

## KARAKTERISTIK PAPAİN SOLUBLE COLLAGEN GELEMBUNG RENANG IKAN MANYUNG DENGAN VARIASI PRAPERLAKUAN ALKALI DAN RASIO EKSTRAKTAN

Rahmadiana Utami, Wini Trilaksani\*, Safrina Dyah Hardiningtyas

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University  
Jalan Agatis, Bogor Jawa Barat 16680 Indonesia

Diterima: 1 September 2023/Disetujui: 15 Februari 2024

\*Korespondensi: [wtrilaksani@apps.ipb.ac.id](mailto:wtrilaksani@apps.ipb.ac.id)

**Cara sitasi (APA Style 7<sup>th</sup>):** Utami, R., Trilaksani, W., & Hardiningtyas, S. D. (2024). Karakteristik *papain soluble collagen* gelembung renang ikan manyung dengan variasi praperlakuan alkali dan rasio ekstraktn. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(3), 223-241. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i3.49968>

### Abstrak

Kolagen merupakan biomaterial penting pada beberapa industri di Indonesia, namun pemenuhan kebutuhannya masih mengandalkan impor. Transformasi hasil samping gelembung renang ikan manyung (*Arius thalassinus*) sebagai sumber kolagen. Optimalisasi proses ekstraksi kolagen menjadi penting diteliti dalam meningkatkan rendemen. Faktor ekstraksi yang memengaruhi antara lain waktu pra-perlakuan alkali dan rasio sampel dan ekstraktn. Penelitian ini bertujuan menentukan waktu perendaman alkali terbaik dalam menghilangkan protein nonkolagen dan mengevaluasi pengaruh perbedaan jenis alkali pada praperlakuan serta rasio sampel dan ekstraktn dalam menghasilkan kolagen gelembung renang ikan manyung. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu pertama penentuan waktu perendaman terbaik dalam larutan alkali (KOH), dan kedua ekstraksi *papain soluble collagen* selama 48 jam dengan variasi alkali (KOH dan NaOH 0,05 M) dan rasio sampel dan ekstraktn (1:10;1:20;1:30 b/v). Ekstraktn yang digunakan adalah enzim papain 5.000 U/g dalam asam asetat 0,5 M. Parameter yang dianalisis meliputi proporsi ikan, proksimat, asam amino, konsentrasi protein, rendemen, stabilitas termal, gugus fungsi, berat molekul, dan zeta potensial. Hasil menunjukkan bahwa gelembung renang ikan manyung memiliki proporsi 4,08%, kadar protein 33,58±0,11%, asam amino penciri prolina 29,2 mg/g, alanina 28,9 mg/g dan hidroksprolina 18,18 mg/g. Waktu perendaman terbaik dalam larutan KOH adalah 6 jam. Perlakuan terbaik untuk ekstraksi *papain soluble collagen* yakni menggunakan praperlakuan alkali menggunakan NaOH selama 6 jam dengan rasio sampel dan ekstraktn 1:20 (b/v). Rendemen kolagen yang diperoleh sebesar 35,31±0,65% dengan karakteristik gugus amida (A, B, I, II, III), pola elektroforesis ( $\alpha 1, \alpha 2, \beta$ ), suhu transisi maksimum 33,06°C dan zeta potensial +32 mV.

Kata kunci: asam asetat, ekstraksi, enzim, kolagen ikan, rendemen

### Characterization of Papain-Soluble Collagen from Sea Catfish Swim Bladder with Variations in Alkali Pretreatment and Extractant Ratio

#### Abstract

Collagen is a crucial biomaterial in multiple sectors of Indonesia, yet its procurement remains heavily reliant on imports. Catfish swim bladders are considered valuable sources of collagen. It is crucial to optimize the extraction process to obtain a higher yield, which is influenced by variables such as the pretreatment time and sample-to-extractant ratio. This study aimed to maximize the duration of alkali soaking and investigate the influence of various alkali types and extractant-to-sample ratios on collagen extraction from sea catfish swim bladders. This study was comprised of two phases. The first phase involved determining the optimal soaking time in an alkaline solution (KOH). The second phase involved papain-soluble collagen extraction for 48 h, with variations in alkali (KOH and NaOH 0.05 M) and sample-to-extractant ratios (1:10, 1:20, 1:30, w/v). Papain enzyme at 5,000 U/g in 0.5 M acetic acid was utilized as the extractant. The parameters analyzed included fish proportion, proximate amino acids, protein concentration, yield, thermal stability, functional

groups, molecular weight, and zeta potential. The data indicate that the sea catfish swim bladder possesses a percentage of 4.08%, and its protein content is  $33.58 \pm 0.11\%$ . The bladder contains characteristic amino acids, such as proline (29.2 mg/g), alanine (28.9 mg/g), and hydroxyproline (18.18 mg/g). The most suitable duration for alkali soaking using potassium hydroxide (KOH) was determined to be 6 h. Furthermore, the most effective method for extracting papain-soluble collagen involved alkali pretreatment using sodium hydroxide (NaOH) for 6 h with a sample extractant ratio of 1:20 (w/v). The yield of collagen obtained was  $35.31 \pm 0.65\%$ , which displayed characteristic amide groups (A, B, I, II, and III), an electrophoresis pattern consisting of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\beta$ , a maximum transition temperature of  $33.06^\circ\text{C}$ , and a zeta potential of +32 mV.

Keyword: acetic acid, enzyme, extraction, fish collagen, yield

## PENDAHULUAN

Permintaan kolagen di pasar global mencapai 920,1 ton pada tahun 2019 dan perkiraan akan mengalami pertumbuhan selama beberapa tahun ke depan (Grand View Research, 2020). Kebutuhan kolagen di Indonesia masih mengandalkan produk impor dari beberapa negara di antaranya Amerika Serikat, Vietnam, dan Filipina. Data International Trade menunjukkan bahwa tahun 2020 nilai impor kolagen Indonesia mencapai 182.753 ton (International Trade, 2021). Sumber kolagen komersial umumnya berasal dari hewan terestrial, yaitu sapi dan babi yang masih perlu diwaspadai terkait kehalalan serta keamanannya.

*Marine collagen* telah banyak diteliti sebagai alternatif pengganti kolagen terestrial, dengan keunggulan pada aspek fleksibilitas, *water absorption*, *biodegradability*, *porosity*, *rigidity* serta ukuran molekul yang lebih kecil (Furtado *et al.*, 2022). Ikan manyung merupakan salah satu hasil perairan yang menjadi bahan baku utama industri pengasinan jambal roti. Produksi ikan manyung dari hasil perikanan tangkap mencapai 114.108 ton (Kementerian Kelautan Perikanan [KKP], 2018). Industri pengolahan ikan memiliki hasil samping mencapai 40,92%. Hasil samping ini terbagi atas kepala 17%, tulang 14,45%, kulit 3,08%, dan isi perut 5,73% berupa hati, gonad, dan gelembung renang (Idrus *et al.*, 2018).

Gelembung renang atau lupe ikan adalah istilah komersial gelembung renang di Indonesia, sedangkan di perdagangan Internasional dikenal sebagai *fish maw* atau *isinglass*. Gelembung renang (*swim bladder*) merupakan hasil samping industri pengolahan perikanan yang memiliki potensi sebagai sumber kolagen. Gelembung renang

sudah diteliti pemanfaatannya di antaranya sebagai *isinglass*, *edible film* (Riyanto, 2006; Trilaksani *et al.*, 2006) dan kolagen (Djailani *et al.*, 2016; Kartika *et al.*, 2016; Gadi *et al.*, 2017; Trilaksani *et al.*, 2019). Kadar protein kolagen yang terdapat pada gelembung renang ikan manyung mencapai 98% dalam basis kering (Kartika *et al.*, 2016). Gelembung renang ikan memiliki komponen pengotor (lemak dan abu) yang lebih rendah dibandingkan bagian yang lain (Liu *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2021) sehingga mempermudah proses ekstraksi kolagen.

Rendemen merupakan parameter penting pada proses ekstraksi. Faktor yang memengaruhi rendemen, salah satunya yaitu jenis alkali pada tahap praperlakuan (Meng *et al.*, 2019) dan perbandingan ekstrak pada tahap ekstraksi (Trilaksani *et al.*, 2019). Proses ekstraksi diawali tahap praperlakuan menggunakan larutan alkali untuk menghilangkan protein non-kolagen (Kumar *et al.*, 2017). Alkali yang paling banyak digunakan dalam proses praperlakuan, yaitu NaOH dan KOH yang memiliki efisiensi serupa dalam melarutkan protein (Zhang *et al.*, 2018). Efisiensi praperlakuan menggunakan alkali tergantung pada jenis, waktu, suhu, dan konsentrasi (Liu *et al.*, 2015). Praperlakuan menggunakan alkali dapat mempercepat proses ekstraksi kolagen yang menyebabkan pembengkakan (*swelling*) pada struktur fibril kolagen (Meng *et al.*, 2019). Pembengkakan gelembung renang ikan selama praperlakuan menggunakan alkali dapat memfasilitasi kelarutan kolagen pada tahap ekstraksi asam berikutnya (Sitepu *et al.*, 2019).

