

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PARSIAL KOLAGEN DARI TERIPANG GAMMA (*Stichopus variegatus*)

Isolation and Partial Characterization of Collagen from Gamma Sea Cucumber (Stichopus variegatus)

Yusro Nuri Fawzya^{1*}, Ekowati Chasanah¹, Achmad Poernomo¹ dan M.H. Khirzin²

¹ Pusat Penelitian dan Pengembangan Daya Saing Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan,
Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat, Indonesia

² Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor, Indonesia

* Korespondensi Penulis: nurifawzya@gmail.com

Diterima: 12 Januari 2016; Disetujui: 22 Mei 2016

ABSTRAK

Isolasi dan karakterisasi parsial kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*) telah dilakukan. Isolasi dilakukan melalui tiga tahap yaitu preparasi, ekstraksi dan isolasi. Tahap preparasi meliputi tahapan penyiangan, pencucian dan perendaman dalam akuades, dalam alkohol, dalam larutan Tris-HCl dan etilenadiaminatetraasetat (EDTA) dan perendaman dalam larutan natrium hidroksida (NaOH). Ekstraksi dilakukan dengan perendaman asam asetat 0,5M. Isolasi dilakukan dengan cara pengendapan menggunakan NaCl dilanjutkan proses dialisis. Isolat kolagen teripang gamma yang diperoleh memiliki rendemen sebesar 16,40% (bobot kering), nilai pH 6,08 dan derajat putih 77,02%. Gugus fungsi kolagen terdiri dari amida A (3412 cm⁻¹), B (2929 cm⁻¹), I (1654 cm⁻¹), II (1554 cm⁻¹), dan III (1239 cm⁻¹). Asam amino utama penyusun kolagen yaitu glisin, prolin, dan alanin, masing-masing sebesar 16,88%; 6,71%; dan 6,42%. Kolagen yang dihasilkan merupakan kolagen tipe I, diduga terdiri dari 3 rantai α_1 yang homolog dengan berat molekul 130,33 kDa.

KATA KUNCI: teripang gamma, kolagen, karakterisasi parsial, *Stichopus variegatus*

ABSTRACT

Isolation and partial characterization of collagen from gamma sea cucumbers (Stichopus variegatus) has been carried out. Isolation was done through three steps, i.e. preparation, extraction and isolation. Preparation step was dressing, immersing in water, in alcohol, in Tris-HCl and EDTA, followed by immersing in NaOH solution. Extraction was done by using 0.5 M acetic acid. Then isolation was conducted through salt precipitation followed by dialysis. The yield of gamma sea cucumber collagen produced was 16.40% (db), with a pH value of 6.08 and whiteness 77.02%. Collagen has a functional group of amide A (3412cm⁻¹), B (2929cm⁻¹), I (1654cm⁻¹), II (1554cm⁻¹), and III (1239cm⁻¹). The main amino acid content, were glycine, proline and alanine (16.88%; 6.71%; and 6.42% respectively). The collagen produced is type I collagen which might contain of (α_1)₃ chain with the molecular weight of 130.33 kDa.

KEYWORDS: gamma sea cucumbers, collagen, partial characterization, *Stichopus variegatus*

PENDAHULUAN

Teripang atau timun laut diketahui mengandung zat gizi yang tinggi dan berbagai zat aktif yang memiliki khasiat untuk kesehatan, di antaranya untuk menjaga sistem imun tubuh, menyembuhkan luka, sebagai antioksidan dan manfaat kesehatan lainnya (Bordbar, Anwar & Saari, 2011). Salah satu bahan aktif yang banyak terkandung dalam teripang adalah kolagen, yang mencapai sekitar 80%. Kolagen merupakan

salah satu jenis protein struktural yang tersusun dari asam-asam amino, terutama didominasi oleh asam amino prolin, hidroksi prolin, alanin dan glisin. Kolagen tidak saja diaplikasikan pada produk-produk kesehatan, namun kolagen banyak digunakan juga untuk keperluan kosmetik, di antaranya untuk meningkatkan kelembaban kulit dan mencegah penuaan dini (Silva et al., 2014).

Di Indonesia, kebutuhan kolagen umumnya masih diperoleh dari impor; termasuk gelatin yang merupakan

produk hidrolisis parsial dari kolagen. Data *International Trade Centre* (2016) menyebutkan bahwa impor gelatin (termasuk kolagen) ke Indonesia dengan HS code 3503 pada tahun 2015 adalah 4.109 ton dengan nilai mencapai US \$ 31.741.000. Sumber kolagen dan gelatin komersial umumnya berasal dari sapi atau babi yang perlu diwaspadai kehalalan dan keamanannya terkait dengan kasus penyakit sapi gila (*Bovine Spongiform Encephalopathy*). Kolagen dari teripang dan hasil perikanan lainnya menjadi alternatif lain yang halal dan relatif aman.

Metode ekstraksi kolagen umumnya didasarkan atas sifat kelarutan kolagen dalam larutan garam netral, asam maupun asam yang ditambah dengan enzim. Sebelum ekstraksi, biasanya dilakukan *pre treatment* atau preparasi terlebih dahulu untuk menghilangkan pengotor, lemak dan protein non kolagen. Preparasi dapat dilakukan menggunakan alkohol dan larutan asam atau basa encer (Nazeer et al., 2014; Singh, Benjakul, Maqsood, Kishimura, 2011; Silva et al., 2014).

