

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit Ikan Gabus

Ikan gabus (*Channa striata*) atau disebut juga dengan *Snakehead fish* adalah jenis ikan yang hidup di perairan tawar yang banyak ditemukan di Asia seperti Sri Lanka, Philipines, China, dan Indonesia. Adapun di Indonesia Ikan gabus dapat ditemukan pada hampir seluruh wilayah Indonesia, diantaranya seperti di wilayah Sumatera, Jawa, Bali, Sulawesi, Lombok, Singkep, Flores, Ambon, dan Maluku. Berdasarkan data dari *Food and Agriculture Organization* (FAO) menunjukkan bahwa produktivitas global ikan gabus meningkat setiap tahunnya dan mencapai 63.409 ton pada 2014 (FAO, 2017). Adapun di Asia ikan gabus banyak di manfaatkan sebagai makanan olahan dan juga dapat digunakan sebagai bahan pembuatan obat untuk penyembuhan luka karena tingginya kadar albumin (13,83-20,80%). (Asfar dkk., 2014).

Kadar protein ikan gabus mencapai 25,5%, lebih tinggi dibandingkan protein ikan bandeng (20,0%), ikan emas (16,05%), ikan kakap (20,0%), maupun ikan sarden (21,1%). Kadar albumin ikan gabus bisa mencapai 6,22% (Carvallo, 1998). Protein ikan gabus terdiri dari fibrilar dan protein gugus bola. Beberapa protein fibrilar yang membangun kulit ikan adalah kolagen, keratin, dan elastin sementara albumin dan globulin adalah protein gugus bola yang juga dapat ditemukan di kulit. Selain itu, menurut Dirjen Perikanan (1996) ikan gabus juga memiliki komposisi gizi lain yang dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut.

Tabel 2.1 Komposisi Kandungan Ikan Gabus

Komposisi	Jumlah (%)
Air	77,40
Protein	19,30
Lemak	1,30
Karbohidrat	1,00
Mineral	1,00

Sumber : *Dirjen Perikanan (1996)*

Pada kulit ikan terdapat dua lapisan utama yakni epidermis dan dermis, dimana kolagen terdapat pada lapisan dermis yang merupakan jaringan ikat. Pada kulit ikan gabus juga mengandung komposisi seperti 36,76% *moisture*, 19,26% protein, 4,21% lemak, dan 0,55% kadar abu, serta protein seperti *lisozim*, *protease*, *alkaline phosphate*, dan *erastase* yang memiliki sifat antimikroba (Loganathan dkk, 2013). Selain itu juga kulit ikan gabus juga mengandung kadar kolagen sebesar 16,57% (See dkk., 2010).

2.2 Kolagen

Kolagen ($C_{102}H_{149}N_{31}O_{38}$) merupakan komponen struktural utama dari jaringan ikat putih (*white connective tissue*) yang meliputi hampir 30% dari total protein pada jaringan dan organ tubuh vertebrata dan invertebrata. Pada ikan, kolagen terdapat di kulit, tendon, tulang rawan dan jaringan ikat. (Sumbono, 2011). Kandungan kolagen pada ikan sangat bervariasi dan tergantung pada spesiesnya. (Hema dkk., 2013). Kandungan kolagen pada kulit ikan gabus memiliki kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan lain, yaitu sekitar 16,57% (See 2010), sedangkan pada kulit ikan lain yang sering ditemukan pada bidang pangan seperti ikan lele 12,8% (Singh dkk., 2011), dan ikan tuna 13,97% (Hema dkk., 2013). Komposisi asam amino dari kolagen cenderung didominasi oleh glisin, prolin, hidroksiprolin dan alanin. Selain itu, komposisi asam amino dan karakteristik fisikokimia kolagen sangat bervariasi dan bergantung pada jaringan. Karakteristik dari kolagen diantaranya adalah memiliki daya tarik kuat, sifat antigenitas rendah, *bioresorbability*, kompatibilitas yang baik, mampu menginduksi proses koagulasi darah, memiliki efek terhadap penyembuhan luka, dan mudah dimurnikan (Aberoumand, 2011).

Unit struktural pembentuk kolagen adalah tropokolagen yang mempunyai struktur batang dengan BM 300.000 dengan didalamnya terdapat tiga rantai polipeptida yang sama panjang, bersama-sama membentuk struktur *triple heliks* dengan ikatan hidrogen antara gugus NH dari residu glisin pada rantai yang satu dengan gugus CO pada rantai lainnya. Cincin pirolidin, prolin, dan hidroksiprolin

membantu pembentukan rantai polipeptida dan memperkuat tripel helik. (Junianto dkk, 2006)

Ikatan hidrogen berpengaruh terhadap sifat fisik kulit segar yang menunjukkan bahwa degradasi molekul kolagen dapat terjadi karena pelepasan molekul air dari ikatannya (Domiszewski dkk, 2011). Kolagen murni sangat sensitif terhadap reaksi enzim dan kimia. Perlakuan alkali dan asam dapat menyebabkan kolagen mengembang yang sering dikonversikan menjadi gelatin, dalam proses konversi ada tiga tahapan, yaitu hidrolisis lateral, hidrolisis ikatan polipeptida terutama glisin, dan penghancuran struktur kolagen. (Nurmala dkk., 2006).

