

Artikel Penelitian

Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin dari Tulang Ikan Patin dengan *Pre-Treatment* Asam Sitrat

Physical and Chemical Characteristics of Gelatin from Pangasius Catfish Bone with Pre-Treatment of Citric Acid

Mega Pertiwi^{1*}, Yoni Atma¹, Apon Zaenal Mustopa², Rizkia Maisarah¹¹Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Bioindustri, Universitas Trilogi, Jakarta²Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), BogorKorespondensi dengan penulis (megapertiwi019@gmail.com)Artikel ini dikirim pada tanggal 31 Maret 2017 dan dinyatakan diterima tanggal 25 Mei 2018. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui www.jatp.ift.or.id. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists® ©2018

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan ekstraksi gelatin dari tulang ikan patin menggunakan asam sitrat dan menganalisis karakteristik fisiko-kimianya. Ekstraksi gelatin melalui dua tahap yaitu tahap *pre-treatment* dengan asam sitrat dan ekstraksi utama dengan *aquadest*. Tahap *pre-treatment* dilakukan dengan variasi waktu yakni 24, 36, 48 dan 56 jam. Tahapan ekstraksi utama dilakukan pada suhu 45, 55, 65, dan 75°C. Hasil ekstraksi dilanjutkan dengan analisis keberadaan protein gelatin dengan metode SDS-PAGE. Analisis fisiko-kimia gelatin meliputi derajat keasaman (pH), rendemen, kekuatan gel, profil tekstur, viskositas, kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak juga dilakukan. Hasil SDS-PAGE gelatin perlakuan terbaik (yakni dengan *pre-treatment* 48 jam dan ekstraksi utama pada suhu 75°C) diketahui memiliki bobot molekul 162 kDa. Gelatin hasil ekstraksi terbaik memiliki rendemen sebesar 6,14%. Gelatin tulang ikan patin memiliki pH 4,46, kekuatan gel 364,19 bloom, daya kunyah sebesar 261,76 g dan viskositas 3,83 cP. Kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak masing-masing berhasil diidentifikasi sebesar 7,72; 0,38; 58,70, dan 2,79%. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu ekstraksi dan lamanya *proses pre-treatment* yang digunakan, maka bobot molekul protein menjadi semakin tinggi. Kesimpulannya, *pre-treatment* asam sitrat selama 48 jam dan ekstraksi utama pada suhu 75°C, berhasil menunjukkan hasil terbaik dan dapat terkarakterisasi sifat fisik serta kimianya.

Kata kunci : gelatin, tulang ikan, ekstraksi, asam sitrat, fisiko-kimia.

Abstract

This research aimed to extract gelatin from Pangasius catfish bone using citric acid and then analyse its physicochemical characteristics. The extraction of gelatin was done in two stages soaking i.e pre-treatment with citric acid and main extraction by aquadest. Pre-treatment was done by soaking bones at 24, 36, 48 and 56 h, then the main extraction was done by soaked leached bones in temperature 45, 55, 65, and 75°C. The gelatin from catfish bone then was analyzed the presence of protein by SDS-PAGE and its physico-chemical including pH, yield, gel strength, texture profile, viscosity, moisture content, ash content, protein content, and fat content. Based on SDS-PAGE, fish bone gelatin had molecular weight of 162 kDa. The best extraction treatment (pre-treatment 48 h and main extraction at 75°C) produced 6.14% of gelatin yield. Gelatin of pangasius catfish bone had pH 4.46, gel strength of 353.76 bloom, chewing power of 261.76 g, and viscosity of 3.83 cP. Water, ash, protein and fat content was 7.72, 0.38, 58.70, and 2.79%, respectively. The higher extraction temperature and the longer time for pre-treatment process, the higher molecule weight of protein. As conclusion, the best treatment that was found in the sample with the pre-treatment at 48 h and the main extraction at 75°C, was successfully characterized on its physicochemicals.

Keywords: gelatin, fish bone, extraction, citric acid, physico-chemical.

Pendahuluan

Gelatin merupakan protein yang diperoleh dari kulit, tulang dan jaringan serat putih (*white fibrous*) hewan. Hewan yang menjadi sumber gelatin utama yakni babi dan sapi. Produksi gelatin dari kulit babi mencapai 46%, kulit sapi 29,4%, tulang sapi 23,1% dan sumber alternatif 1,5% (Karim dan Bhat, 2009) dari total produksi gelatin dunia. Gelatin dari kulit babi tidak diterima oleh masyarakat muslim karena diharamkan (Atma, 2016) dan tidak diterima oleh masyarakat Majusi (Atma, 2016). Selain itu, adanya kasus wabah sapi gila atau *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), penyakit kuku dan mulut semakin perlu dicarinya

sumber alternatif potensial untuk memperoleh gelatin (Nurul dan Sabron, 2015).

Saat ini sumber alternatif yang cukup potensial untuk produksi gelatin adalah kulit dan tulang ikan (Ratnasari *et al.*, 2013). Penelitian sebelumnya telah dilakukan analisis gelatin pada bagian kulit dan tulang ikan antara lain; tuna, hiu, kurisi, salmon, pari, mas, ikan sturgeon, baung, kakap, kakap merah, rohu, nila, patin, beloso, catla, gelik, ikan kod, ikan mackerel, kakap merah, kurisi, nila, patin, lele, kerapu, *blue whiting* (sejenis ikan kod), beloso, dan ikan gelik (Atma, 2017). Hampir sepertiga dari berat ikan berasal kulit dan tulangnya, bahkan menurut Shyni *et al.* (2014),

penyumbang terbesar berat badan ikan berasal dari tulang dan kulit, akan tetapi limbah tulang ikan dibuang dan tidak dimanfaatkan (Atma, 2016).

Saat ini pemanfaatan tulang ikan sebagai sumber alternatif gelatin sudah banyak diteliti. Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa gelatin dari tulang ikan yang hidup di perairan hangat memiliki kualitas fisik seperti kekuatan gel dan viskositas yang lebih baik dibandingkan dari tulang ikan yang hidup di perairan dingin (Atma, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Mahmoodani *et al.* (2014) menunjukkan bahwa kualitas gelatin tulang ikan patin memiliki karakteristik fisik yang menyerupai gelatin sapi. Hasil penelitian yang dilakukan Mahmoodani *et al.* (2014) yaitu mengekstrak gelatin tulang ikan patin menggunakan HCl, didapatkan kadar air sebesar 9,2%, kadar abu 2,6%, kadar lemak 0,96%, dan kadar protein 87,3%. Hasil studi yang dilakukan Atma (2017) menunjukkan bahwa gelatin dari tulang ikan patin juga memiliki kadar abu sesuai dengan standar. Kadar abu dan kadar air merupakan parameter mutu kimia penting gelatin, parameter mutu fisik dan kimia gelatin tulang ikan dipengaruhi oleh cara ekstraksinya (Atma dan Ramdhani, 2017).

