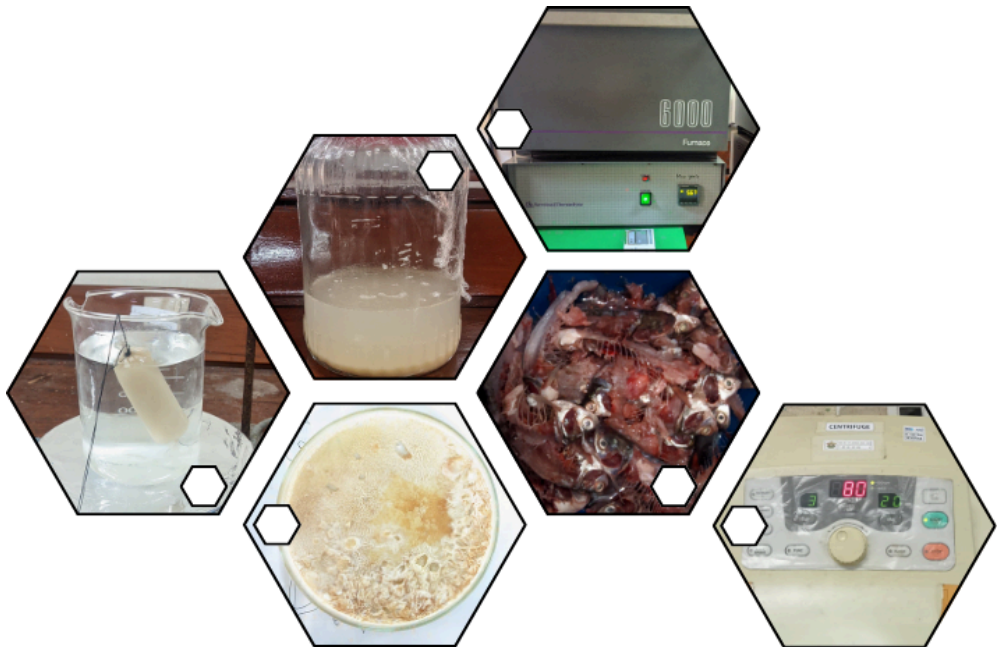


**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN DARI TULANG IKAN TAWES  
(*Barbonymus gonionotus*) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**



**SUKMA FEBRIANTI**

**H031201037**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN DARI TULANG IKAN TAWES  
(*Barbonymus gonionotus*) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

**SUKMA FEBRIANTI**

**H031201037**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN DARI TULANG IKAN TAWES  
(*Barbonymus gonionotus*) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

SUKMA FEBRIANTI

H031201037

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Kimia

pada

**PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**SKRIPSI**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN DARI TULANG IKAN TAWES  
(*Barbonymus gonionotus* DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

**SUKMA FEBRIANTI**  
**H031201037**

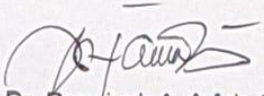
Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana pada tanggal 11 Desember 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan  
pada

Program Studi Kimia  
Departemen Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing tugas akhir

  
**Dr. Ruggayah A. Arfah, M.Si**  
NIP. 19611231 198702 2 002

Mengetahui:

Ketua program studi

  
**Dr. St. Fauziah, M.Si**  
NIP. 19720202 199903 2 002



## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Kolagen dari Tulang Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Rugaiyah A. Arfah, S. Sl., M. Si sebagai Pembimbing Utama). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.



20-Oktober-2024

SUKMA FEBRIANTI  
NIM H031201037

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Kolagen dari Tulang Ikan Tawes (*Barbonymus gonionotus*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan”**. Skripsi ini menjadi salah satu syarat untuk menyelesaikan program studi strata satu (S1) pada Jurusan Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Sholawat serta salam tak lupa pula penulis curahkan kepada Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladan bagi umat manusia.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak baik secara moril, materil maupun spiritual. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih setulus-tulusnya kepada:

1. Ibu **Dr. Rugaiyah A. Arfah, M. Si** selaku dosen pembimbing yang senantiasa memberikan bimbingan, saran, masukan dan arahan selama proses penyelesaian skripsi ini.
2. Ibu **Dr. St. Fauziah, S.Si., M.Si** dan Bapak **Dr. Djabal Nur Basir, S.Si., M.Si** sebagai tim dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan terhadap penyusunan skripsi ini.
3. Kedua orang tua tercinta, Bapak **Musdim, S. Sos** dan Ibu **Mayana**, serta adik saya **Afiqa Ayudia Fitri** dan **Seluruh Keluarga Besar** khususnya paman saya **Robin Alfian, S. Kep., Ns** yang telah memberikan doa dan dukungan yang sangat luar biasa dari awal masa studi hingga saat ini.
4. Teman-teman **I20MER** khususnya **Pengurus HMK FMIPA Unhas periode 2022/2023** yang “Selalu Ada Hingga Akhir” dan juga untuk teman-teman **DIKSAR XXVIII** yang telah menemani berproses di **KSR PMI UNHAS** selama dua tahun lebih.
5. Kawan-kawan **OKEYLICIOUS** dan **SENJA(TA)** yang telah kebersamai selama menjadi mahasiswa serta teman-teman seperjuangan **BIOCHEMISTRY RESEARCHER** yang menemani di laboratorium Biokimia selama penelitian.
6. *Last but not least*, terima kasih kepada diri sendiri yang telah bekerja keras dan pantang menyerah dalam melewati segala proses yang ada.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna karena kesempurnaan hanya milik Allah SWT semata. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca sehingga kedepannya akan lebih baik lagi meskipun tidak sempurna.

