

BAB V PEMBAHASAN

5.1. Pengaruh Waktu *Ultrasound* Terhadap Rendemen dan Karakteristik Kolagen Tulang Ceker Ayam

5.1.1. Rendemen Kolagen Tulang Ceker Ayam

Perhitungan rendemen dari kolagen tulang ceker ayam diperoleh dari perbandingan massa kolagen yang didapatkan dengan massa tulang ceker ayam yang digunakan. Perhitungan total supernatan dan pelet yang didapat selama proses ekstraksi *ultrasound* maupun hidrolisis enzim papain digunakan untuk mengetahui pengaruh dari gelombang *ultrasound* terhadap air, protein, dan komponen makromolekul lainnya pada hasil ekstraksi kolagen. Menurut Akram & Zhang (2020), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi jumlah rendemen kolagen yang diperoleh, yakni teknik ekstraksi, suhu ekstraksi yang sesuai, dan lama waktu ekstraksi. Selain itu, jenis enzim yang digunakan juga dapat berpengaruh pada jumlah rendemen kolagen yang terekstrak. Enzim papain mampu mengekstrak kolagen pada jaringan lebih banyak dibandingkan dengan enzim pepsin dikarenakan tingginya solubilitas kolagen yang diperoleh (Ramli *et al.*, 2020).

Menurut Schmidt *et al.* (2016), salah satu metode untuk meningkatkan jumlah rendemen dari kolagen adalah dengan melakukan *pre-treatment* berupa penghilangan lemak dan senyawa-senyawa non-kolagen lainnya, dikarenakan kolagen yang ditemukan pada jaringan ikat hewan, sehingga sulit untuk dipecah meskipun dengan bantuan air mendidih. Umumnya *pre-treatment* kolagen dilakukan dengan bantuan asam dan basa untuk menghidrolisis secara parsial, yakni dengan membuka ikatan silang namun tetap mempertahankan rantai kolagen (Prestes, 2013).

Berdasarkan Tabel 1. dan Gambar 8., perbedaan perlakuan *ultrasound* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan yang satu dengan yang

lainnya ($p > 0,05$) pada massa supernatan perlakuan *ultrasound* yang diperoleh. Semakin lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, maka massa supernatan yang dihasilkan mengalami peningkatan hingga menit ke-30. Hasil serupa juga dapat dilihat pada massa dari pelet *ultrasound* (Tabel 4. dan Gambar 11.), massa supernatan (Tabel 6. dan Gambar 13.) dan pelet (Tabel 9. dan Gambar 16.) dari kombinasi perlakuan *ultrasound* dan enzim, serta supernatan bubuk (Tabel 18. dan Gambar 25.) dan pelet bubuk (Tabel 20. dan Gambar 27.). Hasil ini diduga disebabkan oleh interval waktu yang diberikan tidak berbeda jauh, sehingga efek yang nampak dari perlakuan perbedaan waktu ekstraksi tidak berbeda signifikan. Meski demikian dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa meskipun massa dari supernatan dan pelet hasil ekstraksi *ultrasound* dan kombinasi perlakuan *ultrasound* dan enzim papain tidak berbeda nyata, namun terjadi perombakan makromolekul pada hasil ekstraksi kolagen yang dihasilkan.

Berdasarkan Tabel 15. dan Gambar 18., dapat dilihat bahwa semakin lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, menunjukkan peningkatan pada massa bubuk gelatin yang diperoleh hingga menit ke-40 yang disebabkan karena perlakuan *ultrasound* akan meningkatkan energi kinetik dari partikel substansi akibat getaran yang ditimbulkan dari gelombang *ultrasound* (Shaik *et al.*, 2021). Selain itu, menurut Akram & Zhang (2020) gelombang *ultrasound* mampu mengeluarkan senyawa yang ingin diekstrak dengan cara memecah dinding sel dan mengaktivasi enzim. Hasil serupa dapat ditemukan pada penelitian Shaik *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa rendemen dari kulit ikan pari hidung mancung yang diberi perlakuan *ultrasound* menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan rendemen yang tidak diberi perlakuan *ultrasound*.

