



# Pengecilan Ukuran Partikel dan Karakterisasi Kolagen dari Kulit Ikan Gabus (*Channa Striata*) dengan Metode *Ball Milling*

(Reducing particele size and characterization of collagen from snakehead fish (*Channa Striata*) skin by ball milling method)

Rini Agustin\*, Dwi Ramasepti Arta, Rahmi Nofita

Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Limau Manis, Pauh, Padang Sumatera Barat, Indonesia

**ABSTRACT:** Isolasi kolagen dari kulit ikan biasanya menghasilkan kolagen dalam bentuk serat padat yang tidak larut dalam air. Pembentukan partikulat kolagen dalam ukuran yang lebih kecil bahkan sampai mencapai ukuran nanometer menjadi hal yang penting terkait dengan aplikasi farmasetis kolagen, terutama dalam pembentukan sistem dispersi kolagen untuk aplikasi topikal. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan mikropartikel kolagen hasil isolasi kulit ikan gabus (*Channa striata*) dalam ukuran yang lebih kecil menggunakan *ball milling* dengan variasi jumlah bola (75 dan 100 bola) dan waktu penggilingan (30, 60, 120 dan 180 menit). Kolagen yang diperoleh dikarakterisasi sifat fisikokimianya meliputi ukuran partikel, sifat termal, pola difraksi sinar X, morfologi dengan SEM dan spektrum Infra merah. Mikropartikel kolagen dengan *ball milling* memiliki ukuran 4,653 µm dengan penggilingan yang optimal pada jumlah bola sebanyak 100 buah dalam waktu 120 menit. Karakteristik dari mikropartikel menunjukkan terjadinya pengurangan ukuran partikel pada kolagen, tidak terjadinya perubahan pada gugus fungsi dengan uji spektroskopi inframerah, adanya penurunan titik leleh dari hasil termogram DSC, penurunan intensitas pola difraksi sinar-X dan tampak fibril yang saling berhubungan dalam kumparan acak pada pengamatan dengan SEM. Dari penelitian ini dapat disimpulkan metoda *ball milling* untuk pengecilan ukuran partikel kolagen yang diisolasi dari kulit ikan gabus (*Channa striata*) dapat mengurangi ukuran partikel dengan penurunan 327 kali dan tidak terjadinya perubahan struktur *triple helix* pada kolagen hasil optimisasi.

**Keywords:** kolagen; mikropartikel, random coil, *ball milling*; karakteristik.

**ABSTRAK:** Isolasi kolagen dari kulit ikan biasanya menghasilkan kolagen dalam bentuk serat padat yang tidak larut dalam air. The formation of collagen particulates in smaller sizes even up to nanometer size is important in relation to the pharmaceutical application of collagen, especially in the formation of collagen dispersion systems for topical applications. The aims of this study is to obtain microparticulates of collagen from the skin isolation of snakehead fish (*Channa striata*) in a smaller size using ball milling with variations in the number of balls (75 and 100 balls) and milling time (30, 60, 120 and 180 minutes). The collagen obtained was characterized by its physicochemical properties including particle size, thermal properties, X-ray diffraction patterns, morphology with SEM and infrared spectra. The results particulates collagen showed that collagen had mean size in 4.653 µm with optimal grinding of 100 balls in 120 minutes. The characteristics of collagen showed a reduction in the particle size of the collagen, no change in functional groups by infrared spectroscopy, a decrease in the melting point from the DSC thermogram results, a decrease in the intensity of the X-ray diffraction pattern and the appearance of interconnected fibrils in random coils on observation with SEM. Based on study, it can be concluded that the ball milling method for reducing the particle size of collagen isolated from the skin of snakehead fish (*Channa striata*) can reduce the particle size by decreasing 327 times and there is no change in the triple helix structure of the optimized collagen.

**Kata kunci:** collagen; microparticulates; random coil; ball milling; characteristics.

## Pendahuluan

Ukuran partikel menjadi hal yang penting dalam aplikasi kolagen terutama dalam penggunaan topikal dan transdermal pada sistem penghantaran obat dan kosmetika [1]. Semakin berbentuk partikulat dan kecil ukuran partikel kolagen, bahkan sampai dalam skala nano, akan semakin mudah kolagen berpenetrasi secara transfolikuler melalui lapisan epidermis kulit karena dapat menembus pori-pori kulit dan folikel rambut [2]. Jalur transfolikuler ini obat

akan masuk melalui folikel rambut karena adanya pori pada kulit, sehingga ukuran partikel menjadi hal yang penting.

Kolagen yang diisolasi dari kulit ikan gabus akan menghasilkan serat kolagen, sehingga diperlukan upaya agar mendapatkan kolagen dalam bentuk partikulat yang berukuran kecil untuk tujuan farmasetis [1,3,4]. Upaya pengecilan ukuran partikel kolagen, dapat dilakukan secara

### Article history

Received: 30 Mar 2023  
Accepted: 09 April 2023  
Published: 30 April 2023

### Access this article



\*Corresponding Author: Rini Agustin

Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Limau Manis, Pauh, Padang Sumatera Barat, Indonesia, 255175 | Email: [riniagustin@phar.unand.ac.id](mailto:riniagustin@phar.unand.ac.id)

biologi, fisika dan kimia [5,6]. Metode pengecilan ukuran serat kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) yang akan dilakukan pada penelitian kali ini ialah dengan metode fisika, yaitu dengan menggunakan bola-bola yang terdapat pada alat *Ball Milling*. Metode yang akan dilakukan memiliki prinsip adanya tekanan mekanik yang diberikan pada alat akibat dari tumbukan atau gesekan antara bola-bola pada *Ball Milling* dengan material yang digunakan [5].