Sumber dan tipe pada kolagen berpengaruh terhadap sifat gelatin yang dihasilkan (Karim dan Bath, 2009). Berdasarkan hasil penelitian Zhou dan Regenstein dkk (2010) menyebutkan bahwa *pre-treatment* menggunakan larutan basa dan asam memberikan efek terhadap pelepasan protein non-kolagen dengan kehilangan sedikit kolagen, dari proses *pre-treatment* dengan kedua larutan tersebut menyebabkan terjadinya pembengkakan kulit ikan dan mengamankan rendemen gelatin dan kekuatan gel yang tinggi dengan menghancurkan ikatan silang kimia tertentu yang ada pada kolagen dengan merusak ikatan peptide.

Prinsip utama dalam transformasi kolagen menjadi gelatin adalah dengan cara mendenaturasi kolagen yang terlarut melalui proses pemanasan. Kolagen pada ikan sangat sensitif terhadap panas jika dibandingkan dengan kolagen yang berasal dari mamalia disebabkan oleh kadar hidrosiprolin yang rendah (4-10%) dan sangat mudah mengalami cross linking (Hema dkk., 2013). Oleh karena itu, denaturasi dapat dilakukan dengan cara memanaskan kolagen dalam kondisi netral atau sedikit asam pada suhu 40°C (Poppe, 1992). Kandungan tropokolagen pada ikan akan terdegradasi dengan pemanasan atau perlakuan dengan zat seperti asam, basa, urea, dan *potassium permanganate*. Selain itu, serabut kolagen dapat mengalami penyusutan jika dipanaskan di atas suhu penyusutannya (Ts). Suhu penyusutan (Ts) kolagen ikan adalah 45°C. Jika kolagen dipanaskan pada $T > T_s$ (misalnya 65 – 70 °C), serabut triple heliks yang dipecah menjadi lebih panjang. Penyusutan serabut triple heliks

hidroksil (OH), gugus karbonil (C=O), dan gugus amina (NH). Susunan asam amino gelatin hampir mirip dengan kolagen, dimana glisin sebagai asam amino utama dan 2/3 dari seluruh asam amino yang menyusunnya, 1/3 asam amino yang tersisa diisi oleh prolin dan hidroksprolin (Charley dkk, 1982). Rantai polimer pada senyawa gelatin merupakan perulangan dari asam amino glisinprolin-prolin atau glisin-prolin-hidroksprolin. Dalam gelatin tidak terdapat asam amino triptofan, sehingga gelatin tidak dapat digolongkan sebagai protein yang lengkap (Junianto dkk., 2006). Gelatin tersusun atas 18 asam amino yang saling terikat dan dihubungkan dengan ikatan peptida membentuk rantai polimer yang panjang (Amiruldin, 2007). Secara lengkap komposisi asam amino gelatin disajikan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Komposisi Asam Amino Gelatin

Asam Amino	Jumlah (%)	Asam Amino	Jumlah (%)
Alanin	11,0	Lisin	4,5
Arginin	8,8	Metionin	0,9
Asam Aspartat	6,7	Prolin	16,4
Asam Glutamat	11,4	Serin	4,2
Genilalanin	2,2	Sistin	0,07
Glisin	27,5	Theorin	2,2
Histidin	0,78	Tirosin	0,3
Hidroksprolin	14,1	Valin	2,6
Leusin dan iso Leusin	5,1	Phenilalanin	1,9

Sumber : *Eastoe dan Leach (1977)*

2.3.1 Sifat Fisika-Kimia Gelatin

Sifat fisik gelatin berbentuk padat, kering, tidak berasa, tidak berbau, transparan dan berwarna kuning redup sampai kuning sawo. Umumnya gelatin mempunyai BM 80.000 gr/mol. (Fatimah, 2008) Gelatin dapat mengembang dalam air dingin, dapat membentuk film, mempengaruhi viskositas suatu bahan, dan dapat melindungi sistem koloid. Massa jenis gelatin adalah 1,35 gr/cm. Gelatin memiliki sifat larut air, pada suhu 71 °C gelatin mudah larut dalam air dan membentuk gel pada suhu 49 °C. Gelatin juga mudah terdenaturasi pada suhu diatas 80 °C. (Nurmala dkk, 2006)

Sifat fungsional gelatin sangat penting dalam aplikasi suatu produk. Sifat fungsional gelatin merupakan sifat fisikokimia yang mempengaruhi perilaku gelatin dalam makanan selama proses, penyimpanan, penyiapan dan pengkonsumsian (Kinsella, 1981). Adapun sifat fungsional dapat berupa berikut : organoleptik meliputi warna, bau, viskositas, kekuatan gel, titik gel, titik leleh, dan pH (Azwar, dkk, 2008).

