

**PERBANDINGAN OPTIMASI EKSTRAKSI KOLAGEN DARI
KULIT IKAN NILA HITAM (*Oreochromis niloticus*) METODE
MASERASI DENGAN METODE ENZIMATIS**

TUGAS AKHIR

**Karya Tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik dari
Universitas Pasundan**

Oleh:

**HADI FATULOH
20.302.0045**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS TEKNIK
UNIVERSITAS PASUNDAN
BANDUNG
2025**

ABSTRAK

PERBANDINGAN METODE MASERASI DENGAN METODE ENZIMATIS DALAM OPTIMASI EKSTRAKSI KOLAGEN DARI KULIT IKAN NILA HITAM (*Oreochromis niloticus*)

Oleh :

Hadi Fatuloh

NPM : 203020045

(Program Studi Teknologi Pangan)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan optimasi pada pembuatan kolagen dari kulit ikan nila hitam menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan metode ekstraksi enzimatis.

Penelitian dilakukan menggunakan *Design Expert* 13 metode *Box-Behnken Design*. Variabel yang digunakan dalam metode ekstraksi maserasi meliputi pH ekstraksi, Waktu perendaman atau ekstraksi, dan Konsentrasi Asam Asetat, sedangkan variabel yang digunakan dalam metode ekstraksi enzimatis meliputi pH ekstraksi, Waktu perendaman atau ekstraksi, dan Konsentrasi Enzim Papain.

Rendemen Kolagen yang dihasilkan dengan metode ekstraksi maserasi dengan rendemen tertinggi yaitu sebesar 14,48%, untuk spesifikasi yang lainnya seperti pH menghasilkan pH 6, kadar air menghasilkan 10,34%, dan kadar protein menghasilkan 34,01%. Sedangkan Rendemen Kolagen yang dihasilkan dengan metode ekstraksi enzimatis dengan rendemen tertinggi yaitu sebesar 17%, untuk spesifikasi yang lainnya seperti pH menghasilkan pH 7,2, kadar air menghasilkan 12,11%, dan kadar protein menghasilkan 42,23%.

Kata Kunci: Optimasi, Ikan Nila, Kulit Ikan Nila, Asam Asetat, Enzim Papain, Ekstraksi, Maserasi, Enzimatis, kolagen, *Design Expert*, *Box-Behnken Design*.

ABSTRACT

COMPARISON OF MACERATION METHODS WITH ENZYMATIC METHODS IN OPTIMIZATION OF COLLAGEN EXTRACTION FROM BLACK NILA FISH SKIN (*Oreochromis niloticus*)

By :

Hadi Fatuloh

NPM : 203020045

(Department of Food technology)

This study aims to determine the comparison of optimization in the preparation of collagen from black tilapia fish skin using maceration extraction method with enzymatic extraction method.

The research was conducted using Design Expert 13 Box-Behnken Design method. The variables used in the maceration extraction method include extraction pH, soaking or extraction time, and acetic acid concentration, while the variables used in the enzymatic extraction method include extraction pH, soaking or extraction time, and papain enzyme concentration.

The collagen yield produced by the maceration extraction method had the highest yield of 14.48%. Other specifications included a pH of 6, a moisture content of 10.34%, and a protein content of 34.01%. Meanwhile, the collagen yield produced using the enzymatic extraction method has the highest yield of 17%, with other specifications such as pH at 7.2, moisture content at 12.11%, and protein content at 42.23%.

Keywords: *Optimization, Tilapia Fish, Tilapia Fish Skin, Acetic Acid, Papain Enzyme, Extraction, Enzymatic, collagen, Design Expert, Box-Behnken Design.*

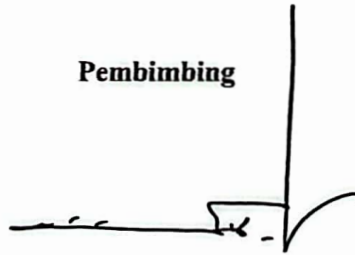
**PERBANDINGAN METODE MASERASI DENGAN METODE
ENZIMATIS DALAM OPTIMASI EKSTRAKSI KOLAGEN
DARI KULIT IKAN NILA HITAM (*Oreochromis niloticus*)**

Oleh :
Hadi Fatuloh
NPM : 203020045
(Program Studi Teknologi Pangan)

Fakultas Teknik
Universitas Pasundan

Menyetujui :

Pembimbing

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a final upward stroke, positioned below the word 'Pembimbing'.

(Dr. Ir. H. Dede Zainal Arief, M.Sc.)

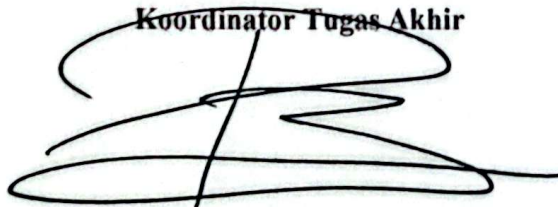
**PERBANDINGAN METODE MASERASI DENGAN METODE
ENZIMATIS DALAM OPTIMASI EKSTRAKSI KOLAGEN
DARI KULIT IKAN NILA HITAM (*Oreochromis niloticus*)**

Oleh :
Hadi Fatuloh
NPM : 203020045
(Program Studi Teknologi Pangan)

Fakultas Teknik
Universitas Pasundan

Menyetujui :

Koordinator Tugas Akhir

A stylized, handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

(Rizal Maulana Ghaffar, S.T., MT.)

PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR

Tugas akhir yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Fakultas dan Universitas, dan terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis dengan mengikuti aturan HaKI yang berlaku di Universitas Pasundan. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai dengan kaidah ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Sitasi hasil penelitian Tugas Akhir ini dapat ditulis dalam bahasa Indonesia sebagai berikut:

Fatuloh, H., & Arief, D.Z., (2025): Perbandingan Metode Maserasi Dengan Metode Enzimatis Dalam Optimasi Ekstraksi Kolagen Dari Kulit Ikan Nila Hitam (*Oreochromis Niloticus.*), Tugas Akhir Program Sarjana Universitas Pasundan.

dan dalam bahasa Inggris sebagai berikut:

Fatuloh, H., & Arief, D.Z., (2025): *Comparison Of Maseration Methods With Enzymatic Methods In Optimization Of Collagen Extraction From Black Nila Fish Skin (Oreochromis Niloticus.), Bachelor's Thesis, Pasundan University.*

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh tugas akhir haruslah seizin Dekan Fakultas Teknik Universitas Pasundan.

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah *rabbi* *lamin*, puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini yang berjudul **“Perbandingan Metode Maserasi Dengan Metode Enzimatis Dalam Optimalisasi Ekstraksi Kolagen Dari Kulit Ikan Nila Hitam (*Oreochromis Niloticus*)”**. Shalawat dan salam semoga selalu tercurahkan kepada hadirat nabi besar Habibana Wanabiyana Muhammad SAW, serta kepada keluarga-Nya, kepada para sahabat-Nya, kepada para tabi’in dan kepada umat-Nya.

Laporan tugas akhir ini, tidak akan selesai tanpa dukungan, bantuan, dan masukan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis akan mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Ir. Dede Zainal M.Sc., selaku pembimbing yang telah sabar untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menuliskan laporan Tugas Akhir.
2. Dr. Ir. Hervelly, M.P., selaku dosen penguji I yang telah memberi masukan dan meluangkan waktu selama proses penyusunan tugas akhir.
3. Ir. Thomas Gozali, M.P., selaku dosen penguji II yang telah memberi masukan dan meluangkan waktu selama proses penyusunan tugas akhir.
4. Ketua Program Studi Teknologi Pangan Universitas Pasundan Bandung, Bapak Jaka Rukmana S.T., M.T..
5. Koordinator Tugas Akhir Program Studi Teknologi Pangan Universitas Pasundan Bandung, Bapak Rizal Maulana Ghaffar S.T., M.T.
6. Keluarga besar penulis khususnya orang tua yaitu ayah Iman Sobirin, Ibu Nanih Rundasih, kakak Rezza Yuandhitra, kakak ipar Sa’adah dan adik Khanza Aulia Putri atas doa yang dipanjatkan, dukungan, dan kasih sayang baik secara moril maupun materil sehingga dalam proses penulisan laporan dapat berjalan lancar.

7. Sahabat – sahabat seperjuangan yaitu Reyhan Baehaqi, Nyanyu Miskah, Keysha Frida, Kensa Novita Jaskia, dan Ghina Luginia yang selalu menghibur, memberikan dukungan, saran, dan bantuan, dan semangatnya.
8. Teman-teman seperjuangan Teknologi Pangan Angkatan 2020 dan orang-orang yang terlibat yang telah memberikan bantuan dan dukungan baik secara langsung maupun tidak langsung kepada penulis selama menyusun Tugas Akhir ini.
9. semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu.

Tugas akhir ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menempuh kelulusan Strata 1 Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Pasundan Bandung.

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	6
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Kerangka Pemikiran	7
1.6 Hipotesis Penelitian	13
1.7 Waktu dan Tempat Penelitian	13
II. TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1 Ikan Nila.....	14
2.2 Kolagen.....	17
2.3 Asam Asetat	20
2.4 Asam Amino.....	22
2.5 Ekstraksi	23
2.6 <i>Design Expert</i>	26
2.7 Enzim Papain.....	28
III. METODE PENELITIAN	31
3.1 Bahan – Bahan Penelitian	31
3.1.1 Bahan Baku	31
3.1.2 Bahan - Bahan Analisis	31
3.2 Alat – Alat Penelitian	31
3.3 Alat – alat yang digunakan	31
3.3.1 Alat – Alat yang digunakan Analisis	31
3.4 Metode Penelitian	32
3.4.1 Rancangan Perlakuan	34
3.4.2 Rancangan Percobaan.....	40
3.4.3 Rancangan Analisis	42
3.5 Prosedur Penelitian	44
3.5.1 Prosedur Ekstraksi Maserasi	44
3.5.2 Prosedur Ekstraksi Enzimatis	49
3.6 Jadwal Penelitian	54
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	55
4.1 Penelitian Pendahuluan	55
4.1.1 Hasil Uji Tirosin Standar	55
4.1.2 Hasil Uji Aktivitas Enzim Papain Murni Powder.....	56
4.1.3 Hasil Uji Aktivitas Enzim Papain Pada Produk Kolagen	57
4.2 Penelitian Utama	58
4.2.1 Optimasi Ekstraksi Kolagen Metode Maserasi	58

4.2.2	Optimasi Ekstraksi Metode Enzimatis	92
4.2.3	Perbandingan Spesifikasi Kolagen Yang Dihasilkan Metode Ekstraksi dengan Metode Enzimatis	127
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	128
5.1	Kesimpulan	128
5.2	Saran	129
	DAFTAR PUSTAKA	130
	LAMPIRAN	137

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kandungan Gizi Ikan.....	15
Tabel 2. Sifat Kulit Ikan Nila dan Tulang Ikan Nila.....	17
Tabel 3. Syarat Mutu Kolagen dari Kulit Ikan.....	19
Tabel 4. Komposisi kimia dari berbagai bagian <i>Carica papaya L</i>	30
Tabel 5. Batas Bawah dan Batas Atas pada Variabel bebas	38
Tabel 6. <i>Goal</i> dan <i>Importance</i> Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Maserasi.....	39
Tabel 7. <i>Goal</i> dan <i>Importance</i> Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Enzimatis	39
Tabel 8. Layout Percobaan Pengacakan dengan <i>Respon Surface Method</i>	41
Tabel 9. Layout Percobaan Pengacakan dengan <i>Respon Surface Method</i>	42
Tabel 10. Uraian Kegiatan	54
Tabel 11. Absorbansi Larutan Tirosin	55
Tabel 12. Aktivitas Enzim Papain Murni Powder	56
Tabel 13. Aktivitas Enzim Papain Produk.....	57
Tabel 14. Batas Bawah dan Batas Atas pada Variabel bebas	60
Tabel 15. Hasil Analisis Rendemen kolagen:.....	60
Tabel 16. Anova Analisis Rendemen Kolagen.....	62
Tabel 17. Hasil <i>Fit Statistic</i> Rendemen Kolagen.....	63
Tabel 18. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen.....	64
Tabel 19. Hasil Persamaan Keakuratan yang Dihasilkan	64
Tabel 20. Hasil Analisis Derajat Keasaman (pH).....	67
Tabel 21. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH).....	69
Tabel 22. Hasil <i>Fit Statistic</i> Derajat Keasaman (pH)	70
Tabel 23. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Derajat Keasaman (pH)	71
Tabel 24. Hasil Analisis Kadar Air	74
Tabel 25. Anova Analisis Kadar Air	75
Tabel 26. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air.....	76
Tabel 27. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air.....	77
Tabel 28. Hasil Analisis Kadar Protein:	80
Tabel 29. Anova Analisis Kadar Protein	81
Tabel 30. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein.....	83
Tabel 31. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein.....	83
Tabel 32. <i>Goal</i> dan <i>Importance</i> Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Maserasi.....	87
Tabel 33. Rekomendasi Optimasi Optimal dari Program <i>Design Expert</i>	89
Tabel 34. Hasil Verifikasi optimasi Optimal.....	91
Tabel 35. Hasil Analisis Optimasi Terpilih Ekstraksi Metode Maserasi	92
Tabel 36. Batas Bawah dan Batas Atas pada Variabel bebas	94
Tabel 37. Hasil Analisis Rendemen :	94
Tabel 38. Anova Analisis Rendemen Kolagen.....	96
Tabel 39. Hasil <i>Fit Statistic</i> Rendemen Kolagen.....	97
Tabel 40. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen.....	97
Tabel 41. Hasil Persamaan Keakuratan yang Dihasilkan	98
Tabel 42. Hasil Analisis Derajat Keasaman (pH) :.....	101
Tabel 43. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH).....	103
Tabel 44. Hasil <i>Fit Statistic</i> Derajat Keasaman (pH)	104
Tabel 45. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Derajat Keasaman (pH)	105

Tabel 46. Hasil Analisis Kadar Air	108
Tabel 47. Anova Analisis Kadar Air	110
Tabel 48. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air	111
Tabel 49. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air	111
Tabel 50. Hasil analisis kadar protein	115
Tabel 51. Anova Analisis Kadar Protein	117
Tabel 52. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein	118
Tabel 53. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein	118
Tabel 54. <i>Goal</i> dan <i>Importance</i> Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Enzimatis	122
Tabel 55. Rekomendasi Optimasi Optimal dari Program <i>Design Expert</i>	124
Tabel 56. Hasil Verifikasi Optimasi Optimal	125
Tabel 57. Hasil Analisis Optimasi Terpilih Ekstraksi Metode Enzimatis	126
Tabel 58. Biaya Produksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam	141
Tabel 59. Biaya Analisis Produk	141
Tabel 60. Total Biaya Keseluruhan Penelitian	141
Tabel 61. Absorbansi Larutan Tirosin	142
Tabel 62. Aktivitas Enzim Papain Murni Powder	142
Tabel 63. Aktivitas Enzim Papain Produk	143
Tabel 64. Perhitungan Uji Aktivitas Enzim	144
Tabel 65. Hasil Analisis Rendemen	148
Tabel 66. Perhitungan Rendemen Kolagen	149
Tabel 67. Hasil Analisis Rendemen	150
Tabel 68. Perhitungan Rendemen Kolagen	151
Tabel 69. Hasil Analisis Derajat Keasaman (pH)	152
Tabel 70. Hasil Analisis pH	153
Tabel 71. Hasil Analisis Kadar Air	153
Tabel 72. Perhitungan Kadar Air	154
Tabel 73. Hasil Analisis Kadar Air	156
Tabel 74. Perhitungan Kadar Air	157
Tabel 75. Hasil Analisis Kadar Protein	158
Tabel 76. Perhitungan Kadar Protein	159
Tabel 77. Hasil analisis kadar protein	162
Tabel 78. Perhitungan Kadar protein	163
Tabel 79. Anova Analisis Rendemen Kolagen	165
Tabel 80. Hasil <i>Fit Statistic</i> Rendemen Kolagen	165
Tabel 81. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen	165
Tabel 82. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH)	166
Tabel 83. Hasil <i>Fit Statistic</i> Derajat Keasaman (pH)	166
Tabel 84. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Derajat Keasaman (pH)	166
Tabel 85. Anova Analisis Kadar Air	167
Tabel 86. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air	167
Tabel 87. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air	167
Tabel 88. Anova Analisis Kadar Protein	168
Tabel 89. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein	168
Tabel 90. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein	168
Tabel 91. Anova Analisis Rendemen Kolagen	169
Tabel 92. Hasil <i>Fit Statistic</i> Rendemen Kolagen	169
Tabel 93. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen	169
Tabel 94. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH)	170
Tabel 95. Hasil <i>Fit Statistic</i> Derajat Keasaman (pH)	170

Tabel 96. Estimasi Koefisien dari Tiap Respon Derajat Keasaman (pH)	170
Tabel 97. Anova Analisis Kadar Air	171
Tabel 98. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Air	171
Tabel 99. Estimasi Koefisien dari Tiap Respon Kadar Air.....	171
Tabel 100. Anova Analisis Kadar Protein	172
Tabel 101. Hasil <i>Fit Statistic</i> Kadar Protein	172
Tabel 102. Estimasi Koefisien dari Tiap Respon Kadar Protein	172

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Ikan Nila Hitam	16
Gambar 2. Serbuk Kolagen	19
Gambar 3. Metode <i>Box Behnken</i> Desain Ekstraksi Metode Maserasi	35
Gambar 4. Penentuan Respon	35
Gambar 5. Running RSM Ekstraksi Kolagen Metode Maserasi.....	36
Gambar 6. Metode <i>Box Behnken</i> Desain Ekstraksi Metode Enzimatis.....	37
Gambar 7. Penentuan Respon	37
Gambar 8. Running RSM Ekstraksi Kolagen Metode Enzimatis	38
Gambar 9. Diagram Alir Pembuatan Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Ekstraksi Maserasi	47
Gambar 10. Diagram Alir Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Maserasi	48
Gambar 11. Diagram Alir Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Ekstraksi Enzimatis.....	52
Gambar 12. Diagram Alir Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Ekstraksi Enzimatis.....	53
Gambar 13. Kurva Larutan Tirosin Standar	55
Gambar 14. Grafik Kenormalan <i>Internally Studentized Residuals</i> Rendemen	65
Gambar 15. Grafik 3D <i>Surface</i> Respon Rendemen Kolagen.....	66
Gambar 16. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respon Rendemen Kolagen.....	66
Gambar 17. Grafik Kenormalan <i>internally studentized residuals</i> Derajat Keasaman (pH)	72
Gambar 18. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respons Derajat Keasaman (pH)	72
Gambar 19. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respon Derajat Keasaman (pH).....	73
Gambar 20. Grafik Kenormalan <i>internally studentized residuals</i> Kadar Air	78
Gambar 21. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respons Kadar Air	78
Gambar 22. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respons Kadar Air	79
Gambar 23. Grafik Kenormalan <i>internally studentized residuals</i> Kadar Protein.....	84
Gambar 24. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respons Kadar Protein	84
Gambar 25. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respons Kadar Protein	85
Gambar 26. Grafik Kenormalan <i>Internally Studentized Residuals</i> Rendemen	99
Gambar 27. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respon Rendemen Kolagen.....	99
Gambar 28. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respon Rendemen Kolagen.....	100
Gambar 29. Grafik Kenormalan <i>Internally Studentized Residuals</i> Derajat Keasaman (pH)	106
Gambar 30. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respon Derajat Keasaman (pH).....	106
Gambar 31. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respon Derajat Keasaman (pH).....	107
Gambar 32. Grafik Kenormalan <i>internally studentized residuals</i> Kadar Air.....	112
Gambar 33. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respons Kadar Air	113
Gambar 34. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respons Kadar Air	113
Gambar 35. Grafik Kenormalan <i>internally studentized residuals</i> Kadar Protein.....	119
Gambar 36. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AB Respons Kadar Protein	120
Gambar 37. Grafik 3D <i>Surface</i> Variabel AC Respons Kadar Protein	120
Gambar 38. Kurva Larutan Tirosin Standar	142
Gambar 39. Analisis Uji Aktivitas Enzim Papain Powder dan Produk	174

Gambar 40. Analisis Uji Kadar Air	174
Gambar 41. Analisis Uji Kadar Protein	175

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Aktivitas Enzim Papain Metode Spektrofotometer UV-Vis (Sari, 2021).....	137
Lampiran 2. Pengujian Rendemen Kolagen (Fahrul, 2005)	138
Lampiran 3. Penentuan Nilai pH (Safitri, 2014).....	138
Lampiran 4. Prosedur Analisis Kadar Air Metode Gravimetri (AOAC dalam Sudarmadji dkk, 2010).....	139
Lampiran 5. Prosedur Analisis Kadar Protein Metode Kjeldahl (AOAC dalam Sudarmadji dkk, 2010).....	139
Lampiran 6. Kebutuhan Bahan dan Biaya Penelitian	141
Lampiran 7. Uji Aktivitas Enzim Papain.....	142
Lampiran 8. Hasil Analisis Rendemen Kolagen Metode Ekstraksi Maserasi	148
Lampiran 9. Hasil Analisis Rendemen Kolagen Metode Ekstraksi Enzimatis	150
Lampiran 10. Hasil Analisis Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Metode Ekstraksi Maserasi.....	152
Lampiran 11. Hasil Analisis Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Metode Ekstraksi Enzimatis	153
Lampiran 12. Hasil Analisis Kadar air Metode Ekstraksi Maserasi	153
Lampiran 13. Hasil Analisis Kadar air Metode Enzimatis	156
Lampiran 14. Hasil Analisis Kadar Protein Metode Maserasi.....	158
Lampiran 15. Hasil Analisis Kadar Protein Metode Enzimatis	162
Lampiran 16. <i>Anova Modell, Fit Statistic, dan Coeficient in Terms of Coded Factors</i> Respon Ekstraksi Maserasi	165
Lampiran 17. <i>Anova for Linear Modell, Fit Statistic, dan Coeficient in Terms of Coded Factors</i> Respon Ekstraksi Enzimatis.....	169
Lampiran 18. Dokumentasi Proses pembuatan kolagen dari kulit ikan nila Hitam	173
Lampiran 19. Dokumentasi Analisis kolagen dari kulit ikan nila Hitam	174

I. PENDAHULUAN

Pendahuluan menguraikan mengenai: Latar Belakang Penelitian, Identifikasi Masalah, Maksud Dan Tujuan Penelitian, Manfaat Penelitian, Kerangka Pikiran, Hipotesis, dan Waktu dan Tempat Penelitian.

1.1 Latar Belakang

Industri pengolahan ikan semakin pesat dengan bertambahnya jumlah produksi ikan di Indonesia khususnya perikanan budidaya air tawar. Ikan nila salah satu produk perikanan budidaya yang produksi setiap tahunnya meningkat. Produksi ikan nila di Indonesia pada tahun 2020 sekitar 1.170.000 ton, sedangkan Produksi ikan nila pada tahun 2021 meningkat menjadi sekitar 1.350.000 ton, dan Produksi ikan nila pada tahun 2022 meningkat menjadi 1.410.000 ton (Kementrian Kelautan dan Perikanan, 2022).

Kulit ikan adalah bagian dari tubuh ikan yang terletak di luar dagingnya. Ini adalah lapisan luar yang melindungi jaringan-jaringan dalam tubuh ikan dan berfungsi sebagai penghalang antara ikan dan lingkungan eksternal. (Taufiq, dkk., 2015). Industri kulit ikan mengelola kulit ikan nila yang biasanya dianggap sebagai limbah. Kulit ikan nila bisa diolah menjadi produk seperti Kolagen dan gelatin yang digunakan dalam industri kosmetik, farmasi, dan makanan. untuk 1 kg ikan nila, kulit yang dihasilkan bisa sekitar 70 gram. Namun, angka ini dapat bervariasi berdasarkan metode pemotongan, dan ukuran ikan (Kittiphanabawon, 2005).

Kulit ikan mengandung gizi nilai gizi yang tinggi terutama kandungan

protein dan lemak. Pada kulit ikan mengandung sekitar, 0,5% dan lemak 2,22%. Selain itu, kulit ikan mempunyai kadar air sekitar 13,81% (Taufiq dkk., 2015).

Dalam penelitian ini bahan baku yang digunakan yaitu kulit ikan nila hitam, kulit ikan nila merupakan bahan yang mudah rusak apabila tidak segera dimanfaatkan sehingga salah satu pemanfaatan kulit ikan nila adalah dengan diolah menjadi kolagen ikan. Kulit Ikan Nila merupakan sumber kolagen, yang artinya Kulit ikan nila kaya akan kolagen, protein struktural yang penting untuk kesehatan kulit. Kolagen membantu menjaga elastisitas kulit, meminimalkan kerutan, dan mempromosikan regenerasi kulit. Konsumsi kulit ikan nila atau penggunaan produk perawatan kulit yang mengandung ekstraknya dapat membantu menjaga kulit tetap kenyal dan lembap. (Kittiphattanabawon, 2005).

Kolagen adalah salah satu dari jaringan ikat utama protein hewani. Kolagen merupakan protein yang paling melimpah dalam jaringan hewan dengan proporsi 30% dari total protein tubuh sebagai komponen utama dari jaringan ikat, otot, gusi dan kulit (Kittiphattanabawon, 2005). Kolagen juga berperan penting dalam pembentukan jaringan dan organ, serta terlibat dalam berbagai ekspresi fungsional sel.

Industri kolagen saat ini sudah banyak dikembangkan, namun sebagian besar kolagen tersebut diproduksi dari kulit dan tulang sapi maupun babi. Kolagen dari sumber tersebut kurang sesuai dengan keyakinan agama tertentu (Pranoto dkk., 2007).

Selain itu kolagen dari sumber tersebut dikhawatirkan menimbulkan beberapa resiko penyakit diantaranya flu babi, sapi gila, dan kaki mulut

(Jongjareonrak dkk. 2005). Menurut Kittiphattanabawon dkk., (2010) menyatakan bahwa kolagen dapat dihasilkan dari ikan terutama pada bagian kulit dan tulang. Hal ini disebabkan kulit ikan memiliki tekstur yang lebih lunak dan memiliki kandungan kolagen yang lebih tinggi dibandingkan dengan tulang.

Kolagen yang bersumber dari ikan memiliki struktur molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan kolagen yang terbuat dari sapi atau babi sehingga lebih mudah untuk diserap oleh tubuh selain itu kolagen ikan juga memiliki protein struktural yang kompleks (Kumar dkk., 2011).

Pada tahun 2003, Indonesia masih mengimpor lebih dari 6200 ton kolagen. Namun, menurut Badan Pusat Statistik (BPS), impor kolagen Indonesia pada tahun 2019 mencapai 4.808 ton, dan mengalami peningkatan dari tahun ke tahun.

Pembuatan kolagen dapat dilakukan melalui proses ekstraksi dan ada dua cara ekstraksi yang dapat dilakukan, yaitu ekstraksi konvensional menggunakan *solvent* serta ekstraksi enzimatis menggunakan enzim protease (Hartati, 2010).

