

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan eksperimental dengan rancangan *one shot case study*, menerapkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola 3 x 2 dengan dua kali pengulangan. Faktor pertama 3 level konsentrasi asam asetat dan faktor kedua 3 level konsentrasi pepsin. Potensi peptida kolagen hasil isolasi diperiksa terhadap hasil rendemen kolagen, karakterisasi peptida kolagen analisis proksimat peptida kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kadar protein, dan uji kadar lemak serta uji pH), dan analisis zat pengemulsi meliputi uji *creaming index* uji homogenitas, dan uji pengukuran daya hantar listrik.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu ekstrak peptida kolagen berasal dari limbah sisik ikan bandeng yang diperoleh dari industri rumahan makanan olahan bandeng di wilayah pesisir pantai Tanjung Pakis Kabupaten Karawang.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

Bahan dan alat yang digunakan meliputi :

3.3.1 Bahan

Bahan yang dibutuhkan yaitu : limbah sisik ikan bandeng, asam asetat, natrium klorida, HCl pekat, natrium sulfat.

3.3.1 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. Kaca Arloji, Amphemeter, Tabung Reaksi.

3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dan Determinasi akan dilakukan di Balai Penelitian

Oceanografi Jakarta. Penelitian ini dilakukan mulai Desember 2022 hingga Juli 2023.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah :

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi asam asetat 1 M; 1,5M; dan 2 M, dengan kombinasi pepsin 0,5%, 1%, dan 1,5% dalam proses isolasi peptida kolagen dari ekstrak sisik ikan bandeng.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil rendemen kolagen, karakterisasi peptida kolagen menggunakan analisis proksimat peptida kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kadar protein, dan uji kadar lemak dan uji pH), dan analisis zat pengemulsi meliputi uji *creaming index*, uji homogenitas, dan uji pengukuran daya hantar listrik.

3.5.3 Variabel Terkendali

Definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini dijelaskan pada Tabel 3.1 sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin pada proses ekstraksi peptida kolagen	Variasi konsentrasi asam asetat 1 M; 1,5M; dan 2M dengan perbandingan konsentrasi pepsin 0,5% b/v, 1% b/v dan 1,5% b/v.	-	Ordinal	1. A ₁ P _{0,5} 2. A ₁ P ₁ 3. A ₁ P _{1,5} 4. A _{1,5} P _{0,5} 5. A _{1,5} P ₁ 6. A _{1,5} P _{1,5} 7. A ₂ P _{0,5} 8. A ₂ P ₁ 9. A ₂ P _{1,5}
Variabel Terikat					
1.	Uji rendemen	Uji rendemen pada peptida kolagen perbandingan berat kering ekstrak dengan jumlah bahan baku		Rasio	%
2.	Uji kadar air	Uji kadar air yang ada dalam peptida	Neraca	Rasio	%

3.	Uji kadar abu	kolagen menggunakan alat oven dan desikator. Uji kadar abu yang ada dalam peptida kolagen menggunakan alat tanur.	Tanur	Rasio	%
4.	Uji kadar protein	Penentuan jumlah protein dengan menentukan jumlah nitrogen yang dikandung suatu bahan	Spektrofotometri	Rasio	%
5.	Uji kadar lemak	Uji kadar lemak yang ada dalam peptida kolagen menggunakan metode ekstraksi	Alat ekstraksi	Rasio	%
6.	Uji kadar pH	Uji pH yang ada dalam peptida kolagen menggunakan alat pH meter	pH meter	Rasio	pH
7.	Uji stabilitas emulsi	Uji stabilitas emulsi yang ada dalam peptida kolagen menggunakan alat sentrifugasi.	Gelas Ukur	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 Listrik	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	Amperemeter	Rasio	Volt

3.6 Prosedur Penelitian

Tahapan kerja dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

3.6.1 Tahap Persiapan Bahan Baku

Pengambilan sampel bahan baku yaitu sisik ikan bandeng dilakukan melalui sampling target dari industri rumahan makanan olahan ikan bandeng di wilayah pesisir pantai Tanjung Pakis Kabupaten Karawang, sisik ikan yang telah disiapkan dicuci dengan air bersih hingga sisik ikan bebas dari kotoran seperti pasir atau sisik lendir, setelah dibersihkan, sisik ikan dikeringkan dengan cara didiamkan pada suhu ruang.

