

## **BAB III**

### **METODE 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 tiga kali ulangan. Faktor pertama 3 level konsentrasi asam asetat dan faktor kedua 3 level konsentrasi pepsin. Potensi kolagen hasil isolasi diperiksa terhadap hasil rendemen kolagen, karakterisi kolagen menggunakan SDS-PAGE, analisis proksimat kolagen (uji kadar air, uji kadar abu, uji kadar protein, dan uji kadar lemak).

#### **3.2. Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu ekstrak kolagen dari sisik ikan hasil limbah industri rumah makan olahan bandeng wilayah hilir Kabupaten Karawang.

#### **3.3. Bahan dan Alat**

Bahan dan alat yang digunakan terdiri dari:



### 3.3.1. Bahan

Limbah sisik ikan bandeng (*Chanos chanos*), Aquadest (Rendys Chemical), Natrium Hidroksida (Brataco), Asam asetat (Glasial), Natrium Clorida (Brataco), Asam amino standar, Asam borat (Pudak scientific), Bromocresol green (Merck), Metilen merah (Arkitos chemical), sam klorida 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*), *Viscometer Brookfield (Amatex DVI Digital)*, Alat Kjeldahl (*Pyrex*), Dan Tanur (*Muffle Furnance*), Desikator (*Duran*), Oven (*IKA*), Kaca Arloji, Amphemeter, Tabung Reaksi.

### 3.4. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang dan Determinasi sisik ikan dilakukan di BRIN Oseanografi Jakarta. Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan November 2022 s/d Maret 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, 2M, dengan kombinasi pepsin 0,5 %, 1%, 1,5% dalam proses isolasi kolagen dari ekstrak sisik ikan bandeng.

### 3.5.2. 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), Karakterisasi kolagen menggunakan SDS Page.

### 3.5.3. Definisi Operasional Variabel

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

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
<b>Variabel Bebas</b>					
1	variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses ekstraksi kolagen	Variasi konsentrasi asam asetat yaitu 1 M, 1,5 M, 2M dengan perbandingan konsentrasi pepsin 0,5% b/v, 1% b/v, dan 1,5% b/v	Kalkulator	Ordinal	1. A1P0,5 2. A1P1 3. A1P1,5 4. A1,5P0,5 5. A1,5P1 6. A1,5P1,5 7. A2P0,5 8. A2P1 9. A2P1,5
<b>Variabel Terikat</b>					
1	Uji Rendemen	Uji rendemen pada kolagen dengan membagi hasil berat kolagen kering dengan berat sisik awal di kali 100 %	Kalkulator	Rasio	%
2	Uji Organoleptik	Pengujian organoleptik pada kolagen dengan panca indra	Panca Indra	Nominal	

3	Karakterisasi kolagen	Uji yang menentukan berat molekul suatu protein yang terdapat pada kolagen menggunakan alat SDS PAGE	SDS Page	Rasio	g/mL
4	uji kadar abu	Uji kadar abu yang ada dalam kolagen menggunakan alat tanur	Tanur	Rasio	%
5	Uji kadar protein	Uji kadar protein yang ada dalam kolagen menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio	%
6	uji kadar lemak	Uji kadar lemak yang ada dalam kolagen menggunakan metode ekstraksi	Alat ekstraksi	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 bandeng di ambil dengan cara purposive sampling disekitar industri rumahan 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*.

### 3.6.2. 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. Deproteinasi dengan cara 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 4° C, 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 Na<sub>2</sub>EDTA 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 cara diangin-angin kan.

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

Proses Ekstraksi mengacu pada modifikasi metode Mahboob (2015). Sisik ikan di maserasi pada suhu 4°C dengan perbandingan asam asetat 1 M, 1,5 M, 2M selama 48 jam. Kemudian ditambahkan pepsin 0,5 %, 1%, 1,5%. Larutan ekstrak kemudian dipisahkan dari residu. Residu ekstraksi lalu ditimbang untuk ekstraksi ulang agar

mendapat hasil yang maksimal dengan kondisi yang sama. Larutan disentrifugasi kecepatan 8000 rpm selama 30 menit sampai terbentuk gumpalan putih, kemudian disaring dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Dihitung rendeman kolagen.

