

BAB III METODE PENELITIAN

1.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan September 2022 hingga November 2022, dengan tetap memperhatikan kondisi pandemi Covid-19. Tempat pelaksanaannya pada Laboratorium Dasar 1 dan Laboratorium Eksperimen Gedung Fransiskus Asisi, Unika Soegijapranata, BSB City.

1.2. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental, dengan desain tunggal berupa 1 variabel bebas, 1 variabel kontrol, dan beberapa variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah tingkatan waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, yakni 0 menit, 10 menit, 20 menit, 30 menit, 40 menit, 50 menit, dan 60 menit. Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah konsentrasi enzim yang digunakan, yakni 3% (w/w) berdasarkan hasil uji pendahuluan. Sedangkan variabel terikat penelitian ini meliputi rendemen, kadar protein, kadar air, kadar lemak, warna bubuk, serta viskositas larutan bubuk.

Penelitian dilaksanakan dalam 2 tahapan, yakni penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Melalui penelitian pendahuluan, dapat diketahui konsentrasi enzim papain yang paling baik dalam menghasilkan rendemen kolagen. Lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* pada uji pendahuluan ini adalah 30 menit pada suhu 30°C dan frekuensi 45 kHz. Setelah dilakukan ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* dan sentrifugasi, selanjutnya supernatan beserta tulang ceker diekstraksi kembali dengan cara direndam pada enzim papain selama 6 jam pada suhu 60°C. Konsentrasi enzim papain yang digunakan dalam uji pendahuluan ini antara lain 1%, 2%, dan 3%, dengan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Setelah direndam, hidrosilat tulang ceker ayam disentrifugasi dan dilakukan pengukuran hasil rendemen. Berdasarkan pengukuran hasil rendemen ini, sampel

dengan konsentrasi enzim papain yang menghasilkan rendemen paling tinggi yang selanjutnya digunakan dalam penelitian utama.

Pada penelitian utama, terdapat 7 tingkat lama waktu ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* yang digunakan, yakni 0 menit, 10 menit, 20 menit, 30 menit, 40 menit, 50 menit, dan 60 menit. Untuk setiap tingkat perlakuan waktu dilakukan 3 kali pengulangan, serta dilakukan pengujian protein supernatan dan pelet ceker ayam hasil *ultrasound*. Setelah ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, selanjutnya supernatan dan ceker ayam direndam kembali dan diinkubasi pada larutan enzim papain dengan konsentrasi terbaik hasil penelitian pendahuluan. Setelah hidrosilat hasil perendaman enzim disentrifugasi, supernatan dan pelet ceker ayam hasil *ultrasound* dan perendaman enzim papain diuji kadar proteinnya. Selain itu juga dilakukan penghitungan total rendemen, uji kadar air, kadar lemak, kadar protein bubuk, viskositas, dan warna untuk mengetahui karakteristik dari bubuk gelatin. Parameter yang diamati pada penelitian utama ini meliputi total rendemen kolagen, kadar protein supernatan dan pelet hasil ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, kadar protein supernatan dan pelet hasil ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* dan perendaman enzim papain, kadar protein supernatan dan pelet bubuk gelatin, viskositas bubuk gelatin, warna bubuk gelatin, kadar air, dan kadar lemak.