*Ball Milling* adalah salah satu alat yang digunakan dengan prinsip menghaluskan material *powder* (bubuk) menjadi bubuk yang sangat halus. *Ball milling* dapat menghaluskan material kering dan basah [7]. Alat ini bekerja tergantung pada energi yang akan dilepaskan dari dampak yang dihasilkan pada gesekan antara material bubuk (*powder*), bola, kecepatan dan waktu [7]. Partikel akan semakin halus apabila alat dijalankan semakin lama, tetapi hal ini dapat menyebabkan perubahan pada serbuk kolagen yaitu dapat menjadi gelatin apabila suhu disekitarnya terlalu panas [6,7].

Kolagen dapat ditentukan stabilitasnya dengan menggunakan analisis spektroskopi infra merah untuk penentuan gugus fungsi dari kolagen, analisis morfologi dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), pengukuran partikel dengan *Particle Size Analyzing* (PSA), *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) untuk melihat perubahan kolagen karena pengaruh termal dan pola kristalinitas kolagen dengan *X-Ray Diffraction* (XRD). Selain itu, karakteristik kolagen dari ikan gabus ditentukan dengan pengujian rendemen, analisis kadar abu, kandungan air, kadar lemak, kadar protein, logam berat, analisis profil protein dengan SDS-PAGE, dan pH.

Penggunaan *ball mill* sebagai metode pengecilan ukuran partikel sudah pernah dilakukan [8,9]. Metode *ball mill* dapat mempengaruhi ukuran partikel karena pengaruh jumlah bola dan waktu penggilingan, tetapi pemastian karakterisasi dari kolagen yang terbentuk masih jarang dilakukan dan masih sedikitnya penelitian terkait kulit ikan gabus (*Channa striata*). Pada penelitian ini diharapkan kolagen yang didapatkan dari metode isolasi kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) yang sudah dipatenkan dengan nomor IDP000073332 [10] dapat dibentuk menjadi partikulat berukuran kecil. Pengecilan serat kolagen dilakukan dengan metode *ball milling* dan dikarakterisasi serta dilihat ada atau tidaknya perubahan pada struktur *triple helix* dari mikropartikulat yang terbentuk, karena kolagen memiliki sifat yang rentan terhadap perubahan struktur *triple helix* dengan adanya perlakuan.

## Metode Penelitian

### Alat

Alat-alat yang digunakan adalah *Planetary Ball Milling*, *Fourier Transform Infra Red* (Shimadzu IR Tracer-100 AH), *Scanning Electron Microscopy* (HITACHI S3400), *Particle Size Analyzer* (Shimadzu SALD-2300), *Differential Scanning Calorimeter* (Shimadzu DSC-60 Plus), Difraktrometer (PANalytical X'Pert Pro), SDS-PAGE (Bio-Rad), *Atomic Absorption Spectroscopy* (Varian AA240), pH meter (Mettler Toledo), *hot plate*, *furnace*, timbangan analitik, cawan porselen, labu erlenmeyer, sentrifugator, oven, aluminium foil, kertas saring, labu *kejdhal*, *glass slide*, *gel cassette* SDS-PAGE dan alat-alat gelas laboratorium lainnya.

### Bahan

Kolagen yang diisolasi dari snakehead fish skin (*Channa striata*), asam asetat glacial pro analysis (Smart Lab), selenium (Merck), asam sulfat (PT. Brataco), natrium hidroksida (PT Brataco), asam borat (PT. Brataco), metil merah, bromkresol hijau, heksan (PT. Brataco), akrilamid (Vivantis), ammonium persulfat (APS), *tetramethyl ethylenediamine* (TEMED), isopropanol (PT. Brataco), *sodium dodecyl sulfate* (Vivantis), tris (Merck), gliserol (Vivantis), *beta-mercaptoethanol* (Sigma-Aldrich), *prestained protein ladder 11–245 kDa* (Gangnam Stain), *comassie blue staining* (MP Biomedicals), *buffers* pH 4,01 and 6,86 (Mettler Toledo), asam nitrat (PT. Brataco), asam perklorat (PT. Brataco), and asam hidroklorida (PT. Brataco).

### Isolasi Kolagen

Isolasi kolagen dari kulit ikan gabus (*Channa striata*) dilakukan dengan menggunakan kombinasi asam asetat dan getah pepaya segar tanpa sentrifugasi yang merujuk kepada metode ekstraksi yang sudah dipatenkan sebelumnya oleh Nofita dengan nomor paten IDP000073332 [10]. Setelah dilakukan proses isolasi, dilakukan pemeriksaan rendemen kolagen dimana kulit ikan gabus awal dan kolagen yang didapatkan ditimbang dan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat kolagen kering}}{\text{berat kolagen awal}} \times 100\%$$

### Pemeriksaan Bahan Baku

Pemeriksaan bahan baku serbuk kolagen hasil isolasi kulit ikan gabus (*Channa striata*) dilakukan sesuai dengan syarat Standar Nasional Indonesia (SNI) [11]. Pemeriksaan bahan baku kolagen yang dilakukan antara lain analisis profil pita protein dengan SDS-PAGE, pemeriksaan kandungan

air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, logam berat dan uji pH. Pengujian stabilitas kolagen dilakukan dengan menggunakan analisis Spektroskopi inframerah (FTIR), analisis morfologi dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), pengukuran ukuran partikel dengan *Particle Size Analyzing* (PSA), pengukuran titik leleh dan sifat termal menggunakan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dan analisis pola difraksi dengan *X-Ray Diffraction* (XRD).

### Pembentukan Mikropartikel Kolagen

Pembentukan mikropartikel kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) dilakukan dengan memvariasikan jumlah bola dan waktu penggilingan dengan kecepatan alat penggiling yang maksimal yaitu 400 rpm, sebagaimana terlihat pada [Tabel 1](#). Setelah dilakukan optimasi, data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji *analysis of varian* (ANOVA) dua arah untuk pengaruh waktu penggilingan dan jumlah bola yang digunakan terhadap ukuran.