3.6.2 Pra perlakuan Sisik Ikan

Pra perlakuan sisik ikan sebelum ekstraksi dilakukan dalam tiga tahap yaitu penyisihan deproteinsasi, demineralisasi dan hidrolisis. Sisik ikan kering ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass 1000 ml. Sebanyak 1000 mL NaOH 1 M ditambahkan ke dalam gelas kimia berisi 100 gram sisik ikan. Sisik ikan direndam dalam larutan NaOH 1 M selama 48 jam pada suhu dingin, protein terlarut diukur dari rendaman NaOH menggunakan metode Bradford. Sisik ikan kemudian dipisahkan dari larutan NaOH dan dicuci dengan aquades hingga pH netral. Demineralisasi sisik ikan dilakukan menggunakan Na₂EDTA 0,5 M pada 10% (b/v) selama 24 jam pada suhu 4 °C.

Sisik ikan yang mengalami demineralisasi dilanjutkan dengan proses hidrolisis dengan perendaman dalam larutan asam asetat 0,5 M dengan perbandingan 10% (b/v) selama 48 jam pada suhu 4 °C. Sisik ikan yang direndam dalam asam asetat dicuci dengan air mengalir hingga mencapai pH netral sebelum diekstraksi selama 2 jam pada suhu 45 °C untuk mencegah degradasi peptida kolagen menjadi gelatin. Ekstrak yang dihasilkan berupa kolagen peptida yang dikeringkan dengan diangin-anginkan. (Cui *et al.*, 2007; Chuaychan *et al.*, 2015)

3.6.3 Proses Ekstraksi Peptida Kolagen

Proses ekstraksi mengacu pada modifikasi metode Mahboob (2015). Sisik ikan dimaserasi pada suhu 4°C dengan asam asetat 1 M; 1,5 M; dan 2 M selama 48 jam. Kemudian ditambahkan pepsin sebesar 0,5%, 1% dan 1,5%. Larutan ekstrak kemudian dipisahkan dari residunya. Residu ekstrak kemudian ditimbang kembali untuk ekstraksi guna memastikan hasil yang maksimal dalam kondisi yang sama. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 30 menit hingga terbentuk massa putih, kemudian disaring dan dikeringkan dengan freeze dryer, kemudian dilakukan perhitungan peptida kolagen (Cui *et al.*, 2007)

3.6.4 Menghitung Rendemen Peptida Kolagen

Menimbang berat peptida kolagen kering kemudian dihitung menggunakan rumus (Ramdhani, 2016) :

$$\text{rendemen kolagen} = \% \frac{\text{berat kolagen kering}}{\text{berat sisik awal}} \times 100 \%$$

3.6.5 Analisa Proksimat Peptida Kolagen

Analisis proksimat adalah analisis untuk mengetahui komposisi bahan kimia yang meliputi analisis kadar air, kadar abu, protein dan lemak mengacu pada (AOAC. 2005).

3.6.6 Uji Kadar Air Peptida Kolagen

Cawan kosong ditimbang dengan timbangan analitik, kemudian sampel peptida kolagen sebanyak 0,5 gram ditambahkan ke dalam cawan kosong dan ditimbang, kemudian cawan yang berisi peptida kolagen ditimbang dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam sampai bobot yang konstan. Setelah dimasukkan ke dalam oven, cawan dimasukkan ke dalam desikatorator selama 1 jam dan timbang. Hitung kadar (AOAC. 2005) :

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

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 Peptida Kolagen

Cawan pengabuan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang hingga berat konstan. Sebanyak 5 gram sampel peptida kolagen kering ditempatkan dalam cawan penyabunan. Cawan pengabuan berisi sampel dibakar di atas kompor listrik hingga tidak berasap lagi dan dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 60°C selama 1 jam. Setelah itu cawan dimasukkan ke dalam desikator dan ditimbang (AOAC. 2005)

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

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 Peptida Kolagen

Pada pembuatan standar Bovine serum albumin (BSA), BSA ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan kedalam aquades sebanyak 20 mL lalu dihomogenkan. Selanjutnya sebanyak 4,5 mL BSA digunakan untuk pengujian kadar protein.

