

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
DAFTAR PUBLIKASI.....	iv
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI .....	v
PRAKATA.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN .....	xvi
ABSTRAK.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	9
1.3 Manfaat Penelitian .....	9
1.4 Tujuan Penelitian .....	10
1.5 Kebaruan Penelitian .....	10
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	13
2.1 Sisik Ikan .....	13
2.2 Kolagen.....	14
2.3 Isolasi Kolagen.....	20
2.3.1 Preparasi Sampel.....	21
2.3.2 Ekstraksi Kolagen .....	22
2.3.3 <i>Recovery</i> Kolagen .....	25
2.4 Penghambatan <i>Angiotensin I-Converting Enzyme</i> (ACE) .....	26

2.4.1	Peranan ACE terhadap hipertensi .....	26
2.4.2	Peptida bioaktif dari hidrolisat kolagen sebagai antihipertensi .....	30
2.4.3	Mekanisme peptida sebagai inhibitor ACE .....	31
2.5	Hidrolisat Kolagen .....	33
2.5.1	Pembuatan hidrolisat kolagen .....	34
2.5.2	Pemilihan enzim untuk hidrolisis enzimatis .....	36
2.5.3	Simulasi digesti gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	41
2.6	Landasan Teori.....	42
2.7	Hipotesis .....	46
III.	METODE PENELITIAN.....	47
3.1	Bahan Penelitian .....	47
3.2	Peralatan Penelitian.....	47
3.3	Lokasi Penelitian.....	48
3.4	Tahapan Penelitian.....	48
3.4.1	Tahap 1: Ekstraksi kolagen dari sisik haruan segar dan kering .....	50
3.4.2	Tahap 2: Hidrolisis kolagen sisik haruan dengan pepsin atau tripsin .....	53
3.4.3	Tahap 3: Hidrolisis kolagen sisik haruan dengan kombinasi dua enzim yaitu pepsin dan tripsin.....	55
3.5	Metode Analisis .....	57
3.5.1	Rendemen.....	57
3.5.2	Proksimat .....	57
3.5.3	Komposisi asam amino .....	58
3.5.4	Kadar hidroksiprolin .....	58
3.5.5	<i>Protein pattern</i> dengan SDS-PAGE.....	58
3.5.6	<i>Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)</i> .....	61
3.5.7	Kelarutan kolagen .....	61
3.5.8	Derajat hidrolisis (DH).....	62
3.5.9	Pengujian aktivitas inhibitor ACE .....	63
3.5.10	Pengujian stabilitas inhibitor ACE dengan simulasi digesti gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	64
3.6	Analisis Statistik .....	65
3.7	Matriks Hubungan Rumusan Masalah, Tujuan, Hipotesis, dan Metode Penelitian .....	66
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	68
4.1	Tahap pertama: Ekstraksi kolagen dari sisik haruan segar dan kering .....	68

4.1.1	Rendemen.....	68
4.1.2	Proksimat sisik dan kolagen.....	70
4.1.3	Komposisi asam amino kolagen sisik haruan .....	72
4.1.4	<i>Protein pattern</i> kolagen sisik haruan dengan SDS-PAGE.....	74
4.1.5	Gugus fungsi kolagen sisik haruan dengan FTIR .....	76
4.1.6	Kelarutan kolagen sisik haruan pada berbagai pH dan konsentrasi NaCl. ....	80
4.2	Tahap kedua: Hidrolisis kolagen sisik haruan dengan pepsin dan tripsin. ....	84
4.2.1	Derajat hidrolisis (DH) hidrolisat kolagen.....	85
4.2.2	<i>Protein pattern</i> dengan SDS-PAGE.....	86
4.2.3	Aktivitas inhibitor ACE hidrolisat kolagen sisik haruan dan nilai IC <sub>50</sub> .....	89
4.3	Tahap ketiga: Hidrolisis kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin.....	95
4.3.1	Derajat hidrolisis (DH).....	95
4.3.2	<i>Protein pattern</i> hidrolisat kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin .....	97
4.3.3	Komposisi asam amino hidrolisat kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin .....	98
4.3.4	Aktivitas inhibitor ACE hidrolisat kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin dan IC <sub>50</sub> .....	100
4.3.5	Stabilitas inhibitor ACE hidrolisat kolagen sisik haruan <i>in vitro</i> .....	104
4.4	Pembahasan Umum .....	105
V.	KESIMPULAN.....	116
5.1	Kesimpulan.....	116
5.2	Saran.....	117
	DAFTAR PUSTAKA .....	118
	LAMPIRAN.....	135
	RINGKASAN .....	175
	SUMMARY .....	183

