

III. MATERI DAN METODE

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian termasuk penelitian pendahuluan dan penelitian utama dilakukan mulai dari tanggal 10 Agustus 2022 hingga 3 Desember 2022. Penelitian dilakukan di Laboratorium milik Fakultas Teknologi Pertanian yang berada di Gedung Fransiskus Asisi Kampus BSB Soegijapranata *Catholic University*. Penelitian pendahuluan dilakukan di Laboratorium Rekayasa Pangan A. Penelitian utama serta pengujian rendemen, kadar air, warna, lemak, dan protein dilakukan di Laboratorium Dasar 1. Pengujian viskositas dan kadar protein menggunakan spektrofotometer dilakukan di Laboratorium *Experiment*.

3.2. Materi

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan gelatin antara lain *beaker glass*, neraca digital, *ultrasonic cleaner* UC-10SD, gelas ukur, oven, sentrifugator, tabung sentrifugasi, cawan porselen, kaca arloji, loyang *aluminium*, *aluminium foil*, dan *plastic wrap*. Alat yang digunakan untuk analisis gelatin antara lain gelas ukur, *beaker glass*, spektrofotometer, labu erlenmeyer, corong kaca, tabung reaksi, *waterbath*, *texture analyzer*, *chromameter*, *vortex*, *micropipette*, *viscometer*, labu distilasi, pipet tetes, dan kertas saring.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan gelatin antara lain ceker ayam dari UD CJDW di Pasar Pedurungan Semarang, enzim papain dari PT Cortico Mulia Sejahtera, dan aquades. Bahan yang digunakan untuk analisis gelatin dan peptida antara lain Bovine Serum Albumin (BSA), NaOH, NaCl, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na/K tartarat, Na_2CO_3 , folin ciocalteu, dan heksana.

3.3. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan variabel bebas tunggal, satu variabel kontrol, dan 2 variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah

enam tingkatan konsentrasi enzim papain (w/w) antara lain 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% yang pada setiap tingkatannya dilakukan tiga kali pengulangan sehingga penelitian ini memiliki 18 unit penelitian. Variabel kontrol pada penelitian ini adalah lama waktu *ultrasound* selama 30 menit pada seluruh unit penelitian. Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik fisik dan kimia gelatin ceker ayam. Karakteristik kimia yang diamati pada penelitian ini antara lain kadar air, kadar lemak, dan kadar protein. Parameter fisik yang diamati pada penelitian ini adalah massa atau rendemen, viskositas, dan warna (L, a, b).

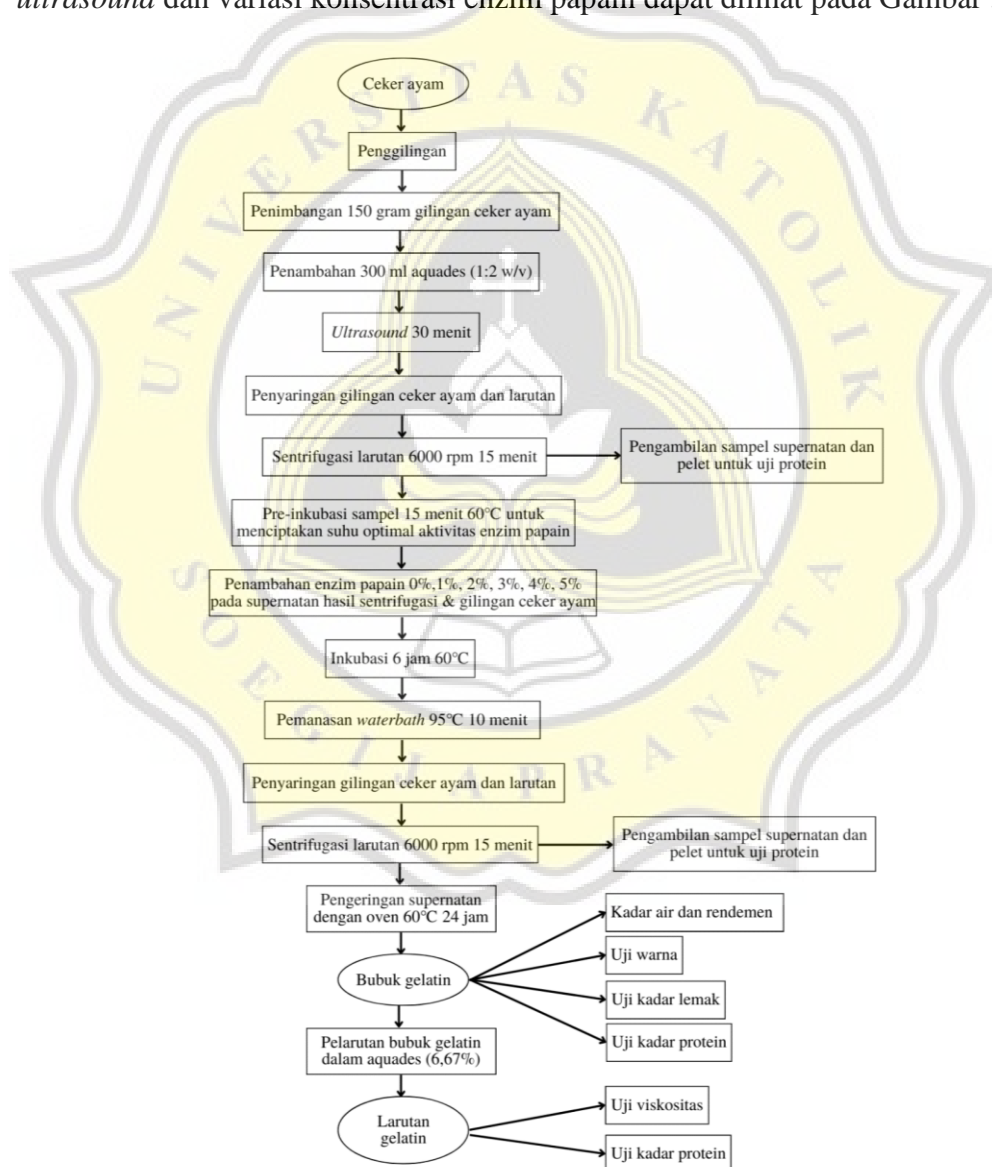
Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan waktu *ultrasound* yang terbaik. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan metode dan teknik pengujian yang sama dengan penelitian utama. Waktu *ultrasound* pada penelitian pendahuluan terdiri dari 3 tingkatan yaitu 10 menit, 20 menit, dan 30 menit. Parameter untuk menentukan waktu *ultrasound* yang terbaik dilihat dari kadar protein gelatin ceker ayam yang dihasilkan. Waktu *ultrasound* 30 menit menghasilkan kadar protein gelatin cakar ayam yang tertinggi sehingga waktu 30 menit ditentukan sebagai waktu *ultrasound* pada penelitian utama.