Pembentukan mikropartikel kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) dilakukan dengan metode *ball milling* menggunakan alat *Planetary Ball Mill*, dilakukan dengan cara memasukkan bola-bola sebagai media pemecah ke dalam media *ball mill* diikuti dengan sampel atau bahan yang akan digiling. Sampel kolagen ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan ke dalam chamber sebagai media *ball mill* yang telah terisi bola-bola penggiling. Kemudian proses penggilingan dilakukan dengan alat *planetary ball mill* untuk membentuk mikropartikel kolagen dengan kecepatan dan waktu yang optimum.

### Karakterisasi Partikulat Kolagen dari Kulit Ikan Gabus

#### a. Pengukuran Ukuran Partikel

Analisis ukuran partikel dilakukan dengan alat

Shimadzu Sald-2300. Pengujian dilakukan pada range 1-6000 nm dengan menggunakan prinsip *Dynamic Light Scattering*. Analisis PSA dimulai dengan mengambil sebanyak 1 mL sampel dalam kuvet dan dimasukkan ke alat PSA. Kemudian alat PSA akan menghasilkan informasi ukuran partikel dan indeks polidispersitas dari sampel dengan cara ditembakannya sampel ke laser gelombang nano pada alat PSA [\[12\]](#).

#### b. Spektroskopi Infra Merah

Mikropartikel kolagen yang sudah didapatkan dari hasil isolasi kolagen kulit ikan gabus dikarakterisasi dengan menggunakan FTIR-ATR pada bilangan gelombang 370-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Sampel sebanyak 1 mg diletakkan pada permukaan kristal ATR dengan jenis kristal ZnSe. Spektrum FTIR diukur pada kecepatan 64 scan/detik dan dengan resolusi 2  $\text{cm}^{-1}$  [\[13\]](#).

#### c. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Mikropartikel kolagen dari hasil isolasi kulit ikan gabus di analisis morfologinya dengan menggunakan alat *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dengan tegangan percepatan yang digunakan lebih kurang 1,5 – 20 kV [\[14\]](#).

#### d. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Analisis dilakukan dengan menggunakan alat Shimadzu DSC-60 Plus yang dilakukan untuk menentukan suhu denaturasi dan suhu leleh. Analisis dilakukan dengan menggunakan sampel sebanyak 5-10 mg, lalu dipanaskan mulai dari suhu 19°C menjadi 260°C dengan kecepatan pemanasan 10°C per menit di bawah atmosfer nitrogen dengan aliran 20 mL per menit. Setiap sampel dilakukan tiga kali pengulangan [\[15\]](#).

#### e. X-Ray Diffraction (XRD)

Analisis dilakukan dengan menggunakan alat difraktometer pada suhu ruang. Pengujian dilakukan dengan menggunakan logam Cu, filter  $K\alpha$ , arus 40 mA, voltase 40 kV dan analisis dilakukan dalam rentang  $2\theta = 10-50^\circ$ . Sampel diletakkan pada kaca atau holder pada alat difraksi lalu diratakan agar dapat mencegah orientasi partikel selama proses penyiapan sampel. Pemindaian dilakukan dengan kecepatan 0,02°/detik [\[16\]](#).

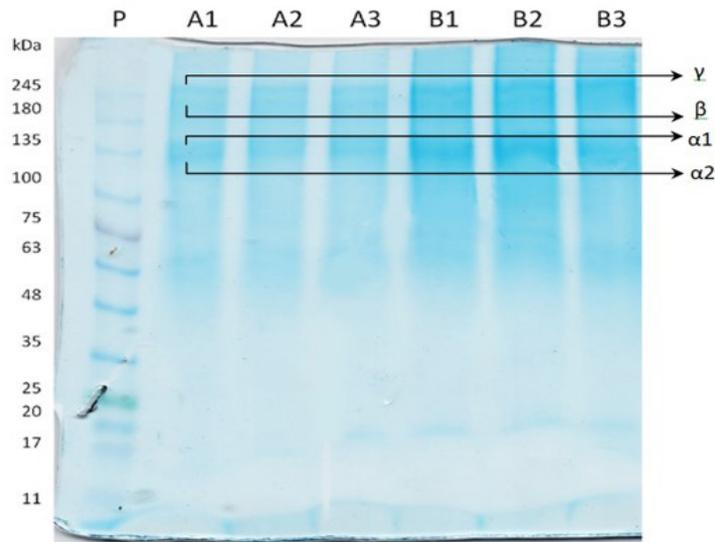
## Hasil dan Diskusi

### Pemeriksaan Bahan Baku

Setelah kolagen diisolasi, dilakukan perhitungan rendemen dari kolagen yang didapatkan. Persentase rendemen kolagen yang didapat adalah 18,05% (w/w).

**Tabel 1.** Optimasi pembentukan mikropartikel kolagen dengan kecepatan 400 rpm

Waktu (menit)	Jumlah Bola (buah)
30	75
30	100
60	75
60	100
120	75
120	100
180	75
180	100



**Gambar 1.** Hasil analisis SDS-PAGE kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*)

**Keterangan:**

- P : Gangnam-Stain Prestained Protein Ladder
- A : Sampel Kolagen 5 mg/mL
- B : Sampel Kolagen 10 mg/mL

Rendemen yang tidak begitu besar ini dikarenakan kelarutan kolagen yang rendah pada saat proses hidrolisis dengan asam asetat dan tingginya persentase dari derajat pengembangan kulit ikan gabus. Selain itu, proses *pretreatment* asam dan basa bisa memicu peningkatan jumlah *crosslink* pada saat *swelling* [14].

Analisis profil pita protein pada kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) dilakukan dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Pada [Gambar 1](#) tampak pita protein pada kolagen kulit ikan gabus dengan konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 5 dan 10 mg/mL. Kolagen tipe I membentuk *triple helix* yang terdiri dari dua rantai ( $\alpha_1$  dan  $\alpha_2$ ) yang heterotrimer [14].

