BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan praeksperimental dengan rancangan *one shot case study*, menerapkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial 3 x 2 dengan dua kali pengulangan. Faktor pertama tiga level konsentrasi asam asetat dan faktor kedua tiga level konsentrasi pepsin. Potensi peptida kolagen hasil isolasi diperiksa terhadap hasil *yield* peptida kolagen, analisis proksimat peptida kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kadar protein, dan uji kadar lemak), uji pH, uji stabilitas emulsi dengan uji batas lapisan selama penyimpanan, uji viskositas, dan uji pengukuran persen transmitan.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu ekstrak peptida kolagen dari sisik ikan *Chanos chanos* hasil limbah dari tambak ikan bandeng wilayah hilir Tanjung Pakis, Kabupaten Karawang, Jawa Barat.

3.3 Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang digunakan terdiri dari:

3.3.1 Bahan

Sisik ikan *Chanos chanos*, Aquadest (*Brataco*), NaOH (*Brataco*), Asam Asetat (*Glasial*), Na_2EDTA (*Brataco*), HCl Pekat (*Merck*), Oleum Lecoris, Bovine Serum Albumin (BSA), dan Reagen Bradford.

3.3.2 Alat

Kertas HVS, Kertas Saring Whatman, Perkamen, Kain Saring, Tissue, Kompor Listrik *(Maspion)*, Timbangan Analitik *(Mettler Toledo)*, Kulkas *(Sharp)*, pH Meter *(Hanna)*, *Viscometer Brookfield (Amatex DVI Digital)*, Spektrofotometer UV-Vis, Tanur *(Muffle Furnance)*, Desikator (*Duran*), Oven (*IKA*), Alat *Soxhlet*, Labu Alas Bundar, Kaca Arloji, Tabung Reaksi (*Pyrex*), Gelas Ukur (*Pyrex*), Gelas

Kimia (*Pyrex*), Mikropipet, Pipet Volume (*Pyrex*), Pipet Tetes, Erlenmeyer (*Pyrex*), Batang pengaduk, Cawan Penguap, Cawan Pengabuan.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan November 2022 s/d Agustus 2023.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari:

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi asam asetat 1 M; 1,5 M; 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 terhadap hasil *yield* peptida kolagen, analisis proksimat peptida kolagen (kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak), uji pH, uji stabilitas emulsi dengan uji batas lapisan selama penyimpanan, uji viskositas, dan uji pengukuran persen transmitan.

3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini dijelaskan pada tabel 3.5.3 berikut ini.

Tabel 3.5.3 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
		Variabel Bebas			
1	Variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin pada proses ekstraksi	Variasi konsentrasi asam asetat yaitu 1 M; 1,5 M; dan 2 M dengan perbandingan konsentrasi pepsin 0,5%, 1%, dan 1,5% b/v	-	Ordinal	1. $A_1P_{0,5}$ 2. A_1P_1 3. $A_1P_{1,5}$ 4. $A_{1,5}P_{0,5}$ 5. $A_{1,5}P_1$ 6. $A1_{,5}P_{1,5}$ 7. $A_2P_{0,5}$ 8. A_2P_1

	peptida kolagen				9. $A_2P_{1,5}$
	Variabel Terikat				
1	Uji *yield*	Uji *yield* yaitu pengujian yang dilakukan untuk mengetahui perbandingan berat kering dari jumlah bahan bakunya	Timbangan digital	Rasio	%
2	Uji kadar air	Uji kadar air yang ada dalam peptida kolagen menggunakan alat oven dan desikator.	Neraca	Rasio	%
3	Uji kadar abu	Uji kadar abu yang ada dalam peptida kolagen menggunakan alat tanur	Tanur	Rasio	%
4	Uji kadar protein	Uji kadar protein yang ada dalam peptida kolagen menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	%
5	Uji kadar lemak	Uji kadar lemak yang ada dalam peptida kolagen menggunakan metode ekstraksi.	Alat ekstraksi	Rasio	%
6	Uji 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 batas lapisan selama penyimpanan	Uji batas lapisan yang ada dalam peptida kolagen menggunakan metode pengukuran batas lapisan yang terlihat selama penyimpanan.	Gelas ukur	Rasio	%
9	Uji viskositas emulsi	Viskositas dari emulsi yang ditunjukan menggunakan viskometer Brookfield.	*Viscometer Brookfield*	Rasio	cP

