

Perbandingan Karakteristik Nanopartikel Kolagen dari Limbah Tulang Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*) dengan Menggunakan *Ball Mill* dan *Magnetic Stirrer*

Lilis Tuslinah, Ade Yeni Aprilia, Vika Jenika*

Program Studi Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya, Indonesia

*Corresponding author: vikajenika866@gmail.com

Abstract

Tuna fish bones have a protein content of around 24-35%, which can be processed into collagen. Collagen from fish bones is classified as type I collagen, which contains large amounts of the amino acids glycine, alanine, proline, and hydroxyproline. Nano collagen is a form of collagen reduced to nanoparticle size that has rapid treatment capabilities to improve healing and cell growth. The method for making collagen nanoparticles uses two methods, namely, the top-down method using a ball mill and salting out using a magnetic stirrer. This study aims to compare the characteristics of collagen nanoparticles from tuna bone waste (*Euthynnus affinis*) made using a ball mill and a magnetic stirrer. Making nanoparticles using a magnetic stirrer with acetic acid solvent and salting out with ammonium hydroxide produces the smallest particle size, namely 528 nm with a polydispersity index of 0.4932 and a potential of -18.29 mV. In comparison, nanoparticles made using a ball mill have a particle size index of 542.3 nm, polydispersity 0.511 and potential -15.43 mV. Morphological analysis using SEM shows that collagen nanoparticles have a spherical or round and irregular shape. It can be concluded that making collagen nanoparticles using the magnetic stirrer method produces better characteristics than the ball mill method.

Keywords: Tuna fish bones, collagen, nanoparticle.

Abstrak

Tulang ikan tongkol memiliki kandungan protein berkisar 24-35% yang dapat diolah menjadi kolagen. Kolagen dari tulang ikan tergolong kolagen tipe I yang mengandung asam amino glisin, alanin, prolin dan hidroksiprolin dalam jumlah besar. Nanokolagen adalah bentuk kolagen yang direduksi menjadi ukuran partikel nano yang mempunyai kemampuan pengobatan yang cepat untuk meningkatkan penyembuhan dan pertumbuhan sel. Metode pembuatan nanopartikel kolagen menggunakan dua cara yaitu metode *top down* dengan *ball mill* dan *salting out* menggunakan *magnetic stirrer*. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakteristik nanopartikel kolagen dari limbah tulang ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) yang dibuat menggunakan *ball mil* dan *magnetik stirrer*. Pembuatan nanopartikel menggunakan *magnetik stirrer* dengan pelarut asam asetat dan *salting out* dengan amonium hidroksida menghasilkan ukuran partikel terkecil yaitu 528 nm dengan indeks polidispersitas 0,4932 dan potensial -18,29 mV sedangkan nanopartikel yang dibuat menggunakan *ball mill* memiliki ukuran partikel 542,3 nm indeks polidispersitas 0,511 dan potensial -15,43 mV. Analisis morfologi dengan SEM menunjukkan bahwa nanopartikel kolagen memiliki bentuk sferis atau bulat dan tidak beraturan. Dapat disimpulkan bahwa pembuatan nanopartikel kolagen dengan metode *magnetik stirrer* menghasilkan karakteristik yang lebih baik dibandingkan dengan metode *ball mill*.

Kata kunci: Tulang ikan tongkol, kolagen, nanopartikel.

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara kepulauan yang memiliki lautan luas 70% dan 30% daratan. Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) mengenai produksi perikanan tangkap di laut, tahun 2021 untuk ikan tongkol mencapai 593.901 ton, angka ini meningkat jika dibandingkan dengan tahun 2019 yakni sebesar 503.564 ton (Statistika, 2021).

Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*) merupakan salah satu jenis ikan yang hidup di laut serta memiliki kandungan protein tinggi dan baik untuk dikonsumsi. Limbah tulang ikan tongkol memiliki kadar protein berkisar 25-35% yang dapat diolah menjadi kolagen aman dan halal. Kolagen terbentuk oleh asam amino glisin 33%, prolin dan hidrosiprolin 22% dalam triple helix yang dibentuk oleh tiga rantai alfa yang saling berpilin satu sama lain (Nining, 2020).