Kolagen tipe I terdiri dari 3 rantai polipeptida dengan struktur *triple helix* karena adanya rantai  $\alpha$  yang saling melingkar seperti untaian tali. Sehingga molekul kolagen memiliki bentuk seperti batang dan kaku. Rantai  $\alpha$  (alfa) dan  $\beta$  (beta) tergolong dalam kolagen tipe I [3]. Rantai  $\beta$  merupakan bentuk dimer dari kolagen dan rantai  $\gamma$  adalah bentuk trimer dari kolagen [17]. *Protein ladder* digunakan sebagai protein pembandingan pada pengujian bobot molekul kolagen. Pada penelitian ini, protein ladder yang digunakan adalah 11 – 245 kDa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kolagen kulit ikan gabus memiliki 4 pita protein yang diduga rantai  $\alpha_1$  dan  $\alpha_2$  (sekitar 135 kDa),  $\beta$  (dibawah 245 kDa) dan  $\gamma$  (diatas 245 kDa). Pita  $\alpha_1$  dan  $\alpha_2$  menunjukkan pita dengan

**Tabel 2.** Hasil pemeriksaan bahan baku kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*)

No.	Pemeriksaan	Hasil Pengamatan	Literatur [22,23].
1	Kandungan air	6,011% (w/w)	≤ 12%
2	Kadar Abu	0,685% (w/w)	≤ 1%
3	Kadar Lemak	0,33% (w/w)	Serendah mungkin
4	Kadar Protein	92,410% (w/w)	≥ 75%
5	Logam Berat	Pb: 0,0015 mg/kg	Pb: ≤ 0,4 mg/kg
		Cd: <0,0953 mg/kg	Cd: ≤ 0,1 mg/kg
6	pH	6,68	6,5-8,0

**Tabel 3.** Data optimasi pembentukan mikropartikel kolagen dengan kecepatan 400 rpm

Waktu (menit)	Ukuran Partikel (µm)	
	Jumlah Bola	
	75 bola	100 bola
30	66,724	49,228
60	24,765	15,148
120	8,151	4,653
180	32,282	14,541

rentang yang berbeda yang masih berada pada sekitaran 135 kDa. Hal ini sesuai dengan yang diperoleh oleh Ramli pada penelitiannya, dimana terdapat pita  $\alpha$  yang identik pada berat molekul 129 – 139 kDa. Selain itu, pita  $\beta$  dapat terlihat pada rentang 200 – 250 kDa dan  $\gamma$  pada 264 kDa [18]. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat dibuktikan bahwa kolagen kulit ikan gabus memiliki struktur kolagen tipe I.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 2, dapat dinyatakan bahwa kolagen kulit ikan gabus yang diisolasi dengan metode kombinasi asam asetat dan getah pepaya tanpa sentrifugasi, yang merujuk kepada nomor paten IDP000073332 memenuhi persyaratan mutu bahan baku [11].

**Pembentukan Mikropartikel Kolagen**

Berdasarkan hasil optimasi yang terbentuk, kolagen memiliki ukuran partikel dalam skala mikrometer. Berdasarkan Tabel 3, dapat dilihat bahwa ukuran partikel kolagen dengan jumlah 100 bola dalam waktu 30 menit lebih kecil dibandingkan dengan 75 bola. Semakin lama waktu yang dilakukan saat penggilingan, ukuran partikel

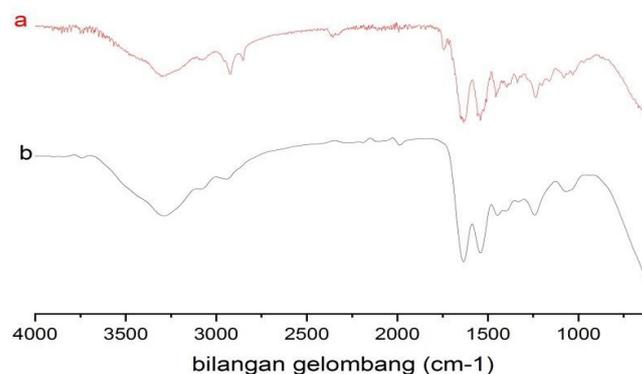
kolagen juga semakin besar dengan perbandingan jumlah bola yang sama. Akan tetapi, setelah waktu 120 menit kolagen memiliki pembesaran ukuran partikel. Hal ini terjadi akibat kecepatan penghancuran serbuk kolagen yang rendah sehingga terjadinya penggumpalan pada serbuk saat proses penggilingan berlangsung. Semakin lama waktu yang digunakan maka kolagen akan memiliki ukuran yang lebih besar lagi. Hal ini disebabkan kolagen mengalami proses agregasi pada saat penggilingan berlangsung. Metode *ball milling* dengan jumlah bola 100 dalam waktu 120 menit adalah parameter optimal dalam pembentukan mikropartikel kolagen dengan penurunan ukuran 327 kali dari ukuran kolagen bahan baku awalnya.

Hasil pengamatan optimasi pembentukan mikropartikel kolagen dianalisa secara statistik menggunakan aplikasi SPSS dengan metode ANOVA dua arah. Sebelumnya dilakukan analisis normalitas dan homogenitas data optimasi sebagai syarat analisis ANOVA. Analisis normalitas dan homogenitas, menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Analisis ANOVA dua arah, secara berurutan waktu dan jumlah bola masing-masing memberikan perbedaan yang nyata terhadap ukuran partikel dengan nilai Sig. 0,006 dan 0,039 (Sig. <0,05) yang berarti H0 ditolak sehingga dilanjutkan dengan uji Tukey. Pada uji Tukey yang diperoleh memiliki nilai Signifikansi >0,05 yang menyatakan bahwa waktu dan jumlah bola memberikan perbedaan yang signifikan terhadap ukuran partikel.

