

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan rancangan penelitian

Metode penelitian pra-eksperimen dikombinasikan dengan desain studi kasus tunggal dalam penyelidikan ini. Complete Randomized Design (RAL) dengan pola faktorial 3 x 2 dan tiga pengulangan merupakan desain dasar yang digunakan dalam penelitian ini. Dua faktor digunakan dalam penyelidikan ini; faktor pertama yang digunakan dari tiga tingkat konsentrasi asam asetat. Selain itu, elemen kedua menggunakan waktu maserasi 24 dan 48 jam. Hasil amandemen kolagen, analisis proksimat kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kandungan protein, dan uji kadar lemak), uji pH, dan analisis zat pengemulsi termasuk uji pengukuran persen transmisi, uji stabilitas emulsi, uji homogenitas, uji pengukuran konduktivitas, dan uji viskositas semuanya digunakan untuk memverifikasi potensi kolagen dari hasil isolasi.

3.2 Populasi dan Sampel

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

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 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*).

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*). Kaca Arloji , Amphemeter, Tabung Reaksi.

3.4 Variabel penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

1.4.1.1. Variabel Bebas

Untuk memisahkan kolagen dari ekstrak skala bandeng, penelitian ini menggunakan variabel bebas untuk memvariasikan jumlah asam asetat, khususnya 0,5 M, 1 M, dan 1,5 M dengan rasio waktu maserasi selama 24 jam dan 48 jam.

3.4.1.2 Variabel Terikat

Hasil amandemen kolagen, analisis proksimat kolagen (termasuk tes kadar air, kadar abu, kandungan protein, dan kadar lemak), uji pH, dan analisis agen pengemulsi, yang meliputi pengujian stabilitas emulsi, pengukuran persen transmitr, homogenitas, uji pengukuran konduktivitas, dan uji viskositas, adalah variabel yang terikat dalam penelitian ini.

3.5 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
	Variabel Bebas				

1	variasi konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi	Variasi konsentrasi asam asetat yaitu 0,25 M; 0,5 M; dan 0,75 M dengan perbandingan waktu maserasi selama 24 jam dan 48 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. $A_{0,75}W_{72}$
Variabel Terikat					
1	uji kadar abu	Uji kadar abu yang ada dalam kolagen menggunakan alat tanur	Tanur	Rasio	%
2	uji kadar protein	Uji kadar protein yang ada dalam kolagen menggunakan alat kjeldahl	Kjeldahl	Rasio	%
3	uji kadar lemak	Uji kadar lemak yang ada dalam kolagen menggunakan metode ekstraksi	Alat ekstraksi	Rasio	%
4	uji pH	Uji pH yang ada dalam kolagen menggunakan alat pH meter	Ph meter	Rasio	pH
5	Uji stabilitas emulsi	Uji stabilitas emulsi yang ada dalam kolagen menggunakan alat sentrifugasi.	Gelas ukur	Rasio	%
6	uji viskositas emulsi	Viskositas dari emulsi yang ditunjukkan menggunakan viskometer brookfield	Viscometer Brookfield	Rasio	cP
7	Uji Pengukuran Persen Transmittan	Uji Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 800 nm dan menggunakan aquadest sebagai blanko.	Spektrofotometri UV-VIS	Rasio	%
8	Uji homogenitas	Diuji homogenitasnya dengan cara dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan yang cocok dan harus menunjukkan susunan yang homogen	Kaca	Nominal	1 = Homogen 2 = Tidak Homogen
9	Uji pengukuran Daya Hantar	Pengujian ini dilakukan dengan Air sebagai fase luar mengandung elektrolit yang diperlukan untuk menghantarkan arus listrik. Emulsi A/M yang fase luarnya minyak akan berfungsi sebagai isolator, sehingga pada amperemeter tidak terjadi simpangan	ampheremeter	Rasio	volt

Tabel 3.5 Definisi Oprasional Variabel

3.6 Prosedur penelitian

3.6.1 Tahap persiapan bahan baku

Sisik ikan yang telah disiapkan dibersihkan menggunakan air bersih sampai sisik ikan bersih dari kotoran seperti pasir atau lendir kerak, dan setelah dibersihkan, sisik ikan dikeringkan menggunakan pengering beku. Sampel bahan baku yaitu timbangan bandeng diambil dengan sengaja pengambilan sampel di dekat rumah industri pengolahan makanan bandeng di wilayah hilir kabupaten Karawang.