UBP KARAWANG

10	Uji pengukuran persen transmitan	Pengukuran persen transmitan ini dilakukan dengan blanko aquadest menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 800 nm.	Spektrofotometri UV-VIS	Rasio	%

3.6 Prosedur Penelitian

Tahapan kerja dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.6.1 Tahap Persiapan Bahan Baku

Sampel bahan baku yaitu sisik ikan *Chanos chanos* di ambil dengan cara *purposive sampling* di sekitar industri olahan ikan bandeng di wilayah hilir Karawang, Tanjung Pakis, Kabupaten Karawang. Sampel sisik ikan disiapkan kemudian dicuci bersih dengan air hingga terpisah dari kotoran baik berupa lendir sisik ataupun pasir, setelahnya sisik ikan yang telah bersih kemudian dikeringkan. Selanjutnya dilakukan determinasi sisik ikan yang dilakukan di BRIN Oseanografi, Jakarta.

3.6.2 Proses Determinasi

Proses determinasi dilakukan di Badan Riset dan Inovasi Nasional Oseanografi (BRIN), Jakarta dengan sampel ikan bandeng dari lokasi tambak ikan bandeng wilayah hilir, Tanjung Pakis, Kabupaten Karawang, Jawa Barat.

3.6.3 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 peptida kolagen yang terdapat dalam sisik ikan. Sisik ikan direndam dalam larutan NaOH 1 M selama 48 jam pada suhu dingin 4°C, larutan perendaman NaOH diukur protein terlarutnya dengan metode Bradford

(1976). Kemudian sisik ikan dipisahkan dari larutan NaOH dan dicuci menggunakan aquadest hingga pH netral. Demineralisasi sisik ikan dilakukan menggunakan Na_2EDTA 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 24 jam pada suhu 4ºC untuk menghindari degradasi peptida kolagen menjadi gelatin. Hasil ekstrak berupa serbuk hablur peptida kolagen yang dikeringkan.

3.6.4 Proses Ekstraksi Peptida Kolagen

(Modifikasi Cui *et al.*, 2007)

Proses Ekstraksi mengacu pada modifikasi metode Cui (2007). Sisik ikan di maserasi pada suhu 4°C dengan perbandingan asam asetat 1 M; 1,5 M; dan 2 M selama 48 jam. Kemudian ditambahkan pepsin 0,5%, 1%, dan 1,5%. Larutan ekstrak kemudian dipisahkan dari residu. Residu ekstraksi ini ditimbang untuk diproses ekstraksi ulang dengan tujuan untuk mendapat hasil ekstrak yang maksimal dengan kondisi serupa dengan yang sebelumnya. Larutan disentrifugasi kecepatan 4000 rpm selama 30 menit sampai terbentuk gumpalan putih, kemudian disaring dan dikeringkan. Dihitung *yield* peptida kolagen.

3.6.5 Menghitung *Yield* Peptida Kolagen

(Modifikasi Gama, 2016)

Perhitungan hasil *yield* peptida kolagen dilakukan dengan menimbang berat peptida kolagen yang sudah kering dan dihitung dengan rumus:

$$Yield \text{ Peptida Kolagen } \% = \frac{\text{Berat peptida kolagen kering}}{\text{Berat sisik awal}} \text{ x } 100\ \%$$

3.6.6 Analisa Proksimat Peptida Kolagen

(AOAC, 2005)

Analisis proksimat yaitu suatu suatu metode analisis yang dilakukan untuk dapat diketahui hasil dari komposisi kimia bahan yang diuji yang meliputi analisis

kadar air, analisis kadar abu, analisis kadar protein dan analisis kadar lemak. Metode analisis ini mengacu pada AOAC 2005 dijabarkan sebagai berikut.