Trilaksani *et al.* (2019) melaporkan bahwa perbedaan rasio sampel dan ekstrak dapat meningkatkan rendemen kolagen gelembung renang ikan kerapu macan sebesar

14,32%. Rendemen juga dapat ditingkatkan melalui penggunaan enzim papain pada proses ekstraksi. Simamora *et al.* (2019) melaporkan bahwa kolagen gelembung renang ikan patin yang diekstraksi dengan enzim papain menghasilkan rendemen sebesar  $27 \pm 0,08\%$ . Penelitian mengenai optimalisasi kolagen gelembung renang ikan manyung dengan perbedaan jenis alkali dan rasio ekstraktan belum dilaporkan. Tujuan penelitian ini adalah menentukan waktu perendaman alkali terbaik dalam menghilangkan protein non-kolagen dan mengevaluasi pengaruh perbedaan jenis alkali pada praperlakuan serta rasio sampel dan ekstraktan dalam menghasilkan kolagen gelembung renang ikan manyung.

## BAHAN DAN METODE

### Preparasi dan Karakterisasi Gelembung Renang Ikan Manyung

Gelembung renang ikan manyung yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari hasil samping industri pengolahan ikan asin jambal roti di Pangandaran, Jawa Barat. Gelembung renang dibersihkan dan dipreparasi. Analisis gelembung renang mencakup proporsi bagian tubuh ikan, proksimat (Association of Official Analytical Chemist [AOAC], 2006) dan komposisi asam amino dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Shimadzu©-prominace (Hitachi, Tokyo, Jepang) (Nollet, 1996).

### Penentuan Waktu Perendaman Terbaik dalam Larutan Alkali (KOH) (Modifikasi Liu *et al.*, 2015)

Perendaman sampel dalam larutan alkali KOH dilakukan untuk menentukan waktu terbaik penghilangan protein non-kolagen serta menghentikan pelarutan protein kolagen yang berlebihan. Perendaman menggunakan larutan KOH teknis dengan konsentrasi 0,05 M rasio 1:10 (b/v) selama 12 jam pada suhu 4°C. Larutan KOH diganti secara berkala setiap 2 jam. Larutan KOH sisa perendaman pada jam ke-2, 4, 6, 8, 10 dan 12 diukur protein terlarutnya dengan metode Bradford (1976). Pengujian asam amino penciri kolagen (glisina, alanina, prolina) dilakukan untuk menghentikan

proses sebelum protein kolagen mulai ikut terlarut. Pemilihan waktu perendaman terbaik ditentukan berdasarkan konsentrasi protein dan komposisi asam amino penciri kolagen pada larutan KOH sisa perendaman.

### Ekstraksi Kolagen (Modifikasi Jamilah *et al.*, 2013)

Ekstraksi kolagen gelembung renang ikan manyung terdiri dari variasi praperlakuan alkali dan rasio ekstraktan. Ekstraksi kolagen diawali dengan variasi praperlakuan alkali untuk mengevaluasi pengaruh jenis alkali dalam memaksimalkan eliminasi protein non-kolagen dan meningkatkan difusi kolagen dalam ekstraktan. Jenis alkali yang digunakan dalam proses praperlakuan adalah NaOH (Teknis, Bogor, Indonesia) dan KOH (Teknis, Bogor, Indonesia) dengan konsentrasi 0,05 M rasio 1:10 (b/v). Waktu perendaman alkali terbaik dari tahap pertama digunakan pada masing-masing jenis alkali dalam proses praperlakuan kolagen. Sampel dicuci dengan akuades sampai pH netral dan dilanjutkan proses penghilangan lemak menggunakan butil alkohol 10% rasio 1:10 (b/v) selama 12 jam.

Ekstraksi kolagen dari gelembung renang ikan manyung dilakukan menggunakan perbedaan rasio ekstraktan. Ekstraktan yang digunakan adalah enzim papain (HiMedia, India) aktivitas 5.000 U/g yang dicampurkan ke dalam asam asetat 0,5 M (Merck, Jerman). Sampel diekstraksi dengan rasio ekstraktan 1:10 (b/v), 1:20 (b/v), dan 1:30 (b/v) pada suhu 4°C selama 48 jam. Sampel disaring lalu diendapkan menggunakan larutan NaCl (Teknis, Indonesia) 2,6 M selama 12 jam. Presipitat disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g selama 30 menit. Pelet dilarutkan dalam CH<sub>3</sub>COOH (Merck, Jerman) 0,5 M rasio 1:1 (b/v) dan didialisis menggunakan membran dialisis (MWCO 14 kDa). Dialisis pertama dengan CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M selama 24 jam dan dialisis kedua dengan akuades selama 24 jam. Kolagen yang dihasilkan diproses liofilisasi menggunakan *freeze dryer* (Eyela FDU-1200, Jepang). Hasil rendemen kolagen dengan variasi praperlakuan alkali dan rasio ekstraktan dianalisis secara statistik. Hasil perlakuan ekstraksi dengan rendemen

kolagen terbaik diuji dan dianalisis secara deskriptif. Parameter yang dianalisis meliputi gugus fungsi dengan *Attenuated Total Reflectin- Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR)* spektrofotometri (Thermo Scientific-Nicolet iS50, USA), berat molekul dengan SDS PAGE (Broadrange Bio Rad®), stabilitas termal dengan *Differential Scanning Calorimetry (DSC-60, Japan)*, nilai pH dengan pH meter (HI 2210), dan zeta potensial dengan *Zeta Potensial Analyzer (HORIBA SZ 100z, Jepang)*.

### Analisis Rendemen

Perhitungan rendemen kolagen diperoleh dari perbandingan antara berat kering kolagen dengan berat gelembung renang ikan manyung sebelum dilakukan ekstraksi. Rumus perhitungan persentase rendemen sebagai berikut:

$$\text{Rendemen kolagen (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Keterangan:

A = berat kering kolagen

B = berat bahan baku basah

### Analisis Asam Amino (Nollet, 1996)

Analisis asam amino menggunakan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Analisis asam amino terdiri dari 2 tahap, yaitu (1) pembuatan larutan sampel dan (2) pembuatan larutan standar. Perhitungan kadar asam amino dihitung dengan rumus:

$$A \text{ (mg/g)} = \frac{\text{rasio analit sampel} \times (C_{\text{std}} \frac{\text{pmol}}{10})}{D \times E} \times Fp \times BM \times 10$$

Keterangan:

A = asam amino (mg/g)

Rasio = luas area analit / luas area AABA

Fp = faktor pengenceran (1 µL) x volume (2 µL)

BM = bobot molekul masing-masing asam amino (g/mol)

D = rasio analit std

E = bobot sampel (g)

### Analisis Gugus Fungsi (Foggia et al., 2011)

Pengujian gugus fungsi kolagen dilakukan untuk menentukan daerah serapan amida penyusun pada kolagen gelembung renang ikan manyung. Penentuan gugus

fungsi pada kolagen menggunakan *Attenuated Total Reflectin- Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spektrofotometri*. Spektrum inframerah dikumpulkan dengan resolusi spektral 2 cm<sup>-1</sup> dan sampel sebanyak 2 tetes atau 20 µL diletakkan pada *crystal plate ATR-Golden Gate refleksi tunggal (Specac)*. *Disk* yang telah dicetak kemudian dimasukkan ke dalam *Fourier Transform Infrared (FTIR) spektrofotometer* dan diukur pada bilangan gelombang 4.000 sampai 500 cm<sup>-1</sup>.

### Analisis Bobot Molekul Protein Kolagen (Singh et al., 2011)

Sampel dilarutkan dalam SDS 5% dan diinkubasi pada suhu 85°C. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 4.000 x g selama 5 menit. Supernatan dicampur dengan buffer (Tris HCl 60 mg, pH 6,8 yang mengandung 2% SDS dan 25% gliserol) dengan rasio 1:1 (v/v) dan 10% β-merkaptotanol (β-ME), lalu dipanaskan selama 2 menit. Sampel 5 µL dimasukkan ke dalam gel *polyacrylamide* 12,5% dan dielektroforesis pada arus konstan 15 mA/gel selama 3 jam. Gel diwarnai dengan coomassie blue R-250 0,05% (b/v) dalam metanol 15% (v/v) dan asam asetat dan 5% (v/v) selama 3 jam serta campuran 30% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asam asetat selama 2 jam. Marker yang digunakan yaitu marker protein merek SDS PAGE Broadrange Bio Rad® dengan bobot molekul 10-250 kDa.

### Analisis Termal (Tan & Chang, 2018)

*Differential Scanning Calorimetry (DSC)* dianalisis untuk mengetahui kesetabilan kolagen terhadap oksidasi dan kapasitas panas. Sampel ditambahkan air deionisasi dengan rasio 1:40 dan disimpan selama 2 hari pada suhu 4°C. Sampel sebanyak 10 mg dideteksi dari 0 sampai 50°C pada kecepatan transisi maksimum (T<sub>max</sub>) sebagai suhu puncak eksotermik.

### Analisis Zeta Potensial (Tan & Chang, 2018)

Penentuan nilai zeta potensial dari sampel kolagen menggunakan alat *Zeta Potential Analyzer* dengan metode *Dynamic Light Scattering (DLS)* pada suhu 25°C,



kuat medan listrik 100 mV. Kolagen hasil ekstraksi dilarutkan dalam asam asetat 0,1 M pada konsentrasi 1 mg/mL. Akua destilata dimasukkan ke dalam *fluid tank* sebagai *baseline*. Sampel dimasukkan ke dalam *fluid tank* tetes demi tetes, hingga konsentrasi mencukupi kemampuan pembacaan alat. Sampel yang diukur berupa fase cair dan memiliki rentang pH 1–13.

