

V. PEMBAHASAN

5.1. Pengaruh Konsentrasi Kadar Enzim Terhadap Rendemen, Karakteristik Fisik dan Kimia Kolagen Ceker Ayam

5.1.1. Rendemen Kolagen Ceker Ayam

Rendemen dalam penelitian ini berupa massa supernatan dan pelet setelah perlakuan *ultrasound* yang dapat dilihat pada Tabel 1, massa supernatan dan pelet setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim yang dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 6, massa bubuk gelatin pada Tabel 7, massa supernatan dan pelet campuran bubuk gelatin dan air pada Tabel 15 dan Tabel 17. Pada Lampiran 1 dan Lampiran 2, nilai normalitas dan homogenitas dari rendemen adalah $p > 0,05$ yang berarti data normal dan homogen. Peningkatan massa atau rendemen dari gelatin berbanding lurus dengan bertambahnya konsentrasi enzim papain (Rahmawati dan Nurjanah, 2020). Gelatin adalah protein yang bersifat larut air yang didapatkan dari proses hidrolisis kolagen (Hermanto, 2014). Maka dalam penelitian ini, penambahan enzim papain mempengaruhi peningkatan massa supernatan yang mengandung protein larut air atau gelatin.

Massa supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim, massa bubuk gelatin, dan massa supernatan campuran bubuk gelatin dan air memiliki perbedaan nyata. Pada ketiga massa tersebut, perlakuan enzim papain 5% menghasilkan massa yang tertinggi. Pada perlakuan kadar enzim 5% diperoleh massa yang paling tinggi karena semakin tinggi konsentrasi enzim papain yang digunakan untuk hidrolisis menyebabkan semakin banyak substrat ceker ayam yang berikatan dengan sisi aktif enzim papain sehingga substrat yang terekstrak semakin banyak. Pada konsentrasi enzim papain yang lebih rendah, massa yang diperoleh juga lebih rendah karena substrat yang berikatan dengan sisi aktif enzim dan terekstrak dari ceker ayam lebih sedikit (Rahmawati dan Nurjanah, 2020).

Massa pelet setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim tidak memiliki perbedaan nyata dan pada perlakuan enzim papain 1% memiliki massa tertinggi yaitu $9,45 \pm 0,93$ gram. Pelet campuran bubuk gelatin dan air memiliki perbedaan nyata

dan massa tertinggi didapat dari perlakuan enzim papain 0% yaitu sebesar $2,27 \pm 0,67$ gram. Kedua massa pelet tertinggi tersebut tidak diperoleh dari perlakuan enzim papain 5% yang menandakan penambahan enzim papain tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap massa pelet. Tinggi rendahnya massa pelet dapat dipengaruhi oleh sumsum pada rongga tulang ceker ayam yang mengandung bahan non kolagen (Khirzin et al., 2019).

5.1.2. Karakteristik Fisik Kolagen Ceker Ayam

a. Viskositas

Viskositas merupakan daya aliran molekul yang terdapat pada suatu larutan seperti suspensi encer, air, dan cairan organik. Viskositas termasuk dalam salah satu karakteristik fisikokimia yang penting pada kolagen. Viskositas diuji menggunakan viskometer untuk mengetahui tingkat kekentalan gelatin yang diukur pada suhu dan konsentrasi tertentu (Pertiwi et al., 2018). Pada Lampiran 1 dan Lampiran 2, nilai normalitas dan homogenitas viskositas gelatin adalah $p > 0,05$ yang berarti data normal dan homogen.

Pada Tabel 11., nilai viskositas campuran air dan bubuk gelatin memiliki perbedaan nyata berkisar dari $2,94 \pm 0,06$ cP sampai $7,25 \pm 0,31$ cP. Hubungan kadar enzim papain dengan viskositas campuran air dan bubuk gelatin berbanding terbalik yaitu bubuk gelatin dari perlakuan kadar enzim yang semakin tinggi memiliki viskositas yang semakin rendah, begitu pula sebaliknya. Huda et al (2013) menyatakan viskositas memiliki hubungan terhadap berat molekul dan panjang asam amino. Gelatin yang mempunyai rantai asam amino yang panjang maka nilai viskositasnya semakin tinggi. Huda et al (2013) juga menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kadar enzim untuk proses hidrolisis menyebabkan semakin banyak rantai asam amino yang terputus menjadi lebih pendek sehingga viskositas gelatin pun semakin rendah. Gelatin dari perlakuan enzim papain 0% memiliki viskositas tertinggi karena rantai asam amino yang panjang belum terhidrolisis dan memiliki tolakan elektrostatis yang kuat di antara rantai molekulnya (Bonnie Sun et al., 2018).

