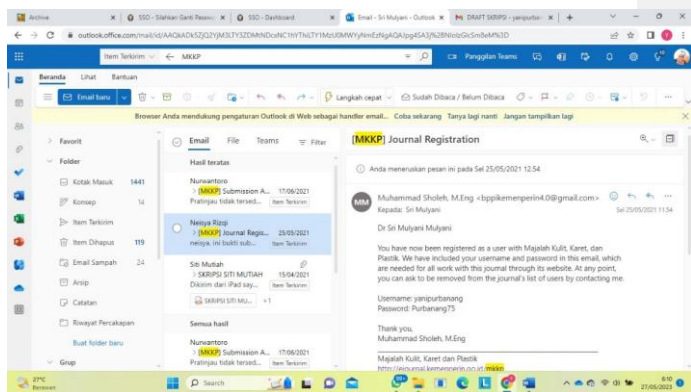
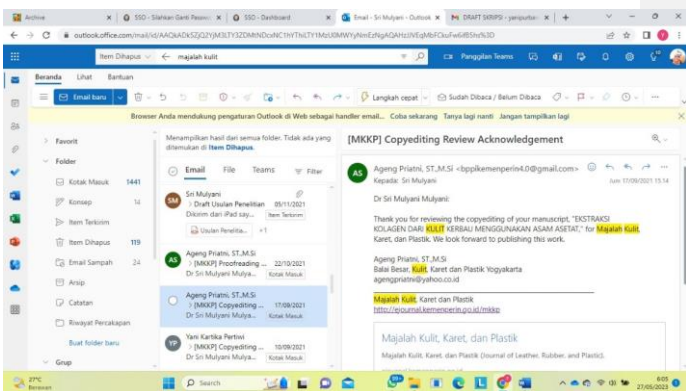
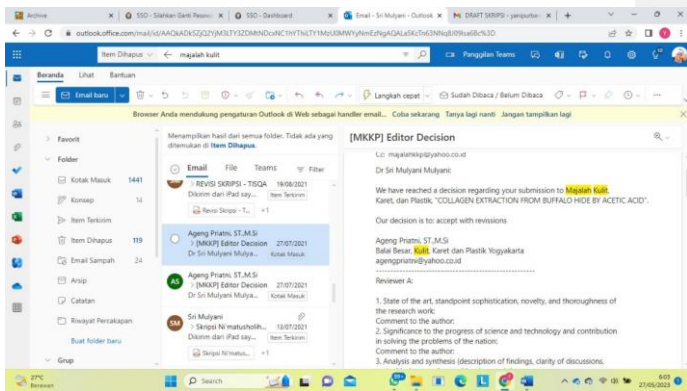


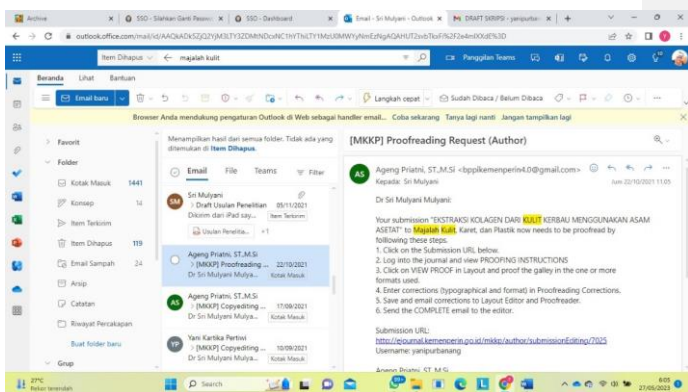
Bukti Korespondensi artikel "COLLAGEN EXTRACTION FROM BUFFALO HIDE BY ACETIC ACID"

An. Dr. Sri Mulyani

No	Tanggal	Aktivitas Korespondensi
1	25/05/2021	Submit
2	27/07/2021	Revisi reviewer A & B decision accepted
3	02/09/2021	Accepted untuk publish
4	17/09/2021	Copy editing manuskrip
5	22/10/2021	Galley Proof (menjelang publish)







EKSTRAKSI KOLAGEN DARI KULIT KERBAU MENGGUNAKAN ASAM ASETAT

EXTRACTION OF COLLAGEN FROM BUFFALO HIDE BY ACETIC ACID

ABSTRACT

Buffalo hide was the potential as an alternative raw material for making halal collagen as a substitute for cow and porcine origin, but the complexity of buffalo hide is higher than cattle hide and pigskin. Acetic acid is a weak acid that is able to extract collagen well. The aim of the study was to determine the interaction and effect of various concentrations of acetic acid and extraction time on collagen quality including yield, water content and collagen characteristics based on molecular weight and functional groups. This study was carried out

experimentally that used completely randomized design with factorial scheme. There were concentrations of acetic acid 3%, 5%, 7%, and extraction times 48 and 72 hours, each treatment was repeated four times. The optimum result of collagen extraction is using a concentration of 1 M acetic acid with 72 hours extraction time that produced collagen with $1.42 \pm 0.27\%$ yield based on the concentration factor and $1.70 \pm 0.35\%$ yield based on the extraction time factor, $4.19 \pm 0.14\%$ water content, and it was identified that collagen has not yet been degraded into gelatin based on molecular weight and functional groups.

Keywords: collagen, buffalo hide, acetic acid

ABSTRAK

Kulit kerbau berpotensi sebagai bahan baku alternatif pembuatan kolagen halal pengganti sapi dan babi, namun kompleksitas kulit kerbau diduga lebih tinggi dibandingkan kulit sapi maupun babi. Asam asetat merupakan asam lemah yang mampu mengekstraksi kolagen dengan baik. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui interaksi dan pengaruh berbagai konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi terhadap kualitas kolagen diantaranya rendemen, kadar air serta karakteristik kolagen berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pola faktorial yang terdiri dari faktor tingkat penggunaan konsentrasi asam asetat sebesar 0,5 M; 1 M; 1,5 M serta lama ekstraksi 48 jam dan 72 jam. Perlakuan diulang sebanyak empat kali. Hasil optimum ekstraksi kolagen adalah menggunakan konsentrasi asam asetat 1 M dengan lama ekstraksi 72 jam yang dapat menghasilkan kolagen dengan rendemen $1,42 \pm 0,27\%$ berdasarkan faktor konsentrasi dan $1,70 \pm 0,35\%$ berdasarkan faktor lama ekstraksi, kadar air $4,19 \pm 0,14\%$, serta teridentifikasi bahwa kolagen belum mengalami degradasi menjadi gelatin berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi.

Kata kunci: kolagen, kulit kerbau, asam asetat.

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan salah satu jenis protein yang jumlahnya mendominasi dari total protein tubuh makhluk hidup secara keseluruhan yakni mencapai 30%. Kolagen merupakan penyusun jaringan pengikat yang salah satunya dapat ditemukan di bagian kulit (Darmanto *et al.*, 2012). Kulit merupakan salah satu hasil samping dari pemotongan hewan ternak seperti kerbau yang keberadaannya cukup melimpah di Indonesia serta memiliki potensi ekonomi namun belum dimanfaatkan secara maksimal. Kulit kerbau mengandung protein kolagen yang dapat dimanfaatkan dalam industri pangan maupun non pangan yakni industri makanan, industri farmasi dan industri kosmetik (Kolanus *et al.*, 2019). Kolagen komersial umumnya yakni berasal dari hewan sapi dan babi. Hal tersebut menjadi suatu permasalahan di Indonesia karena babi merupakan hewan yang diharamkan bagi umat muslim dan dikhawatirkan mengandung penyakit flu babi, sedangkan sapi dilarang bagi pemeluk agama Hindu dan dikhawatirkan terjangkit penyakit sapi gila (Ata *et al.*, 2016). Pemenuhan kebutuhan kolagen di Indonesia juga masih berasal dari negara lain, maka perlu adanya alternatif lain sebagai sumber kolagen dengan memanfaatkan kulit kerbau serta usaha untuk dapat memproduksi kolagen sendiri. Kolagen dapat

diperoleh dengan cara ekstraksi secara enzimatis maupun kimiawi. Dimana secara kimiawi, ekstraksi dilakukan dengan membutuhkan perlakuan suatu zat diantaranya seperti asam maupun basa.

Asam asetat merupakan salah satu asam organik yang dapat mengekstrak kolagen dan merupakan salah satu jenis asam lemah yang memiliki kemampuan mengekstrak kolagen lebih baik dengan jumlah kolagen yang lebih tinggi dibandingkan pelarut lain seperti asam sitrat maupun asam klorida (Ariyanti *et al.*, 2018). Pada tingkat konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi yang berbeda. Dalam penggunaan konsentrasi asam asetat perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi kualitas kolagen yang dihasilkan. Konsentrasi asam yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis lanjut sehingga rantai kolagen berubah menjadi gelatin. Selain itu, lama ekstraksi dengan perendaman dalam asam harus dilakukan dengan baik dan tepat. Semakin lama ekstraksi maka semakin banyak air yang terserap oleh kulit sehingga serat kolagen menjadi semakin mudah untuk dipisahkan dari kulit dan memudahkan proses ekstraksi (Astiana *et al.*, 2016). Perendaman yang dilakukan terlalu lama akan mempengaruhi kelarutan kolagen sehingga dapat menyebabkan terjadinya kehilangan kolagen. Sebelumnya sudah pernah dilakukan proses ekstraksi kolagen dari kulit sapi (Noorzai *et al.*, 2020) yang menghasilkan rendemen 3,8% menggunakan metode *acid solubility*.

