

PEMBUATAN KOLAGEN DARI BERUNOK (*Acaudina molpadiooides*) DENGAN EKSTRAKSI ASAM

*Preparation of Collagen from Beronok (*Acaudina molpadiooides*) by Acid Extraction*

Deden Reinaldi^{1*}, Lily Viruly¹⁾, Yulia Oktavia¹⁾

¹⁾ Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan,
Universitas Maritim Raja Ali Haji, Tanjungpinang, 29111, Indonesia

*korespondensi: brandingasik@gmail.com

ABSTRACT

*Currently, the main source of collagen generally comes from pigs and cow bones, which raises concerns about its use because it contradicts certain religious elements that prohibit consuming anything containing pork and animals that are not slaughtered according to certain teachings. Thus, there is a need for an alternative source of collagen that is safe and halal. One of the alternative collagen sources is from fishery commodities, namely berunok (*Acaudina molpadiooides*). Berunok (*Acaudina molpadiooides*) is one of the potential aquatic biota, it is seen that berunok contains 17 types of essential and non-essential amino acids of which 9 are essential amino acids and 8 are non-essential amino acids. This study aims to determine the characteristics of acid soluble collagen from berunok (*Acaudina molpadiooides*). This research will be conducted in three stages. The first stage is sample preparation, the second stage is extraction of collagen from berunok by acid extraction method, then the third stage is testing collagen yield analysis, pH measurement, proximate analysis and amino acid analysis. The best berunok collagen was found in the P2 treatment (1:2) with a yield value of 3.23% and a pH value of 7.13. Bunok collagen has an ash content of 85.445%, moisture content of 2.66%, protein content of 0.315%, and total fat content of 0.02%. The amino acid composition of berunok collagen extracted using acetic acid has three types of amino acids namely glutamic acid, arginine and glycine.*

Keywords: Amino Acid, Berunok, Collagen, Proximate

ABSTRAK

Saat ini sumber utama kolagen umumnya berasal dari babi dan tulang sapi sehingga menimbulkan kebimbangan untuk penggunaannya karena bertentangan dengan unsur agama tertentu yang melarang untuk mengkonsumsi sesuatu yang mengandung babi dan hewan yang tidak disembelih sesuai ajaran tertentu. Sehingga perlu adanya alternatif sumber kolagen yang aman dan halal. Salah satu bahan alternatif sumber kolagen adalah dari komoditas perikanan yaitu berunok (*Acaudina molpadiooides*). Berunok (*Acaudina molpadiooides*) merupakan salah satu biota perairan yang sangat potensial, hal ini dilihat bahwa berunok mengandung 17 jenis asam amino esensial dan non esensial dimana 9 diantaranya asam amino esensial dan 8 asam amino non esensial. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik kolagen larut asam dari berunok (*Acaudina molpadiooides*). Penelitian ini akan dilakukan dalam tiga tahapan. Tahap pertama yaitu preparasi sampel, tahapan kedua yaitu ekstraksi kolagen dari berunok dengan metode ekstraksi asam, kemudian tahapan ketiga yaitu pengujian analisis rendemen kolagen, pengukuran pH, analisis proksimat dan analisis asam amino. Kolagen berunok terbaik terdapat pada perlakuan P2 (1:2) dengan nilai rendemen sebesar 3,23 % dan nilai pH 7,13. Kolagen berunok memiliki kadar abu 85,445 %, kadar air 2,66 %, kadar protein 0,315 %, dan kadar lemak total 0,02 %. Komposisi asam amino kolagen berunok yang diekstrak menggunakan asam asetat memiliki tiga jenis asam amino yaitu asam glutamat, arginin dan glisin.