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Kesamaan dan kebaruan penelitian dibandingkan penelitian lain yang pernah dilakukan. ....	11
Tabel 2.1 Tipe dan distribusi kolagen .....	16
Tabel 2.2. Komposisi asam amino kolagen dari berbagai sisik ikan (residu/1000 residu asam amino) .....	19
Tabel 2.3. Rendemen kolagen dari berbagai sisik ikan dengan metode ekstraksi asam ( <i>acid soluble collagen/ASC</i> ) dan ekstraksi pepsin ( <i>pepsin soluble collagen/PSC</i> ).....	25
Tabel 2.4 Pembuatan hidrolisat protein sebagai inhibitor ACE dari ikan dan hasil sampingnya. ....	37
Tabel 3.1. Formulasi <i>resolving gel</i> dan <i>stacking gel</i> .....	59
Tabel 3.2. Matriks hubungan antara rumusan masalah, tujuan, hipotesis, dan metode penelitian.....	66
Tabel 4.1. Rendemen kolagen sisik haruan .....	68
Tabel 4.2. Proksimat sisik dan kolagen sisik haruan.....	71
Tabel 4.3. Komposisi asam amino kolagen sisik haruan .....	73
Tabel 4.4. Wilayah serapan FTIR kolagen.....	78
Tabel 4.5. Persentase relatif aktivitas inhibitor ACE hidrolisat kolagen sisik haruan terhadap captopril.....	94
Tabel 4.6. Komposisi asam amino hidrolisat kolagen sisik haruan .....	99
Tabel 4.7. Persentase relatif aktivitas inhibitor ACE hidrolisat kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin terhadap captopril.....	103

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur <i>triple helix</i> kolagen. a) struktur kristal <i>triple helix</i> kolagen, b) ikatan hidrogen pada molekul kolagen.....	15
Gambar 2.2.	Peranan ACE dalam pengaturan tekanan darah (Arihara, 2006).....	28
Gambar 2.3	Model pengikatan antara peptida bioaktif dan ACE (Wilson <i>et al.</i> , 2011).....	31
Gambar 2.4.	Pembuatan hidrolisat kolagen secara enzimatis (Kristinsson dan Rasco, 2000). ....	35
Gambar 3.1.	Tahapan penelitian.....	49
Gambar 3.2.	Ekstraksi kolagen sisik haruan .....	51
Gambar 3.3.	Hidrolisis kolagen sisik haruan dengan pepsin atau tripsin. ....	54
Gambar 3.4.	Hidrolisis kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin dan tripsin.....	56
Gambar 4.1.	SDS-PAGE kolagen sisik haruan. M, <i>marker</i> ; ASC-SS, <i>acid soluble collagen</i> dari sisik haruan segar; PSC-SS, <i>pepsin soluble collagen</i> dari sisik haruan segar; ASC-SK, <i>acid soluble collagen</i> dari sisik haruan kering; PSC-SK, <i>pepsin soluble collagen</i> dari sisik haruan kering.....	75
Gambar 4.2.	Spektra FTIR kolagen sisik haruan. A: ASC-SS; B: PSC-SS; C: ASC-SK; D: PSC-SK. ....	77
Gambar 4.3.	Kelarutan kolagen sisik haruan pada berbagai pH. A: kolagen sisik haruan segar; B: kolagen sisik haruan kering. <i>Error bars</i> menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan.....	81
Gambar 4.4.	Kelarutan kolagen sisik haruan pada berbagai konsentrasi NaCl. A: kolagen sisik haruan segar; B: kolagen sisik haruan kering. <i>Error bars</i> menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan. ....	82
Gambar 4.5.	Derajat hidrolisis hidrolisat kolagen dari sisik haruan. <i>Error bars</i> menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan dan notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan $p < 0,05$ .....	86