**Makassar, 20 Oktober 2024**

**Sukma Febrianti**  
**NIM. H031201037**

## ABSTRAK

SUKMA FEBRIANTI. **Isolasi dan karakterisasi kolagen dari tulang ikan tawes (*barbonymus gonionotus*) dan uji aktivitasnya sebagai antioksidan** (dibimbing oleh Ibu Rugaiyah, A.Arfa).

**Latar belakang.** Kolagen merupakan protein struktural penyusun jaringan tubuh. Tulang ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) dapat menghasilkan kolagen karena kadar proteinnya cukup tinggi. **Tujuan.** Menentukan konsentrasi  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan waktu perendaman berdasarkan nilai derajat pengembangan tertinggi, menentukan % rendemen yang dihasilkan, melakukan karakterisasi (uji kadar air, kadar abu, kadar protein, pH, asam amino, dan analisis gugus fungsi) serta menentukan aktivitas antioksidan kolagen. **Metode.** Penelitian ini terdiri dari pretreatment menggunakan  $\text{NaOH}$  0,1 M, dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M, ekstraksi menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  variasi konsentrasi (0,25; 0,5 dan 0,75 M) dan waktu (24, 48 dan 72 jam), karakterisasi (uji kadar air, abu, protein, pH, analisis asam amino secara kualitatif dan analisis gugus fungsi) dan uji aktivitas antioksidan metode DPPH. **Hasil.** Kolagen tulang ikan tawes memiliki rendemen 1,71% dengan kadar air 16,74%, kadar abu 0,94%, kadar protein 55,87%, dan pH 6,63. Pada uji ninhidrin dan xantoprotein menunjukkan hasil positif dan pada analisis gugus fungsi menunjukkan bahwa sampel memiliki gugus fungsi amida A ( $3348,42\text{ cm}^{-1}$ ), amida B ( $2924,09\text{ cm}^{-1}$ ), amida I ( $1622,13\text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1482,40\text{ cm}^{-1}$ ), dan amida III ( $1234,80\text{ cm}^{-1}$ ). Aktivitas antioksidan menunjukkan nilai  $\text{IC}_{50}$  yaitu 2292,54 mg/L. **Kesimpulan.** Derajat pengembangan tertinggi dihasilkan dari ekstraksi menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,75 M selama 72 jam. Nilai rendemen 1,71% serta hasil uji kadar abu dan pH telah memenuhi SNI(8076:2020). Komposisi asam aminonya yaitu glisin, prolin, tirosin dan fenilalanin serta mengandung gugus fungsi kolagen. Aktivitas antioksidan kolagen sangat lemah.

**Kata kunci:** Antioksidan; FTIR; Kolagen; Tulang Ikan Tawes

## ABSTRACT

SUKMA FEBRIANTI. **Isolation and characterization of collagen from tawes (*barbonymus gonionotus*) bones and its activity test as antioxidant** (supervised by Mrs. Rugaiyah, A. Arfah).

**Background.** Collagen is a structural protein that makes up body tissues. Tawes (*Barbonymus gonionotus*) bones can produce collagen because of its high protein content. **Aim.** Determine the  $\text{CH}_3\text{COOH}$  concentration and soaking time based on the highest development degree value, determine the % yield produced, conduct characterization (water content, ash content, protein content, pH, amino acids, and functional groups) and determine the antioxidant activity of collagen. **Method.** This study consists of pretreatment using  $\text{NaOH}$  0,1 M, and  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 M, extraction using  $\text{CH}_3\text{COOH}$  concentration variations (0,25; 0,5 and 0,75 M) and time (24, 48 and 72 hours), characterization (test water content, ash, protein, pH, qualitative amino acid analysis and functional group analysis and antioxidant activity test DPPH method). **Results.** Tawes bone collagen has a yield of 1,71% with 16,74% moisture content, 0,94% ash content, 55,87% protein content, and pH 6,63. The ninhydrin and xanthoprotein tests showed positive results and the functional group analysis showed that the sample had amide A ( $3348,42\text{ cm}^{-1}$ ), amide B ( $2924,09\text{ cm}^{-1}$ ), amide I ( $1622,13\text{ cm}^{-1}$ ), amide II ( $1482,40\text{ cm}^{-1}$ ), and amide III ( $1234,80\text{ cm}^{-1}$ ) functional groups. Antioxidant activity showed an  $\text{IC}_{50}$  value of 2292,54 mg/L. **Conclusion.** The highest degree of enhancement resulted from extraction using 0,75 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  for 72 hours. The yield value is 1,71% and the test results of ash content and pH have met SNI (8076: 2020). Its amino acid composition is glycine, proline, tyrosine and phenylalanine and contains collagen functional groups. The antioxidant activity is very weak.