3.6.2 Pra perlakuan sisik ikan (Modifikasi Cui *et al.*, 2007 ; Chuaychan *et al.*, 2015)

Deproteinisasi, demineralisasi, dan hidrolisis adalah tiga fase yang membentuk pra-perawatan sisik ikan sebelum ekstraksi. Hingga 100 g sisik ikan kering ditimbang dan kemudian ditempatkan dalam gelas kimia 1000 mL. Gelas kimia diisi dengan 100 g sisik ikan dan 1000 mL larutan NaOH 1 M, yang digunakan untuk mendeproteinisasi sisik ikan dan menghilangkan protein non-kolagen yang mungkin dikandungnya. Sisik ikan direndam dalam larutan NaOH 1 M selama 48 jam pada suhu rendah. Metode Bradford digunakan untuk menentukan jumlah protein terlarut dalam larutan perendaman NaOH (1976). Sisik ikan kemudian dikeluarkan dari larutan NaOH dan dinetralkan pH menggunakan aquades. Na₂EDTA 0,5 M digunakan untuk melakukan demineralisasi sisik ikan selama 24 jam pada suhu 4 ° C, dengan rasio 10% (b / v).

Sisik ikan demineralisasi mengalami hidrolisis lebih lanjut dengan merendam selama 48 jam pada suhu 4 ° C dalam larutan asam asetat 0,5 M dengan perbandingan 10% (b / v). Untuk mencegah kolagen terurai menjadi gelatin selama tahap ekstraksi 2 jam pada suhu 450 ° C, sisik

ikan yang direndam asam asetat dibilas dengan air mengalir sampai memiliki pH netral. Output ekstrak mengambil bentuk kolagen yang telah dikeringkan beku.

3.6.3 Proses ekstraksi kolagen (Modifikasi Cui *et al.*, 2007)

Pada suhu 4°C, sisik ikan dimaserasi dalam larutan asam asetat dengan rasio asam asetat 1,5 M, 3 M, dan 4,5 M dan volume asam asetat terhadap rasio berat skala ikan 1:8 (b/v). Periode maserasi dibagi menjadi 24 dan 48 jam, setelah itu larutan ekstrak dan residu dipisahkan. Untuk mencapai hasil terbaik dalam keadaan yang sama, residu ekstraksi kemudian ditimbang untuk ekstraksi ulang. Setelah itu, larutan ekstrak dari ekstraksi pertama dicampur dengan larutan ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi kedua. Larutan NaCl 0,9 M ditambahkan ke larutan yang diekstraksi. Setelah mengaduk campuran sampai menjadi homogen dan membentuk gumpalan putih, disaring melalui kertas saring, endapan yang dihasilkan adalah kolagen basah, dan kemudian dikeringkan menggunakan pengering beku.

3.6.4 Menghitung rendemen kolagen (Modifikasi Ramdhani, 2016)

Menimbang berat kolagen kering kemudian di hitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendeman Kolagen \%} = \frac{\text{Berat kolagen kering}}{\text{berat sisik awal}} \times 100 \%$$

3.6.5 Analisa Proksimat Kolagen (AOAC.,2005)

Mengacu pada AOAC 2005, berikut ini adalah teknik untuk analisis proksimat, yaitu analisis yang dilakukan untuk menilai komposisi kimia suatu bahan dan melibatkan analisis kadar air, abu, protein, dan kadar lemak:

3.6.6 Uji kadar air Kolagen (AOAC.,2005)

Timbangan analitik digunakan untuk menimbang cangkir kosong, setelah itu sampel kolagen ditempatkan ke dalam piring kosong 0,5 g dan ditimbang. Cangkir yang menahan kolagen

kemudian ditimbang dan ditempatkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 5 jam sampai beratnya konstan. Setelah berada di dalam oven, cabut piring selama satu jam sebelum menimbangnya.