Ekstraksi gelatin tulang ikan biasanya dilakukan dengan dua tahap yakni *pre-treatment* dengan asam atau basa dan *main extraction* dengan air hangat (Atma dan Ramdhani, 2017). Menurut Mariod and Adam (2013) ekstraksi dengan asam sitrat lebih disukai, aman dan tidak membutuhkan tahapan penanganan lainnya dalam produksi gelatin untuk bahan pangan. Di Indonesia, tulang ikan yang sudah diteliti proses ekstraksinya dengan menggunakan asam sitrat adalah tulang ikan cucut (Indrialaksmi, 2000), bandeng (Fatimah dan Jannah, 2009), tenggiri (Adiningsih dan Purwanti, 2015), lele dumbo (Iqbal *et al.*, 2015), pari mondol (Santoso *et al.*, 2015) dan kakap merah (Syahraeni *et al.*, 2017). Data menunjukkan menggunakan asam sitrat dalam ekstraksi tulang ikan patin belum dilakukan sebelumnya. Oleh karena itu, tulang ikan patin dapat dijadikan sumber alternatif paling potensial untuk dikembangkan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengekstraksi gelatin tulang ikan patin menggunakan asam sitrat pada tahapan *pre-treatment* dan kemudian menganalisis karakteristik fisik serta sifat kimianya. Analisis fisik meliputi kekuatan gel, profil tekstur, viskositas dan pH, sedangkan analisis sifat kimia meliputi kadar abu, kadar air, kadar protein dan kadar lemak. Karakteristik fisik dan kimia gelatin yang diperoleh dari penelitian ini dibandingkan dengan gelatin dari tulang ikan lainnya dan gelatin komersial.

Hasil penelitian ini juga ditujukan untuk mengetahui kondisi perlakuan terbaik untuk ekstraksi gelatin dari tulang ikan patin menggunakan asam sitrat dan menganalisis karakteristik fisiko-kimia gelatin yang dihasilkan. Manfaat penelitian ini adalah mendapatkan gelatin yang memiliki karakteristik fisiko-kimia yang sesuai standar dan menggunakan pelarut kimia yang lebih aman.

Materi dan Metode

Materi

Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi gelatin adalah tulang ikan patin yang diperoleh dari CV Karunia Mitra Makmur daerah Cikampek, Jawa Barat, asam sitrat dan aquadest. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis proksimat meliputi larutan heksana (Merck, Germany), kertas saring bebas lemak, kapas, larutan H₂SO₄ pekat (Merck, Germany), larutan NaOH (Merck, Germany), indikator BCG-MM (*Bromocresol Green-Merah Metil*) (SCIENCE Company, USA), larutan standar HCl (Merck, Germany) dan bahan untuk konfirmasi gelatin dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) adalah Tris HCl (Bio Basic Inc, USA), akrilamid (Bio Basic Inc, USA), TEMED (Sigma, USA), amonium persulfat (APS) (MP biomedical, Sweden) dan *protein marker* (SMOBIO, Taiwan).

Alat-alat yang digunakan dalam ekstraksi gelatin meliputi timbangan, pisau, *Meat Cutter* (Fomac, China), WaterBath (Faithful, China), nampan, kertas saring, kain blacu, *food dehydrator* (Ecalibur, USA), shaker, sentrifugasi (Hitachi, Japan), label, erlenmeyer, gelas piala, mikropipet dan gelas ukur. Alat-alat yang digunakan untuk analisa adalah neraca analitik, oven (Mommert, German), tanur (Lenton Furnaces, UK), labu kjeldahl, sokhlet, *Texture Analyzer* (Brookfield CT3, USA), *Viscometer LV D-II+Pro* (Brookfield, USA), pH meter (Agilent Technologies 3200P, USA), perangkat elektroforesis SDS-PAGE (ATTO AE-6500, Japan), cawan porselen, cawan petri, erlenmeyer, mortar, mikropipet, botol schoot, labu ukur, gelas ukur, mikropipet dan gelas piala.

Metode

Penelitian ini dilakukan dari bulan September 2017 sampai bulan Maret 2018. Tempat dilakukannya penelitian adalah Laboratorium Biokimia Universitas Trilogi, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dan Balai Penelitian Pasca Panen Bogor. Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama, yaitu proses ekstraksi gelatin dari tulang ikan patin dan dilakukan analisis keberadaan protein gelatin dengan metode SDS-PAGE. Tahap kedua, yaitu analisis fisiko-kimia gelatin meliputi derajat keasaman (pH), rendemen, kekuatan gel, profil tekstur, viskositas kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak.

Ekstraksi Gelatin Tulang Ikan Patin

Produksi gelatin dari tulang ikan patin mengacu pada penelitian Atma (2017) tahapan produksinya meliputi proses *degreasing* yaitu proses penghancuran limbah tulang ikan patin menggunakan *meat cutter*. Selanjutnya dilakukan tahapan *pre-treatment* untuk menghilangkan kalsium dan garam-garam mineral dari tulang dengan cara perendaman dalam larutan asam sitrat 1% selama 24, 32, 48 dan 56 jam. Perbandingan tulang dan larutan asam sitrat adalah 1:4. Setelah itu dilakukan pemisahan larutan asam sitrat dengan tulang ikan yang diperoleh yang disebut *ossein*. Tulang ikan patin yang telah menjadi *ossein* kemudian dilakukan

pembilasan dengan *aquadest* sampai pH netral (6-7). *Main extraction* dilakukan dengan menggunakan *aquadest* pada suhu 45, 55, 65, dan 75 °C selama 5 jam (perbandingan *ossein* : *aquadest* = 1:4).

Filtrat hasil tahap ekstraksi dipisahkan dari larutan pengeksrak menggunakan kertas saring, selanjutnya di analisa keberadaan protein gelatin pada filtrat menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) atau sebelum mulai pengujian SDS filtrat di simpan di dalam refrigerator. Hasil ekstraksi terbaik yang telah dikonfirmasi keberadaan proteinnya melalui SDS PAGE dilakukan produksi skala besar untuk analisis fisiko-kimia. Karakteristik fisik gelatin yang dianalisis terdiri dari analisis nilai pH, kekuatan gel, profil tekstur dan viskositas, sedangkan karakteristik kimia gelatin yang dianalisis yaitu kadar proksimat.

