

**IDENTIFIKASI ASAM AMINO PADA CACING SUTRA (*Tubifex sp.*) YANG DIEKSTRAK DENGAN PELARUT ASAM ASETAT DAN ASAM LAKTAT**

**IDENTIFICATION OF AMINO ACIDS FROM SILK WORMS (*Tubifex sp.*) EXTRACTED USING ACETIC ACID AND LACTIC ACID SOLVENTS**

**Surya Putri Mandila\* dan Nurul Hidajati\*\***

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya  
Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761*

*\*e-mail : suryaputri\_kimiaunesa@yahoo.com*

*\*\*e-mail : nurul\_hidajati.unesa@yahoo.co.id*

**Abstrak.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persentase (%) dari masing-masing asam amino pada cacing sutra (*Tubifex sp.*) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat dan asam laktat. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% selama 36 jam, penentuan rendemen ekstrak cacing sutra (*Tubifex sp.*) dengan metode AOAC, dan analisis asam amino dengan metode HPLC. Hasil ekstraksi cacing sutra dengan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% menghasilkan rendemen masing-masing sebesar 21,6% dan 42,1%. Hasil analisis asam amino dengan menggunakan HPLC pada penelitian ini menunjukkan bahwa identifikasi asam amino pada cacing sutra (*Tubifex sp.*) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5% mempunyai persentase asam amino terbesar adalah asam glutamat dan arginin, masing-masing sebesar 13,25% dan 13,24%. Sedangkan asam amino pada cacing sutra (*Tubifex sp.*) yang diekstrak dengan pelarut asam laktat 5% mempunyai persentase asam amino terbesar adalah asam glutamat dan asam aspartat, masing-masing sebesar 14,94% dan 13,97%.

**Kata Kunci:** asam amino, cacing sutra (*Tubifex sp.*).

**Abstract.** The aim of this research is to determine the percentage (%) of each amino acids from silk worms (*Tubifex sp.*) extracted using acetic acid and lactic acid solvents. Extraction was carried out by maceration method using 5% acetic acid and 5% lactic acid solvents for 36 hours, determination of yield from silk worms (*Tubifex sp.*) extract by AOAC method, and analysis of amino acids by HPLC method. The extraction of silk worms using 5% acetic acid and 5% lactic acid solvents produce the extracts yield, are respectively 21,6% and 42,1%. The results of the analysis of amino acids using HPLC on this research showed that the identification of amino acids from silk worms (*Tubifex sp.*) extracted using 5% acetic acid solvent has the greatest percentage of amino acids is glutamic acid and arginine, are respectively 13,25% and 13,24%. While the amino acids from silk worms (*Tubifex sp.*) extracted using 5% lactic acid solvent has the greatest percentage of amino acids is acid glutamic and aspartic acid, are respectively 13,97% and 14,94%.

**Keywords:** amino acids, silk worms (*Tubifex sp.*).

## PENDAHULUAN

Asam amino merupakan komponen utama penyusun protein dan dibagi dalam dua komponen yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial. Asam amino esensial tidak dapat diproduksi dalam tubuh sehingga harus ditambahkan dalam bentuk asupan makanan, sedangkan asam amino non esensial dapat diproduksi dalam tubuh. Asam amino umumnya berbentuk serbuk dan mudah larut dalam air, namun tidak larut dalam pelarut organik non polar [1].

Asam amino sangat dibutuhkan oleh tubuh manusia. Asam amino berfungsi memperbaiki

jaringan yang rusak setelah luka, melindungi hati dari berbagai zat toksik, menurunkan tekanan darah, mengatur metabolisme kolesterol, mendorong sekresi hormon pertumbuhan dan mengurangi kadar amonia di dalam darah [2].

Pada umumnya hampir semua sumber asam amino yang digunakan oleh masyarakat berasal dari hewan mamalia yaitu sapi dan babi. Hal ini menyebabkan adanya kekhawatiran dari sebagian besar konsumen yang didasarkan pada alasan religius dan kesehatan. Pada protein yang berasal dari kulit babi memiliki kandungan lemak 0,29% lebih besar dibandingkan protein yang berasal dari

tulang hewan non mamalia (ikan) yaitu sebesar 0,21%. Selain itu pada protein yang berasal dari tulang atau kulit sapi dimungkinkan adanya virus penyakit sapi gila (*Mad Cow Disease*) yang dapat berpengaruh terhadap kesehatan konsumen [3].

