

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki sekitar 17.504 pulau dengan garis pantai lebih dari 81.000 km, yang menyimpan potensi keanekaragaman hayati sumber daya laut yang sangat besar (megabiodiversity). Sumber daya laut ini memiliki berbagai fungsi penting, di antaranya sebagai sumber makanan, bahan farmasi, dan kosmetik (Kustiariyah, 2007). Oleh karena itu, biota laut yang terdapat di perairan Indonesia memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan peranan penting bagi perekonomian negara. Salah satu biota laut yang memiliki potensi ekonomi besar adalah teripang (Holothuroidea) (Roni et al., 2020). Teripang merupakan komoditas perikanan bernilai ekonomis tinggi yang umumnya diperdagangkan dalam bentuk kering dan diolah menjadi produk seperti gonad kering (konoko), usus kering (konowata), atau kerupuk usus (Kustiariyah, 2007).

Masyarakat pada umumnya mengolah dan menjual teripang dalam bentuk kering. Salah satu spesies teripang yang sering diolah adalah *Holothuria atra*, yang dikenal dengan sebutan teripang hitam atau susuan hitam di kalangan penduduk lokal. Pengolahan secara tradisional mencakup proses pengasapan dan pengeringan dengan sinar matahari atau pengeringan langsung. Proses pengolahan ini berpengaruh terhadap profil asam amino dan asam lemak teripang. Perlakuan pemanasan dapat menurunkan kandungan protein dan asam amino di daging teripang. Kusnandar (2010) menyatakan bahwa pemanasan pada suhu 70 °C dapat mengurangi kadar lisin hingga 90%, sedangkan pemanasan pada suhu 160 °C menurunkan kadar lisin sebesar 50% (Ridhowati dan Asnani, 2015).

Teripang dapat ditemukan hampir di semua perairan pantai, mulai dari wilayah pasang surut yang dangkal hingga perairan dalam. Organisme ini umumnya hidup di ekosistem terumbu karang dengan kondisi air yang jernih, bebas polusi, dan relatif tenang. Habitat ideal bagi teripang meliputi air laut dengan salinitas 29–33 ‰, pH 6,5–8,5, kecerahan air laut 50–150 cm, kadar oksigen terlarut 4–8 ppm, dan suhu air antara 20–25 °C (Roni et al., 2020). Sumarto (2019) menjelaskan bahwa tubuh teripang hitam terdiri dari beberapa bagian, yaitu daging, kulit, jeroan, gonad, dan kotoran sisa makanan. Kulit teripang hitam diduga memiliki potensi sebagai sumber antioksidan (Dehwie et al., 2021).

Saat ini, identifikasi teripang banyak dilakukan dengan memanfaatkan dagingnya, sedangkan pemanfaatan jeroan seperti usus, gonad, dan organ lainnya masih sangat terbatas. Bagian jeroan tersebut sering dibuang begitu saja setelah proses pengolahan, yang mendorong perlunya penelitian untuk mengembangkan cara pemanfaatannya (Oktaviani et al., 2015). Chen et al. (2021) melaporkan bahwa *Holothuria atra* memiliki potensi antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 5,78 mg/mL. Rasyid et al. (2021) juga



antioksidan pada spesies ini dengan nilai IC₅₀ sebesar 8,73 mg/mL. Teripang hitam yang tinggi dipengaruhi oleh kandungan proteinnya yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku obat-obatan. Kandungan proteinnya berkisar antara 44–55% (Dewi, 2016), sedangkan dalam usus teripang hitam mencapai 82% (Martoyo et al., 2000). Penelitian Padang et al. (2016) menunjukkan bahwa kandungan protein teripang hitam hasil pemeliharaan dalam kurungan tancap (basah) dan 33,13–43,36% (kering). Kandungan protein yang tinggi

ini menjadikan teripang sumber protein hewani yang potensial dan memiliki manfaat terapeutik (Padang et al., 2016).