Formula berikut digunakan untuk menentukan kadar air kolagen:

$$\text{Kadar air \%} = \frac{B1 - B2}{B} \times 100 \%$$

Keterangan :

B = Berat sampel (g)

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

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

3.6.7 Uji kadar abu Kolagen (AOAC.,2005)

Cangkir pengalengan dikeringkan selama 1 jam pada suhu 60 ° C dalam oven, didinginkan selama 15 menit di lemari es, dan ditimbang berulang kali sampai berat stabil tercapai. Sebuah kanal perbudakan diisi dengan total 5 g bahan kolagen kering. Cangkir yang berisi sampel dipanaskan hingga suhu 60 °C dalam tungku pengalengan selama satu jam setelah dibakar di atas kompor listrik sampai tidak diasapi. Selain itu, cangkir dimasukkan ke dalam decicator sebelum ditimbang.

$$\text{Kadar abu \%} = \frac{B - A}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

A= Berat cawan abu kosong (g)

B= Berat cawan abu + sampel setelah dikeringkan (g)

C= Berat sampel (g)

3.6.8 Uji kadar Protein Kolagen (AOAC.,2005)

Satu gram kolagen kering ditempatkan dalam labu kjeldahl bersama dengan sebutir kjeltab dan sepuluh mililiter H₂SO₄. Dengan 10 mL air ditambahkan, labu yang mengandung larutan ditempatkan dalam oven yang diatur pada suhu 410 °C. Prosedur ini dilanjutkan sampai jawabannya jelas. Setelah mendinginkan larutan yang sebelumnya jelas, 50 mL larutan berair dan 20 mL NaOH ditambahkan. 40% dan deestylated. Temuan distilasi diperhitungkan dalam erlenmeyer 125 mL yang mengandung 25 mL asam borat (H₃BO₃) 2% dan indikator campuran bromocresol green 0,1% dan metil merah 0,1% dalam perbandingan 2:1. Ketika perangkat distilasi dapat menampung 40 mL distilat dalam erlenmeyer dengan distilat hijau kebiruan sebagai produk akhir, 50 mL larutan NaOH-Na₂S₂O₃ ditambahkan ke dalamnya. Distilat yang dihasilkan dititrasi dengan HCl pada konsentrasi 0,09 N sampai larutan berubah menjadi merah muda. Ia membaca dan merekam volume titran. Formula berikut digunakan untuk menentukan kandungan protein:

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{mL \text{ HCL sampel} - mL \text{ HCL blanko} \times N \text{ HCL} \times 14}{mg \text{ sampel}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ nitrogen} \times \text{faktor konversi (6,25)}$$

3.6.9 Uji kadar lemak Kolagen(AOAC.,2005)

Sampel kolagen 1 g ditempatkan ke dalam alat ekstraksi (soxhlet) yang telah diisi sebelumnya dengan dietil eter, dan labu lemak yang akan digunakan dikeringkan dalam oven pada suhu 110 °C, ditempatkan ke dalam decicator, dan ditimbang. Sampai solusinya jelas dan pelarut di dalam labu lemak berwarna jernih, prosedur refluks dilanjutkan. Lemak yang diekstraksi dalam labu lemak dimasak dalam oven pada suhu 105 ° C sampai berat konstan, di mana ia ditempatkan dalam pengering dan ditimbang.

Formula berikut digunakan untuk menentukan kandungan lemak:

$$\text{kadar lemak \%} = \frac{w3 - w1}{w2} \times 100 \%$$

Keterangan :

W1= Berat labu kosong (g)

W2= Berat sampel (g)

W3= Berat labu lemak dengan lemak (g)

3.7 Uji kadar pH kolagen

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

3.8 Analisa Zat Pengemulsi (Modifikasi Anwar *et al*, 2017)

Persiapan sampel emulsi dimulai dengan penimbangan 1 g kolagen, diikuti oleh pembubaran kolagen dalam hingga 50 ml aquadest, homogenisasi sambil dipanaskan hingga 60 ° C dan disimpan selama 10 menit, dan pendinginan hingga 30 ° C. Larutan kolagen kemudian dihomogenisasi selama 1 menit dengan Ultra Turrax T25 pada 8.000 rpm. 50 cc minyak sawit kemudian ditambahkan. Selama tiga menit setelah penambahan oli, kecepatan homogenisasi ditingkatkan menjadi 14.000 rpm. Pada hari pertama, analisis langsung dari viskositas dan indeks krim dilakukan. Analisis organoleptik digunakan untuk menentukan stabilitas emulsi. Ini termasuk pengujian menggunakan Pengukuran Transmisi Persen (%T) (Thakkar et al., 2011), pengukuran homogenitas (Anonim,1979), pengukuran konduktivitas & metode warna (Voigt, 1995), dan pengujian viskositas (Mirhosseini et al., 2009).