Cacing sutra (*Tubifex* sp.) adalah cacing berwarna merah darah yang termasuk dalam kelas *oligochaeta* air tawar. Cacing sutra hidup dengan membentuk koloni dan diperoleh dari hasil tangkapan di sungai atau melalui proses budidaya pada medium bahan organik. Perkembangbiakan cacing sutra tergolong cepat, dalam waktu 42 hari cacing sutra tumbuh menjadi dewasa dan segera berkembangbiak [4]. Pada umumnya cacing sutra digunakan untuk pakan ikan hias, ikan lele dan merupakan sumber protein baru dalam pakan ternak. Hal ini terkait dengan kandungan nutrisi pada cacing sutra yang cukup tinggi yaitu protein mencapai 57%, lemak 13,3%, serat kasar 2,04%, kadar abu 3,6% dan air 87,7% [5]. Menurut Fernando, *et al.* [6] cacing sutra (*Tubificids*) memiliki kadar air 83,2%, kadar protein kasar 71,2%, kadar lemak kasar 5,4% dan kadar abu 3,6%. Cacing sutra (*Tubifex* sp.) dengan kandungan protein yang tinggi dan berkembangbiakan yang tergolong cepat, dapat membuka peluang untuk dimanfaatkan sebagai suatu alternatif dalam mendapatkan sumber asam amino baru selain dari sapi maupun babi. Selain itu, juga dapat menambah potensi pemanfaatan cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang selama ini penggunaannya hanya terbatas sebagai pakan ikan.

Umumnya pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi protein adalah pelarut asam. Hal ini disebabkan karena pada waktu yang sama jumlah protein yang diekstraksi dengan menggunakan larutan asam lebih banyak daripada dengan menggunakan larutan basa. Selain itu, pada proses perendaman dengan larutan basa dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk mengekstraksi protein. Sehingga dalam ekstraksi protein pelarut yang sebaiknya digunakan adalah pelarut asam [7].

Dalam penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% selama 36 jam. Identifikasi asam amino dengan menggunakan metode HPLC dilakukan untuk mengetahui persentase (%) dari masing-masing asam amino yang terdapat pada cacing sutra (*Tubifex* sp.).

## METODE PENELITIAN

### Alat

Beberapa alat yang digunakan antara lain: seperangkat alat ekstraksi dengan metode maserasi, *blender*, kain mori, gelas kimia, gelas ukur, kertas saring, *magnetic stirrer*, lemari pendingin, pH meter,

*centrifuge* Eppendorf 5810R, tabung *centrifuge*, timbangan digital, serta seperangkat alat HPLC Shimadzu LC10 dengan kolom C-18 dan detektor *fluorecen* Shimadzu RF-138.

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: cacing sutra (*Tubifex* sp.), aquades, asam asetat 5%, asam laktat 5%, larutan NaOH 1 N, HCl 6 N, buffer Na-Asetat, THF, larutan derivatisasi OPA (*Orthophthalaldehyde*), metanol 65%.

## PROSEDUR PENELITIAN

### Ekstraksi Cacing Sutra (*Tubifex* sp.)

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah cacing sutra yang dicuci dengan air sampai bersih, kemudian disimpan dalam *freezer*. Setelah beberapa jam, cacing sutra dikeluarkan dari *freezer* untuk selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan penggiling daging (*blender*) selama  $\pm 1$  menit sehingga menghasilkan sampel halus cacing sutra berupa pasta yang siap untuk diekstraksi. Selanjutnya, sampel halus cacing sutra sebanyak 100 gram diekstraksi selama 36 jam, masing-masing menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% dengan volume 8 kali berat sampel (1:8). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Selama perendaman semua sampel disimpan dalam lemari pendingin (kulkas). Setelah mencapai waktu perendaman selama 36 jam, hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain mori. Kemudian, filtrat (cairan hasil penyaringan) ditambahkan larutan NaOH 1 N sampai pH mencapai 7 (netral) dan selanjutnya didiamkan sampai ekstrak cacing sutra menggumpal atau mengendap. Kemudian ekstrak cacing sutra dipisahkan dengan menggunakan *centrifuge* berkecepatan tinggi (4000 rpm) pada suhu 10°C selama 10 menit. Selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring sehingga diperoleh berat basah ekstrak protein cacing sutra (*Tubifex* sp.).

