

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian menggunakan praeksperimental dengan rancangan *one shot case study*. Penelitian ini menerapkan rancangan dasar berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Pada penelitian ini diterapkan 2 faktor, faktor pertama menggunakan 3 level konsentrasi asam asetat dan faktor kedua menggunakan 2 level waktu maserasi yaitu 48 jam dan 72 jam. Potensi kolagen hasil isolasi diperiksa terhadap hasil rendemen kolagen, analisis proksimat kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kadar protein, dan uji kadar lemak), uji pH, dan uji pengawet terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* meliputi uji total mikroba dengan metode difusi kertas cakram.

1.2 Sampel

Sampel yang digunakan menggunakan ekstrak kolagen dalam sisik ikan hasil limbah industri rumahan makanan olahan bandeng wilayah hilir Kabupaten Karawang.

1.3 Bahan dan Alat

1.3.1 Bahan

Limbah sisik ikan bandeng, Aquadest (*Rendys Chemical*), naoh (*Brataco*), Asam asetat (*Glasial*), NaCl (*Brataco*), Asam amino standar, H_3BO_3 (*Pudak scientific*), Bromocresol green (*Merck*), Metilen merah (*Arkitos chemical*), HCl pekat (*Merck*), Natrium sulfat (*Merck*), bubuk sisik ikan bandeng. Bakteri *e-coli*, Media agar (*Merck*), Dietil eter (*Merck*).

3.3.2 Alat

Kertas HVS, Kertas Saring Whatman, Tissue, Kompor Listrik (Maspion), Timbangan Analitik (Mettler Toledo), Freeze Dryer (Magnum XL), Kulkas (Sharp), Ph Meter (Hanna), Viscometer Brookfield (Amatex DVI Digital), Alat Kjeldahl (Pyrex), Dan Tanur (Muffle Furnance), Desikator (Duran), Oven (IKA).

1.4 Variabel Penelitian

1.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi asam asetat yaitu 0,25 M; 0,5 M; dan 0,75 M dengan perbandingan waktu maserasi selama 48 jam dan 72 jam untuk mengisolasi kolagen dari ekstrak sisik ikan bandeng.

1.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil rendemen kolagen, analisis proksimat kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kadar protein, dan uji kadar lemak), uji pH, uji pengawet meliputi uji total mikroba ,uji total mikroba dengan metode Difusi Kertas Cakram.

1.4.3 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Operasional Variabel Bebas

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1.	Variasi konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi	Variasi konsentrasi asam asetat (A) yaitu 0,25 M; 0,5 M; dan 0,75 M dengan perbandingan waktu (W) 48 jam dan 72 jam untuk mengisolasi kolagen dari ekstrak sisik ikan bandeng		Ordinal	1. $A_{0,25}W_{48}$ 2. $A_{0,25}W_{72}$ 3. $A_{0,5}W_{48}$ 4. $A_{0,5}W_{72}$ 5. $A_{0,75}W_{48}$ 6. $A_{0,75}W_{72}$

Sumber: (Peneliti, 2022)

Tabel 3. 2 Operasional Variabel Terikat

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Terikat					
1.	Uji kadar air	Uji kadar air yang ada dalam kolagen menggunakan alat oven dan desikator	Oven dan Desikator	Rasio	%
2.	uji kadar abu	Uji kadar abu yang ada dalam kolagen menggunakan alat tanur	Tanur	Rasio	%
3.	uji kadar protein	Uji kadar protein yang ada dalam kolagen menggunakan alat kjeldahl	Kjedahl	Rasio	%
4.	uji kadar lemak	Uji kadar lemak yang ada dalam kolagen menggunakan metode ekstraksi	Alat Ekstraksi	Rasio	%
5.	uji pH	Uji pH yang ada dalam kolagen menggunakan alat pH meter	Ph Meter	Rasio	Ph
6.	uji pengawet metode kertas cakram	Uji pengawet dari sampel kolagen menggunakan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	Jangka Sorong	Rasio	Cm

Sumber: (Peneliti, 2022)

1.5 Prosedur Penelitian

1.5.1 Determinasi

Tahapan pertamam pada penelitian ini adalah melakukan determinasi pada sisik ikan bandeng (*Chanos-Chanos*) yang bertujuan untuk memastikan sampel yang digunakan sudah sesuai dengan morfologi sisik ikan bandeng terhadap pustaka yang dilakukan di Lembaga Ilmu pengetahuan Indonesia (LIPI) , pusat penelitian Oseanografi LIPI Jakarta , Jawa Barat.

