

## EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI PARSIAL KOLAGEN LARUT ASAM DARI TERIPANG PASIR (*HOLOTHURIA SCABRA*)

Nunik Gustini<sup>1\*</sup>, Gita Syahputra<sup>1</sup>, Yatri Hapsari<sup>1</sup>, dan A'liyatur Rosyidah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pusat Riset Vaksin dan Obat, Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)  
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat 16911

\*Email: [nunik.gustini@brin.go.id](mailto:nunik.gustini@brin.go.id)

### Abstrak

Ekstraksi kolagen meningkat dengan semakin berkembangnya aplikasi kolagen dalam industri farmasi, kosmetik, kulit, maupun pangan, sehingga mencari sumber kolagen alami baru dan meningkatkan metode ekstraksi yang ada dapat menjadi solusi alternatif. Kolagen merupakan komponen protein utama yang terdapat dalam teripang. Banyaknya senyawa bioaktif yang terkandung dalam teripang menjadikan teripang sebagai sumber kolagen laut yang berkualitas tinggi. Tujuan dari penelitian ini yaitu melakukan ekstraksi dan karakterisasi parsial kolagen larut asam dari teripang pasir (*Holothuria scabra*). Kolagen teripang diperoleh melalui dua tahap yaitu pemisahan protein non kolagen menggunakan larutan NaOH 0,1 M dan ekstraksi kolagen dengan menggunakan larutan CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M. Karakterisasi terhadap kolagen hasil ekstraksi dilakukan menggunakan viskometer dan fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kolagen hasil ekstraksi memiliki rendemen sebesar 3,2% (bobot kering) dengan viskositas sebesar 0,9806 mPa.s. Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya beberapa gugus fungsi, yaitu amida A, B, I, II, dan III berturut-turut pada bilangan gelombang 3477 cm<sup>-1</sup>, 2933 cm<sup>-1</sup>, 1659 cm<sup>-1</sup>, 1552 cm<sup>-1</sup>, dan 1342 cm<sup>-1</sup>.

**Kata kunci:** ekstraksi, karakterisasi, kolagen larut asam, teripang pasir.

### 1. PENDAHULUAN

Teripang merupakan hewan laut yang tergolong ke dalam filum Echinodermata dari kelas *Holothuroidea* yang tersebar luas di zona tropis dan beriklim sedang, bahkan di zona dingin dari zona intertidal ke laut dalam terlepas dari batuan berpasir, berlumpur, atau karang (Li dkk., 2020). *Holothuria* adalah spesies teripang yang banyak ditemukan di negara Asia Tenggara dan merupakan spesies teripang yang memiliki nilai ekonomi dan nilai jual yang tinggi (Saallah dkk., 2021). Teripang telah lama dimanfaatkan sebagai makanan maupun obat tradisional di berbagai negara Asia. Perbedaan spesies dan lingkungan dimana teripang tumbuh dapat mempengaruhi nilai gizi dan komposisi kimia dari teripang (Li dkk., 2020). Protein, termasuk kolagen merupakan komponen utama teripang. Dari total protein yang terdapat dalam teripang, sebanyak 86% adalah kolagen (Purcell, 2014). Dalam tubuh hewan, kolagen merupakan protein ekstraseluler esensial yang terlibat dalam perlindungan mekanis jaringan dan organ. Salah satu senyawa bioaktif yang terkandung dalam teripang adalah kolagen, yang memiliki banyak manfaat kesehatan diantaranya yaitu membantu regenerasi kulit dan penyembuhan luka. Kolagen memiliki berbagai manfaat kesehatan yang dapat diaplikasikan dalam industri farmasi, kosmetik, kulit, dan pangan (Ahmed dkk., 2020; Saallah dkk., 2021).

Ekstraksi kolagen terdiri dari dua tahap kunci, yaitu tahap *pretreatment* bahan baku dan tahap ekstraksi kolagen. Tahap *pretreatment* bertujuan untuk menghilangkan pengotor, protein non kolagen, lemak, dan material anorganik. Beberapa metode untuk mengisolasi kolagen dari hewan diantaranya yaitu *acid solubilization extraction*, *salt solubilization extraction*, *enzyme solubilization extraction*, dan *ultra-sonication assisted extraction* (Ahmed dkk., 2020). Metode tersebut didasarkan pada sifat kelarutan kolagen dalam larutan garam netral, asam, maupun asam yang ditambahkan enzim. Berdasarkan perbedaan metode yang digunakan dalam ekstraksi, kolagen diklasifikasikan menjadi kolagen larut asam (*acid soluble collagen*), kolagen larut garam (*salt soluble collagen*), kolagen larut pepsin (*pepsin soluble collagen*), dan kolagen berbantuan *ultrasound* (*ultrasound-assisted collagen*). Sifat fisikokimia kolagen akan bervariasi sesuai dengan jenis metode ekstraksi yang digunakan (Ahmed

dkk., 2020). Diantara metode-metode tersebut, metode asam dan enzim merupakan metode yang paling disukai. Asam yang digunakan untuk proses ekstraksi kolagen dapat berupa asam organik seperti kloroasetat, sitrat, laktat, atau asam asetat (Hukmi dan Sarbon, 2018).