Nanokolagen adalah bentuk kolagen yang direduksi menjadi ukuran partikel nano. Nanokolagen diaplikasikan dalam berbagai bentuk untuk tujuan pengobatan dan peningkatan penyembuhan luka, pencangkakan tulang, pemberian obat, regenerasi jaringan saraf, pencangkakan pembuluh darah, regenerasi tulang rawan artikular, dan kosmetik (Lo & Fauzi, 2021).

Nanopartikel adalah partikel yang memiliki ukuran 1-100 nanometer, namun menurut (Aleksandra Zielińska et al., 2020) bahwa Nanopartikel Polimer (NP) ada pada rentang 1-1000 nm. Nanopartikel adalah senyawa obat yang dibuat dengan cara pengecilan ukuran menggunakan metode *top-down* seperti penggilingan, tekanan tinggi homogenisasi dan sonikasi. Adapun pada proses *bottom-up* seperti presipitasi reaktif dan perpindahan pelarut (Divya & Jisha, 2018).

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Kusa et al., 2022) menyatakan bahwa pembentukan nanopartikel kolagen dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 35-40°C dengan kecepatan 1.500 rpm selama 3 jam dan dilakukan presipitasi spheris dengan penambahan etanol 96% dengan rasio 1:1 (v/v) memperoleh nilai ukuran partikel terkecil yaitu 73,80 nm. Sedangkan penelitian yang dilakukan (Agustin et al., 2023) menyatakan bahwa pembentukan nanopartikel kolagen

dengan menggunakan *ball milling* memperoleh ukuran partikel yang paling kecil yaitu 4,563 mm dengan jumlah 100 bola dan waktu penggilingan selama 120 menit.

Pembuatan nanopartikel kolagen baik menggunakan *magnetic stirrer* ataupun *ball mill* sudah dilakukan, tetapi tidak ada perbandingan antara keduanya, sehingga perlu dilakukan perbandingan karakteristik nanopartikel kolagen yang dibuat menggunakan *magnetic stirrer* dan *ball mill*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan meliputi tulang ikan tongkol diperoleh dari pasar Cikurubuk Tasikmalaya, HCl p.a (Merck), NaOH p.a (Merck), Etanol 96%, NH₄OH (Merck), aquadest.

Alat

Peralatan yang dipakai pada penelitian ini diantaranya adalah oven (momert digital), *Ball mill* (Bexco), *Magnetic Stirrer*, pH meter (Mettler Toledo), Neraca analitik (Excellent), FTIR (Agilent), PSA (Malvern Panalytical), SEM (Jeol JSM 6360).

Metode

Proses isolasi kolagen

Dilakukan preparasi sampel dengan mencuci tulang ikan tongkol menggunakan air. Selanjutnya dilakukan pretreatment yaitu tulang direndam menggunakan larutan NaOH 0,1 M 1:10 selama 9 jam. Penggantian pelarut tiap 3 jam. Tulang hasil pretreatment dicuci dengan aquadest hingga pH netral. Dilakukan perendaman dengan HCl 4% dan perbandingan 1:4 dengan waktu 3x24 jam pada suhu 16°C. Hasil rendaman HCl, ditambahkan NaOH 0,1 M hingga didapat ekstrak kolagen basah. Pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C dengan lama waktu 2x24 jam.

Analisis kolagen dengan FTIR

Sampel hasil dari ekstraksi tulang ikan tongkol dimasukkan kedalam set holder FTIR kemudian cari serapan yang sesuai, lakukan analisis pada spektrum yang dihasilkan sehingga dapat ditentukan amida A, B, I, II, dan III pada sampel kolagen (Safithri et al., 2020).

Pembuatan nanopartikel kolagen dengan ball mill

Sampel kolagen ditimbang hingga 90 g dan dimasukkan ke dalam chamber sebagai media ball mill yang diisi dengan bola penggiling sebanyak 100 buah, kemudian proses penggilingan dilakukan selama 180 menit dengan kecepatan 120 rpm.