- Gambar 4.6. SDS-PAGE hidrolisat kolagen larut asam (ASC) dari sisik haruan. M, *marker*; AP<sub>2</sub>, hidrolisat ASC dengan pepsin jam ke-2; AP<sub>6</sub>, hidrolisat ASC dengan pepsin jam ke-6; AP<sub>12</sub>, hidrolisat ASC dengan pepsin jam ke-12; AP<sub>24</sub>, hidrolisat ASC dengan pepsin jam ke-24; AT<sub>2</sub>, hidrolisat ASC dengan tripsin jam ke-2; AT<sub>6</sub>, hidrolisat ASC dengan tripsin jam ke-6; AT<sub>12</sub>, hidrolisat ASC dengan tripsin jam ke-12; AT<sub>24</sub>, hidrolisat ASC dengan tripsin jam ke-24. .... 87
- Gambar 4.7. SDS-PAGE hidrolisat kolagen larut pepsin (PSC) dari sisik haruan. M, *marker*; PP<sub>2</sub>, hidrolisat PSC dengan pepsin jam ke-2; PP<sub>6</sub>, hidrolisat PSC dengan pepsin jam ke-6; PP<sub>12</sub>, hidrolisat PSC dengan pepsin jam ke-12; PP<sub>24</sub>, hidrolisat PSC dengan pepsin jam ke-24; PT<sub>2</sub>, hidrolisat PSC dengan tripsin jam ke-2; PT<sub>6</sub>, hidrolisat PSC dengan tripsin jam ke-6; PT<sub>12</sub>, hidrolisat PSC dengan tripsin jam ke-12; PT<sub>24</sub>, hidrolisat PSC dengan tripsin jam ke-24. .... 88
- Gambar 4.8. Aktivitas inhibitor ACE dan IC<sub>50</sub> hidrolisat kolagen larut asam dari sisik haruan. A: aktivitas inhibitor ACE ASC-P; B: IC<sub>50</sub> ASC-P; C: aktivitas inhibitor ACE ASC-T; D: IC<sub>50</sub> ASC-T. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan dan notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan  $p < 0,05$ . .... 90
- Gambar 4.9. Aktivitas inhibitor ACE dan IC<sub>50</sub> hidrolisat kolagen larut pepsin dari sisik haruan. Keterangan: A: aktivitas inhibitor ACE PSC-P; B: IC<sub>50</sub> PSC-P; C: aktivitas inhibitor ACE PSC-T; D: IC<sub>50</sub> PSC-T. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan dan notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan  $p < 0,05$ . .... 91
- Gambar 4.10. Derajat hidrolisis hidrolisat kolagen dari sisik haruan. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan dan notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan  $p < 0,05$ . .... 96
- Gambar 4.11. SDS-PAGE hidrolisat kolagen dari sisik haruan. M, *marker*; ASC-PT, *acid soluble collagen* kombinasi pepsin ke tripsin; PSC-PT, *pepsin soluble collagen* kombinasi pepsin ke tripsin; ASC-TP, *acid soluble collagen* kombinasi tripsin ke pepsin; PSC-TP, *pepsin soluble collagen* kombinasi tripsin ke pepsin. .. 98
- Gambar 4.12. Aktivitas inhibitor ACE dan IC<sub>50</sub> hidrolisat kolagen dengan kombinasi pepsin-tripsin. A: aktivitas inhibitor ACE; B: IC<sub>50</sub>. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan

dan notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan $p < 0,05$ .....	101
Gambar 4.13. Stabilitas aktivitas inhibitor ACE <i>in vitro</i> . <i>Error bars</i> menunjukkan standar deviasi dari tiga kali ulangan dan notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan $p < 0,05$ .....	104
Gambar 4.14 Usulan mekanisme penghambatan ACE oleh hidrolisat kolagen sisik haruan .....	107

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Metode Analisis .....	136
Lampiran 1.1.	Kadar air (AOAC, 1995).....	136
Lampiran 1.2.	Kadar abu (AOAC, 1995). ....	136
Lampiran 1.3.	Kadar protein (AOAC, 1995).....	136
Lampiran 1.4.	Kadar lemak (AOAC, 1995). ....	137
Lampiran 1.5.	Rendemen (Chuaychan <i>et al.</i> , 2015).....	138
Lampiran 1.6.	Komposisi asam amino (Piez dan Gross, 1960).....	138
Lampiran 1.7.	Preparasi dan pembuatan kurva standar SDS-PAGE.....	139
Lampiran 1.8.	Analisa protein terlarut (Lowry <i>et al.</i> , 1951). ....	141
Lampiran 2.	Hasil dan Analisis Statistik .....	142
Lampiran 2.1.	Rendemen kolagen sisik ikan haruan.....	142
Lampiran 2.2.	Proksimat sisik dan kolagen sisik haruan. ....	143
Lampiran 2.3.	Komposisi asam amino .....	146
Lampiran 2.4.	Kelarutan kolagen pada berbagai pH dan konsentrasi NaCl..	154
Lampiran 2.5.	Derajat hidrolisis (DH).....	159
Lampiran 2.6.	Aktivitas inhibitor ACE dan IC <sub>50</sub> .....	161
Lampiran 2.7.	Derajat hidrolisis (DH) kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin. ....	165
Lampiran 2.8.	Komposisi asam amino hidrolisat kolagen sisik haruan dengan kombinasi pepsin-tripsin .....	166
Lampiran 2.9.	Aktivitas inhibitor ACE dan IC <sub>50</sub> hidrolisat kolagen kombinasi pepsin-tripsin. ....	173
Lampiran 2.10.	Stabilitas inhibitor ACE dengan simulasi digesti gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	174