Kata kunci: Asam Amino, Berunok, Kolagen, Proksimat

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan protein alami yang berasal dari hewan yang seringkali digunakan di dalam industri kosmetik karena kolagen memiliki kandungan antioksidan, antiaging,

antihipertensi dan dapat mempercepat penyembuhan luka kulit. Saat ini sumber utama bahan baku kolagen umumnya berasal dari babi dan tulang sapi sehingga menimbulkan kebimbangan untuk penggunaannya karena bertentangan

dengan unsur agama tertentu yang melarang untuk mengkonsumsi sesuatu yang mengandung babi dan hewan yang tidak disembelih sesuai ajaran tertentu. Sehingga perlu adanya alternatif sumber kolagen yang aman dan halal.

Salah satu bahan alternatif sumber kolagen adalah dari komoditas perikanan karena aman dan halal untuk digunakan sebagai bahan biofarmaka dan juga pangan. Sumber kolagen dari komoditas perikanan yang banyak diteliti adalah dari teripang. Menurut Purcell (2014) teripang memiliki kandungan kolagen mencapai 86% dari total protein pada tubuh teripang.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2022 sampai bulan April 2022. Pengambilan sampel berunok dilakukan di perairan Kecamatan Moro, Kabupaten Karimun, Kepulauan Riau. Pembuatan kolagen dan pengujian kadar pH dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Universitas Maritim Raja Ali Haji. Sedangkan pengukuran kadar protein, analisis proksimat dan asam amino dilaksanakan di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech, Bogor.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang diperlukan saat penelitian adalah berunok, NaOH, CH₃COOH, aquadest, HgO, K₂SO₄, H₂SO₄, H₃BO₃ (asam borat), NaOH-Na₂S₂O₃ (natrium tiosulfat), HCl, larutan lemak (hexan).

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah gelas beker, kertas saring whatman no. 1, batang pengaduk, mikropipet, cawan porselen, bunsen, labu kjeldahl, labu erlenmeyer, pH meter, tabung reaksi, kieltec, oven, tanur, ekstraktor soxhlet, spektrofotometer, UPLC.

Metode Penelitian

Pada penelitian ini memiliki 1 sampel berunok dengan 3 perlakuan yaitu konsentrasi asam P1 (1:1), P2 (1:2), P3 (1:3) yang di analisis menggunakan rancangan percobaan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) masing-masing dilakukan tiga kali

pengulangan untuk mendapatkan perlakuan terbaik.

Data yang diperoleh dianalisis ragam (ANOVA). Hasil analisis ragam yang menunjukkan perbedaan nyata akan diuji lanjut dengan menggunakan uji lanjut Duncan. Selanjutnya perlakuan terbaik di lanjutkan dengan uji Kadar Protein dan Asam Amino yang dianalisis secara deskriptif.

Prosedur Kerja

Penelitian ini akan dilakukan dalam tiga tahapan. Tahap pertama yaitu preparasi sampel, tahapan kedua yaitu ekstraksi kolagen dari berunok dengan metode ekstraksi asam, kemudian tahapan ketiga yaitu pengujian analisis rendemen kolagen, pengukuran pH, analisis proksimat dan analisis asam amino.

Preparasi Sampel Berunok

Preparasi sampel berdasarkan metode modifikasi Safithri *et al.*, (2020). Berunok yang diperoleh kemudian dicuci sampai bersih lalu dibelah dan dipisahkan dari jeroan, gonad dan kotoran yang ada, setelah itu daging berunok dipotong-potong kecil lalu disimpan dalam wadah tertutup.

Pemisahan Protein Non Kolagen

Pemisahan protein non kolagen berunok menggunakan metode Safithri *et al.*, (2020) dengan modifikasi pada waktu perendaman. Daging berunok yang sudah bersih sebanyak 50 g direndam dalam larutan NaOH 0,1 M pada suhu kamar dengan rasio 1:10 (b/v) selama 24 jam untuk menghilangkan protein non kolagen. Kemudian daging berunok di rendaman dengan larutan aquadest selama 5 menit dan diulangi sebanyak dua kali.

