ANIMAL PRODUCTION, Mei 2007, hlm. 99 - 104 Vol. 9 • No.2 •
ISSN 1411 - 2027 Terakreditasi No. 56/DIKTI/Kep/2005

Ekstraksi Kolagen Cakar Ayam dengan Berbagai Jenis Larutan Asam dan Lama Perendamannya

(Extraction of Collagen from Chicken Feet with Various Acidic Solutions and Soaking Time)

Prayitno

Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

ABSTRACT: The objective of this research was to know the ability of various acidic solutions on dissolving collagen chicken feet, with different soaked time. Each acid 5 percent (v/v), collagen extraction was done by washing chicken feet and then cutted into small pieces and finally grinded. Every 100 gram treatment was soaked in acetic acid (a_1), citric acid (a_2), lactic acid (a_3) and hydrochloric acid (a_4), for 12, 24 and 36 hours. Precipitated collagen in the filtrate was 5 percent NaOH to reach the neutral pH (pH 7). Collagen precipitate was separated by filtration usingfilter paper and then rendement was calculated, HPLC was used to determin amino acid composition, and SDS-PAGE was use determin the type of collagen. This experiment use factorial completely randomized design (CRD) 4 x 3 and three time replication. Result showed that lactic acid has highest capability to dissolve collagen, while citric acid the lowest. Combination of acid solution and soaking time had significant ($P<0.01$) effect on dissolving collagen of chicken feet. Extracted collagen in all acid solution, hassame amino acid, composition but different in percentage of amino acid molecules. Collagen type in treatment combination was the same, but for soaking time of 36 hours revealed some peptide band. Lactic acid had highest capability of collagen extraction in chicken feet than citric acid, acetic acid and hydrochloric acid with soaking time of 12, 24 and 36 hours. It was estimated that extracted collagen can be grouped to type I consisted of two chain of α_1.

Key Words : Chicken feet, acids, soaking time, collagen

Pendahuluan

Cakar ayam banyak tersedia di tempat rumah pemotongan ayam, hingga saat ini pemanfaatannya masih terbatas untuk digoreng, campuran sayur, bubur atau dibuat krecek rambak (kripik). Keadaan tersebut terjadi karena masih sangat terbatasnya informasi dan ketersediaan teknologi pengolahan yang tepat serta manfaat produk cakar ayam yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian Baliant dan Bowes (1977), bahwa cakar ayam mengandung protein 17,40%, kolagen berkisar 9,07%, air 60,05%, abu 5,98% dan lemak 12,00%.

Kolagen yang paling banyak dikenal orang adalah kolagen tipe I yang terdiri dari tiga rantai polipeptida. Dua rantai polipeptida disebut tipe α_1 dan rantai polipeptida yang ketiga adalah tipe α_2. Kolagen tipe I adalah paling banyak terdapat pada bagian tubuh yang lunak seperti kulit dan tendon maupun bagian tubuh yang keras seperti tulang dan gigi serta jaringan penghubung. Kolagen tipe II yang terdiri dari tiga rantai *peptide* α_1 adalah kolagen yang banyak terdapat pada tulang kartilago. Kolagen tipe III yang juga terdiri tiga rantai *peptide* $\alpha 1$banyak terdapat pada pembuluh darah (Liu *et al.*, 2001).

Keberadaan kolagen dalam tubuh biasanya menempel pada otot dibawah kulit dan bagian persendian tulang. Sifat kolagen adalah mudah merenggang (melunak) apabila kondisi lingkungan keasamannya tinggi (pH dibawah empat). Asam asetat, sitrat, laktat dan asam klorida memiliki sifat keasaman yang berbeda. Maka apbila cakar ayam yang telah dihancurkan direndam dalam larutan tersebut, maka kolagennya akan lepas sehingga mudah dipisahkan dari cakar ayam.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui jenis asam dan lama perendaman yang mampu mengekstraksi kolagen dari cakar ayam broiler secara optimal namun tidak merusak kolagen yang dihasilkan. Mengetahui rendemen kolagen hasil ektraksi dengan asam asetat, sitrat, laktat dan asam klorida serta komposisi asam aminonya. Kecuali itu juga untuk mengetahui tipekolagen yang terkandung dalam cakar ayam broiler.