### Penentuan Rendemen Ekstrak Protein Cacing Sutra (*Tubifex* sp.)

Berat basah ekstrak protein cacing sutra dari hasil ekstraksi dengan menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% ditimbang untuk ditentukan rendemennya. Rendemen dihitung menurut metode AOAC [8]:

$$R = \frac{\text{Berat basah ekstrak cacing sutra yang dihasilkan (gram)}}{\text{Berat basah sampel cacing sutra yang digunakan (gram)}} \times 100\%$$

### Analisis Kandungan Asam Amino dengan Menggunakan HPLC

Masing-masing ekstrak protein cacing sutra dari hasil ekstraksi dengan menggunakan pelarut

asam asetat 5% dan asam laktat 5% dianalisis kandungan asam amino penyusunnya dengan menggunakan alat HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pada tahap preparasi sampel, sebanyak 60 mg sampel dihidrolisis asam menggunakan HCl 6 N sebanyak 4 mL yang kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 24 jam. Selanjutnya, dinetralkan (pH 7) dengan menggunakan NaOH 6 N. Kemudian diencerkan hingga 10 mL dan disaring dengan kertas saring Whatman 0,2 µm. Pada tahap injeksi sampel, sebanyak 25 µL sampel yang telah dipreparasi ditambah 300 µL larutan derivatisasi OPA (*orthophthalaldehyde*) kemudian diaduk selama 5 menit dan selanjutnya dimasukkan ke dalam injektor HPLC sebanyak 20 µL. Detektor yang digunakan adalah detektor *fluorescence*, dengan eksitasi pada 360 nm dan emisi pada 460 nm. Fase gerak yang digunakan adalah Buffer Na-Asetat, THF dan methanol 65%. Kolom yang digunakan adalah Oktadesil silika (ODS atau C18), yang juga berfungsi sebagai fase diam. Persentase (%) dari masing-masing asam amino yang terdapat pada sampel ekstrak cacing sutra (*Tubifex sp.*) diperoleh dengan membandingkan luas area asam amino dengan luas area total asam amino kemudian dikalikan 100%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Cacing Sutra (*Tubifex sp.*)

Tahap pertama dalam penelitian ini dimulai dari persiapan bahan dan alat, serta pengumpulan dan penyiapan sampel yang digunakan dalam tahap ekstraksi cacing sutra maupun tahap pengujian asam amino dengan menggunakan HPLC. Pengumpulan sampel yang digunakan berasal dari penjual cacing sutra (*Tubifex sp.*) di daerah Surabaya, Jawa Timur.

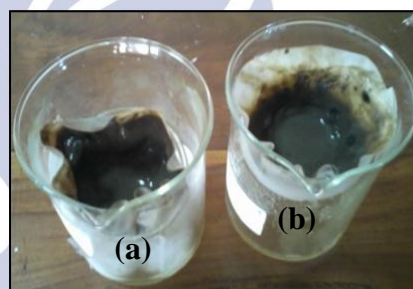


Gambar 1. Cacing Sutra (*Tubifex sp.*)

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah cacing sutra yang telah dibersihkan (Gambar 1) dan disimpan dalam *freezer* kemudian dihaluskan dengan *blender* hingga berbentuk pasta. Selanjutnya sampel halus cacing sutra diekstraksi dengan cara maserasi selama 36 jam masing-masing menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5%. Metode ekstraksi yang digunakan dalam

penelitian ini adalah maserasi. Metode maserasi dipilih karena metode ini murah dan mudah dilakukan, selain itu dikhawatirkan senyawa protein dan asam amino yang terkandung pada cacing sutra (*Tubifex sp.*) merupakan senyawa yang tidak tahan terhadap panas, sehingga metode maserasi dinilai lebih sesuai untuk digunakan.

Hasil ekstraksi dari cacing sutra tersebut masih berupa ekstrak kasar protein cacing sutra (*Tubifex sp.*). Jenis pelarut (asam asetat 5% dan asam laktat 5%) yang digunakan dalam ekstraksi cacing sutra mempengaruhi warna ekstrak yang dihasilkan. Ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan pelarut asam laktat 5% mempunyai warna yang lebih gelap dibandingkan dengan ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan pelarut asam asetat 5% (Gambar 2). Warna yang lebih gelap ini diduga karena pigmen warna yang terdapat pada cacing sutra (*Tubifex sp.*) lebih dapat larut dalam pelarut asam laktat 5%.