Peningkatan total massa dari supernatan, pelet, dan bubuk cenderung menunjukkan kenaikan hanya sampai menit tertentu saja. Seperti pada Tabel 1. dan Gambar 8., peningkatan massa supernatan perlakuan *ultrasound* hanya sampai menit ke-30, lalu setelah itu mengalami penurunan. Sedangkan pada Tabel 11. dan Gambar 18., peningkatan massa bubuk gelatin hanya sampai dengan menit ke-40 dan setelah itu

massa bubuk mengalami penurunan yang disebabkan efek gelombang ultrasonik yang berlebihan justru akan menurunkan solubilitas, sehingga struktur kolagen akan rusak selama proses ekstraksi (Heidari & Rezaei, 2022; Zou *et al.*, 2020).

5.1.2. Karakteristik Kimia Kolagen Tulang Ceker Ayam

A. Kadar Protein

Pengukuran massa protein hasil ekstraksi kolagen ceker ayam dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Sesuai dengan metode ini, sampel yang akan diuji diekstrak terlebih dahulu dengan menggunakan larutan NaCl dan NaOH, kemudian dilakukan penambahan reagen-reagen kimia untuk mengukur konsentrasi proteinnya. Selama proses ekstraksi kolagen dari ceker ayam, akan terjadi pemecahan rantai protein yang semula kompleks, menjadi rantai yang lebih sederhana dan pendek. Proses ekstraksi ini, selain menghasilkan kolagen dan gelatin, juga dapat menyebabkan terbentuknya *Non-Albumin Protein* (NAPs). *Non-Albumin Protein* merupakan protein dengan berat molekul rendah, seperti darah, enzim, *mucoprotein* (khususnya Tamm-Horsfall Protein), imunoglobulin, hormon, dan *mucopolysaccharide* (Siddiqui *et al.*, 2020). Tingginya kadar NAP yang terekstrak selama proses ekstraksi kolagen ceker ayam akan menyebabkan rendahnya kadar protein dari rendemen kolagen yang terekstrak.

Berdasarkan Tabel 2. dan Gambar 9. serta Tabel 7. dan Gambar 14., massa protein supernatan perlakuan *ultrasound* dan supernatan perlakuan kombinasi *ultrasound* dan perendaman enzim papain menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) pada beberapa tingkat perlakuan. Besarnya massa protein supernatan kedua perlakuan menunjukkan kenaikan seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi hingga menit ke-40. Hasil serupa juga terjadi pada pelet perlakuan kombinasi *ultrasound* dan perendama enzim papain (Tabel 10. dan Gambar 17.), yang mana massa protein mengalami kenaikan seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi hingga menit ke-30.

Sedangkan berdasarkan Tabel 5. dan Gambar 12., massa protein pelet perlakuan *ultrasound* tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p > 0,05$) pada beberapa tingkat perlakuan. Besarnya massa protein pelet perlakuan *ultrasound* menunjukkan kenaikan seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi hingga menit ke-30. Hal serupa juga terjadi pada massa protein bubuk (Tabel 12. dan Gambar 19.), supernatan bubuk (Tabel 19. dan Gambar 26.), dan pada pelet bubuk gelatin ceker ayam (Tabel 21. dan Gambar 28.). Peningkatan massa protein pada hasil ekstraksi kolagen ceker ayam ini sesuai dengan terjadinya peningkatan kadar asam amino pada kolagen kulit sapi yang diekstrak dengan metode kombinasi *ultrasound* dan penambahan enzim bromelin (Ahmad *et al.*, 2018).

Selama proses ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, akan terjadi pemecahan rantai peptida dan konversi kolagen menjadi gelatin dengan massa molekul yang berbeda-beda, tergantung pada putusannya ikatan silang dari kolagen (Widyasari & Rawdkuen, 2014). Menurut Nurilmala *et al.* (2022), gelombang ultrasonik akan menghasilkan polipeptida rantai panjang dari hasil pemutusan rantai protein dari sampel yang diekstrak. Panjangnya rantai polipeptida ini menyebabkan kadar protein dari kolagen yang terekstrak mengandung residu asam amino dalam jumlah banyak, sehingga kadar proteinnya menjadi tinggi. Selain itu, Nurilmala *et al.* (2022) juga menambahkan bahwa perlakuan gelombang ultrasonik juga menghasilkan kolagen dengan ikatan hidrogen yang kuat antar molekulnya, sehingga menyebabkan peningkatan *water-binding capacity* dan tingginya *gel strength* dari kolagen yang dihasilkan.