Protein dalam teripang mengandung asam amino lengkap, baik esensial maupun non-esensial, sehingga memberikan nilai gizi yang baik. Berbagai enzim protein yang terdapat dalam teripang antara lain alkalin protease, arginin kinase, bromelin, dan alcalase (Ridhowati dan Asnani, 2015). Siahan et al. (2017) menyatakan bahwa teripang memiliki kandungan kolagen yang tinggi, yaitu sekitar 70% dari total protein tubuh. Kolagen dalam bentuk hidrolisat merupakan hasil dari proses hidrolisis polipeptida kolagen menjadi molekul yang lebih sederhana melalui pemecahan dengan asam, alkali, atau enzim (Baehaki et al., 2015).

Kolagen sendiri diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti antioksidan, antiinflamasi, antidiabetes, dan antikanker, sehingga sering digunakan dalam produk farmasi seperti kosmetik, biomedis, dan suplemen (Rahman et al., 2016). Oleh karena itu, banyak penelitian yang tertarik untuk mengeksplorasi potensi kolagen sebagai bahan aktif antioksidan. Selain kolagen, teripang juga mengandung vitamin E serta berbagai mineral seperti kromium, besi, kadmium, mangan, nikel, kobalt, dan seng. Teripang juga memiliki asam lemak tidak jenuh seperti EPA (asam eikosapentaenoat) dan DHA (asam dekoheksaenoat) (Ridhowati dan Asnani, 2015). Kandungan asam lemak omega-3 pada teripang penting untuk kesehatan jantung (Karnila et al., 2011). Fredalina et al. (1998) menyatakan bahwa asam lemak dominan pada teripang adalah EPA (25,69%) dan oleat (21,98%) hasil ekstraksi menggunakan PBS, sedangkan ekstraksi dengan air menunjukkan kandungan DHA (57,55%) dan linoleat (12,59%). Teripang juga mengandung linoleat sebesar 0,119% dan arakhidonat 0,128%, serta 60 jenis sterol bebas (Dewi, 2016).

Beberapa senyawa yang terkandung dalam teripang telah terbukti memiliki sifat antioksidan yang mampu meredam radikal bebas serta mencegah berbagai penyakit degeneratif yang disebabkan oleh stres oksidatif. Penelitian oleh Althunibat et al. (2009) menunjukkan bahwa ekstrak air teripang memiliki kemampuan antioksidan lebih tinggi dibandingkan ekstrak metanol, kemungkinan karena kandungan fenolik yang lebih tinggi. Nuhayati (2009) melaporkan bahwa ekstrak air teripang hitam (*Holothuria atra*) memberikan kadar fenolik total 4,85 mg GAE/g, jauh lebih tinggi dari ekstrak organik yang hanya 1,53 mg GAE/g.

Teripang hitam telah lama digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat, meskipun senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya belum sepenuhnya diketahui. Metabolit sekunder berperan penting dalam melindungi organisme dari berbagai stres lingkungan. Oleh karena itu, penelitian terhadap teripang hitam (*H. atra*) dilakukan. Teripang hitam dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Yuliana et al., 2017). Identifikasi ada ekstrak metanol *Holothuria atra* menunjukkan adanya alkaloid, dan saponin, yang berkontribusi sebagai senyawa antioksidan dan



an di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi kolagen dari *thuria atra*) serta menguji aktivitas antioksidan dan antibakteri dari ebut. Dengan demikian, penelitian diharapkan dapat memberikan

pemahaman yang lebih mendalam mengenai potensi teripang hitam sebagai sumber bahan bioaktif untuk aplikasi farmasi dan industri kesehatan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana cara melakukan ekstraksi kolagen dari daging dan jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*) ?
2. Bagaimana karakteristik kolagen dari daging dan jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*) ?
3. Bagaimana potensi aktivitas antioksidan kolagen yang diekstrak dari teripang hitam (*Holothuria atra*) ?
4. Seberapa efektif kolagen teripang hitam (*Holothuria atra*) sebagai agen antibakteri?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk mengekstraksi dan mengetahui karakteristik kolagen dari jeroan dan daging teripang hitam (*Holothuria atra*), serta mengetahui potensinya sebagai antioksidan dan antibakteri.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Memahami cara melakukan ekstraksi kolagen daging jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*) dalam memproduksi protein bioaktif.
2. Menentukan karakteristik kolagen dari daging dan jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*)
3. Menentukan aktivitas antioksidan ekstrak kolagen dari daging jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*)
4. Menentukan aktivitas antibakteri ekstrak kolagen dari daging jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*)