Ekstraksi kolagen dari kulit kerbau dilakukan oleh Mustaufa *et al.* (2016) menghasilkan rendemen 1,8%. namun demikian belum ada informasi tentang *yield* dan karakteristik fisikokimia kolagen dengan perlakuan konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang ekstraksi kolagen menggunakan beragam konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi untuk menentukan perlakuan yang terbaik sehingga dapat menghasilkan karakteristik kolagen dari kulit kerbau dengan kualitas yang sesuai standar. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui interaksi dan pengaruh berbagai konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi terhadap kualitas kolagen diantaranya rendemen, kadar air serta karakteristik kolagen berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit kerbau jantan dengan usia sekitar 2-3 tahun dari CV. Panji Jaya di Desa Cegoroyoso, Pleret, Bantul, Yogyakarta, asam asetat, NaOH, NaCl, butil alkohol dan aquades.

Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *sentrifuge, freeze dryer, chiller* dan alat ekstraksi kolagen (*beaker glass, gelas ukur, pengaduk, pH meter* dan lain-lain). Alat yang digunakan untuk pengujian yakni timbangan analitik, oven (Memmert), FTIR Spectroscopy, SDS-PAGE.

Metode Penelitian

Penyiapan kulit kerbau

Commented [U1]: konsentrasi

Commented [U2]: rendemen

Commented [U3]: silica gel

Commented [U4]: mereknya apa

Commented [U5]: merek

Metode yang digunakan mengacu pada penelitian Mulyani *et al.* (2017) yaitu kulit kerbau dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan larutan garam yang merupakan pengawet pada kulit. Kemudian kulit direndam dalam air kapur 2% (b/v) untuk menghilangkan rambut pada kulit. Selanjutnya, rambut dan lemak pada kulit dihilangkan dengan cara manual menggunakan pisau kemudian kulit dicuci kembali dengan air mengalir hingga pH kulit sekitar 7-7,5 lalu kulit dipotong dadu dengan ukuran sekitar 1×1 cm dan kulit kerbau siap untuk diekstraksi.

Ekstraksi kolagen dari kulit kerbau

Metode ekstraksi kolagen mengacu pada percobaan yang dilakukan oleh Noorzai *et al.* (2020) yang telah dimodifikasi yaitu potongan kulit kerbau ditimbang sebanyak 50 gram untuk setiap 1 unit percobaan. Kulit dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml lalu direndam dengan larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:4 (b/v) kemudian erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 6 jam pada suhu kamar untuk menghilangkan komponen non-kolagen pada kulit. Setelah itu, sampel dikeluarkan dan dicuci dengan air mengalir hingga mencapai pH netral. Penghilangan lemak dilakukan dengan cara kulit kerbau direndam dengan larutan butil alkohol 8% selama 18 jam kemudian sampel dibilas kembali menggunakan aquades hingga bersih (pH netral). Selanjutnya sampel diekstraksi dengan larutan asam asetat dengan konsentrasi yang telah ditentukan (0,5 M; 1 M; dan 1,5 M) dan dengan lama waktu ekstraksi yang juga telah ditentukan (48 jam dan 72 jam) pada suhu kamar. Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan saringan untuk memisahkan residu dan ekstrak (supernatan).

Supernatan dipresipitasi dengan cara menambahkan NaCl 1,8 M hingga konsentrasi akhir larutan 0,9 M (banyak NaCl yang ditambahkan disesuaikan dengan banyak supernatan yang akan dipresipitasi sesuai perhitungan), kemudian diaduk hingga didapatkan presipitat kolagen (proses *salting-out*). Presipitat didiamkan selama 24 jam dalam kondisi dingin, kemudian disaring. Presipitat yang berbentuk gumpalan kolagen dimasukkan dalam plastik klip sedangkan presipitat yang mengendap selama penyaringan didiamkan dalam *tube sentrifuge* selama 24 jam. Hasil pengendapan presipitat selanjutnya didialisis dengan cara presipitat dan sedikit aquades dimasukkan ke dalam membran selofan yang telah direndam menggunakan aquades selama 24 jam. Kemudian membran berisi kolagen direndam dalam larutan asam asetat 0,1 M selama 24 jam (diulangi 3 kali dengan larutan asam asetat yang baru). Setelah dua kali dilakukan penggantian larutan asam asetat, membran yang berisi kolagen direndam di dalam aquades yang diganti setiap 3 jam sampai pH aquades mencapai netral. Kolagen pasca dialisis, diliofilisasi (*freeze drying*) selama 12 jam dalam wadah-wadah kecil terpisah yang mudah dikeringkan sehingga diperoleh kolagen berbentuk seperti kapas berwarna putih kemudian kolagen diberi *silica gel*.

Pengujian

Identifikasi karakteristik kolagen dari kulit kerbau meliputi nilai rendemen yang sesuai dengan penelitian Mulyani *et al.* (2017) dan kadar air yang sesuai dengan penelitian Romadhon *et al.* (2019).

Dilakukan uji berat molekul dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan uji gugus fungsional dengan menggunakan metode FTIR yang mengacu pada penelitian Mulyani *et al.* (2017) yang dimodifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen

Rendemen merupakan salah satu cara untuk mengetahui apakah metode ekstraksi yang digunakan telah efektif serta efisien dalam menghasilkan kolagen atau belum. Semakin tinggi nilai rendemen maka menunjukkan semakin efektif metode yang digunakan dan semakin efisien perlakuan yang diberikan (Febriansyah *et al.*, 2019). Rendemen juga menjadi parameter penting untuk menentukan tingkat ekonomis suatu produk (Astiana *et al.*, 2016). Rendemen kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat.

Lama Ekstraksi (Jam)	Konsentrasi Asam Asetat (M)			Rata-Rata ± SD
	0,5	1	1,5	
48	0,75 ± 0,11	1,25 ± 0,18	1,37 ± 0,20	1,12 ± 0,32 ^a
72	1,45 ± 0,18	1,59 ± 0,24	2,07 ± 0,27	1,70 ± 0,35 ^b
Rata-Rata ± SD	1,10 ± 0,40 ^a	1,42 ± 0,27 ^{ab}	1,72 ± 0,44 ^b	

Keterangan: Nilai dengan superskrip yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara konsentrasi asam asetat dengan lama ekstraksi terhadap rendemen, namun pada setiap peningkatan faktor konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap peningkatan nilai rendemen. Hal tersebut disebabkan oleh peran ion H⁺ dari asam asetat serta lamanya kontak antara pelarut asam dengan kulit kerbau. Mulyani *et al.* (2017) menyatakan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi asam maka konsentrasi ion H⁺ turut meningkat sehingga menyebabkan semakin banyak ikatan silang pada daerah telopeptida sisi heliks yang terpecah kemudian kolagen menjadi mudah terlarut. Menurut Hudha *et al.* (2012) semakin lama ekstraksi menyebabkan proses ekstraksi menjadi lebih sempurna sehingga akan semakin banyak kolagen yang terlarut dan jumlah rendemen menjadi meningkat.

Hasil rendemen yang diperoleh lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Ferraro *et al.* (2017) yakni kolagen tulang sapi sebesar 89,2 – 95,8% dan penelitian kolagen kulit sapi oleh Said *et al.* (2018) yakni sebesar 28%. Nilai rendemen yang rendah diduga bahwa penggunaan jumlah asam asetat yang merupakan asam lemah masih kurang efektif untuk mengekstraksi kolagen dari kulit kerbau yang memiliki sifat tebal dan kuat. Asam asetat merupakan asam lemah dengan konsentrasi ion H⁺ yang rendah sehingga dengan perlakuan asam asetat yang sedikit maka kelarutan kolagen dalam asam akan kurang maksimal (Paudi *et al.*, 2020).

Kadar Air

Commented [U6]: spasi

Commented [U7]: spasi

Kadar air merupakan salah satu syarat mutu pada kolagen. Kadar air berpengaruh terhadap daya simpan karena berkaitan dengan aktivitas mikroba, enzim, kimiawi seperti ketengikan hingga aktivitas non enzimatis yang menimbulkan perubahan sifat organoleptik serta nilai mutu. Semakin tinggi kadar air maka semakin pendek umur simpan kolagen (Nurhidayah *et al.*, 2019). Kadar air kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2 yang menunjukkan bahwa kadar air kolagen dari kulit kerbau memenuhi standard mutu kolagen menurut SNI (Badan Standardisasi Nasional, 2014) yaitu maksimal sebesar 12%.