Penambahan enzim untuk menghidrolisis kolagen dari ceker ayam juga mampu meningkatkan kadar protein dari kolagen dikarenakan enzim papain merupakan kelompok endopeptidase yang mampu memecah ikatan peptida pada bagian tengah rantai protein (Nurhayati *et al.*, 2018). Menurut Anggraini & Yuniarta (2015), hidrolisis protein akan mengubah kelarutan dari protein yang semula tidak larut air menjadi gelatin yang larut air, kemudian melalui hidrolisis lebih lanjut oleh enzim

papain akan diubah menjadi asam amino. Hidrolisis kolagen dengan enzim papain akan menyebabkan terdispersinya massa molekul akibat pemutusan ikatan pada area telopeptida oleh enzim, sehingga menyebabkan kolagen memiliki massa molekul yang rendah (Dhakal *et al.*, 2018). Penggunaan enzim papain dalam konsentrasi tepat akan memecah ikatan silang dari telopeptida kolagen tanpa menyebabkan kerusakan pada struktur molekulnya, sehingga menyebabkan peningkatan kadar protein terlarut (Nurhayati *et al.*, 2018). Aplikasi gelombang ultrasonik akan memberi efek mekanis berupa pergerakan molekul pada larutan, sedangkan enzim papain akan meningkatkan proses ekstraksi dengan memecah kolagen pada area telopeptida dan tropokolagen, sehingga kombinasi kedua perlakuan ini akan meningkatkan penetrasi dari enzim papain dan secara bersamaan juga meningkatkan transfer massa dari matriks kulit (Shaik *et al.*, 2021).

Penurunan massa protein pada menit ke-40 dan seterusnya disebabkan oleh perlakuan *ultrasound* pada waktu yang terlalu lama akan menyebabkan pecahnya ikatan hidrogen dan gaya van der Waals dari rantai polipeptida, sehingga terjadi denaturasi protein dan enzim (Schmidt *et al.*, 2016). Waktu *ultrasound* yang terlalu lama juga akan menyebabkan peningkatan suhu dan *shear strength*, sehingga tekanan di dalam medium menjadi terlalu tinggi akibat kavitasi (Schmidt *et al.*, 2016). Menurut Yuniarti *et al.* (2013), denaturasi protein akan menyebabkan penurunan kadar albumin, sehingga ketika dilakukan pengukuran nilai kadar protein mengalami penurunan.

B. Kadar Air

Pengujian kadar air dari sampel dilakukan dengan metode *thermogravimetri*. Metode ini merupakan metode yang mudah dilakukan, tidak memerlukan biaya yang tinggi, dan paling umum dilakukan. Meski demikian, metode ini memerlukan waktu yang tergolong cukup lama (Baehaki *et al.*, 2016). Sebelum menguji kadar air sampel, perlu dilakukan pengeringan dan penimbangan loyang dan cawan yang akan digunakan untuk memastikan tidak adanya keberadaan air pada wadah yang

akan digunakan untuk menguji sampel, sehingga pengukuran menjadi akurat. Setelah wadah yang akan digunakan dikeringkan dan ditimbang, sampel yang akan dikeringkan dimasukkan ke dalamnya lalu ditimbang. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam oven bersuhu 60°C selama semalaman.

Berdasarkan Tabel 3. dan Gambar 10. serta Tabel 8. dan Gambar 15., massa air supernatan perlakuan *ultrasound* dan supernatan perlakuan kombinasi *ultrasound* dan perendaman enzim tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p > 0,05$) antara perlakuan satu dengan yang lainnya. Semakin lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, maka kadar air dari supernatan perlakuan *ultrasound* mengalami penurunan hingga menit ke-40, sedangkan massa airnya mengalami peningkatan hingga menit ke-30. Hasil yang serupa juga terjadi pada kadar air bubuk gelatin ceker ayam (Tabel 13. dan Gambar 18.), yang mana besarnya massa air bubuk gelatin mengalami penurunan seiring dengan lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* hingga menit ke-40, lalu meningkat kembali. Hasil ini dapat disebabkan oleh pada menit ke-40, daya proteolitik dari enzim papain menunjukkan nilai yang paling efektif, akibatnya diperlukan semakin banyak air untuk memutus ikatan protein dari kolagen dan kadar air menjadi menurun (Rahmawati & Nurjanah, 2020). Selain itu menurut Rahmawati & Nurjanah (2020), penambahan enzim papain sendiri tidak memberi pengaruh nyata terhadap kadar air dari gelatin bubuk tulang ceker ayam.