3.8.1 Pengukuran stabilitas emulsi dengan metode sentrifugasi (Modifikasi McClement, 2007)

Sampel sebanyak 14 ml dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse, kemudian sentrifuse dilakukan pada kecepatan 4.500 rpm selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan pada suhu ruang, lalu diukur volume cream yang terbentuk.

Creaming Index dihitung menggunakan rumus menurut McClement :

$$CI = \frac{HS}{HE} \times 100 \%$$

3.8.2 Spektrofotometri dengan Pengukuran Persen Transmittan (%T) (Thakkar dkk,2011).

Untuk mengukur seberapa jelas emulsi yang dibuat, pengujian transmisi persen digunakan. Setelah instrumen spektrofotometri dihidupkan dan distabilkan, masukkan kosong dan sampel yang disiapkan ke dalam salah satu tabung spektrofotometer, lalu masukkan tabung lain dengan sampel. Pilih dan atur panjang gelombang cahaya sehingga dapat menganalisis sampel. Hitung absorbansi sampel dan catat persentase absorbansi atau transmisi sampel.

3.8.3 Pengujian homogenitas

Emulsi harus menunjukkan susunan yang homogen ketika diterapkan pada sepotong kaca atau media transparan lain yang sesuai untuk lulus uji homogenitas (Anonim, 1979).

3.8.4 Pengukuran daya hantar

Emulsi yang disiapkan ditempatkan dalam cangkir cangkir, terhubung ke serangkaian arus listrik, dan konduktivitas diukur menggunakan ampermeter. Jika bisa menyala, itu akan menjadi emulsi minyak dalam air. Emulsi jenis air dalam minyak akan digunakan jika sistem tidak menghantarkan listrik.

3.8.5 Pengukuran Viskositas (Modifikasi Mirhosseini *et al.*, 2009)

Viskometer Brookfield digunakan untuk mengukur viskositas. Setelah stabilitas pengukuran tercapai, sampel diambil dalam porsi 100 ml, ditempatkan dalam cangkir piala, dan diputar dengan kecepatan 100 rpm. Dengan melihat nilai yang ditampilkan oleh gadget dalam satuan cP, dimungkinkan untuk menentukan viskositas sampel langsung (centipoise).

3.9 Analisis Data

Memanfaatkan rasio 1,5 M, 3 M, dan 4,5 M untuk Desain Acak Lengkap (RAL) pada faktor konsentrasi asam asetat Tiga tayangan ulang digunakan untuk setiap perawatan, dan model desain berikut digunakan:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

i = 1, 2, dan 3

j = 1, 2, dan 3

Y_{ij} = respon pengaruh konsentrasi asam asetat ke-i ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh konsentrasi asam asetat ke-i

ε_{ij} = pengaruh acak pada konsentrasi asam asetat ke-i ulangan ke j



Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada faktor waktu maserasi adalah selama 24 jam, dan 48 jam. Semua perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Model rancangan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \text{ (Persamaan 1)}$$

Keterangan:

i = 1, dan 2

- j = 1, 2, dan 3
 Y_{ij} = respon pengaruh waktu maserasi ke- i ulangan ke-j
 μ = nilai tengah umum
 τ_i = pengaruh waktu maserasi ke-i
 ϵ_{ij} = pengaruh acak pada waktu maserasi ke-i ulangan ke j.

Memfaatkan rasio 1,5 M, 3 M, dan 4,5 M untuk Desain Acak Lengkap (RAL) pada faktor konsentrasi asam asetat Tiga tayangan ulang digunakan untuk setiap perawatan, dan model desain berikut digunakan:

3.10 Cara Penafsiran Hasil

H0: Tidak terdapat perbedaan signifikan kualitas pengemulsi dengan metode uji stabilitas emulsi, homogenitas, viskositas dan pengukuran persen transmittan berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng

H1: Terdapat perbedaan signifikan hasil uji pengemulsi dengan metode uji stabilitas emulsi, homogenitas, viskositas dan pengukuran persen transmittan berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan waktu maserasi dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng.

3.11 Penyimpulan Hasil Penelitian

Jika Signifikansi $> 0,05$, Ho diterima

Jika Signifikansi $\leq 0,05$, Ho ditolak

Interpretasinya:

Berdasarkan variasi kandungan asam asetat dan waktu maserasi dalam proses ekstraksi kolagen bandeng, hasil uji pengemulsi dengan stabilitas emulsi, homogenitas, viskositas, dan penilaian persen transmisi menunjukkan perbedaan yang substansial.