Pembuatan nanopartikel kolagen dengan magnetic stirrer

Menggunakan *magnetic stirrer* yang berkecepatan tinggi (1500 rpm) pada suhu 35-40°C selama 3 jam. Larutkan kolagen dalam larutan asam lalu tambahkan larutan basa agar terjadi salting out sedikit demi sedikit dalam keadaan masih di stirring pada saat terjadi salting out lakukan cek pH menggunakan pH meter.

Pengujian ukuran dan distribusi partikel menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) secara otomatis

Digunakan larutan sampel 1 mL kemudian masukan ke dalam kuvet lalu ditambah dengan aquadest dan dimasukan ke dalam holder alat PSA. Kemudian sampel ditembakkan ke laser gelombang nano pada alat PSA yang akan menghasilkan ukuran partikel dan indeks polidispersitas (Agustin *et al.*, 2023).

Pengujian zeta potensial menggunakan *particle size analyzer* (PSA)

Pengukuran zeta potensial dilakukan menggunakan alat pengukuran ukuran partikel (PSA). Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam kuvet zeta potensial, kemudian dimasukkan ke dalam holder alat PSA.

Pengujian morfologi nanopartikel menggunakan *scanning electron microscope* (SEM)

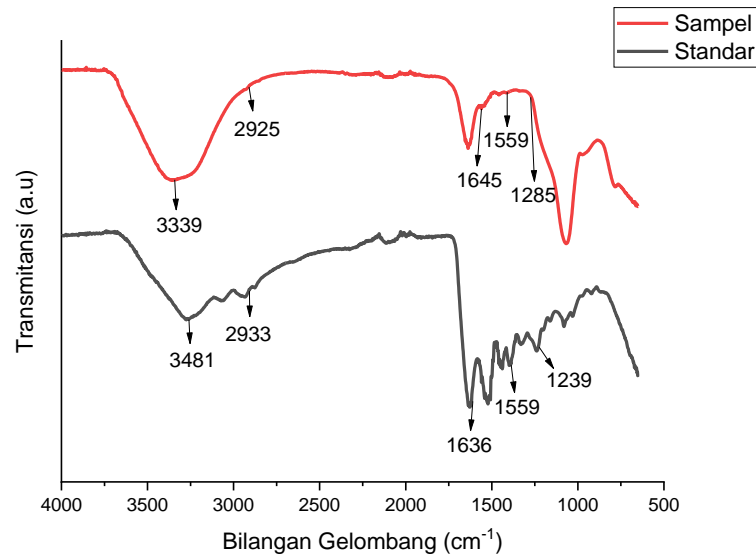
Pengujian dilakukan dengan menggunakan scanning electron microscope. Tujuan uji morfologi ini adalah untuk mengamati struktur permukaan, diameter pori, dan lapisan berpori dan tidak berpori. Sebelum pengamatan SEM dilakukan, serbuk kolagen dilapisi dengan platinum. Selama empat menit, pelapisan dilakukan menggunakan *mini sputter coater* dengan arus 18 mA. Ini dilakukan untuk menghindari kerusakan sampel selama scanning (Romadhon *et al.*, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis puncak serapan menggunakan FTIR dilakukan untuk mengetahui kualitas kolagen hasil isolasi.

Tabel 1. Hasil puncak serapan FTIR

Amida	Wilayah serapan (cm ⁻¹)	Puncak serapan (cm ⁻¹)		Keterangan
		Standar	Sampel	
Amida A	3300-3500	3481	3339	Vibrasi stretching NH
Amida B	2915-2935	2933	2925	Asimetrikal stretching CH ₂
Amida I	1600-1690	1636	1645	Vibrasi stretching C=O
Amida II	1480-1575	1559	1559	NH bending, CH stretching
Amida III	1229-1301	1239	1285	CH sretching, NH bending



Gambar 1. Hasil pemeriksaan spektrum FTIR

Berdasarkan hasil FTIR diatas, isolasi kolagen yang dilakukan merupakan kolagen murni karena adanya Amida III yang menghasilkan struktur *triple helix*. Kolagen memiliki ciri khas Amida III yang dapat menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan kolagen yang belum terhidrolisis menjadi gelatin. Perubahan

daerah serapan Amida III menunjukkan perubahan dari kolagen menjadi gelatin. Bilangan gelombang Amida III pada gelatin lebih rendah daripada kolagen, karena gelatin tidak membentuk *triple helix* tetapi membentuk *single helix* (Agustin et al., 2023).