#### 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)

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:

##### 3.6.5.1. Uji kadar air Kolagen (AOAC.,2005)

Cawan kosong ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukan sampel kolagen kedalam cawan kosong sebanyak 0,5 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:

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

Keterangan :

B = Berat sampel (g)

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

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

### 3.6.5.2. Uji kadar abu Kolagen (AOAC.,2005)

Cawan pengabuan dikeringkan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 60°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 60°C selama 1 jam. Selanjutnya cawan tersebut dimasukkan dalam desikator kemudian 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)

### 3.6.5.3. Uji kadar Protein Kolagen (AOAC.,2005)

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 kolagen sisik ikan bandeng, masing-masing sampel diambil sebanyak 60  $\mu$ L 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.

#### 3.6.5.4. Uji kadar lemak Kolagen(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 :

$$\text{kadar lemak \%} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100 \%$$

Keterangan :

W1= Berat labu kosong (g)

W2= Berat sampel (g)

W3= Berat labu lemak dengan lemak (g)

### 3.7. Karakterisasi Kolagen

Karakterisasi kolagen mengacu metode modifikasi Dhienda (2020), Analisis berat molekul kolagen dilakukan dengan SDS-PAGE.

### 3.7.1. Pembuatan Gel SDS-PAGE

Pembuatan gel SDS-PAGE diawali dengan pembuatan *resolving gel* 12 % dan dilanjutkan dengan *stacking gel* 6%. Berikut merupakan komposisi bahan dari masing-masing gel ditunjukkan pada Tabel 3.2. Komposisi *Stacking* dan *resolving gel*

**Tabel 3. 2 Komposisi *stacking* dan *resolving gel***

Bahan	Volume	
	<i>Stacking gel</i> 6%	<i>Resolving gel</i> 14 %
Akrilamid/bis-akrilamid 30 %	1 mL	5,33 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2 mL
SDS 10%	50 $\mu$ L	80 $\mu$ L
APS 10%	50 $\mu$ L	80 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2,6 mL	0,5 mL
TEMED	5 $\mu$ L	8 $\mu$ L
Total volume	5000 $\mu$ L	8000 $\mu$ L

### 3.7.2. Preparasi dan *Running* Sampel

Preparasi sampel sebelum proses *Running* dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 5 g, kemudian dilarutkan ke dalam aquadest dengan konsentrasi 3%, 10%, 50%, 100%. Sampel sebanyak 1 mL diambil untuk dipekatkan kadar proteinnya dengan Amicon, kemudian ditambahkan 500  $\mu$ L larutan asam sitrat setelah itu dihomogenkan.