1.4 Manfaat Penelitian

Secara umum penelitian ini dilakukan untuk memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Adapun secara khusus manfaat penelitian ini adalah memberikan nilai tambah pada pemanfaatan jeroan dan daging teripang hitam (*Holothuria atra*) dan sebagai informasi mengenai komponen senyawa bioaktif dari jeroan teripang atra (*Holothuria atra*) yang berpotensi sebagai antioksidan dan antibakteri.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah teripang hitam (*Holothuria atra*), akuades, NaOH p.a (Merck), CH₃CHOOH glasial (Merck), NaCl p.a (Merck), KBr (Merck), Lowry A (*follin-ciocalteus* dan akuades) Lowry B (Na₂CO₃ 2%, Na-K-Tartrat 2%, CuSO₄ 1%), BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Merck), methanol p.a (Merck), H₂SO₄ p.a (Merck), Vitamin C, larutan NaOH-Na₂S₂O₃, H₃BO₃ 2%, n-butanol 10%, bromkesol hijau 1%, metil merah 1%, SDS 10% dan serbuk ABTS (3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid).

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *vortex*, kain kasa, oven Genlab LTD, spektrofotometer Ultraviolet-Visible, labu Kjedahl, pH meter (Orain-420A), desikator, cawan porselen, cawan petri, neraca analitik Kern 870, *freeze dryer* Christ Alpha 1-4 LD plus, *freezer*, sentrifugasi, *Fourier Transform Infrared* (FTIR) Shimadzu 820 IPC dan alat gelas yang umum digunakan laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Kimia Terpadu, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Penelitian ini akan dimulai pada bulan Januari-Mei 2025.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel (Karlina et al., 2011)

Teripang hitam (*Holothuria atra*) yang telah dikumpulkan disimpan dalam coolbox dan didinginkan dengan es untuk menjaga kesegarannya. Selanjutnya, teripang dibersihkan dari hitam dan kotoran yang melekat pada permukaan kulitnya. Setelah itu, teripang dibelah untuk memisahkan bagian daging dari jeroannya. Kedua bagian tersebut kemudian dipotong-potong dengan ukuran sekitar 1–2 cm dan dikeringkan. Setelah dikeringkan, bagian daging dan jeroan teripang haluskan menjadi serbuk. Serbuk daging dan jeroan inilah yang kemudian digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya.

2.4.2 Ekstraksi Sampel

a. Pretreatment Kolagen



laging dan jeroan teripang hitam (*Holothuria atra*) direndam dalam oksida (NaOH) dengan konsentrasi 0,1 M. Perendaman dilakukan 1 volume sampel terhadap pelarut sebesar 1:10 (b/v) selama 10 jam setelah proses perendaman selesai, larutan NaOH dipisahkan dari ipang yang direndam. Larutan hasil perendaman tersebut kemudian

diuji kadar proteinnya menggunakan metode uji Lowry (Harjanto, 2017) untuk menentukan kandungan protein yang terlarut selama proses pretreatment.

b. Analisis Protein terlarut dengan Metode Lowry (Harjanto, 2017)

Larutan hasil perendaman NaOH sejumlah 2 mL, larutan standar Bovine Serum Albumin (BSA) sebanyak 2 mL, dan air murni (akuades) sebanyak 2 mL masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi terpisah. Kemudian, ke dalam setiap tabung tersebut ditambahkan 2,75 mL larutan Lowry B, dihomogenkan, dan dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 0,25 mL larutan Lowry A ke dalam tiap tabung, kemudian seluruh campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit sambil dikocok secara perlahan. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang sekitar 740 nm untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan.