Perkembangan aplikasi kolagen yang semakin luas mendorong penelitian tentang kolagen yang dilakukan secara intensif. Selama kurun waktu 13 tahun (2001-2013) dilaporkan peningkatan publikasi mengenai hasil penelitian kolagen mencapai 170%, sedangkan khusus kolagen dari bahan laut rata-rata mencapai lebih dari 200% (Silva et al., 2014). Sampai dengan saat ini ketertarikan terhadap eksplorasi kolagen dari bahan laut masih tinggi, karena jenis biota laut yang sangat beragam dan masing-masing dapat memberikan karakteristik kolagen yang berbeda tergantung dari jenis biota/bahan baku, habitat, metode ekstraksinya maupun tujuan aplikasinya. Sebagian besar eksplorasi *marine collagen* menggunakan bahan baku hasil samping pengolahan ikan, khususnya tulang dan kulit ikan. Penelitian mengenai kolagen teripang masih terbatas, beberapa di antaranya adalah karakterisasi dan komposisi subunit kolagen dari teripang *S.japonicus* (Cui et al., 2007), ekstraksi dan aplikasi kolagen teripang *S. hermannii* untuk pelembab kulit (Andiristanti, 2012), ekstraksi, purifikasi dan karakterisasi kolagen dari teripang *Bohadschia bivitatta* (Siddiqui, Arief, Yusoff, Suzina, Abdullah, 2013), ekstraksi kolagen dari teripang *S.variegatus* (Alhana, Suptijah & Tarman, 2015), aktivitas inhibitor enzim pengubah angiotensin (ACE) dan antioksidan peptida kolagen dari teripang *S.variegatus* (Khirzin, Sukarno, Yuliana, Fawzya, & Chasanah, 2015), serta formulasi sediaan krim berbasis nanokolagen teripang gamma (*S.variegatus*) (Yusida, 2016).

Eksplorasi bahan aktif dari teripang *Stichopus* di Indonesia akhir-akhir ini meningkat baik yang berbasis kolagen maupun senyawa aktif lainnya, seperti steroid

dan saponin (Rasyid, 2014). Hal ini dikarenakan adanya permintaan pasar terhadap produk kosmetik maupun kesehatan berbasis teripang, selain itu ketersediaan jenis teripang *Stichopus* yang cukup banyak di berbagai perairan Indonesia.

Meskipun eksplorasi kolagen dari teripang gamma (*S.variegatus*) dalam waktu yang hampir bersamaan dilakukan di beberapa tempat, namun metode ekstraksi yang digunakan berbeda. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi kolagen dari teripang gamma (*S.variegatus*). Informasi dari hasil penelitian diharapkan dapat melengkapi informasi mengenai kolagen dari teripang gamma (*S.variegatus*), khususnya yang dilakukan oleh Khirzin et al. (2015); maupun peneliti lainnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah teripang gamma (*Stichopus variegatus*) yang diperoleh dalam bentuk segar dari Balai Besar Perikanan Budidaya Laut Lampung. Teripang segar disiangi dan dicuci bersih, kemudian dibawa ke Laboratorium Puslitbang Daya Saing Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan dalam *coolbox* berisi es. Sebelum dilakukan analisis dan isolasi kolagen, teripang ini telah disimpan beku selama sekitar 7 bulan. Bahan lain yang digunakan untuk isolasi dan analisis kolagen meliputi akuades, Tris-HCl, etilenadiaminatetraasetat (EDTA), alkohol, natrium hidroksida (NaOH), asam asetat, natrium klorida, bufer asetat, kantung dialisis (*cellulose membrane cut off* 14.000), kalium bromida (KBr), asam klorida (HCl), akrilamida, bis-akrilamida, sodium dodesil sulfat (SDS), N,N,N',N'-*tetrametiletilediamina* (TEMED), ammonium persulfat (APS), glisin, *coomassie brilliant blue* (CBB), gliserol, dan *beta-mercaptoethanol* (BME).

Alat

Peralatan yang digunakan meliputi peralatan untuk ekstraksi dan isolasi kolagen (pisau, talenan, gelas beaker, timbangan, *magnetic stirrer*, *refrigerated showcase*, *refrigerated centrifuge*, *freeze dryer*), serta peralatan/instrumen untuk pengujian/karakterisasi kolagen yaitu oven, tanur, kjeltec, soxhlet, elektroforesis, *fourier transform infra red-spektrofotometer* (Perkin Elmer, Spectrum One), *ultra performance liquid chromatography* (Waters ACQUITY UPLC®), pH meter, dan ColorFlex EZ Hunter Lab.

