

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2025. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Instrumen Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat-alat gelas (Pyrex) meliputi: gelas ukur, gelas beker, erlenmeyer, corong kaca, pipet tetes, mikropipet, batang pengaduk, tabung reaksi, labu ukur, oven, timbangan analitik (*Ohaus*), blender (*Philips*), pH meter, desikator, cawan porselen, tanur, sentrifus (*Gemmy PLC 05*), mikropipet, kuvet, *melting point apparatus* (DMP-800), pipa kapiler, spektrofotometri *UV-Vis* (*Shimadzu UV-1280*), dan spektroskopi IR (*Bruker*).

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit ikan gabus (*Channa striata*), kolagen (p.a), CuSO_4 , kalium natrium tartat, Na_2CO_3 , NaOH 1N, aquadest, NaOH 0,1 M, kloroform, CH_3COOH 0,5 M, NaCl 0,9 M, kain blacu, pH stik, kertas saring, dan alumunium foil.

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian deskriptif kualitatif dengan pendekatan eksperimen laboratorium yang bertujuan untuk memperoleh gambaran tentang isolasi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan gabus (*Channa striata*).

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu isolasi kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai rendeman kolagen kulit ikan gabus (*Channa striata*).

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah tempat dan waktu pengambilan sampel, jenis dan konsentrasi pelarut.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Hewan

Determinasi hewan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi S1 Universitas Bhamada Slawi dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran identitas hewan yang diinginkan.

3.4.2 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah ikan gabus yang diperoleh dari budidaya ikan gabus di Desa Karangwuluh Kecamatan Suradadi Kabupaten Tegal. Kulit ikan gabus (*Channa striata*) berasal dari

ikan yang berukuran 500-1000 gram/ekor. Selanjutnya kulit ikan gabus yang didapat terlebih dahulu dibersihkan sisik, daging serta kotoran yang tersisa dengan pisau dan dicuci dengan air untuk menghilangkan sisa-sisa yang menempel pada kulit ikan hingga bersih. Selanjutnya kulit dipotong dengan gunting ukuran 1 x 1 cm dan dikeringkan dalam oven selama 7 jam. Kemudian dilakukan uji proksimat meliputi kadar air, kadar abu, dan kadar lemak (Dwijayanti *et al.*, 2023).

3.4.3 Analisis Proksimat

Prosedur dari analisis proksimat adalah sebagai berikut:

3.4.2.1 Kadar air

Cawan porselen dikeringkan terlebih dahulu dalam oven dengan suhu 105°C selama 1 jam. Kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang beratnya, selanjutnya sampel ditimbang sebanyak 2 gram lalu dimasukkan kedalam cawan. Selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 105°C selama 3 jam. Setelah itu cawan didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang hingga beratnya konstan (Herson *et al.*, 2023).

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

Keterangan :

A = berat cawan kosong (g)

B = berat cawan porselen dan sampel awal (g)

C = berat cawan dan sampel kering (g)

3.4.2.2 Kadar abu

Cawan porselen dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam, lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang, kemudian sampel ditimbang sebanyak 1 gram dalam cawan. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tanur pengabuan suhu 600°C selama 120 menit. Kemudian cawan abu berisi hasil pengabuan dimasukkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang hingga beratnya konstan (Dwijayanti *et al.*, 2023).

$$\text{Kadar Abu} = \frac{W1 - W2}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W = Berat sampel sebelum dikeringkan

W1 = Berat cawan+sampel

W2 = Berat cawan kosong

3.4.2.3 Kadar lemak

Cawan dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C selama 1 jam dan didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform ad 10 mL kemudian kocok dan dibiarkan 24 jam. Selanjutnya saring dengan kertas saring, ambil 5 mL dan masukkan ke

dalam cawan yang telah ditimbang sebelumnya, kemudian masukkan dalam oven pada suhu 100°C selama 4 jam lalu dimasukkan dalam desikator 30 menit kemudian ditimbang (Nurhidayah *et al.*, 2019).

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{W3-W1}{W2} \times 100\%$$

Keterangan :

W1 = Berat cawan kosong (gram)

W2 = Berat sampel (gram)

W3 = Berat cawan dengan lemak (gram)

3.4.4 Isolasi Kolagen

Isolasi kolagen dapat dilakukan dengan beberapa tahapan diantaranya, yaitu:

3.4.3.1 Preparasi Sampel

Sampel kulit ikan sebanyak 200 gram dipisahkan dari dagingnya lalu dicuci dengan air. Kulit ikan dipotong menjadi ukuran 1×1 cm dan disimpan di dalam *freezer* sampai sampel tersebut akan digunakan. Kulit ikan gabus yang telah dipreparasi dilanjutkan ke proses isolasi (Wulandari *et al.*, 2015).

3.4.3.2 Degreasing

Tahap pertama adalah proses *degreasing* dengan larutan NaOH 0,1 M yang bertujuan untuk menghilangkan protein non kolagen, lemak, mineral, dan pigmen yang

terdapat pada ikan gabus. Kulit ikan gabus direndam ke dalam larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan (1:10) (b/v) selama 3×24 jam dan setiap hari larutan NaOH 0,1 M diganti dengan yang baru. Sampel kulit ikan gabus kemudian dicuci menggunakan aquadest hingga pH sampel mencapai pH 7 (netral) (Romadhon *et al.*, 2019).

3.4.3.3 Hidrolisis

Proses isolasi kolagen selanjutnya yaitu hidrolisis, sampel yang telah dideproteinisasi, diekstraksi menggunakan larutan asam asetat (CH_3COOH) pada konsentrasi 0,5 M dengan perbandingan (1:10) (b/v) dengan waktu perendaman selama 3x24 jam (Romadhon *et al.*, 2019).