Tabel 2. Kadar air kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat.

Lama Ekstraksi (Jam)	Konsentrasi Asam Asetat (M)		
	0,5	1	1,5
	%		
48	4,49 ± 0,38 ^d	3,40 ± 0,20 ^b	2,57 ± 0,13 ^a
72	6,24 ± 0,13 ^e	4,19 ± 0,14 ^{cd}	3,89 ± 0,26 ^c

Keterangan: Nilai dengan superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa konsentrasi asam asetat, lama ekstraksi dan interaksi antara konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap nilai kadar air. Berdasarkan Tabel 2, nilai kadar air kolagen kering dari kulit kerbau cenderung menurun seiring meningkatnya konsentrasi asam asetat. Hal ini diduga karena semakin tinggi konsentrasi asam asetat maka semakin banyak ion H⁺ yang menyebabkan struktur kolagen menjadi semakin terbuka dan mengganggu ikatan antar protein yang kemudian menyebabkannya ikat air pada kolagen melemahsehingga air akan mudah terlepas atau menyublim pada proses pengeringan (*freeze drying*). Ulfah (2011) menyatakan bahwa penurunan kadar air kolagen kering dapat disebabkan oleh semakin terbukanya struktur kolagen dimana struktur yang lemah akan menyebabkan daya ikat air menjadi menurun. Seiring meningkatnya lama ekstraksi, kadar air kolagen kering semakin meningkat. Hal ini diduga karena air banyak terserap oleh kolagen selama proses perendaman. Kandungan air pada kolagen dapat disebabkan karena terjadinya penetrasi air ke dalam kolagen melalui ikatan hidrogen atau gaya elektrostatik antara gugus polar (Romadhon *et al.*, 2019).

Azara (2017) berpendapat bahwa kadar air dipengaruhi oleh kehilangan air yang terjadi selama proses pengeringan serta penyerapan air pada saat perendaman. Berdasarkan kadar air, kolagen dengan konsentrasi asam asetat 1,5 M dan lama ekstraksi 48 jam merupakan kadar air yang optimal karena nilainya yang rendah. Semakin rendah kadar air maka kualitas kolagen semakin baik karena memiliki umur simpan yang lebih panjang.

Berat Molekul

Berat molekul kolagen dari kulit kerbau diukur menggunakan SDS-PAGE, hasil yang diperoleh berupa pita-pita protein yang dipisahkan berdasarkan berat molekulnya yang setara dengan panjang rantai protein. Protein yang berukuran kecil akan lebih cepat melintasi gel sehingga akan memiliki jarak

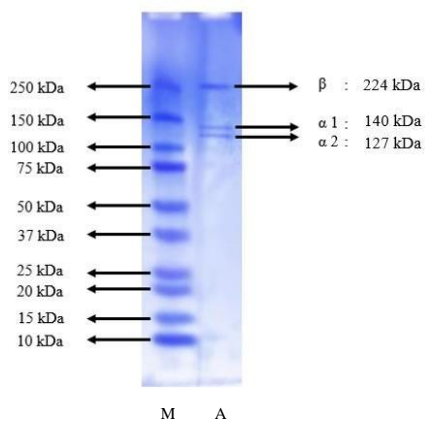
Commented [U8]: diletakkan di atas tabel

Commented [U9]: kolagen basah yang bagaimana mohon dijelaskan mengapa tiba tiba ada kadar kolagen kering

Commented [U10]: spasi

Commented [U11]: spasi

tempuh yang lebih panjang dibandingkan protein dengan ukuran yang lebih besar (Astiana *et al.*, 2016). Semakin berat molekul maka posisi pita protein akan semakin di atas. Erizal *et al.* (2014) menyatakan bahwa setiap molekul kolagen memiliki berat sekitar 300.000 dalton. Hasil SDS-PAGE kolagen dari kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat konsentrasi 1 M dan lama ekstraksi 72 jam yang merupakan perlakuan optimal berdasarkan rendemen disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforesis kolagen dari kulit kerbau dengan (M) marker dan (A) kolagen dengan perlakuan konsentrasi asam asetat 1 M dan lama ekstraksi 72 jam.

Hasil dari SDS-PAGE menunjukkan adanya pita rantai $\alpha 1$, $\alpha 2$, dan β yang masing-masing memiliki berat molekul sekitar 140 kDa, 127 kDa, dan 224 kDa. Idrus *et al.* (2018) menyatakan bahwa struktur rantai α dan β ditemukan pada berat molekul protein sekitar 135 – 245 kDa. Adanya rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ yang merupakan ciri khas dari kolagen dapat menunjukkan bahwa kolagen dari kulit kerbau yang dihasilkan merupakan kolagen tipe 1 (Djailani *et al.*, 2016). Kolagen tipe 1 adalah salah satu jenis kolagen yang banyak terdapat pada jaringan kulit, tendon dan tulang serta umumnya terdiri dari rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ yang membentuk *triple helix* (Fawzya *et al.*, 2016).

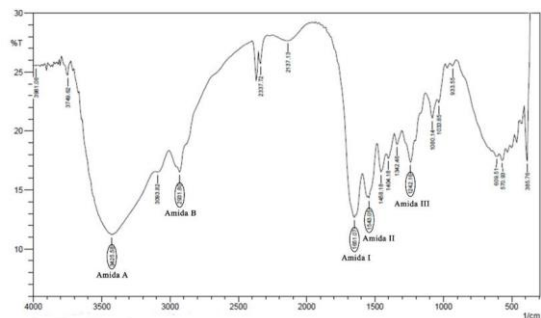
Kolagen dari kulit kerbau memiliki komponen kimia dengan berat molekul tinggi yakni struktur β (rantai dimer α). Struktur rantai β menjelaskan bahwa terdapat ikatan silang (*cross linked*) dalam molekul kolagen dimana semakin tebal pita protein struktur β berarti jumlah kolagen yang mengalami

cross linking semakin banyak (Astiana *et al.*, 2016). Keberadaan rantai β menunjukkan bahwa kolagen kulit kerbau yang dihasilkan dengan perlakuan konsentrasi asam asetat 1 M dan lama ekstraksi 72 jam belum dapat menguraikan rantai *triple helix* pada kolagen menjadi rantai tunggal α heliks. Hal tersebut terjadi karena ikatan silang pada daerah telopeptida pada sisi heliks belum terpecah secara maksimal oleh pelarut asam (Pamungkas *et al.*, 2018).

Diketahui bahwa pada pola elektroforesis tidak terdapat pita protein yang berada di bawah pita rantai α . Menurut Djailani *et al.* (2016), tidak adanya keberadaan pita protein di bawah rantai α menunjukkan bahwa tidak terdapat peptida lain yang terbentuk akibat terjadinya degradasi kolagen. Degradasi protein kolagen menjadi gelatin terjadi karena struktur rantai asam amino penyusun kolagen mengalami pemutusan ikatan kovalen berlebih sehingga rantai asam amino terpotong menjadi lebih pendek dan berat molekul kolagen menjadi rendah (Santoso *et al.*, 2015).

Gugus Fungsi

Spektroskopi FTIR dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsional dan struktur sekunder (Mulyani *et al.*, 2017). Spektrum FTIR kolagen dari kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat konsentrasi 1 M dan lama ekstraksi 72 jam disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR kolagen dari kulit kerbau dengan konsentrasi asam asetat 1 M dan lama ekstraksi 72 jam.

Berdasarkan spektrum FTIR terdeteksi adanya daerah serapan khas kolagen yang disebut amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III yang masing-masing memiliki puncak serapan pada panjang gelombang $3425,58 \text{ cm}^{-1}$; $2931,80 \text{ cm}^{-1}$; $1651,07 \text{ cm}^{-1}$; $1543,05 \text{ cm}^{-1}$; dan $1242,16 \text{ cm}^{-1}$. Gugus amida A umumnya ditemukan pada wilayah serapan $3350 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ yang memiliki karakteristik adanya gugus NH (gugus amina). Posisi puncak serapan amida A dipengaruhi oleh keterlibatan dari gugus OH

(hidroksil) yang menunjukkan adanya partisipasi aktif dari molekul air pada proses ekstraksi kolagen (Safithri et al., 2019). Gugus amida B memiliki wilayah serapan 2915–2935 cm^{-1} yang menunjukkan bahwa memiliki karakteristik adanya gugus CH_2 . Gugus amida I pada kolagen dari kulit kerbau memiliki wilayah serapan 1600 – 1700 cm^{-1} . Puncak gugus amida I menunjukkan adanya gugus karbonil yakni ikatan $\text{C}=\text{O}$ di sepanjang rantai polipeptida (Devi et al., 2017) serta menjadi penanda dari struktur sekunder protein. Gugus amida II menunjukkan adanya ikatan NH dan CN pada kisaran wilayah serapan 1480 – 1575 cm^{-1} . Gugus fungsi yang terakhir yakni gugus amida III memiliki wilayah serapan 1229 – 1301 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan NH dan CH pada ikatan peptida (Safithri et al., 2020).