c. Desain Eksperimen Metode RSM

Pada penelitian ini, metode *Response Surface Methodology* (RSM) diterapkan untuk menentukan kondisi optimal dalam proses ekstraksi kolagen. Dua faktor yang menjadi variabel bebas dan mempengaruhi produksi kolagen adalah konsentrasi asam asetat dan waktu perendaman selama ekstraksi. Respon yang diamati adalah rendemen kolagen yang diperoleh dari setiap perlakuan. Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak Minitab.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah *Central Composite Design* (CCD) dalam metode RSM dengan total 13 kali percobaan. Setiap percobaan merepresentasikan kombinasi tertentu dari variabel konsentrasi asam asetat dan waktu perendaman. Hasil rancangan eksperimen lengkap dengan data rendemen kolagen dari setiap percobaan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan Percobaan Dengan Metode RSM

No.	Konsentrasi Asam Asetat (M)	Waktu Perendaman (Jam)	Jumlah Percobaan
1	0,2 - 0,3	31 - 65	4
2	0,6	24 - 72	6
3	0,9	31 - 65	2
4	1,0	48	1

d. Pengaruh Kosentrasi Asam Asetat dan Waktu Perendaman terhadap Rendemen Kolagen dari Daging dan jeroan teripang hitam dengan Metode RSM



Optimized using
trial version
www.balesio.com

teripang hitam hasil pretreatment terlebih dahulu dinetralisasi mineralisasi hingga mencapai pH netral. Selanjutnya, kulit teripang an asam asetat dengan variasi konsentrasi antara 0,1 hingga 1 M dan ip pelarut sebesar 1:10 (b/v). Waktu perendaman yang digunakan hingga 72 jam. Setelah proses perendaman selesai, campuran n kain kasa untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang

diperoleh kemudian mengalami proses salting out dengan memakai larutan NaCl 2,6 M selama 24 jam. Selanjutnya, hasil salting out disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm dengan temperatur 4 °C selama 20 menit. Endapan hasil sentrifugasi dilarutkan kembali dalam larutan asam asetat 0,1 M sebelum dimasukkan ke dalam membran selofan untuk proses dialisis. Proses dialisis dilakukan selama 4 jam menggunakan larutan buffer asam asetat 0,01 M yang diganti sebanyak 7 kali secara berkala. Setelah proses dialisis, membran berisi larutan kolagen direndam dalam air demineralisasi yang diganti setiap 4 jam hingga pH larutan mencapai netral. Hasil ekstraksi berupa kolagen dalam bentuk larutan air kemudian dikeringkan dengan metode *freeze drying* selama 15 jam sehingga diperoleh kolagen kering berbentuk lembaran. (Komala, 2015).

e. Produksi Kolagen pada Kondisi Optimum

Daging dan jeroan teripang hitam sebanyak 80 gram yang telah menjalani proses pretreatment dinetralisasi menggunakan air demineralisasi hingga pH mencapai kondisi netral. Selanjutnya, proses perendaman dilakukan pada suhu ruang dengan menggunakan larutan asam asetat (CH₃COOH). Tahapan ini melibatkan dua variabel perlakuan, yaitu konsentrasi larutan asam asetat dan durasi waktu perendaman. Daging dan jeroan tersebut direndam dalam larutan asam asetat dengan konsentrasi 0,8 M dan perbandingan antara sampel dan pelarut sebesar 1:10 (b/v) selama 48 jam. Setelah perendaman selesai, campuran disaring menggunakan kain kasa untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian menjalani proses salting out dengan larutan NaCl 2,6 M selama 24 jam. Setelah proses *salting out*, larutan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm dengan suhu 4 °C selama 20 menit. Endapan hasil sentrifugasi dilarutkan kembali dalam larutan asam asetat 0,8 M sebelum dimasukkan ke dalam membran selofan untuk proses dialisis. Proses dialisis dilakukan selama 55 jam dengan menggunakan larutan buffer asam asetat 0,08 M yang diganti sebanyak 10 kali secara berkala. Setelah dialisis selesai, membran yang berisi larutan kolagen direndam dalam air demineralisasi yang diganti setiap 4 jam hingga pH mencapai nilai netral. Hasil ekstraksi berupa larutan kolagen ini kemudian dikeringkan dengan metode *freeze drying* selama 15 jam sehingga diperoleh kolagen dalam bentuk padat dan kering (Komala, 2015).