3.4.3.4 Presipitasi

Hasil hidrolisis disaring dengan menggunakan kain blacu untuk memisahkan residu dan supernatan. Supernatan dipresipitasi dengan NaCl 0,9 M selama 24 jam. Hasil presipitasi disentrifugasi pada 3500 rpm selama 30 menit, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan *freeze dreyer* (Romadhon *et al.*, 2019).

3.4.5 Rendemen

Rendemen kolagen dihitung berdasarkan persentase perbandingan berat kering kolagen dengan berat bahan baku kulit ikan gabus mentah sebelum dilakukan ekstraksi (Utami *et al.*, 2024).

Rumus perhitungan persentase rendemen sebagai berikut:

$$\text{Rendemen Kolagen (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Keterangan :

A = berat kering kolagen

B = berat bahan baku kolagen

3.4.6 Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan melakukan pengamatan organoleptis pada hasil isolat kolagen kulit ikan gabus. Pengamatan organoleptis dilakukan dengan melihat bentuk, bau dan warna (Khotimah, 2023).

3.4.7 Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman pH merupakan salah satu parameter untuk mengetahui kualitas kolagen. Nilai derajat keasaman pH kolagen diukur menggunakan alat pH meter. Kolagen kering ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan dalam 50 mL air suling hingga homogen. pH meter dinyalakan dan dimasukkan kedalam larutan sampel hingga diperoleh angka yang stabil (Safithri *et al.*, 2019). Syarat pH kolagen yaitu berkisar antara 6,5 sampai 8 (Romadhon *et al.*, 2019).

3.4.8 Uji Titik Leleh Kolagen

Sampel kolagen hasil dari isolasi dimasukan ke dalam pipa kapiler hingga panjang $\pm 0,5$ cm (usahakan bagian yang tertutup pada pipa kapiler). Pipa kapiler tersebut dimasukan kedalam alat, dan pastikan padatan dalam pipa kapiler teramati lewat kaca pembesar pada alat. Alat dinyalakan dan mulai mengamati kenaikan suhu pada termometer. Jika padatan mulai meleleh, catat suhu pada saat padatan mulai meleleh sampai padatan habis (Khairiyah *et al.*, 2019). Titik leleh kolagen berkisar pada suhu antara 28-40°C (Wijaya *et al.*, 2021).

3.4.9 Spektrofotometri *UV Vis*

a. Pembuatan Larutan Induk Kolagen 1000 ppm

Ditimbang kolagen p.a sebanyak 100 mg, dilarutkan sedikit dengan air suling didalam *beaker glass* kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, dicukupkan dengan air suling sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen (Hasan *et al.*, 2020).

b. Pembuatan Larutan standar 100 ppm

Larutan induk kolagen 1000 ppm dipipet sebanyak 5 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan aquadest sampai tanda batas, lalu dikocok hingga homogen (Hasan *et al.*, 2020).

c. Pembuatan Deret Larutan Standar Kolagen dengan Variasi Konsentrasi

Ambil 5 tabung reaksi, masing-masing diberi label konsentrasi yaitu 5 ppm; 10 ppm; 20 ppm; 40 ppm dan 80 ppm. Kemudian dipipet sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 4 mL; dan 8 mL dari larutan baku 100 ppm, kemudian dicupkan volumenya dengan aquadest hingga 10 mL (Hasan *et al.*, 2020).

d. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Kolagen

Larutan standar kolagen dari masing-masing larutan standar diambil sebanyak 2 mL ditambahkan reagen Lowry B sebanyak 2,75 mL, ditambahkan reagen Lowry A sebanyak 0,25 mL lalu didiamkan selama 30 menit, setelah itu masukkan dalam kuvet dan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 600-700 nm. Data serapan (y) dan data konsentrasi (x) dimasukkan dalam perhitungan untuk mendapatkan persamaan regresi linier (Hasan *et al.*, 2020).

e. Pengukuran Kadar Kolagen Kulit Ikan gabus dengan Spektrofotometri *UV-Vis*

Pembuatan larutan hasil isolasi kulit ikan gabus sebanyak 1 gram ditambahkan aquadest sebanyak 50 mL. Penentuan kadar kolagen ditentukan berdasarkan metode lowry menggunakan kolagen yang telah diencerkan lalu dipipet dengan mikropipet sebanyak 2 mL ditambahkan 2,75 mL lowry B kemudian

ditambah 0,25 mL lowry A dan didiamkan selama 30 menit, lalu dimasukkan kedalam kuvet, selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer visible. Kadar kolagen dihitung menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$ (Hasan *et al.*, 2020).

3.4.10 Spektrofotometer FTIR

Karakterisasi gugus fungsi kolagen untuk mengetahui gugus-gugus fungsi khas dari kolagen yang dihasilkan. Analisis menggunakan FTIR (*fourier Transform Infra-Red*). Sampel dimasukkan ke dalam set holder, kemudian dicari serapan yang sesuai, spektrum tersebut dianalisis untuk menentukan gugus-gugus fungsi protein pada kolagen kulit ikan gabus (Safithri *et al.*, 2020).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif menggunakan analisis deskriptif berupa excel. Data kuantitatif yang diperoleh dari penelitian ini adalah kadar air, kadar abu, dan kadar lemak. Hasil karakterisasi dibandingkan dengan standar mutu kolagen dan diidentifikasi gugus fungsi serta serapan kolagen menggunakan spektrofotometer FTIR dan *UV-Vis*.