### Analisis Data

Data variasi praperlakuan alkali dan rasio ekstraktan pada tahap ekstraksi kolagen dianalisis dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) menggunakan ragam analisis ANOVA dua faktor. Faktor yang dianalisis di antaranya variasi jenis alkali pada tahap praperlakuan (NaOH dan KOH) dan faktor rasio sampel dan ekstraktan (1:10;1:20; dan 1:30 b/v). Respons yang diukur adalah persentase rendemen kolagen. Data diolah dengan perangkat lunak SAS 9,4. Hasil yang berpengaruh nyata dilakukan uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%. Analisis data karakteristik gelembung renang ikan manyung (proporsi, proksimat dan asam amino), perendaman gelembung renang dalam larutan KOH (konsentrasi protein dan asam amino) serta kolagen dengan perlakuan terbaik (gugus fungsi, stabilitas termal, bobot molekul, pH dan zeta potensial) dilakukan secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Proporsi Gelembung Renang Ikan Manyung

Gelembung renang merupakan salah satu sumber alternatif penghasil kolagen dengan kandungan protein kolagen pada hampir seluruh lapisan (lapisan luar, tengah maupun dalam) (Gadi *et al.*, 2017). Proporsi suatu bahan adalah perbandingan antara dua atau lebih bagian dalam keseluruhan bahan. Proporsi bagian tubuh ikan manyung menjadi indikator dalam mengevaluasi ketersediaan bahan baku yang dapat dieksplorasi menjadi sumber kolagen. Proporsi gelembung renang ikan manyung dapat dilihat pada *Figure 1*.

Bagian tubuh ikan manyung terdiri atas daging, kepala, tulang, kulit, jeroan dan gelembung renang. Liu *et al.* (2012) menjelaskan bahwa setiap bagian pada hasil samping ikan (sirip, sisik, kulit, tulang dan gelembung renang) memiliki perbedaan komposisi kimia penyusun. Kartika *et al.* (2016) menyatakan bahwa gelembung renang merupakan hasil samping perikanan dengan proporsi terkecil (2%), namun memiliki kandungan protein yang tinggi sebesar 98% bk. Lopez *et al.* (2021) melaporkan bahwa gelembung renang memiliki komposisi protein, kandungan lemak serta komponen *impurities* lebih rendah dibandingkan kulit. Gelembung renang ikan berpotensi menghasilkan tingkat kemurnian kolagen yang tinggi melalui proses ekstraksi yang lebih

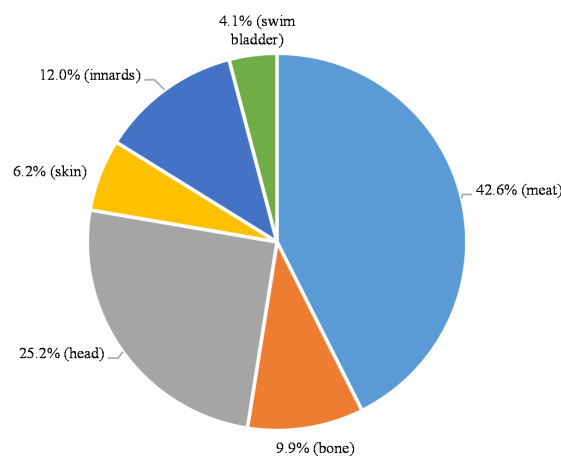


Figure 1 Proportion of swim bladder of sea catfish (*Arius thalassinus*)  
Gambar 1 Proporsi gelembung renang ikan manyung (*Arius thalassinus*)

efisien dan sederhana. Persentase proporsi gelembung renang ikan manyung (4,08%) yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan gelembung renang ikan kerapu 1,67% (Trilaksani *et al.*, 2019), gelembung renang ikan tuna sirip kuning 0,35% (Idrus *et al.*, 2018), dan gelembung renang ikan cunang 0,62% (Kartika *et al.*, 2016), sehingga memiliki potensi yang lebih baik untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku kolagen.

### Komposisi Kimia Gelembung Renang Ikan Manyung

Analisis proksimat dilakukan untuk menentukan komposisi kimia (karbohidrat, lemak, air, abu, dan protein) pada gelembung renang ikan manyung. Bahan baku dengan kandungan protein yang tinggi memiliki kapabilitas yang baik untuk dijadikan sebagai sumber kolagen. Hasil pengujian proksimat gelembung renang ikan manyung dapat dilihat pada *Table 1*.

Gelembung renang ikan manyung memiliki kadar air sebesar 63,88% lebih rendah dari kadar air gelembung renang ikan cunang, ikan patin dan ikan kerapu. Kadar air pada gelembung renang berfungsi sebagai pengatur keseimbangan pH, menjaga kelenturan dan tekstur (Chen *et al.*, 2016). Hasil pengujian menunjukkan bahwa gelembung renang ikan manyung pada penelitian ini dalam kondisi segar. Kandungan air pada bagian tubuh ikan dalam kondisi segar berkisar antara 70-80% (Suwandi *et al.*, 2014). Gelembung renang ikan manyung memiliki kandungan protein sebesar 33,58%. Hasil kadar protein penelitian lebih tinggi dibandingkan gelembung renang

ikan cunang, ikan patin dan ikan kerapu (*Table 1*). Gadi *et al.* (2017) melaporkan bahwa kandungan protein dominan pada gelembung renang ikan adalah protein kolagen. Hal ini menunjukkan bahwa gelembung renang ikan manyung dengan kadar protein yang lebih tinggi berpotensi digunakan sebagai bahan baku kolagen. Kandungan karbohidrat gelembung renang ikan manyung terdapat dalam jumlah yang kecil, yaitu 1,67%, Hemre *et al.* (2022) menyebutkan bahwa karbohidrat dan protein memiliki interaksi yang berperan penting dalam berbagai proses fisiologis ikan. Gelembung renang ikan manyung memiliki kadar lemak dan abu lebih rendah dibandingkan komponen kimia lainnya yang dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi serta mempercepat dan mempermudah proses penghilangan komponen non-kolagen. Zelechowska *et al.* (2010) menyatakan bahwa keberadaan lemak dan pengotor lainnya dapat menurunkan kemurnian dan hasil ekstraksi kolagen.

### Komposisi Asam Amino Gelembung Renang Ikan Manyung

Asam amino merupakan senyawa yang memiliki peranan penting dalam pembentukan protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gelembung renang ikan manyung memiliki asam amino tertinggi, yaitu glisina (Gly) dan terendah, yaitu sistein (Cys). Asam amino Gly termasuk dalam asam amino penciri kolagen. Komposisi asam amino dapat dilihat pada *Figure 2*.

Belitz *et al.* (2009) melaporkan bahwa glisina adalah asam amino paling sederhana

Table 1 Chemical composition swim bladder of sea catfish and other fish  
Tabel 1 Komposisi kimia gelembung renang ikan manyung dan beberapa ikan lainnya

Parameter (%) (wb)	Sea catfish ( <i>A. thalassinus</i> )	Yellow-pike ( <i>M. talabon</i> ) <sup>1</sup>	Catfish ( <i>Pangasius sp.</i> ) <sup>2</sup>	Tiger grouper ( <i>E. fuscoguttatus</i> ) <sup>3</sup>
Moisture	63.88±0.00	73.88±0.22	74.61±0.02	71.1±0.84
Protein	33.58±0.11	24.74±0.75	21.63±0.18	25.88±0.0
Fat	0.79±0.11	0.50±0.05	0.55±0.11	1.29±0.00
Mineral	0.08±0.01	0.27±0.03	0.50±0.11	0.15±0.01
Carbohydrate	1.67±0.01	0.61±0.36	2.71±0.02	1.40±0.84

<sup>1</sup>Djailani *et al.* (2016); <sup>2</sup>Simamora *et al.* (2019); <sup>3</sup>Trilaksani *et al.* (2019)

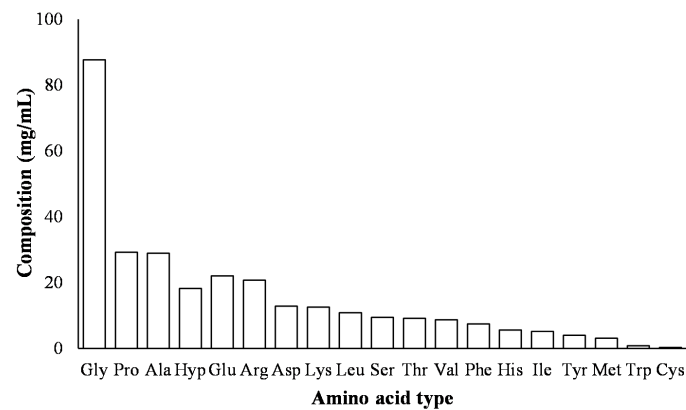


Figure 2 Amino acid composition in swim bladder of sea catfish (*A. thalassinus*)