Penelitian utama dilakukan menggunakan ceker ayam yang dicampur dengan aquades. Campuran ceker ayam dan aquades diberi perlakuan *ultrasound* kemudian disentrifugasi dan diambil sampel supernatan dan peletnya. Campuran ceker ayam dan aquades diinkubasi dan diberi perlakuan enzim papain kemudian disentrifugasi dan diambil sampel supernatan dan peletnya. Campuran ceker ayam dan aquades dipanaskan pada *waterbath* lalu disaring dan diambil larutannya. Larutan disentrifugasi dan diambil sampel supernatan dan peletnya. Supernatan dikeringkan menggunakan oven hingga menjadi bubuk gelatin. Bubuk gelatin dilarutkan dalam aquades dengan konsentrasi 6,67% kemudian disentrifugasi dan diambil sampel supernatan dan peletnya. Tahap selanjutnya adalah analisis karakteristik fisik dan kimia gelatin ceker ayam. Sampel yang digunakan untuk pengujian antara lain supernatan, pelet, bubuk gelatin, dan larutan bubuk gelatin 6,67%. Bubuk gelatin diuji rendemen, kadar air, kadar lemak, dan warna (L, a, b). Sampel supernatan dan

pelet diuji rendemen dan kadar protein. Larutan gelatin 6,67% diuji kadar protein dan viskositas. Data dalam penelitian ini adalah data parametrik yang diuji statistik menggunakan uji normalitas, uji homogenitas variansi, uji *One Way ANOVA*, uji Post-Hoc Duncan dan Tukey.

3.4. Alur Penelitian

Alur penelitian hidrolisis kolagen ceker ayam dengan kombinasi perlakuan *ultrasound* dan variasi konsentrasi enzim papain dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram Alir Hidrolisis Kolagen Ceker Ayam

3.5. Metode

3.5.1. Preparasi Sampel

Ceker ayam pada penjual dipilih dalam kondisi yang baik seperti segar, warna yang seragam, dan tidak ada kecacatan. Ceker ayam dibeli sebanyak satu kilogram kemudian digiling di tempat penggilingan. Gilingan ceker ayam ditimbang sebanyak 150 gram untuk setiap unit penelitian. Penentuan massa gilingan ceker ayam sebesar 150 gram didapatkan dari uji pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya

3.5.2. Ekstraksi Menggunakan *Ultrasound*

Gilingan ceker ayam dicampur aquades dalam *beaker glass* dengan perbandingan 1:2 atau sebanyak 150 gram gilingan ceker ayam dan 300 ml aquades. *Beaker glass* tersebut kemudian diletakkan di atas bak *ultrasonic cleaner* UC-10SD lalu bak diisi dengan air hingga sejajar dengan aquades di dalam *beaker glass*. Mesin *ultrasonic cleaner* UC-10SD dioperasikan pada suhu 30°C, frekuensi 45 kHz, ultrasonic power 90% selama 30 menit. Jika suhu sudah melampaui 30°C maka dilakukan sirkulasi air dengan cara air di dalam bak dibuang melalui keran dan diganti dengan air yang baru. Setelah proses ultrasonik selesai, campuran ceker ayam dan aquades disaring kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 6000 rpm. Supernatan dan pelet hasil sentrifugasi diambil sampelnya untuk uji kadar protein. Supernatan yang selain sampel dicampurkan kembali dengan gilingan ceker ayam dalam *beaker glass*.

3.5.3. Hidrolisis Secara Enzimatis

Proses hidrolisis enzimatis dilakukan mengacu pada penelitian (Jain & Anal, 2016) dengan modifikasi. *Beaker glass* berisi supernatan dan gilingan ceker ayam ditutup dengan *plastic wrap* kemudian dilakukan pre-inkubasi pada suhu 60°C selama 15 menit. Sampel diberi enzim papain dengan 6 tingkatan konsentrasi yaitu 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% w/w lalu diaduk hingga merata. Penentuan konsentrasi enzim papain tersebut mengacu pada penelitian Rahmawati dan Nurjanah (2020). Sampel kemudian diinkubasi dalam oven selama 6 jam pada suhu 60°C. Sampel dipanaskan

dengan *waterbath* pada suhu 95°C selama 10 menit untuk inaktivasi enzim. Sampel disaring untuk memisahkan larutan dengan gilingan ceker ayam. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan dan pelet hasil sentrifugasi diambil sampelnya untuk diuji kadar protein.

3.5.4. Pengeringan Gelatin

Pengeringan gelatin dilakukan dengan cara upernatan setelah hidrolisis enzimatis dituang ke atas loyang yang sudah dilapisi *aluminium foil* lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Proses pengeringan menghasilkan bubuk gelatin. Bubuk gelatin yang menempel pada *aluminium foil* dilakukan pengelupasan untuk dianalisis rendemen, kadar air, warna (L, a, b), dan kadar lemak.

3.5.5. Pembuatan Larutan Bubuk Gelatin

Bubuk gelatin dilarutkan dalam aquades dengan konsentrasi 6,67% (3,335 gram bubuk gelatin dilarutkan dalam 50 ml aquades). Larutan gelatin diuji viskositas menggunakan *viscometer*. Larutan gelatin disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit hingga supernatan terpisah dari pelet. Supernatan dan pelet dilakukan pengujian kadar protein.

3.5.6. Analisis Karakteristik Fisik dan Kimia Gelatin

a. Rendemen

Rendemen dihitung dengan cara menimbang massa bubuk gelatin yang dihasilkan kemudian dibandingkan dengan massa awal ceker ayam yang digunakan. Rendemen bubuk gelatin dalam gram dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Rendemen (g)} = (\text{massa loyang} + \text{aluminium foil}) - (\text{massa loyang} + \text{aluminium foil} + \text{bubuk gelatin})$$

Rendemen bubuk gelatin dalam persen dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Rendemen (g)}}{\text{Massa ceker ayam yang digunakan}} \times 100$$

b. Kadar Air

Uji kadar air pada penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali yaitu kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim serta kadar air bubuk gelatin. Kadar air supernatan diukur dengan cara supernatan dituang ke atas loyang kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam hingga kering dan massanya konstan. Kadar air bubuk gelatin diukur dengan cara sebanyak 1 gram sampel diletakkan di atas cawan porselen kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kadar air bubuk dan supernatan dalam persen dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{y-x}{y} \times 100$$

$y = (\text{massa loyang} + \text{aluminium foil} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{massa loyang} + \text{aluminium foil})$

$x = (\text{massa loyang} + \text{aluminium foil} + \text{sampel sesudah dikeringkan}) - (\text{massa loyang} + \text{aluminium foil})$

c. Warna Gelatin

Bubuk gelatin diletakkan dalam plastik bening kemudian diuji warna dengan chromameter sebanyak 3 kali di titik yang berbeda. Hasil uji warna yaitu nilai L, a, b sebanyak 3 kali tersebut dihitung rata-ratanya dan dicatat.

d. Viskositas

Aquades dipanaskan menggunakan *waterbath* kemudian diukur volumenya hingga 50 mL. Bubuk gelatin dicampur aquades 50 mL dengan konsentrasi 6,67% (w/v). Viskositas gelatin diukur menggunakan viscometer.