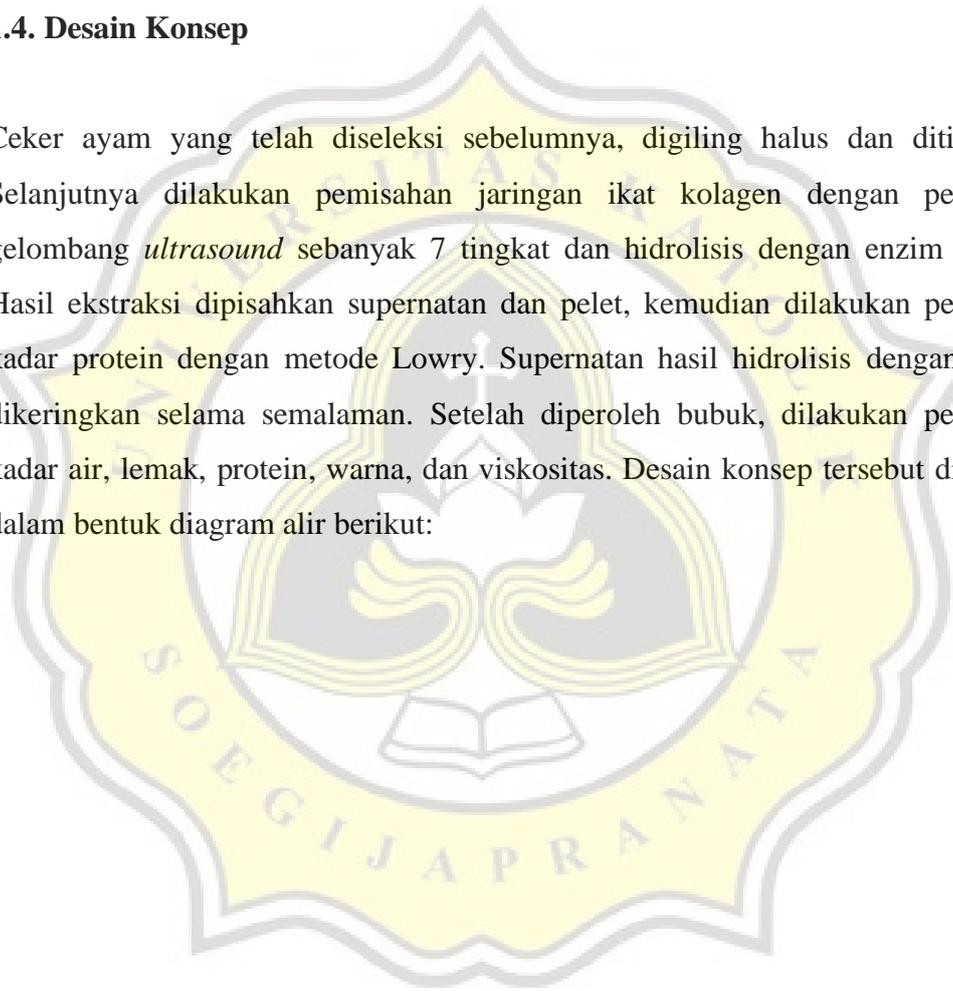
1.3. Kerangka Teoritis

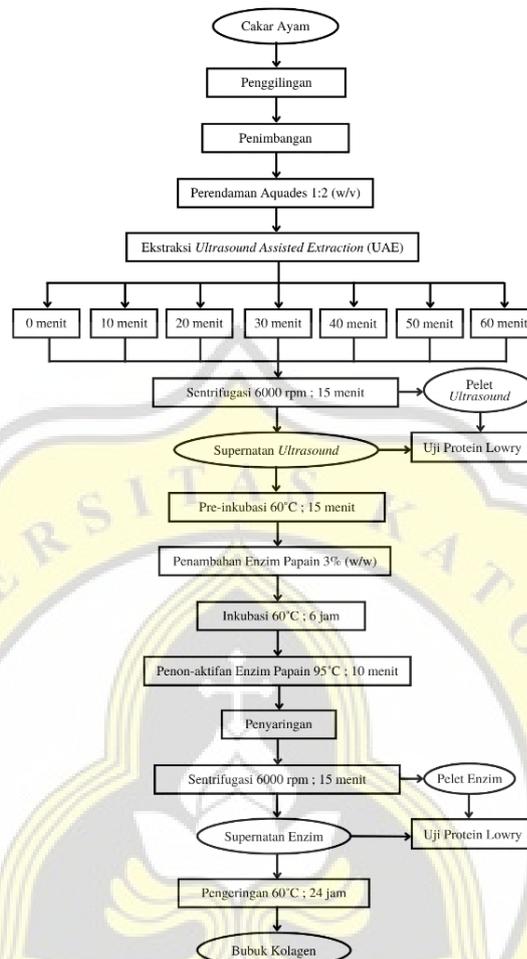
Kolagen merupakan protein dengan berat molekul sekitar 100 kDa hingga 150 kDa (Vate *et al.*, 2022). Menurut Katili (2009), karakteristik umum dari kolagen antara lain berbentuk untaian, tidak larut air, dan tidak dapat dicerna, serta akan mengalami perubahan menjadi gelatin apabila kolagen mengalami pendidihan dalam air. Dengan bantuan asam, basa, enzim, dan perlakuan mekanis, ikatan peptida protein akan terpecah sehingga ekstraksi menjadi lebih mudah dicerna dan diserap tubuh (Anggraini & Yuniarta, 2015). Perlakuan ultrasonik akan menyebabkan serat-serat kolagen terbuka, sehingga perlakuan enzim dapat berjalan dengan cepat dan efektif (Ahmed *et al.*, 2020). Protein sederhana, dibedakan