b. Warna (L, a, b)

Pengukuran warna bubuk gelatin dilakukan menggunakan alat chromameter. Alat ini akan menghasilkan output berupa nilai lightness (L), a, dan b. Menurut Utami et al. (2021), lightness atau parameter kecerahan mempunyai rentang nilai dari 0 hingga 100. Nilai 0 menandakan kecerahan yang semakin hitam atau gelap dan nilai 100 menandakan kecerahan yang semakin putih atau terang. Nilai a dan nilai b merupakan cahaya pantul. Nilai a memiliki nilai positif atau +a dari 0 sampai +100 yang menandakan warna merah dan nilai negatif atau -a dari 0 sampai -80 yang menandakan warna hijau. Nilai b memiliki nilai positif atau +b dari 0 sampai +70 yang menunjukkan warna kuning dan nilai negatif atau -b dari 0 sampai -70 yang menunjukkan warna biru. Pada Lampiran 1 dan Lampiran 2, nilai lightness, a, dan b bubuk gelatin adalah sebesar $p > 0,05$ yang berarti data normal dan homogen.

Nilai lightness, a, dan b bubuk gelatin secara berturut-turut dapat dilihat pada Tabel 12, Tabel 13, dan Tabel 14. Nilai lightness, a, dan b bubuk gelatin memiliki perbedaan nyata. Menurut Rahmawati dan Nurjanah (2020), bubuk gelatin ceker ayam memiliki warna kuning kecoklatan hingga coklat tua. Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi enzim papain menghasilkan bubuk gelatin dengan nilai L, a, b yang semakin tinggi pula. Semakin tingginya nilai L, a, b menandakan bahwa warna coklat dari bubuk gelatin semakin muda atau terang. Warna bubuk gelatin ceker ayam berkaitan dengan kadar lemak yang terkandung dalam bubuk. Konsentrasi enzim papain yang semakin tinggi menghasilkan bubuk gelatin dengan kadar lemak yang semakin rendah. Penurunan kadar lemak menyebabkan berkurangnya proses oksidasi lemak pada bubuk gelatin sehingga semakin sedikit reaksi pencoklatan non enzimatis yang terjadi (Rahmawati dan Nurjanah, 2020). Bubuk gelatin dari perlakuan enzim papain 4% memiliki nilai L, a, b tertinggi karena perlakuan enzim papain 4% menghasilkan bubuk dengan kadar lemak terendah.

5.1.3. Karakteristik Kimia Kolagen Ceker Ayam

a. Kadar Air

Kadar air adalah parameter yang berkaitan erat dengan waktu simpan dari gelatin. Kadar air gelatin diuji untuk mengetahui banyaknya air yang terkandung dalam gelatin ceker ayam (Pertiwi et al., 2018). Kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dapat dilihat pada Tabel 1, kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim dapat dilihat pada Tabel 4, kadar air bubuk gelatin dapat dilihat pada Tabel 9. Pada Lampiran 1 dan Lampiran 2, nilai normalitas dan homogenitas kadar air adalah $p > 0,05$ yang berarti data normal dan homogen.

Rata-rata kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound* adalah $278,88 \pm 7,66$ gram. Kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim memiliki perbedaan nyata berkisar dari $282,32 \pm 2,54$ gram sampai $297,60 \pm 4,30$ gram. Kadar air bubuk gelatin memiliki perbedaan nyata $0,58 \pm 0,01$ gram sampai $1,07 \pm 0,21$ gram. Persentase kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim serta kadar air bubuk gelatin menunjukkan bahwa kadar air tertinggi diperoleh dari perlakuan enzim papain 0% dan kadar air terendah diperoleh dari perlakuan enzim papain 5%. Penurunan persentase kadar air seiring dengan bertambahnya kadar enzim disebabkan karena pada proses hidrolisis untuk mengikatkan enzim papain terhadap substrat bergantung pada ikatan hidrogen sehingga memerlukan air (Triastuti, 2022). Oleh karena itu, semakin tinggi konsentrasi enzim papain maka semakin tinggi juga kebutuhan air untuk proses hidrolisis. Proses pengeringan supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim menjadi bubuk gelatin menggunakan oven secara keseluruhan menurunkan kadar air.