Disamping itu, terdapat hubungan antara intensitas gugus amida III dengan struktur *triple helix* (Simamora et al., 2019). Hasil analisis gugus fungsi pada kolagen menggunakan FTIR dapat memperlihatkan adanya struktur *triple helix* yang ditunjukkan dengan nilai rasio serapan antara amida III dan puncak serapan pada 1450 cm^{-1} apabila mendekati 1,0 (Silva et al., 2014). Nilai rasio serapan antara amida III (pada 1242,16 cm^{-1}) dan 1458,18 cm^{-1} pada kolagen dari kulit kerbau yakni 0,99. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kolagen dari kulit kerbau belum terdegradasi menjadi gelatin. Kolagen yang terdenaturasi dan kehilangan struktur *triple helix* menjadi gelatin memiliki intensitas rasio 0,59 (Safithri et al., 2020). Sehingga berdasarkan hasil spektrum FTIR kolagen dari kulit kerbau dimana menunjukkan adanya gugus-gugus khas penyusun kolagen, adanya gugus *triple helix* dan rasio perbandingan antara amida III dan 1450 cm^{-1} yang mendekati satu, maka dapat disimpulkan bahwa kolagen kulit kerbau dengan perlakuan terbaik merupakan kolagen dan belum mengalami degradasi menjadi gelatin.

KESIMPULAN

Tidak terdapat interaksi antara konsentrasi asam dan lama ekstraksi terhadap nilai rendemen, namun terdapat interaksi terhadap nilai kadar air. Ekstraksi kolagen dari kulit kerbau terbaik dilakukan dengan konsentrasi asam asetat 1 M dengan lama ekstraksi 72 jam yang dapat menghasilkan kolagen dengan rendemen $1,42 \pm 0,27\%$ berdasarkan faktor konsentrasi dan $1,70 \pm 0,35\%$ berdasarkan faktor lama ekstraksi, kadar air $4,19 \pm 0,14\%$, serta teridentifikasi bahwa kolagen belum mengalami degradasi menjadi gelatin berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (PTN-BH Universitas Diponegoro), Republik Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti, A., M. Dewi, A. P. Hapsari, & S. Mashadi. (2018). Perbandingan Kadar kolagen cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dengan cangkang kerang hijau (*Mytilus viridis*) di bandengan, kendal, jawa tengah. *Jurnal Pharmascience*, *5*(2), 134-142. DOI : 10.20527/jps.v5i2.5795.
- Astiana, I., Nurjanah dan T. Nurhayati. (2016). Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan ekor kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, *19*(1), 79-93. DOI: 10.17844/jphpi.2016.19.1.79.
- Ata, S. T., R. Yulianty, F. J. Sami dan N. Ramli. (2016). Isolasi kolagen dari kulit dan tulang ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, *1*(1), 27-30.
- Azara, R. (2017). Pembuatan dan analisis sifat fisikokimia gelatin dari limbah kulit ikan kerapu (*Ephinephelus sp.*). *Jurnal Teknologi Pangan*, *11*(1), 62-69.
- BSN (Badan Standardisasi Nasional). (2014). *Standard Nasional Indonesia SNI 01-8076-2014 : Kolagen Kasar dari Sisik Ikan – Syarat Mutu dan Pengolahan*. Jakarta, Indonesia: BSN.
- Darmanto, Y. S., T. W. Agustini dan F. Swastawati. (2012). Efek kolagen dari berbagai jenis tulang ikan terhadap kualitas miofibril protein ikan selama proses dehidrasi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, *23*(1), 36-36.
- Devi, H. L. N. A., P. Suptijah dan M. Nurilmala. (2017). Efektifitas alkali dan asam terhadap mutu kolagen dari kulit ikan patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, *20*(2), 255-256. DOI : 10.17844/jphpi.v20i2.17906.
- Djailani, F., W. Trilaksana dan T. Nurhayati. (2016). Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidro-ekstraksi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, *19*(2), 156-167. DOI : 10.17844/jphpi.2019.19.2.156.
- Erizal, E., B. Abbas, R. Setyo A. K., Sulistioso G. S. dan Sudirman. (2014). Pengaruh iradiasi gamma pada sifat fisiko-kimia kolagen dalam larutan. *Jurnal Sains Materi Indonesia*, *14*(4), 221-225. DOI : 10.17146/jsmi.2014.15.4.4342.
- Fawzya, Y. N., E. Chasanah, A. Poernomo dan M. H. Khirzin. (2016). Isolasi dan karakterisasi parsial kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, *11*(1), 91-100. DOI : 10.15578/jpbkp.v11i1.284.
- Febriansyah, R., A. Pratama dan J. Gumilar. (2019). Pengaruh konsentrasi naoh terhadap rendemen, kadar air dan kadar abu gelatin ceker itik (*Anas platyrhynchos Javanica*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak (JITEK)*, *14*(1), 1-10. DOI : 10.21776/ub.jitek.2019.014.01.1.
- Ferraro, V., B. Gaillard-Martinie, T. Sayd, C. Chambon, M. Anton and V. Santé-Lhoutellier. (2017). Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, *97*, 55–66. DOI : doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.068.
- Hudha, M. I., R. Sepdwiyantri dan S. D. Sari. (2012). Ekstraksi Karaginan dari rumput laut (*Eucheuma spinosum*) dengan variasi suhu pelarut dan waktu operasi. *Jurnal Teknik Kimia*, *6*(2), 50-53.
- Kolanus, J. P., S. Hadinoto dan S. Idrus. (2019). Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan tuna (*Thunnus albacores.*) dengan metode hidroekstraksi. *Jurnal Riset Teknologi Industri*, *13*(1), 99-110. DOI : 10.26578/jrti.v13i1.4994.
- Mulyani, S., F. M. C. S. Setyabudi, Y. Pranoto and U. Santoso. (2017). The effect of pretreatment using hydrochloric acid on the characteristics of buffalo hide gelatin. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agricultureculture*, *42*(1), 14–22. DOI : 10.14710/jitaa.42.1.14-22.

- Mulyani, S., F. M. C. S. Setyabudi, Y. Pranoto and U. Santoso. (2017). Physicochemical properties of gelatin extracted from buffalo hide pretreated with different acids. *Korean journal for food science of animal resources*, **37**(5), 708-715. DOI : 10.5851/kosfa.2017.37.5.708.
- Moustafa A. Rizki, and Nasser Y. (2016). Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications. *CODEN: OJCHEG*, **32**(3), 1601-1609. DOI : 10.13005/ojc/320336
- Noorzai, S., C. J. R. Verbeek, M. C. Lay and J. Swan. (2020). Collagen extraction from various waste bovine hide sources. *Waste and Biomass Valorization*, **1**(1), 1–13. DOI : 10.1007/s12649-019-00843-2.
- Nurhidayah, B., E. Soekendars dan A. E. Erviani. (2019). Kandungan kolagen sisik ikan bandeng *Chanos-chanos* dan sisik ikan nila *Oreochromis niloticus*. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*, **4**(1), 39-47. DOI : 10.20956/bioma.v4i1.6341.
- Pamungkas, B. F., Supriyadi, A. Murdiati dan R. Indrati. (2018). Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dan pepsin dari sisik haruan (*Channa striatus*) kering. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **21**(3), 513-521. DOI : 10.17844/jphpi.v21i3.24734.
- Paudi, R., R. Sulistijowati dan L. Mile. (2020). Rendemen kolagen kulit ikan bandeng (*Chanos chanos*) segar hasil ekstraksi asam asetat. *Jambura Fish Processing Journal*, **2**(1), 21-27. DOI : 10.37905/jfpi.v2i1.5930.
- Romadhon, R., Y. S. Darmanto dan R. A. Kurniasih. (2019). The difference characteristics of collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) bone, skin, and scales. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **22**(2), 403- 410. DOI : 10.17844/jphpi.v22i2.28832.
- Safithri, M., I. Setyaningsih, K. Tarman, V. M. Yuhendri dan M. Meydia. (2018). Potensi kolagen teripang emas sebagai inhibitor tirosinase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **21**(2), 295-303. DOI : 10.17844/jphpi.v21i2.23085.
- Safithri, M., K. Tarman, P. Suptijah dan N. Widowati. (2019). Karakteristik fisikokimia kolagen larut asam dari kulit ikan parang-parang (*Chirocentrus dorab*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **22**(3), 441-452. DOI : 10.17844/jphpi.v22i3.28924.
- Safithri, M., K. Tarman, P. Suptijah dan S. N. Sagita. (2020). Karakteristik kolagen larut asam teripang gama (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **23**(1), 166-177. DOI : 10.17844/jphpi.v23i1.31063.
- Said, M. I., B. Burhan, T. Tensi and H. Haerati. (2018). Synthesis of collagen from bali cattle's hide using a combination of acid and alkali on the extracting process. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, **43**(3), 247-256. DOI : 10.14710/jitaa.43.3.247-256.
- Santoso, C., T. Surti dan Sumardianto. (2015). Perbedaan penggunaan konsentrasi larutan asam sitrat dalam pembuatan gelatin tulang rawan ikan pari mondol (*Himantura gerrardi*). *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, **4**(2), 106-114.
- Silva, T. H., J. Moreira-Silva, A. L. P. Marques, A. Domingues, Y. Bayon and R. L. Reis. (2014). Marine origin collagens and its potential applications.