Metode

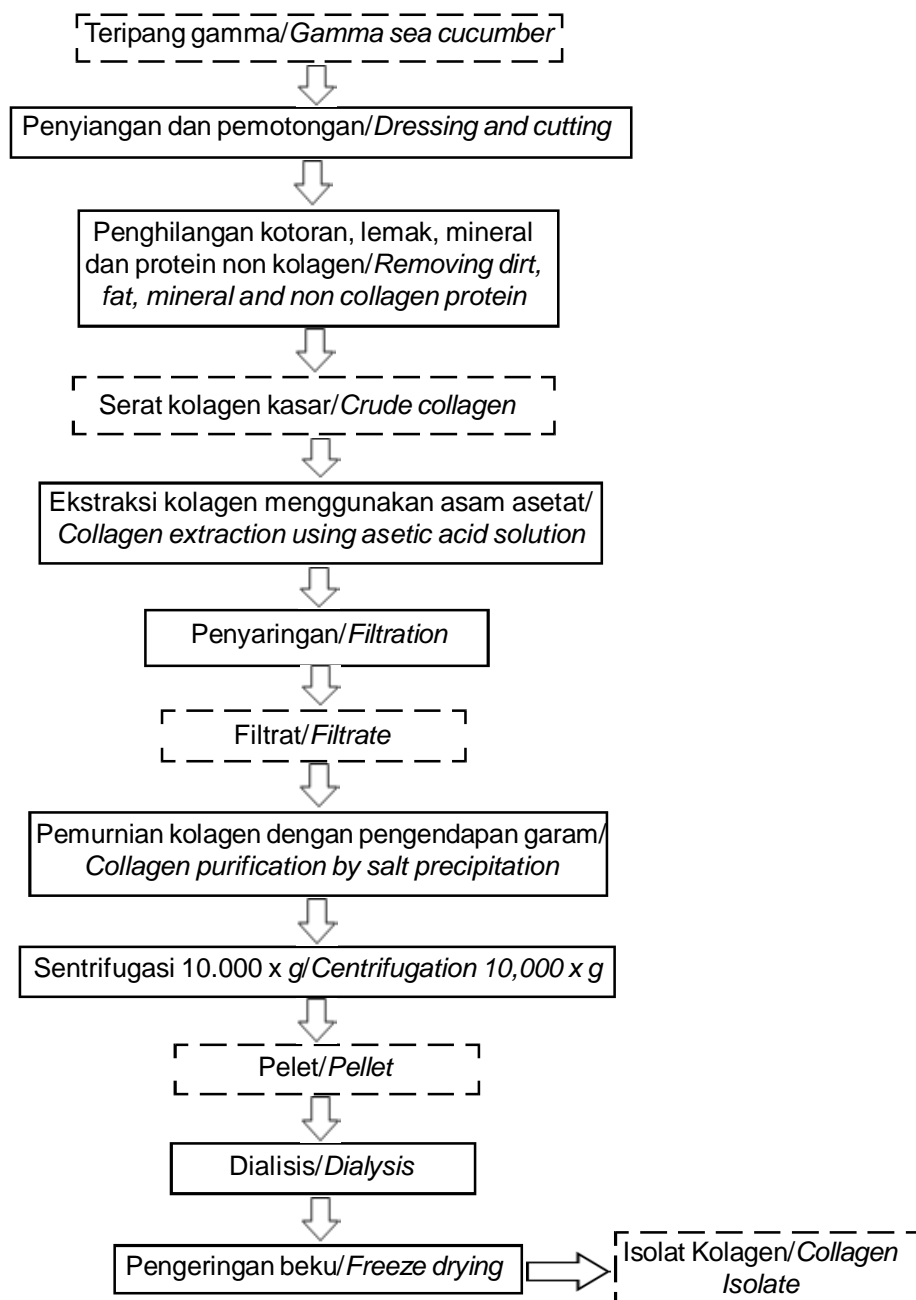
Preparasi daging teripang

Teripang beku dicairkan (*thawing*), dibersihkan, diukur panjang, lebar dan beratnya, kemudian dibelah dan dicuci bersih. Daging teripang selanjutnya dianalisis komposisi kimianya (AOAC 2005).

Isolasi kolagen

Isolasi kolagen dilakukan melalui tahapan ekstraksi terlebih dahulu, mengikuti metode Park et

al. (2012) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan dengan menambahkan tahapan perendaman dalam alkohol untuk menghilangkan lemak. Selain itu penggunaan β -merkaptotanol ditiadakan karena bersifat toksik, dan konsentrasi larutan perendam serta waktu perendaman disesuaikan berdasarkan pengamatan selama proses ekstraksi. Seluruh tahapan ekstraksi dilakukan pada kondisi dingin, sekitar 4 °C. Diawali dengan pencucian, daging teripang kemudian dipotong kecil-kecil dan direndam dalam aquades (1:10 b/v) sambil diaduk menggunakan *stirrer* selama 30 menit, untuk membersihkan daging



Gambar 1. Diagram alir proses ekstraksi dan isolasi kolagen teripang gamma.
 Figure 1. Flow chart of extraction and isolation of gamma sea cucumber collagen.

teripang dari sisa-sisa isi perut dan pengotor lainnya. Perendaman aquades dilakukan 2 kali. Berikutnya akuades diganti dengan alkohol 50% (1:2), diaduk selama 30 menit untuk menghilangkan lemak; lalu dicuci dengan aquades sampai pH netral. Perendaman berikutnya menggunakan 10 bagian volume campuran Tris-HCl 0,1 M dan 4 mM EDTA, selama 1 malam. Perendaman ini dimaksudkan untuk menjaga stabilitas pH dan mengurangi mineral. Setelah dicuci dengan aquades, larutan perendam diganti dengan 10 bagian volume 0,1 M NaOH selama 2 hari, untuk menghilangkan protein-protein non kolagen; kemudian dicuci kembali dengan aquades. Selama perendaman NaOH sebaiknya dilakukan penggantian dengan larutan NaOH baru setiap 4-5 jam agar penghilangan protein non kolagen lebih efektif. Perendaman dengan NaOH diakhiri ketika larutan perendam secara kualitatif tidak mengandung protein, yang dicek menggunakan uji Biuret.

Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan 10 bagian volume asam asetat 0,5 M selama 2 hari, dan disaring menggunakan kain blacu. Filtrat yang mengandung kolagen dilakukan pengendapan garam melalui penambahan garam NaCl sampai dengan konsentrasi akhir 1M dan disimpan semalam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 60 menit. Pelet hasil sentrifugasi dilarutkan dalam asam asetat 0,5 M dan didialisis (kantong dialisis *cut off* 14.000) dengan bufer asetat 0,1 M selama 1 malam, untuk menghilangkan garam-garam selama proses preparasi dan ekstraksi kolagen. Setiap 4 jam bufer diganti dan terakhir diganti dengan aquades. Selama proses dialisis, dan dengan mengganti cairan/pelarut beberapa kali, molekul garam terdifusi keluar kantong dialisis sehingga protein kolagen yang diperoleh lebih murni. Kolagen murni diperoleh melalui sentrifugasi, sebagai pelet yang kemudian dikeringbekukan. Selanjutnya kolagen yang dihasilkan ditentukan rendemennya, pH, dan derajat putih, serta dilakukan analisis gugus fungsional, asam amino dan bobot molekul. Isolasi kolagen teripang ini dilakukan 2 kali ulangan. Secara garis besar ekstraksi dan isolasi kolagen dari teripang melalui tahapan sebagaimana diagram alir pada Gambar 1.

Analisis dan karakterisasi parsial kolagen

Kolagen yang dihasilkan diukur rendemennya, yaitu sebagai persentase dari perbandingan antara berat akhir kolagen yang dihasilkan dengan berat awal teripang (dalam %). Derajat keasaman (pH) larutan kolagen diukur menggunakan pH meter. Derajat putih diukur menggunakan ColorFlex EZ Hunter Lab.

Analisis gugus fungsional kolagen dilakukan menggunakan alat *fourier transform infra red* (FTIR)

spektrofotometer (Perkin Elmer, *spectrum one*) berdasarkan metode Barth (2000). Sampel ditambah KBr (1:100), lalu dihaluskan hingga tercampur merata. Selanjutnya dilakukan pengepresan dengan pompa vakum selama 15 menit, dan dibaca absorbansinya pada bilangan gelombang 500-3000 cm^{-1} . Dari kurva yang dihasilkan ditentukan jenis ikatan dan gugus fungsionalnya berdasarkan referensi FTIR.