1. Uji Kadar Air Peptida Kolagen

(AOAC, 2005)

Cawan kosong ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukan sampel peptida kolagen kedalam cawan kosong sebanyak 0,5 g dan timbang, setelah itu cawan berisi peptida kolagen ditimbang dan dimasukkan ke dalam oven bersuhu 105˚C selama 5 jam sampai bobot konstan. Setelah di oven cawan dimasukkan ke desikator dengan waktu satu jam baru kemudian ditimbang. Persentase kadar air dari peptida kolagen dihitung dengan rumus berikut ini:

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

Keterangan :

B = Berat sampel (g)

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

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

2. Uji Kadar Abu Peptida Kolagen

(AOAC, 2005)

Pengujian kadar abu dilakukan dengan mengeringkan terlebih dahulu cawan pengabuan dengan oben di suhu 60ºC dalam waktu satu jam, kemudian cawan pengabuan tersebut didinginkan dengan waktu 15 menit dalam desikator baru kemudian cawan ditimbang hingga didapatkan berat konstannya. Sebanyak 5 g sampel peptida kolagen kering dimasukkan ke dalam cawan pengabuan. Cawan yang berisi sampel ini kemudian dibakar di atas kompor listrik sampai tidak menunjukkan asap dan dimasukkan ke dalam tanur pengabuan selama waktu satu jam dengan suhu 60ºC. Selanjutnya cawan tersebut dimasukkan dalam desikator kemudian ditimbang.

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

Keterangan :

A = Berat cawan abu kosong (g)

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

C = Berat sampel (g)

3. Uji Kadar Protein Peptida Kolagen

(AOAC, 2005)

Pengujian kadar protein dilakukan dengan menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA). BSA standar dibuat dengan menimbang BSA 20 mg dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 20 mL, dihomogenkan. BSA yang digunakan untuk pengujian kadar protein ini yaitu sebanyak 4,5 mL.

Konsetrasi BSA yang digunakan dalam pembuatan kurva standar protein ini yaitu 0,1; 0,125; 0,25; 0,5 dan 0,75 mL. Selanjutnya diambil dari masing-masing tabung sebanyak 60 µL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi lain yang bersih dan pada tiap tabung ditambahkan 3 mL reagen Bradford kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vorteks lalu didiamkan di suhu ruangan dalam waktu 10 menit hingga terjadi reaksi antara reagen dengan protein.

Pengukuran nilai absorbandi sampel dilaukan pada panjang gelombang 595 nm. Berdasarkan pembuatan kurva standar akan terbentuk persamaan regresi Y=ax+b yang kemudian digunakan untuk penentuan kadar protein yang terlarut. Hasil pengukuran absorbansi yang sebelumnya diperoleh dari masing-masing sampel disubstitusikan ke dalam rumus persamaan regresi untuk didapatkan kadar protein terlarutnya, kemudian dilanjutkan dengan menentukan persentase protein dalam sampel peptida kolagen.

4. Uji Kadar Lemak Peptida Kolagen

(AOAC, 2005)

Pengujian kadar lemak ini dilakukan dengan mengeringkan terlebih dahulu labu lemak yang akan digunakan dengan oven bersuhu 110˚C, kemudian labu lemak yang sudah kering dimasukkan kedalam desikator dan ditimbang, sampel peptida kolagen sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam alat ekstraksi (*soxhlet*) yang sebelumnya diisi dietil eter. Lakukan proses refluks hingga larutan dan pelarut yang ada dalam sampel menjadi jernih. Labu lemak yang telah berisi lemak hasil ekstraksi kemudian dipanaskan dengan menggunakan oven di suhu 105ºC hingga

didapat berat konstan, lalu dimasukkan dalam desikator dan ditimbang. Perhitungan kadar lemak yang dilakukan adalah sebagai berikut :

$$Kadar\ lemak\ \% = \frac{w3 - w1}{w2}\ x\ 100\ \%$$

Keterangan :

W1 = Berat labu kosong (g)

W2 = Berat sampel (g)