Marine Drugs,12(12), 5881-5901. DOI : 10.3390/md12125881.

Simamora, G. R. R., W. Trilaksana dan U. Uju. (2019). Profiling kolagen gelembung renang ikan patin (*Pangasius sp.*) melalui proses enzimatik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*,22(2), 299-310. DOI : 10.17844/jphpi.v22i2.27717.

Ulfah, M. (2011). Pengaruh konsentrasi larutan asam asetat dan lama waktu perendaman terhadap sifat-sifat gelatin ceker ayam. *Agritech*, 31(3), 161-167.

Hasil Review dari Reviewer B

EKSTRAKSI KOLAGEN DARI KULIT KERBAU MENGGUNAKAN ASAM ASETAT

EXTRACTION OF COLLAGEN FROM BUFFALO HIDE BY ACETIC ACID

ABSTRACT

Buffalo hide was the potential as an alternative raw material for making halal collagen as a substitute for cow and porcine origin, but the complexity of buffalo hide is higher than cattle hide and pigskin. Acetic acid is a weak acid that is able to extract collagen well. The aim of the study was to determine the interaction and effect of various concentrations of acetic acid and extraction time on collagen quality including yield, water content and collagen characteristics based on molecular weight and functional groups. This study was carried out experimentally that used completely randomized design with factorial scheme. There were concentrations of acetic acid 3%, 5%, 7%, and extraction times 48 and 72 hours, each treatment was repeated four times. The optimum result of collagen extraction is using a concentration of 1 M acetic acid with 72 hours extraction time that produced collagen with $1.42 \pm 0.27\%$ yield based on the concentration factor and $1.70 \pm 0.35\%$ yield based on the extraction time factor, $4.19 \pm 0.14\%$ water content, and it was identified that collagen has not yet been degraded into gelatin based on molecular weight and functional groups.

Keywords: collagen, buffalo hide, acetic acid

ABSTRAK

Kulit kerbau berpotensi sebagai bahan baku alternatif pembuatan kolagen halal pengganti sapi dan babi, namun kompleksitas kulit kerbau diduga lebih tinggi dibandingkan kulit sapi maupun babi. Asam asetat merupakan asam lemah yang mampu mengekstraksi kolagen dengan baik. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui interaksi dan pengaruh berbagai konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi terhadap kualitas kolagen diantaranya rendemen, kadar air serta karakteristik kolagen berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pola faktorial yang terdiri dari faktor tingkat penggunaan konsentrasi asam asetat sebesar 0,5 M; 1 M; 1,5 M serta lama ekstraksi 48 jam dan 72 jam. Perlakuan diulang sebanyak empat kali. Hasil optimum ekstraksi kolagen adalah menggunakan konsentrasi asam asetat 1 M dengan lama ekstraksi 72 jam yang dapat menghasilkan kolagen dengan rendemen $1,42 \pm 0,27\%$ berdasarkan faktor konsentrasi dan $1,70 \pm 0,35\%$ berdasarkan faktor lama ekstraksi, kadar air $4,19 \pm 0,14\%$, serta teridentifikasi bahwa kolagen belum mengalami degradasi menjadi gelatin berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi.

Kata kunci: kolagen, kulit kerbau, asam asetat.

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan salah satu jenis protein yang jumlahnya mendominasi dari total protein tubuh makhluk hidup secara keseluruhan yakni mencapai 30%. Kolagen merupakan penyusun jaringan pengikat yang salah satunya dapat ditemukan di bagian kulit (Darmanto *et al.*, 2012). Kulit merupakan salah satu hasil samping dari pemotongan hewan ternak seperti kerbau yang keberadaannya cukup melimpah di Indonesia serta memiliki potensi ekonomi namun belum dimanfaatkan secara maksimal. Kulit kerbau mengandung protein kolagen yang dapat dimanfaatkan dalam industri pangan maupun non pangan yakni industri makanan, industri farmasi dan industri kosmetik (Kolanus *et al.*, 2019). Kolagen komersial umumnya yakni berasal dari hewan sapi dan babi. Hal tersebut menjadi suatu permasalahan di Indonesia karena babi merupakan hewan yang diharamkan bagi umat muslim dan dikhawatirkan mengandung penyakit flu babi, sedangkan sapi dilarang bagi pemeluk agama Hindu dan dikhawatirkan terjangkit penyakit sapi gila (Ata *et al.*, 2016). Pemenuhan kebutuhan kolagen di Indonesia juga masih berasal dari negara lain, maka perlu adanya alternatif lain sebagai sumber kolagen dengan memanfaatkan kulit kerbau serta usaha untuk dapat memproduksi kolagen sendiri. Kolagen dapat diperoleh dengan cara ekstraksi secara enzimatik maupun kimiawi. Dimana secara kimiawi, ekstraksi dilakukan dengan membutuhkan perlakuan suatu zat diantaranya seperti asam maupun basa.

Asam asetat merupakan salah satu asam organik yang memiliki kemampuan mengekstrak kolagen lebih baik dibandingkan pelarut lain seperti asam sitrat maupun asam klorida (Ariyanti *et al.*, 2018). Penelitian ekstraksi kolagen dengan asam asetat telah dilakukan oleh Rizk & Mustofa (2016) menghasilkan rendemen yang rendah pada konsentrasi asam asetat 0,5M dan lama ekstraksi 24 jam. Pada penelitian tersebut belum dilakukan optimasi konsentrasi dan lama ekstraksi serta pengaruhnya terhadap karakteristik kolagen yang dihasilkan. Konsentrasi asam yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis lanjut sehingga rantai kolagen berubah menjadi gelatin. Selain itu, lama ekstraksi dengan perendaman dalam asam harus dilakukan dengan baik dan tepat. Semakin lama

Commented [e1]: Gambaran sedikit materi berapa lembar atau bagaimana dan kulit kerbau bangsa apa dijelaskan

Commented [e2]: Ada 3 hal dalam latar belakang yang sangat penting 1. Jenis Kulit kerbau dan kolagennya cari referencenya, mengapa sulit terskrak dibanding kulit lain, penggunaan asam merupakan pilihan tetapi komparasi dengan penelitian lain masih lemah, waktu curing juga perlu disampaikan sehingga alur penelitian di pendahuluan bunyi lebih tajam dan fokus

ekstraksi maka semakin banyak air yang terserap oleh kulit sehingga serat kolagen menjadi semakin mudah untuk dipisahkan dari kulit dan memudahkan proses ekstraksi (Astiana *et al.*, 2016). Perendaman yang dilakukan terlalu lama akan mempengaruhi kelarutan kolagen sehingga dapat menyebabkan terjadinya kehilangan kolagen. Sebelumnya sudah pernah dilakukan proses ekstraksi kolagen dari kulit sapi (Noorzai *et al.*, 2020) yang menghasilkan rendemen 3,8% menggunakan metode *acid solubility*. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang ekstraksi kolagen menggunakan beragam konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi untuk menentukan perlakuan yang terbaik sehingga dapat menghasilkan karakteristik kolagen dari kulit kerbau dengan kualitas yang sesuai standar. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui interaksi dan pengaruh berbagai konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi terhadap kualitas kolagen diantaranya rendemen, kadar air serta karakteristik kolagen berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit kerbau jantan dengan usia sekitar 2-3 tahun dari CV. Panji Jaya di Desa Segoroyoso, Pleret, Bantul, Yogyakarta, asam asetat, NaOH, NaCl, butil alkohol dan aquades.

Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *sentrifuge*, *freeze dryer*, *chiller* dan alat ekstraksi kolagen (*beaker glass*, gelas ukur, pengaduk, pH meter dan lain-lain). Alat yang digunakan untuk pengujian yakni timbangan analitik, oven (*Memmert*), FTIR *Spectroscopy*, SDS-PAGE.

Metode Penelitian

Penyiapan kulit kerbau

Metode yang digunakan mengacu pada penelitian Mulyani *et al.* (2017) yaitu kulit kerbau dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan larutan garam yang merupakan pengawet pada kulit. Kemudian kulit direndam dalam air kapur 2% (b/v) untuk menghilangkan rambut pada kulit. Selanjutnya, rambut dan lemak pada kulit dihilangkan dengan cara manual menggunakan pisau kemudian kulit dicuci kembali dengan air mengalir hingga pH kulit sekitar 7-7,5 lalu kulit dipotong dadu dengan ukuran sekitar 1×1 cm dan kulit kerbau siap untuk diekstraksi.