Berdasarkan sifat fungsionalnya, maka kualitas gelatin dapat diketahui faktor-faktornya dari sifat fisik dan kimianya. Adapun sifat fisik yang sangat mempengaruhi kualitas gelatin antara lain kekuatan gel, viskositas dan titik leleh. Sifat-sifat ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi larutan gelatin, waktu pemanasan gel, suhu pemanasan gel, pH dan kandungan garam (Norland Product, 2012). Selain itu faktor dalam proses ekstraksi gelatin sendiri, seperti keasaman larutan perendam, lama perendaman dan suhu ekstraksi diduga juga mempengaruhi sifat gelatin tersebut. Sedangkan sifat kimia dari gelatin dipengaruhi oleh komposisi asam amino, yang mirip dengan kolagen sehingga dipengaruhi oleh spesies dan jenis jaringan hewan sebagai bahan dasarnya. Perbedaan dalam distribusi berat molekul juga dipengaruhi sifat kimianya yang hasil dari variasi dalam sifat atau kondisi ekstraksi (Regenstein dkk, 2006). Sebelum diproses menjadi gelatin, kulit atau tulang harus diubah bentuk menjadi bentuk *ossein*. *Ossein* adalah kulit yang telah mengalami demineralisasi atau penghilangan kalsium fosfat agar terjadi pelunakan sehingga tulang maupun kulit lunak dan mudah untuk di proses lebih lanjut untuk menjadi gelatin.

Sifat secara umum dan kandungan unsur mineral dalam gelatin dapat digunakan untuk menilai mutu dan SNI (Standar Nasional Indonesia) gelatin ikan No 8622:2018, SNI Gelatin No. 3537:1995 dan GMIA (*Gelatin Manufactures Institute of America*) 2012, dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Sifat Fisika-Kimia Gelatin

Karakteristik	SNI No 8622:2018	SNI No. 3537:1995	GMIA 2012
Warna	-	Tidak Bewarna Sampai Kuning Pucat	-
Bau	-	Normal	-
Kadar Air (%)	Maks. 12	Maks. 16	Maks. 11,45
Kadar Abu (%)	Maks. 3	Maks. 3,25	0,3 – 2
Kadar Protein (%)	-	-	87,26
Kekuatan Gel (Bloom)	Min. 75	-	50 – 300
Viskositas (cPs)	Min. 12	-	Min. 6
pH	3,8 – 7,5	-	3,8 – 5,5

Sumber : SNI, 2018; SNI, 1995; GMIA, 2012

Sifat khas lainnya dari gelatin yang paling disukai oleh hampir seluruh industry makanan maupun farmasi yaitu *melting in the mouth* (meleleh dalam mulut), karena titik leleh gelatin antara 27-34°C, oleh sebab itu gelatin disebut *miracle food* (Poppe, 1992). Gelatin juga mempunyai sifat bioadesif yang cukup baik sehingga dapat digunakan dalam sistem penghantaran mukoadesif (Suryani dkk, 2009). Sistem penghantaran *mukoadesif* adalah suatu sistem penghantaran obat dimana obat bersama polimer bioadesif didesain untuk dapat berkontak lebih lama dengan membran mukosa dalam saluran pencernaan (Rachmawati dkk, 2013). Sistem penghantaran mukoadesif ini bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi obat di dalam saluran pencernaan sehingga memberikan keuntungan farmako kinetik dan farmako dinamik obat (Klausener dkk., 2003).

2.3.2 Kegunaan Gelatin

Gelatin secara luas banyak digunakan oleh industri pangan, antara lain berupa pembentuk busa (*whipping agent*), pengikat (*binder agent*), penstabil (*stabilizer*), pembentuk gel (*gelling agent*), perekat (*adhesive*), pengikat viskositas (*viscosity agent*), pengemulsi (*emulsifier*), dan pengental (*thickener*) (Poppe, 1992). Pada industri dibidang pangan gelatin banyak digunakan untuk untuk pembuatan susu, roti, es krim, yoghurt, keju dan kue. Selain itu juga dapat digunakan untuk pembuatan agar-agar, marshmallow, coklat, permen, dan sosis (Sahilah dkk., 2012). Sedangkan pada industri non-pangan secara luas banyak diaplikasikan pada bidang farmasi

seperti sebagai bahan ahan pembuat kapsul, pengikat tablet, dan mikroenkapsulasi. Pada bidang fotografi, menurut Ockerman dan Hansen (2000) gelatin berbahan dasar ikan dapat digunakan untuk memperpanjang daya simpan dalam menyimpan foto, yakni sebagai *fotoresist* yang dapat menghindari (*coating*) dari adanya cahaya yang sensitif. Selanjutnya dikatakan bahwa gelatin ikan lebih baik digunakan pada bidang fotografi karena mempunyai kekuatan gel yang tinggi dan sensitive terhadap cahaya pada aplikasi foto yang di-*coating* secara aktif, oleh karena itu dengan gelatin dari ikan mempunyai keuntungan langsung dapat digunakan tanpa perlakuan yang rumit pada aplikasinya, serta dapat digunakan pada *container* yang sama untuk beberapa hari pemakaian. Selain itu juga, gelatin berbahan dasar ikan dapat digunakan sebagai produk mikroenkapsulasi untuk pengemulsi vitamin A karena memiliki kandungan hidroksiprolin dengan kekuatan gel yang rendah. Adapun kegunaan gelatin lebih rinci berdasarkan aplikasi produknya yakni sebagai berikut : (Fatimah dkk, 2008)