Ekstraksi adalah suatu metode operasi yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah massa bahan (*Solvent*) sebagai materi pemisah. Apabila komponen yang akan dipisahkan (*Solute*) berada dalam fasa padat, maka proses tersebut dinamakan leaching, sedangkan istilah ekstraksi umum digunakan jika *solute* berada dalam fasa cair (Hartati, 2010).

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi yaitu salah satu metode ekstraksi dingin. Ekstraksi maserasi dilakukan dengan cara merendam selama beberapa waktu, umumnya 24 jam dengan menggunakan satu

atau campuran pelarut. Maserasi bertujuan untuk menarik zat – zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun tidak tahan pemanasan. (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Asam asetat digunakan untuk merubah materi kimia yang ada didalam kulit ikan dimana pilinan heliks rantai kolagen akan terurai dari yang berbentuk heliks tiga rantai menjadi rantai yang sederhana (Simanjuntak, 2013).

Pada proses ekstraksi enzimatis, enzim yang digunakan adalah enzim papain, karena enzim papain adalah enzim yang berfungsi untuk memecah protein non-kolagen dengan cara memecah ikatan peptida dalam protein. Papain menghidrolisis ikatan peptida dalam protein non-kolagen seperti elastin dan keratin, yang seringkali terdapat dalam kulit ikan dan mengikat kolagen (Hartati, 2010).

Proses ini dilakukan dengan memanfaatkan aktivitas proteolitik papain, yang bekerja secara selektif pada protein-protein pengganggu tersebut tanpa merusak struktur kolagen. Dengan demikian, papain membantu membebaskan kolagen dari jaringan kulit dan meningkatkan kemurnian kolagen yang diekstraksi (Hartati, 2010).

Ekstraksi kolagen menggunakan asam lemah dilaporkan menghasilkan rendemen kolagen yang rendah. Oleh karena itu, digunakan enzim protease untuk membantu memecah ikatan peptida pada protein sehingga memudahkan proses ekstraksi. Menurut *et al.* dan Nagai & Suzuki (2000) Menambahkan 0,1% enzim pepsin kedalam larutan asam asetat untuk mengekstraksi kolagen. Pengaruh penggunaan enzim pepsin dipelajari lebih lanjut oleh Nagai *et al.* (2000) pada kulit

ikan *Ocellace Puffer*, Dimana ekstraksi kolagen menggunakan asam asetat menghasilkan rendemen kolagen sebesar 10,7%. Sementara itu, ekstraksi dengan penambahan enzim pepsin dalam asam asetat menghasilkan rendemen sebesar 44,7%. Selain enzim pepsin, salah satu enzim yang dapat digunakan dalam metode ini adalah enzim papain dari tanaman pepaya. Enzim papain dipilih karena memiliki beberapa keunggulan antara lebih tahan terhadap panas, dimana pada suhu 55°-70°C aktivitas papain mulai mengalami penurunan dan memiliki kisaran pH yang luas, dimana rentang pH 2-6 enzim papain optimal dalam melarutkan kolagen (Tan, Y, 2018).

Pemanfaatan papain dalam bidang industri memberikan banyak keuntungan, yaitu mudah untuk mendapatkannya, tersedia dalam jumlah yang banyak, tidak memiliki sifat toksik, tidak memiliki reaksi efek samping, jenis enzim yang cukup tahan terhadap suhu, dan bisa berfungsi dengan baik pada konsentrasi yang rendah (Risnawati, Metty & Cahyaningrum, Sari Edi, 2013).

Metode respons permukaan (RSM) menjadi opsi yang populer untuk menentukan optimalisasi prosedur analitis dengan menggunakan teknik statistik multivariat (Nandane *et al.*, 2017). Menurut Myers *et al.*, (2016) metode RSM digunakan untuk optimalisasi proses pengolahan skala industri karena RSM dapat menentukan proses terdekat dengan respons, sehingga jumlah percobaan tidak terlalu banyak, percobaan singkat, dan menghemat biaya percobaan. Penggunaan metode RSM dapat memetakan titik optimum dari beberapa variabel yang beragam dalam proses pengolahan.

1.2 Identifikasi Masalah

Ditinjau dari uraian latar belakang, maka masalah yang dapat diidentifikasi yaitu :

1. Bagaimana pH ekstraksi, waktu ekstraksi dan konsentrasi asam asetat yang optimal dalam menghasilkan rendemen dan spesifikasi kolagen pada metode maserasi.
2. Bagaimana pH ekstraksi, waktu fermentasi dan konsentrasi enzim papain yang optimal dalam menghasilkan rendemen dan spesifikasi kolagen pada metode enzimatis.

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk membandingkan optimasi dengan menggunakan metode maserasi dan metode enzimatis serta menganalisis spesifikasi kolagen yang dihasilkan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perlakuan yang optimal pada ekstraksi kolagen dengan menggunakan metode maserasi dan ekstraksi kolagen dengan metode fermentasi enzimatis, serta rendemen dan spesifikasi kolagen yang dihasilkannya.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diberikan pada hasil penelitian ini diantaranya :

1. Memberikan informasi mengenai cara membuat kolagen dari bahan kulit ikan nila hitam.

2. Memberikan informasi mengenai perlakuan yang optimal pada ekstraksi kolagen dengan menggunakan metode maserasi dan ekstraksi kolagen dengan metode fermentasi enzimatis, serta rendemen dan spesifikasi kolagen yang dihasilkannya.
3. Menerbitkan panduan ekstraksi kolagen dan diaplikasikan kepada pelaku UMKM.

1.5 Kerangka Pemikiran

Kolagen merupakan material yang mempunyai kekuatan rentang dan struktur yang berbentuk serat. Protein jenis ini banyak terdapat dalam vertebrata tingkat tinggi. Hampir sepertiga protein didalam tubuh vertebrata berada sebagai kolagen. Kolagen juga merupakan komponen utama dalam serat tulang, gigi, tulang rawan, lapisan kulit dalam, tendon, dan tulang rawan. Kolagen ada dalam semua organ yang menampilkan kekuatan dan kekakuan (Lehninger, 2010).

Ekstraksi kolagen dilakukan dengan perendaman dalam asam asetat yang dimodifikasi (Muyonga *et al.*, 2004).

Kulit hasil proses deproteinisasi dengan perendaman konsentrasi NaOH dicuci dengan aquades sampai mencapai pH netral sebelum dilanjutkan pada tahap kedua yaitu hidrolisis dengan perendaman kulit dalam larutan asam asetat.

Pada tahap ini digunakan tiga variasi konsentrasi asam asetat, yaitu 0,5 M; 1 M ; dan 1,5 M dengan lama waktu perendaman selama 18 jam, 21 jam dan 24 jam.

Menurut Nurhayati (2013), dalam penelitiannya mengenai ekstraksi dan karakterisasi kolagen larut asam dari kulit ikan nila (*oreochromis niloticus*)

menjelaskan bahwa ekstraksi kolagen yang dilakukan melalui perendaman dalam asam asetat dengan dua variasi konsentrasi yaitu 0,5 dan 1,5M.

Parameter yang diamati yaitu gugus fungsi, komposisi asam amino, suhu denaturasi, dan kemampuan mengembang kolagen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan asam asetat 0,5 M memiliki komposisi asam amino dan suhu denaturasi yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan asam asetat 1,5 M. Namun demikian, kolagen pada perlakuan asam asetat 1,5 M ternyata memiliki kemampuan mengembang lebih cepat (15 menit) dibandingkan perlakuan asam asetat 0,5 M (60 menit).

Waktu ekstraksi adalah salah satu parameter penting dalam proses ini. Terlalu singkat, kolagen belum sepenuhnya terlarut, namun jika terlalu lama, kolagen mungkin terdegradasi atau mengalami modifikasi struktural, yang berpotensi menurunkan kualitas atau bahkan mengurangi rendemen. (Blanco dkk, 2019).

Hasil kolagen tertinggi (19,18 mg/g) tercatat pada 36 jam namun perpanjangan periode ekstraksi mengakibatkan penurunan hasil, kemungkinan disebabkan oleh kerusakan kolagen, yang mungkin disebabkan oleh degradasi rantai kolagen yang disebabkan oleh asam asetat. Selama proses ekstraksi, peningkatan suhu menurunkan viskositas larutan, menyebabkan laju perpindahan massa yang lebih tinggi.

Menurut Blanco, dkk (2019), pada kolagen dari kulit dua spesies *teleost* dan dua spesies *Chondrichthyes* menunjukkan suhu denaturasi kolagen dalam kisaran 23 hingga 33 °C sementara kolagen yang diisolasi dari kulit ikan cod

mengalami denaturasi sekitar 16 °C, yang mungkin disebabkan oleh habitat spesies. Namun kolagen dari kulit ikan nila, lele, bawal, dan ikan kembung memerlukan suhu ekstraksi yang rendah (sedikit lebih rendah dari 13,26 °C), waktu ekstraksi yang lama (74 jam), dan menghasilkan rendemen sebesar 2,27% (berdasarkan kandungan massa kering).

Metode kimiawi (misalnya, menggunakan asam atau basa), metode enzimatik, dan metode fisik (misalnya, dengan menggunakan panas) masing-masing memiliki durasi optimal yang berbeda. Misalnya, ekstraksi menggunakan enzim mungkin membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan asam. (Latif Sahubawa, 2011).

Kolagen memiliki kelarutan yang berbeda pada pH yang berbeda. Biasanya, kolagen lebih larut pada pH asam. Ekstraksi kolagen sering dilakukan dalam kondisi asam (misalnya, menggunakan asam asetat) untuk meningkatkan kelarutan dan memudahkan ekstraksi. pH rendah memainkan peran penting dalam ekstraksi kolagen dari kulit ikan. pH optimal untuk ekstraksi kolagen berada pada rentang asam (pH 2-3), Menjaga pH dalam rentang optimal ini penting untuk memastikan rendemen kolagen yang tinggi dan kualitas kolagen yang baik. Kondisi pH yang terlalu rendah (di bawah pH 2) dapat menyebabkan denaturasi kolagen, sehingga mengurangi efisiensi ekstraksi. Kondisi pH yang ekstrim (terlalu asam atau terlalu basa) dapat menyebabkan denaturasi atau degradasi kolagen, yang dapat mengurangi rendemen. Oleh karena itu, penting untuk menjaga pH dalam rentang yang tidak merusak struktur kolagen selama proses ekstraksi. (Tan, Y, 2018).

Mengontrol pH selama proses ekstraksi kolagen ikan adalah esensial untuk memaksimalkan rendemen. Pemilihan pH yang tepat memungkinkan kelarutan optimal, mencegah denaturasi, dan memastikan aktivitas enzimatis yang efektif, semuanya berkontribusi pada peningkatan rendemen kolagen. (Tan, Y, 2018).

Berdasarkan penelitian Sembiring (2020) diketahui ini, diketahui bahwa derajat keasaman (pH) kolagen dari sampel kulit ikan tuna (A1) yaitu 3,74 lebih tinggi dibandingkan kolagen dari sampel gabungan kepala, tulang, dan ekor ikan tuna (A2) yaitu 3,23. Hasil Derajat keasaman (pH) kolagen dari kulit dan gabungan kepala, tulang, dan ekor ikan tuna tidak memenuhi bahkan lebih rendah dari standar mutu pH kolagen menurut SNI 8076:2014 yaitu 6,5-8.

Ekstraksi enzimatis pada prinsipnya sama dengan ekstraksi konvensional. Penggunaan enzim disini berfungsi untuk mengambil zat yang akan diekstrak, dengan demikian tidak diperlukan lagi pelarut khusus (*solvent*) dalam proses ekstraksi. Pelarut yang biasanya ditambahkan dalam ekstraksi enzimatis adalah air (Hartati, 2010).

Menurut Imama (2003), dalam penelitiannya mengenai Pengambilan minyak ikan bandeng (*Chanos-chanos*) menggunakan n-heksana dengan bantuan papain menjelaskan bahwa proses penambahan enzim dikontrol oleh pH, kadar enzim, dan temperatur. Papain merupakan enzim yang stabil, tahan terhadap perubahan pH dan suhu yang besar, memiliki pH optimum 5-7 dan suhu optimum 280C.

Kulit hasil proses deproteinisasi dengan perendaman konsentrasi NaOH dicuci dengan aquades sampai mencapai pH netral sebelum dilanjutkan pada

tahap kedua yaitu hidrolisis dengan perendaman kulit dalam larutan enzim papain.

Menurut Nurhayati (2013), ekstraksi kolagen melalui hidrolisis enzimatik (seperti papain) umumnya menghasilkan rendemen lebih tinggi dengan kerusakan struktur minimal dibandingkan metode asam. Pada ekstraksi enzimatis, konsentrasi enzim dan pH menjadi faktor kritis karena memengaruhi aktivitas katalitik enzim dan stabilitas kolagen.

Parameter yang diamati meliputi gugus fungsi, komposisi asam amino, suhu denaturasi, dan kemampuan mengembang kolagen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi papain 1% menghasilkan komposisi asam amino lebih lengkap, tetapi konsentrasi 2% mempercepat kemampuan mengembang kolagen (15 menit dengan 60 menit pada 1%) karena hidrolisis peptida lebih intensif.

Waktu ekstraksi tetap menjadi parameter kritis. Perendaman kurang dari 18 jam menyebabkan ekstraksi tidak sempurna, sementara lebih dari 24 jam berisiko menyebabkan denaturasi kolagen (Blanco *et al.* 2019). Hasil optimal (19,18 mg/g) dicapai pada 24 jam, tetapi perpanjangan waktu menurunkan rendemen akibat degradasi matriks kolagen oleh enzim.

Faktor pH pada ekstraksi enzimatis memiliki peran krusial. Berbeda dengan metode asam yang optimal pada pH 2–3, aktivitas papain maksimal pada pH 5–7 (Tan, 2018). Rentang pH 4–6 dalam penelitian ini dipilih untuk membandingkan pengaruh lingkungan asam lemah terhadap aktivitas enzim dan kelarutan kolagen. pH di bawah 4 dapat menurunkan aktivitas enzim, sementara pH di atas 6 mengurangi spesifisitas hidrolisis.

Suhu ekstraksi juga memengaruhi efisiensi: suhu rendah ($<15^{\circ}\text{C}$) menjaga stabilitas kolagen tetapi memperlambat reaksi, sedangkan suhu tinggi ($>30^{\circ}\text{C}$) berisiko denaturasi (Blanco *et al.*, 2019; Latif Sahubawa, 2011). Metode enzimatik umumnya memerlukan waktu lebih lama daripada metode asam, namun menghasilkan kolagen dengan kemurnian lebih tinggi (Latif Sahubawa, 2011).

Berdasarkan Sembiring (2020), pH kolagen hasil ekstraksi enzimatik cenderung lebih netral (6,0–7,5) dibandingkan metode asam (pH 3,2–3,7), sehingga lebih memenuhi standar SNI 8076:2014 (pH 6,5–8). Penggunaan papain diharapkan meningkatkan kualitas kolagen melalui hidrolisis spesifik tanpa merusak struktur tri-heliks.

Menurut penelitian Baehaki dkk. (2015) penggunaan enzim papain untuk menghidrolisis kolagen ikan patin. Dengan menggunakan Konsentrasi enzim papain 0% – 6%. Menunjukkan bahwa konsentrasi enzim papain sebesar 6% menghasilkan derajat hidrolisis sebesar 71,98%.

Menurut penelitian noorman (2016) dalam penelitiannya mengenai perbandingan produksi kolagen dari sisik dan tulang ikan gurami, hasil analisis kadar air menggunakan metode ekstraksi maserasi sebesar 9,09% sedangkan metode enzimatik sebesar 7,14%, hasil analisis kadar protein menggunakan metode maserasi sebesar 10,27% sedangkan metode enzimatik sebesar 12,43%, hasil derajat keasaman (pH) menggunakan metode maserasi sebesar 6 sedangkan metode enzimatik sebesar 6,5%, dan analisis rendemen menggunakan metode maserasi sebesar 4,27% sedangkan metode enzimatik sebesar 3,94%.

1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka pemikiran diatas, maka dapat diduga bahwa :

1. Diduga bahwa pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi asam asetat yang optimal akan dicapai dengan menggunakan ekstraksi maserasi metode *box behxen desain*.
2. Diduga bahwa pH ekstraksi, waktu fermentasi, dan konsentrasi enzim papain yang optimal akan dicapai dengan menggunakan ekstraksi enzimatis metode *box behxen desain*
3. Diduga dalam hasil yang maksimal dengan spesifikasi kolagen tertentu pada kondisi hasil penelitian.

1.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Program Studi Teknologi Pangan Universitas Pasundan Bandung, yaitu bertempat di Jl. Dr. Setiabudhi no. 193, Bandung, Jawa Barat.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Tinjauan pustaka ini akan menguraikan mengenai : Ikan Nila, Kolagen, Asam Asetat, Asam Amino, Ekstraksi, Regresi Linier Berganda, dan Enzim Papain.

2.1 Ikan Nila

Ikan nila merupakan nama yang diberikan berdasarkan ketetapan Direktur Jenderal Perikanan tahun 1972. Nama nila diambil dari nama spesies ikan tersebut yaitu *nilotica* dimana nama tersebut merupakan nama yang berasal dari daerah asal ikan tersebut yaitu Sungai Nil di Benua Afrika, yang kemudian diubah menjadi nila (Khairuman, 2012).

Ikan nila mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi, sehingga tepat untuk digunakan sebagai penyedia protein hewani yang murah dan mudah didapat. Dibandingkan dengan jenis ikan lainnya, ikan nila memiliki beberapa keunggulan, yaitu memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat dimana ikan nila dapat mencapai bobot 300-500g/ekor selama 6 bulan. Ikan nila juga mudah dibudidayakan, baik di air tawar maupun air payau. Ikan nila mempunyai sifat omnivora, sehingga dalam budidayanya sangat efisien, karena biaya pakannya rendah. Daging ikan nila juga cukup tebal dan tidak terdapat duri-duri halus sehingga mudah untuk dikonsumsi (Cahyono, 2010). Ikan nila biasanya oleh masyarakat diolah dengan cara digoreng, dibuat sup dan lain-lain (Nugroho, 2017).

Nila dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada lingkungan perairan dengan kadar *Dissolved Oxygen* (DO) antara 2,0 - 2,5 mg/l. Secara umum nilai pH air pada budidaya ikan nila antara 5 sampai 10 tetapi nilai pH optimum adalah berkisar 6 - 9. Ikan nila umumnya hidup di perairan tawar, seperti sungai, danau,

waduk, rawa, sawah dan saluran irigasi, memiliki toleransi terhadap salinitas sehingga ikan nila dapat hidup dan berkembang biak di perairan payau dengan salinitas 20 - 25‰ (Setyo, 2006). Jika dibandingkan dengan ikan mujair, ikan mas dan belut, ikan nila memiliki kandungan protein yang lebih tinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Kandungan Gizi Ikan

No	Jenis Ikan	Protein (%)	Lemak (%)	Air (%)
1	Ikan Nila	17,5	4,1	74,8
2	Ikan Mas	16,0	5,6	80,0
3	Ikan Mujair	14,9	2,0	80,0
4	Ikan Belut	14,0	27,0	58,0

(Sumber : Said, 2007)

Secara Ilmiah, ikan nila diklasifikasikan sebagai berikut :

Pada awalnya ikan nila masuk ke dalam jenis *Tilapia nilotica* atau ikan yang berasal dari golongan tilapia yang tidak mengerami larva atau telur dalam mulut induknya. Seiring dengan perkembangannya, akhirnya diketahui bahwa ikan nila mengerami telur dan larva hanya pada mulut induk betinanya saja sehingga para pakar memutuskan nama ilmiah yang sesuai untuk ikan ini adalah *Oreochromis niloticus*. Menurut Khairuman, 2012, Ikan nila mempunyai klasifikasi ilmiah sebagai berikut :

Filum	: <i>Chordata</i>
Subfilum	: <i>Vertebrata</i>
Kelas	: <i>Pisces</i>
Subkelas	: <i>Acanthopterygii</i>
Ordo	: <i>Percomorphi</i>
Subordo	: <i>Percaidae</i>
Famili	: <i>Cichlidae</i>

Genus	: <i>Oreochromis</i>
Spesies	: <i>Oreochromis niloticus</i> (nila hitam) : <i>Oreochromis sp.</i> (nila merah)
Nama Asing	: <i>Nile tilapia</i>
Nama Lokal	: Nila



Gambar 1. Ikan Nila Hitam
(Sumber : Google)

Kulit ikan nila umumnya terdiri dari dua lapisan utama yaitu epidermis dan dermis. Lapisan dermis merupakan jaringan pengikat yang cukup tebal dan mengandung sejumlah serat-serat kolagen (Taufiq *et al.*, 2015). Kulit ikan mengandung air 69,6%, protein 26,9%, abu 2,5% dan lemak 0,7%. Taufiq, (2015) menyatakan bahwa kira-kira 80% dari bahan kering kulit terdapat dari protein yang banyak macamnya serta sangat kompleks komposisinya. Protein pada kulit ikan dapat dibagi dalam dua golongan besar, yaitu (1) protein yang tergolong serat protein meliputi kolagen, keratin, dan elastin, (2) protein yang tergolong globular protein meliputi albumin dan globulin.

Tabel 2. Sifat Kulit Ikan Nila dan Tulang Ikan Nila

Sifat	Kulit Ikan Nila (Pranoto, 2005)	Tulang Ikan Nila (Haris, 2008)
Kadar air (%)	8,71	7,03
Protein	92,22	84,85
Lemak	1,96	1,63
Kadar Abu (%)	1,64	0,93
Kekuatan gel (bloom)	59,53	65,43-126,98
Viskositas (cPs)	8,00	4,80-6,00

Sumber : Hinterwaldner (1977)

2.2 Kolagen

Kolagen berasal dari bahasa Yunani yakni “*cola*” yang berarti lem (*glue*) dan “*genno*” yang berarti kelahiran (*birth*). Hal ini disebabkan karakteristik kolagen yang melekatkan sel untuk membentuk kerangka jaringan dan organ tubuh. (Asyiraf, 2011).

Kolagen adalah suatu jenis protein yang terdapat pada jaringan ikat. Protein ini mempunyai struktur heliks tripel dan terdiri dari 25% glisin dan 25% prolin dan hidroksi prolin, tetapi tidak mengandung sistein, sistin, dan triptofan (Poedjiadi, 2005). Kolagen juga merupakan komponen struktural utama jaringan ikat putih (*white connective tissue*) yang meliputi hampir 30% total protein pada tubuh. Hingga kini terdapat sekitar 25 tipe kolagen yang telah diidentifikasi, yaitu tipe I sampai XXV (Poedjiadi, 2005). Tipe kolagen yang teridentifikasi pada ikan hanya tipe I dan V (Nagai dan Suzuki, 2000).

Kolagen tipe I, II, dan III menyusun mayoritas konten kolagen tubuh. Dari ketiga protein, kolagen tipe I diyakini menjadi yang paling melimpah. Kolagen I dapat ditemukan dalam banyak struktur tubuh, termasuk tulang, kulit, dan *disk*

intervertebralis. Jenis kolagen umumnya digunakan dalam industri gelatin dan untuk penelitian. Kolagen tipe III, yang dapat ditemukan di kulit, otot, dan dinding usus, telah ditemukan untuk menjadi jenis yang paling melimpah kedua di tubuh. Hal ini sering dikaitkan erat dengan kolagen I. Hal ini karena jenis kolagen ini biasanya ditemukan di tempat yang sama dan mereka disintesis dengan cara yang sama. Tipe kolagen tersebut sering digabungkan untuk membentuk suplemen diambil untuk mempertahankan dan mempromosikan kulit yang sehat, tulang, dan otot (Kristy, 2014).

Kolagen tipe II secara jelas ditemukan di tulang rawan dan juga dalam vitreous humor. Jenis kolagen digunakan untuk pengobatan beberapa kondisi, termasuk radang sendi, selulit, dan keriput. bila digunakan untuk tujuan ini, sering dikonsumsi secara oral dalam bentuk kapsul. Kolagen V ditemukan didistribusikan di seluruh tubuh dan diyakini menjadi komponen sebagian besar atau semua jaringan ikat (Kristy, 2014).

Sumber kolagen yang paling banyak di pasaran umumnya berasal dari kulit dan tulang sapi ataupun babi. Kolagen dari sumber tersebut kurang sesuai dengan keyakinan agama tertentu (Pranoto, 2007), sehingga diperlukan alternatif sumber kolagen yang aman dan halal. Salah satu biota perairan yang berpotensi sebagai sumber kolagen adalah ikan. Kulit ikan yang merupakan hasil samping pengolahan filet ikan dari berbagai perusahaan industri pengolahan produk perikanan dianggap sebagai limbah, sehingga pemanfaatan kulit ikan sebagai sumber kolagen alternatif tidak hanya dapat mengurangi jumlah limbah industri pengolahan, tetapi sekaligus juga meningkatkan nilai tambah limbah tersebut.

Menurut Kristy (2014), menyatakan bahwa lebih dari 50 % protein ekstraseluler pada kulit merupakan kolagen.



Gambar 2. Serbuk Kolagen

(Sumber : Google)

Kolagen yang paling banyak dikenal adalah kolagen tipe I yang terdiri dari tiga rantai α polipeptida. Kolagen tipe I paling banyak terdapat pada bagian tubuh yang lunak seperti kulit dan tendon maupun bagian tubuh yang keras seperti tulang dan gigi serta jaringan penghubung (Cardoso dkk., 2014).

Tabel 3. Syarat Mutu Kolagen dari Kulit Ikan

No	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
1	Fisika		
	-Benda Asing	-	Tidak ada
2	Kimia		
	-Air	%	Maks.12
	-Abu	%	Maks. 1
	-Ph	-	6.5-8
	Logam Berat		
	-Arsen	mg/kg	Maks. 1
	-Kadmium	mg/kg	Maks. 0.1
	-Timbal	mg/kg	Maks. 0.4
	-Merkuri	mg/kg	Maks. 0.5
3	Mikrobiologi		
	- <i>Escherichia coli</i>	APM/gram	<3
	- <i>Salmonella</i>	Per 25 gram	Negatif

(Sumber : Standar Nasional Indonesia No : 8076:2014)

Kolagen dapat diaplikasikan pada industri makanan, kosmetik, biomedis dan industri farmasi. Pada kosmetik, kolagen digunakan untuk mengurangi keriput pada wajah atau dapat disuntikkan ke dalam kulit untuk menggantikan jaringan kulit yang telah hilang. Pada biomedis, kolagen digunakan sebagai sponges untuk luka bakar, benang bedah, agen hemostatik, penggantian atau substitusi pada pembuluh darah dan katup jantung tiruan. Pada industri farmasi kolagen digunakan sebagai *drug carrier* yaitu : *mini-pellet* dan *tablet* untuk penghantaran protein, formulasi gel pada kombinasi dengan liposom untuk sistem penghantaran terkontrol, bahan pengkontrol untuk penghantaran transdermal, dan nanopartikel untuk penghantaran gen (Lee *et al.*,2001).

