

3. METODE PENELITIAN

1.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat untuk pembuatan gelatin kulit ikan lele, kakap merah, dan cobia. Alat-alat yang digunakan yang digunakan dalam pembuatan gelatin kulit ikan diantaranya adalah beaker glass 1000 ml, beaker glass 500 ml, gelas ukur, pipet volume, bola hisap, waterbath, spatula, timbangan digital, pisau, nampan, oven, loyang, grinder, dan pH meter. Alat-alat yang digunakan dalam analisa kekuatan gel *magnetic stirrer*, TA-XT plus texture analyzer, incubator, oven dan beaker glass 100 ml. Alat-alat yang digunakan dalam analisa viskositas gelatin Brookfield Syncro-Lectric Viscometer dan beaker glass 100 ml. Alat-alat yang digunakan dalam analisa warna Lab chromameter Minolta CR 300. Alat yang digunakan dalam analisa FTIR adalah nama Spektrofotometer FTIR Shimadzu IR. Alat yang digunakan dalam analisa SDS-PAGE seperangkat alat Elektroforesis SDS-PAGE (Mini-PROTEAN Tetra Cell-BIO-RAD) vertical elektroforesis, vortex, mikropipet 5 μ , hotplate stirrer, blue tip, white tip, erlenmeyer 1000 mL, beaker glass 100 mL, gelas ukur 500 mL, spatula, eppendorf tube, waterbath, dan sentrifuge.

3.1.2 Bahan

Bahan baku yang digunakan adalah kulit ikan lele, kakap merah, dan cobia yang didapat di PT. Probolinggo, Jawa Timur. Bahan lain yang digunakan adalah aquades, asam asetat pro analysis 97% dan NaOH yang diperoleh dari toko Amani. Bahan yang digunakan dalam analisa kekuatan gel gelatin ekstrak gelatin

kulit ikan lele, kakap merah, cobia dan aquades. Bahan yang digunakan dalam analisa viskositas ekstrak gelatin kulit ikan lele, kakap merah, cobia, dan aquades. Bahan yang digunakan dalam analisa warna ekstrak gelatin kulit ikan lele, kakap merah, cobia, dan aquades. Bahan yang digunakan dalam analisa FTIR dan LC-MS ekstrak gelatin kulit ikan lele, kakap merah, cobia. Bahan yang digunakan dalam analisa SDS-PAGE Larutan buffer dan bahan persiapan gel yang digunakan selama proses adalah Tris-HCl 1 M pH 8 , Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 SDS (sodium deodesil sulfat) 10%, APS (ammonium persulfat) 10%, TEMED, Spektra Multi colour, RSB, Na Akrilamida, dan Bufer elektroda pH 6,8.

1.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sifat fisikokimia gelatin dari kulit ikan yang berbeda. Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan metode eksploratif-deskriptif. Metode eksploratif merupakan penelitian yang bertujuan untuk mengeksplorasi fenomena baru yang menjadi sasaran penelitian (Kunjojo, 2009). Penelitian eksploratif juga bersifat deskriptif Penelitian eksploratif tidak menggunakan hipotesis penelitian (Ritonga, 2005). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sifat fisikokimia gelatin dari kulit ikan.

3.2.2 Variabel Penelitian

Variabel adalah objek penelitian, atau apa yang menjadi titik perhatian suatu penelitian (Arikunto, 2006). Sesuatu dinamai variabel dikarenakan secara kuantitatif atau secara kualitatif ia dapat bervariasi. Apabila sesuatu tidak dapat bervariasi maka ia bukan variabel melainkan konstanta (Azwar, 2007). Ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas

adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas (Surakhmad, 1994). Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas yaitu jenis ikan air laut yang berbeda serta variabel terikat, viskositas, kekuatan gel, warna, SDS- PAGE, FTIR, LC-MS.

