

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang mempunyai wilayah perairan seluas 6.400 juta km<sup>2</sup> dan panjang garis pantai sebesar 81.000 km (BPS, 2016). Hal tersebut memberi potensi yang besar terhadap keberagaman sumber daya perikanan yang dapat dibuktikan dengan angka total produksi perikanan pada tahun 2022 sebesar 6,41 juta ton, yang terdiri dari 2,02 juta ton produksi perikanan tangkap dan 4,39 juta ton produksi perikanan budidaya (KKP, 2022). Selain itu, dapat dilihat dari banyaknya spesies ikan yang ditemukan di Indonesia yaitu diperkirakan berjumlah 3.200 spesies. Penyebaran spesies ikan yaitu 51% pada perairan laut, 48% pada perairan air tawar, dan 1% yang bergerak dari lingkungan perairan laut ke perairan tawar atau sebaliknya (Samdani et al., 2021). Ikan tawes merupakan salah satu spesies ikan yang dapat ditemui di perairan air tawar.

Ikan tawes (*Barbonymus gonionotus*) merupakan ikan endemik Indonesia yang habitatnya meliputi wilayah rawa, danau, dan sungai yang tergolong dalam perairan berarus deras (Sutarjo, 2021). Total produksi ikan tawes (*B. gonionotus*) pada tahun 2019 yaitu 37,962 ton (KKP, 2020). Kandungan gizi setiap 100 g ikan tawes (*B. gonionotus*) yakni protein sebanyak 19 g, 13 g lemak, 150 mg fosfor, 150 g vitamin A, dan 48 mg kalsium (Kiranawati et al., 2021). Hal tersebut menyebabkan ikan tawes (*B. gonionotus*) banyak dimanfaatkan sebagai ikan konsumsi ekonomis. Namun, konsumsi ikan tawes (*B. gonionotus*) hanya dititikberatkan pada bagian daging. Bagian lainnya misalnya sisik sebagai sisa pengolahan kemudian dapat memberi peluang dihasilkannya limbah yang berdampak negatif pada kelestarian dan keseimbangan lingkungan. Pemanfaatan limbah sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) belum optimal karena sejauh ini hanya dimanfaatkan sebagai bahan mozaik (Sa'adah dan Mutmainah, 2022). Limbah yang dihasilkan memerlukan pengolahan lebih lanjut agar bernilai lebih ekonomis. Salah satu pemanfaatan yang dapat dilakukan yaitu dengan memanfaatkan limbah sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) sebagai sumber kolagen. Limbah sisik ikan dapat menjadi sumber kolagen karena sisik ikan kaya akan protein terutama kolagen (Basu et al., 2008). Berdasarkan uji pendahuluan pada sampel serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) diperoleh nilai kadar protein, kadar air, kadar abu, dan kadar lemak berturut-turut sebesar 51,52%, 12,41%, 22,91%, dan 0,04%, sehingga sisik ikan tawes dapat dimanfaatkan sebagai sumber kolagen.

Kolagen adalah protein fibrosa yang merupakan komponen utama jaringan ikat dan merupakan protein yang paling banyak jumlahnya dalam tubuh mamalia. Kolagen dijumpai di tendon, tulang, kulit, pembuluh darah, dan kornea mata. Kolagen mengandung sekitar 33% glisin dan 21% prolin serta hidroksiprolin, suatu asam amino yang dihasilkan melalui modifikasi pascatranslasi residu prolin (Marks et al., 2000). Kolagen mempunyai struktur yang molekul-molekulnya terdiri dari polipeptida yang membentuk spiral atau *helix*. Polipeptida tersebut terbentuk dari tiga rantai sehingga disebut *triple helix* yang masing-masing mengandung satu atau lebih pengulangan asam amino dengan struktur Gly-X-Y (Soeparno et al., 2018).