1.5.2 Tahap Persiapan Bahan Baku

Sampel bahan baku yaitu sisik ikan bandeng di ambil dengan cara purposive sampling disekitar industri rumahan makanan olahan bandeng wilayah hilir

kabupaten Karawang, sisik ikan yang sudah disiapkan dibersihkan menggunakan air bersih sampai sisik ikan bersih dari kotoran seperti pasir atau lendir sisik, setelah dibersihkan, sisik ikan di keringkan menggunakan *freeze dryer*

1.5.3 Pra perlakuan Sisik Ikan (Modifikasi Cui *et al.*, 2007; Chuaychan *et al.*, 2015)

Pra perlakuan sisik ikan sebelum ekstraksi dilakukan melalui tiga tahap yaitu deproteinisasi, demineralisasi, dan hidrolisis. Sisik ikan yang sudah kering ditimbang sebanyak 100 g kemudian dimasukkan dalam beaker glass 1000 mL. Sebanyak 1000 mL NaOH 1 M dimasukkan ke dalam beaker glass yang berisi sisik ikan 100 g, larutan NaOH 1 M digunakan untuk deproteinisasi untuk menghilangkan protein non kolagen yang terdapat dalam sisik ikan. Sisik ikan direndam dalam larutan NaOH 1 M selama 48 jam pada suhu dingin, larutan perendaman NaOH diukur protein terlarutnya dengan metode Bradford (1976). Kemudian sisik ikan dipisahkan dari larutan NaOH dan dicuci menggunakan aquades hingga pH netral. Demineralisasi sisik ikan dilakukan menggunakan Na₂EDTA 0,5 M dengan rasio 10% (b/v) pada selama 24 jam pada suhu 4°C. Sisik ikan hasil demineralisasi dilanjutkan proses hidrolisis dengan cara direndam dalam larutan asam asetat 0,5 M dengan rasio 10% (b/v) selama 48 jam pada suhu 4°C. Sisik ikan hasil perendaman asam asetat dicuci dengan air mengalir sampai mencapai pH netral sebelum dilanjutkan pada ke tahap ekstraksi selama 2 jam pada suhu 45°C untuk menghindari degradasi kolagen menjadi gelatin. Hasil ekstrak berupa kolagen yang dikeringkan dengan *freeze dryer*.

1.5.4 Proses Ekstraksi Kolagen (Modifikasi Cui *et al.*, 2007)

Sisik ikan di maserasi pada suhu 4°C dengan perbandingan asam asetat 0,25 M ; 0,5 M ; dan 0,75 M dengan perbandingan berat sisik ikan dan volume asam asetat yaitu 1:8 (b/v). Perbandingan waktu maserasi yaitu selama 48 jam dan 72 jam, setelah itu larutan ekstrak kemudian dipisahkan dari residu. Residu ekstraksi lalu ditimbang untuk ekstraksi ulang agar mendapat hasil yang maksimal dengan kondisi yang sama. Larutan ekstrak yang didapatkan dari ekstraksi ulang kemudian digabungkan dengan larutan ekstrak dari ekstraksi pertama. Larutan ekstrak yang didapatkan ditambahkan larutan NaCl 0,9 M. Kemudian larutan diaduk hingga homogen dan sehingga terbentuk gumpalan putih dalam larutan, kemudian disaring

menggunakan kertas saring, endapan yang terbentuk merupakan kolagen basah dan kemudian dikeringkan menggunakan freeze dryer.