e. Penentuan Kadar Protein

e.1. Ekstraksi Protein

Ekstraksi protein dilakukan dengan metode ekstraksi garam/basa menurut prosedur (Mæhre et al., 2018) dengan modifikasi. Larutan NaOH 0,1 M dibuat dari 0,4 gram soda api yang ditambahkan dengan 100 mL aquades. Larutan NaCl 3,5% dibuat dari 3,5 gram NaCl yang ditambahkan 100 mL aquades. Sebanyak 30 mL larutan NaOH 0,1 M dicampurkan dengan 70 mL larutan NaCl 3,5% dalam gelas ukur dan

diaduk hingga rata. Sebanyak 0,5 gram pellet dan 5 gram supernatan hasil sentrifugasi masing-masing ditambahkan dengan 30 mL campuran larutan NaOH 0,1 M dan NaCl 3,5%. Campuran sampel dan larutan di-*ultrasound* selama 5 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring.

e.2. Pembuatan Reagen

Pada pengujian kadar protein digunakan 1 larutan standar dan 4 reagen yang masing-masing komposisinya mengacu pada penelitian (Muyassaroh *et al.*, 2020) dengan modifikasi. Larutan standar yang digunakan adalah larutan Bovine Serum Albumin (BSA). BSA ditimbang sebanyak 0,025 gram kemudian dimasukkan ke labu takar 25 mL. BSA dicampur dengan aquades hingga volumenya menjadi 25 mL. Stok BSA tersebut dihitung konsentrasinya dalam ppm. Stok BSA diencerkan menjadi beberapa konsentrasi antara lain 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm. Absorbansi dari berbagai konsentrasi BSA tersebut diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 650 nm. Selanjutnya, reagen A dibuat dengan cara 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH. Reagen B dibuat dari campuran 3 mL larutan Na/K tartarat 1% dengan 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%. Reagen C dibuat dari 2 mL reagen B ditambahkan dengan 100 mL reagen A. Reagen D dibuat dari folin ciocelleau yang dilarutkan menggunakan aquades dengan perbandingan 1:1.

e.3. Penentuan Konsentrasi Protein

Metode penentuan konsentrasi protein dilakukan berdasarkan penelitian (Muyassaroh *et al.*, 2020) dengan modifikasi. Sebanyak 1 mL filtrat hasil ekstraksi protein diencerkan menjadi 10 mL lalu diambil sebanyak 1 mL lagi dan ditambahkan dengan 3 mL aquades. Larutan tersebut diberi reagen C sebanyak 5 mL dan dihomogenkan dengan vortex lalu didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Larutan ditambahkan dengan reagen D sebanyak 0,5 mL lalu dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Larutan dihomogenkan lagi dengan vortex lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 650 nm.

f. Analisa Statistik

Penelitian hidrolisis kolagen ceker ayam dengan perlakuan variabel kontrol *ultrasound* dan variabel bebas konsentrasi enzim papain menghasilkan data-data parametrik. Seluruh data yang diperoleh diuji sebaran, keseragaman varian dan koefisien variasinya. Sebaran data diuji normalitasnya menggunakan metode Kolomogorov-Smirnov pada $p \leq 0,05$. Keseragaman data diuji dengan uji homogenitas varians menggunakan teknik Levene Test pada $p \leq 0,05$. Uji keragaman antar tingkat variabel dilakukan dengan analisis sidik ragam (*One-way ANOVA*) pada $p \leq 0,05$. Perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan teknik DMRT pada $p \leq 0,05$ jika CV 10-20% dan jika CV >20% tanpa data ekstrem, pengujian dilakukan menggunakan teknik Tuckey pada $p \leq 0,05$. Parameter yang diuji perbedaannya menggunakan teknik DMRT adalah massa supernatan setelah perlakuan *ultrasound*, kadar air supernatan setelah perlakuan *ultrasound*, protein supernatan setelah perlakuan *ultrasound*, massa pelet setelah perlakuan *ultrasound*, massa supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim, kadar air setelah perlakuan supernatan *ultrasound* dan enzim, massa pelet setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim, massa supernatan campuran bubuk gelatin dan air, warna (L, a, b). Parameter yang diuji beda menggunakan teknik Tuckey adalah protein pelet setelah perlakuan *ultrasound*, protein supernatan setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim, protein pelet setelah perlakuan *ultrasound* dan enzim, massa bubuk gelatin, kadar air bubuk gelatin, kadar lemak bubuk gelatin, kadar protin bubuk gelatin, protein supernatan campuran bubuk gelatin dan air, massa pelet campuran bubuk gelatin dan air, protein pelet campuran bubuk gelatin dan air, viskositas bubuk gelatin.