Analisis SDS PAGE

Analisis bobot molekul gelatin tulang ikan patin dilakukan menggunakan SDS PAGE (Walker, 2009) dengan modifikasi. *Protein marker* yang digunakan yaitu *molecul weight* (MW) 5-245 kDa. Sampel dimasukkan sebanyak 10 µl ke dalam tube kecil (tube khusus PCR) dan dicampurkan dengan 10 µl loading protein selanjutnya didenaturasi pada suhu 100°C selama 5 menit. Sebelum dimasukkan ke dalam sumur pada gel elektroforesis, campuran sampel dan loading protein yang telah didenaturasi dimasukkan dalam lemari pendingin. Gel terdiri dari 2 bagian yaitu *separating gel* dan konsentrat gel. Komposisi *separating* dan konsentrat (*stacking*) gel untuk SDS-PAGE dapat dilihat pada Tabel 3. *Separating gel* dibuat terlebih dahulu dan berada pada bagian bawah, sedangkan konsentrat gel berada pada bagian atas.

Gel dibiarkan mengering tetapi sebelumnya sumur pada gel telah dibuat. Gel dipasang pada perangkat gel elektroforesis dengan posisi berdiri dan direndam dengan buffer elektroforesis. Kemudian marker dan sampel dimasukkan masing-masing sebanyak 7 µl pada sumur gel. Running elektroforesis menggunakan voltase 110 V dilakukan selama ±40 menit. Setelah itu gel dilepaskan dan direndam dalam larutan *commasie blue* selama 30 menit. Gel yang telah direndam dalam larutan *commasie blue* diletakkan pada roker. Tahap selanjutnya gel dibilas dengan *aquadest* dan kemudian direndam kembali dalam larutan destaining selama satu malam. *Band* atau pita protein dengan berat molekul berbeda akan terpisah. Hasil yang diperoleh didokumentasikan melalui alat komputer dan *multiscan*.

Analisis Fisiko-Kimia

Analisis rendemen diperoleh dari perbandingan berat kering gelatin yang dihasilkan dengan berat *ossein* (Mahmoodani *et al.*, 2014). Analisis derajat keasaman (pH), dilakukan dengan menggunakan sampel gelatin sebanyak 10 g yang dilarutkan dengan aquades hingga mencapai volume 100 ml. Pengukuran pH larutan gelatin menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan standar pH 4 dan 7. Analisis

kekuatan gel, dilakukan dengan menggunakan *texture analyzer* menurut metode peneliti sebelumnya (GMIA, 2012). Gelatin cair yang telah melalui proses ekstraksi dan penyaringan dengan kertas saring dimasukkan dalam *refrigerator* pada suhu 10°C selama 17±2 jam (gelatin cair telah membentuk gel), kemudian diukur kekuatan gel. Kekuatan gel diukur dengan menggunakan alat *Texture Analyzer Brookfield*. Alat ini menggunakan probe dengan luas 0,1923 cm². Sampel diletakkan dibawah probe dan dilakukan penekanan dengan beban 97 g. Tinggi kurva kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong. Perhitungan kekuatan gel diukur terlebih dahulu dengan menghitung D atau *dyne/cm²* yang didapatkan dengan menggunakan rumus hasil perkalian antara tinggi kurva/beban (dalam g) dan konstanta (yaitu 0,07) yang kemudian dikalikan 980. Kekuatan gel (bloom) didapat dari penambahan 20 dengan 2,98x10⁻³ yang kemudian dikalikan dengan nilai D.

Analisis Profil Tekstur

Analisis profil tekstur sampel gelatin yang digunakan sama dengan kekuatan gel yang digunakan. Uji analisis profil tekstur dilakukan dengan menggunakan *Texture Analyzer* menggunakan *probe TA5* dengan diameter *plate* 75 mm. Nilai tekanan maksimal yaitu 40%. Karakteristik tekstur gelatin meliputi kekerasan (*hardness*), kekenyalan (*gumminess*), dan daya kunyah (*chewiness*). Prinsip dan penggunaan *Texture Profile Analysis* (TPA) dengan kecepatan probe yang diatur 2 mm/s dan sampel ditekan sampai 30% tinggi awalnya. Deformasi target diatur 5 mm. TPA adalah memberikan gaya tekan terhadap produk sebanyak dua kali dimana alat tersebut sebagai stimulasi pada saat proses pengunyahan. Kekerasan (*hardness*) merupakan kerja yang diperlukan agar mampu menimbulkan deformasi pada suatu bahan. Kohesivitas merupakan rasio dari area tekanan positif pada penekanan pertama dan kedua. Kekenyalan adalah kepadatan yang bertahan sepanjang pengunyahan atau energi yang dibutuhkan untuk menghancurkan makanan semipadat ke keadaan siap ditelan. Perhitungan kekenyalan diperoleh dari perhitungan kekerasan dikalikan dengan kohesivitas. Elastisitas (*springiness*) merupakan jarak dimana makanan kembali pada tinggi mula-mula selama akhir gigitan pertama dan gigitan kedua. Daya kunyah (*chewiness*) adalah energi yang dibutuhkan untuk mengunyah makanan hingga siap ditelan. Perhitungan daya kunyah dapat diperoleh menggunakan rumus perkalian antara kekenyalan dan elastisitas (GMIA, 2012).

Analisis Viskositas

Analisis viskositas dilakukan menggunakan *viscometer Brookfield* (GMIA, 2012). Larutan gelatin dengan konsentrasi 6,67% (b/b) disiapkan dengan aquades (7 g gelatin ditambah 105 ml aquades) kemudian larutan diukur viskositasnya dengan menggunakan alat *Viscometer Brookfield*. Pengukuran dilakukan pada suhu 60°C dengan laju geser 60 rpm

menggunakan spindel. Hasil pengukuran dikalikan dengan faktor konversi. Pengujian ini menggunakan spindel SC4-31 dengan faktor konversinya adalah satu, nilai viskositas dinyatakan dalam satuan centipoise (cP).

Analisis Kadar Air

Analisis kadar air menggunakan metode oven (AOAC 1995). Cawan aluminium dikeringkan dalam oven selama 15 menit dengan suhu 100°C. Kemudian didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Sampel sebanyak 1-2 g dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam sampai tercapai berat konstan. Selanjutnya cawan beserta isinya didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Perhitungan kadar air dilakukan dengan melakukan perbandingan berat sebelum dan setelah dilakukan pengovenan dalam satuan persen.