3.2.3 Rancangan Percobaan

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan tiga kali ulangan. Menurut Sastrosupadi (2000), rancangan ini biasa digunakan apabila percobaan mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium. Model Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

Tabel 3. Rancangan Penelitian (RAL)

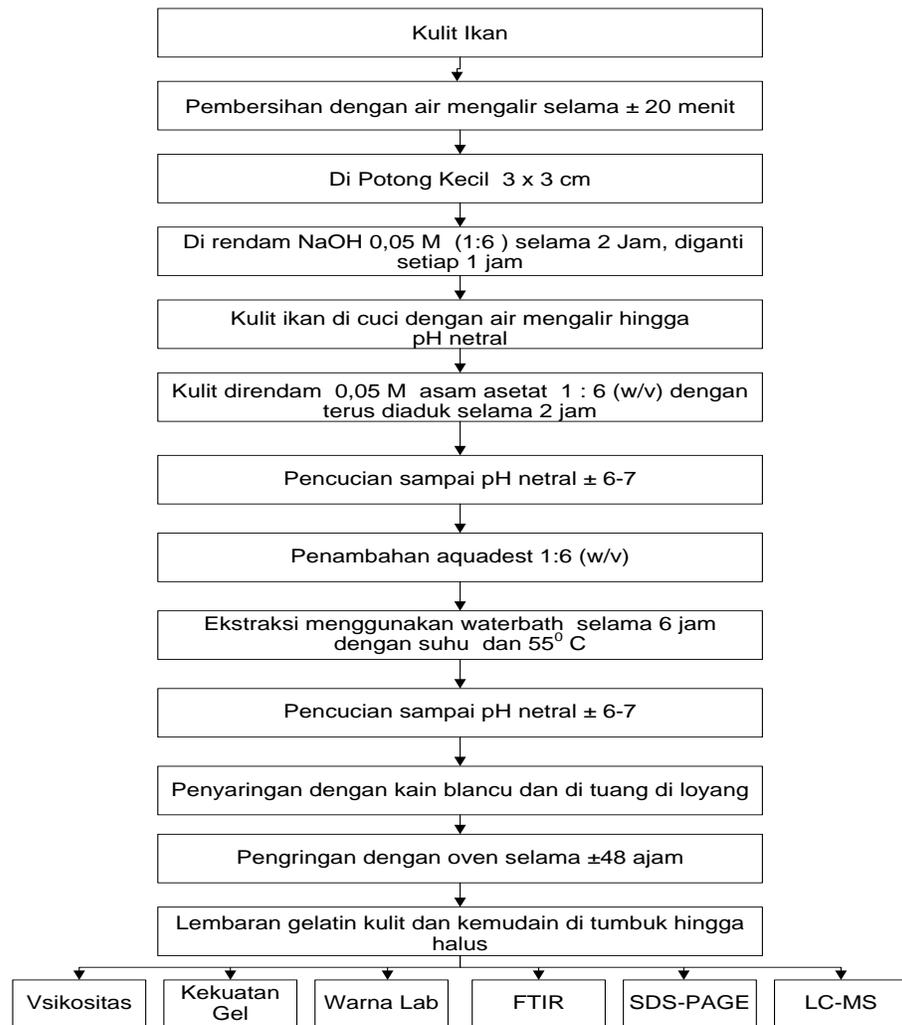
Jenis Ikan	ULANGAN			TOTAL	RATA RATA
	1	2	3		
Ikan Lencam	A1	A2	A3	AT	RA
Ikan Kakap Merah	B1	B2	B3	BT	RB
Ikan Cobia	C1	C2	C3	CT	RC

1.3 Prosedur Penelitian

Prosedur pembuatan gelatin dari kulit ikan meliputi proses kulit segar disimpan dalam freezer. Kulit ikan dibersihkan dengan air mengalir, kemudian di potong kecil 3 x 3 cm. Kulit direndam dalam 0,05 M NaOH dengan rasio kulit / larutan 1:6 (w / v) dan diaduk selama 2 jam pada suhu kamar (sekitar 26-28 °C). Kulit yang sudah basa kemudian dicuci dengan air keran sampai air cucian netral. Setelah itu, kulit dibilas dengan air. Selanjutnya, kulit direndam dalam 0,05 M asam asetat dengan rasio kulit / larutan 1:6 (w / v) selama 2 jam dengan pengadukan

lembut sampai kolagen membengkak dalam matriks kulit. Kulit yang diolah dengan asam kemudian dibilas. Setelah pembengkakan, kulit yang bengkak direndam dalam aquadest dengan suhu 55 °C dengan rasio kulit / air 1:6 (w / v) dalam waterbath shaker untuk mengekstrak gelatin dari bahan kulit. Campuran kemudian disaring menggunakan kain blacu. Filtrat yang dihasilkan dikeringkan menggunakan oven suhu 55 °C selama \pm 2 hari. Gelatin lembaran yang telah kering, kemudian dihaluskan dengan menggunakan grinder untuk mendapatkan gelatin fase bubuk.