Efek dari perlakuan *ultrasound* terhadap kadar air dari gelatin dan bubuk gelatin sendiri antara lain semakin lama paparan gelombang ultrasonik, maka kadar air akan menurun (Mustafa *et al.*, 2020) dikarenakan semakin lama paparan gelombang ultrasonik akan menyebabkan kontak antara ion H^+ dengan sampel ceker ayam yang diekstrak menjadi semakin lama, sehingga gugus arginin dan guanidinin dari gelatin yang terekstrak akan terpecah kembali menjadi gugus dengan rantai yang lebih pendek. Menurut Mustafa *et al.* (2020), gugus guanidinin dan arginin merupakan dua gugus yang akan menyumbang karakter higroskopis dari gelatin. Dengan

pecahnya kedua gugus ini, maka karakteristik higroskopis dari gelatin akan menurun, sehingga kadar airnya pun menurun.

C. Kadar Lemak

Pengujian kadar lemak bubuk gelatin dilakukan dengan menggunakan metode Soxhlet. Sampel yang digunakan dalam pengujian ini adalah bubuk gelatin yang telah dikeringkan sebelumnya untuk meminimalkan keberadaan air pada sampel yang ikut terekstrak selama proses. Keberadaan air ini mampu menyebabkan bias pada perhitungan kadar lemak sampel (Baehaki *et al.*, 2016).

Berdasarkan Tabel 14. dan Gambar 21., massa lemak bubuk menunjukkan perbedaan nyata ($p > 0,05$) antara perlakuan yang satu dengan yang lain. Massa lemak bubuk mengalami penurunan seiring dengan lamanya waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* hingga menit ke-30 yang disebabkan selama proses hidrolisis, protein miofibril pada kolagen akan menurun sedangkan membran sel otot relatif resisten terhadap kerusakan, sehingga kadar lemak menurun (Rahmawati & Nurjanah, 2020). Kadar lemak dari bubuk gelatin ceker ayam yang diperoleh tergolong tinggi dibandingkan kolagen pada umumnya yang disebabkan tidak dilakukannya proses *pre-treatment* untuk menghilangkan senyawa-senyawa non-kolagen, termasuk lemak. Menurut Kim *et al.* (2012), sampel yang diberi perlakuan penghilangan lemak menunjukkan kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan sampel yang tidak diberi perlakuan *pre-treatment*.

5.1.3. Karakteristik Fisik Kolagen Tulang Ceker Ayam

A. Warna Bubuk Gelatin Ceker Ayam

Uji warna bubuk gelatin ceker ayam menggunakan skala CIE Lab, dengan derajat L^* menunjukkan tingkat kecerahan berdasarkan cahaya pantul yang menghasilkan tiga warna akromatik, yakni warna putih, abu-abu, serta hitam, derajat a^*

mendeskrripsikan warna hijau-merah, dan derajat b^* mendeskripsikan warna biru-kuning. Skala dari derajat L^* sendiri berada pada rentang 0 hingga 100. Pada rentang 0 hingga 50 mengindikasikan warna hitam, sedangkan pada rentang 51 hingga 100 mengindikasikan warna putih. Sedangkan skala dari derajat a^* berada pada rentang -80 hingga +80. Pada a^* rentang -80 hingga 0 mengindikasikan warna hijau, sedangkan 0 hingga +80 mengindikasikan warna merah. Notasi warna b^* berada pada rentang -70 hingga +70. Pada b^* rentang -70 hingga 0 mengindikasikan warna biru, sedangkan rentang 0 hingga +70 mengindikasikan warna kuning (Oliveira *et al.*, 2021; Sinaga, 2019).

Berdasarkan Tabel 15. dan Gambar 22., nilai intensitas warna L^* bubuk gelatin ceker ayam tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p > 0,05$) antara perlakuan lama waktu *ultrasound* yang diberikan. Rentang nilai intensitas warna L^* dari bubuk gelatin yang diperoleh berada pada rentang 38,74 hingga 48,05. Berdasarkan Tabel 16. dan Gambar 23. serta Tabel 17. dan Gambar 24., nilai intensitas warna a^* dan warna b^* bubuk gelatin ceker ayam tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p > 0,05$) antara perlakuan lama waktu *ultrasound* yang diberikan. Menurut Rahmawati & Nurjanah (2020), warna coklat pada bubuk gelatin dapat dikarenakan keberadaan dari lemak. Semakin tinggi kadar lemak, maka intensitas warna coklat akan semakin menurun dikarenakan keberadaan lemak mampu menyebabkan reaksi pencoklatan non-enzimatis terhambat. Selain itu, menurut Ahmad *et al.* (2018), semakin lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* juga dapat menyebabkan reaksi pencoklatan non-enzimatis sehingga intensitas warna kuning (b^*) menjadi semakin tinggi.

