

BAB III

METODE PENELITIAN

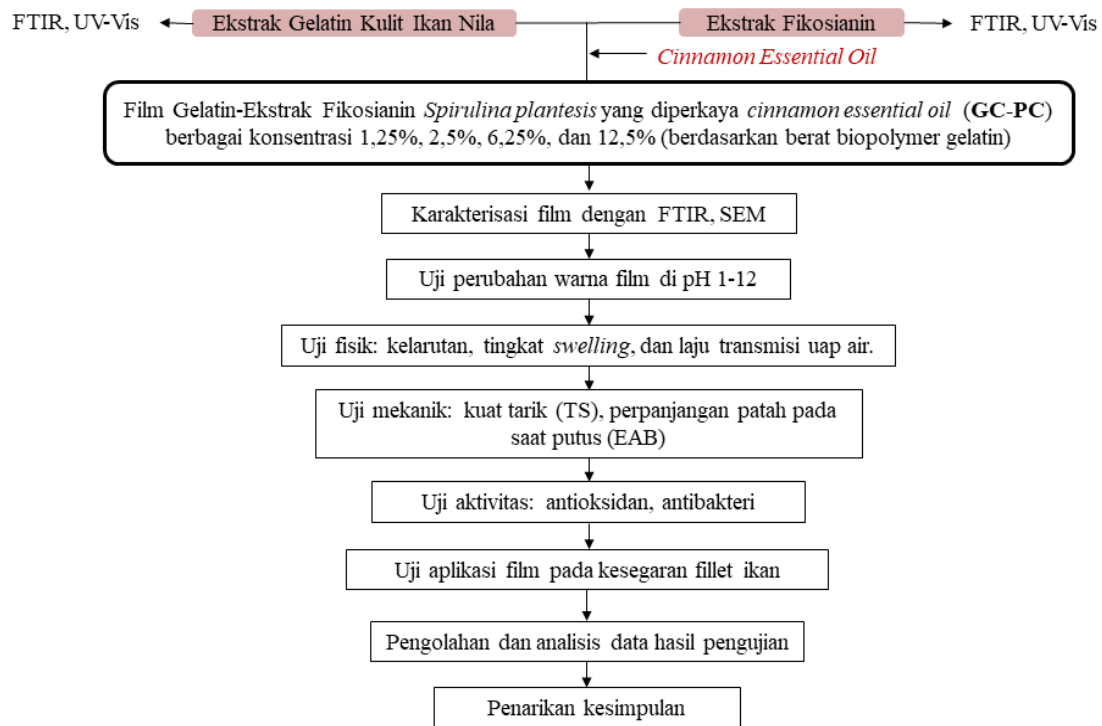
3.1 Alat dan Bahan

Pada ekstraksi gelatin digunakan peralatan seperti baki, pisau, kain blacu, gelas kimia 1 L, corong, saringan, batang pengaduk, gelas ukur, dan labu ukur. Pada ekstraksi dan pemurnian fikosianin digunakan peralatan seperti *magnetic stirrer*, batang magnet, labu Erlenmeyer 250 mL, centrifuge (Corona GL-08), falcon tube 15 mL, neraca analitik, membran selulosa, spatula, dan gelas kimia 100 mL. Pada tahap pembuatan film digunakan cawan petri, pipet tetes, gelas kimia, gelas ukur, hotplate, magnetic stirrer, batang pengaduk dan kipas angin. Instrumen yang digunakan selama penelitian ini diantaranya spektrofotometer UV-Vis, FTIR Shimadzu UV-Mini 1240, dan SEM tipe SU3500.

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini dijabarkan pada tiap tahapan yang dilakukan. Ekstraksi dan pemurnian fikosianin menggunakan biomassa *Spirulina platensis*, buffer fosfat, ammonium sulfat, akuades. Tahap ekstraksi gelatin menggunakan NaOH 0,3 M, asam sitrat 0,03 M dan aquades. Tahap pembuatan film menggunakan ekstrak gelatin, gliserol, dan *cinnamon essential oil*. Sampel daging fillet ikan nila digunakan dalam pemantauan kesegaran oleh film gelatin kulit ikan.

3.2 Tahapan Penelitian

Terdapat beberapa tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini Gambar 3.1 menampilkan tahapan dari penelitian ini.