W3 = Berat labu lemak dengan lemak (g)

3.6.7 Uji pH Peptida Kolagen

Sampel peptida kolagen sebanyak 1 g dilarutkan dalam 50 mL aquadest dan diaduk hingga homogen. Selanjutnya pH larutan diukur menggunakan pH meter Pengujian terhadap pH sediaan dilakukan mencelupkan elektroda pH meter ke dalam sediaan yang diletakkan dalam wadah. Selanjutnya dilihat pH yang ditunjukkan oleh pH meter (Voigt, 1995). Standar pH untuk emulsi dibagi berdasarkan kategori oral dan topikal. Untuk kategori emulsi oral standar pH yang disarankan yaitu berada di kisaran 5,5 – 7,5 (Husni *et al.*, 2019) dan untuk emulsi topikal berada pada kisaran 6,84 – 7,02 (Mu'awanah *et al.*, 2014)

3.6.8 Analisa Zat Pengemulsi

(Modifikasi Anwar *et al.*, 2017)

Persiapan sampel emulsi dimulai dengan penimbangan peptida kolagen sebanyak 1 g, 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 viskositas dan persen transmitan langsung dilakukan pada hari ke-0.

Untuk mengukur stabilitas emulsi dilakukan analisis organoleptik, meliputi pengujian Pengukuran Persen Transmitan (%T) (Thakkar *et al*, 2011), dan pengujian viskositas (Mirhosseini *et al.*, 2009).

1. Pengukuran Batas-Batas Lapisan yang Terlihat Selama Penyimpanan

(Modifikasi Rocha *et al.*, 2020)

Metode ini merupakan modifikasi Rocha *et al.* (2020). Emulsi yang dibuat diukur dari pembentukan batas ketinggian larutan bening dan krim yang terlihat selama 7 hari pengamatan, kemudian dilakukan perhitungan nilai *Emulsifying Activity* (EA) dengan rumus berukut ini.

$$EA = \frac{(lapisan\ krim\ yang\ terbentuk\ (ml)}{Total\ emulsi\ (ml)}\ x\ 100\ \%$$

2. Spektofotometri dengan Pengukuran Persen Transmitan (%T)

(Thakkar *et al*, 2011)

Pengukuran tingkat kejernihan dari sistem emulsi yang terbentuk dapat dilakukan menggunakan pengujian persen transmitan. Disiapkan blanko dan sampel, pertama-tama nyalakan alat spektofotometri kemudian diamkan hingga ± 30 menit supaya alat stabil kemudian masukan blanko kedalam tabung spektrofotometer, kemudian masukan sampel pada tabung satunya. Analisa selanjutnya dilakukan dengan menentukan dan mengatur panjang gelombang cahaya yang digunakan untuk perlakuan analisis sampel. Ukur absorbansi sampel dan catat persentase dari transmitan atau absorbansi yang dihasilkan sampel.

3. Pengukuran Viskositas

(Modifikasi Mirhosseini *et al.*, 2009)

Pengukuran viskositas dilakukan untuk mengetahui tingkat kekentalan dari sampel yang dilakukan dengan memanfaatkan alat viskometer Brookfield. Pada pengujian ini, sebanyak 100 mL sampel dalam gelas piala diuji menggunakan spindle rotasi yang sesuai untuk kemudian spindel diputar dengan kecepatan 100 rpm untuk dicapai kestabilan pengukuran. Viskositas sampel dapat dilihat dari hasil pembacaan nilai viskositas yang ditunjukkan oleh alat tersebut dalam satuan cP (*centipoise*).

3.7 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:

$$Yijk = \mu + Ai + Bj + ABij + \varepsilon ijk$$

Keterangan:

μ = Nilai tengah umum

Ai = Pengaruh konsentrasi asam asetat taraf ke-i

Bj = Pengaruh konsentrasi pepsin ke-j

ABij = Interaksi antara pengaruh konsentrasi asam asetat dengan konsentrasi pepsin

εijk = Pengaruh acak pada pengaruh konsentrasi asam asetat ke-i dan konsentrasi pepsin ke-j serta ulangan ke-k

Tiap unit percobaan diperiksa terhadap hasil *yield* peptida kolagen, analisis proksimat peptida kolagen uji pH, dan analisis bioaktif emulsifier. Data batas-batas lapisan emulsi yang diperoleh dianalisis menggunakan uji T.