2.3 Asam Asetat

Asam asetat, asam etanoat atau asam cuka adalah senyawa kimia asamorganik yang dikenal sebagai pemberi rasa asam dan aroma dalam makanan. Asam cuka memiliki rumus empiris $C_2H_4O_2$. Rumus ini seringkali ditulis dalam bentuk CH_3-COOH , CH_3COOH , atau CH_3CO_2H . Asam asetat murni (disebut asam asetat glasial) adalah cairan higroskopis tak berwarna, dan memiliki titik beku $16.7^\circ C$. Asam asetat merupakan salah satu asam karboksilat paling sederhana, setelah asam format. Larutan asam asetat dalam air merupakan sebuah asam lemah, artinya hanya terdisosiasi sebagian menjadi ion H^+ dan CH_3COO^- . Asam asetat merupakan pereaksi kimia dan bahan baku industri yang penting. Asam asetat digunakan dalam produksi polimer seperti polietilena tereftalat, selulosa asetat, dan polivinil asetat. Dalam industri makanan, asam asetat digunakan sebagai pengatur keasaman. Di rumah tangga, asam asetat encer

juga sering digunakan sebagai pelunak air. Dalam setahun, kebutuhan dunia akan asam asetat mencapai 6,5 juta ton per tahun. 1.5 juta ton per tahun diperoleh dari hasil daur ulang, sisanya diperoleh dari industri petrokimia maupun dari sumber hayati (Mela, 2014).

Asam asetat diproduksi secara sintesis maupun secara alami melalui fermentasi bakteri. Sekarang hanya 10% dari produksi asam asetat dihasilkan melalui jalur alami, namun kebanyakan hukum yang mengatur bahwa asam asetat yang terdapat dalam cuka haruslah berasal dari proses biologis. Dari asam asetat yang diproduksi oleh industri kimia, 75% diantaranya diproduksi melalui karbonilasi metanol. Sisanya dihasilkan melalui metode-metode alternatif.

Menurut Mela (2014) Asam asetat mempunyai sifat fisika dan kimia sebagai berikut :

Bentuk	Cairan
Warna	Tidak berwarna
Bau	Tajam
Nilai pH (50g/l H ₂ O)	(20oC) 2,5
Kekentalan Dinamik	(20oC) 1,22 mm ² /s
Kekentalan Kinematik	(20oC) 1,77
Titik lebur	(17oC)
Titik didih	116-118oC
Suhu penyalan	485oC
Titik nyala	39oC
Batas ledakan	Lebih rendah 4 Vol%, lebih tinggi 19,9 Vol%
Tekanan uap	(20oC) 1,54 hPa
Densitas	(20oC) 1,05 g/cm ³
Kelarutan dalam air	(20oC) Dapat larut

2.4 Asam Amino

Asam amino merupakan unit dasar struktur protein. Suatu asam amino α terdiri dari gugus amino, gugus karboksil, atom H dan gugus R tertentu, yang semuanya terikat pada atom karbon α . Atom karbon ini disebut α karena bersebelahan dengan gugus karboksil (asam). Gugus R menyatakan rantai samping (Stryer, 2000).

Berdasarkan polaritas gugus R, asam amino dibedakan menjadi 4 golongan yaitu (1) asam amino dengan gugus-R yang bersifat non polar, seperti alanin, leusin, isoleusin, valin, prolin, fenilalanin, triptopan, dan metionin, (2) asam amino dengan gugus –R polar tidak bermuatan, seperti serin, treonin, tirosin, asparagin, glutamin, sistein dan glisin, (3) asam amino dengan gugus –R bermuatan positif, seperti lisin, arginin, histidin, dan (4) asam amino dengan gugus –R bermuatan negatif, seperti asam aspartat dan asam glutamat (Sumarno, 2002)

Terdapat 20 macam asam amino yang digunakan dalam sintesis protein. Penamaan asam amino dapat disingkat menjadi tiga huruf atau satu huruf. Sebagian protein yaitu asam amino mengalami modifikasi setelah masuk menjadi bagian protein. Misalnya dalam kolagen, gugus hidroksil ditambahkan pada residu prolin sehingga menghasilkan residu hidroksiprolin (Ngili, 2013).

Asam amino merupakan senyawa amfoter, yakni memiliki gugus asam dan juga gugus basa. Karena itu, asam amino dapat membawa muatan listrik total yang tergantung pada sifat larutannya. Muatan yang dibawa suatu molekul mempengaruhi interaksinya dengan molekul lain. Sifat ini dimanfaatkan untuk isolasi dan pemurnian asam amino maupun protein (Ngili, 2013).

Glisin merupakan asam amino yang paling sederhana dan terdapat pada skleroprotein. Pada tahun 1820 Braconnot menemukan glisin dari hidrolisis protein. Prolin adalah asam amino heterosiklik yang dapat diperoleh dari hasil hidrolisis kasein. Kolagen banyak mengandung prolin dan hidroksiprolin (Poedjiadi, 2005).

Pada umumnya asam amino diperoleh sebagai hasil hidrolisis protein, baik menggunakan enzim maupun asam. Asam amino dengan cara ini diperoleh campuran bermacam-macam asam amino untuk menentukan jenis asam amino maupun kuantitas masing-masing asam amino perlu diadakan pemisahan antara asam-asam amino tersebut. Ada beberapa metode analisis asam amino, misalnya metode gravimetri, kalorimetri, mikrobiologi, kromatografi dan elektroforesis. Salah satu metode yang banyak memperoleh pengembangan adalah kromatografi. Macam macam kromatografi ialah kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi penukar ion (Poedjiadi, 2005).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut, pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyari tertentu. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian, hingga memenuhi baku yang

ditetapkan (Depkes RI 1995).

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan sifat tertentu, terutama kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda. Pada umumnya ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran, biasanya air dan yang lainnya pelarut organik. Bahan yang akan diekstrak biasanya berupa bahan kering yang telah dihancurkan, biasanya berbentuk bubuk atau simplisia (Sembiring, 2020).

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Bahan-bahan aktif seperti senyawa antimikroba dan antioksidan yang terdapat pada tumbuhan pada umumnya diekstrak dengan pelarut. Pada proses ekstraksi dengan pelarut, jumlah dan jenis senyawa yang masuk kedalam cairan pelarut sangat ditentukan oleh jenis pelarut yang digunakan dan meliputi dua fase yaitu fase pembilasan dan fase ekstraksi. Pada fase pembilasan, pelarut membilas komponen-komponen isi sel yang telah pecah pada proses penghancuran sebelumnya. Pada fase ekstraksi, mula-mula terjadi pembengkakan dinding sel dan pelonggaran kerangka selulosa dinding sel sehingga pori-pori dinding sel menjadi melebar yang menyebabkan pelarut dapat dengan mudah masuk kedalam sel. Bahan isi sel kemudian terlarut ke dalam pelarut sesuai dengan tingkat kelarutannya lalu berdifusi keluar akibat adanya gaya yang ditimbulkan karena perbedaan konsentrasi bahan terlarut yang terdapat di dalam dan di luar sel (Voigt, 1995).

Jenis Eksitraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Ekstraksi Maserasi, dan Ekstraksi Enzimatis.

1. Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut diam atau dengan adanya pengadukan beberapa kali pada suhu ruangan. Metoda ini dapat dilakukan dengan cara merendam bahan dengan sekali-sekali dilakukan pengadukan. Pada umumnya perendaman dilakukan selama 24 jam, kemudian pelarut diganti dengan pelarut baru. Maserasi juga dapat dilakukan dengan pengadukan secara sinambung (maserasi kinetik). Kelebihan dari metode ini yaitu efektif untuk senyawa yang tidak tahan panas (terdegradasi karena panas), peralatan yang digunakan relatif sederhana, murah, dan mudah didapat. Namun metode ini juga memiliki beberapa kelemahan yaitu waktu ekstraksi yang lama, membutuhkan pelarut dalam jumlah yang banyak, dan adanya kemungkinan bahwa senyawa tertentu tidak dapat diekstrak karena kelarutannya yang rendah pada suhu ruang (Sarker, S.D., *et al*, 2006).

2. Ekstraksi Enzimatis

Ekstraksi enzimatis adalah proses penggunaan enzim untuk memisahkan atau mengeluarkan komponen tertentu dari bahan alami, seperti tanaman, hewan, atau mikroorganisme. Enzim digunakan untuk mengkatalisis reaksi kimia yang memecah struktur kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana, sehingga memudahkan proses ekstraksi. Ekstraksi dengan menambahkan enzim adalah metode di mana enzim ditambahkan ke bahan yang akan diekstraksi untuk memecah struktur kompleks bahan tersebut. Enzim bertindak sebagai katalis yang mempercepat reaksi kimia tanpa dikonsumsi dalam proses tersebut. Proses ini

dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi, mengurangi waktu yang diperlukan, dan meningkatkan kualitas produk akhir. (Sarker, S.D., et al, 2006).

2.6 *Design Expert*

Design Expert merupakan salah satu perangkat lunak yang digunakan untuk menentukan formulasi optimal. Digunakan untuk mengoptimalkan produk atau proses dengan mempertimbangkan beberapa variabel yang mempengaruhi respons utama. Tujuannya adalah untuk mencapai optimalisasi respons tersebut. Program ini menyediakan beberapa pilihan desain dengan fungsi masing-masing. Berikut adalah beberapa jenis desain yang disediakan:

1. *Factorial*, digunakan untuk mengidentifikasi faktor-faktor penting yang mempengaruhi proses atau produk. Kemudian dapat dilakukan perbaikan.
2. *Respon Surface* (RSM), digunakan untuk pengaturan proses yang ideal sehingga akan dicapai kinerja yang optimal.
3. Teknik desain Campuran (*Mixture*) digunakan untuk menentukan atau menemukan formulasi yang optimal.
4. Gabungan desain (*Combined*) yaitu campurkan variabel proses, digunakan untuk menggabungkan variabel proses, komponen campuran dan faktor kategori dalam satu desain.

Pada penelitian ini menggunakan *Response Surface metode Box-Behnken Design*. *Response Surface Methodology* (RSM) adalah metode statistika yang berguna untuk mengembangkan, meningkatkan, dan mengoptimalkan proses, dimana respon dipengaruhi oleh beberapa faktor (variabel independent).

RSM dapat digunakan untuk menyelidiki dan memilih kondisi proses yang paling optimal (Prabudi, 2018). BBD dikembangkan oleh *Box* dan *Behnken* untuk percobaan orde dua.

BBD yang berbentuk bola ini efektif untuk proses optimasi dimana seluruh titik terluar memiliki jarak yang sama terhadap titik pusat, yaitu sebesar $\sqrt{2}$. Oleh karena itu, BBD tidak mengenal titik faktorial dan titik permukaan. Pengulangan sebanyak tiga atau empat kali perlu dilakukan pada titik pusat untuk menghitung *lack of fit* (Myers dkk., 2009).

Salah satu perbedaan BBD dengan CCD adalah pada BBD tidak ada axial/star runs pada rancangannya. Tidak adanya axial/star runs ini menyebabkan BBD lebih efisien dalam rancangan, karena melibatkan lebih sedikit unit percobaan. Pada CCD, jumlah percobaan 3 faktor adalah $14+N_c$, sedangkan pada BBD hanya $12+N_c$. N_c merupakan notasi dari number of centre point dimana merupakan kombinasi pada level 0-0-0. Hal ini menunjukkan bahwa BBD lebih ekonomis terutama dalam percobaan yang membutuhkan biaya tinggi (Myers, 2009). Jumlah percobaan untuk BBD hanya memerlukan tiga level di setiap faktornya, sedangkan CCD memerlukan lima level (Box dan Draper, 1987).

BBD dibentuk berdasarkan kombinasi rancangan 2^k dengan incomplete block design dan dengan menambahkan center run pada rancangannya (Montgomery, 2009). Rancangan BBD hanya dapat diterapkan pada percobaan yang memiliki minimal 3 faktor, dengan elemen penyusunnya adalah sebagai berikut: a. Rancangan 2^k faktorial incomplete block design, dimana k adalah banyaknya faktor, yaitu percobaan pada titik $(0, \pm 1, \dots, \pm 1)$, $(\pm 1, 0, \dots, \pm 1)$, $(\pm 1, \pm 1, \dots, 0)$. b.

Center runs (nc), yaitu percobaan pada titik pusat (0, 0..., 0), dimana jumlah center runs minimal 3 untuk berbagai jumlah faktor k.

2.7 Enzim Papain

Enzim adalah protein yang bertindak sebagai biokatalisator dalam reaksi kimia dalam sistem metabolisme. Dengan adanya enzim proses metabolisme dalam tubuh dapat berlangsung secara cepat. Buah pepaya termasuk buah tropis yang banyak ditanam karena selain rasanya enak juga mengandung banyak zat nutrisi yang penting bagi tubuh. Kandungan yang ada pada buah papaya tersebut yaitu air, karbohidrat, kalori yang rendah, dan vitamin terutama vitamin A dan C serta mineral kalium (K) yang cukup banyak. Pada bagian buah, daun dan batang pepaya terdapat getah putih yang mengandung enzim proteolitik atau enzim pemecah protein yang disebut enzim papain (Dominggus dkk, 2015). Selain mengandung enzim proteolitik, enzim papain di dalam getah papaya juga mengandung lebih dari 50 asam amino yaitu ada valine, isoleusin, leusin, tirosin, fenilalanin, histidin, lysin, asamaspartat, treonin, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, arginin, tritophan, dansistein (Permata, Deivy Andhika *et al*, 2016). Enzim papain adalah jenis enzim yang banyak manfaatnya dalam bidang industri seperti industri farmasi, industri kosmetik, tekstil, penyamakan kulit. Pemanfaatan papain dalam bidang industri memberikan banyak keuntungan, yaitu mudah untuk mendapatkannya, tersedia dalam jumlah yang banyak, tidak memiliki sifat toksik, tidak memiliki reaksi efek samping, jenis enzim yang cukup tahan terhadap suhu, dan bisa berfungsi dengan baik pada konsentrasi yang rendah (Risnawati, Metty & Cahyaningrum, Sari Edi, 2013).

Enzim papain berfungsi memecah protein pada makanan menjadi molekul yang lebih sederhana dengan cara menghidrolisis ikatan peptida oligopeptide pendek atau asam amino sehingga akan lebih mudah dicerna dan diserap oleh tubuh sehingga bias memperlancar metabolisme dalam tubuh (Anggraini, Ariditadan Yuniarta, 2015).

Aktifitas enzim dapat dilakukan dengan mengukur kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Dalam keadaan normal, kecepatan reaksi yang diukur sesuai dengan aktivitas enzim yang ada. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan absorban 0,001/menit pada kondisi optimumnya, berarti perubahan substrat dari suatu mikromolekul produk meningkatkan kenaikan absorban sebesar 0,001. Aktivitas spesifik dalam jumlah unit enzim per milligram protein atau suatu ukuran kemurnian enzim menjadi maksimum dan tetap jika enzim sudah berada dalam keadaan murni (Lidya dkk., 2000). Menurut Soedarmadji (2002) aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: konsentrasi substrat, pH, konsentrasi, suhu, lama inkubasi dan racun enzim.

Tabel 4. Komposisi kimia dari berbagai bagian *Carica papaya L*

Bagian	Komposisi Kimia
Buah	Protein, lemak, serat, karbohidrat, mineral, kalsium, fosfor, zat besi, vitamin C, tiamin, riboflavin, niacin, dan caroxene, asam amino, asam sitrat dan asam molat (buah-buahan hijau), senyawa volatil: linalol, benzylisothiocynate, cis dan trans 2, 6-dimethyl- 3,6 expoxy-7 octen-2-ol. Alkaloid, α ; carpaine, benzyl- β -d glucoside, 2-phenylethl- β -D-glucoside, 4-hydroxyl - phenyl-2ethyl-B-D glucosides dan empat isomeric malonated benzyl- β -D glucosides.
Biji	Asam lemak, protein mentah, serat mentah, minyak pepaya, karpain, benzylisothiocynate, benzylglucosinolate, glucotropacolin, benzylthiourea, hentriacontane, β -sistosterol, caricin dan enzimnyrosin.
Akar	Arposide dan enzim myrosin
Daun	Alkaloid carpain, pseudocarpain dan dehydrocarpaine I dan II, kolin, karposide, vitamin C dan E.
Kulit pohon	β -sitosterol, glukosa, fruktosa, sukrosa, galaktosa dan xylitol.
Getah	enzim proteolitik, papain dan chemopapain, glutamin cyclotransferase, chymopapain A, B dan C, peptidase A dan B dan lysozymes.

III. METODE PENELITIAN

Metode Penelitian akan menguraikan mengenai : Bahan – bahan yang digunakan, Alat – alat yang digunakan,, Metode Penelitian dan Prosedur Penelitian.

3.1 Bahan – Bahan Penelitian

3.1.1 Bahan Baku

Bahan baku utama yang digunakan adalah Kulit dari ikan nila (*Oreochromis niloticus L.*). Kulit ikan didapatkan dari hasil samping proses fillet ikan nila dengan bobot ikan nila sekitar 250 gram – 1 kilogram. Kulit ikan tidak hancur atau masih dalam keadaan utuh dan baik. Bahan baku utama didapatkan dari Pasar Pelelangan ikan di daerah Ciroyom Kabupaten bandung, dan enzim papain yang didapatkan di *marketplace*.

3.1.2 Bahan - Bahan Analisis

Bahan kimia yang digunakan untuk analisis adalah Sodium Hydroxide (NaOH), Asam asetat (CH₃COOH), Natrium klorida (NaCl), Asam klorida (HCl), Larutan TCA (*Trichloro Acetic Acid*) 30%, kjehdal, selenium black, batu didih, H₂SO₄, Na₂S₂O₃, granula Zn, dan Aquadest.

3.2 Alat – Alat Penelitian

3.3 Alat – alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Chiller*, pisau, gunting, dan wadah plastik.

3.3.1 Alat – Alat yang digunakan Analisis

Alat – alat yang digunakan untuk analisis adalah kain saring 100 *mesh*, spatula, *beaker glass* 500 dan 1000 ml, timbangan analitik, mesin *freeze-dryer*, *Buffer* (pH 4, pH 5, dan pH 6), dan pH meter, kaca arloji, oven, eksikator,

cawan, tangkrus, labu kjedahl, krem statif, labu Erlenmeyer dan Spektrofotometri.

3.4 Metode Penelitian

Metode Penelitian yang digunakan terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan yang dilakukan yaitu Uji tirosin yang bertujuan untuk membuat kurva standar dan akan digunakan untuk uji aktivitas enzim papain, prosedur pembuatan larutan standar tirosin yaitu dengan melarutkan 10 mg L-tirosin murni dalam 100 mL aquades hangat atau sedikit NaOH untuk membantu pelarutan, menghasilkan larutan stok 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, 2020), Sedangkan cara membuat kurva standar yaitu dengan mereaksikan larutan tirosin standar berbagai konsentrasi (0–100 µg/mL) dengan larutan Na₂CO₃ 2% dan reagen Folin–Ciocalteu, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm untuk memplot hubungan antara konsentrasi tirosin dan nilai absorbansi, kurva standar digunakan untuk mengkonversi nilai absorbansi sampel uji aktivitas enzim menjadi konsentrasi tirosin, sehingga aktivitas enzim (misalnya enzim tirosinase, protease, atau enzim lain yang menghasilkan tirosin sebagai produk) dapat dihitung berdasarkan laju produksi tirosin. (Worthington Biochemical Corporation, 2018)

Pembuatan larutan enzim papain dari tepung enzim papain powder dan uji aktivitas enzim yang bertujuan untuk mengetahui apakah enzim papain bisa digunakan dan mengukur kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis protein menjadi peptida dan asam amino. Metode yang digunakan yaitu menggunakan Metode spektrofotometri UV-Vis (Yusriah & Kuswyasari, 2013).

Untuk prosedur membuat larutan enzim papain yaitu dengan melarutkan 1 gram papain powder ke dalam 100 mL larutan buffer fosfat pH 7,0 untuk menghasilkan larutan papain 1% (b/v), kemudian dikocok hingga larut sempurna dan disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ untuk menjaga aktivitas enzim. (Sigma-Aldrich, 2021).

Uji aktivitas enzim papain pada produk kolagen yaitu bertujuan untuk mengetahui apakah kolagen yang dihasilkan masih mengandung enzim papain yang aktif, prosedur pengujiannya yaitu dilakukan dengan mencampurkan larutan kolagen dan larutan papain, diinkubasi pada suhu 37°C selama 30–60 menit, kemudian reaksi dihentikan dan diukur jumlah tirosin bebas yang dilepaskan menggunakan reagen Folin–Ciocalteu dan larutan Na_2CO_3 2%, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, lalu absorbansi diukur pada 750 nm.

2. Penelitian Utama

Penelitian utama yaitu pembuatan ekstrak kolagen dari kulit ikan nila hitam menggunakan metode maserasi dan metode enzimatis dengan konsentrasi yang beragam, dan untuk mengetahui optimasi konsentrasi asam asetat, pH, dan waktu dalam ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila hitam, tujuannya mengetahui konsentrasi asam asetat, pH, dan waktu ekstraksi yang optimal pada ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila hitam.

Mengetahui optimasi konsentrasi enzim papain, pH, dan waktu fermentasi dalam ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila hitam, tujuannya mengetahui konsentrasi enzim papain, pH, dan waktu fermentasi yang optimal pada ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila hitam.

Membandingkan rendemen dan spesifikasi kolagen yang dihasilkan, tujuannya untuk memilih metode yang paling tepat dalam ekstraksi kolagen dari kulit ikan nila hitam.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 3 faktor untuk setiap proses ekstraksi, baik ekstraksi maserasi maupun ekstraksi enzimatis.

Untuk faktor yang digunakan dalam penelitian ekstraksi metode maserasi yaitu pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi asam asetat, sedangkan untuk faktor yang digunakan dalam penelitian ekstraksi metode enzimatis yaitu pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi enzim papain.

Setelah menjadi serbuk kolagen yang dihasilkan kemudian dilakukan pengujian yang meliputi Rendemen Kolagen (Fahrul, 2005), Derajat keasaman (pH) (Safitri, 2014), Kadar Air dengan Metode Gravimetri (AOAC 925.10, 2003), Kadar Protein dengan Metode Kjeldhal (AOAC, 1995).

3.4.1 Rancangan Perlakuan

1. Identifikasi Variabel

1.1) Variabel penelitian (variabel bebas) terdiri dari pH ekstraksi, waktu ekstraksi (jam), dan konsentrasi asam asetat (M).

1.2) Variabel penelitian (variabel bebas) terdiri dari pH ekstraksi, waktu ekstraksi (jam), dan konsentrasi enzim papain (%).

2. Penetapan Batas Bawah Dan Batas Atas Ekstraksi Kolagen Metode Maserasi

Penetapan dilakukan dengan cara trial and error. Setelah dilakukan trial dan error, langkah awal pada penggunaan aplikasi *Design Expert* versi 13 metode RSM BBD, variabel yang telah ditentukan yaitu variabel bebas diinput kedalam

Design Expert pada RSM menu BBD pada kolom batas bawah (*low*) dan batas atas (*high*), serta dilakukan penentuan runs seperti yang dapat dilihat pada gambar 3 dan 4.

Box-Behnken Design

Each numeric factor is set to 3 levels. If categoric factors are added, the Box-Behnken design will be duplicated for every combination of the categoric factor levels. These designs have fewer runs than 3-Level Factorials.

Numeric factors: 3 (3 to 21) ☒ Horizontal
 Categoric factors: 0 (0 to 10) ☐ Vertical

	Name	Units	Low	High
A [Numeric]	pH Ekstraksi		4	6
B [Numeric]	Waktu Ekstra (Jam)		18	24
C [Numeric]	Konsentrasi # (Mol)		0.5	1.5

Blocks: 1
 Center points per block: 1 (0 to 1000) 13 Runs

Gambar 3. Metode *Box Behnken* Desain Ekstraksi Metode Maserasi

Menentukan metode analisa, pada penelitian ini menggunakan metode Box- Behnken Design (BBD). Lalu masukkan bawah dan batas atas dari masing-masing variabel bebas yaitu pH Ekstraksi dengan batas bawah pH 4 dan batas atas pH 6, waktu ekstraksi dengan batas bawah 18 jam, batas atas 24 jam, dan konsentrasi asam asetat (M) batas bawah 0.5 M, dan batas atas 1.5 M.

Box-Behnken Design

Responses: 4 (1 to 999) ☒ Horizontal
☐ Vertical

	Name	Units
	Kadar Rende	%
	Derajat Keas	pH
	Kadar Air	%
	Kadar Proteir	%

Gambar 4. Penentuan Respon

Menentukan respon yang akan dianalisa, yaitu respon Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein.

Std	Run	Factor 1 A:pH Ekstraksi	Factor 2 B:Waktu Ekstraksi (Jam)	Factor 3 C:Konsentrasi A...	Response 1 Kadar Rendemen (%)	Response 2 Derajat Keasam... pH	Response 3 Kadar Air (%)	Response 4 Kadar Protein (%)
10	1	6	21	0.5				
13	2	5	24	1.5				
7	3	5	21	1				
4	4	5	24	0.5				
3	5	5	18	1.5				
6	6	6	21	1.5				
1	7	6	24	1				
11	8	4	21	1.5				
8	9	4	18	1				
12	10	5	18	0.5				
5	11	6	18	1				
9	12	4	24	1				
2	13	4	21	0.5				

Gambar 5. Running RSM Ekstraksi Kolagen Metode Maserasi

Setelah menentukan model desain, menentukan batas bawah dan batas atas, dan menentukan respon, lalu dihasilkan 13 perlakuan yang akan digunakan ketika melakukan proses ekstraksi kolagen. Masing-masing dari *running* tersebut memiliki faktor pH Ekstraksi, Waktu Ekstraksi, dan konsentrasi asam asetat.

Pada kolom yang kosong masukkan hasil analisis meliputi rendemen kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air dan kadar protein. Proses selanjutnya melakukan analisis pada setiap respon dengan memilih menu untuk memulai analisis (*start analysis*).

3. Penentuan Batas Bawah Dan Batas Atas Ekstraksi Kolagen Metode Enzimatis

Penetapan dilakukan dengan cara trial and error. Setelah dilakukan trial dan error, langkah awal pada penggunaan aplikasi *Design Expert* versi 13 metode RSM BBD, variabel yang telah ditentukan yaitu variabel bebas diinput kedalam *Design Expert* pada RSM menu BBD pada kolom batas bawah (*low*) dan batas atas (*high*), serta dilakukan penentuan runs seperti yang dapat dilihat pada gambar 6 dan 7.

Box-Behnken Design

Each numeric factor is set to 3 levels. If categoric factors are added, the Box-Behnken design will be duplicated for every combination of the categoric factor levels. These designs have fewer runs than 3-Level Factorials.

Numeric factors: 3 (3 to 21) ☒ Horizontal

Categoric factors: 0 (0 to 10) ☐ Vertical

	Name	Units	Low	High
A [Numeric]	pH Ekstraksi		4	6
B [Numeric]	Waktu Ekstra (Jam)		18	24
C [Numeric]	Konsentrasi E (%)		1	2

Blocks: 1

Center points per block: 1 (0 to 1000) 13 Runs

Gambar 6. Metode *Box Behnken* Desain Ekstraksi Metode Enzimatis

Menentukan metode analisa, pada penelitian ini menggunakan metode Box- Behnken Design (BBD). Lalu masukkan bawah dan batas atas dari masing-masing variabel bebas yaitu pH Ekstraksi dengan batas bawah pH 4 dan batas atas pH 6, waktu fermentasi dengan batas bawah 18 jam, batas atas 24 jam, dan konsentrasi enzim papain (%) batas bawah 1%, dan batas atas 2%.