b. Kadar Protein Dry Basis

Kadar protein dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk *dry basis*. Gelatin tersusun dari unsur penting berupa protein yang larut air (Hermanto, 2014). Protein larut air tersebut semula berwujud kolagen atau protein tidak larut air yang menempel dengan kuat pada jaringan tulang. Proses hidrolisis menyebabkan lepasnya kolagen dari jaringan tulang dan mengalami denaturasi dari triple helix yang kompleks menjadi rantai sederhana berupa gelatin. Proses transformasi

kolagen menjadi gelatin bersifat irreversible (Khirzin et al., 2019). Dalam penelitian ini, proses hidrolisis dilakukan menggunakan kombinasi *ultrasound* dan variasi konsentrasi enzim papain 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Pengukuran kadar protein bertujuan untuk mengetahui banyaknya protein yang terkandung dalam gelatin. Pengukuran kadar protein dalam penelitian ini menggunakan metode lowry yang diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 650 nm. Metode lowry adalah pengembangan dari metode biuret yang menggunakan reagen folin-ciocalteau yang dapat mendeteksi gugus fenolik dalam residu tirosin (protein). Gugus fenolik tersebut akan mereduksi reagen folin-ciocalteau yang merupakan kompleks phosphomolybdat–phospotungstate menjadi molibdenum dan tungsten yang tampak berwarna biru. Kelebihan dari metode lowry yaitu memiliki sensitivitas lebih tinggi dibandingkan metode biuret sehingga sampel uji yang diperlukan lebih sedikit (Muyassaroh et al., 2020). Pada Lampiran 1 dan Lampiran 2, nilai normalitas dan homogenitas kadar protein adalah $p > 0,05$ yang berarti data normal dan homogen.

Kadar protein *dry basis* supernatan setelah perlakuan *ultrasound* terdapat pada Tabel 1 dengan rata-rata sebesar $0,89 \pm 0,17$ gram. Kadar protein pelet setelah perlakuan *ultrasound* terdapat pada Tabel 1 berkisar dari $0,77 \pm 0,28$ gram. Kadar protein supernatan dan pelet tersebut dipengaruhi oleh waktu perlakuan *ultrasound* yang sama yaitu 30 menit. Kadar protein supernatan lebih besar daripada pelet menandakan efek kavitasi dari proses *ultrasound* mengekstrak protein tidak larut air menjadi larut air (Lee et al., 2022).

Kadar protein supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim pada Tabel 7, kadar bubuk gelatin pada Tabel 14, dan kadar protein supernatan campuran bubuk gelatin dan air pada Tabel 20 memiliki perbedaan nyata ditandai dengan *superscript* yang berbeda. Pada ketiga kadar protein tersebut, perlakuan enzim papain 3% menghasilkan kadar protein yang tertinggi yang menandakan kinerja enzim papain untuk menghidrolisis kolagen ceker ayam mencapai titik optimal hingga konsentrasi 3%. Konsentrasi enzim papain di atas 3% menjadi tidak efektif lagi

yang dibuktikan dengan penurunan kadar protein. Penurunan kadar protein tersebut dapat dipengaruhi oleh keseimbangan antara protein yang terkandung dalam ceker ayam dengan enzim papain. Ketersediaan enzim papain pada konsentrasi 4% dan 5% lebih tinggi dibandingkan dengan protein dalam ceker ayam sehingga proses hidrolisis menjadi kurang maksimal dan terjadi penurunan kadar protein (Susanto et al., 2018). Kemampuan proteolitik dari enzim papain atau enzim protease dapat menurun jika perbandingan enzim dengan protein dalam substrat tidak seimbang (Ojha et al., 2016).

Kadar protein *dry basis* pada pelet setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim serta pelet campuran bubuk gelatin dan air dapat dilihat pada Tabel 10 dan Tabel 22 tidak memiliki perbedaan nyata. Kedua kadar protein pelet tersebut menurun jika dibandingkan dengan kadar protein pelet sebelum ditambahkan enzim papain. Penurunan kadar protein tersebut menandakan bahwa hidrolisis kolagen ceker ayam menggunakan enzim papain dapat mengubah kolagen yang bersifat tidak larut air menjadi larut air (Wardhana, 2022).