Hidrolisis Kolagen

Hidrolisis kolagen dilakukan berdasarkan metode Safithri *et al.*, (2020). Daging berunok yang sudah dilakukan pemisahan non kolagen lalu direndam pada suhu 4°C selama 48 jam menggunakan larutan CH₃COOH 0,5 M dengan rasio 1:1; 1:2; 1:3 (b/v). Selanjutnya, filtrat disaring memakai kertas saring Whatman No. 1, dan dihasilkan protein kolagen bewujud cair kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga berbentuk kristal.

Rendemen Kolagen

Pengukuran nilai % rendemen kolagen berunok menggunakan metode AOAC (2005). Perhitungan % rendemen kolagen didapat dengan rasio bobot kering kolagen hasil isolasi dengan bobot bahan baku daging sebelum diisolasi. Perhitungan % rendemen kolagen menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{bobot kering kolagen}}{\text{bobot bahan baku}} \times 100\%$$

Pengukuran pH

Pengukuran pH kolagen menggunakan prosedur AOAC (2005). Satu gram kolagen berunok dilarutkan dalam 50 mL akuades lalu dihomogenkan. Instrumen pH meter dihidupkan lalu dikalibrasi menggunakan standar larutan pH 7 dan pH 4, selanjutnya elektroda dicelupkan ke gelas piala yang berisi larutan kolagen, dan diukur nilai pH-nya.

Analisis Proksimat

Analisis proksimat yang diuji pada penelitian ini ditentukan dengan metode AOAC (2005) meliputi kadar air, abu, lemak dan protein. Kadar air ditentukan menggunakan metode oven. Kadar abu ditentukan berdasarkan metode pemanasan menggunakan tanur. Lipid kasar ditentukan menggunakan ekstraksi Soxhlet dengan pelarut organik (dietil eter). Protein kasar ditentukan dengan menggunakan metode Kjeldhal.

Analisis Asam Amino

Pengukuran konsentrasi asam amino menggunakan prosedur analisis AOAC (2005). Tahap awal kolagen dihidrolisis menggunakan larutan HCl 6N dan dipanaskan 100°C, lalu hidrolisat dikeringkan. Hidrolisat kering diderivatisasi menggunakan larutan phenylisothiocyanat, lalu sampel disaring menggunakan kertas saring ukuran 0,45 µL kemudian diinjeksikan ke dalam UPLC. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Proksimat Berunok (*Acaudina molpadiooides*)

Karakteristik bahan baku yang digunakan untuk pembuatan kolagen pada

penelitian ini dilakukan untuk mengetahui komposisi bahan kimia yang terkandung pada berunok sebelum dijadikan sebagai bahan baku pembuatan kolagen. Analisis proksimat berunok dilakukan pada sampel berunok kering yang meliputi kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein. Tabel 1 merupakan hasil analisis proksimat berunok kering.

Tabel 1. Hasil analisis proksimat berunok

No	Parameter (%)	Berunok	<i>Holothuria</i> sp.*
1	Kadar abu	26,83±0,10	3,74
2	Kadar air	16,49±0,16	86,88
3	Kadar protein	47,46±0,35	6,37
4	Kadar lemak total	0,54±0,00	0,82
5	Karbohidrat	8,68±0,30	2,18

Keterangan: Proksimat *Holothuria* sp.* (Roska dan Trijoko, 2021)

Berdasarkan hasil analisis proksimat berunok diperoleh nilai kadar air pada berunok yang telah dikeringkan sebesar 16,49±0,16 lebih tinggi dibandingkan *Holothuria* sp. 86,88% pada penelitian Roska dan Trijoko (2021). Nilai kadar abu brunok sebesar 26,83±0,10 lebih tinggi dibandingkan dengan kadar abu *Holothuria* sp 3,74%. Kadar abu yang tinggi berkaitan dengan mineral pada suatu bahan, pembahan NaCl pada proses pembuatan kolagen membuat mineral pada kolagen cair menjadi tidak hilang dan ikut menjadi abu yang terdeteksi pada kadar abu (Astawan dan Aviana, 2002). Kadar lemak kolagen brunok 0,54±0,00 lebih rendah dibandingkan dengan kolagen teripang sebesar 0,82%. Kadar protein sebesar 47,46±0,35. Kandungan kadar protein yang cukup tinggi membuat berunok bisa dijadikan sebagai bahan baku pembuatan kolagen.