Gambar 3.1 Tahapan penelitian

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Ekstraksi Gelatin dari Kulit Ikan Nila

Gelatin dari kulit ikan nila diekstraksi berdasarkan metode yang digunakan Niu *et al.* (2013) dengan beberapa modifikasi. Kulit ikan nila dibersihkan dari sisa potongan daging ikan dan sisik yang masih melekat pada kulitnya dan dipotong menjadi potongan kecil (sekitar $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$) sebelum dilakukan ekstraksi gelatin. Sampel kulit ikan direndam dalam larutan NaOH 0,3 M (1:6 b/v) selama 1 jam. Selanjutnya, kulit ditiriskan selama 5 menit dan dicuci menggunakan air mengalir sampai pH netral. Setelah itu, kulit ikan direndam dalam asam sitrat 0,03 M (1:6 b/v) selama 1 jam. Sampel kulit hasil rendaman asam sitrat dicuci sampai pH netral. Setelah perlakuan asam, kulit direndam dalam aquades (1:4 b/v) pada suhu 50°C dalam bak air selama 3 jam, kemudian difiltrasi untuk memisahkan dengan sisa residu dan mendapatkan supernatan larutan yang mengandung gelatin. Larutan yang tersisa dikeringkan

menggunakan oven pada suhu 50°C hingga diperoleh berat konstan. Hasil pengeringan sampel dilakukan grinding untuk penghalusan dan diperoleh ekstrak gelatin kulit ikan nila. Ekstrak yang dihasilkan dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan analisis FTIR dan UV-Vis. Ekstrak gelatin dilarutkan dalam aquades untuk membuat konsentrasi sebesar 500 ppm. Penentuan puncak dari ekstrak gelatin diamati menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis pada 190-350 nm.

3.3.2 Ekstraksi dan Pemurnian Fikosianin

Dalam proses ekstraksi fikosianin dari biomassa *Spirulina plantesis*, digunakan larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7 sebagai pelarut dengan perbandingan 1:20 (w/v), merujuk pada pendekatan metode yang dikembangkan oleh García (2021). Pada tahap ekstraksi, 5 gram biomassa *Spirulina platensis* ditimbang dan ditempatkan ke dalam labu Erlenmeyer. Kemudian, 100 mL larutan buffer fosfat ditambahkan ke dalam labu Erlenmeyer tersebut. Selanjutnya, campuran diaduk menggunakan magnetic stirrer pada suhu 4°C selama sekitar 20 menit. Larutan ini kemudian diinkubasi lebih lanjut dalam lemari es pada suhu -4°C selama sekitar 20 menit. Setelah proses inkubasi, larutan tersebut dijalankan melalui proses sentrifugasi selama 20 menit pada suhu ruang dengan kecepatan rotasi antara 3000-4000 rpm. Hasil sentrifugasi menghasilkan supernatan, yang merupakan ekstrak kasar fikosianin, dan ekstrak ini disimpan dalam wadah yang tidak tembus cahaya pada suhu dingin (-4°C).

Pemurnian fikosianin dilakukan dengan metode salting out menggunakan garam amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) (Munawaroh et al., 2020). Proses pemurnian melibatkan dua tahap yaitu pada penjenjahan 25% dan penjenjahan 50%. Pada tahap penjenjahan 25%, diperoleh residu berwarna hijau dan supernatan berwarna biru. Selanjutnya, supernatan dari tahap ini diendapkan kembali pada penjenjahan 50%, menghasilkan residu berwarna biru dan supernatan yang tak berwarna. Residu kejenuhan 50% kemudian dilarutkan kembali dalam larutan buffer fosfat dan selanjutnya didialisis menggunakan membran selulosa untuk menghilangkan amonium

sulfat yang masih tersisa. Pemurnian 4 (dialisis) fikosianin dilakukan selama 6 hari dengan penggantian larutan buffer fosfat setiap harinya. Setelah proses dialisis selesai, fikosianin dikeringkan menggunakan metode freeze dry. Konsentrasi fikosianin ditentukan melalui spektroskopi menggunakan persamaan (1). Untuk menghitung konsentrasi C-PC, absorbansi ekstrak kasar diukur menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 620 nm dan 652 nm. Pengukuran ini dilakukan sesuai dengan persamaan berikut.

$$PC = \frac{OD_{620} - 0,474 \cdot OD_{652}}{5,34} \quad (1)$$

di mana fikosianin (konsentrasi PC) diukur dalam $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, dengan kerapatan optik sampel pada dua panjang gelombang cahaya, yaitu 620 nm (OD_{620}) dan 652 nm (OD_{652}) diukur.

Kemurnian fraksi fikosianin dievaluasi melalui spektrofotometri dengan menghitung rasio absorbansi pada 620 nm dibagi 280 nm, seperti yang dijabarkan dalam Persamaan (2),

$$EP = \frac{OD_{620}}{OD_{280}} \quad (2)$$

dimana EP merupakan kemurnian ekstrak, OD_{620} kerapatan optik sampel pada 620 nm, dan OD_{280} merupakan kerapatan optik pada 280 nm.