Secara umum kolagen tersusun atas 3 tingkatan yaitu mengandung beberapa jenis residu asam amino seperti glisin yang berjumlah 33% dari residu asam amino total, prolin yang berjumlah 12%, serta hidroksiprolin dan hidroksilisin; terdapat struktur sekunder yang memiliki *triple* heliks yang merupakan gabungan dari tiga rantai. *Triple* heliks yang kemudian disebut tropokolagen merupakan satuan struktur dasar dari kolagen. Tropokolagen berbentuk batang dengan diameter 15 Å dan panjang 3000 Å. Ketiga rantai heliks tropokolagen mengikat hidrogen satu dengan yang lain dengan perantara gugus peptida -NH yang berasal dari residu glisin dan gugus peptida -C=O pada rantai; dan tropokolagen yang memiliki ikatan kovalen selanjutnya membentuk suatu ikatan-ikatan disebut mikrofibril yang dapat terbentuk dari ikatan paralel berperan dalam pembentukan urat dan kulit (Katili, 2009).

Kolagen adalah protein alami yang dapat ditemukan pada tubuh hewan vertebrata dan invertebrata (Peranginangin, 2014). Kolagen memiliki peran dalam fungsi biologis sel di antaranya kelangsungan hidup sel, proliferasi, dan diferensiasi. Kolagen juga membantu penyembuhan tulang atau pembuluh darah yang rusak. Kolagen banyak dimanfaatkan di bidang industri seperti kosmetik, farmasi, medis, dan makanan. Hal tersebut karena kolagen memiliki biokompatibilitas yang tinggi, tidak beracun, dan mudah terurai secara hayati (Sionkowska et al., 2020).

Menurut Chi et al. (2014), kolagen juga memiliki aktivitas antioksidan yang dapat mencegah terjadinya penuaan, inflamasi, hipertensi, dan kanker. Aktivitas antioksidan pada kolagen merupakan sifat dari senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul reaktif lainnya, sehingga menghambat kerusakan sel dalam tubuh (Sarma et al., 2010). Antioksidan dimanfaatkan untuk pencegahan stres oksidatif. Stres oksidatif ini adalah kondisi ketika jumlah radikal bebas dan jumlah antioksidan dalam tubuh tidak seimbang. Radikal bebas mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbitalnya yang menyebabkan senyawa ini bersifat reaktif dan mampu mengoksidasi molekul di sekitarnya seperti lipid, protein, DNA, dan karbohidrat. Antioksidan yang bersifat oksidatif akan dioksidasi oleh radikal bebas sehingga molekul lain terlindungi dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas (Wherdasari, 2014).

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan menggunakan metode DPPH (difenil-2-pikrihidrazil). Metode ini digunakan karena sederhana, cepat, mudah, dan sensitif terhadap sampel dengan konsentrasi yang kecil. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga dapat digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas. Metode ini didasarkan pada reduksi dari larutan metanol radikal bebas. DPPH akan tereduksi bila larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron. Hal ini menyebabkan warna ungu akan memudar lalu digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Prayoga, 2013). Parameter untuk menginterpretasikan hasil uji dengan metode DPPH yaitu  $IC_{50}$  yang merupakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka semakin kuat antioksidan dalam menangkal radikal bebas (Andayani et al., 2008). Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH telah dilakukan oleh Rusma (2021) dengan menggunakan kolagen dari kulit ikan lele (*Clarias gariepinus*) dan diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 70,30 mg/L. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh diklasifikasikan sebagai antioksidan kuat. Penelitian yang dilakukan oleh

Nurwahdawiah (2023) menunjukkan bahwa kolagen cangkang kerang hijau menghasilkan aktivitas antioksidan sangat lemah dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 867,76 mg/L. Menurut Prastyo et al. (2020), kolagen kulit ikan nila memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 93,32 mg/L yang digolongkan sebagai antioksidan kuat. Ardhani et al. (2020) memperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 926,25 mg/L dari kolagen kulit ikan parang-parang yang digolongkan sebagai antioksidan sangat lemah.