**Keywords:** Antioxidant; Collagen; FTIR; Tawes Fish Bone



**DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN**

| <b>Lambang/singkatan</b> | <b>Arti dan penjelasan</b>           |
|--------------------------|--------------------------------------|
| FTIR                     | Fourier Transform Infrared           |
| DP                       | Derajat Pengembangan                 |
| DPPH                     | 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl       |
| IC <sub>50</sub>         | inhibition concentration             |
| Na <sub>2</sub> EDTA     | Disodium Ethylenediaminetetraacetate |
| pH                       | Potential of hydrogen                |
| rpm                      | Revolutions per minute               |
| SNI                      | Standar Nasional Indonesia           |

## DAFTAR ISI

|                                                                          | Halaman |
|--------------------------------------------------------------------------|---------|
| UCAPAN TERIMA KASIH.....                                                 | vi      |
| ABSTRAK.....                                                             | vii     |
| ABSTRACT.....                                                            | viii    |
| DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....                                        | ix      |
| DAFTAR ISI.....                                                          | x       |
| DAFTAR TABEL.....                                                        | xii     |
| DAFTAR GAMBAR.....                                                       | xiii    |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                                                     | xiv     |
| BAB I PENDAHULUAN.....                                                   | 1       |
| 1.1 Latar Belakang.....                                                  | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah.....                                                 | 3       |
| 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....                                    | 3       |
| 1.3.1 Maksud penelitian.....                                             | 3       |
| 1.3.2 Tujuan penelitian.....                                             | 3       |
| BAB II METODE PENELITIAN.....                                            | 4       |
| 2.1 Bahan Penelitian.....                                                | 4       |
| 2.2 Alat Penelitian.....                                                 | 4       |
| 2.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....                                     | 4       |
| 2.4 Prosedur Penelitian.....                                             | 4       |
| 2.4.1 Preparasi sampel.....                                              | 4       |
| 2.4.2 Pretreatment kolagen.....                                          | 5       |
| 2.4.3 Analisis proksimat tulang ikan tawes ( <i>B. gonionotus</i> )..... | 5       |
| 2.4.3.1 Analisis kadar air.....                                          | 5       |
| 2.4.3.2 Analisis kadar abu.....                                          | 5       |
| 2.4.3.3 Analisis kadar protein.....                                      | 6       |
| 2.4.3.4 Analisis kadar lemak.....                                        | 6       |
| 2.4.3.5 Analisis pH.....                                                 | 6       |
| 2.4.4 Ekstraksi kolagen tulang ikan tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....  | 7       |
| 2.4.5 Produksi kolagen tulang ikan tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....   | 7       |
| 2.4.6 Analisis rendemen.....                                             | 8       |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
|                                                                               | x  |
| 2.4.7 Karakterisasi kolagen tulang ikan tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....   | 7  |
| 2.4.7.1 Analisis asam amino.....                                              | 8  |
| 2.4.7.2 Analisis gugus fungsi dengan FTIR.....                                | 8  |
| 2.4.8 Uji aktivitas antioksidan.....                                          | 9  |
| 2.4.8.1 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM.....                                    | 9  |
| 2.4.8.2 Pembuatan larutan induk asam askorbat 500 mg/L.....                   | 9  |
| 2.4.8.3 Pembuatan larutan induk sampel kolagen 5000 mg/L.....                 | 9  |
| 2.4.8.4 Penentuan aktivitas antioksidan asam askorbat dengan metode DPPH..... | 9  |
| 2.4.8.5 Penentuan aktivitas antioksidan kolagen dengan metode DPPH..          | 9  |
| BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....                                             | 11 |
| 3.1 Pretreatment Kolagen.....                                                 | 11 |
| 3.2 Ekstraksi Kolagen dengan CH <sub>3</sub> COOH.....                        | 11 |
| 3.3 Rendemen Kolagen Tulang Ikan Tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....          | 14 |
| 3.4 Karakterisasi Kolagen Tulang Ikan Tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....     | 15 |
| 3.4.1 Analisis proksimat kolagen tulang ikan tawes.....                       | 15 |
| 3.4.2 Asam amino kolagen Tulang Ikan Tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....      | 16 |
| 3.4.3 Gugus fungsi kolagen Tulang Ikan Tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....    | 17 |
| 3.5 Uji Aktivitas Antioksidan.....                                            | 19 |
| BAB IV KESIMPULAN.....                                                        | 21 |
| 4.1 Kesimpulan.....                                                           | 21 |
| 4.2 Saran.....                                                                | 21 |
| DAFTAR PUSTAKA.....                                                           | 22 |
| LAMPIRAN.....                                                                 | 25 |

**DAFTAR TABEL**

| Nomor                                                                                                      | Halaman |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Rendemen kolagen tulang ikan tawes dan beberapa ikan lain.....                                          | 14      |
| 2. Komposisi proksimat kolagen tulang ikan tawes dan beberapa ikan lain.                                   | 15      |
| 3. Hasil uji asam amino.....                                                                               | 16      |
| 4. Karakteristik gugus fungsi kolagen tulang ikan tawes ( <i>B. gonionotus</i> ).....                      | 18      |
| 5. Data aktivitas antioksidan asam askorbat dan kolagen tulang ikan tawes<br>( <i>B. gonionotus</i> )..... | 19      |
| 6. Klasifikasi antioksidan.....                                                                            | 19      |