c. Kadar Lemak

Kadar lemak pada gelatin merupakan komponen yang berpengaruh terhadap proses oksidasi (ketengikan) dan mutu gelatin selama penyimpanan (Prihatiningsih et al., 2014). Pada Tabel 8., persentase kadar lemak menunjukkan perlakuan enzim papain 0% memiliki kadar lemak tertinggi yaitu $22,53 \pm 1,17\%$ dan perlakuan enzim papain 4% memiliki kadar lemak terendah yaitu $14,10 \pm 2,74\%$. Kadar lemak gelatin memiliki hubungan yang berbanding terbalik dengan konsentrasi enzim papain. Saat proses hidrolisis enzimatik terjadi perubahan struktur jaringan yang cepat. Selain itu, hidrolisis enzimatik menyebabkan membran sel otot/ membran lipid bergabung dan membentuk gelembung tidak larut air yang kemudian hilang bersama dengan protein tidak larut air (Wijayanti & Rianingsih, 2015). Persentase kadar lemak bubuk gelatin pada penelitian ini yaitu $14,10 \pm 2,74\%$ - $22,53 \pm 1,17\%$ lebih tinggi daripada persentase kadar lemak bubuk gelatin pada penelitian Rahmawati dan Nurjanah (2020) yaitu 2,65%-26,96%. Tingginya kadar lemak pada

penelitian ini disebabkan karena tidak dilakukan proses *degreasing* sehingga sampel ceker ayam masih mengandung lemak. Pada umumnya, proses *degreasing* dilakukan pada suhu tinggi misalnya 80°C. Pemanasan ini menyebabkan struktur lemak rusak dan berat jenis lemak menurun sehingga lemak akan terpisah dari substrat ceker ayam kemudian mengapung di permukaan dan menjadi lebih mudah untuk dipisahkan dari sampel (Pertiwi et al., 2018).

5.2. Pengaruh Konsentrasi Kadar Enzim Terhadap Total Protein dan Karakteristik Protein Terlarut dan Tidak Terlarut

Total protein diperoleh dari penjumlahan kadar protein larut air dan kadar protein tidak larut air. Kadar protein larut air dapat diamati melalui kadar protein supernatan, sedangkan kadar protein tidak larut air dapat diamati melalui kadar protein pelet. Pada hasil penelitian supernatan memiliki kadar protein yang lebih tinggi daripada pelet. Kelarutan protein dalam air atau pelarut dibedakan menurut susunan molekulnya yaitu protein globuler dan protein fibriller. Protein dalam supernatan adalah protein yang dapat larut dalam air atau protein globuler. Protein dalam pelet adalah protein fibriller protein tidak larut air misalnya kolagen (Manggabarani et al., 2018).

Kadar protein larut air pada supernatan dan bubuk gelatin setelah perlakuan enzim papain lebih tinggi daripada kadar protein supernatan sebelum ditambahkan enzim papain. Sebaliknya, kadar protein tidak larut air pada pelet setelah perlakuan enzim papain lebih rendah dibandingkan dengan pelet sebelum perlakuan enzim papain. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa penambahan enzim papain meningkatkan kadar protein larut air air atau gelatin. Sisi aktif dari enzim papain berikatan dengan protein tidak larut air atau kolagen yang terdapat dalam pelet menjadi larut air atau gelatin sehingga kadar protein pada supernatan meningkat dan kadar protein pada pelet menurun. Kenaikan kadar protein larut air pada supernatan mencapai titik optimal pada perlakuan enzim papain 3% kemudian terjadi penurunan kadar protein pada konsentrasi enzim di atas 3%. Enzim papain pada konsentrasi yang tepat mampu memecah ikatan silang pada telopeptida

kolagen tanpa menyebabkan kerusakan struktur molekul sehingga dapat meningkatkan jumlah protein yang larut air. Setelah mencapai titik maksimum yaitu perlakuan enzim 3%, penambahan konsentrasi enzim papain tidak akan memberikan efek yang signifikan dan terjadi penurunan kadar protein (Nurhayati et al., 2018).