Tabel 2. Hasil pengujian ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial

Metode	Pelarut	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
<i>Magnetic stirrer</i>	As. Klorida + NaOH	1342±408	0,9025±0,368	-5,608±1,360
	As. Asetat + NaOH	3543 ±252	1±0,1324	-15,56±1,229
	As. Asetat + NH ₄ OH	528±203	0,4932±0,1423	-18,29±2,404
<i>Ball mill</i>	Air	542±395	0,5111±0,110	-15,43±3,631

Menurut (Aleksandra Zielińska et al., 2020) bahwa Nanopartikel Polimer (NP) ada pada rentang 1-1000 nm. Pelarut asam klorida menghasilkan ukuran partikel yaitu 1342 nm, pelarut asam asetat 3543 nm, pelarut amonium hidroksida 528 nm, dan pada *ball mill* memiliki ukuran partikel 542 nm. Hasil ukuran tersebut masuk pada rentang nanopartikel polimer yaitu 1-1000 nm.

Perbedaan ukuran partikel ini dapat disebabkan oleh interaksi antara kolagen dan pelarut selama proses *sizing* menggunakan *magnetic stirrer*. Pelarut asam klorida dan asam asetat cenderung menyebabkan kolagen

terbentuk agregat yang lebih besar, sehingga ukuran partikel yang dihasilkan juga jauh lebih besar (Amirrah et al., 2022). Sebaliknya, pelarut amonium hidroksida dapat mempertahankan struktur kolagen dengan lebih baik, sehingga ukuran partikel yang terbentuk lebih kecil (Darvish, 2022).

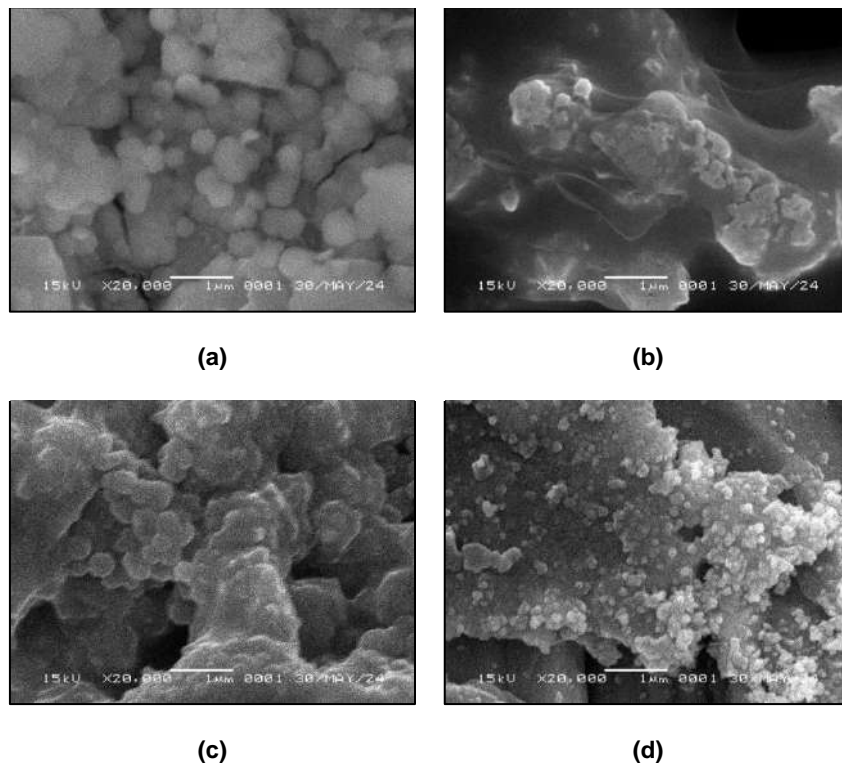
Penggunaan *ball mill* juga memberikan hasil yang berbeda. Ukuran partikel yang dihasilkan pada sampel dengan *ball mill* adalah 542,3 nm, lebih kecil dibandingkan dengan penggunaan *magnetic stirrer* dengan pelarut asam klorida 1342 nm dan asam asetat 3543 nm yang di *salting out* menggunakan natrium hidroksida.