**Karakterisasi Mikropartikel kolagen dari Kulit Ikan Gabus**

**Analisis Ukuran Partikel**

Pada Tabel 4, didapatkan ukuran partikel yang terbentuk dengan teknik *ball milling* masih dalam skala



**Gambar 2.** Overlay spektrum FTIR a) Kolagen bahan baku; b) Kolagen hasil optimasi

**Tabel 4.** Hasil pemeriksaan ukuran partikel kolagen hasil optimasi

Pengukuran	Pengulangan			Rata-rata ± SD
	1	2	3	
Ukuran partikel (µm)	2,702	2,057	2,920	2,560 ± 0,448

mikrometer dengan rata-rata sebesar  $2,560 \pm 0,448$  mikro. Kolagen yang diisolasi dari kulit ikan gabus (*Channa striata*) dapat diperkecil ukurannya menjadi mikropartikel menggunakan *ball milling*.

**Analisis Spektroskopi Infra Merah**

Analisis FTIR dilakukan untuk menunjukkan adanya gugus fungsi senyawa kolagen pada penelitian ini. Penggunaan FTIR sebagai identifikasi gugus fungsi dilakukan dengan pengukuran panjang gelombang dan intensitas serapan infra merah oleh sampel yang menimbulkan getaran akibat penyerapan radiasi infra merah. Sehingga dapat diperoleh informasi terkait struktur protein pada sampel [19]. Adanya pergeseran posisi puncak dan hilang atau munculnya puncak transmitan baru pada spektrum FTIR menunjukkan terjadinya interaksi secara kimiawi dan fisika seperti ikatan hidrogen pada analisis spektroskopi FTIR [20]. Data bilangan gelombang dari kolagen bahan baku dibandingkan dengan data dari kolagen hasil optimasi, yang dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 2.

Hasil spektroskopi kolagen dari kulit ikan gabus menunjukkan puncak serapan dari kolagen bahan baku dan kolagen hasil optimasi. Pada kolagen bahan baku terdapat daerah serapan amida A pada  $3304,06 \text{ cm}^{-1}$ . Setelah dilakukan optimasi pembentukan mikropartikel kolagen dengan *ball milling*, didapatkan pergeseran posisi ke panjang gelombang yang lebih rendah dengan panjang gelombang  $3295,28 \text{ cm}^{-1}$  yang menandakan adanya pergeseran panjang gelombang karena adanya peregangan

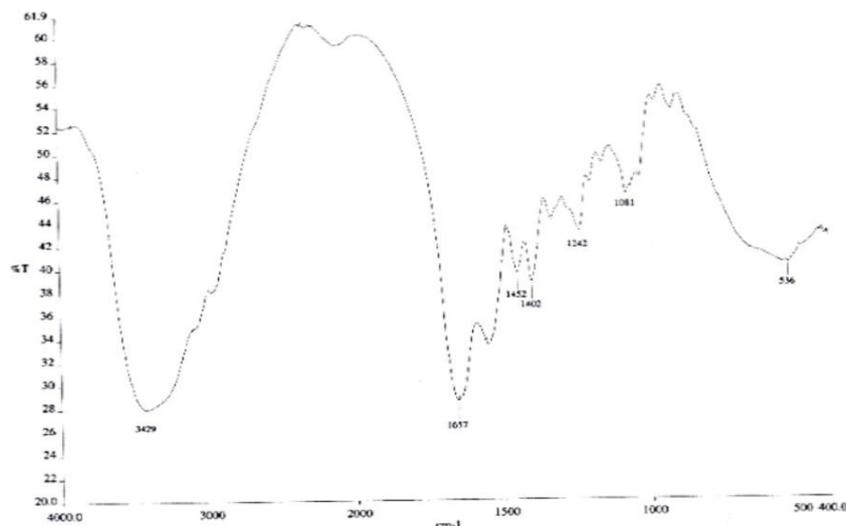
pada gugus NH yang berada dalam ikatan hidrogen [21]. Amida B kolagen bahan baku kulit ikan gabus memiliki panjang gelombang  $2922,16 \text{ cm}^{-1}$  yang menandakan adanya gugus  $\text{CH}_2$ . Sedangkan pita amida B dari kolagen hasil optimasi didapatkan pada  $2930,65 \text{ cm}^{-1}$ .

Perubahan kolagen menjadi gelatin ditandai dengan adanya perubahan pada daerah serapan Amida I dan III. Amida I ditunjukkan dengan bilangan gelombang  $1650 \text{ cm}^{-1}$  yang menandakan struktur karakteristik *α helix* yang merupakan ciri khas dari gelatin (22). Amida III memiliki bilangan gelombang yang lebih kecil dibandingkan dengan Amida III pada kolagen karena gelatin tidak menghasilkan *triple helix*, melainkan berubah menjadi *single helix*. Sehingga hal ini menyebabkan rendahnya puncak serapan Amida III pada gelatin (22). Gambar 3 menunjukkan spektrum FTIR dari gelatin sisik ikan kakatua yang memiliki komposisi asam amino sama dengan ikan gabus.

Pada amida I terjadinya peregangan dari gugus karbonil dimana kolagen bahan baku memiliki puncak serapan pada  $1635,64 \text{ cm}^{-1}$ , sedangkan pada kolagen hasil optimasi memiliki puncak serapan  $1636,74 \text{ cm}^{-1}$ . Amida I memiliki bilangan gelombang sekitar  $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$  yang merupakan ciri khas dari struktur sekunder protein dari analisis FTIR. Berdasarkan puncak serapan amida I yang diperoleh, kolagen bahan baku dan hasil optimasi kulit ikan gabus memiliki struktur karakteristik *β sheet* yang menandakan bahwa senyawa yang diujikan masih dalam bentuk kolagen dan belum terdenaturasi menjadi gelatin [14]. Kolagen terdenaturasi diakibatkan oleh proses pemanasan, sehingga struktur rantai *triple helix* berubah

**Tabel 5.** Karakteristik gugus fungsi kolagen bahan baku dan kolagen hasil optimasi kulit ikan gabus (*Channa striata*)

Jenis Amida	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )			Keterangan [21]
	Kolagen Bahan Baku	Kolagen Hasil Optimasi	Wilayah Serapan [21]	
Amida A	3304,06	3295,28	3350-3550	Peregangan NH
Amida B	2922,16	2930,65	2935-2915	Peregangan asimetris CH2
Amida I	1635,64	1636,74	1600-1700	Peregangan gugus karbonil (ikatan C=O)
Amida II	1541,12	1544,97	1480-1575	Pembengkakan NH
Amida III	1236,37	1239,67	1229-1301	Peregangan CN, Pembengkakan NH



**Gambar 3.** Spektrum FTIR gelatin sisik ikan kakatua [27]

menjadi rantai tunggal *α helix* [22].