Rendemen Kolagen Berunok (*Acaudina molpadiooides*)

Rendemen yang diperoleh dari pengolahan kolagen merupakan salah satu parameter penting dalam menilai tingkat efektivitas produksi kolagen yang melalui beberapa tahap seperti pemotongan berunok, deproteinasi, hidrolisis dan ekstraksi hingga proses pengeringan. Semakin tinggi

nilai rendemen suatu perlakuan, maka semakin tinggi tingkat efektifitas perlakuan tersebut (Maulida, 2011). Kolagen yang dikeringkan dihitung nilai rendemennya dengan mengalikan rasio berat akhir (berat kolagen hasil pengeringan) dan berat awal (berat biomassa sel yang digunakan) dengan 100% (Sani et al., 2014). Table 2 menunjukkan hasil persentase rendemen kolagen dari berunok.

Tabel 2. Rendemen kolagen berunok

Perlakuan	Rendemen (%)	<i>S.variegatus</i>
P1	1,74±0,08 ^a	
P2	3,23±0,07 ^c	2,43 %
P3	2,95±0,08 ^b	

Keterangan:

Rendemen *S.variegatus* (Safithri et al., 2020)
P1: Perbandingan 100 gr daging berunok dan 100 ml larutan CH₃COOH;
P2: Perbandingan 100 gr daging berunok dan 200 ml larutan CH₃COOH;
P3: Perbandingan 100 gr daging berunok dan 300 ml larutan CH₃COOH;
abc: notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata.

Nilai rendemen kolagen yang dihasilkan dari perbandingan konsentrasi asam asetat P1 sebesar 1,74%, P2 sebesar 3,23% dan P3 sebesar 2,95%. Nilai rendemen tertinggi terdapat pada P2 dengan nilai rendemen sebesar 3,23%. Nilai rendemen kolagen pada berunok lebih tinggi dibandingkan nilai rendemen kolagen teripang gama pada penelitian Safithri et al., (2020), sebesar 2,43% dengan menggunakan metode ekstraksi yang sama.

Nilai rendemen berbeda karena jenis sampel yang digunakan berbeda seperti daging dan kulit pada bahan baku (Safithri et al., 2020). Perbedaan nilai rendemen kolagen berunok dikarenakan beberapa faktor seperti jenis bahan baku yang digunakan, rasio konsentrasi larutan asam asetat dan lama waktu ekstraksi kolagen.

pH Kolagen Berunok (*Acaudina molpadiooides*)

pH dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbedaan perbandingan konsentrasi asam yang digunakan pada penelitian ini. Nilai pH pada kolagen berunok dapat dilihat pada Tabel 3 di bawah.

Tabel 3. pH kolagen berunok

Perlakuan	pH	<i>S.variegatus</i>
P1	7,10±0,01 ^a	
P2	7,13±0,06 ^a	6,12
P3	7,33±0,06 ^b	

Keterangan:

pH *S.variegatus* (Safithri et al., 2020)
P1: Perbandingan 100 gr daging berunok dan 100 ml larutan CH₃COOH;
P2: Perbandingan 100 gr daging berunok dan 200 ml larutan CH₃COOH;
P3: Perbandingan 100 gr daging berunok dan 300 ml larutan CH₃COOH;
abc: notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata.

Nilai pH kolagen brunok P1 sebesar 7,10; P2 sebesar 7,13 dan P3 sebesar 7,33. Dimana nilai pH ini lebih besar dibandingkan kolagen daging teripang gama pada penelitian Safithri et al., (2020), yaitu 6,12. Perbedaan nilai pH ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti metode eksraksi dan perbandingan konsentrasi asam asetat yang berbeda. Nilai pH yang diperoleh pada penelitian ini sudah sesuai dengan standarisasi menurut BSN (2014) yang menetapkan bahwa nilai pH kolagen berkisar antara 6,5-8,0.