Box-Behnken Design

Responses: 4 (1 to 999) ☒ Horizontal

☐ Vertical

	Name	Units
	Kadar Rende	%
	Derajat Keas	pH
	Kadar Air	%
	Kadar Protein	%

Gambar 7. Penentuan Respon

Menentukan respon yang akan dianalisa, yaitu respon Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein.

Std	Run	Factor 1 Aph Ekstraksi	Factor 2 Waktu Ekstraksi (jam)	Factor 3 Konsentrasi Enzim Papain (%)	Response 1 Kadar Rendemen (%)	Response 2 Derajat Keasaman pH	Response 3 Kadar Air (%)	Response 4 Kadar Protein (%)
10	1	5	21	1,5				
13	2	6	18	1,5				
7	3	4	18	1,5				
4	4	5	18	1				
3	5	6	21	1				
6	6	4	24	1,5				
1	7	5	24	1				
11	8	5	18	2				
8	9	6	21	2				
12	10	5	24	2				
5	11	4	21	2				
9	12	6	24	1,5				
2	13	4	21	1				

Gambar 8. Running RSM Ekstraksi Kolagen Metode Enzimatis

Setelah menentukan model desain, menentukan batas bawah dan batas atas, dan menentukan respon, lalu dihasilkan 13 perlakuan yang akan digunakan ketika melakukan proses ekstraksi kolagen. Masing-masing dari *running* tersebut memiliki faktor pH Ekstraksi, Waktu Fermentasi, dan konsentrasi enzim papain.

Pada kolom yang kosong masukkan hasil analisis meliputi rendemen kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air dan kadar protein. Proses selanjutnya melakukan analisis pada setiap respon dengan memilih menu untuk memulai analisis (start analysis).

4. Rancangan Pelaksanaan Eksperimen

Penelitian dilakukan dengan rancangan sebagai berikut :

Variabel bebas untuk ekstraksi kolagen metode maserasi, terdiri dari :

Tabel 5. Batas Bawah dan Batas Atas pada Variabel bebas

EKSTRAKSI MASERASI		EKSTRAKSI ENZIMATIS	
pH ekstraksi	Batas bawah = pH 4	pH ekstraksi	Batas bawah = pH 4
	Batas atas = pH 6		Batas atas = pH 6
Waktu ekstraksi	Batas bawah = 18 Jam	Waktu Fermentasi	Batas bawah = 18 Jam
	Batas atas = 24 Jam		Batas atas = 24 Jam
Konsentrasi Asam asetat	Batas bawah = 0,5 M	Konsentrasi Enzim papain	Batas bawah = 1%
	Batas atas = 1,5 M		Batas atas = 2%

5. Kondisi Optimasi

Tahap optimasi bertujuan untuk proses penetapan *goals* dan nilai *importance*. Pada setiap respon harus disesuaikan tujuan (*goals*), apakah tujuan dari respon tersebut mencari nilai maksimum, minimum atau dalam batas tertentu (*in range*). Selain itu pada tahap ini juga harus menentukan nilai dari kepentingan (*importance*) yang memiliki rentan skala dari (+) hingga (+ + + + +).

Berikut merupakan tabel mengenai tujuan dan nilai kepentingan pada tahap optimasi kolagen yang diteliti yaitu metode ekstraksi maserasi dan ekstraksi metode enzimatis.

Tabel 6. *Goal dan Importance* Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Maserasi

Variabel/Respon	Goal	Importance
A= pH Ekstraksi	<i>Is In Range</i>	5 (+++++)
B= Waktu Ekstraksi	<i>Is In Range</i>	5 (+++++)
C= Konsentrasi Asam asetat	<i>Is In Range</i>	5 (+++++)
Rendemen Kolagen	<i>Maximize</i>	5 (+++++)
Derajat Keasaman (pH)	<i>Minimize</i>	3 (+++)
Kadar Air	<i>Minimize</i>	3 (+++)
Kadar Protein	<i>Maximize</i>	5 (+++++)

Tabel 7. *Goal dan Importance* Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Enzimatis

Variabel/Respon	Goal	Importance
A= pH Ekstraksi	<i>Is In Range</i>	5 (+++++)
B= Waktu Fermentasi	<i>Is In Range</i>	5 (+++++)
C= Konsentrasi enzim papain	<i>Is In Range</i>	5 (+++++)
Kadar Rendemen	<i>Maximize</i>	5 (+++++)
Derajat Keasaman (pH)	<i>Maximize</i>	5 (+++++)
Kadar Air	<i>Minimize</i>	3 (+++)
Kadar Protein	<i>Maximize</i>	5 (+++++)

Pada tahap optimasi, masing-masing respon ditentukan tujuan optimasinya dalam program *Design Expert*. Program ini akan melakukan optimasi sesuai data variabel dan data pengukuran respon yang dimasukkan.

Nilai *desirability* merupakan nilai fungsi tujuan optimasi yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang ditetapkan pada produk akhir. Kisaran nilainya dari 0 sampai 1,0. Nilai *desirability* yang semakin mendekati nilai 1,0 menunjukkan kemampuan program untuk menghasilkan produk yang dikehendaki semakin sempurna. Tujuan optimasi bukan untuk memperoleh nilai *desirability* 1,0, namun untuk mencari kondisi terbaik yang mempertemukan semua fungsi tujuan (Nurmiah, 2013).

6. Verifikasi

Tahap verifikasi bertujuan untuk validasi kesesuaian hasil data dengan hasil aktual dengan cara dilakukan verifikasi pada titik dengan nilai *desirability* tertinggi pada masing-masing variabel responnya. Verifikasi optimasi dilakukan dengan membandingkan hasil analisis respon optimasi apakah berkisar antara nilai *Confidence Interval* (CI) yang dapat mengatasi kesalahan acak dari banyaknya data dan *Prediction Interval* (PI) merupakan rentang ekspektasi hasil analisis respon berikutnya dengan kondisi yang sama. Kondisi paling optimal diverifikasi untuk membuktikan bahwa nilai respon aktual berada dalam kisaran nilai respon yang diprediksi program (Syahrul *et al.*, 2017). Pengujian untuk optimasi meliputi respon rendemen kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein.

3.4.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu menggunakan aplikasi perangkat lunak *Design Expert 13* menggunakan metode *Respons Surface Method* (RSM) dengan desain *Box-behnken Design* (BBD). *Box-behnken Design* (BBD)

tidak memiliki kombinasi untuk setiap faktor yang berada pada batas atas dan batas bawah secara bersamaan (Ferreira *et al.*, 2007).

Tahap rancangan percobaan menggunakan *Design Expert 13* dengan desain *Box-behnken Design* (BBD) diperoleh sebanyak 13 *run*. Berikut layout dari percobaan yang akan dilakukan.

Tabel 8. Layout Percobaan Pengacakan dengan *Respon Surface Method*

Run	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)
1	6	21	0,5
2	5	24	1,5
3	5	21	1
4	5	24	0,5
5	5	18	1,5
6	6	21	1,5
7	6	24	1
8	4	21	1,5
9	4	18	1
10	5	18	0,5
11	6	18	1
12	4	24	1
13	4	21	0,5

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel bebas yaitu pH ekstraksi, Waktu ekstraksi dan konsentrasi asam asetat. Variabel respon yang digunakan yaitu respon kimia (Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein). Pada variabel bebas terdapat batas bawah dan batas atas, variabel pH menggunakan batas bawah pH 4 dan batas atas pH 6, variabel Waktu ekstraksi menggunakan batas bawah 18 Jam dan batas atas 24 Jam, dan variabel konsentrasi Larutan menggunakan batas bawah 0,5 M dan batas atas 1,5 M.

Tabel 9. Layout Percobaan Pengacakan dengan *Respon Surface Method*

Run	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)
1	5	21	1,5
2	6	18	1,5
3	4	18	1,5
4	5	18	1
5	6	21	1
6	4	24	1,5
7	5	24	1
8	5	18	2
9	6	21	2
10	5	24	2
11	4	21	2
12	6	24	1,5
13	4	21	1

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel bebas yaitu waktu ekstraksi, pH, dan konsentrasi enzim papain. Variabel respon yang digunakan yaitu respon kimia (Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein).

Pada variabel bebas terdapat batas bawah dan batas atas, variabel waktu ekstraksi menggunakan batas bawah 18 jam dan batas atas 24 jam, variabel pH menggunakan batas bawah 4 dan batas atas pH 6, dan variabel konsentrasi enzim papain menggunakan batas bawah 1% dan batas atas 2%.

3.4.3 Rancangan Analisis

Data hasil analisis yang didapatkan menggunakan *software Design Expert 13* metode *Respon Surface Method* (RSM) dengan desain *Box-behnken Design* (BBD). Analisis yang digunakan yaitu analisis kuadratik. respon yang dihasilkan akan dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) satu persatu untuk mengetahui pengaruh pada masing-masing respon dengan taraf 5%. Signifikan atau *p-value* dianggap signifikan pada $p < 0,05$. Pemilihan model yang cocok

ditentukan dengan melihat *lack of fit*, di mana nilai $>0,005$ menunjukkan bahwa model tersebut dapat diterima sebagai kesesuaian yang baik untuk menemukan proses optimum (Octaviani, 2017).

Menurut Anderson dan Whitcomb (2017), proses desain dan analisa dengan RSM adalah sebagai berikut.

1. Merancang dan menjalankan eksperimen untuk menghasilkan data respon.
2. Sesuaikan data dengan berbagai model polinomial menggunakan regresi.
3. Melakukan Analysis of Variance (ANOVA) untuk mengevaluasi signifikansi statistik dan menguji *lack of fit* (LOF).
4. Memilih model paling sederhana yang memprediksi respon terbaik.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Ekstraksi Maserasi

Prosedur proses ekstraksi atau pembuatan kolagen dari kulit ikan nila hitam tanpa penambahan enzim (Ekstraksi Maserasi) :

1. Persiapan bahan bahan

Persiapan bahan baku meliputi persiapan bahan baku yaitu kulit ikan nila. Bahan baku disortir terlebih dahulu sesuai dengan keperluan, yaitu kulit ikan dalam keadaan baik dan segar yang dikemas dengan stereofom ukuran 20×15cm, kemudian dilakukan pencucian agar tidak ada benda lain masuk yang tidak diinginkan, untuk kulit ikan nila hanya dilakukan pencucian dengan air bersih.

2. Penambahan NaOH 0,1 M

Setelah kulit ikan nila dilakukan pencucian dan pembersihan selanjutnya kulit ikan nila ditambahkan NaOH 0,1 M yang bertujuan untuk untuk menghilangkan protein non-kolagen dan lemak dari kulit ikan. selanjutnya didiamkan selama 24 jam dengan suhu 4°C.

3. Penirisan

Setelah kulit ikan direndam dengan NaOH 0,1 M, maka selanjutnya kulit ikan nila dilakukan penirisan untuk memastikan semua residu NaOH terbuang. Hal ini penting untuk menghindari kontaminasi NaOH pada tahap selanjutnya.

4. Pencucian

Setelah dilakukan proses penirisan, maka selanjutnya kulit ikan nila dilakukan pencucian dengan air.

5. Ekstraksi

Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan asam asetat 0,5 M, 1 M, dan 1,5 M selama 18, 21 dan 24 jam, bertujuan untuk melarutkan kolagen dari jaringan kulit ikan. Asam asetat memecah ikatan non-kovalen dalam jaringan, sehingga kolagen dapat terlepas dan larut dalam larutan.

6. Penyaringan

Setelah dilakukan ekstraksi maka dilakukan penyaringan dengan kain kasa dengan mesh 100 selanjutnya akan didapatkan filtrat.

7. *Salting Out*

Setelah didapatkan filtrat maka selanjutnya filtrat tersebut dilakukan proses *salting out* menggunakan NaCl 0,9 M selama 24 jam, bertujuan untuk mengurangi kelarutan kolagen dalam larutan asam asetat, sehingga kolagen mengendap.

8. Penyaringan

Setelah dilakukan *salting out* selanjutnya disaring dengan kain kasa dengan ukuran mesh 100 dan akan didapatkan endapan kolagen.

9. Dialisis

Setelah dilakukan penyaringan maka dilakukan dialisis dengan asam asetat 0,1 M selama 24 jam, untuk membersihkan kolagen dari garam (NaCl) dan pengotor lainnya yang masih tersisa setelah proses *salting out* dan presipitasi.

10. Penirisan

Setelah dilakukan Dialisis selanjutnya dilakukan penirisan dengan

disaring menggunakan kain kasa dengan ukuran mesh 100

11. Presipitasi

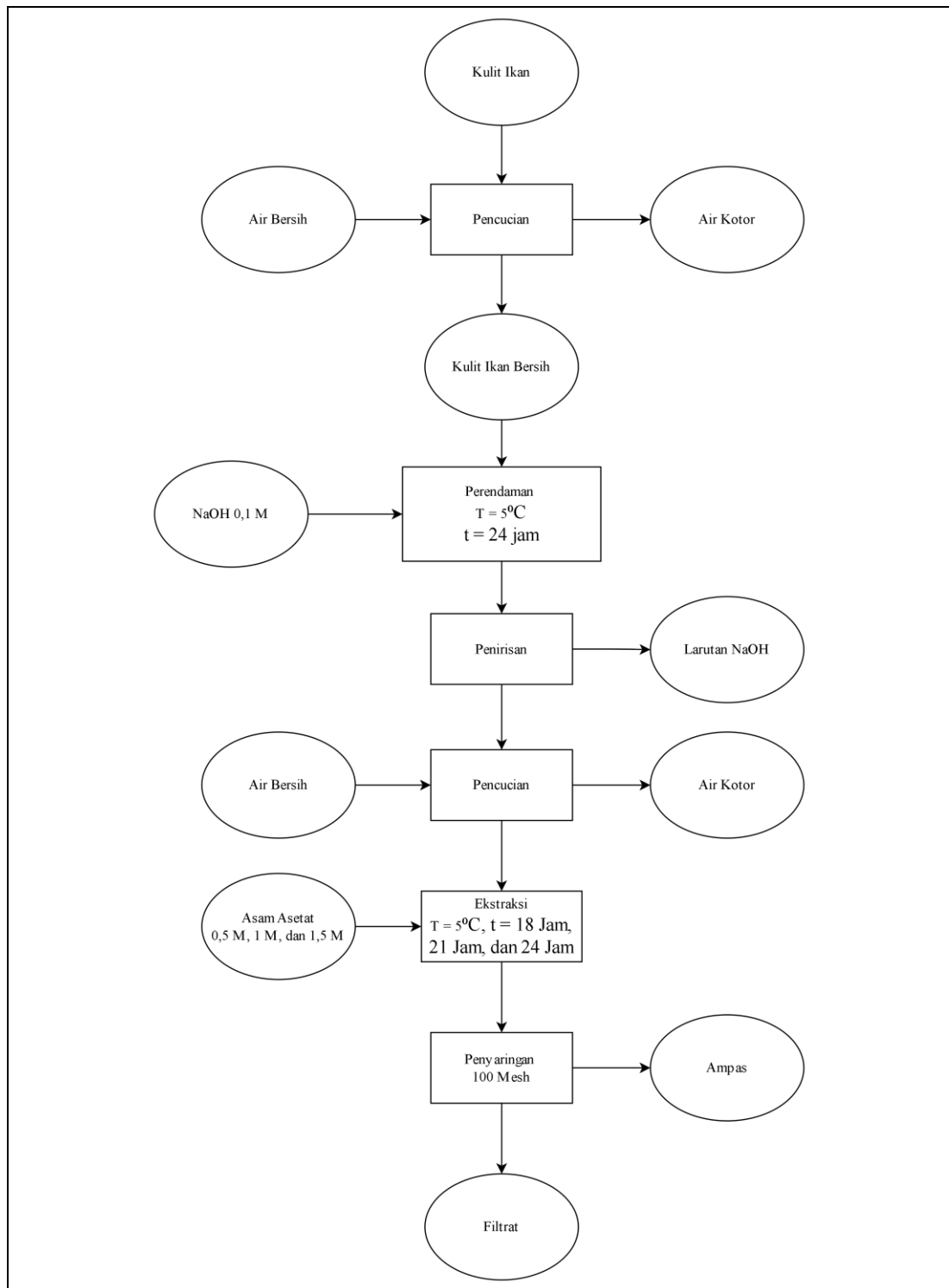
Selanjutkan proses Presipitasi dengan NaCl selama 24 jam dengan suhu 4°C untuk memastikan bahwa kolagen yang telah diendapkan sebelumnya benar-benar murni dan bebas dari pengotor.

12. Penirisan

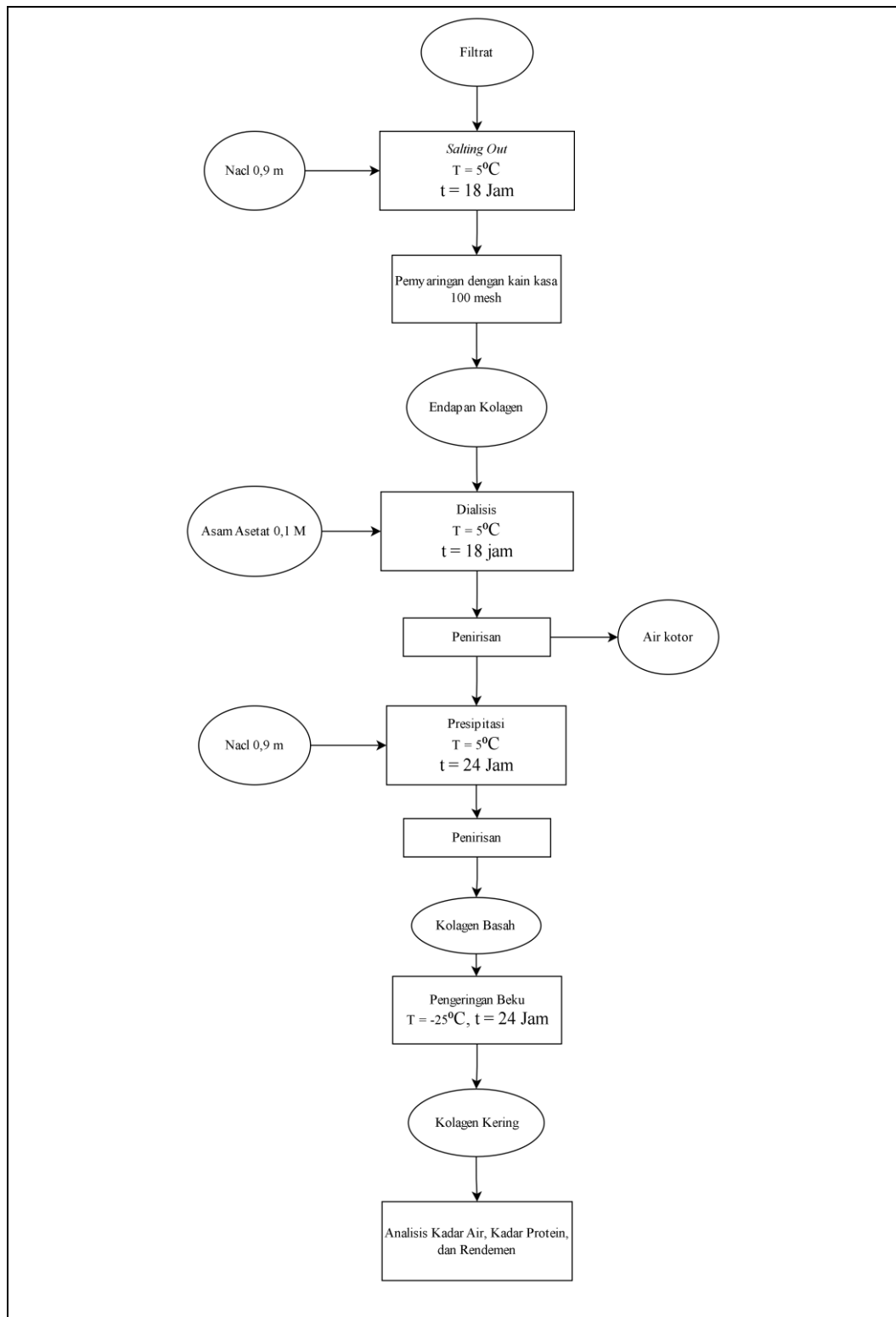
Setelah dilakukan presipitasi selanjutnya disaring dengan kain kasa dengan ukuran mesh 100 dan didapatkan kolagen basah.

13. Pengeringan Beku

Setelah didapatkan kolagen basah maka dilakukan pengeringan beku dengan *freeze dryer* selama ± 25 jam dengan tekanan 270 Pa sehingga kolagen basah akan menjadi kering dan menjadi serbuk kolagen. Setelah didapatkan kolagen kering kemudian dilakukan pengujian kimia yaitu pengujian kadar air, kadar protein, derajat keasaman (pH) dan rendemen kolagen.



Gambar 9. Diagram Alir Pembuatan Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Ekstraksi Maserasi



Gambar 10. Diagram Alir Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Maserasi

3.5.2 Prosedur Ekstraksi Enzimatis

Prosedur proses ekstraksi atau pembuatan kolagen dari kulit ikan nila hitam dengan tambahan enzim papain (Ekstraksi Enzimatis) :

1. Persiapan bahan bahan

Persiapan bahan baku meliputi persiapan bahan baku yaitu kulit ikan nila. Bahan baku disortir terlebih dahulu sesuai dengan keperluan, yaitu kulit ikan dalam keadaan baik, kemudian dilakukan pencucian agar tidak ada benda lain masuk yang tidak diinginkan, untuk kulit ikan nila hanya dilakukan pencucian dengan air bersih.

2. Penambahan NaOH 0,1 M

Setelah kulit ikan nila dilakukan pencucian dan pembersihan selanjutnya kulit ikan nila ditambahkan NaOH 0,1 M, selanjutnya didiamkan selama 24 jam dengan suhu 4°C dengan tujuan untuk menghilangkan protein non-kolagen (seperti albumin dan globulin) serta lemak dari kulit ikan. Konsentrasi 0,1 M dan waktu 24 jam dipilih untuk memastikan bahwa protein non-kolagen terdegradasi tanpa merusak struktur kolagen dan untuk mencegah denaturasi kolagen selama proses perendaman.

3. Penirisan

Setelah kulit ikan direndam dengan NaOH 0,1 M, maka selanjutnya kulit ikan nila dilakukan penirisan.

4. Pencucian

Setelah dilakukan penambahan NaOH 0,1 M, maka selanjutnya kulit ikan nila dilakukan pencucian dengan air.

5. Pengaturan pH

Setelah dicuci kemudian dilakukan perendaman dengan asam asetat dan mengatur pH dengan bantuan Buffer bertujuan agar pH nya tetap satbil yaitu di pH 4, pH 5 dan pH 6.

6. Ekstraksi

Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan enzim papain 1%, 1,5%, dan 2% selama 18, 21 dan 24 jam dengan tujuan untuk memecah ikatan peptida pada protein non-kolagen, sehingga kolagen dapat diekstraksi lebih efisien.

7. Penyaringan

Setelah dilakukan ekstraksi maka dilakukan penyaringan dengan kain kasa dengan mesh 100 selanjutnya akan didapatkan filtrat.

8. *Salting Out*

Setelah didapatkan filtrat maka selanjutnya filtrat tersebut dilakukan proses *salting out* menggunakan NaCl 0,9 M selama 24 jam dengan tujuan untuk mengendapkan kolagen dari larutan hasil ekstraksi enzimatik.

9. Penyaringan

Setelah dilakukan salting out selanjutnya disaring dengan kain kasa dengan ukuran mesh 100 dan akan didapatkan endapan kolagen

10. Dialisis

Setelah dilakukan penyaringan maka dilakukan dialisis dengan asam asetat 0,1 M selama 24 jam.

11. Penirisan

Setelah dilakukan Dialisis selanjutnya disaring dengan kain kasa dengan ukuran mesh 100.

12. Presipitasi

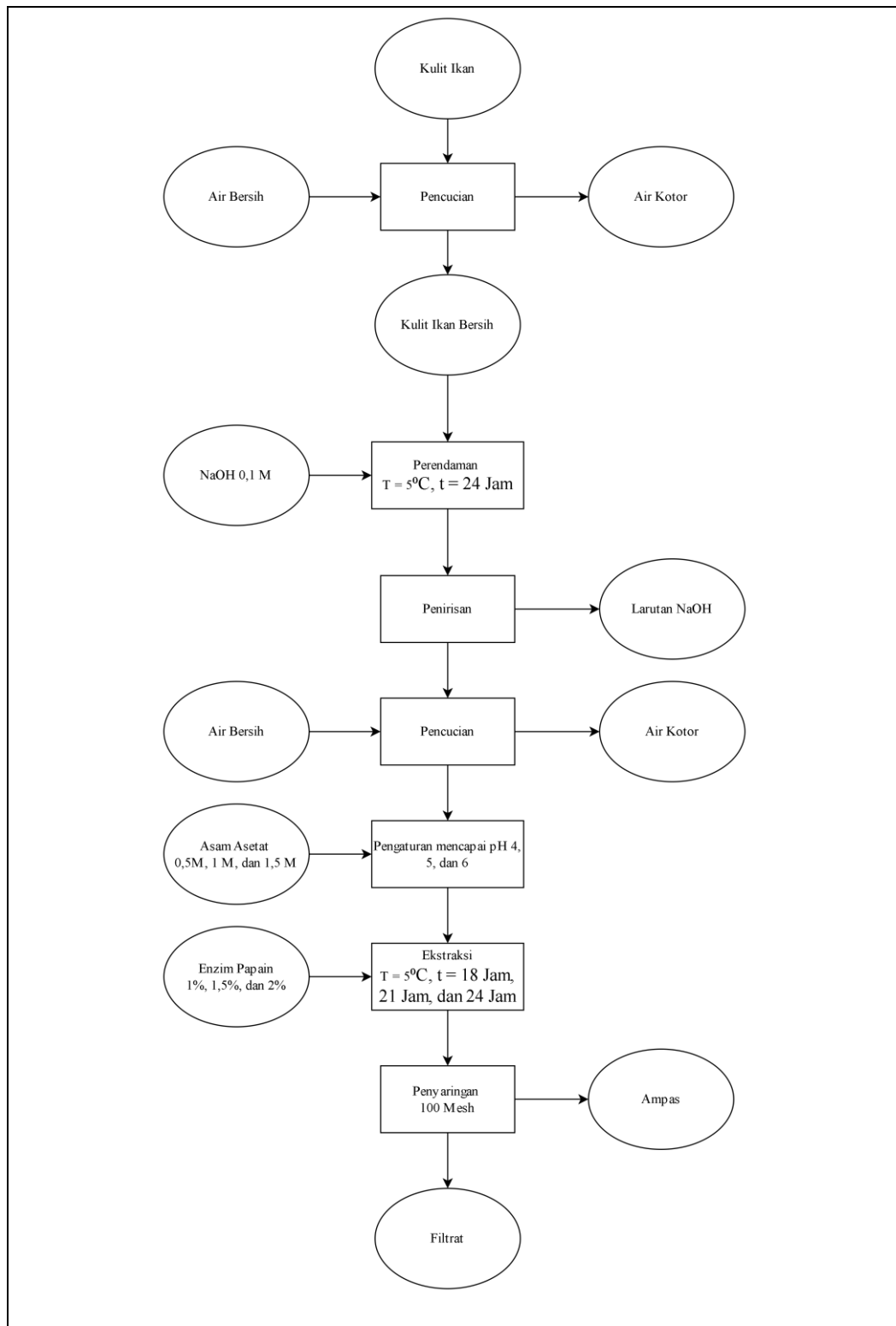
Presipitasi dengan NaCl selama 24 jam dengan suhu 4°C bertujuan untuk memurnikan kolagen lebih lanjut setelah proses dialisis. Pada tahap ini, kolagen sudah lebih murni, dan akan didapatkan kolagen basah.