Besarnya manfaat kolagen membuat kebutuhan akan kolagen juga meningkat. Namun, kebutuhan kolagen yang tinggi berbanding terbalik dengan produksi kolagen di Indonesia yang belum optimal. Hal ini ditunjukkan oleh data *International Trade Center* (2016) bahwa Indonesia mengimpor kolagen lebih dari 6.200 ton per tahunnya. Oleh karena itu, digunakan limbah sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) sebagai sumber alternatif kolagen karena sumber kolagen pada mamalia seperti sapi dan babi tidak dapat dimanfaatkan secara umum karena adanya larangan pada agama tertentu dan adanya isu penyakit sapi gila atau *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) dan flu babi yang dapat ditransmisikan pada manusia yang mengonsumsinya (Muralidharan et al., 2013).

Kolagen dapat dihasilkan dari isolasi dengan cara ekstraksi. Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan metode kimiawi dan enzimatis. Ekstraksi kimiawi salah satunya dengan menggunakan asam. Asam asetat merupakan asam organik yang memiliki kemampuan mengekstrak kolagen lebih baik dibandingkan pelarut lain seperti asam sitrat dan asam klorida (Ariyanti et al., 2018). Asam asetat mampu melarutkan senyawa bukan kolagen dan ikatan kolagen silang. Hasil ekstraksi dan kelarutannya dipengaruhi oleh konsentrasi asam asetat. Sebelum dilakukan ekstraksi terlebih dahulu dilakukan perendaman dengan alkali kuat untuk menghilangkan protein nonkolagen. Larutan alkali yang digunakan yaitu NaOH yang mampu menghilangkan protein nonkolagen tanpa menghilangkan protein kolagen yang ada pada bahan baku (Liu et al., 2015).

Penelitian mengenai isolasi kolagen dari ikan telah dilakukan oleh Ramdhani (2016) yaitu mengisolasi kolagen sisik ikan dari limbah pabrik fillet ikan dengan metode ekstraksi asam asetat menggunakan variasi konsentrasi dan waktu perendaman yang berbeda. Kemudian, diperoleh rendemen terbanyak pada konsentrasi asam asetat 1 M selama 7 jam dan pH 6,62 yaitu sebesar 9,54%. Menurut Ramadani et al. (2024), rendemen kolagen tertinggi pada sisik ikan julung-julung diperoleh pada perendaman dengan asam asetat 0,7 M selama 72 jam sebesar 4,77%. Wahyuddin (2024) memperoleh rendemen tertinggi dari kolagen sisik ikan kakap merah pada perendaman dengan asam asetat 0,2 M selama 58 jam sebesar 0,21%. Isolasi kolagen dari cangkang kerang hijau yang dilakukan oleh Nurwahdawiah (2023) pada konsentrasi 0,25 M selama 72 jam diperoleh rendemen 0,33 %. Kolagen dari gelembung renang ikan patin menghasilkan rendemen sebesar 16,04% yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan asam asetat 0,50 M selama 48 jam (Sitepu et al., 2019). Penelitian dengan memanfaatkan kulit ikan tawes sendiri telah dilakukan oleh Awal (2021), yang menggunakan pelarut konsentrasi asam asetat 1 M dan direndam selama 4 jam, kemudian diperoleh rendemen sebesar 2,84%. Penentuan konsentrasi dan waktu perendaman terbaik diketahui dengan melakukan uji derajat pengembangan (DP). Konsentrasi dan waktu perendaman yang memiliki DP tertinggi dapat dipilih karena terjadinya pengembangan pada sampel secara maksimal karena masuknya air ke

dalam serat kolagen sehingga terjadi kerusakan struktur kolagen dan akan melarutkan kolagen pada asam asetat (Jaswir et al., 2011).