Setelah lembaran gelatin didapatkan kemudian dihaluskan dan diperoleh tepung gelatin, kemudian dilakukan analisis diantaranya, yaitu analisis viskositas, kekuatan gel, warna, SDS- PAGE, FTIR, LC-MS. Diagram alir penelitian tahap pertama dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram Pembuatan Gelatin (modifikasi dari Sae dan Sottawat, 2015)

1.4 Analisis Fisika Kimia gelatin

Sifat fungsional gelatin sangat penting dalam aplikasi terhadap suatu produk. Sifat tersebut merupakan sifat fisika dan kimia yang mempengaruhi perilaku gelatin dalam makanan selama proses, penyimpanan, penyiapan, dan pengkonsumsian (Kinsella, 1982). Sifat fisika gelatin antara lain kekuatan gel, viskositas dan kecerahan warna sedangkan sifat kimia gelatin SDS – PAGE, FTIR dan LC-MS.

3.4.1 Kekuatan Gel (British Standard 757, 1975)

Larutan gelatin dengan konsentrasi 6,67% disiapkan dengan akuades (7,5 gram gelatin ditambah akuades 105 ml). Kemudian larutan diambil sebanyak 10ml dan dipindahkan dalam gelas piala 25 ml dan didinginkan pada suhu 10 °C dengan kisaran lama antara 15 hingga 19 jam. Selanjutnya hasilnya dianalisa menggunakan Voland Steven Texture Analyzer. Hasil dari pengukuran berupa grafik dan diamati tinggi kurva sebelum pecah serta berat beban yang tercatat pada alat saat contoh pecah. Kekuatan gel ditentukan dari grafik yang diperoleh. Rumus untuk menentukan kekuatannya adalah sebagai berikut, kekuatan gel diukur dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kekuatan gel (Bloom)} = 20 + 2,86 \times 10^3 \times G$$

$$G = \frac{F}{g}$$

Keterangan = F = Gaya (N)
g = Konstanta (0,07)
G = Kekuatan Gel (dyne/cm²)

3.4.2 Viskositas (British Standard 757, 1975)

Larutan gelatin dengan konsentrasi 6,67% disiapkan dengan aquades (7 gr gelatin ditambah 105 ml aquades) kemudian larutan diukur viskositasnya dengan menggunakan alat *Brookfield Syncro-Lectric Viscometer*. Pengukuran dilakukan pada suhu 60 °C dengan laju geser 60 rpm menggunakan spindel. Hasil pengukuran dikalikan dengan faktor konversi. Pengujian ini menggunakan spindel no.1 dengan faktor konversinya adalah 1, nilai viskositas dinyatakan dalam satuan centipoise (cP).

3.4.3 Warna (Soekarto, 1990))

Larutan gelatin dengan konsentrasi 6,67% disiapkan dengan aquades (7 gr gelatin ditambah 105 ml aquades). Kemudian sampel diletakkan di dalam gelas/wadah tembus pandang. Hidupkan *colour reader*, kemudian tentukan target pembaca L, a, b color space. Ukuran warna L untuk parameter tingkat kecerahan, sedangkan a dan b untuk kordinat kromatisitas.

Keterangan :

L = nilai yang menunjukkan tingkat kecerahan

a = nilai yang menunjukkan warna merah bila bertanda (+) dan warna hijau bila bertanda (-)

b = nilai yang menunjukkan warna kuning bila bertanda (+) dan warna biru bila bertanda (-).

3.4.4 Analisis FTIR (Siregar, et al. 2009)

Pengujian gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan uji *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Uji FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Univeristias Islam Negeri Malang. Uji FTIR berdasarkan Siregar, et al. (2015) ekstrak gelatin diambil sebanyak 2 ul lalu dicampur dengan 200 mg KBr kemudian diujikan di alat FTIR.