Diharapkan dari penelitian ini akan dihasilkan teknologi untuk ekstraksi dan pemurnian kolagen dari cakar ayam secara tepat, mudah dan murah guna memenuhi kebutuhan kolagen dalam negeri yang masih tergantung impor. Keberhasilan penemuan teknologi ini juga mempunyai dampak terhadap pemanfaatan serta peningkatan nilai jual cakar ayam di berbagai tempat pemotongan ayam.

Metode Penelitian

Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah cakar ayam broiler, asam asetat, asam sitrat, asam laktat dan asam klorida, NaOH, bahan-bahan kimia untuk elektroforesis. Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, *magnetic stirer*, blender, alat elektroforesis, kain mori, kertas saring, timbangan digital dan alat sentrifugasi.

Cakar ayam yang digunakan berasal dari tempat pemotongan ayam dan penjual daging ayam di pasar Wage dan pasar Cerme Purwokerto. Cakar ayam yang telah terkumpul dicuci sampai bersih, kemudian disimpan dalam *freezer* untuk digunakan dalam penelitian.

Rancangan Percobaan

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok, pola faktorial (4 x 3). Sebagai faktor pertama adalah jenis pelarut ekstraksi (A) yaitu asam asetat (a_1), sitrat (a_2), laktat (a_3), dan klorida (a_4). Faktor kedua adalah lama perendaman cakar ayam dalam pelarut ekstraksi (R) yaitu 12 (r_1), 24 (r_2), dan 36 (r_3) jam, sehingga terdapat 12 kombinasi perlakuan. Masing-masing kombinasi perlakuan diulang sebanyak 4 kali (Steel dan Torrie, 1989). Ke empat pelarut asam dibuat dalam konsentrasi 5%. Hasil ekstraksi berupa kolagen selanjutnya diidentifikasi tipenya dengan elektro-foresis menggunakan teknik gel poliakrilamid 7%. Kolagen hasil ekstraksi kemudian diamati komposisi asam amino. Peubah lain yang diamati selain komposisi asam amino adalah bobot basah dan persentase rendemen kolagen, serta tipe kolagen.

Ektraksi Kolagen Cakar Ayam

Ektraksi kolagen dari cakar ayam digunakan metode Ichie *et al.* (1999) dan Liu *et al.* (2001) dimodifikasi. Cakar ayam dikeluarkan dari *freezer* kemudian dipotong – potong menggunakan pisau dengan ukuran kurang lebih 3 cm. Potongan cakar selanjutnya dihancurkan menggunakan gilingan daging. Cakar yang telah hancur diambil sampel 100 g kemudian direndam larutan asam 5% dengan volume 8 kali berat sampel (1 : 80). Setiap sampel (masing-masing 100 g) direndam dalam 5% larutan asam asetat, sitrat, laktat dan asam klorida dengan variasi lama perendaman 12, 24 dan 36 jam. Selama perendaman semua sampel disimpan dalam kulkas. Setelah mencapai waktu perendaman cairan dipisahkan melalui penyaringan dengan kain. Filtrat (cairan hasil penyaringan) ditambah larutan NaOH 1 N sampai pH mencapai 7 (netral) dan didiamkan sampai kolagen menggumpal dan selanjutnya disaring dengan kertas saring. Bobot basah kolagen dari masing-masing kombinasi perlakuan ditimbang untuk ditentukan rendemennya (persentase kolagen yang dapat terekstrak),. dan tipe kolagen yang terekstrak. Masing-masing kolagen dari hasil ekstraksi dengan berbagai larutan asam dengan lama perendaman 36 jam diambil sampel untuk dianalisis komposisi asam aminonya

Penentuan Peubah

Rendemen kolagen dihitung menurut petunjuk Liu *et al.* (2001), yaitu :

$$R = \frac{\text{Bobot basah kolagen yang dihasilkan}}{\text{Bobot sempel cakar yang digunakan}} \times 100\%$$

Asam amino kolagen dianalisis menggunakan teknik HPLC. Tipe kolagen ditentukan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid 7 % menurut O'Driscall *et al.* (1985).