Hal ini disebabkan oleh efek mekanis dari *ball mill* yang dapat memecah agregat kolagen menjadi partikel berukuran lebih kecil (Mujiono et al., 2021).

Nilai indeks polidispersitas pada tabel 2. Untuk *magnetic stirrer* dengan pelarut amonium hidroksida adalah 0,4932 memiliki distribusi ukuran partikel yang seragam dan stabil secara fisik untuk menghindari terjadinya aglomerasi partikel. Sedangkan untuk nanopartikel dengan *ball mill* memiliki nilai indeks polidispersitas 0,5111, untuk *magnetic stirrer* dengan pelarut asam klorida memiliki nilai indeks polidispersitas 0,9025, dan asam asetat memiliki nilai indeks polidispersitas yaitu 1 sehingga hal tersebut menunjukkan partikel

yang terbentuk tidak seragam dan memiliki heterogenitas yang tinggi.

Nilai zeta potensial yang baik adalah ± 30 mV. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa nanopartikel yang menggunakan *magnetic stirrer* mempunyai nilai zeta potensial yang bervariasi tergantung pada jenis pelarutnya, dalam asam klorida memiliki nilai zeta potensial -5,608 mV, asam asetat -15,56 mV, dan dalam amonium hidroksida -18,29 mV. Sementara itu, nanopartikel yang dibuat dengan menggunakan *ball mill* memiliki nilai zeta potensial sebesar -15,43 mV. Nilai zeta potensial tersebut kurang dari -30 mV yang menunjukkan bahwa daya tarik menarik antar partikel lebih rendah sehingga tidak terjadi aglomerasi dan memiliki stabilitas yang lebih baik (Juliantoni et al., 2020).