Amida II pada kolagen bahan baku memiliki panjang gelombang yang berdekatan dengan kolagen hasil optimasi dengan puncak serapan  $1541,12\text{ cm}^{-1}$  dan  $1544,97\text{ cm}^{-1}$  secara berurutan. Hal ini menandakan adanya sedikit peregangan antara kolagen bahan baku dengan kolagen hasil optimasi.

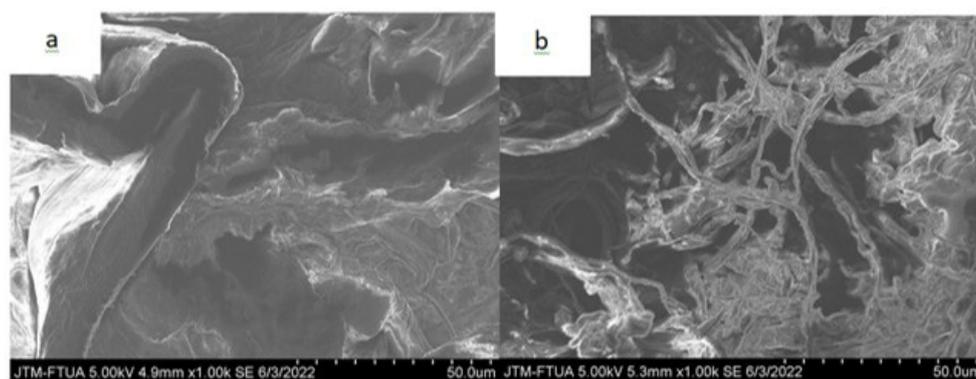
Gugus fungsi yang terakhir yaitu amida III dengan puncak serapan  $1236,37\text{ cm}^{-1}$  pada kolagen bahan baku dengan rasio IR 1,17 sedangkan kolagen hasil optimasi memiliki puncak serapan pada  $1239,67\text{ cm}^{-1}$  dengan rasio IR adalah 1,16. Struktur *triple helix* dapat dikonfirmasi dari nilai rasio serapan pada amida III dengan puncak serapan pada  $1450\text{ cm}^{-1}$  yang mendekati 14. Hal ini menandakan bahwa kolagen bahan baku dengan kolagen yang telah diberikan perlakuan dengan menggunakan metode *ball*

*milling*, masih memiliki stuktur *triple helix* sebagai ciri khas kolagen dan belum terdenaturasi menjadi gelatin.

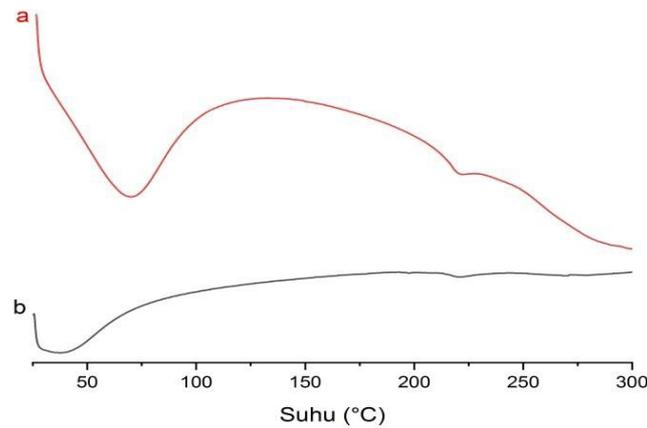
### Scanning Electron Microscopy (SEM)

Analisis dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) ditujukan untuk mengamati morfologi permukaan dari kolagen [17]. Kolagen bahan baku dan kolagen hasil optimasi diamati dengan perbesaran 1000 kali seperti yang terlihat pada Gambar 4.

Hasil analisis SEM pada kolagen bahan baku terlihat seperti batang berbentuk fibril yang saling bertumpang tindih, tebal dan tidak beraturan. Sedangkan untuk permukaan kolagen hasil optimasi tampak seperti serabut yang saling berhubungan dengan kumparan acak. Kumparan acak pada permukaan kolagen hasil optimasi menandakan sifat serat kolagen. Adanya perbedaan ketebalan dari fibril