Ekstraksi kolagen dari kulit kerbau

Metode ekstraksi kolagen mengacu pada percobaan yang dilakukan oleh Noorzai *et al.* (2020) yang telah dimodifikasi yaitu potongan kulit kerbau ditimbang sebanyak 50 gram untuk setiap 1 unit percobaan. Kulit dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml lalu direndam dengan larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:4 (b/v) kemudian erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 6 jam pada suhu kamar untuk menghilangkan komponen non-kolagen pada kulit. Setelah itu,

sampel dikeluarkan dan dicuci dengan air mengalir hingga mencapai pH netral. Penghilangan lemak dilakukan dengan cara kulit kerbau direndam dengan larutan butil alkohol 8% selama 18 jam kemudian sampel dibilas kembali menggunakan aquades hingga bersih (pH netral). Selanjutnya sampel diekstraksi dengan larutan asam asetat dengan konsentrasi yang telah ditentukan (0,5 M; 1 M; dan 1,5 M) dan dengan lama waktu ekstraksi yang juga telah ditentukan (48 jam dan 72 jam) pada suhu kamar. Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan saringan untuk memisahkan residu dan ekstrak (supernatan).

Supernatan dipresipitasi dengan cara menambahkan NaCl 1,8 M hingga konsentrasi akhir larutan 0,9 M (banyak NaCl yang ditambahkan disesuaikan dengan banyak supernatan yang akan dipresipitasi sesuai perhitungan), kemudian diaduk hingga didapatkan presipitat kolagen (proses *salting-out*). Presipitat didiamkan selama 24 jam dalam kondisi dingin, kemudian disaring. Presipitat yang berbentuk gumpalan kolagen dimasukkan dalam plastik klip sedangkan presipitat yang mengendap selama penyaringan didiamkan dalam *tube sentrifuge* selama 24 jam. Hasil pengendapan presipitat selanjutnya didialisis dengan cara presipitat dan sedikit aquades dimasukkan ke dalam membran selofan yang telah direndam menggunakan aquades selama 24 jam. Kemudian membran berisi kolagen direndam dalam larutan asam asetat 0,1 M selama 24 jam (diulangi 3 kali dengan larutan asam asetat yang baru). Setelah dua kali dilakukan penggantian larutan asam asetat, membran yang berisi kolagen direndam di dalam aquades yang diganti setiap 3 jam sampai pH aquades mencapai netral. Kolagen pasca dialisis, diliofilisasi (*freeze drying*) selama 12 jam dalam wadah-wadah kecil terpisah yang mudah dikeringkan sehingga diperoleh kolagen berbentuk seperti kapas berwarna putih kemudian kolagen diberi *silica gel*.

Pengujian

Identifikasi karakteristik kolagen dari kulit kerbau meliputi nilai rendemen yang sesuai dengan penelitian Mulyani *et al.* (2017) dan kadar air yang sesuai panduan AOAC (2005). Uji berat molekul menggunakan SDS-PAGE Metode Laemmli (1971) dan uji gugus fungsional dengan menggunakan FTIR yang mengacu pada penelitian Mulyani *et al.* (2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen

Rendemen merupakan salah satu cara untuk mengetahui apakah metode ekstraksi yang digunakan telah efektif serta efisien dalam menghasilkan kolagen atau belum. Semakin tinggi nilai rendemen maka menunjukkan semakin efektif metode yang digunakan dan semakin efisien perlakuan yang diberikan (Febriansyah *et al.*, 2019). Rendemen juga menjadi parameter penting untuk menentukan tingkat ekonomis suatu produk (Astiana *et al.*, 2016). Rendemen kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat.

Commented [e3]: Sebaiknya menggunakan reference primer sebelum Mulyani dll, rendemen sudah banyak pengukuran sebelumnya demikian juga kadar air, apalagi FTIR Mulyani mengacu kepada metode sebelumnya jadi dibedakan antara penemu metode spt SDS-PAGE itu laemli 1971, maka user yang lain bukanlah penemu metode

Lama Ekstraksi (Jam)	Konsentrasi Asam Asetat (M)			Rata-Rata ± SD
	0,5	1	1,5	
	%			
48	0,75 ± 0,11	1,25 ± 0,18	1,37 ± 0,20	1,12 ± 0,32 ^x
72	1,45 ± 0,18	1,59 ± 0,24	2,07 ± 0,27	1,70 ± 0,35 ^y
Rata-Rata ± SD	1,10 ± 0,40 ^a	1,42 ± 0,27 ^{ab}	1,72 ± 0,44 ^b	

Keterangan: Nilai dengan superskrip yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara konsentrasi asam asetat dengan lama ekstraksi terhadap rendemen, namun pada setiap peningkatan faktor konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap peningkatan nilai rendemen. Hal tersebut disebabkan oleh peran ion H⁺ dari asam asetat serta lamanya kontak antara pelarut asam dengan kulit kerbau. Mulyani *et al.* (2017) menyatakan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi asam maka konsentrasi ion H⁺ turut meningkat sehingga menyebabkan semakin banyak ikatan silang pada daerah telopeptida sisi heliks yang terpecah kemudian kolagen menjadi mudah terlarut. Menurut Hudha *et al.* (2012) semakin lama ekstraksi menyebabkan proses ekstraksi menjadi lebih sempurna sehingga akan semakin banyak kolagen yang terlarut dan jumlah rendemen menjadi meningkat.

Hasil rendemen yang diperoleh lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Ferraro *et al.* (2017) yakni kolagen tulang sapi sebesar 89,2 – 95,8% dan penelitian kolagen kulit sapi oleh Said *et al.* (2018) yakni sebesar 28%. Nilai rendemen yang rendah diduga bahwa penggunaan jumlah asam asetat yang merupakan asam lemah masih kurang efektif untuk mengekstraksi kolagen dari kulit kerbau yang memiliki sifat tebal dan kuat. Asam asetat merupakan asam lemah dengan konsentrasi ion H⁺ yang rendah sehingga dengan perlakuan asam asetat yang sedikit maka kelarutan kolagen dalam asam akan kurang maksimal (Paudi *et al.*, 2020).

Kadar Air

Kadar air merupakan salah satu syarat mutu pada kolagen. Kadar air berpengaruh terhadap daya simpan karena berkaitan dengan aktivitas mikroba, enzim, kimiawi seperti ketengikan hingga aktivitas non enzimatis yang menimbulkan perubahan sifat organoleptik serta nilai mutu. Semakin tinggi kadar air maka semakin pendek umur simpan kolagen (Nurhidayah *et al.*, 2019). Kadar air kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2 yang menunjukkan bahwa kadar air kolagen dari kulit kerbau memenuhi standard mutu kolagen menurut SNI (Badan Standardisasi Nasional, 2014) yaitu maksimal sebesar 12%.

Lama Ekstraksi (Jam)	Konsentrasi Asam Asetat (M)		
	0,5	1	1,5
	%		

48	4,49 ± 0,38 ^d	3,40 ± 0,20 ^b	2,57 ± 0,13 ^a
72	6,24 ± 0,13 ^c	4,19 ± 0,14 ^{cd}	3,89 ± 0,26 ^c

Tabel 2. Kadar air kolagen kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat.

Keterangan: Nilai dengan superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$).

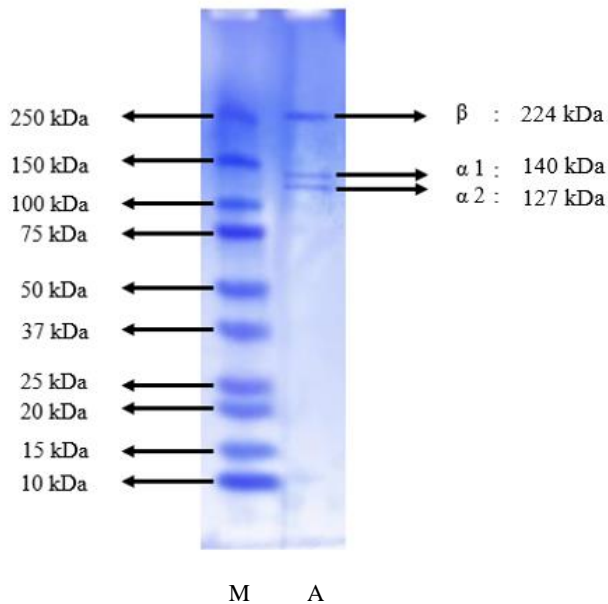
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa konsentrasi asam asetat, lama ekstraksi dan interaksi antara konsentrasi asam asetat dan lama ekstraksi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap nilai kadar air. Berdasarkan Tabel 2, nilai kadar air kolagen kering dari kulit kerbau cenderung menurun seiring meningkatnya konsentrasi asam asetat. Hal ini diduga karena semakin tinggi konsentrasi asam asetat maka semakin banyak ion H^+ yang menyebabkan struktur kolagen menjadi semakin terbuka dan mengganggu ikatan antar protein yang kemudian menyebabkan daya ikat air pada kolagen melemah sehingga air akan mudah terlepas atau menyublim pada proses pengeringan (*freeze drying*). Ulfah (2011) menyatakan bahwa penurunan kadar air kolagen kering dapat disebabkan oleh semakin terbukanya struktur kolagen dimana struktur yang lemah akan menyebabkan daya ikat air menjadi menurun. Seiring meningkatnya lama ekstraksi, kadar air kolagen kering semakin meningkat. Hal ini diduga karena air banyak terserap oleh kolagen selama proses perendaman. Kandungan air pada kolagen dapat disebabkan karena terjadinya penetrasi air ke dalam kolagen melalui ikatan hidrogen atau gaya elektrostatik antara gugus polar (Romadhon *et al.*, 2019).