1.4.3 Karakterisasi Kolagen Daging dan Jeroan Teripang Hitam

a. Analisis Kadar Air (AOAC, 2015)

Cawan porselen terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 60 menit. Setelah proses pengeringan, cawan porselen dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit hingga suhunya stabil, kemudian ditimbang berulang kali sampai diperoleh berat yang konstan. Selanjutnya, sampel sebanyak 0,1007 gram dimasukkan ke dalam cawan dan dikeringkan dalam oven pada suhu 150 °C selama 3 jam. Setelah itu, cawan beserta isinya didinginkan dalam desikator selama 30 menit di suhu kamar, kemudian ditimbang kembali sampai beratnya konstan. Berat sampel dihitung menggunakan rumus yang terdapat pada persamaan



$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

A = berat cawan kosong (g)

B = berat cawan + sampel awal (g)

C = berat cawan + sampel kering (g)

b. Analisis Kadar Abu (AOAC, 2015)

Cawan porselen terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 60 menit. Setelah kering, cawan porselen dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit hingga suhunya stabil, kemudian ditimbang berulang kali sampai beratnya konstan. Sampel sebanyak 0,5019 gram kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan porselen tersebut, lalu dibakar menggunakan kompor listrik sampai tidak lagi mengeluarkan asap. Setelah proses pembakaran, sampel dimasukkan ke dalam tanur pengabuan pada suhu 450 °C selama 4 jam untuk menghilangkan unsur organik. Cawan porselen yang berisi hasil pengabuan kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit sampai suhunya stabil. Setelah itu, dilakukan penimbangan berulang sampai diperoleh berat yang konstan. Persentase kadar abu pada sampel dihitung menggunakan rumus yang terdapat pada persamaan (2).

$$\text{Kadar Abu(\%)} = \frac{C-A}{B-A} \times 100\% \tag{2}$$

Keterangan:

A = berat cawan kosong (g)

B = berat cawan dengan sampel (g)

C = berat cawan dengan sampel setelah dikeringkan (g)

c. Analisis Kadar Protein dengan Metode Kjeldahl (AOAC, 2015)

Analisis kadar protein pada kolagen daging dan jeroan teripang hitam dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 0,1007 gram yang dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Selanjutnya, ditambahkan satu buah kjeltab dan 10 mL asam sulfat (H₂SO₄) ke dalam labu tersebut. Larutan dalam labu kemudian dipanaskan pada suhu 410 °C sambil secara bertahap ditambahkan 10 mL air sampai larutan menjadi jernih. Setelah larutan jernih terbentuk, larutan didinginkan dan ditambahkan 50 mL air demineralisasi serta 20 mL natrium hidroksida (NaOH) dengan konsentrasi 40%, kemudian dilakukan proses destilasi. Destilat hasil destilasi ditampung dalam labu erlenmeyer berukuran 125 mL yang mengandung 25 mL larutan asam borat (H₃BO₃) 2% yang telah ditambahkan indikator campuran *bromocresol green* 0,1% dan *methyl red* 0,1% dengan perbandingan 2:1. Proses destilasi dilanjutkan dengan penambahan 50 mL larutan basah NaOH-Na₂S₂O₃ ke alat tersebut. Diperoleh 40 mL destilat yang berwarna hijau kebiruan di dalam labu erlenmeyer. Destilat tersebut dilakukan titrasi menggunakan asam klorida. Perubahan warna larutan berubah menjadi merah muda. Volume titran yang digunakan untuk perhitungan kadar protein menggunakan rumus pada persamaan



$$N_{\text{total}} (\%) = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times FP}{W \times 1000} \times 100\%$$