B. Viskositas Larutan Bubuk Gelatin Ceker Ayam

Pengukuran viskositas larutan bubuk gelatin ceker ayam dilakukan dengan melarutkan bubuk gelatin ke dalam aquades bersuhu 60°C dengan konsentrasi 6,67% (Asih *et al.*, 2019). Pengukuran viskositas larutan bubuk gelatin bertujuan untuk memastikan keberadaan dari kolagen maupun gelatin pada hasil ekstraksi

yang dihasilkan. Dengan adanya kenaikan viskositas pada larutan bubuk gelatin menunjukkan bahwa di dalam bubuk tersebut terkandung gelatin. Suhu yang tinggi akan memudahkan bubuk untuk larut dalam aquades. Meski demikian, semakin tinggi suhu akan menyebabkan viskositas larutan menurun dikarenakan terjadinya peningkatan laju massa (Shaik *et al.*, 2021). Untuk itu, pengukuran viskositas larutan bubuk perlu dilakukan setelah seluruh sampel yang akan diuji berada pada suhu yang sama agar hasil yang diperoleh tidak bias.

Berdasarkan Tabel 22. dan Gambar 29., besarnya nilai viskositas larutan bubuk gelatin cecek ayam menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara perlakuan lama waktu *ultrasound* yang diberikan. Semakin lama waktu *ultrasound*, viskositas dari larutan bubuk gelatin mengalami peningkatan hingga menit ke-40. Hasil ini sesuai dengan temuan Ahmad *et al.* (2018), yang mana semakin lama waktu *ultrasound* maka viskositasnya akan meningkat hingga waktu tertentu, kemudian pada waktu yang lebih lama justru akan menurunkan viskositas.

Tingginya nilai viskositas seiring dengan peningkatan lama waktu *ultrasound* disebabkan kembalinya ukuran dari partikel kolagen yang sebelumnya terdenaturasi akibat efek kavitasi dari gelombang *ultrasound*. Efek kavitasi ini menyebabkan terjadinya tubrukan dari mikro-jet akibatnya terkelupasnya permukaan, erosi, dan kerusakan dari partikel (Ahmad *et al.*, 2018). Selain itu, tingginya viskositas dari larutan bubuk gelatin juga dapat disebabkan panjangnya rantai asam amino yang terbentuk selama proses hidrolisis dengan enzim papain. Hidrolisis dengan enzim papain mampu mempertahankan struktur dari kolagen triple-helix, sehingga berat molekul dari kolagen menjadi tinggi dan viskositas meningkat (Hidayat *et al.*, 2016). Tingginya jumlah protein terlarut dalam kolagen juga cenderung dapat meningkatkan viskositas larutan bubuk gelatin (Wang *et al.*, 2013).

Penurunan nilai viskositas pada waktu *ultrasound* yang terlalu lama disebabkan karena semakin lama waktu *ultrasound*, maka kadar airnya akan semakin rendah.

Penurunan kadar air menyebabkan kemampuan untuk mengikat air dan membentuk gel menjadi semakin tinggi, sehingga gel menjadi semakin kental (Hidayat *et al.*, 2016). Selain itu, menurut Yuniarti *et al.* (2013), denaturasi protein akibat perlakuan panas selama pengeringan kolagen dapat menyebabkan terganggunya aktivitas biologi dari protein, sehingga menyebabkan penurunan daya kelarutan protein. Perlakuan panas akan menyebabkan molekul pada cairan kolagen bergerak cepat, sehingga menyebabkan lemahnya gaya interaksi antar molekul dan viskositas menurun (Anggraini & Yuniarta, 2015).