Analisis asam amino dilakukan dengan mengacu pada metode Nollet (1996) dan Waters Acquity UPLC Guide 2012, menggunakan *ultra performance liquid chromatography* (UPLC). Hidrolisis sampel dilakukan menggunakan HCl 6N dengan pemanasan 110 °C selama 22 jam. Sebagai internal standar digunakan α -amino butyric acid (AABA), dan sebagai reagen untuk derivatisasi asam amino digunakan *AccQ-Fluor reagent kit*. Kondisi UPLC adalah sebagai berikut : kolom : ACCQ-Tag Ultra C-18, temperatur : 49 °C, laju alir : 0,5 mL per menit, detektor : *photodiode array* (PDA), panjang gelombang 260 nm, dan volume injeksi 1 μL . Sistem elusi dilakukan secara gradien dengan komposisi tertentu. Kadar asam amino dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar asam amino (mg/Kg)} = \frac{\text{luas area puncak sampel} \times \text{C standar} \times \text{FP} \times \text{BM}}{\text{luas area puncak standar} \times \text{bobot sampel (g)}}$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar asam amino ($\mu\text{g/mL}$)

FP = faktor pengenceran

BM = bobot molekul tiap asam amino (g/mol)

Analisis berat molekul kolagen dilakukan dengan SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Prinsip dasar SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh natrium dodesil sulfat yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah poliakrilamid. Sebagai penanda protein digunakan marker *broad range protein ladder* dari Thermo scientific.

HASIL DAN BAHASAN

Ukuran dan Komposisi Kimia Bahan Baku Teripang Segar

Bahan baku teripang gamma segar yang digunakan (Gambar 2a) memiliki ukuran fisik dan komposisi kimia sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Informasi mengenai komposisi kimia teripang segar sebagai bahan baku pembuatan kolagen perlu diketahui sebagai bahan pertimbangan dalam proses

Tabel 1. Ukuran fisik dan komposisi kimia teripang gamma segar
 Table 1. *Gamma sea cucumber size and chemical composition*

Ukuran Fisik/ <i>Physical size</i>	Nilai/ <i>Score</i>
Panjang/ <i>length</i> (cm)	20.7 ± 4.3
Lebar/ <i>width</i> (cm)	7.2 ± 0.3
Berat/ <i>weight</i> (g)	195.4 ± 54.6
Komposisi Kimia/<i>Chemical composition</i>	
Kadar air/ <i>moisture</i> (% <i>wb</i>)	91.19 ± 0.07
Kadar abu/ <i>ash</i> (% <i>db</i>)	40.18 ± 1.93
Kadar lemak/ <i>fat</i> (% <i>db</i>)	2.72 ± 0.23
Kadar protein/ <i>protein</i> (% <i>db</i>)	54.82 ± 0.68

ekstraksi kolagen, khususnya penentuan jenis pelarut, konsentrasi ataupun waktu perendaman untuk tujuan penghilangan bahan-bahan non kolagen dari bahan tersebut. Berdasarkan komposisi kimianya, kandungan lemak teripang gamma relatif cukup tinggi (2,72 % bobot kering atau bk) dibandingkan jenis teripang lainnya yang pernah dilaporkan, yaitu kurang dari 2% bk (Aydin, Sevgili, Tufan, Emre & Ko se, 2011; Fawzya, Januar, Susilowati & Chasanah, 2015; Haider et al., 2015; Vergara & Rodriguez, 2016; Zhong, Khan & Shahidi, 2007). Kandungan lemak ini relatif sama dengan yang pernah dilaporkan oleh Alhana et al. (2015) untuk jenis teripang yang sama, yaitu 2,87% bk. Jenis teripang *Stichopus* lainnya yang pernah dilaporkan, yaitu *S. horrens* mengandung lemak sekitar 3,04% bk (Forghani et al., 2012). Kadar abu teripang yang tinggi berkaitan dengan banyaknya spikula mikroskopis dalam lapisan dermis pada dinding tubuh teripang yang tersusun oleh kalsium karbonat (Hartati, Widianingsih & Fatimah, 2015; Vergara & Rodriguez, 2016). Vergara & Rodriguez (2016) melaporkan bahwa kadar abu teripang *Isostichopus* sp. bervariasi antara 3,16 - 3,81% berat basah (bb) setara dengan 23,43 – 24,16% bk. Dengan demikian teripang *S. variegatus* yang digunakan mengandung mineral yang cukup tinggi (40,18% bk) hampir sama dengan kadar abu *S. variegatus* yang dilaporkan oleh Alhana et al. yaitu 43,18%.

Rendemen

Rendemen kolagen teripang gamma (*S. variegatus*) larut asam (*acid solubilized collagen*/ASC) yang dihasilkan sebagaimana dilaporkan oleh Khirzin et al. (2015) adalah sebesar 16,40 ± 4,81% (bk). Rendemen yang lebih tinggi dilaporkan oleh Abedin et al. (2013) dan Park et al. (2012); yang menggunakan enzim pepsin untuk mengekstrak kolagen; menghasilkan

pepsin solubilized collagen (PSC) dengan rendemen berturut-turut sebesar 26,6%, dan 21,3%. Bahkan Siddiqui et al. (2013) menemukan rendemen PSC yang sangat tinggi yaitu 65% (bk), yang dihasilkan dari teripang *Bohadschia* spp. Rendahnya rendemen ASC diduga karena larutan asam asetat 0,5M belum mampu melarutkan secara sempurna kolagen teripang yang diekstrak; sebagaimana dilaporkan oleh Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, dan Tanaka (2005) di dalam Singh et al. (2011) yang menemukan bahwa ekstraksi kolagen kulit ikan mata goyang (*Priacanthus macracanthus* atau *big eye snapper*) menggunakan asam setat 0,5M menghasilkan solubilisasi kolagen yang belum sempurna. Menurut Zhang et al. (2007) molekul kolagen saling berikatan silang baik di dalam maupun di antara molekul-molekul kolagen melalui ikatan kovalen. Ikatan silang ini terbentuk melalui kondensasi gugus aldehid pada daerah telopeptida; sehingga berpengaruh terhadap menurunnya kelarutan kolagen ASC. Dinyatakan juga bahwa penambahan enzim pepsin dapat meningkatkan kelarutan kolagen, sehingga rendemen yang dihasilkan lebih banyak.