- Produk pangan secara umum : Sebagai zat pengental, penggumpal, membuat produk menjadi elastis, pengemulsi, pembentuk busa, menghindari sineresis, pengikat air, memperbaiki konsistensi, pelapis tipis, pemer kaya gizi.
- Daging olahan : Untuk meningkatkan daya ikat air, konsistensi dan stabilitas produk, sosis, kornet, ham dll.
- Susu olahan : Untuk memperbaiki tesktur, konsistensi, dan stabilitas produk serta menghindari sineresis pada yoghurt, es krim, susu asam, keju cottage, dll.
- Minuman : Sebagai penjernih sari buah, bir, dan wine
- Farmasi : Pembungkus kapsul dan tablet obat
- Kosmetika (Khususnya : Digunakan untuk menstabilkan emulsi pada shampoo, penyegar dan pelindung kulit, sabun,

- produk-produk emulsi) lipstick, cat kuku, busa cukur, krim pelindung sinar matahari, dll.
- Film : Membuat film menjadi lebih sensitive
 - Bakery : Untuk menjaga kelembaban produk, sebagai perekat bahan pengisi pada roti.
 - Buah-buahan : Sebagai pelapis, untuk menjaga kesegaran dan keawetan buah, pengganti lilin pada pengawet buah
 - Bidang Kedokteran : Dapat digunakan untuk menghilangkan rasa nyeri pada lutut dan persendian serta digunakan untuk bahan-bahan pembedahan
 - Fotografi : Sebagai medium pengikat dan koloid pelindung untuk bahan pembentuk image.

2.4 Kasein Susu Sapi

Susu sapi merupakan sumber protein yang mengandung nilai biologis yang tinggi yang dicirikan dengan keseimbangan profil asam amino (Szajkowska et al. 2011). Protein dalam susu dapat dibagi dalam dua kategori yaitu protein tidak larut dari kelompok kasein dan protein terlarut (*protein whey*), yang dapat dijumpai dalam laktoserum. Kelompok kasein terdiri dari beberapa tipe yaitu: α S1-, α S2, β -, K- and γ -, sementara protein whey terdiri dari α -*laktalbumin* dan β -*laktoglobulin*. Susu juga mengandung protein minor yang penting seperti serum albumin, *immunoglobulins*, *laktoferrin*, *transferrin*, *calcium-binding protein*, *prolaktin*, *folate-binding protein* dan *protease-peptone*. Menurut Fitri (2015) kasein mengandung kadar protein pada susu sapi yakni sebesar 88,0% . Beberapa jenis protein susu dan konsentrasinya dalam susu seperti terlihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Jenis Protein Susu dan Perkiraan Konsentrasinya dalam Susu

Protein	Persentase dalam susu skim (%)
α -kasein	45-55
β -kasein	8-15
κ -kasein	25-35
γ -kasein	3-7
α -laktalbumin	2-5
β -laktoglobulin	7-12
Albumin	0,7-1,3
Laktoferrin	0,2-0,8
Immunoglobulin	-
IgG1	1-2
IgG2	0,2-0,5
IgM	0,1-0,2
IgA	0,05-0,1
Protease-pept	2,6

Sumber: *Bremel course note, University of Wisconsin (2013)*

Casein merupakan *phosphoprotein*. Casein tidak larut pada titik isoelektriknya, pH 4,6 tapi setelah pH susu mendekati 7,0, casein ada sebagai garam, *Calcium Caseinate*. Casein bukan protein tunggal tapi dalam bentuk grup, yang terdiri atas 3 atau lebih protein. Protein ini dinamakan α -*casein*, β -*casein* dan δ -*casein*. (Kleiner dan Orten, 1962). α -*casein* dan β -*casein* terbentuk di dalam kelenjar susu atau ambing sedang δ -*casein* mula-mula ditemukan di dalam aliran darah kemudian masuk ambing lalu bergabung dengan kompleks α -*casein* dan dikenal sebagai κ -*casein* (Lampert, 1975)