menjadi 2 berdasarkan kelarutannya, yakni protein larut air (*soluble protein*) dan protein tak larut air (*insoluble protein*) (Manggabarani *et al.*, 2018). Fraksi protein sederhana hasil ekstraksi kolagen pada ceker ayam ada beberapa macam, baik yang dapat dideteksi selama uji protein Lowry, maupun yang tidak dapat diuji (*Non-Albumin Protein/NAPs*) (Siddiqui *et al.*, 2020).

1.4. Desain Konsep

Ceker ayam yang telah diseleksi sebelumnya, digiling halus dan ditimbang. Selanjutnya dilakukan pemisahan jaringan ikat kolagen dengan perlakuan gelombang *ultrasound* sebanyak 7 tingkat dan hidrolisis dengan enzim papain. Hasil ekstraksi dipisahkan supernatan dan pelet, kemudian dilakukan pengujian kadar protein dengan metode Lowry. Supernatan hasil hidrolisis dengan enzim dikeringkan selama semalaman. Setelah diperoleh bubuk, dilakukan pengujian kadar air, lemak, protein, warna, dan viskositas. Desain konsep tersebut disajikan dalam bentuk diagram alir berikut:





Gambar 7. Diagram Alir Penelitian

1.5. Variabel Penelitian

1.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama waktu proses ekstraksi dengan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), yakni 0 menit, 10 menit, 20 menit, 30 menit, 40 menit, 50 menit, dan 60 menit.

1.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah rendemen kolagen tulang ceker ayam yang dihasilkan, kadar air bubuk gelatin, kadar lemak bubuk gelatin, kadar

protein dari supernatan hasil *ultrasound*, kadar protein pelet hasil *ultrasound*, kadar protein supernatan hasil *ultrasound* dan perendaman enzim, kadar protein pelet hasil *ultrasound* dan perendaman enzim, kadar protein supernatan bubuk gelatin, dan kadar protein pelet bubuk gelatin, serta viskositas larutan bubuk gelatin, dan warna bubuk gelatin.

1.5.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah perbandingan tulang ceker ayam dengan aquades saat ekstraksi dengan gelombang *ultrasound* (1:2), suhu dan frekuensi ekstraksi dengan gelombang *ultrasound*, serta konsentrasi enzim, suhu, dan lama waktu perendaman hidrosilat tulang ceker ayam *ultrasound* dengan enzim papain.

1.6. Parameter Penelitian

1.6.1. Parameter Utama

Parameter utama pada penelitian ini antara lain jumlah rendemen kolagen tulang ceker ayam yang dihasilkan, kadar air dari bubuk gelatin, kadar protein dari supernatan hasil *ultrasound*, kadar protein supernatan hasil *ultrasound* dan perendaman enzim, dan kadar protein supernatan bubuk gelatin, serta kadar lemak bubuk gelatin.

1.6.2. Parameter Pendukung

Parameter pendukung pada penelitian ini antara lain, kadar protein pelet hasil *ultrasound*, kadar protein pelet hasil *ultrasound* dan perendaman enzim, kadar protein pelet bubuk gelatin, viskositas larutan bubuk gelatin, dan warna bubuk gelatin.

1.7. Indikator Penelitian

Pada penelitian ini, beberapa indikator penelitian yang digunakan antara lain, untuk menguji kadar protein dari supernatan hasil *ultrasound*, pelet hasil *ultrasound*, supernatan hasil *ultrasound* dan perendaman enzim, pelet hasil *ultrasound* dan perendaman enzim, serta supernatan bubuk dan pelet bubuk gelatin, dilakukan dengan metode Lowry. Untuk mengukur massa rendemen bubuk gelatin digunakan prinsip selisih massa awal dan massa akhir dengan menggunakan timbangan analitik. Untuk analisa warna dari bubuk gelatin dilakukan pengukuran nilai L, a, dan b dari hasil pembacaan *Chromameter*. Untuk analisa viskositas larutan bubuk gelatin digunakan *viscometer*. Prinsip dari pengujian kadar air bubuk gelatin adalah *thermogravimetri*. Untuk analisa kadar lemak bubuk gelatin, digunakan metode *Soxhlet* dengan heksana sebagai pelarut.