**DAFTAR GAMBAR**

| Nomor                                                                                                        | Halaman |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Reaksi NaOH dengan Protein.....                                                                           | 11      |
| 2. Reaksi Na <sub>2</sub> EDTA dengan kalsium.....                                                           | 12      |
| 3. Data Pengaruh Konsentrasi dan Waktu Perendaman CH <sub>3</sub> COOH<br>terhadap DP Tulang Ikan Tawes..... | 12      |
| 4. Struktur kolagen.....                                                                                     | 13      |
| 5. Kolagen Tulang Ikan Tawes.....                                                                            | 15      |
| 6. Reaksi Ninhidrin dengan asam amino.....                                                                   | 17      |
| 7. Reaksi pada uji Xantoprotein.....                                                                         | 17      |
| 8. Spektrum infra merah kolagen tulang ikan tawes (B. gonionotus) (b) dan<br>kolagen standar (a).....        | 17      |

**DAFTAR LAMPIRAN**

| Nomor                                                                                    | Halaman |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Bagan Alir Penelitian.....                                                            | 25      |
| 2. Bagan Kerja.....                                                                      | 26      |
| 3. Peta Tempat Pengambilan Sampel.....                                                   | 30      |
| 4. Perhitungan Pembuatan Larutan.....                                                    | 31      |
| 5. Perhitungan Kadar Proksimat (Kadar Air, Kadar Abu, Kadar Protein dan Kadar Lemak..... | 32      |
| 6. Perhitungan Derajat Pengembangan (DP).....                                            | 35      |
| 7. Perhitungan Rendemen Kolagen Tulang Ikan Tawes.....                                   | 36      |
| 8. Spektrum Inframerah Kolagen Tulang Ikan Tawes.....                                    | 37      |
| 9. Perhitungan Pembuatan Larutan Induk dan Deret Standar Antioksidan...                  | 38      |
| 10. Perhitungan Data Aktivitas Antioksidan.....                                          | 40      |
| 11. Dokumentasi Penelitian.....                                                          | 43      |



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia dengan luas lautan lebih banyak dibandingkan daratan. Indonesia memiliki 17.508 pulau dengan panjang garis pantai sekitar 81.000 km. Sekitar tiga perempat (5,8 juta km<sup>2</sup>) wilayah Indonesia merupakan wilayah maritim yang terdiri dari laut pesisir, laut lepas, teluk, dan selat dengan keseluruhannya merupakan perairan laut teritorial dengan luas total kurang lebih 3,1 juta km<sup>2</sup>. Selain laut, Indonesia juga mempunyai luas perairan umum atau perairan tawar kurang lebih 54 juta ha yang terdiri dari sungai, danau, waduk, dan rawa (Kordi, 2008). Salah satu perairan tawar di Indonesia adalah danau Sidenreng yang terletak di Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia, tepatnya di Kabupaten Sidenreng Rappang. Berbagai jenis ikan terdapat di Danau Sidenreng, salah satunya yaitu ikan tawes (Oktaviany et al., 2023).

Ikan tawes yang memiliki nama latin *Barbonymus gonionotus* merupakan salah satu ikan asli Indonesia yang berkembang biak di beberapa perairan dengan air yang jernih dan terdapat aliran air seperti sungai, danau dan rawa-rawa (Haerunnisa, 2021). Menurut Oktaviany et al. (2023) salah satu habitat ikan tawes (*B. gonionotus*) ada di danau Sidenreng dengan jumlah tangkapan sekitar sekitar 1.284 ekor atau 60% dari total hasil tangkapan di perairan tersebut. Berdasarkan data yang diperoleh dari Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Sidenreng Rappang, produksi ikan tawes (*B. gonionotus*) di danau Sidenreng pada tahun 2016 sampai tahun 2020 masing-masing mencapai 501,6 ton, 513,9 ton, 372 ton, 554,6 ton, dan 760,1 ton. Masyarakat setempat memanfaatkan ikan tawes (*B. gonionotus*) untuk dikonsumsi saja (Syam, 2022). Menurut Kiranawati et.al (2021), dalam 100 g daging ikan tawes (*B. gonionotus*) memiliki kandungan gizi sebesar 19 g protein, 13 g lemak, 150 mg fosfor, 150 mg vitamin A dan 48 mg kalsium. Namun, pemanfaatan ikan tawes ini hanya sebatas dagingnya saja, sedangkan bagian lainnya seperti tulang hanya menjadi limbah. Sejauh ini, pemanfaatan limbah tulang ikan belum cukup optimal. Tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) memiliki kadar air 11,14%, kadar abu 52,41%, kadar protein 28,2%, kadar lemak 5,07% dan pH 9,5. Oleh karena itu, pemanfaatan limbah tulang ikan perlu dikembangkan menjadi bahan yang bermanfaat agar tidak berpotensi mencemari lingkungan. Salah satu pemanfaatannya yaitu sebagai bahan baku pembuatan kolagen (Destiana dan Sari, 2018). Menurut Amalia dan Ainiyah (2022) kadar protein yang dimiliki oleh limbah tulang ikan air tawar terbilang cukup untuk diolah menjadi kolagen karena memiliki rendemen sekitar 48-56%. Tulang ikan dapat dimanfaatkan menjadi sumber kolagen karena mengandung anti-aging yang dapat mencegah penuaan dini dan tentunya memberi banyak manfaat pada kulit.