5.2. Pengaruh Waktu *Ultrasound* Terhadap Jumlah Protein Terlarut dan Tidak Terlarut

Pengukuran kadar protein terlarut dan tidak terlarut dilakukan dengan memisahkan larutan sampel yang didapat dengan menggunakan *sentrifuge*. Dari hasil sentrifuge, akan didapatkan supernatan yang merupakan protein larut air, dan pelet yang pelet yang merupakan protein tidak larut air. Menurut Manggabarani *et al.* (2018), susunan molekul dari protein dapat mempengaruhi kelarutannya, sehingga protein digolongkan menjadi dua kelompok, yakni protein *fibriller* dan protein *globuler*. Protein *fibriller* merupakan kelompok protein yang tidak larut dalam pelarut encer, seperti contohnya kolagen, fibrin, dan myosin. Sedangkan protein *globuler* merupakan kelompok protein yang larut dalam pelarut asam encer, garam, dan air, seperti contohnya albumin, glutelin, globulin, histon, prolamin, serta protamin. Menurut Silva *et al.* (2022), gelatin merupakan *soluble* protein yang diperoleh dari tulang, kulit, dan tulang rawan daging hewan, melalui hidrolisis kolagen. Kolagen sendiri cenderung berserabut dan menurun kelarutannya pada medium cair dibandingkan dengan medium asam (Ahmed *et al.*, 2020).

Berdasarkan Tabel 2. dan Gambar 9., semakin lama waktu *ultrasound* maka massa protein terlarut pada supernatan perlakuan *ultrasound* semakin meningkat. Hasil yang serupa juga dapat dilihat pada Tabel 7. dan Gambar 14. serta Tabel 19. dan Gambar 26., yang mana massa protein supernatan kombinasi perlakuan *ultrasound*

dan enzim, serta supernatan larutan bubuk mengalami peningkatan seiring dengan lama waktu *ultrasound* dikarenakan perlakuan *ultrasound* akan menyebabkan pembengkakan dari serat otot sehingga tersedia ruang kosong untuk penetrasi peptida kolagen dari tulang dan kulit ceker ayam, dan keluarlah *soluble* protein (Zou *et al.*, 2022). Selain itu Yang *et al.* (2018) juga menambahkan bahwa perlakuan *ultrasound* akan menyebabkan perubahan pada struktur protein, hidrofobisitas permukaan, gugus sulfhidril bebas, dan ikatan disulfida. *Ultrasound* akan menyebabkan terbukanya struktur protein dan meningkatnya permukaan kontak dari air dengan asam amino hidrofilik (Wirayudha *et al.*, 2022). Rendahnya bobot molekul dari sampel kolagen berhubungan dengan meningkatnya paparan residu asam amino. Residu asam amino ini bersifat polar, sehingga air dapat terikat pada ikatan hidrogen kolagen (Khiari *et al.*, 2014).

Selain protein terlarut, perlakuan *ultrasound* juga mampu meningkatkan massa dari protein yang tidak larut. Hasil tersebut dapat dilihat dari meningkatnya massa protein dari pelet perlakuan *ultrasound* (Tabel 5. dan Gambar 12.), pelet perlakuan *ultrasound* dan perendaman enzim (Tabel 10. dan Gambar 17.), dan pelet larutan bubuk gelatin (Tabel 21. dan Gambar 28.). Hasil tersebut diduga dikarenakan selama proses ekstraksi, tidak hanya *soluble* kolagen saja yang terekstrak, namun kolagen yang tidak larut air juga akan ikut keluar (Ali *et al.*, 2018).

Proses pengeringan supernatan kolagen menjadi bubuk dapat menyebabkan penurunan kadar protein. Hasil tersebut dapat dilihat dari nilai massa protein supernatan perlakuan kombinasi *ultrasound* dan enzim menunjukkan nilai yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan supernatan larutan bubuk dikarenakan perlakuan panas di atas suhu 60°C akan menyebabkan denaturasi protein (Anggraini & Yuniarta, 2015). Sedangkan menurut Song *et al.* (2014), suhu denaturasi dari kolagen berada pada rentang 40°C hingga 41°C pada pH netral, dan pada pH asam berada pada rentang 38°C - 39°C. Akibat denaturasi protein ini, struktur kimia dari albumin akan rusak dan terjadi flokulasi atau penggumpalan dan pengendapan partikel protein yang tidak stabil akibat paparan suhu tinggi (Yuniarti

et al., 2013). Selain menyebabkan penurunan kadar protein, denaturasi protein juga dapat menyebabkan penurunan kelarutan dari protein.