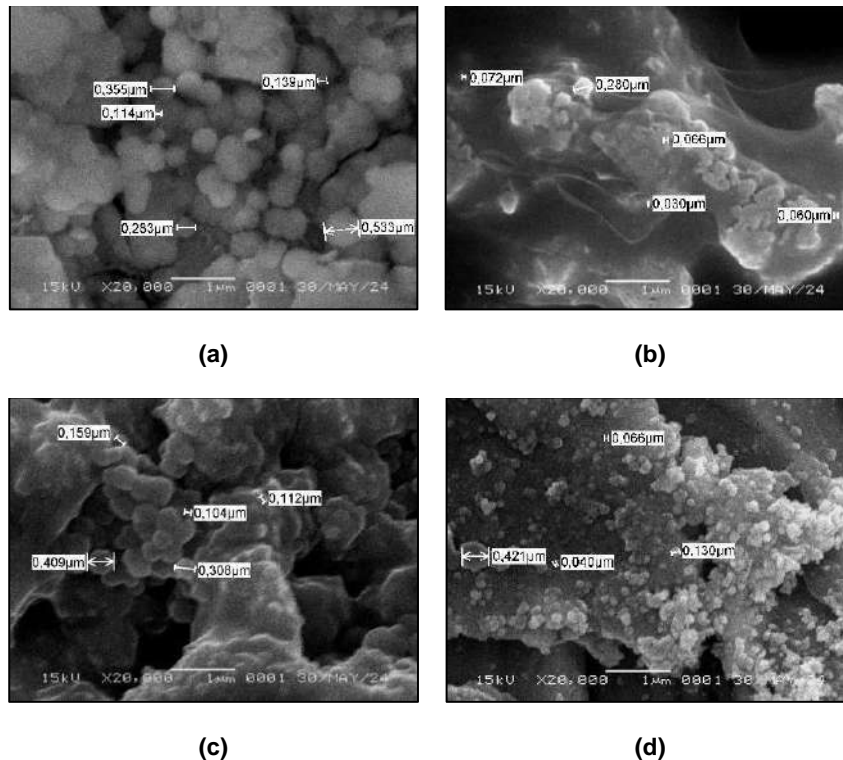


Gambar 2. Hasil analisis sampel nanopartikel kolagen dengan SEM menggunakan perbesaran 20000x (a) pelarut asam klorida; (b) pelarut asam asetat; (c) pelarut amonium hidroksida; (d) *ball mill*.

Pada gambar 2 dapat dilihat bahwa nanopartikel kolagen memiliki bentuk morfologi yang sferis atau bulat dan tidak beraturan dan

membentuk struktur globular atau bulat ketika menjadi nanopartikel. Hal ini didukung oleh

karakteristik kolagen sebagai protein fibrillar yang dapat mengalami perubahan spontan dalam kondisi tertentu (Yanti et al., 2022).



Gambar 3. Hasil analisis sampel nanopartikel kolagen dengan SEM menggunakan perbesaran 20000x (a) pelarut asam klorida; (b) pelarut asam asetat; (c) pelarut amonium hidroksida; (d) *ball mill*.

Pada gambar 3 terdapat partikel dengan ukuran kurang dari 100 nm yaitu pada gambar (a) pelarut asam asetat dan (d) *ball mill*. Hal tersebut menunjukkan bahwa partikel kolagen sudah berukuran nano. Sedangkan pada gambar 4.4 (b) pelarut asam klorida dan (c) pelarut amonium hidroksida tidak terdapat partikel dengan ukuran yang lebih kecil dari 100 nm.

Dibandingkan dengan alat PSA, hasil pengujian SEM ini memperoleh ukuran nanopartikel yang lebih kecil. Hal ini disebabkan oleh partikel kolagen dalam larutan dapat beragregasi, sehingga ukuran partikel yang diukur oleh PSA cenderung lebih besar. Sementara itu, SEM mengamati partikel dalam kondisi kering, dimana agregasi cenderung lebih sedikit atau lebih terkontrol. SEM juga mengukur partikel secara langsung melalui