Ekstraksi kolagen dari berbagai spesies teripang telah banyak dilakukan, diantaranya yaitu *Stichopus variegatus* (Fawzya dkk., 2016; Safithri dkk., 2020), *Stichopus monotuberculatus* (Zhong dkk., 2015), dan *Holothuria cinerascens* (Li dkk., 2020). Namun, ekstraksi dan karakterisasi terhadap kolagen larut asam dari teripang pasir (*Holothuria scabra*) belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi dan mengkarakterisasi kolagen larut asam dari teripang pasir (*Holothuria scabra*). Kolagen hasil ekstraksi dikarakterisasi menggunakan viskometer dan fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakteristik kolagen larut asam dari teripang pasir.

## 2. METODOLOGI

### 2.1. Bahan dan Alat

Teripang pasir (*Holothuria scabra*) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil budidaya dari Pusat Riset Bioindustri Laut dan Darat BRIN di Lombok, Nusa Tenggara Barat. Bahan kimia yang digunakan yaitu NaOH (Merck, Jerman) dan asam asetat glasial (Merck, Jerman). Instrumen yang digunakan diantaranya adalah viskometer (RheolabQC SN82939649), dan *fourier-transform infrared spectroscopy* (Perkin Elmer Spectrum Two).

### 2.2. Preparasi Sampel

Teripang dicuci hingga bersih kemudian dipisahkan antara kulit luar dan organ dalamnya. Daging teripang selanjutnya dipotong-potong kecil dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 48 jam. Setelah kering, daging teripang digiling untuk mendapatkan tepung teripang yang akan digunakan untuk proses selanjutnya.

### 2.3. Ekstraksi Kolagen

Ekstraksi kolagen yang dilakukan mengacu pada metode yang dipaparkan oleh (Syahputra dkk., 2021) dengan sedikit modifikasi. Daging teripang dihilangkan dari protein non kolagen dengan perendaman menggunakan larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v) dan dihomogenkan menggunakan *orbital shaker-incubator* selama 24 jam pada suhu 4°C, 150 rpm. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi pada 10.000×g pada suhu 4°C selama 10 menit untuk memisahkan pelet dan supernatan, pelet kemudian dicuci menggunakan aquades hingga mencapai pH netral. Setelah dilakukan pencucian, pelet direndam dengan larutan CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v) dan dihomogenkan selama 24 jam pada suhu 4°C, 150 rpm. Filtrat hasil perendaman dengan asam asetat selanjutnya dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 10.000×g pada suhu 4°C selama 10 menit, kemudian dilakukan *freeze dry* untuk mendapatkan kolagen padat.

### 2.4. Rendemen Kolagen

Renemen kolagen (%) teripang dihitung menggunakan metode AOAC (2005). Perhitungan rendemen kolagen diperoleh berdasarkan perbandingan antara bobot kering kolagen hasil isolasi dengan bobot awal teripang kering.

$$\text{Rendemen kolagen (\%)} = \frac{\text{Bobot kering kolagen}}{\text{Bobot bahan baku (teripang kering)}} \times 100\%$$

### 2.5. Analisis Viskositas

Analisis viskositas terhadap kolagen dilakukan menggunakan instrumen RheolabQC SN82939649 mengacu pada metode (Safithri dkk., 2020) dengan sedikit modifikasi. Larutan kolagen dengan konsentrasi 0,3% (b/v) dibuat dengan cara melarutkan 0,15 g kolagen teripang pasir ke dalam 50 mL

larutan asam asetat 0,1 M. Larutan kolagen kemudian dihomogenkan dan diukur viskositasnya pada suhu 25°C dan *shear rate* 100 rpm.