Protein (%) = kadar Ntotal x faktor koreksi (6,25)

d. Analisis Rendamen (Komala, 2015)

Rendamen kolagen diperoleh melalui perbandingan antara berat kering kolagen yang didapatkan dengan berat bahan baku berupa tulang. Besaran rendamen ini dapat dihitung menggunakan rumus yang tercantum pada persamaan (4).

$$\text{Rendamen kolagen}(\%) = \frac{\text{Berat kolagen kering (gram)}}{\text{Berat awal sampel (gram)}} \times 100\% \quad (4)$$

e. Analisis pH (Komala, 2015)

Sebelum melakukan pengukuran pH, alat pH meter terlebih dahulu dibersihkan dengan cara membilas elektroda menggunakan air demineralisasi (akuades), kemudian dikeringkan menggunakan tisu agar tidak ada sisa air yang dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Selanjutnya, kolagen kering sebanyak 0,1 gram ditimbang secara akurat dan dilarutkan dalam 10 mL air demineralisasi, kemudian larutan homogen tersebut dibuat agar tercampur merata. Setelah larutan homogen siap, elektroda pH meter dicelupkan ke dalam larutan sampel tersebut hingga nilai pH pada layar proyektor pH meter stabil dan dapat dibaca untuk menentukan nilai pH larutan kolagen.

f. Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR (Putra et al., 2013)

Kolagen kering sebanyak 0,02 gram dicampurkan dengan kalium bromida (KBr) kemudian dihaluskan menggunakan mortar sampai menjadi homogen. Campuran tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam cetakan pellet, yang kemudian dipadatkan dan divakum menggunakan mesin pencetak pellet. Pellet yang telah terbentuk dimasukkan ke dalam sel khusus, kemudian sel tersebut diletakkan pada ruang penempatan alat FTIR. Selanjutnya, pellet ditembakkan dengan sinar inframerah (IR) dari spektrofotometer inframerah tipe IR-408 yang sudah dioperasikan dalam kondisi stabil. Proses pendeteksian dilakukan dengan mengoperasikan tombol detektor pada alat dan data hasil akan ditampilkan dalam bentuk kromatogram FTIR pada monitor. Kromatogram ini memperlihatkan puncak-puncak spektrum yang merepresentasikan gugus fungsi kimia yang terkandung dalam sampel kolagen. Data kromatogram tersebut kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mendapatkan informasi tentang gugus fungsi yang ada pada sampel, sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Muyonga et al. (2004).

3.1.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan ABTS (Lee et al., 2004)



Optimized using
trial version
www.balesio.com

ABTS (2,2- azinobis (3- ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate). Ditimbang 3,5 mg, dan melarutkan dengan 5 mL aquadest. Kemudian menimbang 3,5 mg, melarutkan dengan 5 mL aquades. Kedua larutan tersebut diaduk hingga tercampur sempurna. Kemudian ditambahkan volumenya dengan etanol p.a sampai 25 mL, kemudian disimpan di suhu kamar selama 16 jam

b. Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat 500 ppm

Vitamin C ditimbang sebanyak 0,005 g kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sebanyak 10 mL ke dalam botol vial kosong lalu dihomogenkan (Ulfah, 2015)

c. Pembuatan Larutan Induk Sampel Kolagen 50 ppm

Sampel kolagen ditimbang 0,5 g kemudian dilarutkan dengan DMSO sebanyak 10 mL ke dalam botol vial kosong lalu dihomogenkan (Ulfah, 2015)

d. Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat dengan Metode ABTS (Rusma, 2021)

Uji antioksidan asam askorbat dilakukan dengan membuat deret standar asam askorbat terlebih dahulu dengan cara memipet asam askorbat konsentrasi 5 ppm masing-masing 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; dan 4,0 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda untuk membuat deret standar 0,25; 0,5; 1,0; dan 4,0 mL larutan asam askorbat ditambahkan masing-masing 1 mL larutan ABTS. Setelah itu larutan asam askorbat ditambahkan metanol p.a masing-masing 3,75 mL, 3,5 mL, 3 mL, 2 mL, dan 0 mL sehingga didapatkan volume total 5 mL untuk masing-masing deret standar. Deret standar diinkubasi pada ruangan yang gelap dengan suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya, diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 750 nm.