3.4.5 Analisa Berat Molekul

3.4.5.1 Separating Gel 12%

Bahan-bahan running gel 12 % dicampur sampai homogen (acrylamide 2,5 ml, Tris HCl (pH 8,8) 1,2 ml, SDS 10% 1,2 ml, aquadest 1,1 ml TEMED 5 µl, APS 10% 30 µl) kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam gelas plate melalui dindingnya agar tidak terbentuk gelembung, sampai kira-kira satu cm dari atas. Buthanol ditambahkan di atasnya sampai penuh (lebih kurang 1 ml) dan dibiarkan 15 selama 30 menit pada suhu kamar agar gel membeku.

3.4.5.2 Stacking Gel 5%

Cara pembuatan stacking gel sama seperti mencetak separating gel. Bahan-bahan stacking gel 5% dicampur hingga homogen (acrylamide 0,66 ml, Tris HCl (pH 6,8) 0,8 ml, SDS 10% 0,8 ml, aquadest 0,8 ml, TEMED 4 μ l, APS 10% 20 μ l) kemudian campuran tersebut dimasukkan di atas running gel yang telah mengeras hingga penuh.

3.4.5.3 Persiapan Gel

Dua plat kaca dirangkai dengan jarak \pm 1mm. Pembuatan gel sebanyak dua lapis digunakan untuk mengumpulkan sampel (*stacking gel*) dan gel untuk memisahkan protein (*separating gel*). Campuran larutan separating gel dimasukkan ke dalam plate dengan menggunakan mikropipet. Gel dibiarkan selama 10 – 30 menit hingga memadat. Kemudian stacking gel dituangkan diatas separating gel sambil dipasang sisir sampai terbentuk gel dan sumurnya. Setelah didiamkan 30 menit dan terbentuklah gel, sisir diangkat dan plate dipasang pada alat elektroforesis. Larutan buffer (1 mL Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; 1,6 mL SDS 10%; 0,8 mL gliserol; 0,4 mL bromfenol biru 1%; dan 3,8 mL air yang) di tuang ke dalam bejana elektroforesis. Elektroforesis dimulai dengan memasang gelas plate dan dirangkai dengan frame dari bio-Rad. Sampel dan marker yang telah dibuat dimasukkan ke dalam lubang comb. Marker yang digunakan adalah thermo Broad Range Protein Ladder dengan berat molekul 5 – 250 kDa. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 125 V dan kuat arus 40 mA. Proses ini dihentikan setelah warna biru turun (Laemmli turun) kurang lebih tiga sampai empat jam.

3.4.5.4 Pewarnaan Gel

Pewarna gel dilakukan dengan cara merendam gel ke dalam larutan staining selama 30-60 menit dan di shaker. Pewarna bisa menggunakan comassie brilliant blue R-250. Warna dihilangkan menggunakan larutan destaining (Metahanol 100 ml, asam asetat glasial 100 ml dan Aquades 800 ml) sambil digoyang- goyang dengan penggoyang otomatis sampai gel jernih. Lalu hasil elektroforesi di scan atau di foto lalu di dokumentasikan.

3.4.5.5 Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul dengan menggunakan aplikasi image lab 5.2.1. Gambar hasil analisa dibuka dalam aplikasi tersebut, kemudian klik lanes untuk menambahkan lane pada gambar tersebut. Klik bands untuk menentukan band pita, kemudian klik MW Analisis tools untuk menambahkan standart Thermo broads range. Kemudian klik Analysis table untuk menentukan table berat molekul.

3.4.6 Uji LC-MS

Identifikasi berat molekul menggunakan *Liquid Chromathography-Mass Spectroscopy* (LC-MS). Uji *Liquid Chromathography-Mass Spectroscopy* (LC-MS) berdasarkan Maharani, *et al.* (2016) sebanyak 1 mg senyawa ditimbang dan dilarutkan dalam metanol. Diambil 10 μ L sampel dan disuntikkan pada LCMS/MS melalui kolom C-18 (2 x 150 mm) dengan kecepatan alir 0.3 mL/menit.