Kolagen merupakan protein struktural yang menyusun jaringan tubuh seperti otot, tulang dan kulit (Djailani et.al., 2016). Secara umum, terdapat sekitar 25-35%

kolagen dari total protein tubuh. Kolagen berfungsi sebagai bahan pembentukan dan pemeliharaan tulang serta dapat merangsang pertumbuhan akar rambut dan memperkuat kuku agar tidak mudah patah. Penggunaan kolagen secara teratur dapat membuat kulit tetap elastis dan menghilangkan bekas luka pada kulit (Peranginangin et al., 2014). Menurut Rahman dan Wathoni, (2020) kolagen mempunyai aktivitas antioksidan yang dapat mencegah terjadinya penuaan, inflamasi, hipertensi, dan kanker sehingga banyak digunakan sebagai bahan aktif maupun bahan tambahan pada makanan, kosmetik, biomedis, ataupun farmasi. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi karena dapat mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga dapat menghambat kerusakan sel tubuh (Kamaluddin, 2024). Aktivitas antioksidan dapat diukur menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) seperti yang telah dilakukan oleh Zakaria (2021) pada kolagen tulang ikan lele.

Secara alamiah, tubuh manusia kehilangan kolagen paling sedikit 1% setiap tahun dan pada usia 40 tahun manusia tidak lagi dapat memproduksi kolagen sehingga kolagen yang hilang mencapai 35-40%. Oleh karena itu, manusia memerlukan kolagen yang berasal dari luar tubuhnya (Kamaluddin, 2024). Namun, selama ini kolagen yang dipasarkan umumnya berasal dari jaringan kulit dan tulang sapi atau babi yang keamanan dan kehalalannya perlu diwaspadai. Salah satu alternatif penggantinya yaitu dengan memanfaatkan limbah dari ikan tawes (*B. gonionotus*) khususnya pada bagian tulang. Untuk memperoleh kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*), tentunya perlu dilakukan isolasi kolagen dari sumbernya guna memperoleh rendemen kolagen murni (Rahman dan Wathoni, 2020).

Beberapa penelitian terkait isolasi kolagen telah dilakukan oleh Awal (2021) dengan menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1 M dan waktu perendaman 4 jam (rendemen 2,84%); Nurwahdawiah (2023) menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,25 M dan waktu perendaman 72 jam (rendemen 0,08%); dan Nurjanah et,al (2021) menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,5 M dan waktu perendaman 72 jam (rendemen 0,8%). Penentuan konsentrasi dan waktu perendaman terbaik dapat diketahui dengan melakukan uji derajat pengembangan (DP). Konsentrasi dan waktu perendaman dengan nilai derajat pengembangan tertinggi dapat dipilih karena sampel mengembang secara maksimal dan mudah memecah ikatan kolagennya sehingga serat kolagen mudah untuk dipisahkan. Hal tersebut juga akan mempengaruhi rendemen kolagen yang dihasilkan dari proses isolasi Nurjanah et,al (2021). Kemudian, kolagen yang dihasilkan akan dikarakterisasi untuk membandingkan dengan nilai SNI kolagen. Adapun penelitian terkait karakterisasi kolagen telah dilakukan oleh Awal (2021) yang memperoleh kadar air 15,81%; kadar abu 0,15%; kadar protein 74,79%; dan pH 5,9. Sementara itu, Kamaluddin (2024) dan Zakaria (2021) memperoleh kadar air 10,02% dan 7,76%; kadar abu 1,39% dan 1,98%; kadar protein 47,36% dan 20,68% serta pH 6,34 dan 4,91. Kamaluddin (2024) dan Zakaria (2021) juga melakukan uji aktivitas antioksidan terhadap kolagen yang dihasilkan dan memperoleh aktivitas antioksidan sangat lemah untuk kolagen tulang ikan kakap merah dan aktivitas antioksidan sedang untuk kolagen tulang ikan lele. Penelitian

lain juga dilakukan oleh Rusma (2021) terhadap kolagen kulit ikan lele dengan aktivitas antioksidan kuat.

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka dilakukanlah penelitian Isolasi dan karakterisasi kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) untuk menentukan % rendemennya dengan perendaman menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dengan konsentrasi dan waktu perendaman berdasarkan nilai derajat pengembangan tertinggi. Kolagen yang dihasilkan akan dikarakterisasi dan diuji aktivitas antioksidannya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. berapa konsentrasi asam asetat dan waktu perendaman sampel tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) berdasarkan nilai derajat pengembangan tertinggi?
2. berapa % rendemen kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) yang diperoleh berdasarkan nilai derajat pengembangan tertinggi?
3. bagaimana karakteristik kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*)?
4. bagaimana aktivitas antioksidan kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*)?