Kolagen yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi. Karakterisasi kolagen dari penelitian yang dilakukan oleh Pati et al. (2010) yaitu pada kolagen dari sisik ikan rohu (*Labeo rohita*) dan catla (*Catla catla*). Kedua jenis ikan ini ditemukan pada sungai dan danau di Asia Selatan dan Asia Tenggara. Isolasi menggunakan ekstraksi metode asam menggunakan asam asetat dengan konsentrasi 0,5 M, waktu perendaman selama 48 jam, dan pH 2,5. Hasil yang diperoleh yaitu rendamen sebesar 5%. Analisis menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi Amida I ( $1653\text{ cm}^{-1}$ ,  $1643\text{ cm}^{-1}$ ) Amida II ( $1463\text{ cm}^{-1}$ ,  $1454\text{ cm}^{-1}$ ), Amida III ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ), Amida A ( $3440\text{ cm}^{-1}$ ), dan Amida B ( $2923\text{ cm}^{-1}$ ,  $2935\text{ cm}^{-1}$ ). Selain itu diperoleh beberapa jenis asam amino pada ikan rohu yaitu glisin 361%, prolin 110%, dan hidroksiprolin 83%, sedangkan pada ikan catla yaitu glisin 353%, prolin 130%, dan hidroksiprolin 84%. Karakteristik kolagen dari kulit ikan tawes yang diperoleh dari penelitian Awal (2021) yakni mengandung gugus fungsi Amida I, II, III, A, dan Amida B; asam amino dominan glisin 23,31%, prolin 10,80%, dan arginin 8,23%. Sahubawa dan Putra (2011) melakukan penelitian mengenai pengaruh konsentrasi asam asetat dan waktu ekstraksi terhadap kolagen dari kulit ikan nila dengan variasi konsentrasi 0,25 M, 0,50 M, dan 0,75 M dan waktu ekstraksi 16 dan 48 jam. Rendamen tertinggi sebesar 5,97% diperoleh pada konsentrasi 0,75 M dan waktu 16 jam. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa kolagen kulit ikan nila memiliki kandungan asam amino glisin 52,99%, alanin 22,08%, dan asam glutamat 7,45%. Penelitian juga dilakukan oleh Tangka'a et al. (2020) pada kulit ikan situhuk hitam dengan variasi konsentrasi asam asetat 0,7 M dan 0,9 M serta waktu perendaman selama 24 jam. Rendamen terbanyak diperoleh pada konsentrasi asam asetat 0,9 M dan lama waktu perendaman 24 jam sebesar 4,77%. Kadar air dan pH optimum diperoleh dari konsentrasi asam asetat 0,7 M dan lama waktu perendaman 24 jam yaitu 15,13% dan 6,45. Pada penelion yang dilakukan oleh Pratiwi et al. (2023), diperoleh karakteristik kolagen kulit ikan payus dengan nilai rendemen 1,26%, pH 6,8, kadar air 8,9%, dan asam amino dominan asam glutamat 8,18%, asam aspartat 6,41%, dan glisin 5,42%. Hasil ini diperoleh dari ekstraksi menggunakan pelarut asam asetat selama 2 jam. Kolagen dari gelembung renang ikan cunang yang diekstraksi dengan asam asetat 0,5 M selama 48 jam memiliki kadar protein 89,48%, gugus fungsi amida I, II, dan III, serta asam amino dominan glisin 26,03%, prolin 10,05%, dan alanin 10,68% (Kartika et al., 2016). Kolagen dari kulit ikan gabus memiliki karakteristik kadar air 6,01%, kadar abu 0,69%, kadar protein 92,41%, pH 6,68, gugus fungsi amida A ( $3304,06\text{ cm}^{-1}$ ), amida B ( $2922,16\text{ cm}^{-1}$ ), amida I ( $1635,64\text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1544,12\text{ cm}^{-1}$ ), dan amida III ( $1236,37\text{ cm}^{-1}$ ) (Agustin et al., 2023). Penelitian lainnya dilakukan oleh Nurhidayah et al. (2019), dengan membandingkan kandungan kolagen pada sisik ikan bandeng dan sisik ikan nila menggunakan metode ekstraksi dengan asam asetat. Konsentrasi asam asetat dan waktu perendaman yang digunakan adalah 0,5 M dan 48 jam, diperoleh rendamen sisik ikan bandeng 0,3 % dan ikan nila 0,29 %. Kadar air, kadar abu, dan kadar protein untuk ikan bandeng yaitu 24,50%, 21,90%, dan 49,16%, sedangkan pada ikan nila sebesar 19,05%, 20,15% dan 53,01%.