Analisis Kadar Abu

Analisis kadar abu dilakukan menggunakan metode tanur (AOAC 1995). Cawan porselen dikeringkan dalam oven bersuhu 100°C, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sebanyak satu gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan porselen. Selanjutnya sampel dilakukan pengabuan di dalam tanur listrik pada suhu 550°C selama 5–6 jam atau sampai terbentuk abu. Sampel kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Perhitungan kadar abu dilakukan dengan menghitung perbandingan berat sebelum dan setelah dilakukan proses tanur.

Analisis Kadar Lemak

Analisis kadar lemak dilakukan menggunakan metode ekstraksi soxhlet (AOAC, 1995). Labu lemak yang akan digunakan dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C, lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sebelum pengukuran kadar lemak, sampel yang telah ditimbang 1 g dihidrolisis terlebih dahulu. Hasil hidrolisis kemudian disaring dan dibungkus dengan selongsong kemudian disumbat dengan kapas dan dimasukkan ke dalam alat ekstraksi (soxhlet) yang dihubungkan dengan kondensor dan labu lemak. Selanjutnya diekstraksi selama 4 jam. Labu lemak yang berisi lemak hasil ekstraksi dikeringkan dalam oven suhu 105°C hingga 5 jam, setelah itu didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Berat lemak dihitung dengan menggunakan rumus perbandingan berat awal dan akhir dalam satuan persen.

Analisis Kadar Protein

Analisis protein dilakukan menggunakan metode semimikro-kjeldahl (AOAC, 1995). Sejumlah kecil sampel yaitu sekitar 0,5 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu kjeldahl 30 ml. Kemudian ditambahkan 0,9 g K₂SO₄, 40 mg HgO, dan 2 ml H₂SO₄. Jika bobot sampel lebih dari 15 mg, ditambahkan 0,1 ml H₂SO₄ untuk setiap 10 mg bahan organik di atas 15 mg. Sampel dididihkan selama 1–1,5 jam sampai cairan

menjadi jernih. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam alat destilasi, dibilas dengan akuades, dan ditambahkan 10 ml larutan NaOH 30%. Gas NH₃ yang dihasilkan dari reaksi dalam alat destilasi ditangkap oleh H₃BO₃ dalam erlenmeyer yang telah ditambahkan 3 tetes indikator (campuran 2 bagian merah metil 0,2% dalam alkohol dan 1 bagian *methylene blue* 0,2% dalam alkohol). Kondensat tersebut kemudian dititrasi dengan HCl 0,1 N yang sudah distandardisasi hingga terjadi perubahan warna kondensat menjadi abu-abu. Penetapan blanko dilakukan dengan metode yang sama seperti penetapan sampel. Kadar protein dihitung dengan melakukan perhitungan selisih volume titrasi dan blanko dikalikan normalitas HCl dan 0,014, faktor konversi gelatin (yaitu 5,55), faktor pengenceran yang dibagi dengan bobot sampel dikalikan 100%

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Gelatin Tulang Ikan Patin

Tahap awal dilakukan proses produksi gelatin dari tulang ikan patin dan dikerjakan analisis pendeteksian protein gelatin menggunakan SDS PAGE. Proses produksi gelatin tulang ikan patin diawali dengan pengumpulan tulang ikan patin mentah yang diambil dari hasil samping (limbah) pengolahan ikan dari CV Karunia Mitra Makmur daerah Cikampek, Jawa Barat. Kemudian bahan baku tulang ikan yang didapat dilakukan proses *degreasing*, yaitu proses penghilangan daging, kotoran, dan lemak yang masih menempel pada tulang ikan. Proses ini dilakukan pada suhu 80°C selama 30 menit, hingga sisa daging dapat terpisah dari tulang dan penggunaan suhu tersebut sesuai dengan titik kelarutan dari lemak dan suhu koagulasi albumin, yaitu berkisar antara 32-80°C. Penggunaan suhu lebih dari 80°C dapat mengurangi banyaknya kolagen yang dihasilkan. Waktu 30 menit pada proses *degreasing* merupakan waktu yang optimum untuk mengurangi jumlah lemak yang terdapat pada tulang. Setelah itu tulang yang telah dibersihkan disimpan di *freezer* selama ±12 jam untuk mengeringkan tulang setelah proses *degreasing* agar lebih mudah dihancurkan dengan *meat cutter* (Atma dan Rhamdani, 2017).

Tulang ikan yang telah dibersihkan dari daging, kotoran dan lemak kemudian dikeringkan sebelum dihancurkan menggunakan *meat cutter*. Pengecilan ukuran tulang dilakukan sebelum proses *pre-treatment* dan *main extraction*. Pengecilan ukuran tulang bertujuan untuk memperluas bidang permukaan sehingga pada proses *pre-treatment* dan ekstraksi utama, reaksi berlangsung lebih cepat. Pengecilan ukuran tulang ikan patin pada penelitian ini menggunakan *meat cutter* yang berbentuk seperti tabung besar yang didalamnya terdapat mata pisau untuk menghancurkan tulang. Setelah proses pengecilan tulang ikan, proses selanjutnya adalah proses *pre-treatment*.

Pre-treatment merupakan proses penghilangan kalsium dan garam-garam mineral yang terdapat di dalam tulang sehingga tulang yang dihasilkan menjadi lunak atau disebut *ossein* yang terdapat kolagen

didalamnya. Selama proses berlangsung tulang ikan patin di aduk menggunakan *shaker*. Proses *pre-treatment* dilakukan menggunakan larutan asam sitrat 1% dengan lama *pre-treatment* 24, 32, 48 dan 56 jam. Pada perendaman lebih dari 24 jam larutan asam sitrat diganti setiap harinya (Atma dan Ramdhani, 2017).

Penggunaan larutan *pre-treatment* biasanya menggunakan larutan HCl dengan rentang konsentrasi HCl 2-6% dan lama perendaman yang relatif singkat yaitu 2-3 hari (Haris, 2008). Proses *pre-treatment* pada penelitian menggunakan asam sitrat 1%. Tahapan selanjutnya adalah proses *main extraction* menggunakan berbagai perlakuan suhu, yaitu 45, 55, 65 dan 75°C selama 5 jam. Perlakuan pada berbagai suhu untuk mengetahui suhu optimal ekstraksi protein dalam tulang ikan patin. Proses ekstraksi ini terjadi konversi dari kolagen menjadi gelatin. Waktu ekstraksi utama selama 5 jam merupakan waktu optimum, karena jika lebih dari 5 jam maka *ossein* akan hancur dan larut bersama *aquadest* (Rahayu dan Fithriyah, 2015). Larutan gelatin yang telah dihasilkan kemudian disaring menggunakan kertas saring. Setelah itu, dilakukan identifikasi bobot molekul menggunakan SDS-PAGE.