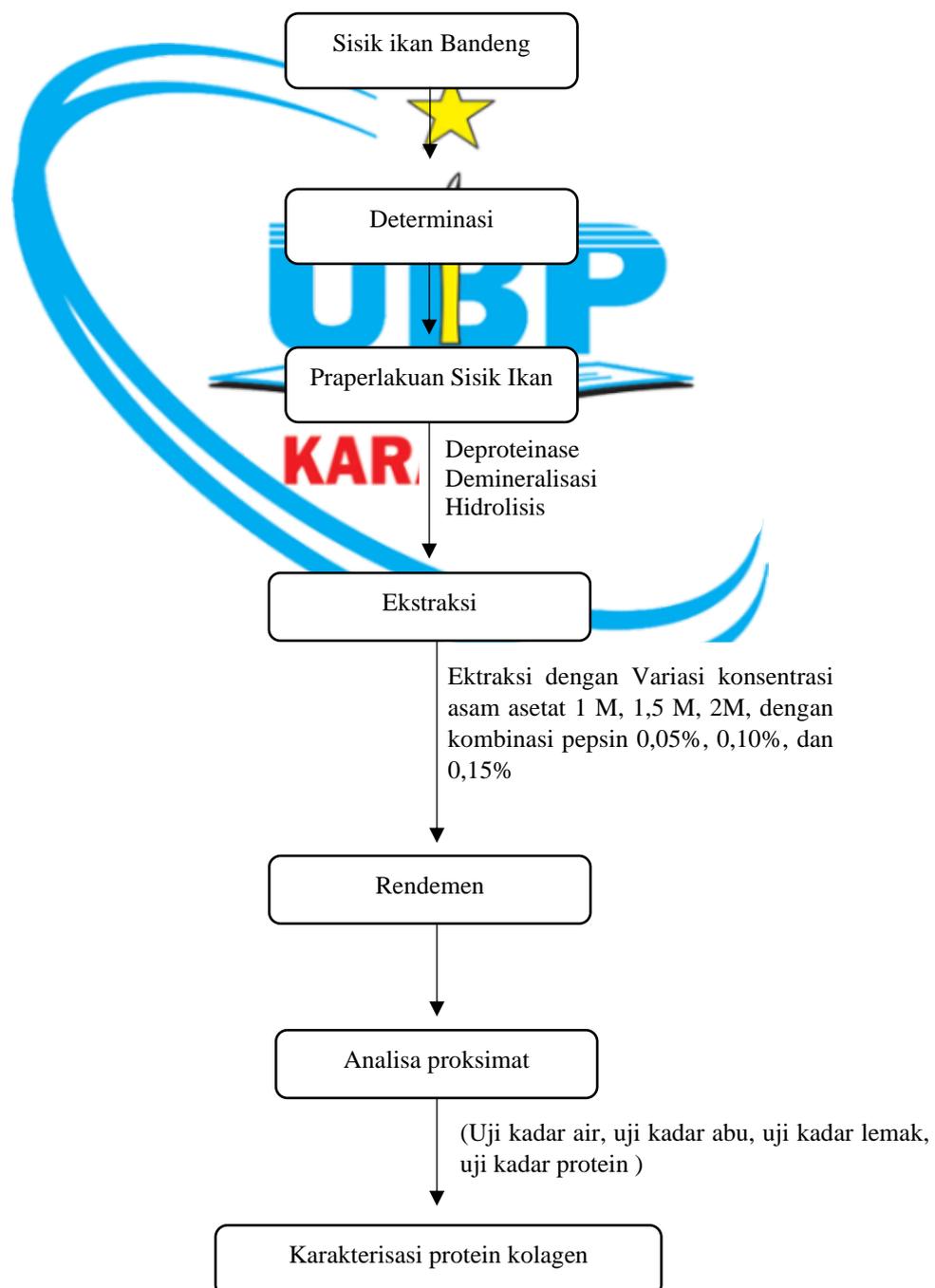
### 3.7.3. Pewarnaan dan pelunturan Gel

Proses *staining* atau pewarnaan gel diawali dengan perendaman gel dalam larutan *comassie brilliant blue* R-250. *Staining* dilakukan selama 25-30 menit dengan di *shaker* pada kecepatan 80 rpm. Kemudian proses *destaining* atau pelunturan, gel dicuci dengan aquades lalu direndam dalam larutan peluntur

(*destain*) selama semalam. Pelunturan warna atau destaining pada gel dilakukan secara berulang hingga didapatkan pita protein berwarna biru dengan latar gel bening.

### 3.8. Diagram alir penelitian

Diagram alir penelitian berisi tahapan-tahapan yang akan dilakukan dalam penelitian ini, dapat dilihat pada gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian berikut.



### Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

#### 3.9. 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, 2M dan konsentrasi pepsin 0,5 %, 1%, 1,5%. Semua perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan, model rancangan adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

$\mu$  = 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

$\epsilon_{ijk}$  = 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, data yang diperoleh dianalisis ANOVA.

#### 3.10. Cara Penafsiran Hasil

$H_0$ : Tidak terdapat perbedaan signifikan hasil rendemen kolagen berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng

$H_1$ : Terdapat perbedaan signifikan hasil rendemen kolagen berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng

#### 3.11. Penyimpulan Hasil Penelitian

Jika Signifikasi  $> 0,05$ ,  $H_0$  diterima

Jika Signifikasi  $\leq 0,05$ ,  $H_0$  ditolak

Interpretasinya:

Terdapat perbedaan signifikan hasil rendemen kolagen berdasarkan variasi konsentrasi asam asetat dan konsentrasi pepsin dalam proses isolasi kolagen ikan bandeng.