Terdapat faktor-faktor yang dapat meningkatkan hasil ekstraksi antara lain rasio pelarut, volume bahan baku, penghilangan kadar air, dan spesies ikan. Rasio yang

tinggi akan meningkatkan volume pelarut sehingga terjadi perpindahan massa antara pelarut dan sampel yang lebih mudah. Volume bahan baku yang digunakan juga dapat meningkatkan hasil akhir ekstraksi. Semakin tinggi volume bahan yang digunakan maka hasil dari ekstraksi akan semakin tinggi. Tinggi atau rendahnya nilai protein yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh besarnya kandungan air yang terdehidrasi (hilang) dari bahan. Semakin besar jumlah air yang hilang selama proses ekstraksi maka nilai protein yang terukur akan semakin tinggi (Okmawati dan Rosmawati, 2013).

Dengan demikian, pada penelitian ini isolasi kolagen dilakukan dengan memanfaatkan sisik ikan tawes (*B. gonionotus*). Penelitian dilakukan dengan metode ekstraksi kimiawi menggunakan asam asetat yang dengan variasi konsentrasi dan waktu perendaman agar diperoleh kondisi optimum untuk mendapatkan kolagen yang maksimal. Selain itu, dilakukan pula uji aktivitas antioksidan pada kolagen dari sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) yang dihasilkan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka dirumuskan masalah sebagai berikut :

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

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

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

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai kandungan asam amino, nilai pH, gugus fungsi, dan aktivitas antioksidan dari kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*).

## **BAB II**

### **METODE PENELITIAN**

#### **2.1 Bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sisik ikan tawes (*B. gonionotus*), NaOH p.a (Merck), Na<sub>2</sub>EDTA (Merck), CH<sub>3</sub>COOH *glacial* (Merck), NaCl teknis (Merck), AgNO<sub>3</sub> 1%, membran selofan, DPPH (difenil-2-pikrihidazil), metanol p.a (Merck), asam askorbat (Merck), KBr (Merck), kloroform (Merck), pereaksi ninhidrin 2%, HNO<sub>3</sub> pekat (Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a (Merck), HCl p.a (Merck), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2%, akuades, *bromoscerol green* 0,1%, metil merah 0,1%, dan kertas saring.

#### **2.2 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan yaitu *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) (Shimadzu 820 IPC), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1780), *freezer*, *freeze dryer* (Christ Alpha 1-4 I.D plus), pH meter (Atc pH-009), rangkaian alat Kjeldahl, *vortex* (Maxi Max II), sentrifugasi (Tomy MX-305), neraca analitik (Ohaus), cawan porselen, cawan petri, desikator, tanur (Nabertherm), kain saring, oven, blender, ayakan 60 mesh, dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

#### **2.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia, laboratorium Kimia Terpadu, laboratorium Kimia Analitik, Departemen Kimia FMIPA Unhas; Laboratorium Kimia Pakan, Fakultas Peternakan Unhas; dan Laboratorium Kimia Pakan, Teknik Kimia, PNUP yang dilaksanakan pada Maret - September 2024.

#### **2.4 Prosedur Penelitian**

##### **2.4.1 Preparasi sampel**

Ikan tawes (*B. gonionotus*) dibersihkan dan diambil sisiknya. Sisik yang sudah disiapkan dibersihkan dari kotoran menggunakan air bersih. Setelah bersih, sisik dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C (Ramdhani, 2016).