**Gambar 4.** Morfologi SEM perbesaran 1000x a) Kolagen bahan baku; b) Kolagen hasil optimasi



**Gambar 5.** Overlay Termogram DSC a) Kolagen bahan baku; b) Kolagen hasil optimasi

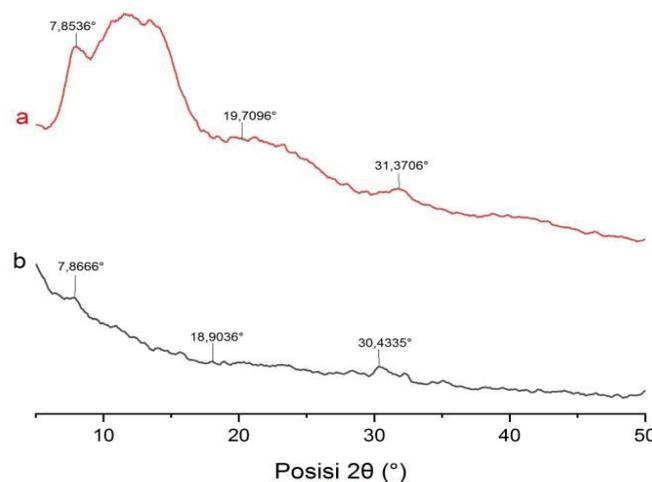
pada permukaan kolagen bahan baku dengan kolagen hasil optimasi dikarenakan adanya perlakuan pada saat optimasi pembentukan mikropartikel kolagen, sehingga permukaan dari kolagen yang dihasilkan tampak tidak terlalu tebal saat diamati dengan perbesaran yang sama. Selain itu, kolagen hasil optimasi memiliki ruang yang sedikit berpori yang lebih jelas dibandingkan dengan kolagen bahan baku yang disebabkan oleh adanya ruang antar serat pada kolagen.

**Differential Scanning Calorimetry (DSC)**

Termogram DSC kolagen bahan baku dan kolagen hasil optimasi menunjukkan dua puncak endotermik yang merupakan puncak transisi gelas dan puncak titik leleh

(Tmax). Pada [Gambar 5](#), tampak suhu transisi gelas dan titik leleh dari kolagen bahan baku pada suhu masing-masing 70,07 dan 222,16 °C dengan suhu awal dan akhir pelelehan yaitu 213,34 dan 225,79 °C. Sedangkan pada kolagen hasil optimasi, tampak suhu 37,58 °C untuk transisi gelas dan puncak titik leleh pada suhu 220,67 °C, dengan suhu awal dan akhir pelelehan yaitu 214,05 dan 227,99 °C. Puncak endotermik yang terdapat pada kolagen hasil optimasi tampak lebih rendah dibandingkan dengan kolagen bahan baku. Hal ini dapat disebabkan karena suhu dan perlakuan yang dilakukan pada kolagen.

Adanya penurunan suhu denaturasi pada transisi gelas menandakan adanya perubahan pada struktur *triple helix* pada kolagen. Sehingga semakin rendah suhu denaturasi



**Gambar 6.** Overlay Difraktogram sinar-X a) Kolagen bahan baku; b) Kolagen hasil optimasi

pada transisi gelas maka kolagen akan semakin tidak stabil karena suhu denaturasi menunjukkan perubahan fisikokimia pada struktur *triple helix* kolagen [17]. Suhu denaturasi dari kolagen berkaitan dengan kandungan asam amino dan dipengaruhi oleh lingkungan, suhu, habitat, umur ikan dan musim [18]. Semakin tinggi kandungan asam amino (terutama hidroksiprolin dan prolin) maka kolagen akan semakin stabil dengan suhu denaturasi yang tinggi. Hal ini dikarenakan asam amino hidroksiprolin dan prolin memiliki cincin pirolidin dan ikatan hidrogen yang menjaga kestabilan polipeptida [13]. Selain itu, suhu pelelehan yang tinggi membuat kolagen tahan terhadap panas [23]. Berdasarkan hasil yang diperoleh, kolagen hasil optimasi memiliki sifat yang tidak tahan terhadap panas karena memiliki penurunan pada titik leleh.

### X-Ray Diffraction (XRD)

Pengujian terhadap difraksi sinar X dapat memberikan informasi terkait struktur, ukuran butiran kristal, sifat fase kristal dan parameter kisinya. Difraktogram yang dihasilkan oleh difraksi sinar X dari kolagen bahan baku dan kolagen hasil optimasi dapat dilihat pada Gambar 6. Difraktogram yang didapatkan dari hasil pengujian menunjukkan intensitas puncak yang khas dari bahan yang digunakan. Puncak interferensi pada kolagen bahan baku memiliki sudut difraksi  $2\theta$  yang tampak pada  $7,8536^\circ$ ;  $19,7096^\circ$ ; dan  $31,3706^\circ$ , sedangkan pada kolagen hasil optimasi yaitu  $7,8666^\circ$ ;  $18,9036^\circ$ ; dan  $30,4335^\circ$ .

Berdasarkan hasil difraktogram sinar X yang diperoleh, dapat dilihat bahwa kolagen bahan baku dan kolagen hasil optimasi memiliki struktur berupa amorf, yang ditandai dengan puncak difraktogram yang luas pada  $16-25^\circ$ . Selain itu, kolagen memiliki puncak khas yang tajam pada sudut sekitar  $8^\circ$  yang menandakan jarak terpanjang antara rantai *triple helix* [27].

### Kesimpulan

Kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*) yang berbentuk serat dapat dibentuk menjadi mikropartikel kolagen dengan metode *ball milling* dengan pengecilan ukuran kolagen 327 kali dalam skala mikrometer.

Kolagen yang terbentuk setelah dilakukan pengecilan ukuran tidak menunjukkan perubahan struktur *triple helix*, yang menandakan bahwa kolagen tidak mengalami perubahan menjadi gelatin pada proses reduksi ukuran partikel.

## Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Fakultas Farmasi yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah Pengembangan Dosen Pemula tahun 2022 dengan nomor kontrak 19/UN16.10.D/PJ.01./2022.