Gambar 2. Ekstrak Cacing Sutra (*Tubifex sp.*) dengan pelarut (a) Asam Laktat 5% dan (b) Asam Asetat 5%

Selanjutnya ekstrak protein yang diperoleh dari ekstraksi cacing sutra dengan menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5%, ditimbang untuk mendapatkan berat basah ekstrak protein cacing sutra yang diperoleh.

### Penentuan Rendemen Ekstrak Protein Cacing Sutra (*Tubifex sp.*)

Rendemen ekstrak protein cacing sutra (*Tubifex sp.*) dihitung berdasarkan perbandingan antara berat basah ekstrak yang diperoleh dengan berat basah sampel cacing sutra yang digunakan.

Rendemen dihitung menurut metode AOAC [8], yaitu:

$$R = \frac{\text{Berat basah ekstrak cacing sutra yang dihasilkan (gram)}}{\text{Berat basah sampel cacing sutra yang digunakan (gram)}} \times 100\%$$

Data rendemen ekstrak protein cacing sutra (*Tubifex sp.*) yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% selama 36 jam dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen Ekstrak Protein Cacing Sutra (*Tubifex* sp.)

Pelarut	Rendemen Ekstrak Protein Cacing Sutra (%)			
	Pengulangan			Rata-rata
	1	2	3	
Asam Asetat 5 %	19,7	23,6	21,6	21,6
Asam Laktat 5 %	41,6	45,1	39,5	42,1

Ekstraksi protein cacing sutra (*Tubifex* sp.) dengan pelarut asam asetat 5% diperoleh rendemen sebanyak 21,6%, sedangkan ekstraksi protein cacing sutra (*Tubifex* sp.) dengan pelarut asam laktat 5% diperoleh rendemen sebanyak 42,1%. Rendemen yang diperoleh dengan menggunakan pelarut asam laktat 5% lebih besar dibandingkan rendemen yang diperoleh dengan menggunakan pelarut asam asetat 5%. Hal ini karena perbedaan kekuatan asam pada asam asetat 5% (pH 3,2) dan asam laktat 5% (pH 2,8). Ikatan antar molekul protein dalam otot bagian kulit atau tulang akan merenggang atau melunak pada kondisi pH dibawah 4 [7]. Asam asetat 5% merupakan asam lemah dengan nilai  $K_a$   $1,8 \times 10^{-5}$  [9]. Sedangkan asam laktat 5% merupakan asam lemah dengan nilai  $K_a$   $1,38 \times 10^{-4}$  [10]. Berdasarkan jumlah rendemen yang diperoleh menunjukkan bahwa asam laktat 5% dengan nilai  $K_a$  yang lebih besar dari asam asetat 5% memiliki kemampuan yang lebih optimal dalam ekstraksi protein cacing sutra (*Tubifex* sp.) sehingga diperoleh rendemen ekstrak cacing sutra yang lebih besar.

#### Analisis Kandungan Asam Amino dengan Menggunakan HPLC

Kandungan asam amino suatu protein dapat ditentukan melalui analisis asam amino. Salah satu analisis asam amino adalah dengan kromatografi cair kinerja tinggi atau sering disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) [11]. Pada penelitian ini analisis kandungan asam amino dengan menggunakan HPLC dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Analisis asam amino dengan menggunakan HPLC dilakukan untuk mengetahui persentase (%) masing-masing asam amino pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5%.