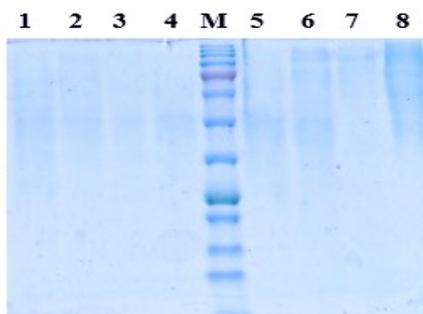
Analisis Bobot Molekul Gelatin dengan SDS-PAGE

Hasil yang didapatkan dari elektroforesis yaitu berupa pita-pita protein yang terpisahkan berdasarkan perbedaan berat molekulnya yang setara dengan panjang rantai protein. Migrasi pita protein dalam SDS PAGE berbanding terbalik dengan berat molekulnya (panjang pita), maka semakin besar berat molekul produk gelatin semakin lambat migrasinya sehingga posisinya pada elektroforegram semakin di atas. Berat molekul gelatin berbeda-beda, bobot molekul gelatin rata-rata berkisar mulai dari 50.000-200.000 Da atau lebih (Haris, 2008).

Terdapat 16 sampel yang di *running* menggunakan SDS PAGE. Hasil *running* memperlihatkan adanya pita protein dari berbagai perlakuan dengan lama *pre-treatment* dan suhu *main extraction*. Tujuan analisis SDS PAGE yaitu mengetahui bobot molekul protein yang terkandung disetiap perlakuan sampel. Pita protein yang paling terlihat jelas yaitu pada waktu *pre-treatment* 48 jam dengan suhu *main extraction* 75 °C. Hasil analisis SDS PAGE dapat dilihat pada Figur 1 dan 2.

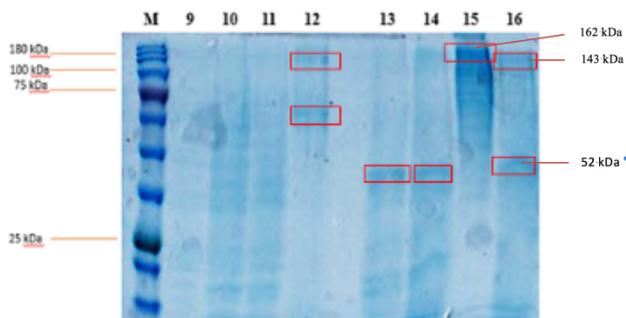
Pita protein pada sampel 1, 2, 3, dan 4 sangat tipis yang terlihat, tetapi pita protein mulai sedikit terlihat pada sampel 5, 6, 7 dan 8, dapat dilihat pada Gambar 1. Hal ini dikarenakan pada sampel 1, 2, 3 dan 4 menggunakan suhu minimum yaitu 45°C dan protein dalam tulang ikan patin tidak terdenaturasi (Atma dan Ramdhani, 2017). Pada sampel nomor 6 dan 8 pita yang terlihat diatas 100 kDa, tetapi pita protein terlalu tipis. Sampel nomor 13 dan 14 bobot molekul dibawah 75 kDa yaitu 38 kDa. Sampel nomor 12 dan 16 terdapat pita protein diatas 100 kDa yaitu 143 kDa, tetapi tidak terlihat jelas, pita protein yang terlihat jelas berada pada sampel 15 yaitu dengan waktu *pre-treatment* selama 48 jam dan suhu ekstraksi utama 75 °C. Pita protein pada

sampel 15 memiliki bobot molekul yang cukup tinggi yaitu 162 kDa. Bobot molekul tersebut menunjukkan keberadaan rantai β -sheet (160-250 kDa) dapat dilihat pada Gambar 2. Penelitian Mahmoodani *et al.* (2014) tentang ekstraksi gelatin tulang ikan patin menggunakan asam klorida menunjukkan bahwa berat molekul gelatin berada pada kisaran >97-120 kDa termasuk ikatan α , sedangkan ikatan β dan γ berada pada 200-300 kDa.



Figur 1. Elektroforegram hasil optimasi ekstraksi gelatin dengan SDS-PAGE.

Keterangan : M (Marker 245 kDa), 1 (24 jam/45°C), 2 (32 jam/45°C), 3 (48 jam/45°C), 4 (56 jam/45°C), 5 (24jam/55°C), 6 (32 jam/55°C), 7 (48 jam/55°C), 8 (56 jam/55°C).



Figur 2. Elektroforegram hasil optimasi ekstraksi gelatin dengan SDS-PAGE.

Keterangan : M (Marker 245 kDa), 9 (24 jam/65°C), 10 (32 jam/65°C), 11 (48 jam/65°C), 12 (56 jam/65°C), 13 (24jam/75°C), 14 (32 jam/75°C), 15 (48 jam/75°C), 16 (56 jam/75°C).

Perhitungan bobot molekul diperoleh dari hasil perkalian berat molekul (BM) protein standar dengan nilai faktor retensi (Rf). Faktor retensi diperoleh dari pembagian jarak pita dengan berat molekul protein standar. Nilai R_f dari marker protein didapatkan nilai $R^2 = 0,9564$, semakin mendekati 1 maka persamaan regresi linier semakin menunjukkan kepastian dari berat molekulnya. Setelah itu bobot molekul dapat dihitung melalui persamaan regresi linier dari marker protein yakni $y = -1,444x + 2,2649$. Kurva regresi linier dapat dilihat pada Figur 3.

Selanjutnya, gelatin dengan *pre-treatment* 48 jam dengan suhu *main extraction* 75°C dilakukan produksi skala besar untuk ke tahap analisis fisiko-kimia. Pengujian fisiko-kimia gelatin yang telah melalui proses *main extraction* di saring menggunakan kertas saring dan diletakan di dalam refrigerator pada suhu 4-10°C selama ± 12 jam. Selanjutnya, gelatin cair dikeringkan dengan menggunakan *dehydrator* pada suhu 60°C selama ± 3 jam menggunakan plastik mika, kemudian

gelatin yang telah mengering dilakukan analisis fisik dan kimia.