Hasil dan Pembahasan

Rendemen Kolagen

Perendaman cakar ayam dengan 5% larutan asam asetat, sitrat, laktat dan HCl, selama 12, 24 dan 36 jam dihasilkan rendemen ekstrak kolagen seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen kolagen hasil ekstraksi pada berbagai kombinasi perlakuan

No.	Perlakuan	Rataan Rendemen Kolagen (%)
1	a_1r_1	$26,209^{f}$
2	a_1r_2	$29,381^{g}$
3	a_1r_3	$30,816^{h}$
4	a_2r_1	$10,397^{i}$
5	a_2r_2	$11,868^{a}$
6	a_2r_3	$12,136^{a}$
7	a_3r_1	$36,401^{bd}$
8	a_3r_2	$36,828^{bc}$
9	a_3r_3	$38,757^{j}$
10	a_4r_1	$28,733^{k}$
11	a_4r_2	$36,641^{cde}$
12	a_4r_3	$36,401^{cde}$
Jumlah		1003,873

^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j} Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada P<0,05

Tabel 1 menunjukkan rendemen kolagen tertinggi dihasilkan dari perendaman dengan larutan asam laktat selama 36 jam (a_3r_2) dan terendah dengan asam sitrat selama 12 jam (a_4r_1). Perendaman dengan larutan HCl dan asam laktat selama 24 jam dan 36 jam dihasilkan rendemen kolagen yang hampir sama, namun pada perendaman 12 jam berbeda. Perendaman dengan asam laktat selama 12, 24 dan 36 jam dihasilkan kolagen tidak jauh berbeda.

Hasil analisis variansi (anova) rendemen kolagen hasil ekstraksi dengan asam asetat, sitrat, laktat dan HCl, dengan lama perendaman 12, 24 dan 36 jam dan juga interaksinya menunjukkan perbedaan sangat nyata ($P<0,01$). Rendemen kolagen hasil ekstraksi antara asam asetat (a_1) dengan HCl (a_4), asam asetat (a_1) dengan asam laktat (a_2), asam asetat (a_1) dengan asam sitrat (a_2), asam sitrat (a_2) dengan HCl (a_4), asam sitrat (a_2) dengan asam laktat (a_3) asam laktat (a_3) dengan HCl (a_4) masing-masing berbeda sangat nyata ($P<0,01$). Antara lama perendaman 12 jam (r_1) dengan 24 jam (r_2), 12 jam (r_1) dengan 36 jam (r_3) dan 24 jam (r_2) dengan 36 jam (r_3) masing-masing berbeda sangat nyata ($P<0,01$). Kecuali antara a_2r_3 dengan a_2r_2, a_4r_2 dengan a_3r_2, $a_4 r_2$ dengan $a_3 r_3$, a_4r_2 dengan a_4r_1, a_4r_1 dengan a_3r_2, a_4r_1 dengan a_3r_3, a_3r_3 dengan a_3r_2 masing-masing berbeda tidak nyata ($P>0,05$), interaksinya sangat nyata ($P<0,01$). Keadaan ini menunjukkan asam laktat dan HCl pada saat digunakan untuk merendam cakar ayam selama 24 dan 36 jam mempunyai kemampuan mengekstrak kolagen yang hampir sama. Pada lama perendaman yang sama, kemampuan mengekstrak kolagen lebih besar bila dibandingkan dengan asam asetat maupun asam sitrat.

Kolagen banyak terdapat pada tubuh dan merupakan protein unik dengan kadar mencapai 3% dari total protein yang terdapat dalam tubuh. Paling sedikit ada 14 tipe kolagen yang telah berhasil diidentifikasi dan banyak dipengaruhi oleh faktor genetik (Liu *et al.*, 2001).

Li (1993) menyatakan bahwa Ikatan antar molekul kolagen dalam otot bagian kulit dan atau tulang akan merenggang (melunak) pada kondisi pH dibawah 4 atau diatas 10. Ekstraksi kolagen dari cakar ayam dengan larutan asam sitarat 5% diperoleh kolagen sebanyak 36% dari berat cakar ayam yang digunakan. Chow (1981) melakukan perendaman kulit babi menggunakan larutan asam laktat 5% dengan pH 2,15 mampu melepaskan molekul kolagen pada bagian kulit. Wang (1994) menyatakan bahwa rantai protein kolagen apabila dipotong (dipecah) dengan asam klorida (HCl) akan dihasilkan asam amino dan rantai peptida. Akan tetapi pemecahan kolagen oleh HCl tidak spesifik serta tidak teratur sehingga sulit dikontrol.