## 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Maksud penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk melakukan isolasi kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) dan menguji aktivitasnya sebagai antioksidan

### 1.3.2 Tujuan penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka dapat ditetapkan tujuan dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. menentukan konsentrasi asam asetat dan waktu perendaman sampel tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) berdasarkan nilai derajat pengembangan tertinggi,
2. menentukan % rendemen kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) berdasarkan konsentrasi nilai derajat pengembangan tertinggi,
3. mengkarakterisasi kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) (kadar air, kadar abu, kadar protein, pH, asam amino, dan gugus fungsi),
4. menentukan aktivitas antioksidan kolagen dari tulang ikan tawes (*B. gonionotus*).

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tulang ikan tawes (*B. gonionotus*), natrium hidroksida (NaOH) (*Merck*), *disodium ethylene diamine tetra acetate* ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (*Merck*), asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  100%) (*Merck*), natrium klorida (NaCl) (*Merck*), membran selofan, perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$  1%), asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%) (*Merck*), asam borat ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  2%), *bromocresol green* 0,1%, *methyl red* 0,1%, kloroform ( $\text{CHCl}_3$  10%), pereaksi Ninhidrin 2%, asam nitrat ( $\text{HNO}_3$  3%), kalium bromida (KBr), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$  98%), asam askorbat, kertas saring dan akuades.

#### 2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Centrifuge* (Tomy MX-305), *Freeze dryer* (Christ Alpha 1-4 1.D plus), cawan petri, neraca analitik (ohaus), oven (Memmert), tanur (Barnstead Thermolyne), cawan porselen, desikator (Duran), seperangkat alat destilasi Kjeldahl, pH meter (ATC pH-009), *hotplate* (Velp Am4), *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) (Shimadzu 820 IPC), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1780), *vortex* (Thermolyne), kain saring dan alat gelas umum di laboratorium.

#### 2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April - September 2024. Penelitian ini telah dilakukan di laboratorium Biokimia, Departemen Kimia FMIPA Unhas; Laboratorium Kimia Terpadu, Departemen Kimia FMIPA Unhas; laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas peternakan Unhas; Laboratorium Kimia Pakan, Teknik Kimia PNUP; dan Laboratorium Kimia Analitik, Departemen Kimia FMIPA Unhas.

#### 2.4 Prosedur Penelitian

##### 2.4.1 Preparasi sampel

Tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) dibersihkan dan dipisahkan dari sisa-sisa daging dan lemak yang masih melekat. Kemudian tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) *didegreasing* dalam air selama 10 menit pada suhu 70°C untuk memisahkan dengan kontaminan lain yang masih menempel. Setelah itu, tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) dipotong-potong menjadi kecil (Kamaluddin, 2024).

### 2.4.2 Pretreatment kolagen

Tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) direndam dalam larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v) selama 12 jam, lalu disaring untuk memisahkan tulang dengan larutan NaOH. Tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil *pretreatment* direndam dalam akuades selama 5 menit dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Kemudian tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) digunakan untuk tahap penelitian berikutnya (modifikasi dari Safithri et al., 2019).

### 2.4.3 Analisis proksimat tulang ikan tawes (*B. gonionotus*)

#### 2.4.3.1 Analisis kadar air

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,4 g dan dimasukkan ke dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobot tetapnya, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Cawan beserta isinya kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian ditimbang hingga diperoleh berat konstan (Rusma, 2021). Kadar air dihitung menggunakan rumus pada persamaan 1.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan: A = berat cawan kosong (g)  
B = berat cawan+sampel awal (g)  
C = berat cawan+sampel kering (g)

#### 2.4.3.2 Analisis kadar abu

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,4 g dan dimasukkan ke dalam cawan porselen yang sudah diketahui berat konstannya, lalu dibakar di atas kompor hingga tidak berasap. Kemudian cawan porselen beserta isinya dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 600°C selama 6 jam, lalu hasil pengabuan dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang. Pekerjaan diulangi hingga diperoleh berat konstan (Rusma, 2021). Kadar abu dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan (2)

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{C-A}{B-A} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan: A = berat cawan kosong (g)  
B = berat cawan+sampel awal (g)  
C = berat cawan+sampel setelah diabukan (g)

### 2.4.3.3 Analisis kadar protein

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,2015 g dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Lalu ditambahkan sebanyak 1 g campuran selenium dan 20 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan dihomogenkan. Labu yang berisi larutan tersebut dimasukkan ke dalam alat pemanas dengan suhu 410°C sampai jernih. Larutan yang telah jernih didinginkan dan diencerkan sampai 100 mL dengan FP 50 kali. Kemudian, sampel hasil pengenceran dipipet sebanyak 2 mL ke dalam labu destilasi, lalu ditambahkan 100 mL akuades dan 5 mL NaOH 30%. Setelah itu, disiapkan labu penampung yang terdiri dari 10 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2% dan campuran (*bromocresol green* 0,1% dan *methyl red* 0,1%) dengan perbandingan 2:1. Destilat yang dihasilkan dititrasi dengan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0103 N (modifikasi dari Kamaluddin, 2024). Kadar protein dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan (4)

$$\text{Protein (\%)} = \frac{V \times N \times 14 \times 6,25 \times FP}{W \times 1000} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan: V : volume titrasi contoh (mL)  
 N : Normalitas larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N)  
 FP : Faktor pengenceran  
 W : Bobot sampel kering (g)