Tabel 1. Perhitungan *Retention Factor* (RF) Hasil SDS-PAGE menggunakan *Protein Marker* 245 kDa

MW Marker (kDa)	log MW Marker	Panjang pita (cm)	RF
245	2,389	0,2	0,0377
180	2,255	0,3	0,0566
140	2,146	0,4	0,0755
100	2,000	0,6	0,1132
75	1,875	1	0,1887
60	1,778	1,4	0,2642
45	1,653	2	0,3774
35	1,544	2,7	0,5094
25	1,398	3,5	0,6604
20	1,301	3,8	0,7170
15	1,176	4,4	0,8302
10	1,000	4,8	0,9057
5	0,699	5,1	0,9623
Sampel nomor 12		0,4	0,0755
		1,4	0,2642
Sampel nomor 13		2,5	0,4717
Sampel nomor 14		2,5	0,4717
Sampel nomor 15		0,2	0,0377
Sampel nomor 16		0,4	0,0755
		2	0,3774

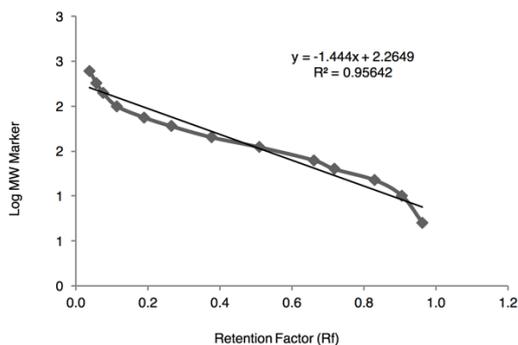
Keterangan : Panjang gel 5,3 cm

Tabel 2. Perhitungan Bobot Molekul Protein Gelatin

Sampel Nomor	Nilai Rf (x)	Nilai y	Bobot Molekul (kDa)
12	0,0755	2,1559	143
	0,2642	1,8834	76
13	0,4717	1,5838	38
14	0,4717	2,1559	38
15	0,0377	2,2104	162
16	0,0755	2,1559	143
	0,3774	1,7199	52

Tabel 3. Komposisi gel untuk SDS- PAGE

Senyawa kimia	Separating gel 10%	Konsentrat gel 3,9 %
1,5 M Tris HCl pH 8,8	1,875 ml	-
0,5 M Tris HCl pH 6,8	-	0,625 ml
44% Akrilamid	1,681 ml	0,244 ml
2H ₂ O	3,94 ml	1,61 ml
10% APS	25 µl	12,5 µl
TEMED	2,25 µl	2,5 µl
Total	7,5 ml	2,5 ml



Figur 3. Kurva Regresi Linier Bobot Molekul *Protein Marker*

Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu aspek dari parameter yang diterapkan dalam penentuan standar mutu gelatin. Pengukuran nilai pH menggunakan alat pH meter sebagaimana tampil pada Tabel 4. Menurut Iqbal *et al.* (2015) pengukuran nilai pH penting dilakukan karena pH larutan mempengaruhi sifat-sifat gelatin lainnya seperti viskositas, kekuatan gel dan berpengaruh juga terhadap aplikasi gelatin dalam produk. Hasil uji pH gelatin tulang ikan patin adalah 4,462, nilai tersebut memenuhi Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-3735 (1995) dan standar GMIA (2012).

Tabel 4. Hasil karakteristik fisik gelatin tulang ikan patin

Karakteristik Fisik	Hasil Penelitian	GMIA	SNI 06-3735	Iqbal <i>et al</i> (2015)
pH	4,46	3,8-6,0	4,5-6,5	4,2
Kekuatan gel (bloom)	364,19±0,04	75-300	-	136,439
Viskositas (cP)	3,83±0,08	1,5-7,5	-	3,025

Kekuatan gel

Kekuatan gel adalah salah satu parameter dari tekstur suatu bahan dan merupakan gaya untuk menghasilkan deformasi tertentu. Hasil pengukuran kekuatan gel pada gelatin dari tulang ikan patin yang diperoleh yakni 364,19 bloom (Tabel 4). Kekuatan gel pada penelitian ini lebih besar dari penelitian Mahmoodani *et al.* (2014) yaitu 254,7 bloom dan penelitian Iqbal *et al.* (2015) yaitu 136,439 bloom.

Nilai kekuatan gel pada penelitian ini terbilang tinggi karena pengujian sampel dilakukan setelah proses gelatin diekstraksi dan dilakukan penyaringan dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam refrigerator pada suhu 10 °C selama 17±2 jam (sampai gelatin cair telah membentuk gel), sehingga konsentrasi gelatin lebih pekat. Kekuatan gel merupakan sifat fisik gelatin yang berhubungan dengan aplikasi pada produk pangan. Nilai kekuatan gel gelatin untuk diaplikasikan ke dalam produk *confectionery* adalah >175 bloom (Damayanti, 2007).

Viskositas

Viskositas gelatin menunjukkan daya aliran molekul dalam suatu larutan baik itu air, cairan organik sederhana dan suspensi encer. Sistem koloid dalam larutan dapat meningkat dengan cara mengentalkan cairan, sehingga terjadi absorpsi dan pengembangan koloid (Haris 2008). Pengujian viskositas dilakukan untuk mengetahui tingkat kekentalan gelatin sebagai larutan pada konsentrasi dan suhu tertentu. Menurut Setiawati (2009) viskositas berhubungan dengan berat molekul (BM) rata-rata gelatin dan distribusi molekul. Bobot molekul gelatin berhubungan langsung dengan panjang rantai asam amino. Semakin panjang rantai asam amino maka nilai viskositas akan semakin tinggi.

Nilai viskositas penelitian ini diperoleh 3,83 cP (Tabel 4). Nilai viskositas penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Iqbal *et al.* (2015) yaitu hanya sebesar 3,025 cP. Nilai viskositas ini memenuhi persyaratan standar GMIA (2012) yaitu 3,8-6,0 cP

sedangkan Standar Nasional Indonesia (SNI) belum menentukan standardisasinya.

Profil Tekstur

Hasil profil tekstur gelatin tulang ikan patin pada penelitian yaitu kekenyalan 17,1 g yang didapat dari perkalian antara kekerasan dan kohesivitas. Daya kunyah sebesar 261,76 g yang didapat dari perkalian antara kekenyalan dan elastisitas. Daya kunyah (*chewiness*) yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Mahmoodani *et al.* (2014) yaitu 214,2 g. Hasil profil tekstur gelatin tulang ikan patin dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil profil tekstur gelatin tulang ikan patin

Karakteristik Fisik	Hasil Penelitian
Kekerasan (<i>hardness</i>) (g)	8
Kohesivitas (<i>cohesiveness</i>)	2,14
Elastisitas (<i>springiness</i>) (mm)	15,29
kekenyalan (<i>gumminess</i>) (g)	17,1
Daya kunyah (<i>chewiness</i>) (g)	261,76

Karakteristik Kimia Gelatin Tulang Ikan Patin

Karakterisasi fisiko-kimia gelatin menggunakan metode analisis proksimat yang terdiri atas kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak. Hasil analisis fisiko-kimia gelatin dibandingkan dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-3735 (1995) dan standar lain yaitu *Gelatin Manufactures Institute of America* (GMIA) dan dibandingkan dengan penelitian Iqbal *et al.* (2015) tentang gelatin tulang ikan lele dumbo yang diekstraksi menggunakan asam sitrat, hal tersebut untuk mengetahui perbandingan hasil penelitian gelatin tulang ikan patin yang telah dilakukan.