Komposisi Asam Amino

Perendaman cakar ayam dengan 5% larutan asam asetat, asam sitrat , asam laktat dan klorida (HCl) selama 24 jam diperoleh ekstrak kolagen dengan komposisi asam amino seperti pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa kolagen dari cakar ayam hasil ekstraksi menggunakan empat jenis asam masing-masing mengandung 17 macam asam amino, dan komposisi residu asam amino terbesar adalah glisin yaitu sebesar 33, 24; 24,11; 27,98 dan 36,19%. Masing-masing dihasilkan dari perendaman berturut-turut dengan 5% asam asetat, HCl, laktat dan sitrat selama 24 jam. Pada kondisi perlakuan yang sama residu asam amino prolin dalam ekstrak kolagen berturut-turut adalah 11,96; 11, 12; 1103 dan 13,25%. Komposisi asam amino alanin berturut 13,04, 16,06, 11,35 dan 13,93%, sedangkan untuk glutamat bertururt-tururt 9,12, 18,94, 8,79 dan 11,12%. Berdasarkan hasil penelitian ini menggambarkan bahwa ekstrak protein yang dihasilkan dari perendaman cakar ayam dengan larutan asam asetat, sitrat, laktat dan HCl sebagian besar adalah kolagen karena komposisi asam amino terbesar adalah glisin dan prolin. Menurut Lehninger *et al.* (1993) bahwa penyusun kolagen adalah residu asam amino glisin 35%, alanin 11% dan prolin atau hidroksiprolin 21%. Kolagen tersusun dari tiga (triple) urutan asam amino secara berulang-ulang dan setiap tiga urutan tersebut tersusun dari asam amino glisin-X-prolin atau hidroksiprolin. Urutan asam amino X dapat ditempati oleh berbagai jenis asam amino, tetapi yang paling umum adalah valin. Asam amino tersebut membentuk struktur helik sederhana yang unik.

Asghar dan Henrickson (1982) menyatakan, ada 20 atau 21 macam asam amino terdapat pada tipe kolagen yang berbeda. Liu *et al.* (2001) menyatakan, kolagen dari cakar (kaki) ayam mengandung 21 macam asam amino dan sebanyak 30 persennya adalah glisin, 11% prolin dan 10 sampai 12,70% alanin serta glutamat. Kandungan

lisin, histidin, penil alanin, isoleusin, tirosin dan metionin berkisar 2 persen atau kurang, sedangkan 14 asam amino lainnya juga relatif kecil.

Tipe Kolagen

Elektroforesis dengan SDS-poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE) kolagen cakar ayam hasil ektraksi dengan 5 persen larutan asam asetat, HCl, laktat dan sitrat dengan lama perendaman 12 sampai 24 jam diperoleh pita-pita peptida seperti tertera pada Gambar 1 dan 2.

Kolagen hasil ekstraksi dengan asam asetat, sitrat, laktat dan HCl, menunjukkan pita dengan pola jarak migrasi hampir sama. Berdasarkan pola dan jarak migrasinya, pita peptida (protein) untuk kolagen hasil ektraksi dengan ke empat jenis larutan asam masing-masing diduga termasuk kolagen tipe I yang terdiri dari dua rantai peptida kembar yaitu rantai α_1. Li (1993) menyatakan bahwa semua tipe kolagen terdiri dari tiga rantai α dan β. Selanjutnya dinyatakan hasil elektroforesis ekstrak kolagen dari ekor tikus yang diekstraksi menggunakan larutan asam dapat memisahkan rantai α (rantai α_1 dan α_2) dan rantai β.

Kolagen yang paling banyak dikenal orang adalah kolagen tipe I yang terdiri dari tiga rantai polipeptida.

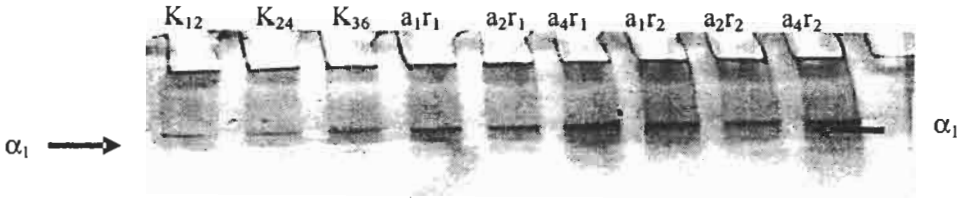
Dua rantai polipeptida disebut tipe α_1 dan rantai polipeptida yang ketiga adalah tipe α_2. Kolagen tipe I adalah paling banyak terdapat pada bagian tubuh yang lunak seperti kulit dan tendon maupun bagian tubuh yang keras seperti tulang dan gigi serta jaringan penghubung. Kolagen tipe II yang terdiri dari tiga rantai peptide α-1 adalah kolagen yang banyak terdapat pada tulang kartilago. Kolagen tipe III yang juga terdiri tiga rantai peptide α_1 banyak terdapat pada pembuluh darah (Liu *et al.*, 2001).