5.3. Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain Terhadap Massa Dan Kadar Protein Bubuk Gelatin

Kadar enzim papain berpengaruh terhadap rendemen bubuk gelatin yang dapat dilihat pada Tabel 7. Perlakuan konsentrasi enzim papain tertinggi yaitu 5 % menghasilkan rendemen yang paling banyak sebesar $21,45 \pm 1,36$ gram, sedangkan konsentrasi enzim papain terendah yaitu 0% menghasilkan rendemen paling sedikit sebesar $8,24 \pm 1,26$ gram. Konsentrasi enzim juga mempengaruhi kadar protein bubuk gelatin yang dapat dilihat pada Tabel 10. Kadar protein bubuk gelatin meningkat hingga pemberian konsentrasi enzim papain 3% sebesar $4,62 \pm 0,86$ gram atau $25,57 \pm 4,52\%$. Kadar protein kemudian mengalami penurunan jika diberi perlakuan konsentrasi enzim papain di atas 3%. Peningkatan rendemen menandakan bahwa konsentrasi enzim papain yang semakin tinggi menyebabkan peningkatan permeabilitas jaringan ikat pada ceker ayam sehingga kolagen yang terlepas lebih banyak dan dapat terurai menjadi protein sederhana (Maqsood et al., 2018). Selain itu, semakin tinggi konsentrasi enzim papain juga berarti semakin banyak sisi aktif enzim yang mengikat dan mengekstrak substrat ceker ayam (Rahmawati dan Nurjanah, 2020). Namun, pada perlakuan konsentrasi enzim papain di atas 3%, kadar protein bubuk gelatin tidak meningkat lagi melainkan mengalami penurunan. Penurunan tersebut dapat disebabkan karena sebagian protein yang terekstrak memiliki karakteristik yang sama dengan albumin sehingga dapat dideteksi melalui uji Lowry. Sebagian protein lainnya bersifat non-albumin sehingga keberadaannya tidak terdeteksi melalui uji Lowry. Protein non-albumin memiliki berat molekul yang rendah, misalnya seperti mukopolisakarida, mukoprotein (Tamm-Horsfall protein), enzim, hormon, darah, dan immunoglobulin, (Siddiqui et al., 2020).

Protein non-albumin dapat berupa kolagen atau non-kolagen yang perlu diuji lebih lanjut. Metode uji protein yang dapat dilakukan adalah metode Bradford. Jika dibandingkan dengan uji Lowry dan Biuret, uji Bradford mempunyai kelebihan seperti lebih cepat, lebih sederhana, lebih sensitif, dan tidak terpengaruh oleh reagen dan komponen non-protein dari sampel biologis (Mehata & Dahari, 2020). Metode pengujian Bradford didasarkan pada ikatan antara reagen *Commassie Brilliant Blue G-250* dengan residu asam amino spesifik yang memiliki rantai samping histidin, arginin, leusin, triptofan, dan fenilalanin. Reaksi ini berlangsung cepat dan menghasilkan kompleks berwarna biru yang stabil dan dapat diukur absorbansinya (Utami et al., 2016). Uji Bradford memiliki sensitivitas sebesar 0-0,01 mg dan tingkat akurasinya bergantung pada komposisi asam amino. Kelemahan dari uji Bradford adalah gangguan dari beberapa komponen seperti detergen, sabun, Triton x-100, dan SDS. Pembentukan warna selain dari analit yang diinginkan adalah permasalahan yang umum pada uji kolorimetri secara tidak langsung (Martina & Vojtech, 2015). Prinsip kerja dari uji Biuret adalah reaksi antara Cu^{2+} dengan gugus fungsional ikatan peptida protein. Pembentukan kompleks protein dengan Cu^{2+} membutuhkan dua ikatan peptida yang menimbulkan warna violet. Karakteristik uji biuret adalah memiliki sensitivitas sebesar 0-1 mg, tingkat akurasinya tidak bergantung pada komposisi asam amino, dapat terganggu oleh keberadaan gugus amino $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Uji Lowry merupakan uji protein yang memiliki sensitivitas sebesar 0-0,1 mg dan tingkat akurasinya bergantung secara parsial pada komposisi asam amino. Uji Lowry dapat terganggu oleh keberadaan EDTA, fenol, DTT, asam, dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Metode pengujian Lowry berlangsung sekitar 40 menit dilakukan berdasarkan reaksi biuret yang melibatkan reagen Folin-Ciocalteu. Sampel yang mengandung protein diberi perlakuan alkalin tembaga sulfat dalam keberadaan tartarat. Selanjutnya, sampel diberi tambahan reagen Folin-Ciocalteu. Pembentukan warna pada pengujian Lowry terjadi ketika kompleks tetradentat tembaga mentransfer elektron ke reagen Folin-Ciocalteu sehingga reagen tersebut tereduksi dan muncul warna biru (Martina & Vojtech, 2015).