1.8. Materi dan Metode

1.8.1. Materi

A. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass* 500 ml, *beaker glass* 250 ml, *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) (UC-10SD), *centrifuge*, *waterbath*, tabung reaksi, *erlenmeyer*, corong, kertas saring, pipet tetes, pipet volume, pengaduk kaca, gelas arloji, Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1800), oven, cawan porselen, loyang, penjepit, desikator, *Chromameter*, *Viscometer* (Brookfield DV-I Prime), *Vortex*, *Soxhlet apparatus*, serta sarung tangan, *plastic wrap*, *aluminium foil*, dan kantong plastik.

B. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ceker ayam, aquades, enzim papain (PT Cortico Mulia Sejahtera), serta reagen uji protein yang meliputi *Bovine Serum Albumin* (BSA), 3,5% NaCl, Na₂CO₃, 0,1 N NaOH, 1% NaK Tartarat, 1% CuSO₄.5H₂O, dan reagen Folin Ciocalteu. Ceker ayam yang digunakan diperoleh dari Rumah Potong Ayam UD. CJDW, Kecamatan Pedurungan, Kota Semarang. Untuk setiap ulangan penelitian, digunakan ceker ayam yang masih segar tidak lebih dari 6 jam setelah dipotong. Ceker ayam yang digunakan memiliki ukuran yang relatif seragam, dan dipilih ceker ayam dengan warna seragam dan tidak cacat sebagai indikasi lama waktu pemotongan yang sama dan kondisi ayam yang sehat. Pembelian ceker ayam dilakukan pada pagi hari sebelum proses ekstraksi, dengan massa ceker yang dibeli sebanyak 1,5 kg untuk setiap ulangannya, kemudian dilakukan penggilingan halus dan diambil sebanyak 1,05 kg untuk 7 tingkat perlakuan.

Untuk penelitian pendahuluan, banyaknya ceker ayam yang diperlukan adalah sebanyak 1,35 kg, aquades, enzim papain sebanyak 27 gram, dan reagen untuk uji kadar protein. Sedangkan untuk penelitian utama, dibutuhkan 3,15 kg ceker ayam, aquades, sebanyak 94,5 gram enzim papain, serta reagen untuk uji kadar protein.

1.8.2. Metode

A. Preparasi Sampel

Sampel ceker ayam digiling kasar dengan bantuan mesin penggiling untuk memperbesar luas permukaan bahan sehingga proses ekstraksi berjalan maksimal (Rahmawati & Nurjanah, 2020). Setelah itu dilakukan penimbangan tulang ceker ayam halus sebanyak 150 gram.

B. Ekstraksi Dengan Gelombang *Ultrasound*

Sampel ceker ayam direndam pada aquades dengan perbandingan ceker:aquades adalah 1:2. Selanjutnya larutan sampel diberi perlakuan *ultrasound* dengan menggunakan instrumen *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) pada frekuensi 45 kHz dan suhu 30°C, serta pada lama waktu sesuai perlakuan. Setelah itu, tulang ceker ayam disaring dan larutannya disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 6000 rpm. Kemudian supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan dari peletnya dengan bantuan spatula laboratorium. Supernatan hasil *ultrasound* digunakan untuk uji selanjutnya (Jain & Anal, 2016).

C. Hidrolisis Dengan Enzim

Sampel supernatan dan tulang ceker ayam dicampurkan kembali pada *beaker glass*, setelah itu dilakukan pre-inkubasi dengan meningkatkan suhu sampel menjadi suhu optimal hidrolisis dengan enzim papain, yakni 60°C. Selanjutnya enzim ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu 60°C. Tahap selanjutnya adalah inaktivasi enzim papain dengan cara dipanaskan dengan *waterbath* bersuhu 95°C selama 10 menit. Kemudian hidrosilat dipisahkan dari tulang ceker dan didinginkan pada suhu 30°C, lalu disentrifugasi kembali selama 15 menit pada kecepatan 6000 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan dilakukan uji analisa selanjutnya, serta pelet juga diambil dengan spatula laboratorium untuk diuji kadar proteinnya (Jain & Anal, 2016).