pH

Kolagen teripang gamma yang dihasilkan memiliki nilai pH 6,08 ± 0,04. Alhana et al. (2015) melaporkan bahwa kolagen teripang *S. variegatus* memiliki nilai pH 7,37. Meskipun jenis teripang yang digunakan sama dan bahan yang digunakan untuk ekstraksi kolagen sama, yaitu asam asetat, namun konsentrasi maupun suhu ekstraksi yang diterapkan berbeda, sehingga menghasilkan karakteristik kolagen yang berbeda. Beberapa kolagen komersial yang digunakan untuk kosmetik memiliki pH 3,8-4,7 (Peng, Glattauer, Werkmeister & Ramshaw, 2004). Dinyatakan bahwa nilai pH ini berkaitan dengan kandungan garam/mineral



Gambar 2. (a) Teripang gamma (*S. variegatus*) segar; (b) Kolagen teripang gamma (*S. variegatus*)
 Figure 2. (a) Fresh gamma sea cucumber (*S. variegatus*); (b) Collagen of gamma sea cucumber (*S. variegatus*)

yang berperan sebagai penyangga (*buffering*) larutan kolagen.

Derajat Putih

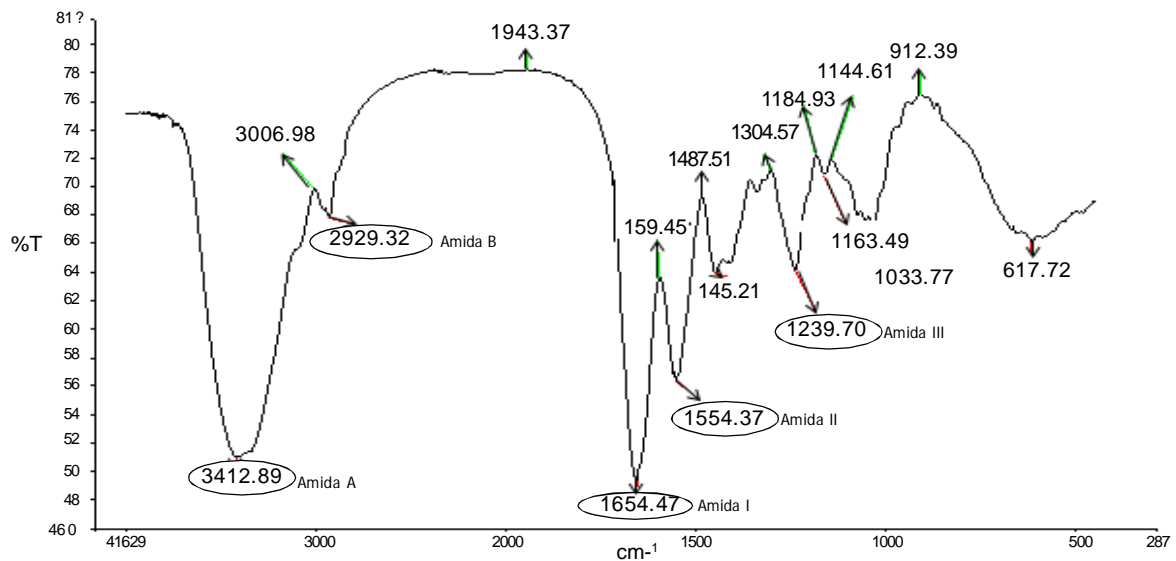
Analisis derajat putih menunjukkan bahwa nilai derajat putih kolagen teripang gamma adalah $77,02 \pm 0,00\%$. Nilai ini lebih tinggi dari nilai derajat putih teripang gamma yang dilaporkan oleh Alhana et al. (2015), yaitu 69,01%. Hal ini disebabkan oleh metode ekstraksi yang berbeda. Ekstraksi kolagen teripang gamma yang dilakukan oleh Alhana et al. (2015) menggunakan asam asetat 0,1 – 0,3%, dengan *pretreatment* menggunakan NaOH 0,05 – 0,3%; sedangkan pada penelitian ini menggunakan asam asetat 0,5M (setara dengan 0,42%), dengan *pretreatment* menggunakan NaOH 0,1M (setara 0,4%). Rasio daging teripang dengan pelarut yang digunakan pada kedua riset itu sama. Dengan demikian efektivitas metode ekstraksi kolagen pada penelitian ini lebih tinggi dalam hal mengurangi pigmen sehingga menghasilkan derajat putih yang lebih tinggi daripada metode ekstraksi yang dilakukan oleh Alhana et al. Gambar teripang segar dan kolagennya disajikan pada Gambar 2.

Gugus Fungsional

Hasil analisis gugus fungsional kolagen teripang gamma menggunakan FTIR menunjukkan bahwa kolagen ini memiliki sebaran puncak-puncak serapan pada beberapa bilangan gelombang yang menunjukkan gugus-gugus fungsional tertentu. Puncak serapan pada bilangan gelombang 3412 cm^{-1} menunjukkan amida A. Amida ini berada pada kisaran $3400\text{-}3440 \text{ cm}^{-1}$, dimana vibrasi *N-H stretching* bebas terjadi (Singh et al., 2011). Puncak serapan amida A dapat bergeser pada frekuensi yang lebih rendah, yaitu 3300 cm^{-1} apabila gugus N-H berikatan dengan ikatan hidrogen (Doyle, Bendit &

Blout, 1975). Dalam hal ini tidak terdapat gugus NH yang berikatan dengan ikatan hidrogen, karena puncak serapan amida A kolagen teripang gamma ini berada pada 3412 cm^{-1} . Puncak serapan berikutnya terdapat pada panjang gelombang 2929 cm^{-1} , berada pada wilayah serapan amida B, yaitu kisaran $2935\text{-}2915 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan *stretching* asimetris dari gugus CH_2 (Coates, 2000).