##### **2.4.2 Pretreatment**

Sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) kering sebanyak 310 g direndam dalam larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v) selama 12 jam pada suhu ruang. Sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil perendaman dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam (Huang et al., 2016). Setelah kering, sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) dihaluskan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh (Sidauruk et al., 2014). Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu ruang untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

### 2.4.3 Analisis kadar proksimat sisik ikan tawes

#### 2.4.3.1 Analisis kadar air (AOAC, 2005).

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,4 g lalu dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui berat tetapnya, kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Selanjutnya, cawan porselen yang berisi sampel tersebut didinginkan di dalam desikator selama 30 menit lalu ditimbang. Perlakuan tersebut diulangi hingga diperoleh bobot yang tetap. 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 (AOAC, 2005).

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,4 g, dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui bobot tetapnya, lalu dibakar di atas kompor listrik 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. Perlakuan tersebut diulangi hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung 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 (AOAC, 2005).

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,2 g dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, kemudian ditambahkan  $\pm 1$  g campuran selenium dan 10-25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Labu yang telah berisi campuran larutan tersebut dimasukkan ke dalam alat pemanas dengan suhu 410°C. Proses ini dilakukan hingga larutan menjadi jernih. Larutan kemudian didinginkan dan diencerkan hingga 100 mL, lalu dipipet sebanyak 2 mL ke dalam labu destilasi dan ditambahkan 100 mL akuades dan 5 mL NaOH 30%. Hasil destilasi ditampung dalam labu penampung yang telah ditambahkan 10 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2% dan larutan indikator campuran (*bromocresol green* 0,1% dan *methyl red* 0,1% rasio 2:1). Destilat yang dihasilkan dititrasi dengan HCl 0,0105 N hingga larutan berubah menjadi merah muda. Volume titran dibaca dan dicatat. Kadar protein dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan (3).

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{V \times N \times 14 \times 6,25 \times FP}{W \times 1000} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

- V = volume HCl untuk titrasi sampel (mL)  
 N = normalitas HCl standar yang digunakan (N)  
 FP = faktor pengenceran  
 W = bobot sampel kering (g)

#### 2.4.3.4 Analisis kadar lemak (AOAC, 2005).

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 1 g lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berskala 10 mL. Ditambahkan kloroform hingga tanda batas dan ditutup rapat, kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 24 jam, lalu disaring ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dipipet 2,5 mL ke dalam cawan yang telah diketahui berat tetapnya, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100°C selama 8 jam. Cawan beserta isinya dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang. Kadar lemak dihitung dengan menggunakan rumus pada persamaan (4).

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \text{FP} \frac{\text{C} - \text{B}}{\text{A}} \times 100\% \quad (4)$$

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

#### 2.4.3.5 Analisis pH.

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) sebanyak 0,01 g ditambahkan dengan 10 mL akuades, lalu dipanaskan selama 15 menit pada suhu 50°C dan dihomogenkan. Selanjutnya, alat pH meter dinyalakan dan dibiarkan hingga stabil. Elektroda pada alat pH meter dicelupkan ke dalam larutan hingga diperoleh angka yang stabil pada proyektor pH meter (Modifikasi dari Safithri, 2019).

#### 2.4.4 Demineralisasi

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil *pretreatment* dinetralisasi pH-nya dengan akuades. Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) kemudian didemineralisasi dengan Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M pada pH 7,4 dan rasio 1:5 (b/v) selama 2 hari dengan mengganti larutan Na<sub>2</sub>EDTA setiap 24 jam (Awal, 2021).