Pembuatan Kurva Standar Standar protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah BSA dengan konsentrasi masing-masing 0,1; 0,125; 0,25; 0,5 dan 0,75 ml. Selanjutnya diambil 60 µL dari setiap tabung kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi lain yang bersih. Setelah itu masing-masing tabung ditambahkan 3 mL reagen Bradford kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks lalu didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit agar terjadi reaksi antara reagen dengan protein.

Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 595 nm. Melalui pembuatan kurva standar akan dihasilkan persamaan regresi $Y=ax+b$ yang digunakan untuk menentukan kadar protein terlarut. Pengukuran Protein Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah peptida kolagen sisik ikan bandeng, masing-masing sampel diambil sebanyak 60 µL kemudian masing-masing ditambahkan 3 mL reagen Bradford lalu divorteks

kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi pada masing-masing sampel disubstitusikan kedalam rumus persamaan regresi sehingga akan didapatkan kadar protein terlarutnya. Ditentukan kadar persentase protein dalam sampel kolagen (AOAC. 2005)

1.6.9 Uji Kadar Lemak Peptida Kolagen

Labu lemak yang akan digunakan dikeringkan dalam oven bersuhu 110°C dimasukkan kedalam desikator dan ditimbang, sampel peptida kolagen sebanyak 1 gram 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 (AOAC. 2005) :

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

Keterangan :

W1 = Berat labu kosong (g)

W2 = Berat sampel (g)

W3 = Berat labu lemak dengan lemak (g)

3.6.10 Uji Kadar pH Peptida Kolagen

Sampel peptida kolagen sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 50 ml aquadest dan diaduk hingga homogen. pH larutan diukur menggunakan pH meter (Voigt, 1995). Nilai pH standar untuk kosmetik berkisar 6,84-7,02 (Mu'awanah *et al.*, 2014) dan nilai standar pH oral 5,5-7,5 (Husni *et al.*, 2019)

3.7 Analisa Zat Pengemulsi

Persiapan sampel emulsi dimulai dengan penimbangan peptida kolagen sebanyak 1 gram, kemudian peptida kolagen dilarutkan kedalam aquadest sebanyak 50 ml lalu dihomogenisasi sambil dipanaskan sampai suhu 60°C dan ditahan selama 10 menit lalu didinginkan sampai suhu 30°C. Larutan peptida

kolagen kemudian dihomogenisasi menggunakan Ultra Turrax T25 dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Kemudian ditambahkan minyak kelapa sawit sebanyak 50 ml. Setelah penambahan minyak kecepatan homogenisasi dinaikkan menjadi 14.000 rpm selama 3 menit. Analisis *creaming index* dan viskositas langsung dilakukan pada hari ke-0 (Anwar *et al.*, 2017)

Untuk mengukur stabilitas emulsi dilakukan analisis organoleptic, meliputi pengujian Pengukuran Persen Transmittan (%T) (Thakkar *et al.*, 2011), pengukuran homogenitas, pengukuran daya hantar listrik (Voigt, 1995), dan pengujian viskositas (Mirhosseini *et al.*, 2009).

3.7.1 Pengukuran Stabilitas Emulsi Dengan Metode *Creaming Index*

Ditimbang peptida kolagen sebanyak 1 gram yang dilarutkan ke aquadest sebanyak 50 ml lalu dihomogenisasi. Emulsi diukur *Creaming Index* dan viskositasnya. Analisis *Creaming Index* dihitung menggunakan rumus (McClements, 2007) :

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

Keterangan:

CI = *Creaming Index*;

HS = Tinggi lapisan bening (ml);

HE = Tinggi emulsi awal sebelum sentrifuse (ml).

3.7.2 Pengujian Homogenitas

Emulsi diuji homogenitasnya dengan cara dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan yang cocok dan harus menunjukkan susunan yang homogen (Hayati *et al.*, 2020)

3.7.3 Pengukuran Daya Hantar

Emulsi yang sudah dibuat dimasukkan dalam gelas piala kemudian dihubungkan dengan rangkaian arus listrik dan diukur daya hantarnya menggunakan amphermeter. Jika mampu menyala maka emulsi tipe minyak dalam air. Jika sistem tidak menghantarkan listrik maka emulsi tipe air dalam minyak (Voigt, 1995).