### 2.4.3.4 Analisis kadar lemak

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,5007 g, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berskala 10 mL dan dihipitkan dengan kloroform hingga batas skala. Kemudian tabung ditutup dan dihomogenkan, lalu dibiarkan hingga 24 jam. Selanjutnya, larutan tersebut disaring ke dalam tabung reaksi. Kemudian dipipet sebanyak 2,5 mL ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya. Selanjutnya cawan beserta isinya dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama 8 jam, lalu dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit dan timbang. Kadar lemak dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan (3)

$$\text{Kadar lemak (\%)} = FP \times \frac{C-B}{A} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan: FP = faktor pengenceran  
 A = berat sampel awal (g)  
 B = berat cawan (g)  
 C = berat cawan + sampel kering (g)

### 2.4.3.5 Analisis pH

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,01 g dan ditambah akuades sebanyak 10 mL lalu dipanaskan sampai larut pada suhu 50°C. Kemudian dinyala pH meter dicelupkan bagian elektroda alat ke dalam sampel selama

beberapa saat hingga proyektor pada pH meter menunjukkan angka yang stabil (dimodifikasi dari Kusa et al., 2022).

#### 2.4.4 Ekstraksi kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*)

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil *pretreatment* direndam dengan akuades hingga pH netral, lalu didemineralisasi dengan Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M dengan rasio 1:5 (b/v) selama 2 hari dengan mengganti larutan setiap hari (Zakaria, 2021). Kemudian dilakukan perendaman dengan larutan CH<sub>3</sub>COOH pada suhu ruang, dengan dua faktor perlakuan yaitu variasi konsentrasi CH<sub>3</sub>COOH dan lama waktu perendaman. Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam 9 buah Erlenmeyer yang berbeda, lalu direndam dengan CH<sub>3</sub>COOH variasi konsentrasi 0,25 M; 0,5 M dan 0,75 M dengan perbandingan sampel dan pelarut yaitu 1:10 (b/v) selama rentang variasi waktu perendaman 24; 48; dan 72 jam. Kemudian hasil perendaman disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan endapan. Lalu dilakukan pengukuran derajat pengembangan (DP) terhadap endapan yang diperoleh. Perlakuan dengan nilai DP tertinggi akan digunakan pada tahap berikutnya. Derajat Pengembangan (DP) serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditentukan dengan menggunakan rumus pada persamaan (5).

$$DP (\%) = \frac{(B-A)}{A} \times 100\% \quad (5)$$

Keterangan: A : berat serbuk tulang ikan tawes sebelum perendaman  
B : berat serbuk tulang ikan tawes setelah perendaman

#### 2.4.5 Produksi kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*)

Serbuk tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil demineralisasi direndam menggunakan CH<sub>3</sub>COOH 0,75 M dengan perbandingan berat sampel dan volume pelarut 1:10 (b/v) selama 72 jam. Hasil perendaman kemudian disaring untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat *disalting out* dengan NaCl 2,6 M selama 24 jam dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit untuk mengendapkan residu kolagen. Kemudian endapan dimasukkan ke dalam membran selofan lalu didialisis menggunakan CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M selama 4 jam hingga garam pada residu kolagen hilang. Hilangnya garam ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih jika ditetesi larutan AgNO<sub>3</sub> 1%. Selanjutnya, membran selofan yang berisi kolagen direndam dalam akuades dengan mengganti setiap 4 jam hingga pH akuades menjadi netral. Hasil yang diperoleh berupa kolagen basah yang perlu dikering-bekukan (*freeze dry*) selama 8 jam untuk memperoleh kolagen kering. Selanjutnya, dilakukan analisis rendemen dan karakterisasi kolagen (dimodifikasi dari Awal, 2021).

### 2.4.6 Analisis rendemen

Kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya dengan menggunakan rumus pada persamaan (6).

$$\text{Rendemen kolagen (\%)} = \frac{\text{Berat kolagen kering (g)}}{\text{Berat bahan baku tulang (g)}} \times 100\% \quad (6)$$

### 2.4.7 Karakterisasi kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*)

Karakterisasi kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) meliputi uji kadar air, kadar abu, kadar protein, pH, uji asam amino secara kualitatif (uji Ninhidrin dan Xantoprotein) dan analisis gugus fungsi dengan FTIR. Untuk prosedur uji kadar air, kadar abu, kadar protein dan pH sama dengan analisis proksimat sampel tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) pada sub bab 2.4.3.

#### 2.4.7.1 Analisis asam amino

Analisis asam amino kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan uji Ninhidrin dan uji Xantoprotein. Pada uji Ninhidrin, kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,01 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan larutan NaOH 1 M sebanyak 1 mL. Selanjutnya, ditambah dengan 5 tetes pereaksi Ninhidrin 2% dan dipanaskan selama beberapa menit. Selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif uji Ninhidrin ditandai dengan perubahan warna menjadi ungu/biru (menandakan adanya semua asam amino, amina primer dan sekunder) atau kuning pucat (menandakan adanya asam amino glisin dan prolin) (dimodifikasi dari Subagja et al., 2022).