D. Metode Analisa

D.1. Rendemen Kolagen

Jumlah rendemen dari kolagen tulang ceker ayam dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Shaik *et al.*, 2021):

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{massa kolagen yang terekstrak}}{\text{massa tulang ceker ayam}} \times 100\%$$

D.2. Kadar Air Supernatan dan Kadar Air Bubuk Gelatin

Analisa kadar air supernatan dan kadar air bubuk gelatin dihitung sesuai metode Aziza *et al.* (2019) dengan beberapa perubahan. Cawan porselen dikeringkan terlebih dahulu dengan menggunakan oven bersuhu 100°C selama 2 jam lalu didinginkan pada desikator selama 30 menit dan ditimbang massa cawan kosong. Sampel hasil ekstraksi beserta cawan ditimbang, lalu dipanaskan menggunakan oven bersuhu 60°C selama semalaman. Kemudian dilakukan penurunan suhu sampel dengan cara dimasukkan pada desikator selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan penimbangan kembali massa cawan dan sampel kering, setelah itu dilakukan penghitungan kadar air bubuk gelatin dengan rumus:

$$\text{Wet Basis} = \frac{\text{massa sampel dan cawan awal} - \text{massa cawan dan sampel kering}}{\text{massa cawan dan sampel awal} - \text{massa cawan kosong}} \times 100\%$$

D.3. Kadar Lemak

Metode yang digunakan dalam pengukuran kadar lemak dari bubuk gelatin ceker ayam adalah metode *Soxhlet*. Prinsip dari metode *soxhlet* adalah ekstraksi lemak pada bahan dengan menggunakan pelarut heksana, yang nantinya pelarut ini akan diuapkan kembali dan lemak dapat diukur dan dihitung persentasenya (Baehaki *et al.*, 2016). Sampel bubuk gelatin ceker ayam yang telah dikeringkan ditimbang dengan menggunakan kertas saring. Setelah massa awal sampel dicatat, selanjutnya sampel dibungkus rapat dengan kertas saring. Setelah itu, kertas saring dimasukkan ke dalam *cellulose thimble* lalu dimasukkan ke dalam labu kolektor dan ditambahkan dengan heksana sebagai pelarut. Kemudian, alat *soxhlet apparatus* dirangkai, air dialirkan melalui kondensor, dan *soxhlet* dinyalakan. Dilakukan proses ekstraksi sampel selama kurang lebih 4 jam atau hingga warna sampel

berubah menjadi jernih. Setelah jernih, ekstraksi dihentikan dan pelarut dituang kembali ke dalam jeriken heksana, sedangkan hasil ekstraksi dituang ke dalam cawan porselen yang telah dikeringkan dan ditimbang sebelumnya. Sampel hasil ekstraksi dioven pada suhu 100°C selama kurang lebih 4 jam agar sisa pelarut dan air dalam sampel hilang. Selanjutnya sampel hasil pengovenan didinginkan di dalam desikator selama 20 menit, lalu ditimbang dengan neraca analitik dan dicatat massanya. Kadar lemak dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{\text{massa lemak dan cawan} - \text{massa cawan kosong}}{\text{massa sampel awal}} \times 100\%$$

D.4. Kadar Protein

Untuk analisa kadar protein dari sampel, digunakan metode Lowry. Menurut Pangestu *et al.* (2017), prinsip dari uji protein dengan metode Lowry adalah pembentukan kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, yang selanjutnya kompleks ini akan diuji dengan Spektrofotometer UV-VIS. Tahap pengujiannya sendiri terbagi menjadi 4 tahapan, yakni Pembuatan larutan reagen Lowry, Pembuatan larutan standar BSA, Penentuan kurva baku standar, dan Penentuan kadar protein sampel (Malle *et al.*, 2015). Pada tahap pertama, dilakukan pembuatan keempat larutan reagen yang terdiri dari Reagen A berupa 2 gram Na_2CO_3 dan 0,1 N NaOH, Reagen B berupa 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 1% NaK tartarat, Reagen C berupa 100 ml larutan Reagen A dan 2 ml larutan Reagen B, serta Reagen D berupa reagen Folin Ciocalteu dan aquades (1:1). Pada tahapan kedua, larutan reagen BSA dibuat ke dalam 7 konsentrasi (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm). Pada tahap ketiga, sebanyak 1 mL larutan standar sebelumnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 mL aquades dan 5 mL larutan Reagen C, lalu diaduk dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit. Selanjutnya sebanyak 0,5 mL reagen D ditambahkan, lalu diaduk dan didiamkan kembali selama 30 menit, kemudian diabsorbansi pada panjang gelombang 650 nm. Setelah didapatkan nilai absorbansi dari seluruh larutan standar, kurva standar dapat dibuat dengan konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi

(sumbu y). Tahap terakhir, sebanyak 1 mL sampel yang akan diuji, sebanyak 5 mL reagen C dan sebanyak 3 mL aquades dicampurkan di dalam tabung reaksi, lalu diaduk dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu, larutan sampel ditambahkan dengan 0,5 mL reagen D, lalu diaduk dan didiamkan kembali selama 30 menit. Kemudian absorbansi dari larutan sampel diukur pada panjang gelombang maksimum.

D.5. Warna Bubuk Gelatin

Analisa warna bubuk gelatin dinyatakan dalam satuan CIE Lab, yakni nilai L, a, dan b. Sebelum sampel bubuk gelatin diuji, *chromameter* terlebih dahulu dikalibrasi. Setelah itu, sampel kolagen yang akan diuji dimasukkan ke dalam plastik bening, lalu *chromameter* didekatkan dengan permukaan dari sampel yang akan diuji dan ditekan tombol *test*. Selanjutnya hasil pengukuran akan tampak pada layar *chromameter* (Said *et al.*, 2011). Pengukuran dilakukan dengan 3 kali pengulangan, dengan setiap ulangannya diuji pada titik yang berbeda. Setiap selesai menguji sampel, bagian *chromameter* yang bersentuhan dengan sampel dibersihkan dengan menggunakan tisu bersih dan kering. Setelah didapatkan sebanyak 3 nilai untuk setiap satuan L*, a*, dan b*, selanjutnya dilakukan perhitungan rata-rata. Dari nilai rata-rata tersebut, dilakukan penambahan nilai +80 untuk satuan a*, serta nilai +70 untuk satuan b* (Sinaga, 2019).

D.6. Viskositas Larutan Bubuk

Viskositas dari larutan bubuk gelatin dengan konsentrasi 6,67% (w/v) diuji dengan menggunakan instrumen *Viscometer* (Asih *et al.*, 2019). Sebanyak 3,335 gram bubuk gelatin ditimbang dan dilarutkan ke dalam 50 ml aquades bersuhu 60°C. Sebelum diuji, *viscometer* disesuaikan terlebih dahulu kecepatan dan persentase *spindel* sesuai yang akan digunakan. Setelah itu *spindel* dari *viscometer* dicelupkan ke dalam sampel yang akan diuji. Besarnya nilai viskositas dari sampel yang diuji akan tampak pada layar *viscometer*, dan ditunggu hingga nilai tersebut konstan.

Setiap viskositas sampel telah selesai diukur, *spindel* dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan menggunakan tisu kering (Hidayat *et al.*, 2016).

D.7. Pemisahan Protein Terlarut dan Tidak Terlarut

Metode untuk memisahkan keberadaan protein terlarut dan tidak terlarut pada kolagen ceker ayam dapat dilakukan dengan bantuan instrumen *sentrifuge*. Bubuk gelatin yang telah dilarutkan, dipisahkan antara padatan dengan cairannya dengan *sentrifuge* pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Dari pemisahan ini, akan didapatkan supernatan yang merupakan protein larut air dan pelet yang merupakan protein tidak larut air.

E. Analisa Data Statistik

Seluruh hasil uji dianalisis diolah dan dilakukan tabulasi data dengan bantuan aplikasi Microsoft Excel. Setelah itu, hasil tabulasi diuji normalitas dan homogenitasnya dengan bantuan aplikasi SPSS versi 16. Apabila data yang diuji menunjukkan hasil tidak normal dan/atau tidak homogen, ditandai dengan pada tabel *Stem and Leaf* menunjukkan nilai $< 0,05$, maka perlu dilakukan pengulangan. Setelah seluruh data yang diuji normal dan homogen, selanjutnya dilakukan analisis secara kuantitatif dengan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) *One Way* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc* dan *Duncan Test* untuk membandingkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar tingkat sampel yang diuji dan perbedaan diantara pasangan perlakuan yang dapat terjadi. Data diolah dan dinyatakan dalam bentuk *means* dan *standard deviation*. Metode analisis sendiri dilakukan dengan bantuan aplikasi SPSS versi 16 (Jain & Anal, 2016).