Dalam analisis asam amino yang ada pada sampel perlu dilakukan pembuatan kromatogram standar asam amino terlebih dahulu dengan menggunakan standar asam amino. Pengukuran ini menghasilkan suatu kromatogram yang memperlihatkan waktu retensi dan luas area standar asam amino. Selanjutnya, data waktu retensi dari larutan standar asam amino digunakan sebagai dasar dalam menentukan waktu retensi dari asam amino pada

sampel ekstrak cacing sutra. Jenis asam amino yang terdapat pada ekstrak cacing sutra didapat dengan cara membandingkan waktu retensi (*retention time*) standar asam amino dengan waktu retensi sampel ekstrak cacing sutra. Waktu retensi merupakan waktu yang diperlukan oleh sampel mulai dari saat injeksi sampai sampel mencapai puncak (*peak*) maksimum [12]. Puncak asam amino yang diuji akan memiliki nilai waktu retensi yang sama dengan nilai waktu retensi standar asam amino. Selanjutnya persentase (%) dari masing-masing asam amino pada ekstrak cacing sutra (*Tubifex* sp.) diperoleh dengan membandingkan luas area asam amino dengan luas area total asam amino kemudian dikalikan 100% [13]. Hasil analisis asam amino pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Analisis Asam Amino pada Ekstrak Cacing Sutra (*Tubifex* sp.)

No.	Asam Amino	Cacing Sutra ( <i>Tubifex</i> sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5%	Cacing Sutra ( <i>Tubifex</i> sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam laktat 5%
		Persentase (%)	Persentase (%)
1.	Asam Aspartat	11,16	13,97
2.	Asam Glutamat	13,25	14,94
3.	Serin	7,81	7,71
4.	Histidin	2,35	2,28
5.	Glisin	8,50	8,12
6.	Arginin	13,24	7,54
7.	Alanin	9,54	9,43
8.	Tirosin	3,34	3,52
9.	Valin	8,44	8,85
10.	Fenilalanin	4,64	4,89
11.	Isoleusin	6,14	6,62
12.	Leusin	8,96	9,94
13.	Lisin	2,62	2,19

Berdasarkan hasil analisis asam amino dengan menggunakan HPLC menunjukkan bahwa cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% masing-masing mengandung 13 macam asam amino. Asam-asam amino tersebut terdiri dari 7 asam amino esensial dan 6 asam amino non esensial. Asam amino esensial yang terdapat pada ekstrak cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diteliti meliputi histidin, valin, fenilalanin, isoleusin, leusin, lisin dan arginin. Asam amino non esensial yang terdapat pada ekstrak cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diteliti meliputi asam aspartat, asam glutamat, serin, glisin, alanin, dan tirosin.

Pada sampel cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5% dan asam laktat 5% terdapat persentase asam amino glisin masing-masing sebesar 8,50% dan 8,12%. Pada perlakuan yang sama persentase asam amino alanin

berturut-turut yaitu 9,54% dan 9,43%. Untuk persentase asam amino glutamat berturut-turut yaitu 13,25% dan 14,94%. Sedangkan persentase asam aspartat berturut-turut yaitu 11,16% dan 13,97%.

Hasil analisis asam amino pada penelitian ini menunjukkan bahwa diantara 13 asam amino yang terdapat pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) terdapat 5 jenis asam amino yang mendominasi, yaitu asam aspartat, asam glutamat, arginin, lisin dan leusin. Lisin dan leusin termasuk dalam golongan asam amino ketogenik yaitu asam amino yang dapat menghasilkan senyawa keton dalam hati. Sedangkan asam aspartat, asam glutamat dan arginin termasuk dalam golongan asam amino glukogenik yaitu asam amino yang dapat diubah menjadi glukosa dan glikogen [14].

Asam amino pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan menggunakan pelarut asam asetat 5% mempunyai persentase asam amino terbesar adalah asam glutamat dan arginin masing-masing sebesar 13,25% dan 13,24%. Untuk asam amino pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan menggunakan pelarut asam laktat 5% mempunyai persentase asam amino terbesar adalah asam glutamat dan asam aspartat masing-masing sebesar 14,94% dan 13,97%.

Persentase asam glutamat, asam aspartat dan arginin yang tinggi dalam ekstrak cacing sutra (*Tubifex* sp.) dapat dijadikan sebagai pertimbangan dalam pemanfaatan potensi lain dari cacing sutra khususnya dibidang kesehatan. Asam glutamat bermanfaat untuk menahan konsumsi alkohol berlebih, mempercepat penyembuhan luka pada usus, meningkatkan kesehatan mental serta meredam depresi. Asam aspartat merupakan komponen yang berperan dalam biosintesis urea, prekursor glukonik dan prekursor pirimidin. Selain itu asam aspartat juga bermanfaat untuk penanganan pada kelelahan kronis. Sedangkan arginin bermanfaat untuk meningkatkan daya tahan tubuh atau produksi limfosit, dan meningkatkan pengeluaran hormon pertumbuhan [15]. Arginin dapat mempercepat proses penyembuhan luka, meningkatkan kemampuan untuk melawan kanker dan memperlambat pertumbuhan tumor. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa arginin dapat membantu mengobati diabetes tipe 2 (karena gaya hidup), hal ini dikarenakan arginin mampu meningkatkan metabolisme glukosa dan sensitifitas insulin yang dapat menurunkan kadar glukosa yang tinggi dalam darah [16].