3.3.2.1 Uji Perubahan Warna Fikosianin pada pH 1-12

Pengujian ini melibatkan pengukuran spektrum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dari larutan fikosianin pada berbagai tingkat keasaman (pH) antara 1 hingga 12. Pengukuran absorbansi dalam kisaran sinar tampak yaitu 400-800 nm, dilakukan dengan menambahkan 1 ml larutan fikosianin pada 5 ml larutan buffer pada botol vial sesuai dengan pH yang diinginkan (Shi et al., 2022).

3.3.3 Pembentukan Film *Smart Packaging*

Pembentukan film dilakukan dengan beberapa modifikasi metode oleh Kilinc et al. (2021) dengan melarutkan gelatin (G) (4%, b/v) dipanaskan pada 45°C dan diaduk selama 30 menit hingga homogen. Setelah itu, larutan G ditambahkan 20% (b/b, berat zat terlarut) gliserol ditambahkan ke campuran sebagai agen plasticizer. Campuran ini diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 15 menit pada suhu 50°C. Tween 80 kemudian ditambahkan sebagai emulsifier sebanyak 25% (w/w, berdasarkan CEO) untuk mendukung pelarutan CEO dalam campuran. Setelah itu, CEO secara bertahap ditambahkan pada konsentrasi 2% (b/v). Campuran ini didegas dalam bak ultrasound selama 30 menit untuk menghilangkan gelembung udara yang terlarut sepenuhnya. Selanjutnya larutan diatur pada suhu 27-28°C dan disesuaikan pH-nya menjadi 5 untuk mendapatkan larutan campuran GC. Setelah larutan cukup dingin, fikosianin ditambahkan ke dalam larutan GC pada konsentrasi 0,5; 1; 2,5; dan 5 mg mL⁻¹, yang sesuai dengan proporsi masing-masing 1,25%, 2,5%, 6,25%, dan 12,5% (berdasarkan berat gelatin), dan diaduk pada suhu ruangan (25°C ± 2°C) selama 60 menit untuk memastikan dispersi yang homogen. Film yang mengandung fikosianin dinamakan GC-PC. Setelah diaduk, larutan film ±10 ml dituangkan ke dalam cawan Petri plastik dengan diameter 9 cm, dan dikeringkan di suhu ruang selama 72 jam. Film yang telah kering kemudian dilepaskan secara manual dari permukaan cetakan dan disimpan pada suhu ruang 25°C hingga proses analisis. Film GC tanpa penambahan fikosianin dianggap sebagai kontrol.

3.3.4 Karakterisasi Struktur dan Morfologi Film

3.3.4.1 Penentuan Struktur Film menggunakan Analisis FTIR

Gugus fungsi pada film dianalisis menggunakan FTIR dengan membandingkan hasil film kontrol dan film mengandung fikosianin. Potongan film yang telah kering dicampurkan dengan KBr murni dan ditempatkan di atas permukaan disk pencetak pada suhu ruang. Kemudian, sampel tersebut dianalisis menggunakan instrumen FTIR dalam rentang panjang gelombang 4000 cm⁻¹ hingga 400 cm⁻¹ dengan resolusi

spektrum 4 cm^{-1} . Analisis FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Universitas Pendidikan Indonesia.

3.3.4.2 Penentuan Morfologi Film menggunakan Analisis SEM

Morfologi permukaan film ini diuji melalui penggunaan SEM (Scanning Electron Microscopy) tipe SU3500. Sampel di-coating dengan lapisan emas sebelum dimasukkan ke holder sampel SEM. Analisis SEM dilakukan di ITB Nanoscience and Nanotechnology Research Center (PPNN).

3.3.5 Karakterisasi Sifat Fisik Film *Smart Packaging*

3.3.5.1 Penentuan Kelarutan Film

Kelarutan film ditentukan dengan meletakkan potongan film $2 \times 2 \text{ cm}$ yang sudah kering (dikeringkan pada suhu 105°C) sebagai berat kering awal (m_1) dalam labu dengan 20 mL aquades dan didiamkan pada suhu 25°C selama 24 jam. Setelah itu, potongan film yang tersisa diangkat dan dikeringkan pada suhu 105°C selama 24 jam untuk menentukan berat kering akhir (m_2). Berat film yang larut dalam aquades dihitung dengan mengurangi berat kering yang tidak larut dari berat kering awal dan dinyatakan sebagai persentase dari berat kering awal film. Kelarutan film dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Kelarutan film (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

di mana m_1 : berat awal film (g), m_2 : berat kering film setelah dilarutkan dalam aquades (g). Semua pengukuran dilakukan dalam tiga ulangan.