## 2.6. Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR

Penentuan gugus fungsi pada kolagen dilakukan dengan menggunakan alat *fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR) PerkinElmer *Spectrum Two* dengan rentang spektrum infra merah dari 4000 hingga 400  $\text{cm}^{-1}$ . Kolagen dicampurkan dengan kalium bromida (KBr) dengan perbandingan 1:10, kemudian dihaluskan menggunakan mortar hingga homogen. Setelah homogen, campuran ditekan ke dalam palet dengan *hydraulic press* untuk selanjutnya dilakukan pembacaan pada alat FTIR. (Hukmi dan Sarbon, 2018).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Ekstraksi Kolagen

Proses perolehan kolagen dari teripang pasir (*Holothuria scabra*) dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap *pretreatment* dan tahap ekstraksi kolagen. Tahap *pretreatment* dilakukan dengan merendam daging teripang dengan larutan NaOH 0,1 M pada suhu 4°C selama 24 jam. Perendaman dengan NaOH menyebabkan daging teripang mengembang (*swelling*) sehingga memudahkan pelarutan protein non kolagen dan zat pengotor serta material anorganik yang terdapat pada daging teripang dan dapat menghilangkan komponen non kolagen. Selain itu, fungsi larutan basa juga sebagai saponifikasi lemak yang terikat pada serat kolagen sehingga lemak akan keluar dari daging teripang (Safithri dkk., 2020). Proses perendaman dilakukan pada suhu 4°C dengan tujuan untuk menjaga agar kolagen tidak mengalami kerusakan atau denaturasi yang disebabkan oleh suhu tinggi. Proses pencucian terhadap daging teripang dilakukan sebelum melanjutkan ke proses berikutnya yaitu ekstraksi dengan larutan asam asetat. Hal ini bertujuan agar daging teripang memiliki pH netral sehingga tidak mempengaruhi proses ekstraksi dengan larutan asam asetat.

Setelah proses *pretreatment*, tahap selanjutnya yaitu ekstraksi kolagen yang dilakukan dengan cara merendam daging teripang menggunakan larutan asam asetat 0,1 M pada suhu 4°C selama 24 jam dengan tujuan agar terjadi proses hidrolisis kolagen menjadi lebih sederhana. Struktur tersier kolagen dapat diubah oleh asam asetat melalui pemutusan ikatan ionik sehingga kolagen dapat larut (Jaswir dkk., 2011). Rendemen kolagen padat yang diperoleh dari hasil ekstraksi yaitu sebesar 3,2% berdasarkan bobot kering. Nilai rendemen tersebut lebih rendah dibandingkan rendemen kolagen teripang pasir yang dilaporkan oleh Syahputra dkk. (2021), yaitu sebesar 4,8%. Liu dkk. (2010) berhasil mengisolasi kolagen larut asam dari kulit teripang *Parastichopus californicus* dengan rendemen sebesar 3,4% berdasarkan bobot kering, sedangkan rendemen kolagen teripang gama yang berhasil diisolasi oleh Safithri dkk. (2020) yaitu sebesar 2,43% (b/b). Perbedaan rendemen kolagen dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu jenis bahan baku yang digunakan, perbedaan larutan dan konsentrasi larutan yang digunakan, suhu dan waktu ekstraksi, serta perbandingan berat teripang dengan larutan yang digunakan dalam proses ekstraksi (Jafari dkk., 2020).