#### 2.4.5 Optimasi ekstraksi kolagen (Modifikasi dari Nurwahdawiah, 2023)

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil demineralisasi direndam dengan larutan asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH) pada suhu ruang untuk proses optimasi ekstraksi kolagen yang ditunjukkan pada Tabel 1. Proses ini dilakukan dengan dua faktor perlakuan, yaitu variasi konsentrasi asam asetat dan lama waktu perendaman. Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil demineralisasi dimasukkan ke dalam 9 buah Erlenmeyer yang berbeda masing-masing sebanyak 3 g. Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) selanjutnya direndam dalam larutan asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH) dengan variasi

konsentrasi (0,25 M; 0,50 M; dan 0,75 M) rasio 1:10 (b/v) dengan variasi waktu perendaman pada setiap konsentrasi yaitu 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Hasil perendaman kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan endapan. Pada tahap ini dilakukan uji derajat pengembangan (DP) terhadap endapan yang diperoleh. Perlakuan dengan nilai DP tertinggi digunakan pada tahap produksi kolagen.

**Tabel 1.** Optimasi Ekstraksi Kolagen

Waktu (Jam)	[CH <sub>3</sub> COOH] (M)
24	0,25
	0,50
	0,75
48	0,25
	0,50
	0,75
72	0,25
	0,50
	0,75

Derajat pengembangan (DP) ditentukan menggunakan rumus pada persamaan (5).

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

Keterangan: A : berat serbuk sisik ikan tawes sebelum perendaman asam asetat  
B : berat serbuk sisik ikan tawes setelah perendaman asam asetat

#### 2.4.6 Produksi kolagen pada kondisi optimum

Serbuk sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) hasil demineralisasi direndam dengan asam asetat dengan menggunakan konsentrasi dan waktu perendaman berdasarkan derajat pengembangan terbaik yaitu 0,50 M selama 72 jam, selanjutnya disaring dengan kain saring untuk memisahkan antara filtrat dan endapan. Filtrat *disalting out* dengan NaCl 2,6 M selama 24 jam dan disentrifus pada kecepatan 8000 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dari proses sentrifus didialisis menggunakan membran selofan terhadap asam asetat 0,1 M yang diganti setiap 4 jam hingga garam pada rendemen kolagen hilang (ditandai dengan tidak terbentuknya endapan putih jika ditetesi larutan AgNO<sub>3</sub> 1% ). Selanjutnya, membran yang berisi kolagen direndam di dalam akuades yang diganti setiap 2 jam hingga pH akuades menjadi 5 atau lebih. Hasil yang diperoleh berupa kolagen basah dikering-bekukan (*freeze dry*) selama 24 jam untuk memperoleh kolagen kering dalam bentuk lembaran (Awal, 2021). Kolagen kering yang diperoleh digunakan untuk tahap analisis berikutnya.

#### 2.4.7 Analisis rendemen (AOAC, 2005)

Nilai rendemen kolagen diperoleh dari perbandingan berat kering kolagen yang dihasilkan dengan berat bahan baku sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) yang dapat dihitung dengan persamaan (6).

$$\text{Rendemen kolagen (\%)} = \frac{\text{berat kering kolagen}}{\text{berat bahan baku sisik}} \times 100\% \quad (6)$$

#### 2.4.8 Karakterisasi kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*)

Karakterisasi kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) meliputi analisis kadar air, kadar abu, kadar protein, pH, uji ninhidrin, uji xantoprotein, dan analisis gugus fungsi dengan FTIR. Adapun prosedur analisis kadar air, kadar abu, kadar protein, dan pH dapat dilihat pada sub bab 2.4.3.

##### 2.4.8.1 Analisis asam amino (Modifikasi dari Subroto et al., 2020).

Analisis asam amino kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) dilakukan secara kualitatif menggunakan uji ninhidrin dan uji xantoprotein. Pada uji ninhidrin, kolagen SIT sebanyak 0,01 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL NaOH 1 M dan 5 tetes pereaksi ninhidrin 2%, lalu dipanaskan dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji positif ditandai dengan perubahan warna menjadi ungu atau biru dan kuning pucat. Perubahan warna menjadi biru atau ungu menandakan adanya asam amino yang memiliki gugus alfa amino bebas seperti alanin, valin, isoleusin, dan metionin. Perubahan warna menjadi kuning pucat menunjukkan adanya asam amino glisin dan prolin.