3.3.5.2 Laju Transmisi Uap Air (WVT)

Untuk mengukur tingkat permeabilitas uap air (WVT) pada film, digunakan botol vial dengan diameter mulut sekitar 1,5 cm yang diisi dengan 10 mL air deionisasi. Kemudian, mulut botol ditutup dengan film dan disegel udara dengan selotip. Setelah

itu, botol tersebut ditempatkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 40°C. Setelah 24 jam, botol diambil dari oven dan ditimbang kembali. WVT dihitung sebagai berikut dalam (g/m²h).

$$WVT = \frac{W_i - W_t}{A \times t}$$

di mana W_i adalah berat awal (g), W_t adalah berat akhir (g), A adalah luas area mulut botol (m²), dan t adalah waktu jam (h).

3.3.6 Karakterisasi Sifat Mekanik Film *Smart Packaging*

3.3.6.1 Uji Kekuatan Tarik/*Tensile strength* (TS)

Uji kekuatan tarik film dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknik Mesin dan Dirgantara (FTMD) ITB Bandung. Film diubah menjadi potongan berbentuk persegi panjang (7 x 2 cm) dan diukur menggunakan Universal Testing Machine (UTM) instron 5985 dengan *speed rate* 10 mm/min dan beban 100 N. Selama perpanjangan film hingga putus, gaya dan jarak direkam (Tongnuanchan et al., 2012). Penggunaan TS bertujuan untuk mengevaluasi sifat mekanik dari keenam film.

3.3.6.2 Uji Perpanjangan film pada saat patah/*Elongation at break* (EAB)

Pengujian perpanjangan putus film dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknik Mesin dan Dirgantara (FTMD) ITB Bandung. Film berbentuk persegi panjang (7 x 2 cm) dan diukur menggunakan Universal Testing Machine (UTM) instron 5985 pada *speed rate* 10 mm/min dan beban 100 N. Selama perpanjangan film hingga putus, gaya dan jarak direkam (Tongnuanchan et al., 2012). Perhitungan EAB film dilakukan sebagai berikut:

$$EAB (\%) = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100$$

di mana ΔL dan L_0 masing-masing adalah perpanjangan dan panjang awal (mm) dari film.

3.3.7 Pengaplikasian Film *Smart Packaging*

3.3.7.1 Uji Perubahan Warna Film

Untuk menguji perubahan warna film, sebanyak 1 mL larutan buffer pH 1-12 diteteskan ke permukaan sampel film yang berukuran 1 cm \times 1 cm dan kemudian dihilangkan setelah 5 menit. Selanjutnya, warna film indikator didokumentasikan dengan menggunakan kamera *smartphone*, merujuk pada metode yang dilakukan oleh Ezati dkk (2020) dengan sedikit modifikasi. Selain itu, warna permukaan sampel film diukur dengan menggunakan ImageJ untuk mendapatkan nilai RGB dan dikonversi menjadi L^* , a^* , b^* , yang ditempatkan pada alas warna putih yang digunakan sebagai latar belakang standar untuk pengukuran warna. Selisih warna total (ΔE) dihitung menggunakan persamaan berikut.

$$\Delta E = \sqrt{(L - L^*)^2 + (a - a^*)^2 + (b - b^*)^2}$$

3.3.7.2 Uji Film pada Fillet Ikan Nila

Film indikator pada fillet ikan nila dilakukan untuk memantau proses pembusukkan daging ikan selama masa penyimpanan. Film dipotong menjadi ukuran 1,5 \times 1,5 cm² dan ditempelkan pada plastik wrap. Suhu penyimpanan untuk setiap film pada fillet ikan dilakukan pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dan $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Dalam proses penyimpanan, film dengan berbagai konsentrasi dianalisis selama 24 jam pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dan pada suhu $4 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 7 hari (Amaregouda et al., 2022). Pengambilan gambar dilakukan menggunakan kamera *smartphone* setiap 24 jam sekali pada suhu chiller ($\pm 4^\circ\text{C}$) dan setiap 3 jam sekali pada suhu ruang ($\pm 25^\circ\text{C}$). Hasil gambar kemudian dianalisis menggunakan software imageJ untuk mendapatkan nilai RGB dan dikonversi menjadi nilai L^* , a^* , b^* . Nilai perbedaan warna total (ΔE) dihitung untuk menentukan film indikator dengan konsentrasi fikosianin terbaik. Perubahan warna film fikosianin pada

perubahan pH fillet ikan yang terlihat jelas perbedaannya, dipilih sebagai film yang efektif.