13. Penirisan

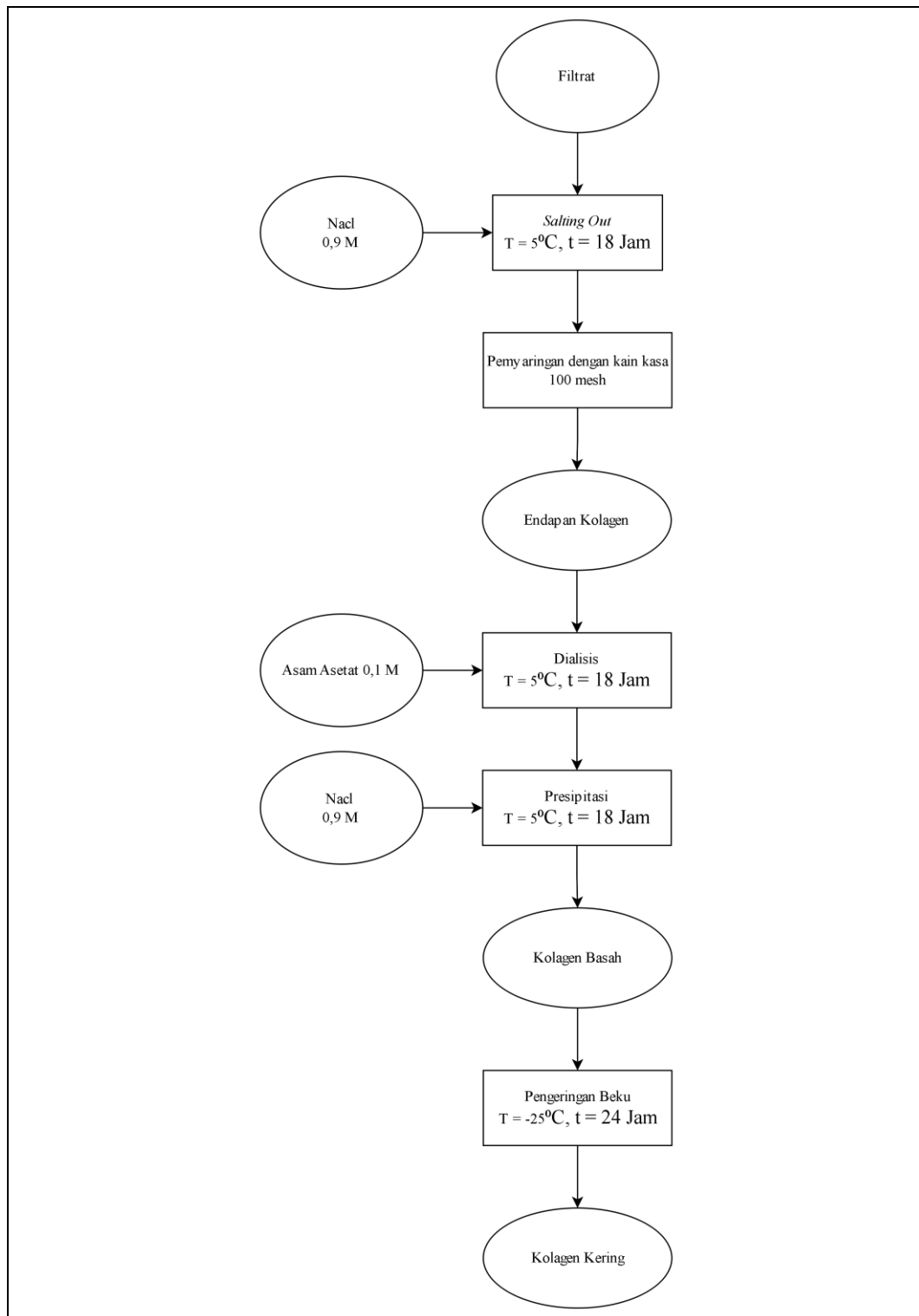
Setelah dilakukan presipitasi selanjutnya disaring dengan kain kasa dengan ukuran mesh 100 dan didapatkan kolagen basah.

14. Pengeringan Beku

Setelah didapatkan kolagen basah maka dilakukan pengeringan beku dengan *freeze dryer* selama ± 27 jam dengan tekanan 270 Pa sehingga kolagen basah akan menjadi kering dan menjadi serbuk kolagen. Setelah didapatkan kolagen kering kemudian dilakukan pengujian kimia yaitu pengujian kadar air, kadar protein, derajat keasaman (pH) dan rendemen kolagen.



Gambar 11. Diagram Alir Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Ekstraksi Enzimatis.



Gambar 12. Diagram Alir Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam Menggunakan Metode Ekstraksi Enzimatis.

Tabel 10. Uraian Kegiatan

[illegible]

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini akan menguraikan mengenai: (4.1) Penelitian Pendahuluan dan (4.2) Penelitian Utama.

4.1 Penelitian Pendahuluan

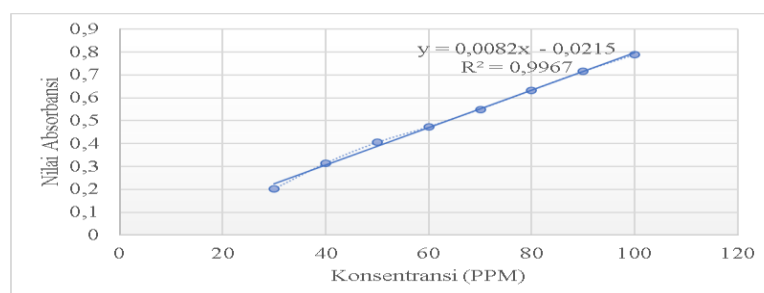
Penelitian pendahuluan yang dilakukan yaitu analisis aktivitas enzim papain yang bertujuan untuk mengukur kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis protein yang akan digunakan pada proses ekstraksi enzimatis, dan mengetahui apakah aktivitas enzimnya masih ada setelah menjadi produk kolagen.

4.1.1 Hasil Uji Tirosin Standar

Data absorbansi dari larutan standar tirosin dengan berbagai konsentrasi seperti pada Tabel 11 yang kemudian diplot kedalam regresi seperti pada Gambar 13 sehingga didapat persamaan:

Tabel 11. Absorbansi Larutan Tirosin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
30	0,202
40	0,314
50	0,405
60	0,473
70	0,550
80	0,633
90	0,715
100	0,788



Gambar 13. Kurva Larutan Tirosin Standar

Tirosin adalah asam amino yang digunakan sebagai larutan standar pada metode Murachi dalam menentukan besarnya aktivitas enzim. Hasil uji spektrum menggunakan larutan standar tirosin dengan deret standar 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm dan 100 ppm didapatkan persamaan regresi yaitu $y = 0,0082x - 0,0215$.

Menurut Herawati (2020), pemilihan tirosin sebagai larutan standar karena tirosin merupakan salah satu asam amino hasil produk hidrolisis protein. Larutan standar tirosin digunakan untuk mengukur aktivitas enzim protease dalam memecah protein menjadi asam amino penyusunnya. Kurva standar yang sudah diperoleh, selanjutnya digunakan untuk menguji aktivitas enzim papain.

4.1.2 Hasil Uji Aktivitas Enzim Papain Murni Powder

Tabel 12. Aktivitas Enzim Papain Murni Powder

Absorbansi	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
0,494	85,506 ($\pm 1,46$)

Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim papain 1000 ppm didapatkan hasil sebesar 85,506 Unit/mL. Menurut Rini (2022) dari uji aktivitas yang diukur pada papain isolat dan papain pabrikan, maka diperoleh nilai masing-masing sebesar $1,018 \times 10^5$ U/mL dan $0,826 \times 10^5$ U/mL. Dengan demikian aktivitas yang ditunjukkan oleh papain isolat lebih tinggi daripada aktivitas yang ditunjukkan oleh papain pabrikan. Makin tinggi aktivitas papain makin baik untuk hidrolisis protein.

4.1.3 Hasil Uji Aktivitas Enzim Papain Pada Produk Kolagen

Analisis aktivitas enzim papain produk kolagen dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Setelah dilakukan perhitungan sesuai dengan rumus aktivitas enzim didapatkan hasil analisis aktivitas enzim papain produk kolagen.

Berikut merupakan hasil analisis uji aktivitas enzim papain hasil fermentasi.

Tabel 13. Aktivitas Enzim Papain Produk

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
1	5	21	1,5	14,86 ($\pm 0,44$)
2	6	18	1,5	13,895 ($\pm 1,12$)
3	4	18	1,5	10,37 ($\pm 2,14$)
4	5	18	1	10,69 ($\pm 0,28$)
5	6	21	1	10,225 ($\pm 0,54$)
6	4	24	1,5	8,045 ($\pm 0,23$)
7	5	24	1	19,703 ($\pm 0,63$)
8	5	18	2	8,962 ($\pm 0,82$)
9	6	21	2	18,5 ($\pm 0,30$)
10	5	24	2	10,945 ($\pm 0,64$)
11	4	21	2	12,12 ($\pm 1,40$)
12	6	24	1,5	21,805 ($\pm 1,75$)
13	4	21	1	15,48 ($\pm 1,54$)

Berdasarkan Tabel 13. didapatkan aktivitas enzim paling kecil pada konsentrasi 1,5% atau pada *Run* 6 memiliki nilai aktivitas enzim yaitu sebesar 8,045 Unit/mL dan pada konsentrasi 1,5% atau pada *Run* 12 memiliki nilai aktivitas enzim paling tinggi yaitu sebesar 21,805 Unit/mL.

Menurut penelitian Kezia *et al.* (2017) melaporkan aktivitas papain 5.2 Unit/mL pada pH 4 dan suhu 25°C. Rendahnya aktivitas disebabkan oleh denaturasi enzim pada pH asam, di mana struktur enzim terganggu tidak stabil. Sedangkan menurut penelitian El Moussaoui *et al.* (2019) menemukan aktivitas 6.8 Unit/mL pada pH 4.5. Penurunan ini diakibatkan oleh inhibitor

alami dalam lateks pepaya yang aktif pada pH asam. Aktivitas Run 6 (8.045 Unit/mL) lebih tinggi dibanding studi di atas karena perbedaan sumber enzim (bubuk vs lateks segar) dan metode ekstraksi.

Aktivitas Run 12 mendekati nilai optimal. Perbedaan kecil disebabkan oleh jenis substrat dan kemurnian enzim. Penelitian Muthulakshmi *et al.* (2012) melaporkan aktivitas 18.7 Unit/mL pada pH 6. Nilai lebih rendah karena konsentrasi enzim 1% yang tidak optimal. Sedangkan menurut penelitian Anggraini *et al.* (2015) mencapai aktivitas 25.3 Unit/mL pada pH 6.5 dan waktu 20 jam.

Disimpulkan bahwa kualitas papain ditentukan oleh tinggi rendahnya aktivitas proteasenya (papain) yang dimilikinya, semakin tinggi aktivitas proteasenya semakin tinggi pula kualitasnya dan sebaliknya, semakin rendah aktivitas proteasenya (papain) semakin rendah kualitasnya (Widjaja, 1977).

4.2 Penelitian Utama

4.2.1 Optimasi Ekstraksi Kolagen Metode Maserasi

4.2.1.1 Identifikasi Variabel

Penetapan variabel penelitian (variabel bebas) mengacu pada penelitian noorman (2016), pada penelitiannya menggunakan variable bebas yang terdiri dari pH ekstraksi, waktu ekstraksi (jam), dan konsentrasi asam asetat (M).

4.2.1.2 Penentuan Batas Bawah Dan Batas Atas (Rentang Variabel) Ekstraksi Kolagen Metode Maserasi

1) Penentuan Batas Bawah dan Batas Atas pH Ekstraksi

Batas bawah pH ditetapkan 4, karena menurut penelitian Liu *et al.* (2015), kolagen memiliki stabilitas optimal pada pH (4–6), pH dibawah 4 akan menyebabkan denaturasi, menyebabkan kerusakan pada struktur kolagen dan

mengurangi kualitasnya. Batas Atas pH ditetapkan 6, karena apabila pH diatas 6, menurut penelitian Kittiphattanabawon *et al.* (2010), Pada pH netral atau basa, kolagen menjadi kurang larut, sehingga yield ekstraksi menurun dan kolagen menjadi kurang stabil.

2) Penentuan Batas Bawah dan Batas Atas Waktu Ekstraksi

Batas bawah waktu ekstraksi ditetapkan 18 jam. Waktu ekstraksi yang lama (18–24 jam) diperlukan untuk memastikan kolagen terlarut sempurna dari jaringan kulit ikan. Waktu ekstraksi dibawah 18 jam, menurut Sinthusamran *et al.* (2014) waktu ekstraksi yang lebih singkat menghasilkan yield kolagen yang lebih rendah karena proses pelarutan belum optimal. Batas Atas Waktu Ekstraksi ditetapkan 24 jam, karena apabila lebih dari 24 Jam menurut Nalinanon *et al.* (2007) waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat menyebabkan hidrolisis berlebihan, mengurangi kualitas kolagen.

3) Penentuan Batas Bawah dan Batas Atas Konsentrasi Asam Asetat

Batas bawah konsentrasi asam asetat ditetapkan 0,5 M. Menurut penelitian Zhang *et al.* (2016) konsentrasi asam asetat 0.5–1.5 M optimal untuk ekstraksi kolagen tanpa menyebabkan denaturasi yang signifikan, dan karena kemampuannya melarutkan kolagen tanpa merusak struktur triple helix-nya. Konsentrasi dibawah 0,5 M, menurut penelitian Zhang *et al.* (2016) tidak efektif dalam melarutkan kolagen dari jaringan kulit. Batas Atas Konsentrasi Asam asetat ditetapkan 1,5 M, karena apabila konsentrasi diatas 1,5 M, menurut penelitian Liu *et al.* (2015), dapat menyebabkan denaturasi kolagen, merusak struktur triple helix-nya, dan mengurangi kualitas kolagen.

4.2.1.3 Rancangan Pelaksanaan Eksperimen

Variabel bebas untuk ekstraksi kolagen metode maserasi, terdiri dari :

Tabel 14. Batas Bawah dan Batas Atas pada Variabel bebas

No	Variabel atau Faktor	Batas Bawah	Batas Atas
1	pH Ekstraksi	4	6
2	Waktu Ekstraksi (Jam)	18	24
3	Konsentrasi Asam Asetat (M)	0,5	1,5

4.2.1.4 Hasil Analisis Respon

Respon yang telah dianalisis meliputi rendemen kolagen, Derajat Keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein.

4.2.1.4.1 Rendemen Kolagen

Tabel 15. Hasil Analisis Rendemen kolagen:

Run	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Rendemen %
1	6	21	0,5	14,02
2	5	24	1,5	12,98
3	5	21	1	13,68
4	5	24	0,5	13,56
5	5	18	1,5	12,68
6	6	21	1,5	12,32
7	6	24	1	13,77
8	4	21	1,5	13,22
9	4	18	1	12,47
10	5	18	0,5	12,49
11	6	18	1	12,33
12	4	24	1	14,48
13	4	21	0,5	13,22

Berdasarkan hasil analisis Rendemen Kolagen diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan Rendemen Kolagen terendah sebesar 12,32% pada Run 6 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 6, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 21 jam, dan konsentrasi asam asetat yaitu 1,5 M, sedangkan Rendemen

Kolagen tertinggi sebesar 14,48% pada *Run* 12 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 4, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 24 jam, dan konsentrasi asam asetat yaitu 1 M.

Rendemen kolagen diperoleh dari perbandingan berat kering kolagen dengan berat bahan atau sampel awal (Astiana., 2016).

Rendemen yang tinggi terjadi karena kombinasi kondisi optimal seperti pH rendah (pH 4), waktu ekstraksi panjang (24 jam), dan konsentrasi asam asetat sedang (1 M). pH yang rendah menciptakan lingkungan asam yang membantu memutuskan ikatan silang pada struktur jaringan kolagen, sehingga kolagen lebih mudah larut (Zhang *et al.*, 2007). Selain itu, waktu ekstraksi yang cukup panjang memberikan kesempatan maksimal bagi kolagen untuk terekstrak, sementara konsentrasi asam asetat 1 M terbukti cukup kuat untuk melarutkan kolagen tanpa merusak strukturnya secara berlebihan (Nalinanon *et al.*, 2007).

Sebaliknya, rendemen yang rendah, terjadi karena kombinasi kondisi yang kurang optimal, yaitu pH terlalu tinggi (pH 6) dan konsentrasi asam asetat terlalu kuat (1,5 M). Pada pH tinggi, stabilitas struktur triple helix kolagen meningkat, sehingga kolagen sulit larut dalam pelarut (Muyonga *et al.*, 2004). Di sisi lain, konsentrasi asam yang terlalu tinggi justru dapat menyebabkan denaturasi dan fragmentasi kolagen menjadi potongan kecil yang tidak tertangkap saat pengeringan, sehingga menurunkan rendemen (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005).

Tabel 16. Anova Analisis Rendemen Kolagen

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	3.56	3	1.19	4.63	0.0319	significant
A-pH Ekstraksi	0.1128	1	0.1128	0.4396	0.5239	
B-Waktu Ekstraksi	2.90	1	2.90	11.32	0.0083	
C-Konsentrasi Asam Asetat	0.5460	1	0.5460	2.13	0.1787	
Residual	2.31	9	0.2566			
Cor Total	5.87	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh *Design Expert* versi 13 untuk respon rendemen kolagen adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,0319. Artinya formulasi yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon Rendemen Kolagen.

Berdasarkan hasil analisis varians (ANOVA) yang ditampilkan pada Tabel 16, diketahui bahwa model regresi yang dibentuk dari faktor-faktor pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi asam asetat secara keseluruhan signifikan terhadap respon yang diamati, dengan nilai F sebesar 4,63 dan p-value sebesar 0,0319 ($< 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa model layak digunakan untuk menjelaskan hubungan antara variabel bebas dengan respon.

Dari ketiga faktor yang diuji, faktor waktu ekstraksi (B) menunjukkan pengaruh yang paling signifikan terhadap respon, dengan nilai F sebesar 11,32 dan p-value sebesar 0,0083, yang jauh di bawah batas signifikansi 0,05. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan waktu ekstraksi memberikan dampak nyata terhadap hasil respon, seperti rendemen atau kualitas kolagen yang dihasilkan.

Sementara itu, faktor pH ekstraksi (A) dan konsentrasi asam asetat (C) menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan, dengan p-value masing-masing sebesar 0,5239 dan 0,1787. Artinya, secara statistik, perubahan pada pH larutan

ekstraksi dan konsentrasi asam asetat tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap respon yang diamati dalam kondisi dan rentang yang digunakan pada penelitian ini.

Nilai Residual (kesalahan) sebesar 2,31 dengan mean square residual sebesar 0,2566 menunjukkan besarnya variasi data yang tidak dapat dijelaskan oleh model. Adapun total variasi (Cor Total) sebesar 5,87 menunjukkan bahwa model telah mampu menjelaskan sebagian besar variasi yang terjadi, terutama dari kontribusi waktu ekstraksi.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa model regresi yang dibentuk memiliki validitas yang cukup baik, dan waktu ekstraksi merupakan faktor dominan yang secara signifikan mempengaruhi hasil, sedangkan pH dan konsentrasi asam asetat tidak berpengaruh signifikan secara individual.

Tabel 17. Hasil *Fit Statistic* Rendemen Kolagen

	Std. Dev.	0.5066		R²	0.6067
	Mean	13.17		Adjusted R²	0.4756
	C.V. %	3.85		Predicted R²	0.1775
				Adeq Precision	6.1477

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukkan nilai R² sebesar 0,6067. Nilai adjusted R² sebesar 0,4756 dan predicted R² sebesar 0,1775 maka selisih perbedaanya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 6,1477 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 18. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	13.17	1	0.1405	12.85	13.49	
	A-pH Ekstraksi	-0.1188	1	0.1791	-0.5239	0.2864	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	0.6025	1	0.1791	0.1973	1.01	1.0000
	C-Konsentrasi Asam Asetat	-0.2612	1	0.1791	-0.6664	0.1439	1.0000

Persamaan model matematika untuk analisis respon Rendemen Kolagen merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 13,17 - (A)0,1188 + (B)0,6025 - (C)0,2612$$

Tabel 19. Hasil Persamaan Keakuratan yang Dihasilkan

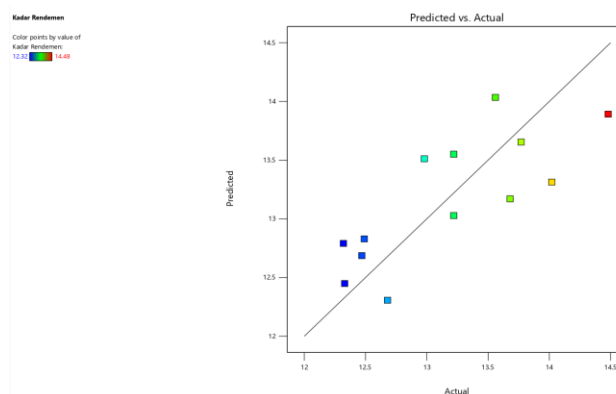
Run	Faktor I Ph Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Rendemen %	Persamaan Keakuratan Yang Dihasilkan
1	6	21	0,5	14,02	13,23
2	5	24	1,5	12,98	14,66
3	5	21	1	13,68	12,99
4	5	24	0,5	13,56	14,92
5	5	18	1,5	12,68	11,05
6	6	21	1,5	12,32	12,97
7	6	24	1	13,77	14,91
8	4	21	1,5	13,22	12,74
9	4	18	1	12,47	11,06
10	5	18	0,5	12,49	11,31
11	6	18	1	12,33	11,30
12	4	24	1	14,48	14,67
13	4	21	0,5	13,22	13,00

Setelah diterapkan persamaan ini maka run 1 berdasarkan persamaan rendemen kolagen 14,02, persamaan keakuratannya 13,23, run 2 berdasarkan persamaan rendemen kolagen 12,98, persamaan keakuratannya 14,66, run 3 berdasarkan persamaan 13,68, persamaan keakuratannya 12,99.

Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) -0,1188, Komponen B (waktu Ekstraksi) 0,6025, Komponen C

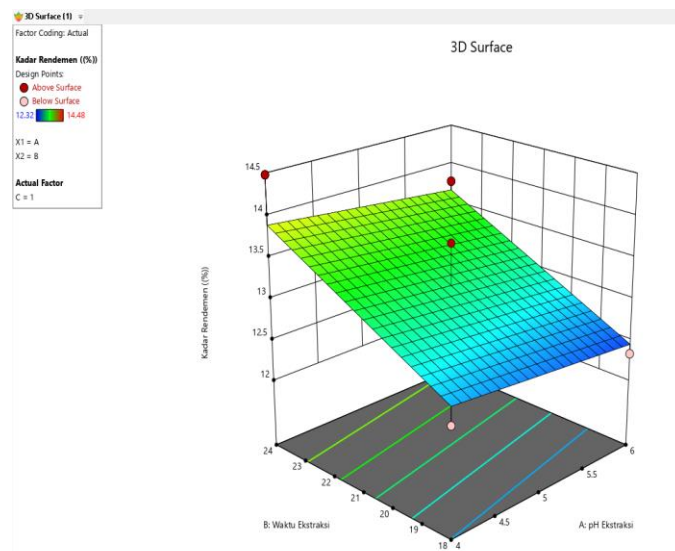
(Konsentrasi Asam Asetat) $-0,2612$, berpengaruh terhadap respon Rendemen Kolagen. Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis Rendemen Kolagen pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien B (Waktu Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi B memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar $0,6025$ apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Untuk melihat perbedaan antara data aktual formulasi dengan nilai prediksi yang didapatkan dari tabel ANOVA dapat dilihat pada Grafik *internally studentized residual* dari respons Rendemen Kolagen pada gambar 14 berikut:



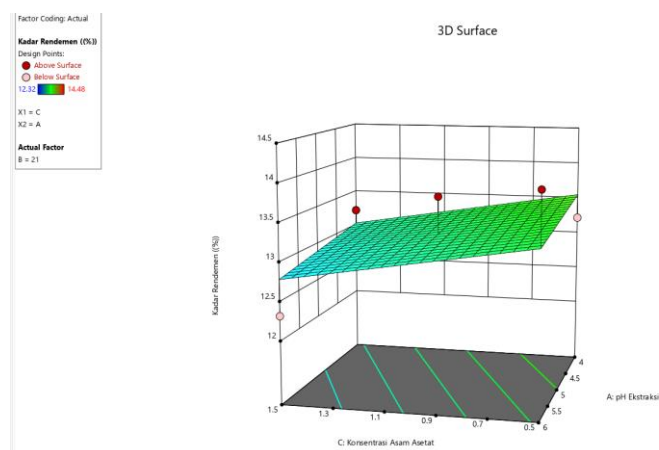
Gambar 14. Grafik Kenormalan *Internally Studentized Residuals* Rendemen

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 optimasi setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 15. Grafik 3D *Surface* Respon Rendemen Kolagen

Berdasarkan grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap Rendemen Kolagen. Permukaan berwarna biru ke hijau ke kuning hingga merah menunjukkan peningkatan rendemen kolagen. Warna merah mewakili titik dengan rendemen tertinggi (sekitar 14,48%), sedangkan biru menunjukkan yang terendah (sekitar 10,5%).



Gambar 16. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respon Rendemen Kolagen

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara konsentrasi asam asetat dan pH ekstraksi terhadap rendemen. Perbedaan ketinggian permukaan menunjukkan nilai respons yang berbeda-beda untuk setiap kombinasi variabel, area yang rendah menunjukkan nilai respons Rendemen Kolagen terendah, sedangkan area yang tinggi menunjukkan nilai respons Rendemen Kolagen tertinggi.

Rendemen yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 12,33% – 14,48% lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian oleh Selvy, dkk. (2016) yang berkisar 9,98 %.