Pada bilangan gelombang 1654 cm^{-1} ditemukan puncak serapan yang menunjukkan amida I, sebagaimana dinyatakan oleh Singh et al. (2011) bahwa puncak amida I berada pada kisaran bilangan gelombang $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$. Puncak tersebut menunjukkan adanya vibrasi *C=O stretching* di sepanjang rantai polipeptida sekaligus merupakan penanda dari struktur sekunder peptida. Amida II ditemukan pada bilangan gelombang 1554 cm^{-1} . Menurut Kong dan Yu (2007) serapan amida II yang terdapat pada kisaran $1480\text{-}1575 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya *C-N stretching* dan *N-H bending*. Gugus fungsi terakhir adalah amida III dengan puncak serapan pada 1239 cm^{-1} . Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan dan Shahidi (2010) menyatakan bahwa amida III memiliki serapan antara $1200\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya *N-H bending* dan *C-H stretching*. Analisis gugus fungsional dengan FTIR ini dapat digunakan untuk konfirmasi adanya struktur *triple helix*, yang diketahui dari nilai rasio serapan amida III (1239 cm^{-1}) dengan puncak serapan pada 1450 cm^{-1} yang mendekati 1 (Plepis et al., 1996 di dalam Silva et al., 2014). Pada Gambar 3 hasil analisis FTIR menunjukkan rasio serapan amida III (pada 1239 cm^{-1}) dengan puncak serapan pada 1450 cm^{-1} menunjukkan nilai yang sesuai dengan pernyataan tersebut, sehingga hal ini menandakan bahwa kolagen teripang ini belum terdegradasi menjadi gelatin karena masih terdapat struktur *triple helix*. Spektra infra merah kolagen teripang disajikan pada Gambar 3 dan Tabel 2.



Gambar 3. Spektra infra merah kolagen teripang gamma (*S. variegatus*).
 Figure 3. Infra red spectrum of gamma sea cucumber (*S. variegatus*).

Tabel 2. Gugus fungsional kolagen teripang gamma (*S. variegatus*).
 Table 2. Functional group of collagen gamma sea cucumber (*S. variegatus*).

Amida	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) Wavenumber (cm ⁻¹)	Wilayah Serapan (cm ⁻¹) Wavenumber Range (cm ⁻¹)	Keterangan/ Description	Referensi/ References
Amida A	3412.89	3400-3440	NH stretch	Singh et al., 2011
Amida B	2929.32	2935-2915	asimetrikal stretching CH ₂	Coates, 2000
Amida I	1654.47	1600-1700	C-O stretch	Singh et al., 2011
Amida II	1554.37	1480-1575	C-N stretching dan N-H bending	Kong dan Yu (2007)
Amida III	1239.70	1200-1400	N-H bending dan C-H stretching	Kittiphattanabawon et al. (2010)

Komposisi asam amino kolagen teripang gamma disajikan pada Tabel 3. Hasil analisis menunjukkan bahwa asam amino yang paling dominan adalah glisin (16,88 %). Hal serupa dilaporkan oleh Alhana et al. (2015), bahwa komposisi asam amino terbanyak dari kolagen teripang *S. variegatus* adalah glisin (11,35%). Kolagen dari sumber lainnya juga dilaporkan mengandung asam amino yang didominasi oleh glisin (Jamilah, Umi Hartina, Mat Hashim & Sazili, 2013; Mahboob, 2015; Singh et al., 2011). Jenis asam amino lainnya yang jumlahnya relatif tinggi adalah asam glutamat (11,12%), alanin (6,42%) dan prolin (6,71%). Struktur triple helix dalam molekul dasar kolagen memiliki susunan asam amino yang khas, yaitu Gly-X-Y, dengan posisi X adalah prolin dan posisi

Y adalah hidroksiprolin. Menurut Aberoumand (2012), kolagen mengandung glisin dalam proporsi sekitar sepertiga bagian, tidak mengandung triptofan dan sistein; dan kadar tirosin dan histidin yang rendah. Pada kolagen teripang gamma ini proporsi glisin masih lebih rendah dari kolagen pada umumnya, meskipun lebih tinggi dari yang dilaporkan Alhana et al.; sedangkan sistein hampir tidak terdeteksi (0,04%), dan kadar tirosin dan histidin relatif rendah, yaitu masing-masing 1,20 dan 0,52%. Rendahnya kadar asam amino tirosin, lisin dan histidin pada kolagen teripang juga dilaporkan oleh Abedin et al. (2013) dan Zhong, Chen, Hu dan Ren (2015).

Kadar asam amino kolagen dari jenis bahan baku yang sama bisa saja berbeda, disebabkan oleh

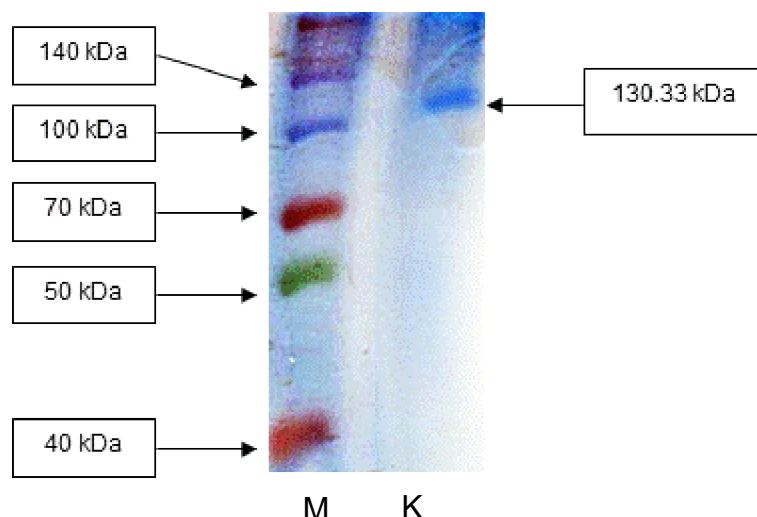
Tabel 3. Komposisi asam amino kolagen teripang gamma (*S. variegatus*).
 Table 3. Amino acid composition of gamma sea cucumber (*S. variegatus*).