citra permukaan dan menghasilkan gambar dengan resolusi yang tinggi

KESIMPULAN

Karakterisasi kolagen menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi khas kolagen seperti Amida A, B, I, II, dan III yang sesuai dengan standar kolagen. Pembuatan nanopartikel kolagen dilakukan dengan dua cara, yaitu *magnetic stirrer* dan *ball mill*. Hasil karakterisasi menggunakan PSA dari dua metode pembuatan nanopartikel yang paling baik adalah menggunakan *magnetic stirrer* dengan pelarut asam asetat dan *salting out* menggunakan NH_4OH . Berdasarkan SEM, morfologi partikel yang terbaik adalah metode *ball mill*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada pihak yang terlibat dan telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdassah, M. (2017). Nanopartikel dengan gelas ionik. *Jurnal Farmaka*, 15(1), 45–52.
- Agustin, R., Arta, D. R., & Nofita, R. (2023). Pengecilan Ukuran Partikel Dan Karakterisasi kolagen dari Kulit Ikan Gabus (*Channa Striata*) Dengan Metode Ball Milling. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 10(1), 44. <https://doi.org/10.25077/jsfk.10.1.44-53.2023>
- Aleksandra Zielińska 1, 2, Filipa Carreiró 1, Ana M. Oliveira 1, Andreia Neves 1, B. P. 1, 3, D. N. V., 4, A. D., Massimo Lucarini 4, P. E. 5, Amélia M. Silva 6, 7, & Antonello Santini 8,* and Eliana B. Souto 1, 9. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25, 3731.
- Amirrah, I. N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M. F. M. R., Motta, A., & Fauzi, M. B. (2022). A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092307>
- Darvish, D. M. (2022). Collagen fibril formation in vitro: From origin to opportunities. *Materials Today Bio*, 15(June), 100322. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100322>
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>
- Helwig, N. E., Hong, S., & Hsiao-wecksler, E. T. (n.d.). *Potensi Abu dari Tulang Ikan Tongkol Sebagai Adsorben Ion Mangan Dalam Larutan*. 1(2), 1–9.
- Hou, N., & Chen, B. (2023). *Preparation of Nanoemulsions with Low-Molecular-Weight Collagen Peptides from Sturgeon Fish Skin and Evaluation of Anti-Diabetic and Wound-Healing Effects in Mice*. Juliantoni, Y., Hajrin, W., & Subaidah, W. A. (2020). Nanoparticle Formula Optimization of Juwet Seeds Extract (*Syzygium cumini*) using Simplex Lattice Design Method. *Jurnal Biologi Tropis*, 20(3), 416–422. <https://doi.org/10.29303/jbt.v20i3.2124>
- Kusa, S. R., Naiu, A. S., & Yusuf, N. (2022). KARAKTERISTIK KOLAGEN KULIT TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*) PADA WAKTU HIDRO-EKSTRAKSI BERBEDA. *Sinta 4*, 107–116.
- Lo, S., & Fauzi, M. B. (2021). Current update of collagen nanomaterials—fabrication, characterisation and its applications: A review. *Pharmaceutics*, 13(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030316>
- Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N., & Karki, N. (2018). *Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. 2014*.
- Mujiono, Qiram, I., & Rubiono, G. (2021). Pengaruh Penambahan Profil Pada Dinding Silinder Ball-Mill Terhadap Distribusi Massa Serbuk Batu Bata. *V-MAC (Virtual of Mechanical Engineering Article)*, 6(2), 52–56. <https://doi.org/10.36526/v-mac.v6i2.1517>
- Nining, N. (2020). Pemanfaatan Kolagen Laut dalam Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmasetika*, 5(5), 245. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v5i5.28866>
- Nora Idawati; Intan Novita; Sy Irwan Nurdiansyah; Sukal Minsas; Sepridawati Siregar. (2022). IDENTIFIKASI KOLAGEN DARI CANGKANG BULU BABI (*Diadema setosum*) ASAL PERAIRAN PULAU LEMUKUTAN. *Marinade*, 05(02), 136–141.
- Romadhon, Yudhomenggolo Sastro Darmanto, R. A. K. (2019). *The Difference Characteristics of Collagen from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Bone, Skin, and Scales*. 22, 403–410.

- Safithri, M., Tarman, K., Suptijah, P., & Novita Sagita, S. (2020). Karakteristik Kolagen Larut Asam Teripang Gama (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(1), 166–177. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v23i1.3106>
3
- Septiansyah, E., Putra, O. A., Abshar, K., Jati, D. R., & Apriani, I. (2020). PEMANFAATAN TULANG IKAN TONGKOL (*Euthynnusaffinis* C) DARI LIMBAH HOME INDUSTRY ABON SEBAGAI TEPUNG. *Jurnal Teknologi Lingkungan Lahan Basah*, 8(2), 076. <https://doi.org/10.26418/jtlb.v8i2.44169>
- Statistika. (2021). Produksi Perikanan Tangkap di Laut Menurut Komoditas Utama (Ton), 2019-2021. *Badan Pusat Statistik*.
- Sudewi. (2020). Formulasi Sediaan Krim Menggunakan Kolagen Tulang Ikan Patin (*Pangasius* sp.) sebagai Anti Aging. *Journal of Pharmaceutical and Health Research*, 1(2), 27–31.
- Trisnayanti, N. P. (2020). Metode sintesis nanopartikel. *Universitas Indonesia*, 3, 1–4.
- Yanti, F., Dharmayanti, N., & Suryanti, S. (2022). Aktivitas Antioksidan Kolagen dari Kulit Ikan Patin (*Pangasius* sp.) dengan Enzim Bromelin Kasar Kulit Nanas (*Ananas comosus* L.). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 88–96. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.3673>
1