

BAB III

METODE RISET

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Riset

Penelitian berlangsung selama empat bulan yang berlokasi di Lab. Bahan Alam Teknologi dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Bahan dan Alat

Kertas HVS, Kertas Saring Whatman, Timbangan Analitik (*Mettler Toledo*), Freeze Dryer (*Magnum XL*), Kulkas (*Sharp*), pH Meter (*Hanna*), Tanur (*Muffle Furnance*), Desikator (*Duran*), Oven (*IKA*). Sisik ikan bandeng, aquadest (*Rendys Chemical*), NaOH (*Brataco*), Asam asetat (*Glacial*), NaCl (*Brataco*), Enzim Pepsin, bakteri *Eschericia coli*, bakteri *Staphylococcus aureus*, media agar (*Merck*).

3.3 Variabel Riset

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini adalah kelompok perlakuan dengan perbandingan asam asetat 1 M dan pepsin 1%, asam asetat 1 M dan pepsin 2%, asam asetat 1 M dan pepsin 3%. sehingga menghasilkan 3 variasi A1P1; A1P2; A1P3. 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 karakterisasi rendemen kolagen, uji pH, uji pengawet meliputi uji total mikroba dengan metode Difusi Kertas Cakram.

3.4 Prosedur Riset

3.4.1 Tahapan Persiapan Sampel Penelitian

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

3.4.2 Proses Determinasi

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

3.4.3 Pra Perlakuan Sisik Ikan

Prosedur praperlakuan dilakukan sebelum ekstraksi, sisik ikan melalui tiga tahap yaitu deproteinisasi menggunakan larutan NaOH 1 M, demineralisasi menggunakan Na₂EDTA 0,5 M, dan hidrolisis dalam larutan asam asetat 0,5 M dengan rasio 10 % (b/v).

3.4.4 Proses Ekstraksi Kolagen

Proses Ekstraksi Sisik ikan di maserasi pada suhu 4°C dengan perbandingan kombinasi asam asetat 1 M dan pepsin 1%, 2%, dan 3% selama 48 jam. Larutan ekstrak yang didapatkan kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit sehingga terbentuk gumpalan putih dalam larutan, lalu disaring, endapan yang terbentuk merupakan kolagen basah dan kemudian dikeringkan.

3.4.5 Analisis Proksimat

Analisis proksimat peptida kolagen dianalisis kadar air, abu, protein dan kadar lemak.

3.4.6 Karakterisasi Kolagen

Karakterisasi kolagen mengacu metode modifikasi Roche (2017), analisis berat molekul kolagen dilakukan dengan SDS-PAGE.

3.4.7 Uji pH

Sampel kolagen sebanyak 1 g dilarutkan dalam 50 mL air suling dan diaduk hingga homogen. pH larutan diukur dengan pH meter.

3.4.8 Uji Zat pengawet dengan Difusi Disk

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diencerkan dengan mencampurkan satu ose suspensi ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl. Kekeruhan larutan tersebut distandarisasi menggunakan

konsentrasi 0,5 McFarland. Selanjutnya, larutan bakteri ini dioleskan pada media pertumbuhan Nutrient Agar. Cakram uji kosong yang telah direndam selama 15 menit di dalam masing-masing stok konsentrasi 0,05%, 0,1%, 1,5%, dan 2% kolagen tadi diletakkan di dalam *laminar air flow*. Lalu media diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24x3, kemudian diukur diameter zona terang (*clear zone*) yang terbentuk menggunakan penggaris atau jangka sorong.