1.5.5 Menghitung Rendemen Kolagen (Modifikasi Ramdhani, 2016)

Menimbang berat kolagen kering kemudian di hitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendeman Kolagen \%} = \frac{\text{Berat kolagen kering}}{\text{berat sisik awal}} \times 100 \% \quad \dots\dots\dots (3. 1)$$

1.5.6 Analisa Proksimat (AOAC, 2005)

Analisis proksimat yaitu suatu analisis yang dilakukan untuk mengetahui komposisi kimia suatu bahan yang meliputi analisis kadar air, abu, protein dan kadar lemak yang mengacu pada AOAC 2005, berikut adalah prosedur dari analisis proksimat:

A. Uji Kadar Air (AOAC, 2005)

Cawan kosong ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukan sampel kolagen kedalam cawan kosong sebanyak 1 g dan timbang, setelah itu cawan berisi kolagen ditimbang dan dimasukkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam sampai bobot konstan. Setelah di oven dimasukkan cawan ke dalam desikator selama 1 jam kemudian ditimbang. Dihitung kadar air pada kolagen dengan rumus berikut ini:

$$\text{Kadar air \%} = \frac{B1 - B2}{B} \times 100 \% \quad \dots\dots\dots (3. 2)$$

Keterangan :

B = Berat sampel (g)

B1 = Berat (sampel + cawan) sebelum dikeringkan (g)

B2 = Berat (sampel + cawan) setelah dikeringkan (g)

B. Uji Kadar Abu (AOAC, 2005)

Cawan pengabuan dikeringkan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 600°C, kemudian didinginkan selama 15 menit di dalam desikator dan ditimbang hingga didapatkan berat yang konstan. Sebanyak 5 g sampel kolagen kering dimasukkan ke dalam cawan pengabuan. Cawan berisi sampel dibakar di atas kompor listrik sampai tidak berasap dan dimasukkan ke dalam tanur pengabuan

dengan suhu 600°C selama 1 jam. Selanjutnya cawan tersebut dimasukkan dalam desikator kemudian ditimbang.

$$\text{Kadar abu \%} = \frac{B - A}{C} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3.3)$$

Keterangan :

- A = Berat cawan abu kosong (g)
 B = Berat cawan abu + sampel setelah dikeringkan (g)
 C = Berat sampel (g)

C. Uji Kadar Protein (AOAC, 2005)

Sampel kolagen kering sebanyak 1 g sampel dimasukkan ke dalam labu kjeldahl, kemudian ditambahkan sebutir kjeltab dan 10 mL H₂SO₄. Labu yang berisi larutan tersebut dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 410°C dan ditambahkan air sebanyak 10 mL. Proses ini dilakukan sampai larutan menjadi jernih. Larutan yang telah jernih didinginkan, kemudian ditambahkan 50 mL akuades dan 20 mL NaOH 40% dan didestilasi. Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer 125 mL yang berisi 25 mL asam borat (H₃BO₃) 2% yang mengandung indikator campuran dari bromocresol green 0,1% dan methyl red 0,1% dengan perbandingan 2:1. Destilasi dilakukan dengan menambahkan 50 mL larutan NaOH-Na₂S₂O₃ ke dalam alat destilasi hingga tertampung 40 mL destilat di dalam erlenmeyer dengan hasil destilat berwarna hijau kebiruan. Destilat yang dihasilkan dititrasi dengan HCl 0,09 N sampai warna larutan berubah warna menjadi merah muda. Volume titran dibaca dan dicatat. Perhitungan kadar protein adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \% \text{ Nitrogen} &= \frac{\text{mL HCL sampel} - \text{mL HCL blanko} \times N \text{ HCL} \times 14}{\text{mg sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Protein} &= \% \text{ nitrogen} \times \text{faktor konversi (6,25)} \end{aligned} \quad \dots\dots (3.4)$$

D. Uji Kadar Lemak (AOAC, 2005)

Labu lemak yang akan digunakan dikeringkan dalam oven bersuhu 110°C dimasukkan kedalam desikator dan ditimbang, sampel kolagen sebanyak 1 g dimasukkan kedalam alat ekstraksi (soxhlet) yang telah berisi dietil eter.

Proses reflux dilakukan sampai larutan jernih dan pelarut yang ada di dalam labu lemak berwarna jernih. Labu lemak yang berisi lemak hasil ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C hingga beratnya konstan, lalu dimasukkan dalam desikator dan ditimbang.