e. Penentuan Aktivitas Antioksidan Kolagen daging dan jeroan teripang hitam dengan Metode ABTS (Rusma 2021)

Larutan induk kolagen dipipet sebanyak masing-masing 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL, dan 1,6 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda untuk membuat deret ukur 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, dan 160 ppm. larutan deret ukur ditambahkan masing-masing 1 mL larutan ABTS. dan ditambahkan metanol p.a hingga didapatkan volume total 5 mL. Setelah itu dibuat larutan kontrol dengan dipipet larutan ABTS sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi lalu dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan metanol p.a. Deret ukur dan larutan kontrol diinkubasi pada ruangan yang gelap dengan suhu ruang selama 30 menit lalu diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 748 nm. Selanjutnya, dihitung aktivitas antioksidan dan nilai IC₅₀. Persentase aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan rumus pada persamaan (8).

$$\text{Aktivitas Antioksidan(\%)} = \frac{(A_b - A_s)}{A_s} \times 100\% \quad (5)$$



.rol
pel

3.4.4 Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat (Hamidy et al., 2006)

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas. Sterilisasi dilakukan dengan autoklav pada suhu 121 °C selama 15 menit, sedangkan jarum ose dan pinset disterilkan dengan pemijaran.

b. Pembuatan *Nutrient Agar* (Arifin et al., 2013)

Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan 4,6 g *nutrient agar* dalam 200 mL akuades pada beaker gelas. Suspensi yang dihasilkan dipanaskan sampai mendidih, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer ditutup dengan kapas dan wrap kemudian disterilisasi. Proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

c. Pembuatan *Nutrient Broth* (Arifin et al., 2013)

Pembuatan media *Nutrient broth* dilakukan dengan melarutkan 0,9 g *nutrient broth* dalam 100 mL akuades pada beaker gelas. Suspensi yang dihasilkan dipanaskan sampai mendidih, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer ditutup dengan kapas dan wrap kemudian disterilisasi. Proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

d. Pembuatan Biakan Aktif (Kusmiyati dan Agustini, 2007)

Bakteri uji yang digunakan yaitu *S. aureus* FNCC 0047 dan *E. coli* FNCC 0091 dalam bentuk isolat miring. Bakteri uji pada media agar miring diambil 1 ose dengan menggunakan kawat ose yang telah disterilkan sebelumnya kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 10 mL larutan *nutrient broth* (NB). Kemudian tabung reaksi yang telah berisi suspensi bakteri *divortex* agar homogen kemudian tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

e. Uji Aktivitas Antibakteri (Arifin et al., 2013)

Uji aktivitas antibakteri menggunakan konsentrasi sampel 0,1%, 0,2%, 0,3%. Konsentrasi kontrol positif Kloramfenikol 0.1%, 0,2%, 0,3%. Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO. Langkah pertama yaitu membuat variasi konsentrasi kolagen dan kontrol sesuai konsentrasi di atas. Kertas cakram diresapkan dalam sampel. Proses peresapan dilakukan dengan cara merendamkan kertas cakram pada ekstrak etanol, kontrol positif Kloramfenikol dan kontrol negatif pelarut. Langkah kedua, *nutrient agar* dipanaskan sampai mencair, kemudian didinginkan sampai suhu ± 40 °C dan dituangkan ke dalam cawan petri.

Larutan biakan aktif bakteri diambil sebanyak 50 μ L dan dimasukkan ke dalam cawan petri *agar*. *Nutrient agar* dan larutan biakan aktif bakteri dihomogenkan dan nadat. Kertas cakram diletakkan di atas permukaan media bakteri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama ± 48 jam, lalu diukur menggunakan jangka sorong. Luas zona hambatan ditentukan rangi diameter keseluruhan (cakram + zona hambatan) dengan diameter zona hambat pelarut (jika terdapat zona hambat).





Optimized using
trial version
www.balesio.com