Analisis Proksimat Kolagen Berunok (*Acaudina molpadiooides*)

Analisis proksimat dilakukan untuk mengetahui kandungan yang ada dalam suatu bahan pangan serta menguji kualitas bahan pangan dengan menggunakan parameter yang telah ditetapkan oleh badan Standar Nasional Indonesia (SNI) seperti kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak. Sehingga keempat uji yang dilakukan berkaitan dengan penentuan kualitas sampel kolagen dalam penelitian ini. Hasil uji kadar abu, kadar air, kadar protein dan kadar lemak disajikan pada Tabel 4 sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil analisis proksimat kolagen berunok

No.	Parameter	Nilai (%)	SNI 8076- 2014
1	Kadar abu	85,445±0,21	≤ 1,0
2	Kadar air	2,66±0,33	≥ 12
3	Kadar protein	0,315±0,007	≥ 75
4	Kadar lemak total	0,02±0,00	-

Analisis Asam Amino Berunok (*Acaudina molpadiooides*)

Suatu protein dapat dinilai dari perbandingan asam-asam amino yang menyusun protein tersebut. Terdapat dua jenis asam amino yang menyusun protein yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial. Asam amino esensial merupakan asam amino yang tidak dapat disintesis oleh tubuh yaitu leusin, isoleusin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, lisin, dan valin. Asam amino non esensial adalah asam amino yang dapat disintesis oleh tubuh. Asam amino jenis ini adalah alanin, asparagin, asam aspartat, sistin, asam glutamat, glutamin, glisin, hidroksi prolin, prolin, serin, dan tirosin (Suryaningrum *et al.*, 2010).

Komposisi asam amino kolagen berunok yang diekstrak menggunakan asam asetat dapat dilihat pada table dibawah ini. Pada penelitian ini asam amino dari kolagen yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan penelitian penelitian Safithri *et al.*, (2020). Perbedaan kandungan asam amino diduga karena terdapat perbedaan pada bahan baku, metode ekstraksi, konsentrasi bahan pengekstrak yang digunakan.

Tabel 5. Hasil analisis asam amino kolagen berunok

No.	Jenis Asam Amino	Konsentrasi (mg/kg)
1.	L-Serin	44,92±0,0
2.	L-Asam Glutamat	719,60±8,3
3.	L-Fenilalanin	142,82±0,0
4.	L-Isoleusin	51,3±0,0
5.	L-Valin	38,63±0,0
6.	L-Alanin	25,39±0,0
7.	L-Arginin	826,97±4,33
8.	Glisin	548,77±4,13
9.	L-Lisin	100,82±0,0
10.	L-Asam Aspartat	57,17±0,0
11.	L-Leusin	50,19±0,0
12.	L-Tirosin	182,4±0,0
13.	L-Prolin	38,51±0,0
14.	L-Treonin	48,93±0,0
15.	L-Histidin	88,53±0,0

Rendahnya kandungan asam amino pada penelitian ini berbanding lurus dengan rendahnya kadar protein yang dihasilkan dari kolagen berunok. Kadar abu yang tinggi akibat tidak sempurnanya proses demineralisasi juga menyebabkan rendahnya kadar protein dan lemak pada kolagen yang dihasilkan.

Asam amino yang rendah juga terjadi karena protein telah mengalami denaturasi. Terjadinya denaturasi protein dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti pemanasan, pengadukan, asam atau basa dan garam. Tiap faktor tersebut memiliki pengaruh yang berbeda-beda terhadap denaturasi protein.

Suhu penyimpanan sampel juga mempengaruhi kualitas dari kolagen. Selama penyimpanan, semakin tinggi suhu maka kualitas fisikokimia kolagen semakin rendah. Menurut Nofita *et al.*, (2023) suhu optimal penyimpanan kolagen berkisar antar 5-40°C. Kandungan asam amino yang rendah selaras dengan rendahnya kadar protein pada kolagen.