Todbunter *et al.* (1994) melaporkan telah berhasil mengisolasi kolagen tipe I dan II dari kulit dan tendon fleksor kuda dengan menggunakan larutan asam asetat 5 persen. Hasil penelitian Yoshino (1996), Toguchi *et al.* (1999), Trenthan *et al.* (1993) dan Liu *et al.* (2001) didapatkan bahwa berdasarkan hasil elektroforesis kolagen yang diekstraksi dari cakar ayam dengan larutan asam, diketahui mengandung kolagen tipe I dan tipe II.

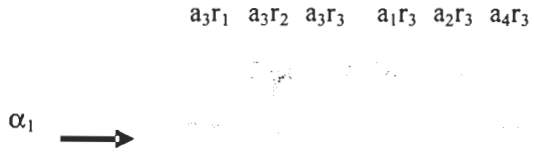
Ichie *et al.* (1999) melaporkan ekstraksi secara mekanik tulang bagian tubuh ayam dihasilkan kolagen tipe I, III dan V, sedangkan yang diekstraksi dari tulang leher banyak mengandung kolagen tipe I (Tanaka dan Shimokomaki, 1996).

Tabel 2. Komposisi asam amino kolagen hasil ekstraksi menggunakan empat jenis larutan asam konsentrasi 5% dengan lama perendaman 24 jam

No.	Asam Amino	Kandungan asam amino ekstrak kolagen (%)			
		Asam Asetat	HCl	Asam Laktat	Asam Sitrat
1.	Aspartat	4,40	15,97	8,29	10,11
2.	Glutamat	9,12	18,94	8,79	11,12
3.	Serin	2,98	6,13	3,04	2,89
4.	Glisin	33,14	24,11	27,98	36,19
5.	Histidin	1,05	2,86	0,92	1,62
6.	Arginin	8,35	10,07	8,12	8,92
7.	Treonin	3,08	6,65	2,86	4,04
8.	Alanin	13,04	16,08	11,35	13,93
9.	Prolin	11,92	11,12	11,03	13,25
10.	Tirosin	1,03	1,92	1,02	1,45
11.	Valin	5,02	9,98	4,08	4,76
12.	Metionin	1,24	3,02	1,11	1,35
13.	Sistein	0,42	0,62	0,27	0,24
14.	Isoleusin	2,23	6,89	2,42	3,06
15.	Leusin	5,06	12,84	4,72	5,15
16.	Penil alanin	1,98	4,82	1,95	3,11
17.	Lisin	5,12	9,01	3,84	4,92



Gambar 1. Pita protein kolagen hasil ektraksi dengan berbagai jenis larutan asam dan lama perendaman, padaSDS-poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE).
K_{12}, K_{24} dan K_{36} adalah berturut-turut sampel kolagen hasil perendaman cakar ayam dengan aquades selama 12, 24 dan 36 jam



Gambar 2. Pita protein kolagen hasil ektraksi dengan berbagai jenis larutan asam dan lama perendaman pada SDS-poliakrilamid Gel elektroforesis (SDS-PAGE).

Ichie *et al.* (1999) melaporkan ekstraksi secara mekanik tulang bagian tubuh ayam dihasilkan kolagen tipe I, III dan V, sedangkan yang diekstraksi dari tulang leher banyak mengandung kolagen tipe I (Tanaka and Shimokomaki, 1996).

Bailey dan Light (1989) menyatakan bahwa semua tipe kolagen yang terdapat dalam tubuh hewan terdiri dari tiga rantai polipeptida α (rantai α). Kolagen tipe I terdiri dari dua rantai α_1 dan satu rantai α_2, sedangkan kolagen tipe II hanya terdiri tiga rantai peptide kembar yaitu α_1. Teknik elektroforesis dapat digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi rantai peptida α_1 dan α_2 yang terdapat pada kolagen baik tipe I maupun II.