Pada uji xantoprotein, kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,01 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL akuades. Campuran kolagen dan akuades kemudian ditambahkan 3 tetes HNO<sub>3</sub> pekat dan dipanaskan hingga muncul warna kuning. Campuran didinginkan dan ditambahkan 10 tetes NaOH 1 M. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning jingga yang menunjukkan bahwa sampel mengandung asam amino dengan gugus aromatik.

##### 2.4.8.2 Analisis gugus fungsi dengan FTIR (Yan et al., 2008).

Kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) sebanyak 0,02 g dicampur dengan 100 mg KBr dan dihaluskan dalam mortar, lalu dimasukkan ke dalam cetakan pellet dan dipadatkan serta divakum dalam mesin pencetak pellet. Pellet dimasukkan ke dalam sel dan dimasukkan ke dalam ruang penempatan sel, lalu ditembakkan dengan sinar IR dari spektrofotometer inframerah IR-408. Pengukuran dilakukan pada bilangan gelombang 4000-500 cm<sup>-1</sup>. Spektra FTIR yang diperoleh menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang dari kolagen yang diuji. Gugus fungsi ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terdeteksi untuk wilayah serapan gugus fungsi protein.

## 2.4.9 Aktivitas antioksidan

### 2.4.9.1 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM.

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,015 g dan dilarutkan menggunakan metanol p.a gelas kimia, kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas, lalu dihomogenkan (Ikhrar et al., 2019).

### 2.4.9.2 Pembuatan larutan asam askorbat 500 mg/L.

Asam askorbat ditimbang sebanyak 0,005 g dan dilarutkan dengan 10 mL metanol p.a ke dalam botol vial kosong, lalu dihomogenkan hingga didapatkan konsentrasi 500 mg/L (Ikhrar et al., 2019).

### 2.4.9.3 Pembuatan larutan induk sampel kolagen 10000 mg/L.

Sampel kolagen sisik ikan tawes (*B. gonionotus*) ditimbang sebanyak 0,1 g dan dilarutkan dengan 10 mL metanol p.a ke dalam botol vial kosong, lalu dihomogenkan (Ikhrar et al., 2019).

### 2.4.9.4 Penentuan aktivitas antioksidan asam askorbat dengan metode DPPH.

Penentuan aktivitas antioksidan dari asam askorbat dilakukan dengan membuat terlebih dahulu deret standar asam askorbat dengan memipet asam askorbat konsentrasi 500 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. Deret standar ditambahkan masing-masing sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Selanjutnya, deret standar ditambahkan metanol p.a masing-masing sebanyak 3,875; 3,75; 3,5; 3; dan 2 mL sehingga diperoleh volume total sebanyak 5 mL. Deret standar diinkubasi dengan ditempatkan pada ruangan gelap dengan suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 512 nm (Zakaria, 2021).

### 2.4.9.5 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 ukur 400; 800; 1600; 3200; dan 6400 mg/L. Selanjutnya ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan metanol p.a hingga volume 5 mL ke dalam larutan deret ukur, lalu dibuat larutan kontrol dari 1 mL larutan DPPH 0,4 mM yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah metanol p.a hingga volume 5 mL. Setelah itu, deret ukur dan larutan kontrol diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit pada suhu ruang, lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 512 nm (Zakaria, 2021). Kemudian dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan rumus pada persamaan (7).

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (7)$$

Untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$  digunakan persamaan regresi yang dapat dilihat pada persamaan (8) dan (9).

$$y = ax + b \quad (8)$$

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (9)$$

Keterangan:  $IC_{50}$  = *inhibitor concentration* (mg/L)  
y = variabel terikat  
x = variabel bebas  
a = konstanta/*intercept*  
b = koefisien regresi/*slope*