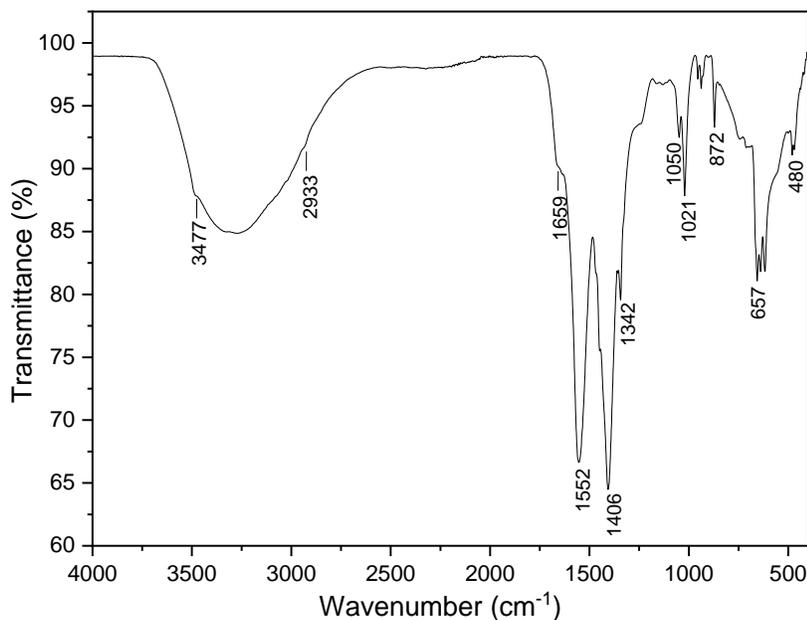
### 3.2. Viskositas Kolagen

Viskositas kolagen teripang pasir hasil ekstraksi yaitu sebesar 0,9806 mPa-s. Nilai tersebut jauh lebih kecil dibandingkan dengan viskositas kolagen teripang gama yang dilaporkan oleh Safithri dkk. (2020) yaitu sebesar 5,37 mPa-s. Beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan viskositas diantaranya adalah suhu, gaya tarik antar molekul, dan jumlah molekul terlarut (Purwaningsih dan Triono, 2019). Selain itu, pergerakan molekul dalam larutan juga dapat mempengaruhi nilai viskositas. Pergerakan molekul dalam larutan dipengaruhi oleh bobot molekul. Bobot molekul yang besar akan mengakibatkan berkurangnya pergerakan molekul dalam suatu larutan sehingga mengakibatkan tingginya nilai viskositas (Ogawa dkk., 2003).

### 3.3. Gugus Fungsional Kolagen

Analisis FTIR diperlukan untuk mengidentifikasi gugus fungsional yang terdapat pada kolagen seperti gugus fungsi amida. Spektra FTIR kolagen teripang pasir hasil ekstraksi pada Gambar 1 menunjukkan puncak serapan pada wilayah-wilayah amida A, B, I, II, dan III sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 1. Amida A diasosiasikan dengan vibrasi ulur N-H yang berada pada bilangan gelombang 3350-3550  $\text{cm}^{-1}$  (Erizal dkk., 2014). Pada Gambar 1 puncak serapan pada bilangan gelombang 3477  $\text{cm}^{-1}$  merupakan amida A. Jika gugus NH dari peptida terlibat dalam ikatan hidrogen, maka puncak serapan amida A dapat bergeser ke frekuensi yang lebih rendah yaitu pada 3300  $\text{cm}^{-1}$ . Karena puncak serapan amida A kolagen larut asam teripang pasir berada pada 3477  $\text{cm}^{-1}$  maka tidak terdapat gugus NH yang terlibat dalam ikatan hidrogen (Doyle dkk., 1975). Puncak serapan selanjutnya yaitu amida B yang berada pada panjang gelombang 2933  $\text{cm}^{-1}$  yang berkaitan dengan peregangan asimetris dari gugus  $\text{CH}_2$  (Coates, 2000).

Bilangan gelombang pada 1659  $\text{cm}^{-1}$  merupakan puncak serapan amida I yang terutama terkait dengan vibrasi peregangan gugus karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) di sepanjang tulang punggung peptida. Pita amida I merupakan faktor terpenting dalam memahami struktur sekunder molekul protein (Saallah dkk., 2021). Puncak serapan selanjutnya yaitu pada bilangan gelombang 1552  $\text{cm}^{-1}$  merupakan puncak dari amida II yang terkait dengan kombinasi N-H *in plane bending* dan vibrasi ulur C-N (Coates, 2000).



Gambar 1. Spektra Inframerah dari Kolagen Larut Asam Teripang Pasir (*Holothuria scabra*)

Tabel 1. Puncak Spektra Inframerah yang Berkaitan dengan Gugus Fungsi Amida dari Kolagen Larut Asam Teripang Pasir (*Holothuria scabra*)

Tipe Amida	Wilayah Absorbansi Standar ( $\text{cm}^{-1}$ )	Gugus Fungsi	Referensi	Absorbansi Kolagen Larut Asam <i>H. scabra</i> ( $\text{cm}^{-1}$ )
Amida A	3350-3550	NH stretching	(Erizal <i>et al.</i> , 2014)	3477
Amida B	2915-2935	$\text{CH}_2$ asymmetric stretching	(Coates, 2000)	2933
Amida I	1600-1700	$\text{C}=\text{O}$ vibration	(Kong and Yu, 2007)	1659
Amida II	1480-1575	CN stretching, NH bending	(Kong and Yu, 2007)	1552
Amida III	1229-1301	NH bending, CN stretching	(Kong and Yu, 2007)	1342

Keberadaan struktur *triple helix* kolagen dikonfirmasi dengan adanya pita amida III pada bilangan gelombang  $1342\text{ cm}^{-1}$  pada kolagen *H. scabra*. Selain itu, amida III juga terkait dengan kombinasi vibrasi tekuk N-H dan vibrasi ulur C-N (Kong dan Yu, 2007). Rasio antara puncak amida III ( $1342\text{ cm}^{-1}$ ) dan  $1454\text{ cm}^{-1}$  (absorbansi dari  $-\text{CH}_2-$ ) yaitu sebesar 0,92. Rasio IR antara amida III dan  $1454\text{ cm}^{-1}$  yang mendekati 1 menunjukkan adanya struktur *triple helix* dalam kolagen (De Guzzi Plepis dkk., 1996).