## PENUTUP

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa identifikasi asam amino

pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam asetat 5% mempunyai persentase asam amino terbesar adalah asam glutamat dan arginin masing-masing sebesar 13,25% dan 13,24%. Sedangkan asam amino pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) yang diekstrak dengan pelarut asam laktat 5% mempunyai persentase asam amino terbesar adalah asam glutamat dan asam aspartat masing-masing sebesar 14,94% dan 13,97%.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Sitompul, S. 2004. Analisis Asam Amino dalam Tepung Ikan dan Bungkil Kedelai. *Buletin Teknik Pertanian*. Vol. 9. Nomor 1.
2. Kamiya T., Miyukigaoka, Shi T., Ibaraki. 2002. Biological Functions and Health Benefits of Amino Acids. *Journal of Foods Ingredients* 6(2):206-235.
3. Junianto., Hoetemi, Kiki., dan Maulina, Ine. 2006. *Produksi Gelatin dari Tulang Ikan dan Pemanfaatannya sebagai Bahan Dasar Pembuatan Cangkang Kapsul*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing IV Tahun I. DIKTI, Departemen Pendidikan Nasional No: 013/SP3/PP/DP2M/II/2006.
4. Gusrina. 2008. *Budidaya Ikan Jilid 2*. Jakarta: Departemen Pendidikan Nasional.
5. Faridloh, Afif Miadatul. 2010. *Pemanfaatan Limbah Ikan Sebagai Nutrisi Tambahan Pada Pembuatan Media Tumbuh Tubifex sp.* Skripsi. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya.
6. Fernando, A. A., V. P. E. Phang and S. Y. Chan. 1991. Diets and Feeding Regimes of Poeciliid Fishes in Singapore. *Asian Fisheries Science* 4 (1991): 99-107.
7. Li, Shu-Tung. 1993. Collagen Biotechnology and Its Medical Application. *Biomed. Eng. ppl. Baia Comm.* 5: 646-657.
8. Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1999. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*. Washington: AOAC Inc.
9. Sarsojoni. 1996. *Kamus Kimia*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
10. Narayanan, Niju., Pradip K. Roychoudhury., Aradhana Srivastana. 2004. L(+)-Lactic acid Fermentation and Its Product Polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2. ISSN: 0717-3458 Vol.7.
11. Adnan, M. 1997. *Teknik Kromatografi untuk Analisa Bahan Makanan*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
12. Riyadi, W. 2009. *Identifikasi Signal Kromatogram HPLC (High Performance Liquid*

- Chromatography*). <http://www.wordpress.com>. Diakses pada tanggal 2 Agustus 2012.
13. Suwardi, Yuniarto., Atmaja, Lukman., dan Martak, Fahimah. 2010. *Pengaruh Variasi Larutan Asam pada Isolasi Gelatin Kulit Ikan Patin (Pangasius hypothalamus) terhadap Sifat-sifat Kimia dan Fisik*. Paper Seminar. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.
  14. Lehninger, Albert L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Alih Bahasa Maggy Thenawidjaja. Jakarta: Penerbit Erlangga.
  15. Linder, M. C. 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian Secara Kimia*. Aminuddin P, Penerjemah. Jakarta: UI Press.
  16. Winarto, Dedy. 2009. *Asam Amino-Arginin*. <http://271090.multiply.com>. Diakses pada 21 November 2012.
  17. Liu, D. C., Y. K. Lin., and M. T. Chen. 2001. Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and Its Characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 14: 1638-1644.
  18. Prayitno. 2007. Ekstraksi Kolagen Cakar Ayam dengan Berbagai Jenis Larutan Asam dan Lama Perendamánya. *Journal Animal Production*. Vol. 9 No. 2, 2007: 99-104. ISSN 1411-2027.