Dalam susu, casein banyak terdapat dalam bentuk *casein micelle* atau kumpulan casein. *Casein micelle* memiliki peran yang sangat penting dalam karakteristik susu, terutama sifat koloidal susu. Pada susu segar yang tidak didinginkan, casein akan nampak sebagai partikel bulat dengan ukuran diameter hingga 300 nm. Dengan mikroskop elektron, partikel-partikel casein dalam susu segar nampak sebagai bulatan-bulatan yang terpusat dengan garis tengah sekitar 10 – 200 milimikron. Casein bersifat hibrofobik dan memiliki banyak muatan, struktur primernya terdiri dari rantai polipeptida dari asam-asam amino yang disatukan ikatan-ikatan peptida (*peptida linkages*). Casein tidak mudah mengalami denaturasi, namun pemanasan mendekati 120°C akan mendorong perubahan kimiawi casein, sehingga

casein memiliki sifat insoluble. Protein juga memiliki pH isoelektrik tertentu. pH isoelektrik merupakan suatu nilai pH dimana jumlah muatan listrik positif sama dengan muatan negatifnya. Pada pH tersebut, protein tidak bermuatan positif maupun negatif, sehingga dapat membentuk agregat (gumpalan-gumpalan yang keruh) dan mengendap, karena sebagian protein menunjukkan kelarutan yang minimal pada pH isoelektriknya. Sifat inilah yang akan digunakan untuk memisahkan atau mengisolasi *casein* dari susu. Kandungan *casein* pada susu akan mengalami presipitasi (pengendapan) pada pH 4,6 atau bila ada penambahan mineral kalsium (Walstra dkk, 2006).

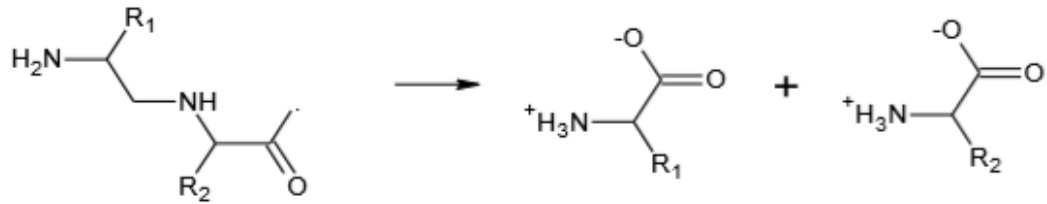
Adapun cara lain partikel *casein* dalam susu dapat dipisahkan dengan sentrifugal dengan kecepatan tinggi atau dengan penambahan asam. Pengasaman susu oleh kegiatan bakteri yaitu juga menyebabkan mengendapnya *casein*. Bila terdapat cukup asam yang dapat mengubah pH susu menjadi kira-kira 5,2 – 5,3 akan terjadi pengendapan disertai dengan melarutnya garam-garam kalsium dan fosfor yang semula terikat pada protein secara berangsur-angsur. Sesudah pengendapan, kasein dapat dilarutkan kembali dengan menambah alkali sampai pH 8,5 (Sukaryawan, 2011)

Casein asam (*acid casein*) sangat ideal digunakan untuk kepentingan medis, nutrisi, dan produk-produk farmasi. Selain sebagai makanan, acid casein digunakan pula dalam industri pelapisan kertas (*paper coating*), cat, pabrik tekstil, perekat, dan kosmetik. Pemanasan, pemberian enzim proteolitik (*rennin*), dan pengasaman dapat memisahkan casein dengan *whey* protein. Selain itu, sentrifugasi pada susu dapat pula digunakan untuk memisahkan casein (Susilo dkk, 2013).

Dalam isolasi, casein larut dalam air, alkohol dan eter namun tidak larut dalam etanol, senyawa alkali dan beberapa larutan asam. Setelah kasein dikeluarkan, maka protein lain yang tersisa dalam susu disebut *whey* protein. Protein serum terdiri dari β -laktoglobulin 50%, α -laktalbumin 20%, albumin, immunoglobulin, laktoferin, transferin dan sebagian kecil protein dan enzim. *Whey* tidak mengandung fosfor tapi mengandung asam amino sulfur yang membentuk ikatan disulfide. Jika ikatan rusak maka protein mengalami denaturasi (Arbianto, 1993).

Berikut proses gambaran hidrolisis isolasi *casein* dari susu secara garis besar :