4.2.1.4.2 Derajat Keasaman (pH)

Tabel 20. Hasil Analisis Derajat Keasaman (pH)

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	pH %
1	6	21	0,5	6,5
2	5	24	1,5	5,1
3	5	21	1	6,5
4	5	24	0,5	5
5	5	18	1,5	5,5
6	6	21	1,5	4,1
7	6	24	1	4,3
8	4	21	1,5	6
9	4	18	1	6,5
10	5	18	0,5	6,5
11	6	18	1	5,2
12	4	24	1	6
13	4	21	0,5	6,5

Berdasarkan hasil analisis derajat keasaman diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan kadar pH terendah sebesar 4,3 pada *Run* 6 sedangkan kadar pH tertinggi sebesar 6,5 dimana SNI kolagen kering untuk nilai pH yaitu sebesar 6,5-8.

Derajat keasaman digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan. Nilai pH berkisar dari 0 sampai 14, suatu larutan netral apabila memiliki nilai pH 7, dan nilai pH lebih dari 7 menunjukkan derajat kebasaan dan nilai dibawah 7 menunjukan derajat keasaman.

pH awal ekstraksi juga berpengaruh terhadap pH akhir. Jika larutan diawali dengan pH rendah (misalnya pH 4), maka kemungkinan akumulasi ion H^+ di sistem akan lebih tinggi, terutama bila disertai dengan konsentrasi asam asetat yang tinggi (Kittiphattanabawon, P. *et al.*, 2005). sebaliknya, jika pH awal tinggi (misalnya pH 6), maka kecenderungan larutan mempertahankan pH netral lebih besar, seperti terlihat pada Run 1 dan 13 yang menghasilkan pH akhir 6,5.

Kittiphattanabawon *et al.* (2005) menyatakan bahwa ekstraksi kolagen optimal terjadi pada pH antara 5 dan 6 untuk menjaga stabilitas struktur triple helix. (Kittiphattanabawon, P. *et al.*, 2005)

Waktu ekstraksi yang terlalu panjang dapat memperbesar peluang terjadinya degradasi protein dan pelepasan senyawa asam dari jaringan. Hal ini bisa menyebabkan pH menjadi lebih rendah, menurut Nurilmala *et al.* (2013) menunjukkan bahwa perpanjangan waktu ekstraksi dapat memicu hidrolisis parsial dan memperbanyak pelepasan gugus karboksilat ($-COOH$), yang berkontribusi terhadap penurunan pH larutan. (Nurilmala, M. *et al.*, 2013)

Konsentrasi asam asetat merupakan faktor paling dominan yang mempengaruhi nilai pH akhir. Asam asetat merupakan asam lemah yang dapat menurunkan pH larutan secara signifikan apabila digunakan dalam konsentrasi tinggi. Menurut Sihombing *et al.* (2020), penggunaan asam asetat dengan

konsentrasi tinggi meningkatkan jumlah ion H^+ dalam larutan yang berdampak pada penurunan pH selama ekstraksi kolagen. (Sihombing, R.R. *et al.*, 2020).

Tabel 21. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	6.17	3	2.06	6.47	0.0126	significant
A-pH Ekstraksi	3.00	1	3.00	9.44	0.0133	
B-Waktu Ekstraksi	1.36	1	1.36	4.28	0.0684	
C-Konsentrasi Asam Asetat	1.81	1	1.81	5.68	0.0410	
Residual	2.86	9	0.3178			
Cor Total	9.03	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh Desain Expert versi 13 untuk respon Rendemen Kolagen adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu $<0,0001$. Artinya formulasi yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon Derajat Keasaman (pH).

Berdasarkan hasil analisis ANOVA pada tabel 21, diketahui bahwa model yang digunakan dalam penelitian ini signifikan dengan nilai F sebesar 6,47 dan p-value sebesar 0,0126 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa model regresi dapat menjelaskan pengaruh variabel bebas terhadap derajat keasaman (pH) kolagen secara keseluruhan.

Secara individual, variabel pH ekstraksi (A) menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap pH kolagen, dengan nilai F sebesar 9,44 dan p-value sebesar 0,0133. Hasil ini menunjukkan bahwa perubahan nilai pH pada saat ekstraksi kolagen berpengaruh nyata terhadap pH akhir kolagen yang dihasilkan. Hal ini diduga karena pH lingkungan sangat memengaruhi kestabilan dan kelarutan protein kolagen, serta proses ionisasi gugus asam amino selama ekstraksi.

Faktor konsentrasi asam asetat (C) juga memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pH kolagen, dengan nilai F sebesar 5,68 dan p-value sebesar 0,0410. Konsentrasi asam asetat yang lebih tinggi dapat menyebabkan lingkungan ekstraksi menjadi lebih asam, sehingga memengaruhi struktur dan muatan kolagen yang terbentuk, serta menyebabkan perubahan derajat keasaman pada produk akhir.

Sementara itu, waktu ekstraksi (B) menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan terhadap pH kolagen, dengan nilai F sebesar 4,28 dan p-value sebesar 0,0684 ($p > 0,05$). Meskipun demikian, nilai F yang relatif tinggi menunjukkan bahwa waktu ekstraksi tetap memiliki kontribusi terhadap perubahan pH kolagen, meskipun tidak dominan dibandingkan faktor lainnya.

Tabel 22. Hasil *Fit Statistic* Derajat Keasaman (pH)

	Std. Dev.	0.5637		R²	0.6832
	Mean	5.67		Adjusted R²	0.5776
	C.V. %	9.94		Predicted R²	0.3797
				Adeq Precision	6.9554

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukan nilai R² sebesar 0,6832. Nilai adjusted R² sebesar 0,5776 dan predicted R² sebesar 0,3797 maka selisih perbedaanya kurang dari 0,2 menunjukan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 6,9554 yang berarti sudah menunjukan sinyal yang memadai.

Tabel 23. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Derajat Keasaman (pH)

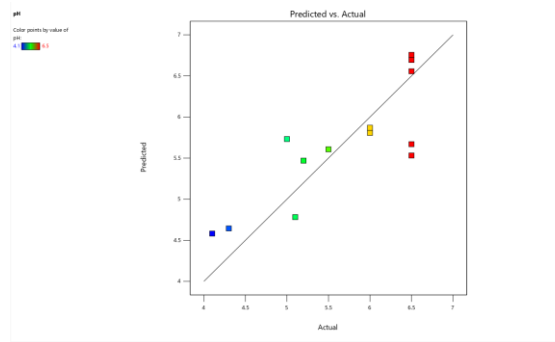
	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	5.67	1	0.1564	5.32	6.02	
	A-pH Ekstraksi	-0.6125	1	0.1993	-1.06	-0.1616	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.4125	1	0.1993	-0.8634	0.0384	1.0000
	C-Konsentrasi Asam Asetat	-0.4750	1	0.1993	-0.9259	-0.0241	1.0000

Persamaan model matematika untuk analisis respon Derajat Keasaman (pH) merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 5,67 - (A)0,6125 - (B)0,4125 - (C)0,4750$$

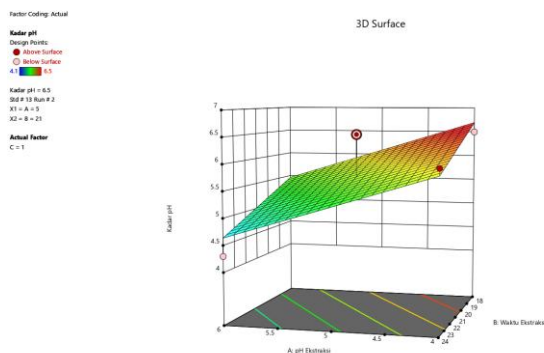
Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) -0,6125, Komponen B (waktu Ekstraksi) 0,4125, Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) -0,4750, berpengaruh terhadap respon Derajat keasaman. Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis derajat keasaan pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien B (Waktu Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi B memiliki nilai yang paling rendah yaitu sebesar -0,4125 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Untuk melihat perbedaan antara data aktual formulasi dengan nilai prediksi yang didapatkan dari tabel ANOVA dapat dilihat pada Grafik *internally studentized residual* dari respons Derajat Keasaman (pH) pada gambar berikut:



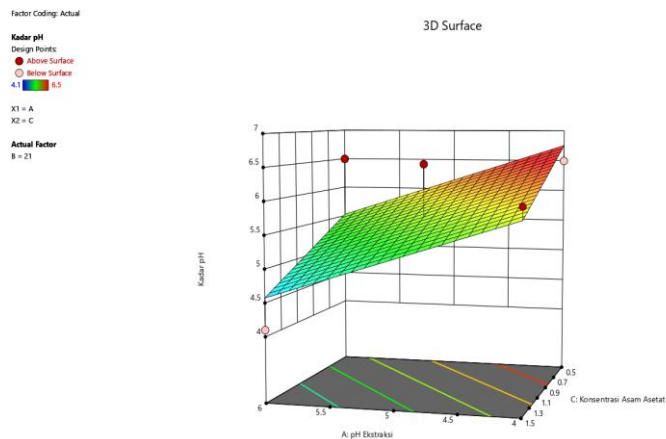
Gambar 17. Grafik Kenormalan *internally studentized residuals* Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 18. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respons Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar pH. Permukaan Warna permukaan berubah dari warna biru, warna hijau, warna kuning dan warna merah. Warna biru menandakan pH akhir rendah (4), sedangkan warna merah menunjukkan pH akhir tinggi (mendekati 6,5). Gradasi warna ini memperjelas bahwa nilai pH akhir meningkat seiring naiknya pH awal.



Gambar 19. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respon Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara konsentrasi asam asetat dan pH ekstraksi terhadap pH. Permukaan Warna permukaan berubah dari Warna gradasi dari biru, warna hijau, warna kuning dan warna merah menggambarkan kenaikan pH akhir. Warna biru menandakan pH rendah (4), sedangkan warna merah menandakan pH tinggi (6,5).

Warna merah menunjukkan daerah dengan pH akhir tertinggi, yaitu pada pH awal tinggi (6) dan konsentrasi asam tinggi (1,5 M).

Kadar pH yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu pH 4,1 – 6,5 lebih rendah dibandingkan dengan standar SNI untuk kolagen kering yaitu 6,5 – 8, dan penelitian Selv dkk. (2019), yang berkisar pH 6,66. Nilai pH 4,1 – 4,3 terlalu rendah dan dapat menyebabkan denaturasi kolagen, sedangkan pH 6,5 sudah mencapai standar SNI.

4.2.1.4.3 Kadar Air

Tabel 24. Hasil Analisis Kadar Air

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Kadar Air %
1	6	21	0,5	10,68
2	5	24	1,5	10,46
3	5	21	1	9,18
4	5	24	0,5	9,33
5	5	18	1,5	10,21
6	6	21	1,5	10,51
7	6	24	1	9,44
8	4	21	1,5	9,68
9	4	18	1	9,37
10	5	18	0,5	11,43
11	6	18	1	11,88
12	4	24	1	10,34
13	4	21	0,5	9,61

Berdasarkan hasil analisis kadar air diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan kadar air terendah sebesar 9,18 pada *Run* 3 sedangkan kadar air tertinggi sebesar 11,88%, dimana SNI kolagen kering untuk kadar air maksimal sebesar 13%.

pH ekstraksi mempengaruhi struktur protein kolagen dan keterikatan airnya. pada pH ekstrim (terlalu rendah atau terlalu tinggi), struktur triple helix kolagen bisa terganggu, sehingga meningkatkan interaksi air dengan gugus-gugus polar yang terbuka. Hal ini bisa menyebabkan kadar air lebih tinggi. Menurut Wang *et al.* (2008), pH optimum untuk stabilitas kolagen adalah sekitar pH 5. Pada pH ini, kolagen cenderung mempertahankan struktur triple helix yang stabil dan kurang mengikat air bebas.

Waktu ekstraksi yang terlalu lama (misalnya 24 jam) dapat menyebabkan degradasi kolagen dan pelepasan fraksi protein kecil yang menyerap lebih banyak

air. sebaliknya, waktu yang terlalu singkat dapat menyebabkan kolagen tidak terekstrak sempurna. (Jongjareonrak, et. Al . 2005).

Asam asetat digunakan untuk melarutkan dan mengekstrak kolagen. Konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi sebagian struktur kolagen dan pelepasan lebih banyak air saat pengeringan karena jaringan menjadi lebih terbuka dan menyerap air. (Liu, *Et. Al.* 2012).

Tabel 25. Anova Analisis Kadar Air

Response 1: Kadar Air (1)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	7.22	6	1.20	6.07	0.0226	significant
A-pH	1.54	1	1.54	7.77	0.0317	
B-Waktu Ekstraksi	1.38	1	1.38	6.95	0.0387	
C-Konsentrasi asam Asetat	0.0045	1	0.0045	0.0228	0.8850	
AB	2.91	1	2.91	14.67	0.0087	
AC	0.0144	1	0.0144	0.0726	0.7965	
BC	1.38	1	1.38	6.97	0.0386	
Residual	1.19	6	0.1982			
Cor Total	8.41	12				

Model polynomial yang disarankan oleh *Design Expert* untuk respon kadar air adalah 2FI model. Hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan nilai P sebesar F” atau P lebih kecil dari 0,0500. Hal tersebut menunjukkan bahwa variabel antara pH ekstraksi, Waktu Ekstraksi dan Konsentrasi Asam Asetat memberikan pengaruh nyata atau significant terhadap respon kadar air.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, diketahui bahwa model yang digunakan untuk menganalisis kadar air kolagen signifikan secara statistik, dengan nilai F sebesar 6,07 dan p-value sebesar 0,0226 ($p < 0,05$). Ini menunjukkan bahwa model regresi dapat menjelaskan pengaruh variabel bebas terhadap kadar air kolagen secara layak.

Secara individual, pH ekstraksi ($F = 7,77$; $p = 0,0317$) dan waktu ekstraksi ($F = 6,25$; $p = 0,0387$) memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar air

kolagen. Hal ini menunjukkan bahwa proses ekstraksi kolagen sangat dipengaruhi oleh kondisi pH dan lamanya waktu kontak bahan dengan pelarut, yang dapat memengaruhi struktur, hidrasi, dan pengikatan air dalam kolagen

Sementara itu, konsentrasi asam asetat tidak memberikan pengaruh signifikan ($F = 0,0228$; $p = 0,8805$), sehingga perubahan konsentrasi larutan asam tidak terlalu memengaruhi kadar air produk akhir.

Dari sisi interaksi, interaksi antara pH dan waktu ekstraksi (AB) serta interaksi antara waktu dan konsentrasi asam asetat (BC) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar air. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi dua faktor tertentu dapat memberikan efek sinergis atau antagonis terhadap kandungan air dalam kolagen.

Tabel 26. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air

Fit Statistics

	Std. Dev.	0.4452	R²	0.8586
	Mean	10.16	Adjusted R²	0.7173
	C.V. %	4.38	Predicted R²	0.7172
			Adeq Precision	8.2186

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukkan nilai R² sebesar 0,8586. Nilai adjusted R² sebesar 0,7173 dan predicted R² sebesar 0,7172 maka selisih perbedaannya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 8,2186 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 27. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air**Coefficients in Terms of Coded Factors**

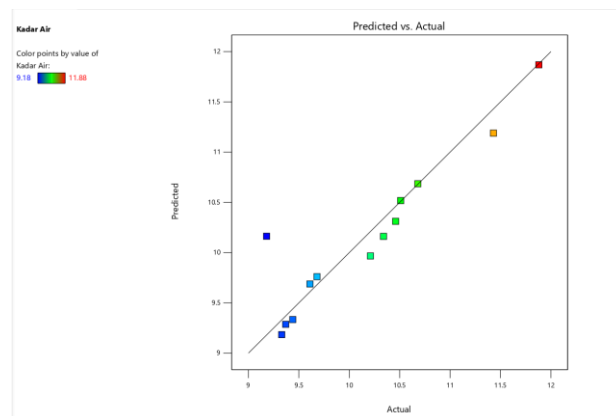
Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	10.16	1	0.1235	9.86	10.47	
A-pH	0.4387	1	0.1574	0.0536	0.8239	1.0000
B-Waktu Ekstraksi	-0.4150	1	0.1574	-0.8002	-0.0298	1.0000
C-Konsentrasi asam Asetat	-0.0237	1	0.1574	-0.4089	0.3614	1.0000

Persamaan model matematika untuk analisis respon kadar air merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 10,16 + (A)0,4387 - (B)0,4150 - (C)0,0237$$

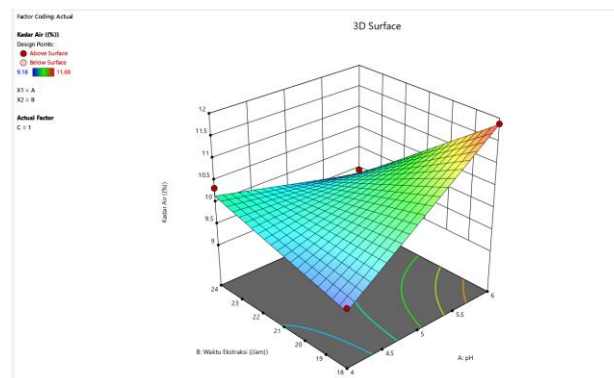
Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) 0,4387, Komponen B (waktu Ekstraksi) -0,4150, Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) -0,0237, berpengaruh terhadap respon kadar air. Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis kadar air pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien A (pH Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi A memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar 0,4387 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Untuk melihat perbedaan antara data aktual formulasi dengan nilai prediksi yang didapatkan dari tabel ANOVA dapat dilihat pada Grafik *internally studentized residual* dari respons kadar air pada gambar berikut :



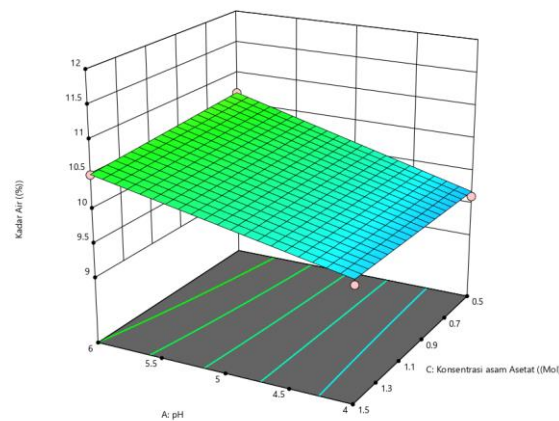
Gambar 20. Grafik Kenormalan internally studentized residuals Kadar Air

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 21. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respons Kadar Air

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar air. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke warna hijau, warna kuning dan warna merah menunjukkan peningkatan kadar air. warna biru menunjukkan kadar air rendah (9,3%), warna werah menunjukkan kadar air tinggi (11,5%), serta warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH dan waktu ekstraksi tertentu



Gambar 22. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respons Kadar Air

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar air. Permukaan berwarna biru ke warna hijau menunjukkan perubahan kadar air dari rendah ke tinggi. Warna Biru menunjukkan kadar air rendah (10%), warna hijau menunjukkan kadar air lebih tinggi (11,5%), dan tidak terlihat warna merah atau kuning, yang berarti rentang kadar air tidak terlalu ekstrem

Kadar air yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 9.18% – 11.88%, lebih rendah dibandingkan dengan penelitian oleh Hardiyanti (2017) yang berkisar kadar air 17,8%, tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian oleh Syahril dkk. (2022) yang berkisar sebesar 2,91%.

4.2.1.4.4 Kadar Protein

Tabel 28. Hasil Analisis Kadar Protein:

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Kadar Protein %
1	5	21	1	35,81
2	6	21	0,5	37,56
3	5	18	1,5	36,46
4	5	24	1,5	34,21
5	6	18	1	38,23
6	4	24	1	34,01
7	6	21	1,5	36,12
8	4	18	1	34,15
9	5	18	0,5	36,22
10	5	24	0,5	35,23
11	4	21	0,5	34,18
12	6	24	1	36,89
13	4	21	1,5	34,27

Berdasarkan hasil analisis kadar protein diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan kadar protein terendah sebesar 34,01% pada *Run* 6 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 4, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 24 jam, dan konsentrasi asam asetat yaitu 1 M, sedangkan kadar protein sebesar 38,23% pada *Run* 5 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 6, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 18 jam, dan konsentrasi asam asetat yaitu 1 M.

pH ekstraksi sangat memengaruhi kelarutan dan stabilitas kolagen. Pada pH 4, kolagen mendekati titik isoelektriknya, di mana muatan bersih molekul protein adalah nol. Hal ini menyebabkan interaksi hidrofobik meningkat dan kelarutan kolagen menurun, sehingga kadar protein yang dihasilkan lebih rendah. Sebaliknya, pada pH 6, meskipun mendekati titik isoelektrik, kelarutan kolagen masih cukup baik, memungkinkan ekstraksi yang lebih efisien dan menghasilkan kadar protein yang lebih tinggi. (Komala A.H, 2015)

Waktu ekstraksi memengaruhi sejauh mana kolagen dapat diekstraksi dari jaringan ikan. Waktu yang terlalu singkat mungkin tidak cukup untuk melarutkan kolagen secara maksimal, sementara waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan degradasi kolagen menjadi peptida yang lebih kecil, menurunkan kualitas dan kadar protein. Perendaman selama 18 jam pada pH 6 menghasilkan kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan perendaman selama 24 jam pada pH 4, menunjukkan bahwa waktu ekstraksi yang optimal bergantung pada kondisi pH dan konsentrasi asam. (Rahayu Fadjar, 2015)

Konsentrasi asam asetat memengaruhi kemampuan asam untuk mengekstrak kolagen dari jaringan ikan. Konsentrasi yang terlalu rendah mungkin tidak cukup untuk melarutkan kolagen, sementara konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi atau degradasi kolagen, mengurangi kualitas dan kadar protein. Penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi asam asetat sekitar 0,5 M menghasilkan kolagen dengan kualitas yang lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih tinggi seperti 1 M. (Nurhayati, Dkk., 2018).

Tabel 29. Anova Analisis Kadar Protein

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	21.93	3	7.31	27.44	< 0.0001	significant
A-pH	18.57	1	18.57	69.74	< 0.0001	
B-Waktu Ekstraksi	2.78	1	2.78	10.46	0.0103	
C-Konsentrasi asam Asetat	0.5671	1	0.5671	2.13	0.1785	
Residual	2.40	9	0.2663			
Cor Total	24.32	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh Desain Expert versi 13 untuk respon kadar protein adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu <0,0001. Artinya formulasi

yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon kadar protein.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA pada kadar protein kolagen, diketahui bahwa model regresi yang dibangun sangat signifikan secara statistik, dengan nilai F sebesar 27,44 dan $p\text{-value} < 0,0001$. Hal ini menunjukkan bahwa model tersebut layak digunakan untuk menjelaskan hubungan antara variabel bebas terhadap kadar protein kolagen.

Dari ketiga faktor yang diuji, pH ekstraksi menunjukkan pengaruh yang paling dominan terhadap kadar protein kolagen, dengan nilai F sebesar 69,74 dan $p\text{-value} < 0,0001$. Ini menunjukkan bahwa pH yang digunakan selama proses ekstraksi sangat menentukan efisiensi pelepasan protein kolagen dari bahan baku. pH yang optimal memungkinkan terbukanya struktur jaringan kolagen secara maksimal, sehingga protein dapat terekstrak dengan baik.

Waktu ekstraksi juga memberikan pengaruh yang signifikan ($F = 10,46$; $p = 0,0103$). Waktu yang cukup memungkinkan proses difusi berjalan lebih sempurna dan struktur kolagen terurai secara efisien, sehingga meningkatkan kandungan protein dalam ekstrak.

Sebaliknya, konsentrasi asam asetat tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan ($F = 2,13$; $p = 0,1785$), yang mengindikasikan bahwa dalam rentang konsentrasi yang digunakan, perubahannya tidak cukup kuat memengaruhi kadar protein.

Tabel 30. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein**Fit Statistics**

	Std. Dev.	0.5161		R²	0.9014
	Mean	35.64		Adjusted R²	0.8686
	C.V. %	1.45		Predicted R²	0.7837
				Adeq Precision	14.7672

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukkan nilai R² sebesar 0,9014. Nilai adjusted R² sebesar 0,8686 dan predicted R² sebesar 0,7837 maka selisih perbedaannya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 14,7672 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 31. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein**Coefficients in Terms of Coded Factors**

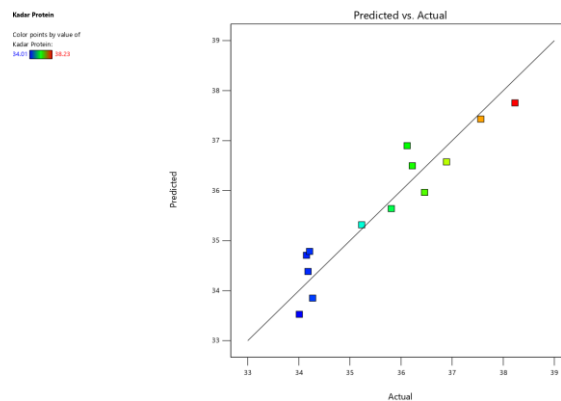
	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	35.64	1	0.1431	35.32	35.97	
	A-pH	1.52	1	0.1825	1.11	1.94	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.5900	1	0.1825	-1.00	-0.1772	1.0000
	C-Konsentrasi asam Asetat	-0.2662	1	0.1825	-0.6790	0.1465	1.0000

Persamaan model matematika untuk analisis respon kadar protein merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 35,64 + (A)1,52 - (B)0.5900 - (C)0,2662$$

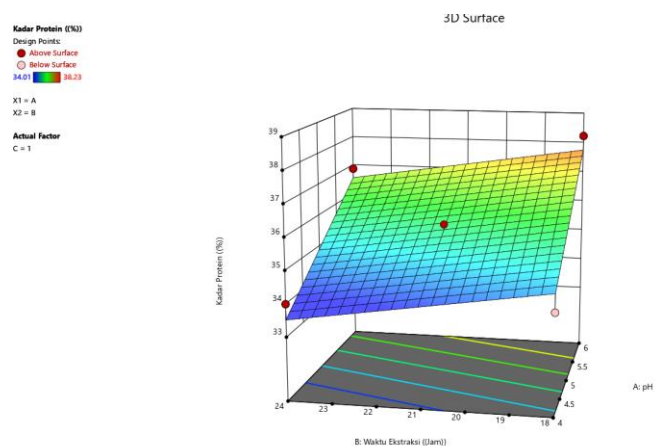
Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) 1,52, Komponen B (waktu Ekstraksi) -0,5900, Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) -0,2662, berpengaruh terhadap respon kadar protein. Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis kadar protein pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien A (pH Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi A memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar 1,52 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Untuk melihat perbedaan antara data aktual formulasi dengan nilai prediksi yang didapatkan dari tabel ANOVA dapat dilihat pada Grafik *internally studentized residual* dari respons kadar protein pada gambar berikut:



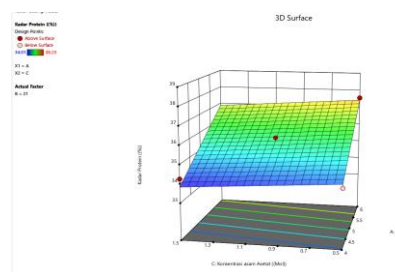
Gambar 23. Grafik Kenormalan *internally studentized residuals* Kadar Protein

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 24. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respons Kadar Protein

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar protein. Permukaan grafik menunjukkan gradasi warna dari biru ke hijau hingga kuning yang menandakan peningkatan kadar protein. Warna biru menunjukkan kadar protein rendah (sekitar 30,2%), sedangkan warna kuning menunjukkan kadar protein tinggi (sekitar 35,3%). Warna terang (hijau-kuning) muncul pada kombinasi pH tinggi dan waktu ekstraksi yang lebih lama, yang mengindikasikan bahwa peningkatan kedua variabel tersebut secara bersamaan dapat meningkatkan kadar protein secara signifikan.