Gambar 2 Komposisi asam amino gelembung renang ikan manyung (*A. thalassinus*)

dan umumnya tersedia dalam jumlah besar dengan komposisi sekitar 25-30% dari total protein kolagen. Ketersediaan glisina yang tinggi sangat penting dalam pembentukan kolagen dengan struktur spiral. Kolagen *triple helix* dibentuk terutama oleh asam amino Ala, Phe, Asp, Glu, His, Leu, Met, dan Tyr (Gauza-Włodarczyk *et al.*, 2017). Asam amino penciri kolagen lainnya yang ditemukan, yaitu Ala, Pro dan Hyp. Identitas asam amino yang ditemukan merupakan sekuens dasar Gly-X-Y yang mengatur elastisitas kolagen dalam matriks ekstraseluler, dimana posisi X dan Y adalah Pro dan Hyp (Liu *et al.*, 2012; Kirkness *et al.*, 2019). Asam amino Gly, Pro, dan Hyp memiliki konfigurasi spasial dan sudut antar ikatan serta jarak antar atom dalam berbagai asam amino yang berbeda (Gauza-Włodarczyk *et al.*, 2017). Asam amino prolina adalah asam amino esensial dengan cincin pirolidin untuk memperkuat struktur *triple helix* (Tamilmozhi *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017). Prolin (Pro) memiliki atom nitrogen dalam cincin heterosiklik yang menghilangkan kemungkinan rotasi di sekitar ikatan karbon nitrogen dan mencegah pembentukan ikatan hidrogen intramolekul, sehingga rantai dapat tertekuk dan menimbulkan putaran, sedangkan alanina merupakan asam amino yang berfungsi dalam membentuk struktur spiral kolagen (Gauza-Włodarczyk *et al.*, 2017). Hidroksiprolina (Hyp) merupakan asam amino khas kolagen yang terbentuk dari proses oksidasi prolina yang dikatalis oleh prolina hidroksilase. Keberadaan hidroksiprolina dalam struktur kolagen

dapat meningkatkan elastisitas kolagen serta berkontribusi pada stabilitas struktur *triple helix* oleh formasi ikatan hidrogen antar rantai melalui gugus hidroksil (Kittiphatanabawon *et al.*, 2005; Ghanaeian & Soheilifard, 2018). Kandungan Hyp pada gelembung renang ikan manyung 18,18 mg/g lebih rendah dibandingkan pada bagian kulit ikan, yaitu 19,5 mg/g dan lebih tinggi dari bagian tulang sebesar 5,71 mg/g (Kittiphatanabawon *et al.*, 2005). Perbedaan kandungan asam amino penyusun kolagen dapat tergantung pada spesies, lingkungan, dan suhu tubuh ikan (Lin *et al.*, 2020).

### Waktu Perendaman Alkali terbaik menggunakan KOH

Proses perendaman gelembung renang ikan menggunakan larutan alkali merupakan tahapan penting sebelum dilakukan ekstraksi kolagen. Perendaman menggunakan alkali KOH bertujuan menghilangkan komponen protein non kolagen, lemak, pigmen, dan pengotor lainnya yang secara tidak langsung dapat memengaruhi hasil ekstraksi, kemurnian, dan efisiensi ekstraksi kolagen. Waktu perendaman gelembung renang ikan merupakan salah satu faktor penting dalam meningkatkan efektivitas penghilangan komponen protein non-kolagen. Jenis alkali yang digunakan adalah KOH konsentrasi 0,5 M 1:20 (b/v) selama 12 jam. Hasil pengamatan protein terlarut dalam sisa perendaman KOH pada setiap regulasi (2; 4; 6; 8; 10 dan 12) jam disajikan pada *Figure 3*.

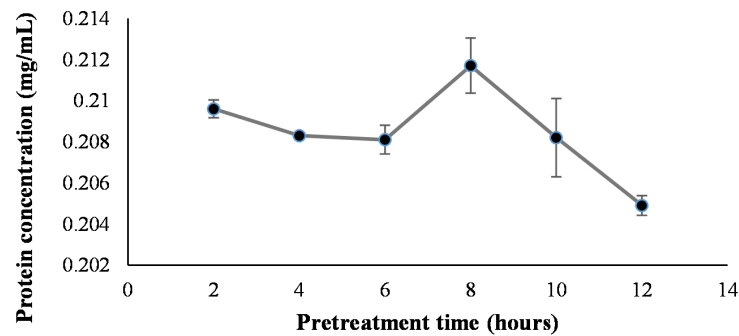


Figure 3 The soluble protein content of the residual KOH soaking solution  
Gambar 3 Kandungan protein terlarut dalam larutan sisa perendaman KOH

Proses perendaman gelembung renang ikan manyung menggunakan alkali KOH dilakukan sebelum proses ekstraksi bertujuan untuk menghilangkan protein non-kolagen dan komponen pengotor pada gelembung renang ikan manyung. Regulasi larutan KOH secara bertahap setiap 2 jam dilakukan untuk mengamati kondisi transisi antara degradasi protein non-kolagen dan protein kolagen. Hasil menunjukkan bahwa perendaman gelembung renang ikan manyung menggunakan KOH pada 2 jam pertama mampu melarutkan protein non-kolagen yang cukup tinggi, yaitu  $0,21 \pm 0,00$  mg/mL. Konsentrasi protein larutan sisa perendaman KOH semakin menurun hingga jam ke-6. Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan protein non-kolagen pada larutan KOH sisa perendaman gelembung renang semakin berkurang seiring pertambahan waktu perendaman. Hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan Simamora *et al.* (2020) yang melaporkan konsentrasi protein semakin menurun seiring dengan pergantian larutan alkali sampai waktu perendaman 6 jam. Jaswir *et al.* (2011) menjelaskan bahwa pembengkakan/*swelling* yang diakibatkan oleh larutan alkali mampu memutus sebagian ikatan antar serat pada struktur kolagen serta menimbulkan ruang untuk air menembus dan terserap sehingga zat non-kolagen yang awalnya terperangkap dalam matriks kolagen mudah dilepaskan. Liu *et al.* (2015) menjelaskan bahwa peningkatan

pembengkakan gelembung renang seiring waktu perendaman menggunakan alkali dapat meningkatkan kecepatan transfer massa di matriks jaringan.

Konsentrasi protein dari larutan sisa perendaman KOH semakin menurun seiring dengan pergantian larutan selama waktu perendaman 6 jam, namun terjadi kenaikan konsentrasi protein pada waktu perendaman 8 jam. Konsentrasi protein mengalami penurunan kembali pada waktu perendaman 10 jam dan 12 jam berikutnya. Hasil ini diduga larutan KOH dapat menurunkan protein non-kolagen seiring lama perendaman. Peningkatan waktu perendaman KOH melebihi 6 jam mulai mendegradasi protein kolagen sehingga meningkatkan konsentrasi protein terlarut. Hal ini selaras dengan pendapat Cho *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa gugus OH berikatan dengan protein dan komponen pengotor lainnya pada matriks kolagen sehingga terjadi perpindahan zat selama perendaman alkali. Konsentrasi protein sisa perendaman KOH berikutnya semakin menurun diduga karena komposisi protein non-kolagen menipis dan lebih didominasi oleh protein kolagen sehingga untuk membuktikan dugaan tersebut dilakukan pengecekan asam amino penciri kolagen yang berupa glisina, prolina dan alanina pada larutan sisa perendaman KOH jam ke-8 dan jam ke-10. Hasil analisis asam amino pada larutan sisa perendaman KOH dapat dilihat pada *Figure 4*.



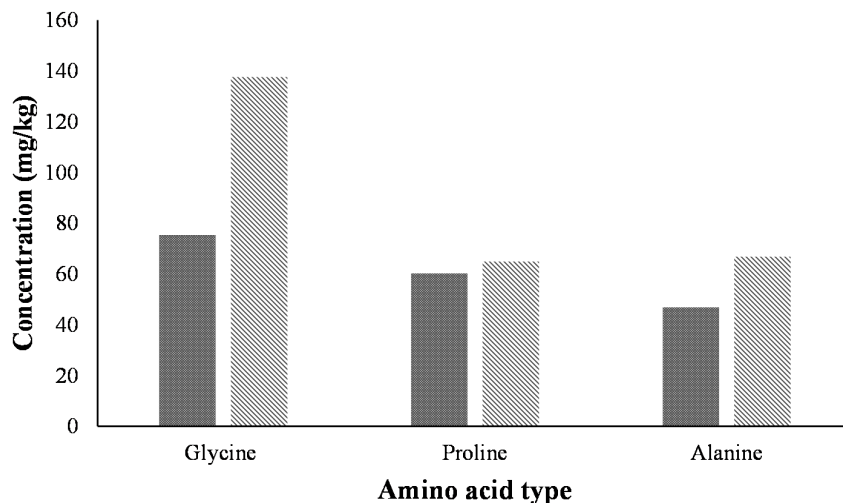


Figure 4 Amino acid composition in the KOH solution from sea catfish swim bladder;

(■) 8 hours soaking, (▨) 10 hours soaking

Gambar 4 Komposisi asam amino pada larutan KOH gelembung renang ikan manyung;

(■) 8 jam perendaman, (▨) 10 jam perendaman

Hasil menunjukkan bahwa perendaman menggunakan KOH melebihi 6 jam dapat melarutkan protein kolagen dengan konsentrasi asam amino yang semakin meningkat selama jam ke-8 hingga jam ke-10. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin lama waktu perendaman gelembung renang ikan manyung akan meningkatkan kelarutan kolagen. Hal ini diduga karena protein non-kolagen pada gelembung renang sudah menipis pada jam ke-6, dan waktu perendaman selanjutnya protein yang terlarut adalah dominan protein kolagen. Hal ini dijelaskan oleh Mo *et al.* (2023) bahwa kolagen dapat terlarut pada pH alkali namun tidak lebih baik pada pH asam. Yoshimura *et al.* (2000) menjelaskan bahwa perendaman alkali dapat menyerang bagian telopeptida yang menyebabkan kolagen terlarut. Efisiensi penghilangan protein non-kolagen menggunakan alkali dipengaruhi oleh suhu, waktu dan konsentrasi (Liu *et al.*, 2015). Sitepu *et al.* (2019) melaporkan bahwa waktu perendaman dalam larutan KOH 0,05 M selama 6 jam merupakan waktu optimal dalam penghilangan protein non-kolagen gelembung renang ikan patin. Waktu efektif perendaman gelembung renang ikan manyung dalam larutan KOH yaitu pada jam ke-6, dikarenakan nilai protein terendah sebelum

terjadi peningkatan konsentrasi protein akibat terlarutnya protein kolagen. Waktu perendaman terbaik yang dipilih selanjutnya digunakan sebagai waktu praperlakuan ekstraksi kolagen dengan variasi jenis alkali (KOH dan NaOH).