Asam amino/Amino acids	Konsentrasi/Concentration (%)
Asp	5.84 ± 0.13
Ser	2.59 ± 0.05
Glu	11.12 ± 0.24
Gly	16.89 ± 0.35
His	0.52 ± 0.01
Arg	6.57 ± 0.15
Thr	3.73 ± 0.08
Ala	6.42 ± 0.14
Cys	0.04 ± 0.00
Tyr	1.20 ± 0.02
Val	1.82 ± 0.03
Met	0.80 ± 0.01
Lys	0.99 ± 0.01
Ile	1.46 ± 0.04
Leu	2.33 ± 0.06
Phe	1.30 ± 0.03
Pro	6.71 ± 0.16

metode ekstraksi yang berbeda, konsentrasi bahan pengekstrak yang berbeda ataupun metode analisis asam amino yang berbeda. Nurhayati, Tazwir dan Murniyati (2013) menemukan bahwa ekstraksi kolagen kulit ikan nila menggunakan asam asetat 1,5 M menghasilkan kadar asam amino sekitar separuh dari kadar asam amino kolagen dari bahan yang sama yang diekstraksi menggunakan asam asetat 0,5M.

Bobot Molekul

Penentuan bobot molekul kolagen teripang gamma dengan SDS-PAGE sebagaimana dilaporkan oleh Khirzin et al. (2015) menunjukkan nilai bobot molekul (BM) 130,33 kDa. Hanya ada satu pita protein dengan nilai tersebut. Menurut Schmidt et al. (2016) terdapat paling tidak 29 jenis kolagen, yang paling umum



Keterangan/Note: Gambar telah dipublikasi juga oleh Khirzin et al. (2015)

Gambar 4. Elektroforegram SDS-PAGE kolagen teripang gamma (*S. variegatus*). (M : marker, K : kolagen).
 Figure 4. SDS-PAGE of gamma sea cucumber collagen (*S. variegatus*). (M : marker; K : collagen).

adalah kolagen tipe 1, yaitu jenis kolagen yang banyak ditemukan pada jaringan kulit, tendon dan tulang. Kolagen tipe 1 biasanya terdiri dari rantai α_1 dan α_2 yang heterolog membentuk triple helix (α_1)₂ α_2 . Berdasarkan hasil elektroforesis ini diduga bahwa triple helix kolagen teripang ini dibentuk oleh 3 rantai α_1 yang homolog atau (α_1)₃. SDS PAGE ini tidak mampu memisahkan rantai α_2 kemungkinan masing-masing rantai α tersebut memiliki sifat kimia dan elektroforesis yang mirip sehingga bermigrasi pada posisi yang sama pada gel, seperti yang dijelaskan oleh Miyauchi dan Kimura di dalam Abedin et al. (2013). Triple helix yang homolog juga ditemukan oleh Abedin et al. untuk kolagen *S. vastus* dengan BM 122 kDa, Cui et al. (2007) untuk kolagen *Stichopus japonicus* dengan BM 135 kDa, Liu et al. (2010) untuk kolagen *Parastichopus californicus* dengan BM 138 kDa, dan Zhong et al. (2015) untuk kolagen *S. monotuberculatus* dengan BM 137 kDa.

Kolagen teripang sebagai salah satu alternatif kolagen sapi atau babi berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan kosmetik atau perawatan kulit (*beauty care*) maupun aplikasi di bidang kesehatan lainnya (Silva et al., 2014), di antaranya sebagai pelembab, mencegah penuaan dini, pelindung sinar UV dan lain-lain. Meskipun rendemen kolagen teripang relatif kecil, yaitu sekitar 20% (bk) namun sumberdaya teripang, termasuk *Stichopus*, tersebar di berbagai wilayah perairan Indonesia (Kiara Indonesia, 2015), termasuk di Pulau Bintan yang saat ini mulai dikembangkan usaha pengolahan teripang sebagai bahan herbal. Menurut Karim & Bhat (2009) di dalam Zhong et al. (2015), kolagen hewan air dari daerah tropis memiliki kualitas yang serupa dengan kolagen dari hewan darat (sapi dan babi). Oleh karena itu kolagen dari teripang dan hewan air lainnya mempunyai prospek ke depan yang sangat baik untuk dikembangkan.

KESIMPULAN

Isolasi kolagen teripang gamma (*Stichopus variegatus*) dengan metode Park et al. (2012) yang dimodifikasi menghasilkan isolat kolagen dengan rendemen 16,40% (bk), pH 6,08 dan derajat putih 77,02%. Gugus fungsi kolagen terdiri dari amida A (3412 cm⁻¹), B (2929 cm⁻¹), I (1654 cm⁻¹), II (1554 cm⁻¹), dan III (1239 cm⁻¹). Isolat kolagen ini merupakan kolagen tipe 1 yang kemungkinan dibentuk oleh 3 rantai α_1 yang homolog, dengan bobot molekul rantai α_1 130,33 kDa. Komposisi asam amino didominasi oleh asam amino glisin, asam glutamat, prolin dan alanin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedin, M.D.Z., Karim, A.A., Ahmed, F., Latif, A.A., Gan, C.Y., Ghazali, F.C., W., & Sarker, M.Z.I. (2013). Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the integument of sea cucumber (*Stichopus vastus*). *J Sci Food Agric*, 93(5),1083-8. doi: 10.1002/jsfa.5854.
- Aberoumand, A. (2012). Comparative Study Between Different Methods of Collagen Extraction from Fish and its Properties. *World Applied Sciences Journal*, 16 (3), 316-319.
- Alhana, Suptijah, P. & Tarman, K. (2015). Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen dari Teripang gamma. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 150-61. DOI: 10.17844/jphpi.2015.18.2.150
- Andiristanti WA. (2012). Uji Manfaat Ekstrak Kolagen Kasar dari Teripang *Stichopus Hermanii* Sebagai Bahan Pelembab Kulit. Universitas Indonesia : Tesis [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. (2005). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemist Inc. Washington,DC.
- Aydin, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y., & Ko se, S. (2011). Proximate Composition and Fatty Acid Profile of Three Different Fresh and Dried Commercial Sea Cucumbers From Turkey. *Int J. Food Sci Tech*, 46, 500–508
- Barth, A. (2000). The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chain. Review. *Progress in Biophysics and Molekuler Biology*, 74, 141-173.
- Bordbar, S., Anwar F., & Saari N. (2011). High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. *Mar Drugs*. 9(10), 1761-805. doi: 10.3390/md9101761.
- Coates, J. 2000. Interpretation of infrared spectra. A practical approach. Di dalam Meyers R.A. (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 10815–10837
- Cui, F.X., Chang, H.X., Zhao, J.L., Yong, Q.Z., Ping, D., Xue, Y.F., Xin, G. (2007). Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Food Chemistry* 100 : 1120-1125
- Doyle, B. B., Bendit, E. G., & Blout, E. R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, 14, 937–95
- Fawzya, Y.N. , Januar, H.I., Susilowati, R., & Chasanah, E. (2015). Chemical composition and fatty acid profile of some Indonesian sea cucumbers. *Squalen Bull. of Mar. & Fish. Postharvest & Biotech*, 10 (1), 27-34
- Forghani, B., Ebrahimpour, A., Bakar, J., Hamid, A.A., Hassan, Z. & Saari, N. (2012). Enzyme Hydrolysates from *Stichopus horrens* as a New Source for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 236384, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/236384>
- Haider, M. S., Sultana, R. S., Jamil, K., Lakhte, Zehra, Tarar, M., Shirin, K., & Afzal, W. (2015). A study on proximate composition, amino acid profile, fatty acid