Gambar 25. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respons Kadar Protein

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar protein. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau hingga kuning menunjukkan peningkatan kadar protein: warna biru menunjukkan kadar protein rendah (sekitar 30,2%), sedangkan warna kuning menunjukkan kadar protein tinggi (sekitar 35,3%). Warna terang (hijau-kuning) muncul pada kombinasi pH tinggi dan konsentrasi asam asetat tertentu, yang menunjukkan bahwa peningkatan pH memiliki pengaruh yang lebih signifikan terhadap kadar protein dibandingkan dengan variasi konsentrasi asam asetat.

Kadar protein yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 34,01% – 38,23%, lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Syahril dkk. (2022) yang berkisar sebesar 82,96%, dan lebih tinggi dari penelitian Noorman (2016) yang berkisar sebesar 10,27%.

4.2.1.5 Penentuan Kondisi Optimasi

Penentuan kondisi optimasi dilakukan dengan menggabungkan variabel bebas (pH Ekstraksi, waktu ekstraksi dan konsentrasi asam asetat) dan variabel respon (Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein) dengan bantuan *Design Expert 13*.

Tujuan dilakukannya optimasi adalah untuk mendapatkan respon yang sesuai dengan keinginan (*desirability*).

Desirability merupakan tingkat keinginan untuk mencapai hasil terbaik. Proses optimasi dilakukan dengan menetapkan batasan (*goal*) untuk kriteria respons yang diinginkan, dengan memperhatikan rentang (*range*) yang dapat dicapai serta tingkat kepentingan (*importance*). Penetapan goal dan importance dapat dilihat pada Tabel 32.

Pada setiap respon penelitian dilakukan penetapan *goal* dan juga *importance*. Menurut Syahrul, et. al. (2020), *importance* atau kepentingan dari suatu respon akan menentukan proses optimum yang dihasilkan oleh *Design Expert 13*. Nilai *importance* dari suatu respon dimulai dari nilai 1 (+) hingga 5 (+++++). Semakin tinggi nilai *importance*, maka akan semakin tinggi juga kepentingan dari suatu respon untuk dicapai dalam proses optimum yang dihasilkan.

Tabel 32. *Goal dan Importance* Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Maserasi

Variabel/Respon	Goal	Batas Bawah	Batas Atas	Importance
A= pH Ekstraksi	<i>Is In Range</i>	4	6	5 (+++++)
B= Waktu Ekstraksi	<i>Is In Range</i>	18	24	5 (+++++)
C= Konsentrasi Asam asetat	<i>Is In Range</i>	0,5	1,5	5 (+++++)
Rendemen Kolagen	<i>Maximize</i>	12,32	14,48	5 (+++++)
Derajat Keasaman (pH)	<i>Minimize</i>	4,3	6,5	3 (+++)
Kadar Air	<i>Minimize</i>	9,18	11,88	3 (+++)
Kadar Protein	<i>Maximize</i>	34,01	38,23	5 (+++++)

Variabel berubah pH Ekstraksi dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat importance 5 (+++++). diharapkan dapat mempertahankan pH akhir pada produk kolagen.

Variabel berubah Waktu Ekstraksi dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat importance 5 (+++++).diharapkan dapat mengekstraksi kolagen tanpa mengakibatkan degradasi atau denaturasi.

Variabel berubah Konsentrasi Asam asetat dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat importance 5 (+++++).diharapkan dapat mengekstraksi kolagen tanpa merusak struktur jaringannya.

Respon Rendemen Kolagen dioptomalkan dengan *goal maximize* dengan tingkat importance 5 (+++++). Diharapkan rendemen kolagen memiliki Rendemen Kolagen yang tinggi, karena kualitas kolagen dilihat dari Rendemen Kolagennya.

Respon Derajat keasaman (pH) dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat importance 5 (+++++). Diharapkan pH kolagen memiliki pH yang tidak terlalu rendah dan tidak terlalu tinggi sesuai dengan SNI.

Respon kadar air dioptimalkan dengan *goal minimize* dengan tingkat *importance* 3 (+++). Kadar air yang diharapkan pada kolagen kulit ikan nila hitam yaitu memiliki kadar air yang tidak terlalu tinggi sesuai dengan SNI pada tahun, kadar air kolagen memiliki maksimal 13%.

Respon kadar protein dioptimalkan dengan *goal maximize* dengan tingkat *importance* 5 (+++++). Diharapkan protein kolagen memiliki kadar protein yang tinggi.

Setelah melakukan penetapan *goal* dan *importance* dari setiap variabel dan respon maka *Design Expert* akan memberikan rekomendasi optimasi terbaik beserta nilai *desirability* dan prediksi hasil pengujian respon. optimasi optimal kolagen dari kulit ikan nila hitam yang direkomendasikan oleh program *Design Expert* dapat dilihat pada Tabel 33.

Tabel 33. Rekomendasi Optimasi Optimal dari Program *Design Expert*.**Solutions**

46 Solutions found

Number	pH Ekstraksi	Waktu Ekstraksi	Konsentrasi Asam Asetat	Rendemen Kolagen	Derajat Keasaman	Kadar Air	Kadar Protein	Desirability	
1	6.000	24.000	0.500	13.916	5.119	8.831	36.842	0.724	Selected
2	6.000	24.000	0.504	13.914	5.116	8.835	36.839	0.724	
3	6.000	24.000	0.508	13.912	5.112	8.839	36.837	0.724	
4	6.000	24.000	0.517	13.907	5.103	8.847	36.833	0.724	
5	6.000	24.000	0.525	13.902	5.095	8.856	36.828	0.723	
6	6.000	23.973	0.500	13.910	5.123	8.847	36.847	0.723	
7	6.000	24.000	0.566	13.881	5.057	8.897	36.807	0.722	
8	6.000	23.935	0.500	13.903	5.128	8.871	36.854	0.722	
9	6.000	24.000	0.574	13.877	5.049	8.905	36.802	0.722	
10	6.000	24.000	0.581	13.874	5.042	8.912	36.799	0.722	
11	6.000	23.894	0.500	13.895	5.134	8.896	36.862	0.721	
12	6.000	23.931	0.544	13.879	5.087	8.916	36.832	0.721	
13	5.982	24.000	0.500	13.918	5.130	8.837	36.814	0.721	
14	6.000	23.866	0.500	13.889	5.138	8.914	36.868	0.720	
15	6.000	24.000	0.631	13.847	4.995	8.962	36.772	0.720	
16	6.000	24.000	0.645	13.840	4.982	8.977	36.764	0.720	
17	5.980	23.946	0.500	13.907	5.139	8.871	36.822	0.719	
18	5.971	24.000	0.500	13.919	5.137	8.841	36.798	0.719	
19	6.000	23.769	0.500	13.869	5.151	8.973	36.887	0.718	
20	5.958	24.000	0.500	13.921	5.145	8.846	36.777	0.717	
21	6.000	24.000	0.768	13.776	4.864	9.101	36.699	0.715	
22	6.000	23.608	0.500	13.837	5.173	9.073	36.919	0.713	
23	6.000	24.000	0.829	13.744	4.806	9.162	36.666	0.712	
24	6.000	23.496	0.500	13.815	5.189	9.142	36.941	0.710	
25	5.933	24.000	0.603	13.870	5.062	8.959	36.684	0.710	
26	6.000	23.472	0.517	13.801	5.175	9.171	36.936	0.709	
27	6.000	23.449	0.500	13.805	5.195	9.172	36.950	0.709	
28	5.968	23.955	0.780	13.764	4.879	9.148	36.653	0.708	
29	5.900	24.000	0.667	13.840	5.022	9.037	36.600	0.702	
30	5.909	24.000	0.719	13.812	4.967	9.086	36.587	0.702	
31	6.000	24.000	0.937	13.688	4.705	9.270	36.609	0.701	
32	6.000	24.000	0.950	13.681	4.692	9.283	36.602	0.700	
33	5.897	23.980	0.820	13.757	4.881	9.203	36.518	0.694	
34	6.000	24.000	1.006	13.652	4.639	9.340	36.572	0.693	
35	6.000	23.729	0.951	13.626	4.728	9.404	36.655	0.686	
36	6.000	23.046	0.538	13.704	5.215	9.444	37.009	0.682	
37	6.000	24.000	1.111	13.596	4.539	9.446	36.516	0.681	
38	6.000	24.000	1.116	13.594	4.534	9.451	36.514	0.680	
39	6.000	24.000	1.136	13.584	4.515	9.471	36.503	0.678	
40	6.000	24.000	1.169	13.566	4.484	9.505	36.485	0.674	
41	6.000	24.000	1.196	13.552	4.458	9.532	36.471	0.670	
42	5.704	24.000	0.735	13.828	5.077	9.180	36.266	0.666	
43	6.000	24.000	1.342	13.476	4.320	9.679	36.393	0.650	
44	6.000	22.483	0.500	13.611	5.328	9.769	37.140	0.647	
45	6.000	24.000	1.464	13.412	4.204	9.802	36.328	0.633	
46	6.000	24.000	1.475	13.407	4.193	9.812	36.323	0.631	

Terdapat beberapa optimasi yang direkomendasi oleh program *Design-Expert* Versi 13 satu dari solusi yang ada dipilih sebagai optimasi yang optimal. Optimasi yang dipilih yaitu optimasi no 1 yang memiliki desirability sebesar 0,724 artinya optimasi tersebut dapat menghasilkan produk yang memiliki optimasiasi sekitar 72,3%.

4.2.1.6 Verifikasi Optimasi

Optimasi yang dihasilkan oleh *Design Expert* akan dianalisis kembali berdasarkan respon kimia yaitu Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein. Tujuan dari tahap verifikasi adalah untuk mengetahui nilai aktual dari optimasi dan dibandingkan dengan prediksi yang dihasilkan oleh *Design Expert*. *Design Expert* akan menghasilkan *confidence interval* (CI) dan *prediction interval* (PI) untuk setiap nilai prediksi respon pada taraf signifikansi 5%. *Confident interval* (CI) merupakan rentang yang menunjukkan ekspektasi rata-rata hasil pengukuran berikutnya dan untuk mengatasi kesalahan acak dari banyaknya data. *Prediction interval* (PI) merupakan rentang yang menunjukkan ekspektasi hasil pengukuran respon berikutnya dengan kondisi yang sama (Engelen, 2015). Oleh karena itu, CI dan PI perlu dibandingkan untuk mengkonfirmasi bahwa hasil verifikasi berbeda pada kisaran menunjukkan nilai ketepatan respon. Rentang nilai *confidence interval* (CI) akan lebih kecil jika dibandingkan dengan rentang nilai *prediction interval* (PI), karena pengukuran *prediction interval* (PI) melibatkan beragam variasi sampel yang tidak diketahui untuk gambaran hasil sampel produk akhir berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan (Rahmadania, 2023).

Tabel 34. Hasil Verifikasi optimasi Optimal

Respon	Prediksi	Aktual	Std. Dev	95% CI Low	95% CI High	95% PI Low	95% PI High
Rendemen Kolagen	13,1708	13,1708	0.506581	12.8529	13.4886	10.7665	15.5751
Derajat Keasaman (pH)	5.66923	5.66923	0.563737	5.31554	6.02292	2.99364	8.34482
Kadar Air	10.1631	10.1631	0.445216	9.86093	10.4652	7.72652	12.5996
Kadar Protein	35.6415	35.6415	0.51609	35.3177	35.9653	33.1921	38.091

Berdasarkan hasil verifikasi optimasi optimal, respon Rendemen Kolagen memenuhi 95% *Prediction Interval* (PI) dan memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI). Respon Derajat keasaman(pH) tidak memenuhi 95% *Prediction Interval* (PI) dan tidak memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI). respon kadar air memenuhi 95% *Prediction Interval* (PI) dan memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI). Respon kadar protein melebihi 95% *Prediction Interval* (PI) dan tidak memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI).

4.2.1.7 Hasil Optimasi Terpilih

Berikut hasil analisis optimasi yang telah dilakukan terhadap respon rendemen kolagen beserta spesifikasi hasil lainnya.

Tabel 35. Hasil Analisis Optimasi Terpilih Ekstraksi Metode Maserasi

Sampel	Variabel	Rendemen Kolagen	Derajat Keasaman (pH)	Kadar Air	Kadar Protein
Optimasi Terpilih	pH ekstraksi = pH 4	14,48%	6	10,34%	34,01%
	Waktu ekstraksi = 24 Jam				
	Konsentrasi Asam asetat = 1 M				

Hasil optimal yang terpilih metode maserasi yang dicapai yaitu pH ekstraksi 4, waktu ekstraksi 24 jam dan konsentrasi asam asetat 1 M. Pada kondisi optimal tersebut rendemen kolagen yang dihasilkan 14,48% sedangkan untuk spesifikasi yang lainnya seperti pH menghasilkan pH 6, kadar air menghasilkan 10,34%, dan kadar protein menghasilkan 34,01%.

4.2.2 Optimasi Ekstraksi Metode Enzimatis

4.2.2.1 Identifikasi Variabel

Penetapan variabel penelitian (variabel bebas) mengacu pada penelitian noorman (2016), pada penelitiannya menggunakan variable bebas yang terdiri dari pH ekstraksi, waktu ekstraksi (jam), dan konsentrasi enzim papain (%).

4.2.2.2 Penentuan Batas Bawah Dan Batas Atas (Rentang Variabel) Ekstraksi Kolagen Metode Enzimatis

1) Penentuan Batas Bawah Dan Batas Atas Batas pH

Batas bawah pH ditetapkan 4, karena menurut penelitian Liu *et al.* (2015), kolagen memiliki stabilitas optimal pada pH (4–6), pH dibawah 4 akan menyebabkan denaturasi, menyebabkan kerusakan pada struktur kolagen dan mengurangi kualitasnya. Batas Atas pH ditetapkan 6, karena apabila pH diatas 6, menurut penelitian Kittiphattanabawon *et al.* (2010), aktivitas enzim papain

menurun pada pH di atas 6, dan kolagen menjadi kurang stabil.

2) Penentuan Batas Bawah dan Batas Atas Waktu Fermentasi

Batas bawah waktu fermentasi ditetapkan 18 jam. Waktu ekstraksi yang lama (18–24 jam) diperlukan untuk memastikan kolagen terlarut sempurna dari jaringan kulit ikan. Pada ekstraksi enzimatik, waktu ini juga memastikan enzim papain bekerja optimal dalam memecah protein non-kolagen.

Waktu ekstraksi dibawah 18 jam, menurut Sinthusamran *et al.* (2014) waktu ekstraksi yang lebih singkat menghasilkan yield kolagen yang lebih rendah karena proses pelarutan belum optimal. Batas Atas Waktu Ekstraksi ditetapkan 24 jam, karena apabila lebih dari 24 Jam menurut Nalinanon *et al.* (2007) Waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat menyebabkan degradasi kolagen, terutama jika menggunakan enzim, karena enzim terus bekerja memecah protein, termasuk kolagen.

3) Penentuan Batas Bawah dan Batas Atas Konsentrasi Enzim Papain

Batas bawah konsentrasi Enzim papain ditetapkan 1%, Enzim papain digunakan dengan konsentrasi antara 1% hingga 2%. Enzim ini berfungsi untuk memecah protein non-kolagen sehingga kolagen dapat diekstraksi lebih efisien. Konsentrasi dibawah 1%, Konsentrasi enzim yang terlalu rendah tidak cukup untuk memecah protein non-kolagen secara optimal, sehingga yield kolagen rendah. Menurut penelitian Jongjareonrak *et al.* (2006) konsentrasi enzim papain di bawah 1% tidak efektif dalam meningkatkan yield kolagen. Batas Atas Konsentrasi enzim papain ditetapkan 2%, karena apabila konsentrasi diatas 2%, menurut penelitian Nalinanon *et al.* (2007) konsentrasi enzim yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi kolagen.

4.2.2.3 Rancangan Pelaksanaan Eksperimen

Variabel bebas untuk ekstraksi kolagen metode enzimatis, terdiri dari :

Tabel 36. Batas Bawah dan Batas Atas pada Variabel bebas

No	Variabel atau Faktor	Batas Bawah	Batas Atas
1	pH Ekstraksi	4	6
2	Waktu Fermentasi (Jam)	18	24
3	Konsentrasi Enzim Papain (%)	1	2

4.2.2.4 Hasil Analisis Respon

Respon yang telah dianalisis meliputi rendemen kolagen, Derajat Keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein.

4.2.2.4.1 Rendemen Kolagen

Tabel 37. Hasil Analisis Rendemen :

Run	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Rendemen %
1	5	21	1,5	15,78
2	6	18	1,5	17
3	4	18	1,5	15,20
4	5	18	1	16,46
5	6	21	1	16,34
6	4	24	1,5	15
7	5	24	1	15,10
8	5	18	2	15,33
9	6	21	2	16,27
10	5	24	2	16,56
11	4	21	2	15,48
12	6	24	1,5	16,78
13	4	21	1	15,16

Berdasarkan hasil analisis Rendemen Kolagen diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan Rendemen Kolagen terendah sebesar 15% pada Run 6 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 4, waktu fermentasi (perendaman) yaitu 24 jam, dan konsentrasi enzim papain yaitu 1,5%, sedangkan Rendemen Kolagen tertinggi sebesar 17% pada Run 2 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH

6, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 18 jam, dan konsentrasi enzim papain yaitu 1,5%.

Rendemen kolagen diperoleh dari perbandingan berat kering kolagen dengan berat bahan atau sampel awal. Menurut Astiana (2016) semakin tinggi rendemen, maka semakin tinggi pula nilai ekonomisnya.

pH sangat mempengaruhi aktivitas enzim papain dalam memecah jaringan ikat untuk mengekstraksi kolagen. Enzim papain memiliki aktivitas optimum pada pH mendekati netral, yaitu sekitar pH 6–7. Pada kondisi pH yang terlalu rendah (misalnya pH 4), struktur enzim dapat mengalami denaturasi sehingga aktivitas katalitiknya menurun, yang pada akhirnya menurunkan efisiensi ekstraksi kolagen (Shavandi *et al.*, 2017). Hal ini tercermin pada Run 6, di mana pH 4 menghasilkan rendemen yang paling rendah. Sebaliknya, pH 6 seperti pada Run 2 memberikan lingkungan yang sesuai bagi enzim papain untuk bekerja secara maksimal, sehingga proses pemisahan kolagen dari jaringan pengikat lebih efisien dan hasil rendemen menjadi lebih tinggi.

Durasi ekstraksi juga memainkan peran penting. Waktu yang terlalu singkat bisa menyebabkan kolagen belum sepenuhnya terekstrak, sedangkan waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan degradasi lanjut pada kolagen, menghasilkan produk akhir yang lebih kecil dan sulit dipisahkan secara efisien.

Meskipun pada sebagian besar run digunakan konsentrasi papain yang sama (1,5%), hasil rendemen tetap bervariasi. Ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim tidak hanya tergantung pada jumlah enzim, tetapi juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti pH dan waktu ekstraksi (Kittiphattanabawon, 2005).

Tabel 38. Anova Analisis Rendemen Kolagen

Response 1: Kadar Rendemen

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	4.97	3	1.66	13.61	0.0011	significant
A-pH Ekstraksi	4.89	1	4.89	40.17	0.0001	
B-Waktu Ekstraksi	0.0378	1	0.0378	0.3108	0.5908	
C-konsentrasi Enzim Papain	0.0420	1	0.0420	0.3456	0.5711	
Residual	1.10	9	0.1217			
Cor Total	6.06	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh Desain Expert versi 13 untuk respon Rendemen Kolagen adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,0011. Artinya formulasi yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon Rendemen Kolagen.

Berdasarkan hasil analisis varians (ANOVA) yang ditampilkan pada tabel, diketahui bahwa model regresi yang dibentuk dari faktor-faktor pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi enzim papain secara keseluruhan signifikan terhadap respon rendemen kolagen, dengan nilai F sebesar 13,61 dan p-value sebesar 0,0011 ($< 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa model layak digunakan untuk menjelaskan hubungan antara variabel bebas dengan rendemen kolagen.

Dari ketiga faktor yang diuji, faktor pH ekstraksi (A) menunjukkan pengaruh yang paling signifikan terhadap rendemen kolagen, dengan nilai F sebesar 40,17 dan p-value sebesar 0,0001, yang jauh di bawah batas signifikansi 0,05. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan pH ekstraksi memberikan dampak nyata terhadap rendemen kolagen yang dihasilkan.

Sementara itu, faktor waktu ekstraksi (B) dan konsentrasi enzim papain (C) menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan, dengan p-value masing-masing sebesar 0,5908 dan 0,5711. Artinya, secara statistik, perubahan pada waktu

ekstraksi dan konsentrasi enzim papain tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap rendemen kolagen dalam kondisi dan rentang yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 39. Hasil *Fit Statistic* Rendemen Kolagen

Fit Statistics

Std. Dev.	0.3488		R²	0.8194
Mean	15.88		Adjusted R²	0.7592
C.V. %	2.20		Predicted R²	0.6051
			Adeq Precision	8.4454

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* Rendemen Kolagen menunjukkan nilai R² sebesar 0,8194. Nilai adjusted R² sebesar 0,7592 dan predicted R² sebesar 0,6051 maka selisih perbedaannya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 8,4454 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 40. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	15.99	1	0.0983	15.77	16.21	
A-pH Ekstraksi	0.7102	1	0.1120	0.4567	0.9636	1.0000
B-Waktu Ekstraksi	-0.0687	1	0.1233	-0.3477	0.2102	1.0000
C-konsentrasi Enzim Papain	0.0725	1	0.1233	-0.2065	0.3515	1.0000

Persamaan model matematika untuk analisis respon Rendemen Kolagen merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 15,99 + (A)0,7102 - (B)0,0687 + (C)0,0725$$

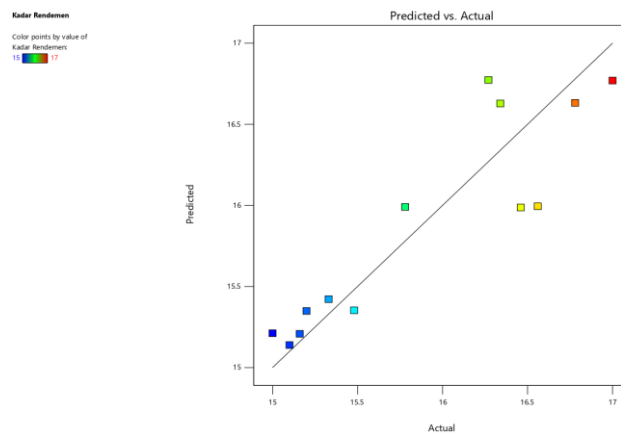
Tabel 41. Hasil Persamaan Keakuratan yang Dihasilkan

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Rendemen %	Hasil Persamaan Keakuratan yang Dihasilkan
1	5	21	1,5	15,78	18,21
2	6	18	1,5	17	19,12
3	4	18	1,5	15,20	17,70
4	5	18	1	16,46	18,38
5	6	21	1	16,34	18,88
6	4	24	1,5	15	17,29
7	5	24	1	15,10	17,96
8	5	18	2	15,33	18,45
9	6	21	2	16,27	18,95
10	5	24	2	16,56	18,04
11	4	21	2	15,48	17,53
12	6	24	1,5	16,78	18,71
13	4	21	1	15,16	17,46

Setelah diterapkan persamaan ini maka run 1 berdasarkan persamaan rendemen kolagen 15,78%, persamaan keakuratannya 18,21, run 2 berdasarkan persamaan rendemen kolagen 17%, persamaan keakuratannya 19,12, run 3 berdasarkan persamaan 15,20, persamaan keakuratannya 17,70

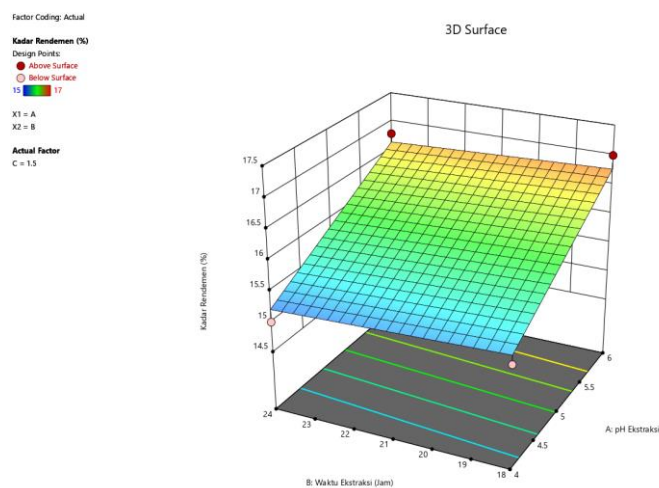
Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) 0,7102, Komponen B (waktu Ekstraksi) -0,0687, Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) 0,0725, berpengaruh terhadap respon Rendemen Kolagen. Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis Rendemen Kolagen pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien A (pH Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi A memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar 0,7102 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Berdasarkan analisis yang dilakukan oleh program Desain Expert 13 diketahui bahwa grafik kenormalan untuk respon rasa *internally studentized residual* dapat dilihat pada gambar 26.



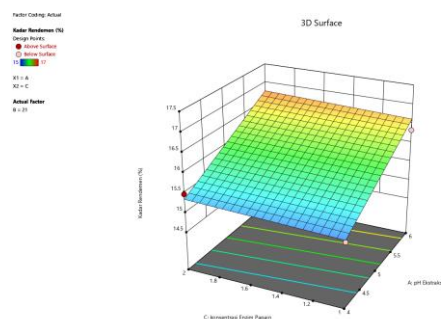
Gambar 26. Grafik Kenormalan *Internally Studentized Residuals* Rendemen

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 27. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respon Rendemen Kolagen

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap Rendemen Kolagen. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau, kuning, hingga merah menunjukkan peningkatan rendemen kolagen, warna biru menunjukkan rendemen kolagen yang rendah (sekitar 14%), sedangkan warna merah menunjukkan rendemen kolagen yang tinggi (mendekati 17%). Warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH dan waktu ekstraksi yang lebih tinggi, menunjukkan bahwa semakin besar pH dan semakin lama waktu ekstraksi, maka rendemen kolagen yang dihasilkan cenderung meningkat.



Gambar 28. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respon Rendemen Kolagen

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variable AC terlihat hubungan antara konsentrasi asam asetat dan pH ekstraksi terhadap rendemen. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau, kuning, hingga merah menunjukkan peningkatan rendemen kolagen, warna biru menunjukkan rendemen rendah (sekitar 15%), sedangkan warna merah menunjukkan rendemen tinggi (mencapai 17.5%). Warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH dan konsentrasi enzim papain yang tinggi, sehingga dapat disimpulkan bahwa peningkatan pH ekstraksi dan konsentrasi enzim papain secara bersamaan meningkatkan rendemen kolagen.