### Rendemen Kolagen Gelembung Renang Ikan Manyung

Metode ekstraksi merupakan salah satu faktor yang memengaruhi rendemen kolagen. Variasi jenis alkali (NaOH dan KOH) pada proses praperlakuan serta enzim papain aktivitas 5.000 U/g dalam rasio sampel:ekstraktan (1:10; 1:20; 1:30, b/v) dilakukan dalam upaya meningkatkan rendemen ekstrak kolagen. Hasil rendemen kolagen dapat dilihat pada *Figure 5*.

Hasil sidik ragam (*Figure 5*) menunjukkan bahwa interaksi perbedaan variasi praperlakuan alkali serta rasio sampel:ekstraktan pada proses ekstraksi berpengaruh nyata terhadap rendemen kolagen. Hasil uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa bahwa interaksi faktor variasi jenis alkali dan rasio ekstraktan berbeda signifikan. Hasil praperlakuan menggunakan alkali NaOH menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan KOH. Nilai rendemen tertinggi diperoleh pada

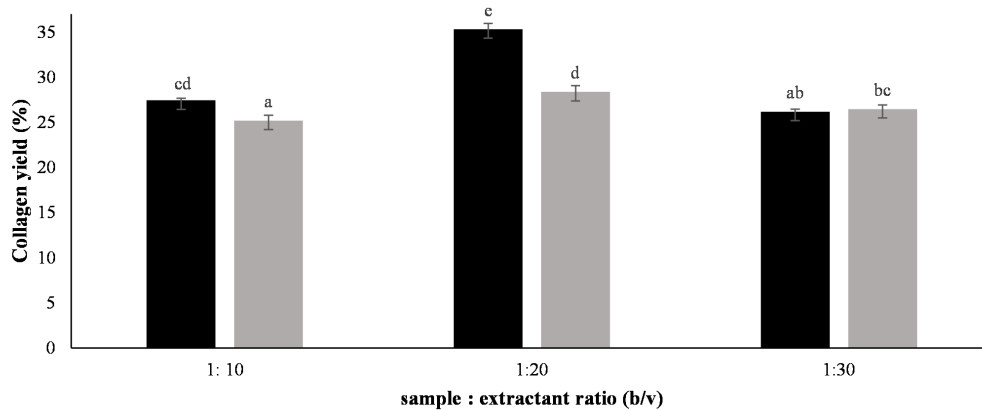


Figure 5 Collagen yield at different alkaline type and sample:extractant ratio; superscripts (a, b, d, e) on different interaction factors show significantly different treatment results ( $p < 0.05$ ), (■) pretreated with NaOH, (■) pretreated with KOH

Gambar 5 Rendemen kolagen pada perbedaan alkali dan rasio sampel:ekstraktan, superskrip a, b, c, d, e) pada interaksi faktor berbeda menunjukkan signifikansi perlakuan ( $p < 0,05$ ); (■) praperlakuan menggunakan NaOH, (■) praperlakuan menggunakan KOH

praperlakuan menggunakan NaOH dan rasio sampel dan ekstraktan 1:20 (b/v) yaitu sebesar 35,31%. Hasil ini diduga karena pembengkakan gelembung renang pada tahap praperlakuan menggunakan NaOH lebih besar dibandingkan KOH. Sitepu *et al.* (2019) menjelaskan bahwa perbedaan afinitas alkali memengaruhi pembengkakan (*swelling*) elektrostatis pada gelembung renang. Kondisi gelembung renang yang lebih bengkak/*swell* dari hasil perendaman alkali dapat mempermudah difusi dan meningkatkan kelarutan kolagen pada tahap ekstraksi asam.

Hasil penelitian menunjukkan rasio sampel:ekstraktan memengaruhi rendemen kolagen. Nilai maksimum rasio ekstraktan pada ekstraksi kolagen adalah 1:20 (b/v). Feng *et al.* (2013) menjelaskan bahwa rendemen kolagen meningkat dengan peningkatan rasio sampel dan pelarut disebabkan karena peningkatan area reaksi enzim. Hasil penelitian memperoleh penurunan rendemen dengan peningkatan rasio sampel dan pelarut mencapai 1:30 (b/v). Hal ini selaras dengan penelitian Song *et al.* (2014) yang melaporkan bahwa rendemen mengalami penurunan setelah mencapai nilai maksimum. Feng *et al.* (2013) menjelaskan bahwa peningkatan rasio lebih lanjut tidak meningkatkan hasil *Pepsin Soluble Collagen* (PSC) karena reaksi telah

lengkap. Penurunan rendemen kolagen pada rasio sampel:ekstraktan 1:30 (b/v) diduga dipengaruhi oleh kecepatan pengadukan yang konstan pada perbedaan volume pelarut yang semakin besar. Kiew & Mat Don (2012) menjelaskan bahwa rasio sampel dan ekstraktan serta kecepatan pengadukan memengaruhi kelarutan dan perpindahan massa antara sampel dalam ekstraktan. Rasio sampel:ekstraktan yang semakin tinggi dengan kecepatan pengadukan konstan menghasilkan kekuatan pendorong yang lebih rendah untuk partikel kolagen berdifusi dari sampel ke dalam medium, sehingga terjadi penurunan dalam perpindahan massa pada proses ekstraksi.

Hasil perlakuan terbaik ekstraksi kolagen gelembung renang ikan manyung, yaitu menggunakan praperlakuan NaOH dan rasio sampel:ekstraktan 1:20 (b/v). Hasil rendemen kolagen gelembung renang ikan manyung yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan gelembung renang ikan patin dengan metode asam 16,04% dan enzim papain 27% (Simamora *et al.*, 2019; Sitepu *et al.*, 2019). Perbedaan hasil ekstraksi dipengaruhi oleh spesies bahan baku, kondisi biologis, dan metode praperlakuan kolagen (Liu *et al.*, 2012). Metode ekstraksi dengan penambahan enzim papain dapat meningkatkan rendemen

kolagen melalui proses pemecahan di wilayah telopeptida (Sinthusamran *et al.*, 2013; Kaewdang *et al.*, 2014).

### Gugus Fungsi Kolagen Gelembung Renang Ikan Manyung

Hasilekstraksidenganperlakuanterbaik dianalisis untuk menentukan karakteristik kolagen yang diperoleh. Karakteristik utama yang membedakan kolagen dengan protein lainnya terletak pada gugus fungsional. Pengujian gugus fungsi kolagen dilakukan menggunakan *Fourier transform Infrared Spectroscopy* (FTIR). Prinsip dari spektroskopi FTIR, yaitu pengukuran panjang gelombang dan intensitas penyerapan radiasi inframerah. Daerah serapan khas amida pada kolagen dapat diklasifikasi di antaranya wilayah serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III (Muyonga *et al.*, 2004). Hasil spektra FTIR kolagen gelembung renang ikan manyung dapat dilihat pada *Figure 6*.

Hasil analisis gugus fungsi kolagen gelembung renang ikan manyung dengan praperlakuan NaOH dan ekstraksi rasio 1:20 (b/v) menunjukkan adanya puncak daerah serapan amida A, amida B, amida I, amida II, dan Amida III. Bilangan gelombang amida A pada kolagen gelembung renang ikan manyung terdeteksi pada puncak serapan  $3.271\text{ cm}^{-1}$ . Amida A umumnya memiliki getaran *NH stretching* bebas pada kisaran  $3.400\text{--}3.440\text{ cm}^{-1}$  (Muyonga *et al.*, 2004).

(Qutrinnada *et al.*, 2022) melaporkan amida A pada standar kolagen berada pada  $3.491\text{ cm}^{-1}$  karena dipengaruhi adanya gugus fungsi OH yang berpartisipasi sebagai molekul air dalam kolagen. Daerah serapan pita amida A pada kolagen gelembung renang ikan manyung terdapat pada bilangan gelombang  $3.270\text{ cm}^{-1}$ . Amida A pada bilangan gelombang sekitar  $3.270\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan hidrogen dengan kekuatan medium (Foggia *et al.*, 2011). Amida A yang terdapat pada kolagen gelembung renang ikan manyung merupakan *NH stretching* yang berasosiasi dengan ikatan hidrogen. Spektrum FTIR sesuai hasil penelitian juga ditemukan pada kolagen dari gelembung renang ikan tuna sirip kuning dengan puncak serapan  $3.275\text{ cm}^{-1}$  (Kaewdang *et al.*, 2014).