- Hidrolisis Protein

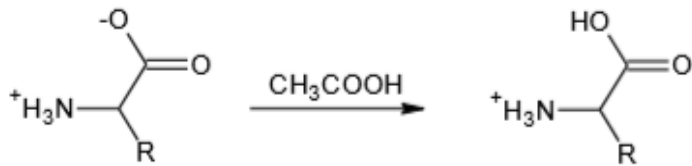


Protein

Asam Amino

Asam Amino

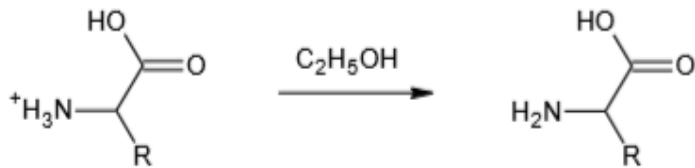
- Dalam suasana asam



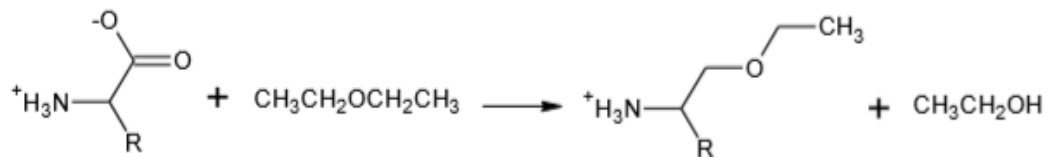
Asam Amino

Asam Amino dalam Asam

- Penambahan etanol 95%



- Penambahan Eter



Asam Amino

Dietil Eter

Sumber: *Nursa'id Fitria, 2012*

Gambar 2.2 Reaksi Hidrolisis Kasein dari Susu

2.5 Ekstraksi Gelatin

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (solven) sebagai separating agent. Pada proses ekstraksi gelatin, bahan baku yang digunakan sebagai solute dan solven masing-masing adalah padat dan cair. Berdasarkan bahan baku tersebut menunjukkan proses ekstraksi dengan prinsip *leaching* dimana terjadi pemisahan solute yang berada dalam solid pembawanya menggunakan pelarut cair yang disesuaikan dengan sifat padatan tersebut. Berdasarkan metodenya, ekstraksi dibagi menjadi beberapa macam menurut Dirjen POM (1986):

2.5.1 Ekstraksi secara Sokletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Pelarut dipanaskan sampai mendidih. Uap pelarut akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan pelarut lalu turun untuk mengekstrak zat aktif dalam bahan. Selanjutnya bila pelarut mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi ekstraksi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam bahan tersaring seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

2.5.2 Ekstraksi secara Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip ekstraksi dengan perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori, cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif dalam sel-sel simplisia yang dilalui sampel dalam keadaan jenuh. Gerakan ke bawah disebabkan oleh kekuatan gaya beratnya sendiri dan tekanan penyari dari cairan di atasnya, dikurangi dengan daya kapiler yang cenderung untuk menahan gerakan ke bawah (Dirjen POM, 1986). Perkolasi dilakukan dengan cara dibasahkan 10 bagian bahan dengan derajat halus yang cocok, dan menggunakan 2,5 bagian sampai 5 bagian pelarut yang dimasukkan dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam.

2.5.3 Metode Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya (Ditjen POM, 1986). Metode ini digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang seperti benzoin, stiraks dan lilin. Penggunaan metode ini misalnya pada sampel yang berupa daun, contohnya pada penggunaan pelarut eter atau aseton untuk melarutkan lemak/lipid (Ditjen POM, 1986).

Maserasi umumnya dilakukan dengan cara: memasukkan simplisia yang sudah diserbukkan dengan derajat halus tertentu sebanyak 10 bagian dalam bejana maserasi yang dilengkapi pengaduk mekanik, kemudian ditambahkan 75 bagian cairan penyari ditutup dan dibiarkan selama 5 hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari, cairan penyari disaring ke dalam wadah penampung, kemudian ampasnya diperas dan ditambah cairan penyari lagi secukupnya dan diaduk kemudian disaring lagi sehingga diperoleh sari 100 bagian. Sari yang diperoleh ditutup dan disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama 2 hari, endapan yang terbentuk dipisahkan dan filtratnya dipekatkan (Ditjen POM, 1986).

2.5.4 Metode Refluks

Metode refluks adalah termasuk metode berkesinambungan dimana cairan penyari secara kontinyu menyari komponen kimia dalam simplisia cairan penyari dipanaskan sehingga menguap dan uap tersebut dikondensasikan oleh pendingin balik, sehingga mengalami kondensasi menjadi molekul-molekul cairan dan jatuh kembali ke labu alas bulat sambil menyari simplisia. Proses ini berlangsung secara berkesinambungan dan biasanya dilakukan 3 kali dalam waktu 4 jam. Simplisia yang biasa diekstraksi adalah simplisia yang mempunyai komponen kimia yang tahan terhadap pemanasan dan mempunyai tekstur yang keras seperti akar, batang, buah, biji dan herba (Ditjen POM, 1986).

2.6 Pelarut Gelatin – Casein

Pelarut dalam proses ekstraksi sangat berperan penting sebagai pengikat kandungan dalam solid atau liquid yang akan diekstraksi. Menurut GMIA (2012), gelatin dapat larut dalam larutan encer seperti dari alkohol polihidrat dan juga larutan sangat polar yang memiliki ikatan hidrogen dan merupakan pelarut organik dimana gelatin akan larut dalam asam asetat, trifluoroetanol, dan formamida. Namun sebaliknya, gelatin tidak dapat larut dalam pelarut organik yang kurang polar seperti benzena, aseton, alkohol primer dan dimetilformamida.

Pada pembuatan gelatin beberapa proses seperti pemanasan dapat membuat kandungan protein pada gelatin yang digunakan. Selain itu juga kandungan protein pada gelatin khususnya yang berbahan dasar kulit ikan memiliki kandungan protein yang lebih rendah daripada bagian tulang. Sehingga penambahan protein casein dapat dijadikan sarana peningkatan kadar protein pada gelatin. Pada susu murni, protein casein mendominasi hingga mencapai 70% dan sisanya merupakan lemak. Untuk mendapatkan casein maka diperlukannya pelarut. Menurut hasil Analisa Hakim (2015) menunjukkan bahwa protein stabil pada kebanyakan pelarut polar seperti etanol dan bahkan lebih stabil dalam ruang hampa, tetapi tidak stabil dalam pelarut non-polar seperti sikloheksana. Namun dalam studi kelarutan menunjukkan bahwa kelarutan protein akan sangat rendah dalam pelarut polar seperti etanol dan bahwa protein pada dasarnya tidak larut dalam pelarut non-polar seperti sikloheksana.