3.8 Cara Penafsiran Hasil

H0: Tidak terdapat perbedaan signifikan kualitas pengemulsi dengan metode uji batas-batas lapisan 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 batas-batas lapisan dan uji kualitas pengemulsi yang lain berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi peptida kolagen ikan bandeng.

3.9 Penyimpulan Hasil Penelitian

Penyimpulan dari hasil penelitian ini dapat dilihat dari besaran nilai yang ditunjukkan dari hasil uji secara statistik yang dapat ditentukan dengan pembacaan sebagai berikut.

Jika Signifikasi > 0,05, H0 diterima

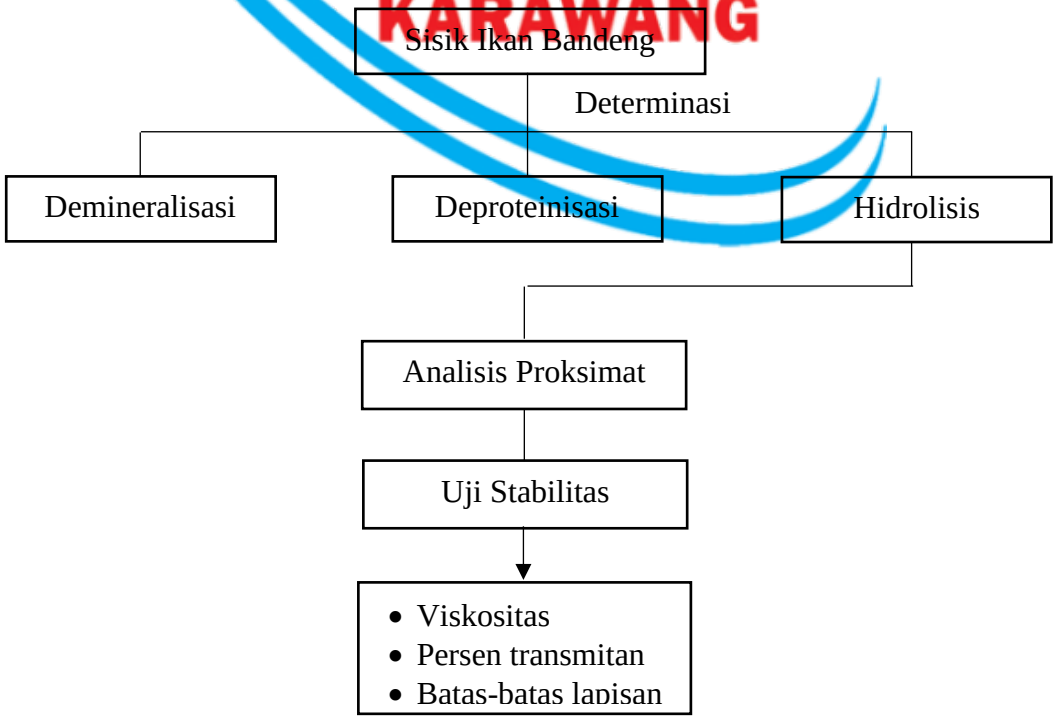
Jika Signifikasi < 0,05, H0 ditolak

Interpretasinya:

Terdapat perbedaan signifikan hasil uji pengemulsi dengan metode uji batas-batas lapisan dan uji kualitas pengemulsi yang lain berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi peptida kolagen ikan bandeng.

3.10 Diagram Alir Penelitian

Berdasarkan gagasan penelitian yang ada, maka diagram alir dari penelitian yang akan dilakukan dijabarkan pada gambar 3.10 dengan jadwal kegiatan ditunjukkan pada lampiran 2.



Gambar 3.10 Diagram Alir Penelitian
(Sumber: Setyaningsih, 2022)