#### 4. KESIMPULAN

Kolagen larut asam berhasil diekstraksi dari daging teripang pasir (*Holothuria scabra*) dengan rendemen sebesar 3,2% dan viskositas sebesar 0,9806 mPa.s. Gugus fungsi kolagen hasil ekstraksi terdiri dari amida A ( $3477\text{ cm}^{-1}$ ), B ( $2933\text{ cm}^{-1}$ ), I ( $1659\text{ cm}^{-1}$ ), II ( $1552\text{ cm}^{-1}$ ), dan III ( $1342\text{ cm}^{-1}$ ) menunjukkan sidik jari untuk struktur kolagen.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M., Verma, A. K. and Patel, R. (2020) 'Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review', *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. Elsevier B.V., 18(August), p. 100315. doi: 10.1016/j.scp.2020.100315.
- Coates, J. (2000) 'Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach', in Meyers, R. A. (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, pp. 22–31. doi: 10.1097/00010694-197107000-00005.
- Doyle, B. B., Bendit, E. G. and Blout, E. R. (1975) 'Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides', *Biopolymers*, 14(5), pp. 937–957. doi: 10.1002/bip.1975.360140505.
- Erizal *et al.* (2014) 'Pengaruh Iradiasi Gamma pada Sifat Fisiko-Kimia Kolagen dalam Larutan', *Jurnal Sains Materi Indonesia*, 15(Juli 2014), pp. 221–225.
- Fawzya, Y. N. *et al.* (2016) 'Isolasi dan karakterisasi parsial kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*)', *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 11(1), pp. 91–100.
- De Guzzi Plepis, A. M., Goissis, G. and Das-Gupta, D. K. (1996) 'Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen', *Polymer Engineering and Science*, 36(24), pp. 2932–2938. doi: 10.1002/pen.10694.
- Hukmi, N. M. M. and Sarbon, N. M. (2018) 'Isolation and characterization of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) extracted from silver catfish (*Pangasius sp.*) skin', *International Food Research Journal*, 25(6), pp. 2601–2607.
- Jafari, H. *et al.* (2020) 'Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering', *Polymers*, 12(10), pp. 1–37. doi: 10.3390/polym12102230.
- Jaswir, I., Monsur, H. A. and Salleh, H. M. (2011) 'Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development', *African Journal of Biotechnology*, 10(81), pp. 18847–18854. doi: 10.5897/AJB11.2764.
- Kong, J. and Yu, S. (2007) 'Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), pp. 549–559. doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
- Li, P.-H. *et al.* (2020) 'Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics', *Aquaculture*, 515, p. 734590. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734590>.
- Liu, Z., Oliveira, A. C. M. and Su, Y. C. (2010) 'Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), pp. 1270–1274. doi: 10.1021/jf9032415.
- Ogawa, M. *et al.* (2003) 'Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), pp. 8088–8092. doi: 10.1021/jf034350r.
- Purcell, S. W. (2014) *Processing sea cucumbers into beche-de-mer : A manual for Pacific Island fishers*. East Lismore NSW: Southern Cross University.
- Purwaningsih, S. and Triono, R. (2019) 'Efektivitas Pretreatment Alkali terhadap Karakteristik Kolagen

- Alami dari Keong Bakau ( *Telescopium telescopium* )', *Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(2), pp. 355–365.
- Saallah, Suryani *et al.* (2021) 'Comparative study of the yield and physicochemical properties of collagen from sea cucumber (*Holothuria scabra*), obtained through dialysis and the ultrafiltration membrane', *Molecules*, 26(9). doi: 10.3390/molecules26092564.
- Safithri, M. *et al.* (2020) 'Karakteristik Kolagen Larut Asam Teripang Gama (*Stichopus variegatus*)', *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(1), pp. 166–177. doi: 10.17844/jphpi.v23i1.31063.
- Syahputra, G. *et al.* (2021) 'Extraction and Characterization of Collagen from Sand Sea Cucumber (*Holothuria scabra*)', *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 26(3), pp. 319–327. doi: 10.18343/jipi.26.3.319.
- Zhong, M. *et al.* (2015) 'Isolation and Characterization of Collagen from the Body Wall of Sea Cucumber *Stichopus monotuberculatus*', *Journal of Food Science*, 80(4), pp. C671–C679. doi: 10.1111/1750-3841.12826.