Bilangan gelombang amida B pada kolagen gelembung renang ikan manyung terdapat pada puncak  $3.065\text{ cm}^{-1}$ . Puncak amida B pada kolagen gelembung renang ikan manyung lebih tinggi dibandingkan kolagen standar dengan panjang gelombang  $2.933\text{ cm}^{-1}$ . Keberadaan gugus amida B mendekati  $3.000\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan asimetrikal *stretching*  $\text{CH}_2$  (Kong & Yu, 2007). Gugus fungsi yang terdeteksi pada kolagen gelembung renang ikan manyung selanjutnya, yaitu amida I, amida II, dan amida III. Pembeda protein kolagen dan protein lainnya adalah amida I. Amida I memiliki korelasi yang erat dengan struktur sekunder protein (Muyonga *et al.*,

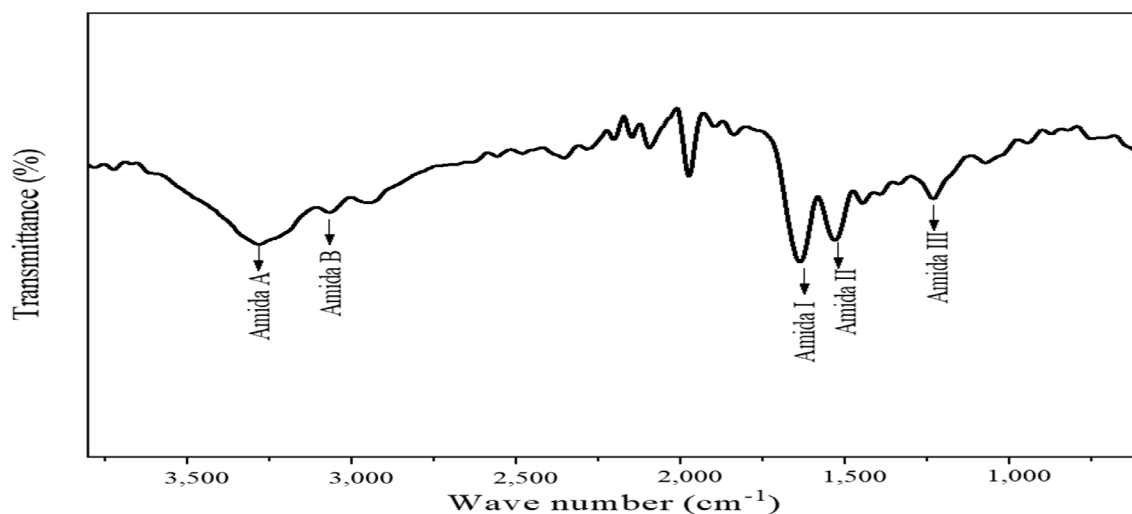


Figure 6 Spectrum of functional groups of sea catfish swim bladder collagen

Gambar 6 Spektrum gugus fungsi kolagen gelembung renang ikan manyung

2004). Spektrum struktur sekunder amida I terdiri atas  $\alpha$ -heliks pada daerah serapan  $1.654\text{ cm}^{-1}$  dan  $1.658\text{ cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -sheet pada daerah serapan  $1.624$  dan  $1.642\text{ cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -turns pada daerah serapan  $1.666\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.672\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.680\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.688\text{ cm}^{-1}$  dan *random coil* pada daerah serapan  $1.648\text{ cm}^{-1}$  (Muyonga *et al.*, 2004). Puncak serapan amida I yang terdapat pada kolagen gelembung renang ikan manyung terdeteksi dengan bilangan gelombang  $1.629\text{ cm}^{-1}$ . Puncak serapan amida I pada kolagen gelembung renang ikan manyung menunjukkan struktur sekunder protein pada  $\beta$ -sheet. Hasil pembacaan spektrum amida I kolagen gelembung renang ikan manyung mendekati dengan hasil standar kolagen. Amida I pada standar kolagen memiliki puncak pada panjang gelombang  $1.630\text{ cm}^{-1}$  (Qutrinnada *et al.*, 2022). Hasil tersebut menunjukkan bahwa kolagen yang diperoleh dari gelembung renang ikan manyung memiliki kesesuaian dengan kolagen standar.

Amida II pada kolagen gelembung renang ikan manyung terdeteksi dengan daerah serapan  $1.536\text{ cm}^{-1}$ . Amida II pada bilangan gelombang  $1.480\text{-}1.575\text{ cm}^{-1}$  memiliki karakteristik vibrasi *stretching* CN dan *binding* NH (Kong & Yu, 2007). Gugus Amida III pada kolagen gelembung renang ikan manyung memiliki bilangan gelombang

$1.233\text{ cm}^{-1}$ . Foggia *et al.* (2011) menyebutkan bahwa daerah serapan amida III ditunjukkan pada  $1.200\text{-}1.300\text{ cm}^{-1}$  dengan karakteristik berupa *stretching* CN dan *binding* NH. Keberadaan amida III juga menandakan adanya struktur *triple helix* yang merupakan ciri khas dari kolagen dan Intensitas amida III berkaitan dengan struktur *triple helix* (Kong & Yu, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa kolagen gelembung renang ikan manyung yang diekstraksi dengan praperlakuan jenis alkali NaOH dan rasio sampel dan ekstrak (1:20 b/v) belum terdegradasi menjadi bentuk gelatin. Standar daerah serapan spektrum FTIR kolagen dan daerah serapan spektrum kolagen disajikan pada *Table 2*.

### Stabilitas Termal Kolagen Gelembung Renang Ikan Manyung

Stabilitas termal merupakan karakteristik fisik khas kolagen yang menentukan sifat termodinamis dan suhu denaturasi. Analisis termal diuji menggunakan metode *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dengan mengukur fase-fase transisi dan perbedaan aliran panas pada sampel. Suhu denaturasi merupakan parameter yang digunakan dalam menjaga ketahanan kolagen terhadap suhu tertentu. Zidek *et al.* (2016) menyatakan kolagen mengalami denaturasi

Table 2 Characteristics of collagen functional groups of FTIR results

Tabel 2 Karakteristik gugus fungsi kolagen hasil analisis FTIR

Absorption area	Absorption peak wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )			
	Absorption area standard	Research result	Information	References
Amida A	3,290-3,270	3,205	NH stretching of the amide group associated with hydrogen bonds	Foggia <i>et al.</i> (2011)
Amida B	3,100	2,963	Stretching $\text{CH}^2$	Kong & Yu (2007)
Amida I	1,695-1,630	1,667	Stretching $\text{C=O}$	Foggia <i>et al.</i> (2011)
Amida II	1,480-1,575	1,549	CN stretching	Kong & Yu (2007)
Amida III	1,200-1,300	1,446	NH binding	Foggia <i>et al.</i> (2011)

struktur menjadi gelatin saat suhu melewati stabilitas termal kolagen. Retensi struktur kolagen terhadap panas dipengaruhi oleh kestabilan struktur helikal kolagen dalam suhu lingkungan. Stabilitas termal yang tinggi pada kolagen dapat dilihat melalui nilai suhu transisi maksimum ( $T_{max}$ ) yang semakin tinggi (Sinthusamran *et al.*, 2013). Kurva stabilitas termal kolagen gelembung renang ikan manyung disajikan pada *Figure 7*.

Kurva DSC menunjukkan bahwa kolagen gelembung renang ikan manyung dengan perlakuan terbaik memiliki puncak eksotermis dengan transisi gelas ( $T_g$ ) terjadi pada suhu 27,26°C. Transisi gelas dari kolagen terjadi akibat terputusnya ikatan hidrogen yang mengarah pada pembentukan polimer amorf, yaitu gelatin (Alhana *et al.*, 2015). Transformasi panas mengakibatkan disintegrasi struktur heliks kolagen menjadi *random coils* (Huang *et al.*, 2011). Suhu transisi maksimum ( $T_{max}$ ) menunjukkan puncak *melting* dari kolagen gelembung renang ikan manyung yang terdeteksi pada 33,06°C. Hasil yang diperoleh pada kolagen gelembung renang ikan manyung lebih tinggi daripada  $T_{max}$  kolagen kulit ikan buntal menggunakan metode PSC sebesar 30,30°C (Huang *et al.*, 2011), namun lebih rendah dari kolagen gelembung renang ikan kakap putih (35,02°C) (Sinthusamran *et al.*, 2013) dan kolagen gelembung renang ikan rohu, yaitu (42,16°C)

(Kumar *et al.*, 2017). Semakin tinggi nilai  $T_{max}$  mengindikasikan semakin tinggi stabilitas termal kolagen. Suhu transisi maksimum  $T_{max}$  memiliki korelasi dengan kandungan asam amino prolina dan hidroksiprolina. Semakin tinggi prolina dan hidroksiprolina yang terkandung dalam kolagen maka stabilitas termal pada kolagen semakin meningkat, karena adanya cincin pirolidin yang terdapat pada asam amino dan sebagian ikatan hidrogen yang terbentuk melalui gugus hidroksil dari hidroksiprolina (Benjakul *et al.*, 2010; Sinthusamran *et al.*, 2013).

### Bobot Molekul Kolagen Gelembung Renang Ikan Manyung

Pengamatan secara histokimia kolagen gelembung renang ikan manyung dilakukan dengan mengidentifikasi pola protein menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode SDS PAGE merupakan teknik elektroforesis gel menggunakan poliakrilamida untuk memisahkan rantai polipeptida berdasarkan berat molekul dari protein. Pengujian bobot molekul ditandai dengan adanya pita pada elektrogram (Singh *et al.*, 2011). Orgel *et al.* (2014) melaporkan bahwa protein dengan kisaran bobot molekul 135-245 kDa merupakan struktur alfa dan beta. Pola pita rantai alfa memiliki dua struktur rantai, yaitu  $\alpha_1$  dan  $\alpha_2$ . Pola elektroforesis yang

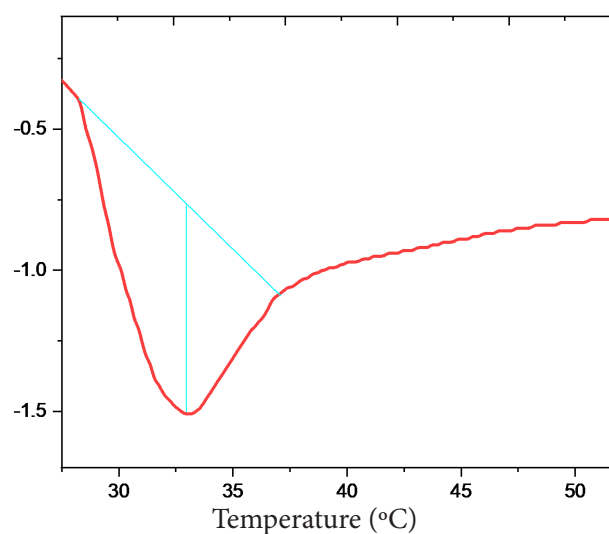


Figure 7 Thermal stability of sea catfish swim bladder collagen  
Gambar 7 Stabilitas termal kolagen gelembung renang ikan manyung



terdeteksi pada kolagen gelembung renang ikan manyung dapat dilihat pada *Figure 8*.