Azara (2017) berpendapat bahwa kadar air dipengaruhi oleh kehilangan air yang terjadi selama proses pengeringan serta penyerapan air pada saat perendaman. Berdasarkan kadar air, kolagen dengan konsentrasi asam asetat 1,5 M dan lama ekstraksi 48 jam merupakan kadar air yang optimal karena nilainya yang rendah. Semakin rendah kadar air maka kualitas kolagen semakin baik karena memiliki umur simpan yang lebih panjang.

Berat Molekul

Berat molekul kolagen dari kulit kerbau diukur menggunakan SDS-PAGE, hasil yang diperoleh berupa pita-pita protein yang dipisahkan berdasarkan berat molekulnya yang setara dengan panjang rantai protein. Protein yang berukuran kecil akan lebih cepat melintasi gel sehingga akan memiliki jarak tempuh yang lebih panjang dibandingkan protein dengan ukuran yang lebih besar (Astiana *et al.*, 2016). Semakin berat molekul maka posisi pita protein akan semakin di atas. Erizal *et al.* (2014) menyatakan bahwa setiap molekul kolagen memiliki berat sekitar 300.000 dalton. Hasil SDS-PAGE kolagen dari kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat konsentrasi 1 M dan lama ekstraksi 72 jam yang merupakan perlakuan optimal berdasarkan rendemen disajikan pada Gambar 1.

Commented [e4]: Gambar SDS PAGE ini hanya satu perlakuan sehingga sulit membandingkan dengan perlakuan yang lain dan dihubungkan dengan parameter lain, kalau ada gambar lengkap SDS PAGE mhn ditampilkan



Gambar 1. Elektroforesis kolagen dari kulit kerbau dengan (M) marker dan (A) kolagen dengan perlakuan konsentrasi asam asetat 1 M dan lama ekstraksi 72 jam.

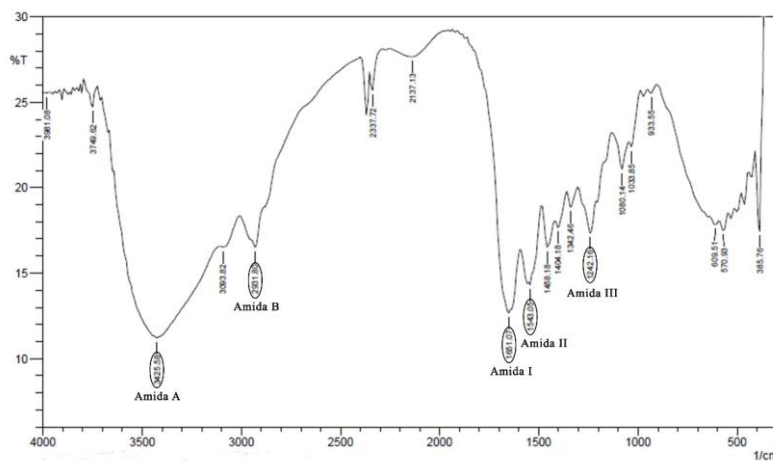
Hasil dari SDS-PAGE menunjukkan adanya pita rantai $\alpha 1$, $\alpha 2$, dan β yang masing-masing memiliki berat molekul sekitar 140 kDa, 127 kDa, dan 224 kDa. Idrus *et al.* (2018) menyatakan bahwa struktur rantai α dan β ditemukan pada berat molekul protein sekitar 135 – 245 kDa. Adanya rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ yang merupakan ciri khas dari kolagen dapat menunjukkan bahwa kolagen dari kulit kerbau yang dihasilkan merupakan kolagen tipe 1 (Djailani *et al.*, 2016). Kolagen tipe 1 adalah salah satu jenis kolagen yang banyak terdapat pada jaringan kulit, tendon dan tulang serta umumnya terdiri dari rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ yang membentuk *triple helix* (Fawzya *et al.*, 2016).

Kolagen dari kulit kerbau memiliki komponen kimia dengan berat molekul tinggi yakni struktur β (rantai dimer α). Struktur rantai β menjelaskan bahwa terdapat ikatan silang (*cross linked*) dalam molekul kolagen dimana semakin tebal pita protein struktur β berarti jumlah kolagen yang mengalami *cross linking* semakin banyak (Astiana *et al.*, 2016). Keberadaan rantai β menunjukkan bahwa kolagen kulit kerbau yang dihasilkan dengan perlakuan konsentrasi asam asetat 1 M dan lama ekstraksi 72 jam belum dapat menguraikan rantai *triple helix* pada kolagen menjadi rantai tunggal α heliks. Hal tersebut terjadi karena ikatan silang pada daerah telopeptida pada sisi heliks belum terpecah secara maksimal oleh pelarut asam (Pamungkas *et al.*, 2018).

Diketahui bahwa pada pola elektroforesis tidak terdapat pita protein yang berada di bawah pita rantai α . Menurut Djailani *et al.* (2016), tidak adanya keberadaan pita protein di bawah rantai α menunjukkan bahwa tidak terdapat peptida lain yang terbentuk akibat terjadinya degradasi kolagen. Degradasi protein kolagen menjadi gelatin terjadi karena struktur rantai asam amino penyusun kolagen mengalami pemutusan ikatan kovalen berlebih sehingga rantai asam amino terpotong menjadi lebih pendek dan berat molekul kolagen menjadi rendah (Santoso *et al.*, 2015).

Gugus Fungsi

Spektroskopi FTIR dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsional dan struktur sekunder (Mulyani *et al.*, 2017). Spektrum FTIR kolagen dari kulit kerbau yang diekstraksi dengan asam asetat konsentrasi 1 M dan lama ekstraksi 72 jam disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR kolagen dari kulit kerbau dengan konsentrasi asam asetat 1 M dan lama ekstraksi 72 jam.

Berdasarkan spektrum FTIR terdeteksi adanya daerah serapan khas kolagen yang disebut amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III yang masing-masing memiliki puncak serapan pada panjang gelombang $3425,58 \text{ cm}^{-1}$; $2931,80 \text{ cm}^{-1}$; $1651,07 \text{ cm}^{-1}$; $1543,05 \text{ cm}^{-1}$; dan $1242,16 \text{ cm}^{-1}$. Gugus amida A umumnya ditemukan pada wilayah serapan $3350 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ yang memiliki karakteristik adanya gugus NH (gugus amina). Posisi puncak serapan amida A dipengaruhi oleh keterlibatan dari gugus OH (hidroksil) yang menunjukkan adanya partisipasi aktif dari molekul air pada proses ekstraksi kolagen (Safithri *et al.*, 2019). Gugus amida B memiliki wilayah serapan $2915 - 2935 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan bahwa memiliki karakteristik adanya gugus CH_2 . Gugus amida I pada kolagen dari kulit kerbau memiliki wilayah serapan $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$. Puncak gugus amida I menunjukkan adanya gugus karbonil yakni ikatan $\text{C}=\text{O}$ di sepanjang rantai polipeptida (Devi *et al.*, 2017) serta menjadi penanda

dari struktur sekunder protein. Gugus amida II menunjukkan adanya ikatan NH dan CN pada kisaran wilayah serapan 1480 – 1575 cm^{-1} . Gugus fungsi yang terakhir yakni gugus amida III memiliki wilayah serapan 1229 – 1301 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan NH dan CH pada ikatan peptida (Safithri *et al.*, 2020).

Disamping itu, terdapat hubungan antara intensitas gugus amida III dengan struktur *triple helix* (Simamora *et al.*, 2019). Hasil analisis gugus fungsi pada kolagen menggunakan FTIR dapat memperlihatkan adanya struktur *triple helix* yang ditunjukkan dengan nilai rasio serapan antara amida III dan puncak serapan pada 1450 cm^{-1} apabila mendekati 1,0 (Silva *et al.*, 2014). Nilai rasio serapan antara amida III (pada 1242,16 cm^{-1}) dan 1458,18 cm^{-1} pada kolagen dari kulit kerbau yakni 0,99. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kolagen dari kulit kerbau belum terdegradasi menjadi gelatin. Kolagen yang terdenaturasi dan kehilangan struktur *triple helix* menjadi gelatin memiliki intensitas rasio 0,59 (Safithri *et al.*, 2020). Sehingga berdasarkan hasil spektrum FTIR kolagen dari kulit kerbau dimana menunjukkan adanya gugus-gugus khas penyusun kolagen, adanya gugus *triple helix* dan rasio perbandingan antara amida III dan 1450 cm^{-1} yang mendekati satu, maka dapat disimpulkan bahwa kolagen kulit kerbau dengan perlakuan terbaik merupakan kolagen dan belum mengalami degradasi menjadi gelatin.