Asam amino glisin pada kolagen yaitu membentuk tiga rantai alfa heliks menjadi struktur super heliks. Arginin merupakan asam amino semi esensial yang memiliki banyak fungsi seperti terlibat dalam produksi berbagai enzim, hormon dan protein struktural yang mendukung pelepasan hormon pertumbuhan, insulin, glukagin dan prolaktin yang merupakan komponen dari hormon vesopressin yang diproduksi oleh kelenjar hipofisis serta merupakan perkursor fisiologis senyawa nitrat, poliamina, prolin, glutamat, kreatin, agmatin dan urea. Arginin sebagai penguat imunitas, merangsang timus dan mendorong produksi limfosit sehingga dapat diaplikasikan pada penyembuhan luka bakar dan luka lainnya. Hal ini menunjukkan manfaat dari asam amino arginin sebagai agen farmasi yang dapat diaplikasikan sebagai anti-aging (Sari *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Kolagen berunok terbaik terdapat pada perlakuan P2 (1:2) dengan nilai rendemen sebesar 3,23% dan nilai pH 7,13. Kolagen berunok memiliki kadar abu 85,445 %, kadar air 2,66 %, kadar protein 0,315 %, dan kadar lemak total 0,02 %. Komposisi asam amino kolagen berunok yang diekstrak

menggunakan asam asetat memiliki tiga jenis asam amino yaitu asam glutamat, arginin dan glisin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada kedua orang tua dan rekan-rekan yang banyak membantu selama proses penyusunan dan penulisan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical of Chemist. The Association of Official Analytical Chemist, Inc: Arlington.
- Astawan, M. & Aviana, T. 2002. Pengaruh Jenis Larutan Perendaman Serta Metode Pengeringan Terhadap Sifat Fisik, Kimia Dan Fungsional Gelatin Dari Kulit Cucut. *J. Teknol dan Industri Pangan*. 14 (1):7-13.
- BSN. 2014. Kolagen kasar dari sisik ikan- Syarat mutu dan pengolahan: SNI 8076-2014. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Maulida, R. 2011. *Ekstraksi Gelatin Dari Tulang Ikan Tenggiri dengan Variasi Konsentrasi HCl*. Skripsi. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Nofita, R., Agustin, R., Fajrin, Mutiara. 2023. Pengaruh Variasi Suhu dan Lama Waktu Penyimpanan terhadap Karakteristik Fisikokimia Kolagen Kulit Ikan Gabus (*Channa striata Bloch*). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 10(1): 89-99.
<http://dx.doi.org/10.25077/jsfk.10.1.89-99.2023>.
- Purcell, S. W. 2014. Processing Sea Cucumbers into Beche-De-Mer: A Manual For Pacific Island Fishers. Southern Cross University, Lismore, and the Secretariat of the Pacific Community, Noumea. 44 Halaman.
- Roska, F. B., Trijoko. 2021. *Keanekaragaman dan Kadar Proksimat Teripang (Holothuroidea) di Zona Intertidal Pantai Sepanjang Gunungkidul*. Skripsi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Safithri, M., Tarman, K., Suptijah, P., Sagita, S. N. 2020. Karakteristik kolagen larut asam teripang gama (*Stichopus variegatus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(1): 166-177. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v23i1.31063>.
- Sari, E. M., Nurilmala, M., Abdullah, A. 2017. Profil Asam Amino dan Senyawa Bioaktif Kuda Laut *Hippocampus comes*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2): 605 – 617. <http://dx.doi.org/10.29244/jitkt.v9i2.19295>.
- Suryaningrum, T. D., Muljanah, I., Tahapari, E. 2010. Profil sensori dan nilai gizi beberapa jenis ikan patin dan hybrid nasutus. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 5 (2): 153-164. <http://dx.doi.org/10.15578/jpbkp.v5i2.419>.