3.8 Analisis Data

Analisis data kualitas dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial meliputi faktor konsentrasi asam asetat menggunakan perbandingan konsentrasi asam asetat 1 M; 1,5 M; dan 2 M dan konsentrasi pepsin 0,5%, 1%, dan 1,5%. Semua perlakuan dilakukan sebanyak dua kali pengulangan, 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 pepsin ke-j

AB_{ij} = Interaksi antara pengaruh konsentrasi asam asetat dengan konsentrasi pepsin

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

Tiap unit percobaan diperiksa terhadap hasil rendemen kolagen, analisis proksimat peptida kolagen uji pH, dan analisis bioaktif emulsifier. Data yang diperoleh dianalisis ANOVA dan apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

3.9 Cara Penafsiran Hasil

H₀: Tidak terdapat perbedaan signifikan kualitas pengemulsi dengan metode uji *creaming index* dan uji kualitas pengemulsi yang lain berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi peptida kolagen ikan bandeng

H₁: Terdapat perbedaan signifikan hasil uji pengemulsi dengan metode uji *creaming index* dan uji kualitas pengemulsi yang lain berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi peptida kolagen ikan bandeng.

3.10 Penyimpulan Hasil Penelitian

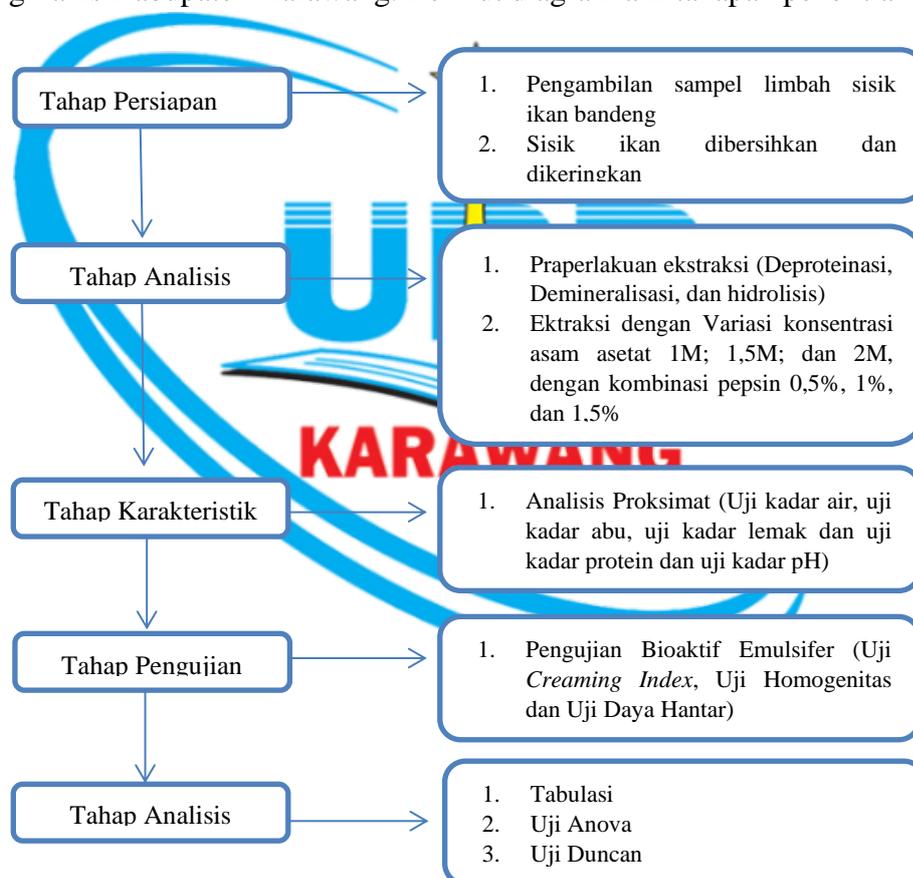
Jika Signifikansi > 0,05, H₀ diterima

Jika Signifikansi ≤ 0,05, H₀ ditolak

Interpretasinya : Terdapat perbedaan signifikan hasil uji pengemulsi dengan metode metode uji *creaming index* dan uji kualitas pengemulsi yang lain variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi peptida kolagen ikan bandeng.

3.11 Diagram Alir Penelitian

Diagram ini berisi tahapan yang dimulai dari pengambilan sampling bahan baku, sampel yang digunakan berasal dari limbah sisik ikan bandeng yang diperoleh dari industri rumahan makanan olahan bandeng di wilayah pesisir pantai Tanjung Pakis Kabupaten Karawang. Berikut diagram alir tahapan penelitian.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