2.6.1 Asam Asetat (CH_3COOH)

Asam asetat merupakan asam lemah dan yang termasuk kedalam golongan asam karboksilat berwujud liquid serta memiliki bau khas yang tajam. Berdasarkan golongannya asam asetat merupakan pelarut polar atau hidrofilik yang mirip seperti air dan etanol. Menurut Hart (1983).

Asam karboksilat seperti asam asetat dapat membentuk ikatan hidrogen dengan sesamanya atau dengan molekul 5 lain, sehingga asam asetat memiliki titik didih untuk bobot molekulnya dan dapat mengurai di dalam air serta menghasilkan anion karboksilat dan ion hironium. Pada asam asetat atom hidrogen (H) pada gugus

karboksil ($-\text{COOH}$) dalam asam karboksilat dapat dilepaskan sebagai ion H^+ (proton), sehingga memberikan sifat asam (Hart, 1983).

2.6.2 Natrium Klorida (NaCl)

Natrium klorida merupakan senyawa kimia ionic yang mewakili perbandingan 1:1 ion natrium dan klorida. Natrium klorida memiliki sifat fisik yakni tidak berbau, berwujud padatan, tidak berbau, serta dapat larut dalam gliserol, etilen glikol, dan asam formiat, namun tidak larut dalam HCl . Pada umumnya natrium klorida digunakan sebagai sebagai bahan pengering yang murah dan aman karena memiliki sifat higroskopis, membuat penggaraman menjadi salah satu metoda yang efektif untuk pengawetan makanan. Selain digunakan dalam memasak, natrium klorida juga digunakan dalam banyak aplikasi, seperti pada pembuatan pulp dan kertas, untuk mengatur kadar warna pada tekstil dan kain, dan untuk menghasilkan sabun, deterjen dan produk lainnya. Natrium klorida juga biasa digunakan sebagai penyerap debu yang aman dan murah dikarenakan sifatnya yang higroskopis, juga pada pembuatan garam sebagai salah satu metode pengawetan yang efektif dikarenakan sifatnya yang menarik air keluar dari bakteri melalui tekanan osmotik sehingga mencegah baktei tersebut bereproduksi dan membuat makanan basi (Aquilina, 2009). Selain itu juga Natrium klorida dalam pembuatan gelatin memiliki fungsi sebagai bahan tambahan dalam proses pencampuran gelatin dan casein sehingga menjadi produk berupa gel gelatin.

2.7 Uji Organoleptik

Uji organoleptik adalah cara mengukur, menilai atau menguji mutu komoditas dengan menggunakan kepekaan alat indra manusia, yaitu mata, hidung, mulut, dan ujung jari tangan. Uji organoleptik juga disebut pengukuran subjektif karena didasarkan pada respon subjektif manusia sebagai alat ukur (Soekarto, 1985). Dalam penilaian bahan pangan, faktor yang menentukan diterima atau tidak suatu produk adalah sifat indrawinya baik dari segi warna, bau, rasa, bentuk maupun penampilan.

2.8 Analisa Kimia

2.8.1 Kadar Air

Air merupakan salah satu unsur yang penting didalam makanan. Kadar air merupakan komponen yang sangat penting dalam bahan pangan karena dapat mempengaruhi penampakan, tekstur, dan cita rasa. Semakin tinggi kadar air dalam bahan pangan maka tekstur bahan semakin lembab, dan juga sebaliknya jika kadar air dalam bahan pangan sedikit, maka bahan pangan akan semakin keras (Winarno, 2004). Kadar air pada bahan pangan akan berpengaruh terhadap daya simpan, karena erat kaitannya dengan aktivitas metabolisme yang terjadi selama bahan pangan tersebut disimpan seperti aktivitas enzim, aktivitas mikroba dan aktivitas kimiawi, yaitu terjadinya ketengikan dan reaksi-reaksi non enzimatik sehingga menimbulkan perubahan sifat-sifat organoleptik dan nilai mutunya (Ulfah, 2011).

2.8.2 Kadar Abu

Abu adalah zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan organik. Kadar abu merupakan campuran dari komponen anorganik atau mineral yang terdapat pada suatu bahan pangan. Bahan pangan terdiri dari 96% bahan anorganik dan air, sedangkan sisanya merupakan unsur-unsur mineral. Kadar abu tersebut dapat menunjukkan total mineral dalam suatu bahan pangan. Bahan-bahan organik dalam proses pembakaran akan terbakar tetapi komponen anorganiknya tidak, karena itulah disebut sebagai kadar abu. Produk perikanan memiliki kadar abu yang berbeda-beda (Winarno, 1992). Apabila dalam suatu bahan pangan memiliki total mineral yang tinggi maka kualitas bahan pangan tersebut tidak baik, dan sebaliknya apabila memiliki nilai kadar abu yang sedikit maka bahan pangan tersebut aman untuk digunakan. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka nilai kadar abu akan semakin kecil, karena konsentrasi tersebut berpengaruh terhadap kadar abu.