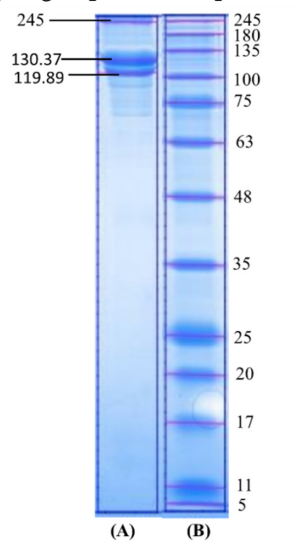


Figure 8 Electrophoretic pattern of sea catfish swim bladder collagen (A); marker (B)  
Gambar 8 Pola elektroforesis kolagen gelembung renang (A); marker (B)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pola elektroforesis yang terdeteksi pada kolagen gelembung renang ikan manyung dengan praperlakuan alkali jenis NaOH dan rasio sampel:ekstraktan 1:20 (b/v) terdiri atas dua rantai alpha yang berupa ( $\alpha_1$  dan  $\alpha_2$ ) dan satu rantai beta ( $\beta$ ). Keberadaan rantai  $\beta$  yang ditemukan pada pola protein kolagen mengindikasikan adanya komponen ikatan silang dan ketebalan pita protein struktur  $\beta$  menunjukkan tingginya *cross linking* pada kolagen (Ogawa *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2011). Bobot molekul yang terdapat pada kolagen gelembung renang ikan manyung memiliki pita utama, yaitu  $\alpha_1$  130,37 kDa,  $\alpha_2$  119,89 kDa dan  $\beta$  245 kDa. Ogawa *et al.* (2004) menyatakan bahwa keberadaan rantai alpha menunjukkan kolagen tipe I, sehingga hasil pola elektroforesis kolagen gelembung renang ikan manyung dapat diklasifikasikan sebagai kolagen tipe I. Kolagen tipe I juga ditemukan pada gelembung renang lainnya, yaitu gelembung renang Miiuy Croaker (Zhao *et al.*, 2018), rohu (Kumar *et al.*, 2017), dan grass carp (Liu *et al.*, 2015).

## Zeta Potensial

Zeta potensial diuji pada kolagen gelembung renang ikan manyung perlakuan terbaik untuk menentukan karakteristik muatan permukaan pada kolagen. Muatan permukaan kolagen terbentuk dari komposisi asam amino penyusun yang dipengaruhi oleh pH dan ion dalam larutan. Zeta potensial merupakan indikator yang dapat digunakan untuk mengukur tingkat interaksi dan kestabilan kolagen dalam dispersi koloid pada pH tertentu (Zhao *et al.*, 2018). Nilai zeta potensial kolagen gelembung renang ikan manyung sebesar +38,6 mV pada pH  $5,61 \pm 0,02$  dengan intensitas yang ditunjukkan pada *Figure 9*.

Zhao *et al.* (2018) melaporkan bahwa pH memengaruhi muatan zeta potensial kolagen. Nilai zeta potensial kolagen gelembung renang ikan manyung menunjukkan nilai yang positif. Nilai zeta potensial pada kondisi asam (kisaran 2-6) bernilai positif, pH cenderung netral (kisaran 7-11) bernilai negatif, sedangkan pada pH isoelektrik muatan molekul protein akan menjadi minimal atau nol. Singh *et al.* (2011) menjelaskan bahwa kondisi *Isoelectric point* (pI) adalah titik dalam pH bersifat netral secara elektrik dengan jumlah muatan positif dan negatif sama yang memiliki kecenderungan minimal untuk berinteraksi dengan ion hidrogen ( $H^+$ ) atau ion hidroksil ( $OH^-$ ) dalam larutan. Ahmed *et al.* (2019) menjelaskan bahwa muatan permukaan berhubungan dengan kestabilan suspensi. Muatan permukaan yang lebih tinggi menyebabkan tolakan antar molekul kuat sehingga menghasilkan suspensi yang stabil, sedangkan muatan permukaan yang lebih rendah dapat menyebabkan presipitasi. Ahmed *et al.* (2019) menjelaskan bahwa struktur protein pada kondisi PI menjadi lebih hidrofobik dan kurang stabil karena tidak adanya gaya tolak antar partikel. Oleh karena itu, protein dapat dengan mudah beragregasi dan mengendap dalam kondisi titik isoelektrik. Umumnya pI pada *marine collagen* terdapat pada pH antara 4,71-7,26 (Oliveira *et al.*, 2021). Titik isoelektrik kolagen gelembung renang ikan berada pada pH 6,2

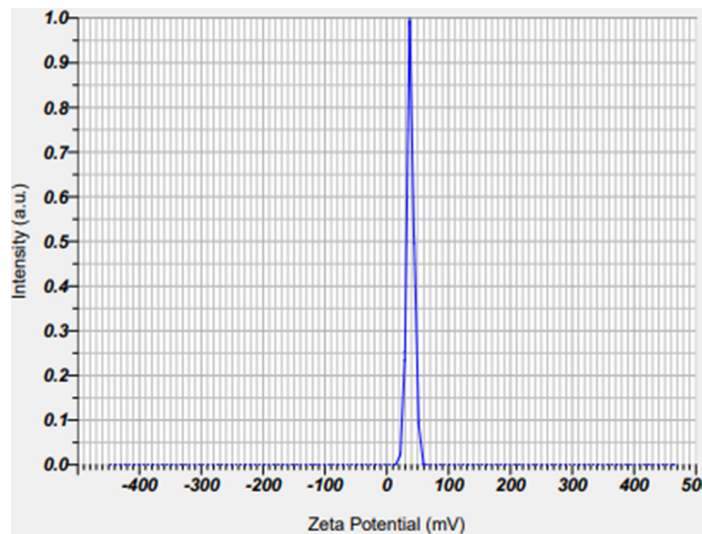


Figure 9 Zeta potential score of sea catfish swim bladder collagen  
Gambar 9 Zeta potensial kolagen gelembung renang ikan manyung

(Oliveira *et al.*, 2021), *porcine collagen* 6,03 (He *et al.*, 2023), dan *bovine collagen* 8,26 (Zhang *et al.*, 2006). He *et al.* (2023) menyatakan bahwa secara umum titik isoelektrik kolagen dari berbagai organisme dapat berbeda-beda karena adanya perbedaan komposisi asam amino yang dipengaruhi oleh komposisi dan urutan asam amino pada permukaan kolagen. Dalam penelitian ini, kolagen gelembung renang ikan manyung memiliki pH asam  $5,61 \pm 0,02$  yang berada di bawah titik isoelektriknya, sehingga mampu menciptakan suspensi yang stabil.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa zeta potensial kolagen gelembung renang memiliki nilai +38,6 mV. Nilai zeta potensial yang tinggi (positif atau negatif) semakin menolak agregasi, sedangkan nilai rendah cenderung menghasilkan agregat (Zhao *et al.*, 2018). Kolagen dari gelembung renang ikan memiliki nilai zeta potensial yang berbeda, diantaranya ikan tuna sirip kuning +12 mV (Zhao *et al.*, 2018), ikan kakap putih +32 mV (Sinthusamran *et al.*, 2013), dan ikan gulf corvina +17 mV (Lopez *et al.*, 2021). Perbedaan nilai potensial zeta kolagen dan pI mungkin disebabkan oleh urutan asam amino dan distribusi residu asam amino.

## KESIMPULAN

Ekstraksi kolagen terbaik adalah praperlakuan menggunakan alkali NaOH

selama 6 jam dan enzim papain 5.000 U/g dalam rasio sampel dan ekstrak 1:20 (b/v). Hasil rendemen kolagen diperoleh sebesar  $35,31 \pm 0,65\%$ . Karakteristik kolagen dengan perlakuan terbaik memiliki gugus amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Pola elektroforesis kolagen memiliki pita ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta$ ) yang digolongkan ke dalam tipe I. Suhu transisi maksimum kolagen berada pada  $33,06^\circ\text{C}$ , dengan nilai zeta potensial sebesar +32 mV.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbudristek) melalui pendanaan program penelitian kompetitif nasional skema Penelitian Tesis Magister (PTM) dengan nomor kontrak: 18933/IT3.D10/PT.01.02/M/T/2023 pada tanggal 20 Juni 2023 atas nama Dr. Ir. Wini Trilaksana M.Sc

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, R., Haq, M., & Chun, B. S. (2019). Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 668-676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.213>
- Alhana, A., Suptijah, P., & Tarman, K. (2015).