Perhitungan kadar lemak sebagai berikut:

$$\text{kadar lemak \%} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100 \% \quad \dots\dots\dots (3.5)$$

Keterangan :

W1 = Berat labu kosong (g)

W2 = Berat sampel (g)

W3 = Berat labu lemak dengan lemak (g)

1.5.7 Uji pH (AOAC, 2005)

Sampel kolagen sebanyak 1 g dilarutkan dalam 50 ml aquadest dan diaduk hingga homogen. pH larutan diukur menggunakan pH meter.

1.5.8 Uji Zat Pengawet (Modifikasi Cavalieri, 2005)

1. Persiapan Alat

Sterilisasi Alat dan Bahan, alat-alat yang digunakan dalam penelitian dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan aluminium foil. Setelah itu dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Untuk alat seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara dipijarkan atau dipanaskan pada nyala api bunsen.

2. Pembuatan Media

Media NA ditimbang sebanyak 28 g dilarutkan dalam aquadestilata 1000 ml kemudian dipanaskan di atas magnetic stirer hingga homogeny dan diperoleh larutan jernih. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit , ukur media 25 ml masukkan kedalam cawan petri dan diinkubasi dalam incubator selama 24 jam dengan suhu 37°C , biarkan hingga memadat.

3. Pembuatan stok bakteri

Pembuatan stok bakteri ini dilakukan untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri, dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni bakteri

Staphylococcus aureus dan *Eschericia coli* ke dalam Nutrien Agar yang telah diinkubasi selama 24 jam, kemudian kedua bakteri diinokulasikan kedalam cawan petri menggunakan mikropipet dan Batang L , kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator.

4. Tahap pengujian

Uji zat pengawet dengan metode kertas cakram

- Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 ose suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan NaCl.
- Kekeruhannya distandarisasi dengan konsentrasi 0.5 Mc Farland sehingga jumlah bakteri memenuhi standarisasi untuk uji kepekaan yaitu: 10^5 – 10^8 /ml.
- Kemudian larutan bakteri yang telah distandarisasi tadi, dioleskan pada media pertumbuhan Nutrient Agar.
- Cakram uji kosong yang telah direndam selama 15 menit di dalam masing-masing stok konsentrasi kolagen tadi diletakkan di atas permukaan agar secara higienis di dalam *laminar air flow*.
- Lalu media yang telah kita buat tadi, diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam, keesokan harinya diukur diameter zona terang (*clear zone*) yang terbentuk dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong.

1.6 Analisis Data

Analisis data kualitas dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial meliputi faktor konsentrasi asam asetat menggunakan perbandingan konsentrasi asam asetat 0,25 M; 0,5 M; dan 0,75 M dan waktu maserasi selama 48 jam, dan 72 jam. Semua perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan, model rancangan adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

μ = nilai tengah umum

A_i = pengaruh konsentrasi asam asetat taraf ke-i

B_j = pengaruh konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi ke-j

AB_{ij} = Interaksi antara pengaruh konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi

ε_{ijk} = pengaruh acak pada pengaruh konsentrasi asam asetat ke-i dan waktu maserasi ke-j serta ulangan ke-k

Tiap unit percobaan diperiksa terhadap hasil rendemen kolagen, analisis proksimat kolagen uji pH, dan analisis zat pengawet. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%. Data ditampilkan dalam bentuk mean, standar deviasi, tabel, dan grafik.

1.7 Cara Penafsiran Hasil

Adapun dilakukan cara penafsiran hasil dengan cara sebagai berikut:

H0: Tidak terdapat perbedaan yang signifikan hasil uji pengawet dengan metode cakram berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng

H1: Terdapat perbedaan yang signifikan hasil uji pengawet dengan metode cakram berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng.

1.8 Penyimpulan Hasil Penelitian

Jika Signifikansi $> 0,05$, H_0 diterima

Jika Signifikansi $< 0,05$, H_0 ditolak

Interpretasinya:

Konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi berpengaruh signifikan terhadap hasil isolasi kolagen berdasarkan uji pengawet dengan metode cakram.