2.8.3 Tingkat Keasaman (pH)

pH adalah derajat keasaman yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu bahan. Ia didefinisikan sebagai kologaritma aktivitas ion hidrogen (H^+) yang terlarut. Nilai pH berkisar dari 0 sampai

dengan 14. Suatu larutan netral apabila memiliki nilai pH 7. Nilai pH lebih dari 7 menunjukkan derajat kebasaan dan nilai dibawah 7 menunjukkan derajat keasaman (Thridhar, 2016).

2.9 Analisa Fisik

2.9.1 Kekuatan Gel

Kekuatan gel dapat dilihat dari besarnya kekuatan yang diperlukan oleh probe untuk menekan gel sedalam 4mm sampai gel tersebut pecah. Satuan untuk menunjukkan kekuatan gel yang dihasilkan dari konsentrasi tertentu disebut Gram Bloom (Hermanianto dkk, 2000). Kekuatan gel sendiri merupakan sifat fisik gelatin yang utama, karena kekuatan gel menunjukkan kemampuan gelatin dalam pembentukan gel (Rusli, 2004). Astawan (2003) menyatakan bahwa pembentukan gel terjadi karena pengembangan molekul gelatin pada waktu pemanasan. Panas akan membuka ikatan-ikatan pada molekul gelatin dan cairan yang semula bebas mengalir menjadi terperangkap di dalam struktur tersebut, sehingga menjadi kental. Setelah semua cairan terperangkap menjadi larutan kental, larutan tersebut akan menjadi gel secara sempurna jika disimpan pada suhu dingin. Kekuatan gel juga sangat berhubungan dengan pengaplikasian produk.

2.9.2 Viskositas

Viskositas merupakan ukuran kekentalan yang menyatakan besar kecilnya gesekan dalam fluida. Semakin besar viskositas fluida, semakin sulit suatu benda bergerak dalam fluida tersebut. Viskositas suatu bahan berhubungan dengan bobot molekul (BM) rata-rata dan distribusi molekul bahan, sedangkan bobot molekul gelatin berhubungan langsung dengan panjang rantai asam aminonya. Semakin tinggi konsentrasi larutan yang dipakai dalam rangkaian proses, semakin kuat penetrasi larutan tersebut dalam memecah ikatan sekunder protein sehingga terjadi hidrolisis yang menghasilkan rantai lebih pendek dan BM rata-rata yang lebih kecil sehingga menghasilkan viskositas yang lebih kecil (Tabarestani, 2010).

2.9.3 Kadar Protein

Protein adalah polipeptida yang memiliki berat molekul lebih dari 5.000 makromolekul ini berbeda beda sifat fisiknya mulai dari enzim yang larut dalam air sampai keratin yang tak larut (Sudarmadji, 1995). Menurut Sudarmadji (1995) kadar protein yang dianalisa dengan cara Kjeldahl disebut sebagai kadar protein kasar dengan menentukan jumlah nitrogen yang dikandung oleh suatu bahan. Dasar perhitungan penentuan protein menurut Kjeldahl menyatakan bahwa umumnya protein alamiah mengandung unsur N rata-rata 16% (dalam protein murni). Faktor perkalian yang telah diketahui adalah 5,5 untuk gelatin (kolagen terlarut). Kadar protein dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. 21 Destruksi merupakan proses pemanasan gelatin dengan asam sulfat pekat ditambah katalis yang berguna untuk mempercepat reaksi. Senyawa karbon dan hidrogen yang terdapat dalam rantai polipeptida teroksidasi menjadi CO, CO₂ dan H₂O, sedangkan senyawa nitrogennya akan berubah menjadi (NH₄)₂SO₄. Destilasi merupakan proses dimana (NH₄)₂SO₄ dipecah menjadi ammonia (NH₃) dengan penambahan NaOH 33% dan dipanaskan. Ammonia yang dibebaskan selanjutnya ditangkap oleh H₃BO₃ 0.02 N dan dengan penambahan indikator mengsel, larutan yang diperoleh berwarna keunguan. Larutan tersebut dititrasi dengan H₂SO₄ 0.02 N dimana NaOH bereaksi dengan H₃BO₃ bebas (tidak berikatan dengan ammonium). Titrasi dihentikan ketika indikator berwarna kehijauan.

2.9.4 Rendemen

Rendemen merupakan salah satu parameter dalam pembuatan kolagen. Efisien dan efektifnya proses ekstraksi bahan baku yang dapat dilihat dari nilai rendemen yang dihasilkan. Rendemen diperoleh dengan perbandingan antara berat produk yang dihasilkan dengan berat bahan baku. Semakin besar rendemen yang dihasilkan, maka semakin efisien perlakuan yang diterapkan dengan tidak mengesampingkan sifat sifat lainnya (Fahrul, 2004).