Kadar Air

Pengujian terhadap kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan air dalam gelatin tulang ikan patin. Kadar air merupakan parameter penting dari suatu produk pangan, karena kadar air sangat erat hubungannya dengan waktu simpan gelatin. Kadar air gelatin tulang ikan patin yang dihasilkan dalam penelitian ini sebesar 7,72% (Tabel 6). Nilai ini lebih baik dari nilai kadar air dalam penelitian Iqbal *et al.* (2015) yang mengekstraksi gelatin dari tulang ikan lele dumbo menggunakan asam sitrat sebesar 13,12%. Kadar air dalam penelitian ini telah memenuhi standar dari SNI 06-3735 (1995) yaitu maksimal 16%.

Tabel 6. Hasil karakteristik kimia gelatin tulang ikan patin (%b/b)

Karakteristik	Hasil Penelitian	GMIA	SNI 06-3735	Iqbal <i>et al.</i> (2015)
Kadar Air	7,72±0,01	-	Maks. 16	13,12
Kadar Abu	0,38±0,08	0,3-2,0	Maks. 3,25	12,10
Kadar Protein	58,70±0,01	-	-	65,42
Kadar Lemak	2,79±0,06	-	-	-

Kadar Abu

Abu adalah zat anorganik sisa dari hasil pembakaran suatu bahan organik yang ada pada bahan pangan. Penentuan kadar abu merupakan salah

satu cara untuk mengetahui kemurnian suatu bahan (Iqbal *et al.*, 2015). Tinggi atau rendahnya kadar abu suatu bahan disebabkan oleh kandungan mineral yang ada pada bahan baku.

Kadar abu dalam gelatin tulang ikan patin hasil penelitian ini adalah 0,38% (Tabel 6), kadar abu pada penelitian ini memenuhi standar SNI 06-3735 (1995) dan memenuhi standar GMIA (2012), sedangkan pada penelitian Iqbal *et al.* (2015), kadar abu sangat jauh berbeda dengan hasil yang didapat maupun dengan standar yang ada yaitu 12,1%. Kadar abu adalah salah satu parameter yang digunakan untuk melihat kualitas dan tingkat keberhasilan dari proses ekstraksi pada gelatin. Tahapan proses *pre-treatment* gelatin yang dilakukan adalah untuk menghilangkan mineral dalam tulang ikan patin, sehingga menghasilkan *ossein* yang selanjutnya diekstraksi menjadi gelatin.

Penelitian ini menunjukkan bahwa proses *pre-treatment* berlangsung dengan cukup baik sebab dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* selama *pre-treatment* berlangsung, sehingga mineral yang terbawa tidak banyak saat penyaringan gelatin.

Kadar Protein

Gelatin sebagai salah satu jenis protein konversi yang dihasilkan melalui proses hidrolisis kolagen, tentunya memiliki kadar protein yang tinggi. Kadar protein menunjukkan seberapa besar kandungan protein yang terdapat dalam suatu bahan pangan. Hasil pengujian kadar protein gelatin tulang ikan patin yang dihasilkan, yaitu sebesar 58,70% (Tabel 6). Nilai ini lebih rendah dari nilai kadar protein dalam penelitian Iqbal *et al.* (2015) yaitu 65,42%. Perbedaan nilai kadar protein ini diduga karena perbedaan konsentrasi asam sitrat yang digunakan dalam pembuatan gelatin. Penetapan standar kadar protein belum ditetapkan dalam SNI dan GMIA, sehingga tidak dapat dibandingkan dengan standar yang ada.

Kadar Lemak

Penentuan kadar lemak berpengaruh terhadap mutu bahan selama penyimpanan. Gelatin yang bermutu tinggi diharapkan memiliki kandungan lemak yang rendah (Haris 2008). Hasil analisis uji kadar lemak gelatin tulang ikan patin sebesar 2,79% (Tabel 6). Nilai ini lebih tinggi dari pada kadar lemak gelatin dari penelitian yang dilakukan oleh (Damayanti 2007) yaitu 1,83%. Menurut Haris (2008) nilai kadar lemak yang cukup tinggi ini diakibatkan oleh lemak yang belum keluar secara maksimal pada saat proses *degreasing*. Kadar lemak yang cukup tinggi memungkinkan akan mempengaruhi mutu gelatin selama penyimpanan. Kandungan lemak akan lepas pada saat proses perendaman dengan asam sitrat dan pada saat ekstraksi. Pemanasan akan mengakibatkan kerusakan lemak sehingga lemak akan terpisah dengan tulang dan terapung dipermukaan. Hal ini diakibatkan juga semakin besarnya suhu, maka berat jenis lemak akan semakin menurun sehingga lemak akan melayang di permukaan.

Rendemen gelatin

Rendemen merupakan parameter penting untuk menilai efektivitas produksi gelatin tulang ikan patin. Gelatin cair (filtrat gelatin) yang telah melalui proses penyaringan dikeringkan menggunakan *food dehydrator* dengan suhu 60°C selama $\pm 3-4$ jam. Gelatin yang sudah mengering, kemudian dikerik dan ditimbang untuk mengetahui rendemen gelatin tulang ikan patin.

Tabel 7. Rendemen Gelatin Tulang Ikan Patin

Berat tulang ikan (g)	Berat Ossein (g)	Berat Gelatin Kering (g)	Rendemen (%)	Rerata (%)
100	81,786	5,109	6,24	6,14 \pm 0,02
150	127,721	7,714	6,04	

Semakin besar nilai rendemen yang dihasilkan maka semakin efisien perlakuan yang diberikan. Nilai rendemen gelatin tulang ikan patin menggunakan asam sitrat 1% dengan lama *pre-treatment* 48 jam dan suhu *main extraction* 75°C yaitu 6,14% (Tabel 7), dan lebih besar jika dibandingkan penelitian Iqbal *et al.* (2015) yaitu hanya sebesar 2,90% yang menggunakan asam sitrat 5,8% dengan waktu *pre-treatment* 41 jam dan suhu ekstraksi 70°C. Perbedaan rendemen yang dihasilkan karena jenis tulang ikan, konsentrasi asam sitrat yang digunakan, waktu *pre-treatment* dan *main extraction* yang berbeda.