- Extraction and characterization of collagen from sea cucumber flesh. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(2), 150–161. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2015.18.2.150>
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry 4<sup>th</sup> revised and extended edition*. Springer Science & Business Media, Food Chemical.
- Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran, T., & Meesane, J. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal Science and Food Agriculture*, 90(1), 132–138. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3795>
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Food Science Technology*, 66, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
- Cho, S. M., Gu, Y. S., & Kim, S.B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Journal Food Hydrocolloid*, 19(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.05.005>
- Djailani, F., Trilaksani, W., & Nurhayati, T. (2016). Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidro-ekstraksi. *Journal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(2), 156–167. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2019.19.2.156>
- Feng, W., Zhao, T., Zhou, Y., Li, F., Zou, Y., Bai, S., Wang, W., Yang, L., & Wu, X. (2013). Optimatization of enzyme-assisted extraction and characterization of collagen from chinese sturgeon (*Acipenser sturio* Linnaeus) skin. *Pharmacognosy Journal*, 9(1), S32–S37. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.117859>
- Foggia, M. D., Taddei, P., Torreggiani, A., Dettin, M., & Tinti, A. (2011). Self-assembling peptides for biomedical applications: IR and Raman Spectroscopies for the study of secondary structure. *Journal Proteomics Research*, 2(3), 232–272.
- Furtado, M., Chen, L., Chen, Z., Chen, A., & Cui, W. (2022). Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. *Engineered Regeneration*, 3(3), 217–231. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.05.002>
- Gadi, D.S., Trilaksani, W., & Nurhayati, T. (2017). Histologi, ekstraksi dan karakterisasi kolagen gelembung renang ikan cunang *Muarenesox talabon*. *Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 9(2), 665–683. <https://doi.org/10.29244/jitkt.v9i2.19300>
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., & Włodarczyk, D. (2017). Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. *International Journal Biology Macromolecule*, 104, 987–991. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.013>
- Ghanaeian, A., & Soheilifard, R. (2018). Mechanical elasticity of proline-rich and hydroxyproline-rich collagen-like triple-helices studied using steered molecular dynamics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 86, 105–112. <https://doi:10.1016/j.jmbbm.2018.06.021>
- He, X., Lin, L., Jiang, S., & Lu, J. (2023). Comparison of Acid-Soluble Collagen (ASC) Extracted from Silver Carp, Walleye Pollock, Porcine and Duck Skin. *Heliyon*.
- Hemre, K., Berge, G. M., Sæle, Ø., Holen, E., Kousoulaki, K., Remø, S. C., & Lein, I. (2022). Optimization of the Balance between Protein, Lipid and Carbohydrate in Diets for Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture Nutrition*. <https://doi.org/10.1155/2022/1155989>
- Huang, Y.R., Shiao, C.Y., Chen, H.H., & Huang, B.C. (2011). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Journal Food Hydrocolloids*, 25(6), 1507–1513. <https://doi.org/10.1016/j>

- foodhyd.2011.02.011
- Idrus, S., Hadinoto, S., & Kolanus, J. (2018). Karakterisasi kolagen gelembung renang tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dari perairan maluku menggunakan ekstraksi asam. *Biopropal Ind*, 9(2), 87-94. <https://doi.org/10.36974/jbi.v9i2.4020>
- Jamilah, B., Umi, H.M.R., Mat, H.D., & Sazili, A.Q. (2013). Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*, 20(2), 835-842.
- Jaswir, I., Monsur, H.A., & Salleh, H.M. (2011). Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development. *African Journal Biotechnology*, 10(81), 18847-18854. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2764>
- Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T., & Kishimura, H. (2014). Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemical*, 155, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.076>
- Kiew, P. L., & Mat Don, M. (2012). Collagen extraction from Malaysian cultured catfish (hybrid *Clarias* sp.): kinetics and optimization of extraction conditions using response surface methodology. *International Scholarly Research Notices*.
- Kartika, I. W. D., Trilaksani, W., Adnyane, I. K. M. (2016). Karakterisasi kolagen limbah gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *Journal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(3), 222-232. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2016.19.3.222>
- Kirkness, M.W., Lehmann, K., & Forde, N. R. (2019). Mechanics and structural stability of the collagen triple helix. *Journal Current Opinion in Chemical Biology*, 53(4), 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.08.001>
- Kittiphatanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Journal Food Chemical*, 89(3), 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Kumar, P., Nidheesh, T., Govindaraju, K., Jyoti, & Suresh, P.V. (2017). Enzymatic extraction and characterisation of a thermostable collagen from swim bladder of rohu (*Labeo rohita*). *Journal Science Food Agriculture*, 97(5), 1451-1458. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7884>
- Lin, F., Rong, H., Lin, J., Yuan, Y., Yu, J., Yu, C., You, C., Wang, S., Sun, Z., & Wen, X. (2020). Enhancement of collagen deposition in swim bladder of Chu's croaker 38 (*Nibea coibor*) by proline: View from in-vitro and in-vivo study. *Aquaculture*, 523, 735175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735175>
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J.M., & Zhou, P. (2012). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemical*, 133(4), 1441-1448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.032>
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J.M., & Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemical*, 172, 836-843. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.147>
- Lopez, C.H., Rodríguez-Morales, S., Enríquez-Paredes, L.M., Villarreal-Gómez, L.J., Olivera-Castillo, L., Cortes-Santiago, Y., & López, L.M. (2021). Comparison of collagen characteristic from the skin and swim bladder of Gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*). *Tissue and Cell*, 72, 101593. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101593>
- Meng, D., Tanaka, H., Kobayashi, T., Hatayama, H., Zhang, X., Ura, K., Yunoki, S., & Takagi, Y. (2019). The effect of alkaline pretreatment on the



- biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products. *Journal of Biological Macromolecules*, 131, 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.03.091>
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemical*, 86(3), 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038>
- Mo, C., Wang, Q., Li, G., Dong, W., Liang, F., Wu, C., ... & Wang, Y. (2023). Extraction and Characterization of Pepsin-and Acid-Soluble Collagen from the Swim Bladders of *Megalonibeia fusca*. *Marine Drugs*, 21(3), 159.
- Nollet L. M. L. (1996). Handbook of Food Analysis: Physical characterization dan nutrient analysis. Edisi ke-2. New York (US): CRC Press LLC.
- Ogawa, M., Portier, R.J., Moody, M.W., Bell, J., Schexnayder, M.A., & Losso, J.N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonias cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemical*, 88(4), 495-501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.006>
- Oliveira, D. M. V., Assis, C. R. D., Costa, B. D. A. M., de Araújo, N. R. C., Monte, F. T. D., da Costa, V. H. M. S., & Porto, A.L.F. (2021). Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. *Journal of Molecular Structure*, 1224, 129023. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129023>
- Orgel, J. P. R. O., Persikov, A. V., & Antipova, O. (2014). Variation in the helical structure of native collagen. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089519>
- Riyanto, B. (2006). Pengembangan pelapis edible dari isinglass dan aplikasinya untuk mempertahankan mutu udang masak. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Simamora, G. R. R., Trilaksana, W., & Uju, U. (2019). Profiling of Catfish Swim Bladder Collagen (*Pangasius* sp.) Through Enzymatic Proses. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(2), 299-310. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v22i2.27717>
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Journal Food Chemical*, 124(1), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.111>
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Journal Food Chemical*, 138(4), 2435-2441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.136>
- Sitepu, G. S. B., Santoso, J., & Trilaksana, W. (2019). Profiling of Collagens from Swim Bladder of Catfish (*Pangasius* sp.) by Acid Extraction. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(2), 327-339. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v22i2.27781>
- Song, W., Chen, W., Yang, Y. N., Li, C., & Qian, G. (2014). Extraction optimization and characterization of collagen from the lung of soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Biomedical materials*, 2(4). <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140304.16>
- Suwandi, R., Nurjanah., & Margaretha, W. (2014). Proporsi bagian tubuh dan kadar proksimat ikan gabus pada berbagai ukuran. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 17(1), 22-28.
- Tamilmozhi, S., Veeruraj, A., & Arumugam, M. (2013). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*, 54(2), 1499-1505. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.002>
- Tan, Y., & Chang, S., K., C. (2018). Isolation and characterization of collagen



- extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*, 242, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.013>
- Trilaksani, W., Riyanto, B., & Suminto. (2006, Juli 17-18). Edible film berbahan dasar protein gelembung renang ikan patin (*Pangasius* sp). [Prosiding]. Konferensi Sains Kelautan dan Perikanan IPB Dramaga, Bogor, Indonesia. 141-150.
- Trilaksani, W., Adnyane, I. K. M., Riyanto, B., & Safitri, N. (2019). Nano collagen of the grouper swim bladder in compliance with quality standard of cosmetics materials. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 404(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/404/1/012050>
- Qutrinnada, A., Tuslinah, L., & Nurdianti, L. (2022). Isolasi Kolagen dari Limbah Tulang Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*) serta Pemanfaatan sebagai Sediaan Hand Gel Lotion. In *Prosiding Seminar Nasional Diseminasi Hasil Penelitian Program Studi S1 Farmasi*, 2(1).
- Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D., & Shirai, K. (2000). Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 685-690. <https://doi.org/10.1021/jf990389d>
- Zelechowska, E., Sadowska, M., & Turk, M. (2010). Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocolloids*, 24(4), 325-329. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.010>
- Zhang, C., Slegers, P., Wisse, J., Sanders, J. P. M., & Bruins, M.E. (2018). Sustainable scenarios for alkaline protein extraction from leafy biomass using green tea residue as a model material. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(4), 586-599. <https://doi.org/10.1002/bbb.1870>
- Zhang, Z.K., Li, G.Y., & Shi, B.L. (2006). Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *J Soc Leath Tech*, 90(1), 23-28.
- Zhao, W.H., Luo, Q. B., Pan, X., Chi, C.F., Sun, K. L., & Wang, B. (2018). Preparation, identification, and activity evaluation of ten antioxidant peptides from protein hydrolysate of swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Journal of Functional Foods*, 47, 503-511. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.014>.
- Zidek, J., Vojtova, L., Abdel-Mohsen, A.M., Chmelik, J., Zikmund, T., Brtnikova, J., Jakubicek, R., Zubal, L., Jan, J., & Kaiser, J. (2016). Accurate micro-computed tomography imaging of pore spaces in collagen-based scaffold. *Journal of Materials Science*, 27(6), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5717-2>.