Pada uji Xantoprotein, kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,01 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 mL akuades. Selanjutnya, ditambahkan 3 tetes HNO<sub>3</sub> pekat dan dipanaskan hingga warna kuning muncul lalu didinginkan dan ditambahkan 5 tetes larutan NaOH. Hasil positif uji Xantoprotein ditandai dengan terbentuknya warna kuning jingga yang menandakan bahwa sampel mengandung asam amino tirosin dan fenilalanin (dimodifikasi dari Astuti dan Fitriyanti, 2020).

#### 2.4.7.2 Analisis gugus fungsi dengan FTIR

Kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,02 g lalu dihaluskan dalam mortar dengan penambahan KBr hingga homogen. Kemudian, dimasukkan ke dalam cetakan pellet dan dipadatkan serta divakum dalam mesin pencetak pellet. Kemudian, pellet dimasukkan ke dalam sel dan dimasukkan pada ruang penempatan sel lalu ditembakkan dengan sinar IR dari spektrofotometer inframerah IR-408 yang sudah dinyalakan pada kondisi stabil. Selanjutnya, dideteksi dengan tombol detektor agar dihasilkan rekorder histogram FTIR yang



menampilkan gugus fungsi sampel dalam bentuk puncak-puncak. Kemudian dilakukan analisis histogram untuk mendapat baik data kualitatif maupun Kuantitatif (Zakaria, 2021).

## **2.4.8 Uji aktivitas antioksidan**

### **2.4.8.1 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM**

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,015 g, dilarutkan dengan metanol di dalam gelas kimia lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dihomogenkan hingga tanda batas lalu dihomogenkan (Susiloningrum dan Sari, 2021).

### **2.4.8.2 Pembuatan larutan induk asam askorbat 500 mg/L**

Asam askorbat ditimbang sebanyak 0,005 g kemudian dilarutkan dengan 10 mL metanol ke dalam botol vial kosong, lalu dihomogenkan untuk memperoleh konsentrasi 500 mg/L. Kemudian, larutan induk asam askorbat 500 mg/L diencerkan menjadi 10 mg/mL dengan cara dipipet larutan sebanyak 0,2 mL dan dilarutkan dengan 9,8 mL metanol (dimodifikasi dari Ida et al., 2023).

### **2.4.8.3 Pembuatan larutan induk sampel kolagen 5000 mg/L**

Kolagen tulang ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,05 g dan dilarutkan dengan 10 mL metanol ke dalam botol vial kosong, lalu dihomogenkan hingga didapatkan konsentrasi 5000 mg/L (dimodifikasi dari Ida et al., 2023).

### **2.4.8.4 Penentuan aktivitas antioksidan asam askorbat dengan metode DPPH**

Penentuan aktivitas antioksidan asam askorbat dilakukan dengan membuat terlebih dahulu deret standar asam askorbat dengan memipet asam askorbat konsentrasi 10 mg/L ke dalam tabung reaksi berbeda dengan masing-masing sebanyak 0,125; 0,25; 0,5; 1; dan 2 mL untuk membuat deret standar 0,25; 0,5; 1; 2; dan 4 mg/L. Selanjutnya ditambahkan masing-masing sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, lalu ditambahkan metanol sebanyak 3,875; 3,75; 3,5; 3; dan 2 mL hingga didapatkan volume masing-masing deret standar sebanyak 5 mL. Kemudian dilakukan inkubasi terhadap deret standar dengan menempatkan pada ruangan gelap dengan suhu ruang selama 30 menit dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm (dimodifikasi dari Zakaria, 2021).

### **2.4.8.5 Penentuan aktivitas antioksidan kolagen dengan metode DPPH**

Larutan induk kolagen dipipet sebanyak 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 dan 3,2 mL untuk membuat deret standar kolagen 200, 400, 800, 1600, dan 3200 mg/L. Lalu ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan metanol sebanyak 3,8; 3,6; 3,2; 2,4 dan 0,8 mL hingga volume masing-masing deret standar sebanyak 5 mL. Kemudian

dibuat larutan kontrol dari 1 mL larutan DPPH 0,4 mM yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah metanol hingga volume 5 mL. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada deret ukur dan larutan kontrol di tempat gelap selama 30 menit pada suhu ruang, lalu diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang maksimum 515 nm dan ditentukan nilai aktivitas antioksidan serta nilai  $IC_{50}$  (dimodifikasi dari Zakaria, 2021). Persentase aktivitas antioksidan nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung dengan rumus pada persamaan (7) dan (8)

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(Ab - As)}{Ab} \times 100\% \quad (7)$$

Keterangan:  $IC_{50}$             Ab        : Absorbansi kontrol  
                                  As        : Absorbansi sampel

Untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$ , digunakan persamaan regresi berikut

$$y = ax + b$$

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (8)$$

Keterangan:  $IC_{50}$         : *Inhibitor concentration* (mg/L)  
                          y        : Variabel terikat  
                          x        : Variabel bebas  
                          a        : Konstanta/*intercept*  
                          b        : Koefisien regresi/*slop*