Kolagen II. Pada kolagen hasil ekstraksi dengan 5% larutan asam asetat, laktat dan sitrat setelah diidentifikasi dengan SDS-PAGE mempunyai berat molekul yang besar. Hasil penelitian O'Driscall *et al.* (1985) bahwa gel SDS-PAGE dapat digunakan untuk mengidentifikasi kolagen tipe I dan kolagen II.

Kesimpulan

Perendaman cakar ayam dengan larutan asam asetat, sitrat, laktat dan HCl selama 12 sampai 36 jam dihasilkan rendemen ekstrak kolagen berbeda.

Larutan asam laktat dan HCl mempunyai kemampuan hampir sama dalam mengekstrak kolagen cakar ayam. Kolagen hasil ektraksi dengan kombinasi berbagai jenis larutan asam dan lama perendaman mempunyai komposisi asam amino yang sama namun berbeda persentasenya. Kolagen hasil ekstraksi dengan kombinasi berbagai jenis larutan asam dan lama perendaman mempunyai tipe yang sama. Asam laktat mempunyai kemampuan terbaik dalam melarutkan kolagen cakar ayam.

Daftar Pustaka

Asghar, A. and R.L. Hendrickson, 1982. Chemical, Biochemical, function and nutritional characteristics of collagen food systems. *Advances in Food Research.* 28: 232-312.

Bailey, A.J. and N.D. Light, 1989. *Conective Tissue in Meat and Meat Product.* Elsevier Science. London 75-119.

Baliant, G. and J.H. Bowes, 1977. *The Structure and Properties of Collagen. Science and Technology of Gelatin.* Edited by Ward, A.G. and Court A., Academic Press Inc. New York USA. 1-27.

Chow, 1981. *Studies on Using Pork Skin Collagen to Manufacture Edible Film.* National, Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

Ichie, K., Y. Toguchi, Y. Takahata, S. Toki, F. Morimatus, T. Yamanaka, T. Kumagai, Y. Wataya, K. Kumara, Y. Tanaka, K. Ikeda, A. Umetsu, R. Shibata, J. Kurisaki, and R. Yamada, 1999. Low allergenic gelatin prepared from chicken cartilage by acid processing. *45 th. ICoMST, Japan. Proceeding.* 2 : 714-715.

Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox, 1993. Principles of Biochemistry. 2nd Worth. New York.

Li, Shu-Tung, 1993. Collagen biotechnology and its medical application. *Biomed. Eng. ppl.Baia Comm.* 5 :646-657.

Liu, D.C, Y.K. Lin, and M.T. Chen, 2001. Optimum cocndition of extrcting collagen from Chicken feet and its caracetristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sci*ence 14 : 1638-1644.

O'Driscqll, S.W., R.B. Salter, and F.W. Keeley, 1985. A method for quantitative analysis of ratio of type I and II collagen in small samples of articular cartilage. *Analytical Biochemistry.* 145 : 277-285.

Rose, H.J. 1968. *Method of Preparating an Edible Tubular Collagen Casing.* US. Patent.

Taguchi, Y., T. Matsumoto, K. Fujita, F. Morimatus, and T. Shigchisa, 1998. Oral administration of type II collagen from chicken cartilage suppress adjuvant arthritis in rats. *Proceeding of* 44th. CoMST, Spain. 2 : 1030-1031.

Tanaka, C.Y. and M. Shimokamaki, 1996. Collagen type in mechanically deboned chicken meat. *Journal Food Biochem*istry 20 : 215-225.

Todbunter, J. Rory, A.M. Wooton, and R.R. Minor, 1994. Structure of equin type I and type II collagen. *American Journal of Vet*eriner 55 (3) : 425-431.

Trenthan, D.E., R.A. Dynersius-Trenthan, E.J. Orov, H. Cornbitchi, C. Lorenzo, K.L. Sewell, D.A. Hofler, and H.A. Weiner, 1993. Effect of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science.* 261 :1727-1730.

Steel, R.G.D dan J.H. Torrie, 1989. *Prinsip dan Prosedur Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik.* Bambang Sumantri (penerjemah). PT. Gramedia, Jakarta.

Wang, D., 1994. *Studies on manufacturing a functional ingredient from porcine skin collagen by enzyme hydrolysis.* Tunghai University, Taichung, Taiwan, ROC.

Yoshino, S., 1996. Oral administration of type III collagen supresed non-specifically induced chronic arthritis in rats. *Biomedical and Pharmacotheraphy.* 50 : 24-28.