5.3. Pengaruh Kombinasi Lama Waktu *Ultrasound* dan Enzim Papain Terhadap Bubuk dan Kadar Protein yang Dihasilkan

Ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* mampu menyebabkan lepasnya ikatan peptida dari serat-serat kolagen akibat tekanan kavitasi yang dihasilkan dari gelombang ultrasonik (Akram & Zhang, 2020). Semakin lama waktu *ultrasound*, maka kolagen yang terekstrak akan semakin banyak kandungan asam amino, sehingga kadar proteinnya meningkat (Nurilmala *et al.*, 2022). Gelombang ultrasonik akan memutus ikatan pada rantai karbon α . Dari perlakuan ultrasonik ini, terjadi peningkatan rendemen dan kadar protein hingga menit ke-40, namun setelah itu terjadi penurunan akibat pecahnya ikatan hidrogen dan gaya *van der Waals* dari rantai polipeptida oleh gelombang *ultrasound* yang terlalu lama, sehingga protein terdenaturasi (Schmidt *et al.*, 2016). Berdasarkan hasil penelitian, massa dari supernatan dan pelet hasil ekstraksi *ultrasound* maupun supernatan dan pelet hasil kombinasi perlakuan *ultrasound* dan enzim papain menunjukkan tidak ada perbedaan nyata. Meski demikian terjadi perombakan makromolekul pada hasil ekstraksi kolagen yang dihasilkan, ditandai dengan peningkatan massa protein dan penurunan massa lemak dari hasil ekstraksi kolagen yang diperoleh.

Dengan adanya penambahan enzim papain, massa protein supernatan perlakuan *ultrasound* dan enzim menunjukkan kenaikan dibandingkan dengan massa supernatan perlakuan *ultrasound*. Hasil tersebut didukung temuan Nurilmala *et al.* (2022), yang mana dengan adanya perlakuan panas, asam, basa, maupun enzim, kolagen yang semula bersifat tidak larut air akan diubah menjadi gelatin yang larut air. Selain itu, hasil ini yang didapatkan juga sesuai dengan penelitian Ali *et al.* (2018) yang menyebutkan bahwa perlakuan *ultrasound* dengan kombinasi enzim pepsin secara efektif meningkatkan rendemen dan mempercepat proses ekstraksi. Perlakuan sonifikasi yang diaplikasikan untuk mengekstrak kolagen ceker ayam

akan menyebabkan serat-serat kolagen akan terbuka, sehingga perlakuan asam dan enzim menjadi lebih efektif dan ekstraksi berjalan lebih cepat (Ahmed *et al.*, 2020).

Meningkatnya jumlah rendemen antara bubuk gelatin ceker ayam tanpa perlakuan *ultrasound* dengan bubuk gelatin ceker ayam dengan perlakuan *ultrasound* menunjukkan bahwa selama proses ekstraksi, gelombang *ultrasound* akan mengurai fraksi kolagen menjadi jaringan protein yang lebih sederhana (Zou *et al.*, 2020). Dari penguraian tersebut, diduga sebagian terurai menjadi protein albumin sedangkan sebagian lainnya terurai menjadi protein non-albumin. Diduga, hanya protein albumin terlarut pada hasil kolagen yang terdeteksi uji Lowry, sedangkan protein non-albumin tidak dapat terukur. Menurut Kruger (2009), uji Bradford memiliki sensitivitas uji lebih tinggi dibandingkan uji Lowry, serta menunjukkan variasi respon terhadap jenis protein berbeda, sehingga mampu menghitung kadar protein non-albumin yang tidak dapat terukur dengan metode Lowry.

Selain metode Bradford dan Lowry, terdapat metode uji kadar protein secara kuantitatif lainnya, yakni uji Kjeldahl dan uji *Bicinchoninic Acid Assay* (BCA). Prinsip uji protein metode Kjeldahl adalah destruksi protein dan komponen organik pada sampel dengan menggunakan asam sulfat dan katalis (Afkar *et al.*, 2020). Metode Kjeldahl akan menguji protein kasar dari sampel berdasarkan jumlah nitrogen pada sampel (Wardani & Wardani, 2014), sehingga meskipun diduga dapat menghitung kadar protein non-albumin, namun metode ini tetap kurang spesifik dalam mengetahui kadar pasti dan jenis protein pada bahan pangan. Metode BCA merupakan metode pengukuran protein yang mudah, sensitif, dan tidak membutuhkan biaya terlalu tinggi jika dibandingkan dengan metode Lowry. Meski demikian, metode BCA kurang rentan terhadap deterjen dan kurang bervariasi, serta hasil pengukurannya mudah bias oleh keberadaan komponen lainnya (Najafov & Hoxhaj, 2017)