Menurut Haris (2008) jumlah nilai rendemen dipengaruhi oleh konsentrasi larutan asam sitrat yang digunakan dalam perendaman. Tinggi konsentrasi larutan asam yang digunakan akan menyebabkan larutan perendaman semakin asam, sehingga ion H⁺ yang menghidrolisis kolagen dari rantai *triple helix* menjadi rantai tunggal semakin banyak. Konsentrasi yang tinggi serta waktu perendaman yang lama diduga dapat mengurangi jumlah rendemen gelatin yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan pada perlakuan tersebut *ossein* yang dihasilkan menjadi sangat lunak dan hancur sehingga menyebabkan banyak *ossein* yang hilang selama proses penetralan. Menurut Puspawati *et al.* (2015) perendaman dengan asam sitrat 1% merupakan proses perendaman yang paling efektif untuk menghasilkan gelatin dengan rendemen tinggi.

Kesimpulan

Hasil penelitian ekstraksi gelatin tulang ikan patin terbaik dengan asam sitrat 1% yaitu dengan waktu *pre-treatment* 48 jam dan suhu *main extraction* 75°C. Bobot molekul gelatin tulang ikan patin yang didapat yaitu 162 kDa. Hasil rendemen gelatin yang didapatkan sebesar 6,14%. Nilai pH, kekuatan gel, daya kunyah, dan viskositas dapat terdeteksi dengan baik. Kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak juga dapat terkarakteristik dengan baik serta dapat dibandingkan dengan SNI 06-3735 dan GMIA.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini disponsori oleh Indofood Riset Nugraha dalam rangka program penghargaan bagi peneliti unggul bidang pengembangan pangan.

Daftar Pustaka

- Adiningsih, Y., Purwanti, T. 2015. Karakterisasi mutu gelatin ikan tenggiri (*Scomberomorus commersonii*) dengan perendaman menggunakan asam sulfat dan asam sitrat. *Jurnal Riset Teknologi Industri* 9(2): 149-156. DOI:10.26578/jrti.v9i2.1713.
- Atma, Y. 2016. Pemanfaatan limbah ikan sebagai sumber alternatif produksi gelatin dan peptida bioaktif: Review. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi*, Jakarta: 8-9 November.
- Atma, Y. 2017. Amino acid and proximate composition of fish bone gelatin from different warm-water species: A comparative study. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 58:1-5. DOI:10.1088/1755-1315/58/1/012008.
- Atma, Y., Ramdhani, H. 2017. Gelatin extraction the indogenous pangasius catfish bone using pineapple liquid waste. *Indonesian Journal of Biotechnology* 22(2):86-91. DOI 10.22146/ijbiotech.32472.
- Association of Official Analytical (AOAC). 1995. *Official Methods of Analysis 16th Edition*. Maryland (US): Association of Official Analytical Chemist.
- Damayanti, D. 2007. Aplikasi gelatin dari tulang ikan patin pada pembuatan permen jelly. Data tidak dipublikasikan.
- Fatimah, D., Jannah, A. 2009. Efektivitas penggunaan asam sitrat dalam pembuatan gelatin tulang ikan bandeng. (*Chanos-chanos forskal*). *Alchemy* 1(1): 7-15. DOI:10.18860/al.v0i0.1663.
- Gelatin Manufactures Institute of America (GMIA). 2012. *Gelatin Handbook*. Gelatin Manufactures Institute of America [Internet]. [Diunduh 9 Oktober 2017. Tersedia pada: http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Manual_2012.pdf]
- Haris, M.A. 2008. Pemanfaatan limbah tulang ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sebagai gelatin dan pengaruh lama penyimpanan pada suhu ruang. Data tidak dipublikasikan.
- Indrialaksmi, O. 2000. Pembuatan dan Karakterisasi Sifat Fisik Gelatin dari Kulit dan Tulang Ikan Cucut. Data tidak dipublikasikan.
- Iqbal, M., Anam, C., Ridwan, A. 2015. Optimasi rendemen dan kekuatan gel gelatin ekstrak tulang ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus* sp.). *Jurnal Teknosains Pangan* 4(4): 8-16.
- Karim, A.A., Bhat, R. 2009. Review Fish Gelatin: Properties. Challenges and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Trends in Food Science and Technology* 19: 644-656.
- Mahmoodani, F., Ardekani, V.S., See, S.F., Yusop, S.M., Babji, A.S. 2014. Optimization and physical properties of gelatin extracted from pangasius catfish (*Pangasius sutchi*) bone. *Journal Food Science and Technology* 51(11): 3104-3113. DOI: 10.1007/s13197-012-0816-7
- Mariod, A.A., Adam, H.F. 2013. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 12(2): 135-147.

- Nurul, A.G., Sarbon, N.M. 2015. Effects of pH on functional, rheological and structural properties of eel (*Monopterus* sp.) skin gelatin compared to bovine gelatin. *International Food Research Journal* 22(2): 572-583.
- Puspawati, N.M., Widihati, I.A., Widana, I.N. 2015. Analisis komposisi asam amino dan pola protein gelatin halal dari kulit ayam broiler. Data tidak dipublikasikan.
- Rahayu, F., Fithriyah, N.H. 2015. Waktu ekstraksi terhadap remdemen gelatin dari tulang ikan nila merah. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi*, Jakarta: 17 November.
- Ratnasari, I., Yuwono, S.S., Nusyam, H., Widjanarko, S.B. 2013. Extraction and characterization of gelatin from different fresh water fishes as alternative sources of gelatin. *International Food Research Journal* 20(6): 3085-3091.
- Santoso, C., Surti, T, Sumardianto. 2015. Perbedaan penggunaan konsentrasi larutan asam sitrat dalam pembuatan gelatin tulang rawan ikan pari mondol (*Himantura gerrardi*). *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan* 4(2): 106-114.
- Setiawati, I.H. 2009. Karakterisasi Mutu Fisika Kimia Gelatin Kulit Ikan Kakap Merah (*Lutjanus* sp.) Hasil Proses Perlakuan Asam. Data tidak dipublikasikan.
- Shyni, K., Hema, G.S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C.G., Lakshmanan, P.T. 2014. Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocolloids* 39: 68-76. DOI : 10.1016/j.foodhyd.2013.12.008.
- Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-3735. 1995. Mutu dan Cara Uji Gelatin. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Syahaeni, Anwar, M., Hasri. 2017. Pengaruh konsentrasi asam sitrat dan waktu demineraliasi pada perolehan gelatin dari tulang ikan kakap merah (*Lutjanus* sp.). *Analytical and Environmental Chemistry* 2(1): 53-62.
- Walker, J.M. 2009. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Di dalam: Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. 3rd Edition. UK: Human Press. hlm 177-186.