- profile and some mineral contents in two species of sea cucumber. *J Anim Plant Sci*, 25(1):168-175
- Hartati, R., Widianingsih, & Fatimah, U. (2015). Re-Deskripsi Teripang *Stichopus hermanii* Dari Kepulauan Karimunjawa Melalui Analisa Morfologi, Anatomi dan Spikula (Ossicles). *Jurnal Kelautan Tropis*, 18(2),70–75.
- International Trade Centre. (2016). List of products imported by Indonesia detailed products in the following category: 35 Albuminoidal substances; modified starches; glues; enzymes, 2011-2015. In Trademap. International Trade Statistics. http://www.trademap.org/tradestat/Product_SelCountry_TS.aspx.
- Jamilah, B., Umi Hartina, M. R., Mat Hashim, D. & Sazili, A. Q. (2013). Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*, 20(2), 835-842 .
- Khirzin, M.H., Sukarno, Yuliana, N.D., Fawzya, Y.N. & Chasanah, E. (2015). Aktivitas inhibitor enzim pengubah angiotensin (ACE) dan antioksidan peptida kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *J. Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* 10(1), 27-35.
- Kiara Indonesia. 2015. Perdagangan Teripang. Bulletin Kabar Bahari, edisi Mei-Juni 2015. p. 4-9.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT - Food Science and Technology*, 43, 792–800.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta bioch bioch sin*, 39(8), 549-559
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Liu, Z., Alexandria, C.M., Oliveira., & Su, Y.C. (2010). Purification and characterization of pepsin solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). *Agriculture Food.Chemistry*, 58, 1270-1274.
- Mahboob, S. (2015). Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *J Food Sci Technol*, 52(7), 4296–4305. doi: 10.1007/s13197-014-1520-6.
- Nazeer, R.A., Kavitha, R. Ganesh, Naqash, J.S.Y., Kumar, N.S.S. & Ranjith, R. (2014). Detection of collagen through FTIR and HPLC from the body and foot of *Donax cuneatus* Linnaeus, 1758. *J Food Sci Technol*, 51(4), 50-55. doi: 10.1007/s13197-011-0539-1.
- Nurhayati, Tazwir, & Murniyati. (2013). Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam dari Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Komunikasi ringkas. *Jurnal Pasca panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 8(1), 85–92.
- Park, S.Y., Hee, K.L., Seogjae, L., Hyeong, C.H., Somi, K.C., & Moonjae, C. (2012). *Pepsin solubilized collagen* (PSC) from red sea cucumber (*Stichopus japonicas*) regulates cell cycle and fibronectin synthesis in HaCaT cell migration. *Food chemistry*, 132, 487-492
- Peng, Y., Glattauer, V., Werkmeister, J.A. & Ramshaw, J.A.M. (2004). Evaluation for collagen products for cosmetic application. *International Journal of Cosmetic Science*, 26(6), DOI: 10.1111/j.1467-2494.2004.00245_2.
- Rasyid, A. (2014). Potensi pemanfaatan teripang *Stichopus variegatus* sebagai suplemen makanan. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 40(2).
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P. & Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. Mini Review. *International Food Research Journal*, 23(3), 913-922.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon Hypophthalmus*). *Food chemistry*, 124, 97-105.
- Silva, T.H., Moreira-Silva, Marques, A.L.P., Domingues, A., Bayon, I. & Reis.L. (2014). Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Mar Drugs*. 2014 Dec; 12(12): 5881–5901. doi: 10.3390/md12125881
- Siddiqui, Y.D., Arief, E.M., Yusoff, A., Suzina, A.H., Abdullah, S.Y. (2013). Isolation of pepsin solubilized collagen (PSC) from crude collagen extracted from body wall of sea cucumber (*Bohadschia* spp.). *Int J Pharm Sci*. 5(2):555-559.
- Tuwo, A. (2004). Status of Sea Cucumber Fisheries and farming in Indonesia. In *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*; Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.-F., Mercier, A., Eds.; FAO Fisheries Technical Paper No. 463; FAO: Rome, Italy, pp. 49–55.
- Vergara, W., & Rodríguez, A. (2016). Nutritional Composition of Sea Cucumber *Isostichopus* sp. *Natural Resources*, 7, 130-137. <http://dx.doi.org/10.4236/nr.2016.73013>.
- Yusida, A. (2016). *Formulasi Sediaan Krim Berbasis Nanokolagen Teripang gamma (Stichopus variegatus)*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. 36p.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Yu, Q. & Wu, X. (2007). Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103, 906-912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.053>.
- Zhong, M., Chen, T., Hu, C., & Ren, C. (2015). Isolation and characterization of collagen from body wall of sea cucumber *Stichopus monotuberculatus*. *Journal of food science*, 80(4), c1-c9. doi: 10.1111/1750-3841.12826.
- Zhong, Y., Khan, M.A., & Shahidi, F. (2007). Compositional Characteristics and Antioxidant Properties of Fresh and Processed Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*). *J. Agric. Food Chem*. 2007, 55, 1188-1192.