KESIMPULAN

Tidak terdapat interaksi antara konsentrasi asam dan lama ekstraksi terhadap nilai rendemen, namun terdapat interaksi terhadap nilai kadar air. Ekstraksi kolagen dari kulit kerbau terbaik dilakukan dengan konsentrasi asam asetat 1 M dengan lama ekstraksi 72 jam yang dapat menghasilkan kolagen dengan rendemen $1,42 \pm 0,27\%$ berdasarkan faktor konsentrasi dan $1,70 \pm 0,35\%$ berdasarkan faktor lama ekstraksi, kadar air $4,19 \pm 0,14\%$, serta teridentifikasi bahwa kolagen belum mengalami degradasi menjadi gelatin berdasarkan berat molekul dan gugus fungsi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (PTN-BH Universitas Diponegoro), Republik Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti, A., M. Dewi, A. P. Hapsari, & S. Mashadi. (2018). Perbandingan Kadar kolagen cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dengan cangkang kerang hijau (*Mytilus viridis*) di bandengan, kendal, jawa tengah. *Jurnal Pharmascience*, 5(2), 134-142. DOI : 10.20527/jps.v5i2.5795.
- Astiana, I., Nurjanah dan T. Nurhayati. (2016). Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan ekor kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(1), 79-93. DOI: 10.17844/jphpi.2016.19.1.79.
- Ata, S. T., R. Yulianty, F. J. Sami dan N. Ramli. (2016). Isolasi kolagen dari kulit dan tulang ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 1(1), 27-30.

- Azara, R. (2017). Pembuatan dan analisis sifat fisikokimia gelatin dari limbah kulit ikan kerapu (*Ephinephelus sp.*). *Jurnal Teknologi Pangan*, **11**(1), 62-69.
- BSN (Badan Standardisasi Nasional). (2014). *Standard Nasional Indonesia SNI 01-8076-2014 : Kolagen Kasar dari Sisik Ikan – Syarat Mutu dan Pengolahan*. Jakarta, Indonesia: BSN.
- Darmanto, Y. S., T. W. Agustini dan F. Swastawati. (2012). Efek kolagen dari berbagai jenis tulang ikan terhadap kualitas miofibril protein ikan selama proses dehidrasi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **23**(1), 36-36.
- Devi, H. L. N. A., P. Suptijah dan M. Nurilmala. (2017). Efektifitas alkali dan asam terhadap mutu kolagen dari kulit ikan patin. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **20**(2), 255-256. DOI : 10.17844/jphpi.v20i2.17906.
- Djailani, F., W. Trilaksana dan T. Nurhayati. (2016). Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidro-ekstraksi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **19**(2), 156-167. DOI : 10.17844/jphpi.2019.19.2.156.
- Erizal, E., B. Abbas, R. Setyo A. K., Sulistioso G. S. dan Sudirman. (2014). Pengaruh iradiasi gamma pada sifat fisiko-kimia kolagen dalam larutan. *Jurnal Sains Materi Indonesia*, **14**(4), 221-225. DOI : 10.17146/jsmi.2014.15.4.4342.
- Fawzya, Y. N., E. Chasanah, A. Poernomo dan M. H. Khirzin. (2016). Isolasi dan karakterisasi parsial kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, **11**(1), 91-100. DOI : 10.15578/jpbkp.v11i1.284.
- Febriansyah, R., A. Pratama dan J. Gumilar. (2019). Pengaruh konsentrasi naoh terhadap rendemen, kadar air dan kadar abu gelatin ceker itik (*Anas platyrhynchos Javanica*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak (JITEK)*, **14**(1), 1-10. DOI : 10.21776/ub.jitek.2019.014.01.1.
- Ferraro, V., B. Gaillard-Martinie, T. Sayd, C. Chambon, M. Anton and V. Santé-Lhoutellier. (2017). Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, **97**, 55–66. DOI : doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.068.
- Hudha, M. I., R. Sepdwiyantri dan S. D. Sari. (2012). Ekstraksi Karaginan dari rumput laut (*Eucheuma spinosum*) dengan variasi suhu pelarut dan waktu operasi. *Jurnal Teknik Kimia*, **6**(2), 50-53.
- Kolanus, J. P., S. Hadinoto dan S. Idrus. (2019). Karakteristik kolagen larut asam dari kulit ikan tuna (*Thunnus albacores*.) dengan metode hidroekstraksi. *Jurnal Riset Teknologi Industri*, **13**(1), 99-110. DOI : 10.26578/jrti.v13i1.4994.
- Mulyani, S., F. M. C. S. Setyabudi, Y. Pranoto and U. Santoso. (2017). The effect of pretreatment using hydrochloric acid on the characteristics of buffalo hide gelatin. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agricultureculture*, **42**(1), 14–22. DOI : 10.14710/jitaa.42.1.14-22.
- Mulyani, S., F. M. C. S. Setyabudi, Y. Pranoto and U. Santoso. (2017). Physicochemical properties of gelatin extracted from buffalo hide pretreated with different acids. *Korean journal for food science of animal resources*, **37**(5), 708-715. DOI : 10.5851/kosfa.2017.37.5.708.
- Moustafa A. Rizk1, and Nasser Y. (2016). Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications. *CODEN: OJCHEG*, **32**(3), 1601-1609. DOI :10.13005/ojc/320336
- Noorzai, S., C. J. R. Verbeek, M. C. Lay and J. Swan. (2020). Collagen extraction from various waste bovine hide sources. *Waste and Biomass Valorization*, **1**(1), 1–13. DOI : 10.1007/s12649-019-00843-2.

- Nurhidayah, B., E. Soekendars dan A. E. Erviani. (2019). Kandungan kolagen sisik ikan bandeng *Chanos-chanos* dan sisik ikan nila *Oreochromis niloticus*. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*, **4**(1), 39-47. DOI : 10.20956/bioma.v4i1.6341.
- Pamungkas, B. F., Supriyadi, A. Murdiati dan R. Indrati. (2018). Ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dan pepsin dari sisik haruan (*Channa striatus*) kering. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **21**(3), 513-521. DOI : 10.17844/jphpi.v21i3.24734.
- Paudi, R., R. Sulistijowati dan L. Mile. (2020). Rendemen kolagen kulit ikan bandeng (*Chanos chanos*) segar hasil ekstraksi asam asetat. *Jambura Fish Processing Journal*, **2**(1), 21-27. DOI : 10.37905/jfpj.v2i1.5930.
- Safithri, M., I. Setyaningsih, K. Tarman, V. M. Yuhendri dan M. Meydia. (2018). Potensi kolagen teripang emas sebagai inhibitor tirosinase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **21**(2), 295-303. DOI : 10.17844/jphpi.v21i2.23085.
- Safithri, M., K. Tarman, P. Suptijah dan N. Widowati. (2019). Karakteristik fisikokimia kolagen larut asam dari kulit ikan parang-parang (*Chirocentrus dorab*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **22**(3), 441-452. DOI : 10.17844/jphpi.v22i3.28924.
- Safithri, M., K. Tarman, P. Suptijah dan S. N. Sagita. (2020). Karakteristik kolagen larut asam teripang gama (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **23**(1), 166-177. DOI : 10.17844/jphpi.v23i1.31063.
- Said, M. I., B. Burhan, T. Tensi and H. Haerati. (2018). Synthesis of collagen from bali cattle's hide using a combination of acid and alkali on the extracting process. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, **43**(3), 247-256. DOI : 10.14710/jitaa.43.3.247-256.
- Santoso, C., T. Surti dan Sumardianto. (2015). Perbedaan penggunaan konsentrasi larutan asam sitrat dalam pembuatan gelatin tulang rawan ikan pari mondol (*Himantura gerrardi*). *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, **4**(2), 106-114.
- Silva, T. H., J. Moreira-Silva, A. L. P. Marques, A. Domingues, Y. Bayon and R. L. Reis. (2014). Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs*, **12**(12), 5881-5901. DOI : 10.3390/md12125881.
- Simamora, G. R. R., W. Trilaksana dan U. Uju. (2019). Profiling kolagen gelembung renang ikan patin (*Pangasius sp.*) melalui proses enzimati. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, **22**(2), 299-310. DOI : 10.17844/jphpi.v22i2.27717.
- Ulfah, M. (2011). Pengaruh konsentrasi larutan asam asetat dan lama waktu perendaman terhadap sifat-sifat gelatin ceker ayam. *Agritech*, **31**(3), 161-167.