3.3.7.3 Uji pH sampel Fillet Ikan Nila

Pengujian pH pada sampel ikan dilakukan dengan mengikuti metode yang dilakukan oleh (Nuronyah dkk, 2022) dengan sedikit modifikasi. Tujuan pengujian ini adalah untuk mengukur tingkat kebusukan fillet ikan nila selama penyimpanan bersamaan dengan film indikator. Sebanyak 1 gram sampel ikan diambil, dihaluskan, dan dilarutkan dalam 10 ml air destilasi hingga homogen. pH dari sampel daging diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan buffer asam pH 4, netral pH 7, dan basa pH 10. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali, dan nilai rata-ratanya diambil. Pengukuran dilakukan setiap 3 jam pada suhu ruangan (25°C) dan setiap 24 jam pada suhu chiller (4°C). Film yang menunjukkan korelasi positif yang paling tinggi antara warna antosianin film dengan perubahan pH ikan dipilih sebagai film yang paling efektif dan akan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

3.3.7.4 Uji sensitivitas film terhadap amonia

Responsivitas terhadap amonia dari film diuji sesuai dengan metode yang dikembangkan oleh Huang et al. (2019) dengan beberapa penyesuaian. Strip film berukuran 3 cm × 3 cm ditempatkan di atas mulut botol vial yang berisi larutan amonia 2 mmol/L sebanyak 10 mL dan dilakukan pada suhu ruang 25°C selama 30 menit, sementara perubahan warna film penunjuk warna dicatat setiap 5 menit. Parameter R, G, dan B dari indikator dicatat oleh program ImageJ, dan sensitivitas (S_{RGB}) film terhadap amonia dihitung sebagai berikut,

$$S (\%) = 100 \times (|R - R_0| + |G - G_0| + |B - B_0|) / (R + G + B)$$

di mana, R_0 , G_0 , dan B_0 adalah nilai yang dicatat pada 0 menit, dan R, G, dan B adalah nilai pada saat pengambilan sampel (Chen et al., 2020).

3.3.8 Uji Aktivitas pada Film

Ni Putu Yunika Arindita, 2024

PENGEMBANGAN FILM GELATIN DENGAN FIKOSIANIN *Spirulina plantesis* YANG DIPERKAYA MINYAK ESENSIAL KAYU MANIS SEBAGAI SMART PACKAGING

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3.8.1 Uji DPPH Aktivitas Antioksidan

Pengujian antioksidan dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Shi *et al.* (2022) dengan sedikit modifikasi. Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan film-film tersebut. Dalam proses ini, sampel film (berukuran 2 cm × 2 cm) direndam dalam tabung reaksi yang berisi 4 mL metanol dan diaduk selama 2 jam pada suhu 25°C. Setelah itu, larutan metanol DPPH sebanyak 150 µM (1 mL) dicampurkan dengan larutan sampel (3 mL) dan ditempatkan dalam keadaan gelap selama 60 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan campuran diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV–Vis. Aktivitas antioksidan film dihitung menggunakan rumus berikut,

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

dimana A_0 adalah absorbansi kontrol dan A_1 adalah absorbansi film uji.

3.3.8.2 Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri film dianalisis dengan menggunakan uji difusi cakram berdasarkan metode Ezati, *et al.* (2020) dengan sedikit modifikasi pada tiga jenis bakteri, yang terdiri dari dua bakteri Gram-negatif (seperti *Escherichia coli*-ATCC 8939 dan *Pseudomonas aeruginosa*-ATCC 9027) dan satu bakteri Gram-positif *Staphylococcus aureus*-ATCC 6538. Setiap strain bakteri diinkubasi dalam suspensi kultur semalam sebanyak 100 µL, dengan sekitar 10^6 unit pembentukan koloni (CFU mL⁻¹) yang diestimasi melalui pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 600 nm. Kemudian, cotton swab yang telah dicelupkan pada suspensi bakteri/suspensi inokulum tersebut digoreskan secara perlahan pada media agar *Luria-Bertani* (LB) untuk bakteri Gram-negatif dan *Brain Heart Infusion* (BHI) untuk bakteri Gram-positif secara hati-hati agar media tidak robek. Film dengan ukuran 6 mm ditempatkan di

permukaan agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Area yang bening di sekitar sampel dianggap sebagai indikasi positif untuk aktivitas antibakteri.

3.3.9 Uji Statistika

Uji statistika dilakukan menggunakan perangkat lunak *IBM Statistics 25* dengan metode ANOVA. Uji secara statistik digunakan pada analisis varians (ANOVA), dan perbandingan rata-rata dilakukan dengan uji kisaran ganda Duncan.