## Referensi

- [1]. Vinay K. Sharma, Long Valley, N.J. Process of Preparing Microparticulate Collagen Collagen-Based Products Produced Thereby And method of Applying Same. United States Patent No US005356614A
- [2]. Setyowati, Hanny dan Wahyuning S. Potensi Nanokolagen Limbah Sisik Ikan Sebagai Cosmeceutical. J Farm Sains Dan Komunitas. 2015;12(1):30–40.
- [3]. Jafari H., Lista A., Siekapen, MN, Pejman GB., Nie L., Alimoradi H. and Shavandi A., A review : Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering, Polymers 2020, 12, 2230; doi:10.3390/polym12102230
- [4]. Martien R, Adhyatmika, Irianto IDK, Farida V, Sari DP. Perkembangan teknologi nanopartikel dalam sistem penghantaran obat. Maj Farm. 2012;8(1):133–44.
- [5]. Sud S, Kamath A. Methods of Size Reduction and Factors Affecting Size Reduction in Pharmaceuticals. Int Res J Pharm. 2013;4(8):57–64.
- [6]. Devatha CP, Thalla AK. Green Synthesis of Nanomaterials. Synthesis of Inorganic Nanomaterials. Elsevier Ltd.; 2018. 169–184 p.
- [7]. Piras CC, Fern S, Borggraeve WM De. Nanoscale Advances Ball milling : A Green Technology For The Preparation And Functionalisation of Nanocellulose Derivatives. 2019;937–47.
- [8]. Rasyidin, Rahmad., Ahmad Fadli., Silvia, R.R. Ball Milling Process Hydroxyapatite From Sea Shells by Synth Method with Low Temp Hydrothermal. 2018;5(2):1–6.
- [9]. Muryati M, Loekitowati Hariani P, Said M. Preparation and Characterization Nanoparticle Calcium Oxide from Snakehead Fish Bone using Ball Milling Method. Indones J Fundam Appl Chem. 2019;4(3):111–5.
- [10]. <http://repo.unand.ac.id/41721/1/IDP000068264> - RAHMI NOFITA. pdf, Proses Produksi Kolagen Dari Kulit Ikan Gabus (*Channa striata*) menggunakan kombinasi asam asetat dan getah pepaya segar tanpa sentrifugasi, paten IDP000073332
- [11]. BSN. Kolagen kasar dari sisik ikan – Syarat mutu dan pengolahan. Badan Standardisasi Nasional. 2014.
- [12]. Alhana A, Suptijah P, Tarman K. Extraction and Characterization of Collagen from Sea Cucumber Flesh. J Pengolah Has Perikan Indones. 2015;18(2):150–61.
- [13]. Safithri M, Tarman K, Suptijah P, Widowati N. Karakteristik Fisikokimia Kolagen Larut Asam dari Kulit Ikan Parang - parang (*Chirocentrus dorab*). J Pengolah Has Perikan Indones. 2019;22(3):441–52.
- [14]. Rosmawati. Potensi Kolagen Ikan Gabus (*Channa striata*) Sebagai Gelatin Alternatif dan Aplikasinya Dalam Pengolahan Sosis Berbasis Meat By-Product Sapi. [Disertasi]. Universitas Hasanuddin; 2018.
- [15]. Wulandari. Karakterisasi Fisikokimia Kolagen Yang Diisolasi Dengan Metode Hidro-Ekstraksi Dan Stabilisasi Nanokolagen Kulit Ikan Gabus (*Channa Striata*). Tesis. Institut Pertanian Bogor; 2016. Lo S, Fauzi MB. Current update of collagen nanomaterials—fabrication, characterisation and its applications: A review. Pharmaceutics. 2021;13(3):1–18.
- [16]. Lebon M, Reiche I, Gallet X, Bellot-Gurlet L, Zazzo A. Rapid Quantification of Bone Collagen Content by ATR-FTIR Spectroscopy. Radiocarbon. 2016;58(1):131–45.
- [17]. Zhang Y, Chen Z, Liu X, Shi J, Chen H, Gong Y. SEM, FTIR and DSC Investigation of Collagen Hydrolysate Treated Degraded Leather. J Cult Herit. 2021;48:205–10

- [18]. Cao J, Duan Q, Liu X, Shen X, Li C. Extraction and Physicochemical Characterization of Pepsin Soluble Collagens from Golden Pompano (*Trachinotus blochii*) Skin and Bone. *J Aquat Food Prod Technol*. 2019;1–11.
- [19]. Sari N. Eksraksi dan Karakterisasi Kolagen Tulang Ayam Broiler (*Gallus domesticus*) dengan Variasi Lama Perendaman Pelarut Asam Sitrat. [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim; 2020.
- [20]. Budiarti E, Budiarti P, Aristri MA, Batubara I. Kolagen dari Limbah Tulang Ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap Aktivitas Anti Aging secara In Vitro. *ALCHEMY J Penelit Kim*. 2019;15(1):44.
- [21]. Gomez-Guillen MC, Gimenez B, Lopez-Caballero ME, Montero MP. Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin from Alternative Sources: a Review. *Food Hydrocoll*. 2011;25(8):1813–27.
- [22]. Andakke JN, Rumengan IFM, Nainggolan HHH, Parapat LRME, Pandey E, Suptijah P, et al. Molecular Structure of Gelatin Extracted from Parrot (*Scarus sp*) Fish Scales. *J Pesisir Dan Laut Trop*. 2020;8(1):15.
- [23]. Wulandari W, Suptijah P. Effectiveness of Alkaline Pretreatment and Acetic Acid Hydrolysis on the Characteristics of Collagen from Fish Skin of Snakehead. *J Pengolah Hasil Perikan Indonesia*. 2015;18(3).
- [24]. Gadi DS, Trilaksani W, Nurhayati T. The Histological, Extraction and Characterization Collagens Yellow-Pike Conger *Muraenesox talabon*. *J Ilmu dan Teknol Kelaut Trop*. 2018;9(2):665–83.
- [25]. HUMA JFD. Isolasi dan Profil Protein Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa striata*) dengan Enzim Bromelain. [Skripsi]. Universitas Brawijaya; 2018.
- [26]. Ramli AR, Annisa AR, Bahmid NA, Mustafa MD. Isolation of papain-soluble collagen from the skin of snake-head fish (*Channa striata*). *Canrea J Food Technol Nutr Culin J*. 2020;3(2):87–93.
- [27]. Bak SY, Lee SW, Choi CH, Kim HW. Assessment of the Influence of Acetic Acid Residue on Type I Collagen during Isolation and Characterization. *Materials (Basel)*. 2018;10(12).



Copyright © 2023 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)