Kadar rendemen yang diperoleh dalam penelitian menggunakan ekstraksi enzimatis adalah 15% - 17%, lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian Noorman (2016) yang berkisar sebesar 12,43%.

4.2.2.4.2 Derajat Keasaman (pH)

Tabel 42. Hasil Analisis Derajat Keasaman (pH) :

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	pH %
1	5	21	1,5	6,5
2	6	18	1,5	7,2
3	4	18	1,5	4,5
4	5	18	1	6,5
5	6	21	1	7
6	4	24	1,5	4,5
7	5	24	1	4,6
8	5	18	2	5,5
9	6	21	2	6,8
10	5	24	2	6,9
11	4	21	2	5,7
12	6	24	1,5	6,7
13	4	21	1	5,5

Berdasarkan hasil analisis derajat keasaman diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan kadar pH terendah sebesar 4,5 pada *Run* 3 sedangkan kadar pH tertinggi sebesar 7,2 pada *Run* 2, dimana SNI kolagen kering untuk nilai pH yaitu sebesar 6,5-8.

Hasil penelitian antara ekstraksi enzimatis dan ekstraksi maserasi berbeda karena proses pembuatan kolagen itu sendiri. Derajat keasaman digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan. Nilai pH berkisar dari 0 sampai 14, suatu larutan netral apabila memiliki nilai pH 7, dan nilai pH lebih dari 7 menunjukkan derajat kebasaan dan nilai dibawah 7 menunjukkan derajat keasaman (Yunia, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian, nilai pH akhir kolagen dari ekstraksi enzimatis dipengaruhi oleh tiga faktor utama, yaitu pH awal ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi enzim papain. Secara umum, pH akhir cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya pH awal ekstraksi. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya efektivitas enzim papain yang bekerja optimal pada pH mendekati netral, yaitu sekitar pH 6–7 (Poedjiadi, 2005; Suhartono, 2011).

Ketika proses ekstraksi dilakukan pada pH 6, pH akhir kolagen yang dihasilkan dapat mencapai 7,2 (Run 2), menunjukkan kondisi yang sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI 8066:2015) untuk kolagen kering, yakni pH antara 6,5 hingga 8. Sebaliknya, ekstraksi pada pH rendah, seperti pH 4, menyebabkan aktivitas enzim menurun drastis dan menghasilkan pH akhir yang rendah, yakni berkisar antara 4,5 hingga 5,5. Kondisi ini terjadi karena enzim tidak bekerja optimal dalam lingkungan asam dan meninggalkan residu asam yang tidak sepenuhnya terurai (Yunia, 2007).

Selain itu, waktu ekstraksi juga berpengaruh signifikan terhadap pH akhir. Waktu ekstraksi selama 21 jam terbukti paling optimal dalam menjaga stabilitas pH hasil, karena memberikan waktu yang cukup bagi enzim untuk berinteraksi dengan substrat tanpa menyebabkan degradasi protein secara berlebihan (Zavareze *et al.*, 2009). Hal ini tampak pada beberapa run yang menggunakan waktu 21 jam dan menghasilkan pH akhir mendekati standar, seperti Run 2 dan Run 9.

Konsentrasi enzim papain turut memengaruhi pH akhir. Konsentrasi enzim sebesar 1,5% hingga 2% dinilai cukup efektif dalam mendukung reaksi hidrolisis

(Arvanitoyannis & Ladas, 2008), tetapi jika diaplikasikan dalam kondisi pH rendah, efektivitasnya menurun. Sebagai contoh, pada Run 7 yang menggunakan pH ekstraksi 4 dan enzim 2%, pH akhir tetap rendah yaitu 4,6. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi enzim yang tinggi tidak dapat mengompensasi kondisi pH lingkungan yang tidak sesuai. Oleh karena itu, interaksi antara pH ekstraksi, waktu, dan konsentrasi enzim harus dijaga secara seimbang agar diperoleh pH akhir yang sesuai dengan standar mutu.

Tabel 43. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH)

Response 1: Kadar pH

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	9.42	3	3.14	11.28	0.0021	significant
	A-pH Ekstraksi	9.09	1	9.09	32.63	0.0003	
	B-Waktu Ekstraksi	0.1250	1	0.1250	0.4489	0.5197	
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.2112	1	0.2112	0.7586	0.4064	
	Residual	2.51	9	0.2785			
	Cor Total	11.93	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh *Desain Expert* versi 13 untuk respon derajat keasaman adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,0021. Artinya formulasi yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon derajat keasaman (pH).

Berdasarkan hasil analisis varians (ANOVA) yang ditampilkan pada Tabel 43, diketahui bahwa model regresi yang dibentuk dari faktor-faktor pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi enzim papain secara keseluruhan signifikan terhadap respon yang diamati, dengan nilai F sebesar 11,28 dan p-value sebesar 0,0021 ($< 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa model yang digunakan layak untuk menjelaskan hubungan antara variabel bebas terhadap kadar pH kolagen.

Dari ketiga faktor yang diuji, faktor pH ekstraksi (A) menunjukkan pengaruh yang paling signifikan terhadap respon, dengan nilai F sebesar 32,63 dan p-value sebesar 0,0003, yang jauh di bawah batas signifikansi 0,05. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan pada pH ekstraksi memberikan dampak nyata terhadap kadar pH kolagen yang dihasilkan.

Sementara itu, faktor waktu ekstraksi (B) dan konsentrasi enzim papain (C) menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan, dengan nilai p-value masing-masing sebesar 0,5197 dan 0,4064. Artinya, secara statistik, perubahan pada waktu perendaman dan konsentrasi enzim papain tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap kadar pH kolagen dalam kondisi dan rentang variasi yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 44. Hasil *Fit Statistic* Derajat Keasaman (pH)

Fit Statistics

	Std. Dev.	0.5277		R²	0.7899
	Mean	5.99		Adjusted R²	0.7199
	C.V. %	8.81		Predicted R²	0.5732
				Adeq Precision	8.1529

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukkan nilai R² sebesar 0,7899. Nilai adjusted R² sebesar 0,7199 dan predicted R² sebesar 0,5732 maka selisih perbedaannya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 8,1529 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 45. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Derajat Keasaman (pH)

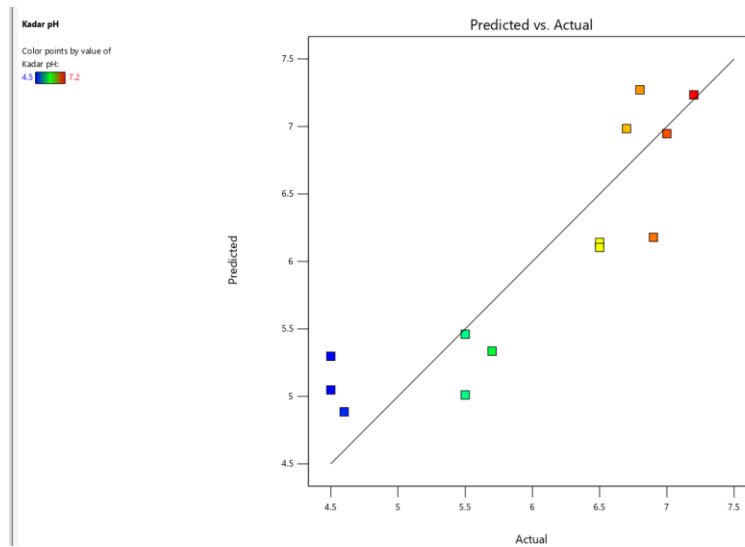
Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	6.14	1	0.1487	5.80	6.48	
A-pH Ekstraksi	0.9683	1	0.1695	0.5848	1.35	1.0000
B-Waktu Ekstraksi	-0.1250	1	0.1866	-0.5471	0.2971	1.0000
C-konsentrasi Enzim Papain	0.1625	1	0.1866	-0.2596	0.5846	1.0000

Persamaan model matematika untuk analisis respon kadar rendemen merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 6,14 + (A)0,9683 - (B)0.1250 + (C)0,1625$$

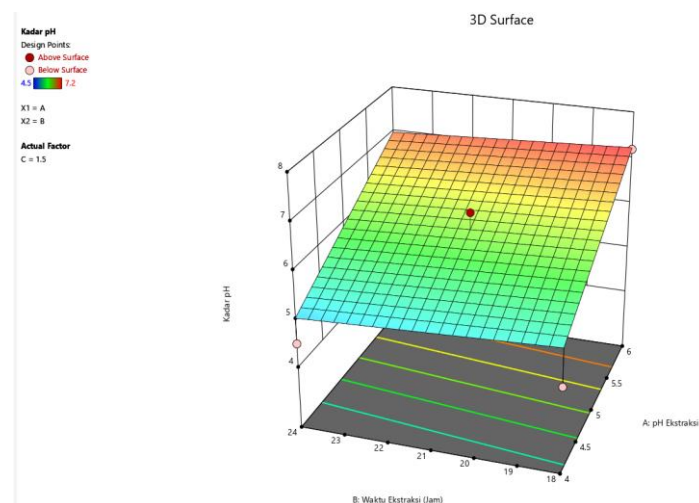
Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) 0,9683, Komponen B (waktu Ekstraksi) -0,1250 Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) 0,1625, berpengaruh terhadap respon Derajat keasaman. Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis derajat keasaan pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien A (pH Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi A memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar 0,9683 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Berdasarkan analisis yang dilakukan oleh program Desain Expert 13 diketahui bahwa grafik kenormalan untuk respon rasa *internally studentized residual* dapat dilihat pada gambar 29.



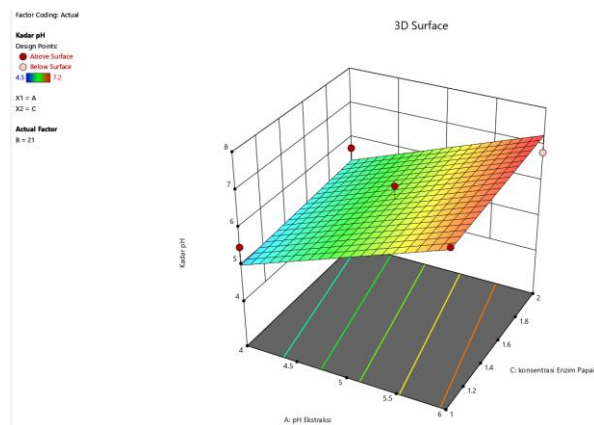
Gambar 29. Grafik Kenormalan *Internally Studentized Residuals* Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 30. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respon Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar pH. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau, kuning, hingga merah menunjukkan peningkatan nilai pH, warna biru menunjukkan pH produk rendah (sekitar 6,8), sedangkan warna merah menunjukkan pH produk tinggi (sekitar 7,2). Warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH ekstraksi yang lebih tinggi dan waktu ekstraksi yang lebih lama, menunjukkan bahwa pH produk akan semakin meningkat jika pH larutan dan durasi proses diperbesar.



Gambar 31. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respon Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar pH. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau, kuning, hingga merah menunjukkan peningkatan nilai pH, warna biru menunjukkan pH produk rendah (sekitar 6,8), sedangkan warna merah menunjukkan pH produk tinggi (sekitar 7,2). Warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH ekstraksi dan konsentrasi enzim papain yang lebih tinggi, menunjukkan bahwa peningkatan pH larutan dan konsentrasi enzim cenderung menaikkan pH hasil produk kolagen.

Kadar pH yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu pH 4,5 – 7,2, lebih rendah dibandingkan dengan standar SNI untuk kolagen kering yaitu 6,5 – 8, tetapi lebih tinggi dari penelitian Noorman (2016), yang berkisar pada pH 8,6. Nilai pH 4,5-4,6 terlalu rendah dan dapat menyebabkan denaturasi kolagen, sedangkan pH 6,5-7,2 sudah mencapai standar SNI.

4.2.2.4.3 Kadar Air

Tabel 46. Hasil Analisis Kadar Air

Run	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Kadar Air %
1	5	21	1,5	12,53
2	6	18	1,5	12,11
3	4	18	1,5	10,2
4	5	18	1	12,22
5	6	21	1	11,87
6	4	24	1,5	10,67
7	5	24	1	10,7
8	5	18	2	10,85
9	6	21	2	11,97
10	5	24	2	11,25
11	4	21	2	10,56
12	6	24	1,5	11,14
13	4	21	1	10,45

Berdasarkan hasil analisis kadar air diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan kadar air tertinggi sebesar 12,53% pada *Run* 1, dimana SNI kolagen kering untuk kadar air maksimal sebesar 13%.

Kadar air kolagen cenderung lebih rendah pada pH 4, dibandingkan dengan pH 5 dan 6. Hal ini diduga karena pada pH rendah, struktur triple heliks kolagen lebih stabil dan tidak mudah menyerap air, sehingga kadar air yang tertahan dalam kolagen lebih sedikit. Sebaliknya, pada pH yang lebih tinggi,

struktur kolagen lebih rentan terhadap pembengkakan sehingga lebih banyak menyerap air (Jongjareonrak *et al.*, 2005).

Selain itu, lama waktu ekstraksi juga menunjukkan pengaruh terhadap kadar air. Waktu ekstraksi yang terlalu singkat (misalnya 18 jam) dapat menghasilkan kolagen dengan kadar air rendah karena kolagen belum sepenuhnya terekstraksi dan strukturnya masih padat. Sementara itu, waktu yang terlalu lama (24 jam) dapat menyebabkan degradasi struktur kolagen menjadi peptida-peptida kecil yang bersifat lebih higroskopis, sehingga kadar air justru meningkat kembali setelah melewati waktu optimum (Sinthusamran *et al.*, 2013). Hal ini menunjukkan pentingnya kontrol waktu ekstraksi agar tidak menimbulkan denaturasi atau kerusakan berlebih pada struktur kolagen.

Konsentrasi enzim papain juga memainkan peran penting terhadap kadar air. Konsentrasi enzim yang terlalu rendah (1%) menghasilkan ekstraksi yang kurang efisien, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi (2%) dapat menyebabkan fragmentasi molekul kolagen, sehingga menghasilkan senyawa-senyawa kecil yang lebih mudah menyerap air (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Konsentrasi optimal sebesar 1,5% terbukti memberikan kadar air yang relatif seimbang, karena cukup untuk memutus ikatan jaringan kolagen tanpa menyebabkan degradasi berlebihan. Oleh karena itu, kombinasi parameter pH rendah, waktu ekstraksi optimum, dan konsentrasi enzim yang sesuai sangat berpengaruh dalam menghasilkan kolagen dengan kadar air rendah sesuai standar mutu.

Tabel 47. Anova Analisis Kadar Air

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	4.34	3	1.45	4.49	0.0346	significant
	A-pH Ekstraksi	3.97	1	3.97	12.30	0.0066	
	B-Waktu Ekstraksi	0.3280	1	0.3280	1.02	0.3396	
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.0465	1	0.0465	0.1442	0.7130	
	Residual	2.90	9	0.3226			
	Cor Total	7.25	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh Desain Expert versi 13 untuk respon kadar air adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,0346. Artinya formulasi yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon kadar air.

Berdasarkan hasil analisis varians (ANOVA) yang ditampilkan pada Tabel 47, diketahui bahwa model regresi yang dibentuk dari faktor-faktor pH ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi enzim papain secara keseluruhan signifikan terhadap respon yang diamati, dengan nilai F sebesar 4,49 dan p-value sebesar 0,0346 ($< 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa model yang digunakan layak untuk menjelaskan hubungan antara variabel bebas dengan kadar air kolagen.

Dari ketiga faktor yang diuji, faktor pH ekstraksi (A) menunjukkan pengaruh yang paling signifikan terhadap respon, dengan nilai F sebesar 12,30 dan p-value sebesar 0,0066, yang jauh di bawah batas signifikansi 0,05. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan pH ekstraksi memberikan dampak nyata terhadap kadar air kolagen yang dihasilkan.

Sementara itu, faktor waktu ekstraksi (B) dan konsentrasi enzim papain (C) menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan, dengan p-value masing-masing sebesar 0,3396 dan 0,7130. Artinya, secara statistik, perubahan pada waktu

perendaman dan konsentrasi enzim papain tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap kadar air kolagen dalam kondisi dan rentang variasi yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 48. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air

Std. Dev.	0.5680		R²	0.5993
Mean	11.27		Adjusted R²	0.4658
C.V. %	5.04		Predicted R²	0.3280
			Adeq Precision	5.3475

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukkan nilai R² sebesar 0,5993. Nilai adjusted R² sebesar 0,4658 dan predicted R² sebesar 0,3280 maka selisih perbedaannya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 5,3475 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 49. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	11.37	1	0.1600	11.01	11.73	
	A-pH Ekstraksi	0.6398	1	0.1824	0.2272	1.05	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.2025	1	0.2008	-0.6567	0.2517	1.0000
	C-konsentrasi Enzim Papain	-0.0763	1	0.2008	-0.5305	0.3780	1.0000

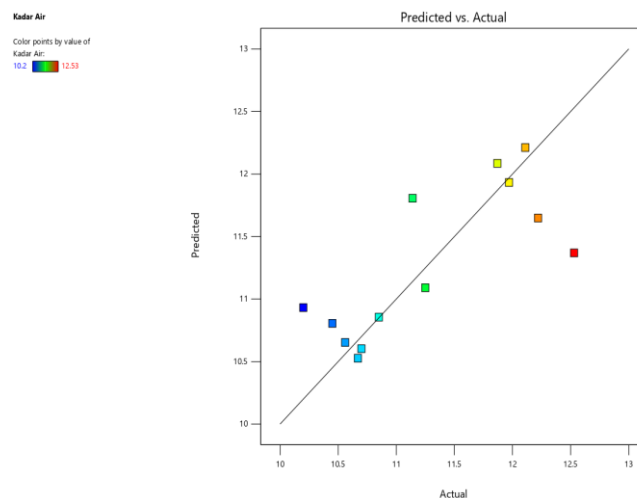
Persamaan model matematika untuk analisis respon kadar air merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 11,37 + (A)0,6398 - (B)0,2025 - (C)0,0763$$

Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) 0,6398 Komponen B (waktu Ekstraksi) -0,2025, Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) -0,0763, berpengaruh terhadap respon kadar air.

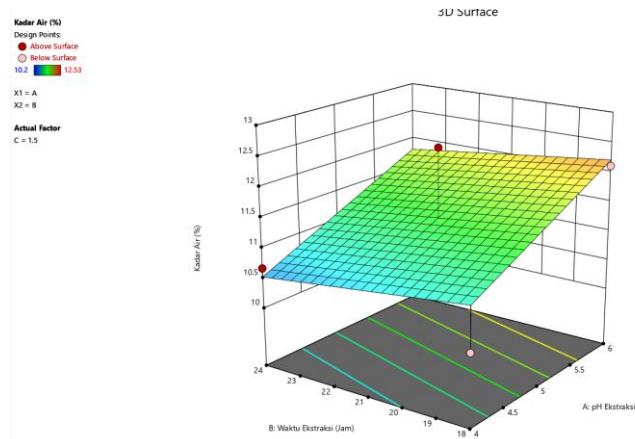
Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis kadar air pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien A (pH Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi A memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar 0,6398 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya.

Untuk melihat perbedaan antara data aktual formulasi dengan nilai prediksi yang didapatkan dari tabel ANOVA dapat dilihat pada Grafik *internally studentized residual* dari respons kadar air pada gambar berikut :



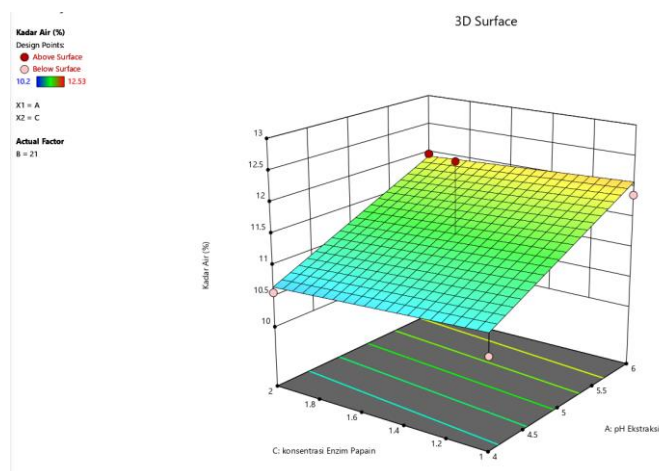
Gambar 32. Grafik Kenormalan *internally studentized residuals* Kadar Air

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 33. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respons Kadar Air

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar air. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau, kuning, hingga merah menunjukkan peningkatan kadar air, warna biru menunjukkan kadar air rendah (sekitar 10,3%), sedangkan warna merah menunjukkan kadar air tinggi (mencapai 12,3%). Warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH dan waktu ekstraksi yang tinggi, menunjukkan bahwa peningkatan pH dan lamanya waktu ekstraksi cenderung meningkatkan kadar air dalam produk kolagen.



Gambar 34. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respons Kadar Air

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar air. Permukaan berwarna gradasi dari biru ke hijau, kuning, hingga merah menunjukkan peningkatan kadar air, warna biru menunjukkan kadar air rendah (sekitar 10,3%), sedangkan warna merah menunjukkan kadar air tinggi (sekitar 12,3%). Warna terang (kuning-merah) muncul pada kombinasi pH ekstraksi dan konsentrasi enzim yang tinggi, menunjukkan bahwa peningkatan pH dan konsentrasi enzim papain secara bersamaan menyebabkan kadar air dalam produk kolagen meningkat. Kadar air yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 10,2% – 12,53%, lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian oleh Noorman (2016) yang berkisar kadar air sebesar 7,14 – 9,09%.

Kadar air yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 9.18% – 11.88%, lebih rendah dibandingkan dengan penelitian oleh Hardiyanti (2017) yang berkisar kadar air 17,8%, tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian oleh Syahril dkk. (2022) yang berkisar sebesar 2,91%.

4.2.2.4.4 Kadar Protein

Tabel 50. Hasil analisis kadar protein

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Kadar Protein %
1	5	21	1,5	39,4
2	6	18	1,5	42,23
3	4	18	1,5	37,23
4	5	18	1	40,11
5	6	21	1	40,57
6	4	24	1,5	37,02
7	5	24	1	37,37
8	5	18	2	38,09
9	6	21	2	39,76
10	5	24	2	39,2
11	4	21	2	38,19
12	6	24	1,5	40,12
13	4	21	1	38,93

Berdasarkan hasil analisis kadar protein diatas, dapat diketahui kolagen kulit ikan nila dengan kadar protein terendah sebesar 37,02% pada *Run* 6 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 4, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 24 jam, dan konsentrasi asam enzim papain yaitu 1,5%, sedangkan kadar protein protein sebesar 42,23% pada *Run* 2 dengan variabel pH ekstraksi yaitu pH 6, waktu ekstraksi (perendaman) yaitu 18 jam, dan konsentrasi enzim papain yaitu 1,5 %.

Enzim papain memiliki rentang pH optimum antara 6–7. Pada pH tersebut, enzim mempertahankan struktur aktifnya dan bekerja secara maksimal dalam menghidrolisis ikatan peptida dalam protein kolagen. Hal ini menyebabkan pelepasan protein dalam jumlah yang lebih tinggi. Sebaliknya, pada pH yang terlalu rendah (misalnya pH 4), enzim papain mengalami penurunan aktivitas akibat denaturasi parsial, sehingga menghambat proses hidrolisis protein secara

efektif (Simat & Steinhart, 1998; Ariffin *et al.*, 2009).

Waktu ekstraksi yang moderat, yaitu antara 18–21 jam, terbukti menghasilkan kadar protein yang relatif tinggi. Waktu ini cukup untuk memungkinkan enzim bekerja optimal tanpa menyebabkan degradasi protein secara berlebihan. Jika waktu ekstraksi terlalu lama, seperti pada kondisi 24 jam, terjadi over-hidrolisis, di mana protein dipecah menjadi peptida yang sangat kecil atau bahkan asam amino bebas. Hal ini dapat menyebabkan penurunan kadar protein yang terukur secara total (Kristinsson & Rasco, 2000; Gildberg, 2004).

Konsentrasi enzim papain sebesar 1,5% menghasilkan kadar protein tertinggi pada kondisi pH dan waktu yang optimal. Konsentrasi ini cukup untuk memecah protein secara efisien tanpa menyebabkan degradasi berlebih. Konsentrasi enzim yang terlalu rendah akan menyebabkan hidrolisis tidak maksimal, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat mempercepat proses over-hidrolisis, menghasilkan peptida kecil yang tidak terhitung dalam pengukuran protein total (Pasupuleti & Demain, 2010; Sila & Bougatef, 2016).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein kolagen tidak hanya dipengaruhi oleh satu faktor tunggal, melainkan oleh interaksi dari ketiga faktor: pH, waktu ekstraksi, dan konsentrasi enzim. Kombinasi optimal dari ketiga parameter ini (pH 6, waktu 18 jam, dan enzim 1,5%) menghasilkan kadar protein tertinggi. Sebaliknya, kombinasi yang tidak sinkron (misalnya pH 4, waktu 24 jam, enzim 1,5%) meskipun dengan enzim optimal tetap menghasilkan kadar protein rendah, menandakan pentingnya sinkronisasi kondisi ekstraksi.

Tabel 51. Anova Analisis Kadar Protein

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	22.66	3	7.55	14.82	0.0008	significant
A-pH Ekstraksi	20.33	1	20.33	39.89	0.0001	
B-Waktu Ekstraksi	1.95	1	1.95	3.83	0.0821	
C-konsentrasi Enzim Papain	0.3785	1	0.3785	0.7426	0.4112	
Residual	4.59	9	0.5096			
Cor Total	27.25	12				

Model Polinomial yang direkomendasikan oleh Desain Expert versi 13 untuk respon kadar protein adalah model *Linear*. Dilihat dari ANOVA pada aplikasi *Desain Expert* menunjukkan hasil pada model yaitu *significant* dengan nilai *P-value* memiliki nilai lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,0008. Artinya formulasi yang dibuat berpengaruh nyata terhadap respon kadar protein.

Berdasarkan hasil analisis varians (ANOVA) yang ditampilkan pada Tabel 51, diketahui bahwa model regresi yang dibentuk dari faktor-faktor pH ekstraksi (A), waktu ekstraksi (B), dan konsentrasi enzim papain (C) secara keseluruhan signifikan terhadap respon kadar protein, dengan nilai F sebesar 14,82 dan p-value sebesar 0,0008 ($< 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa model layak digunakan untuk menjelaskan hubungan antara variabel bebas dengan respon yang diamati.

Dari ketiga faktor yang diuji, faktor pH ekstraksi (A) menunjukkan pengaruh yang paling signifikan terhadap respon, dengan nilai F sebesar 39,69 dan p-value sebesar 0,0001, yang jauh di bawah batas signifikansi 0,05. Hal ini mengindikasikan bahwa perubahan pada pH ekstraksi memberikan dampak nyata terhadap kadar protein yang dihasilkan.

Sementara itu, faktor waktu ekstraksi (B) dan konsentrasi enzim papain (C) menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan, dengan p-value masing-masing sebesar 0,0821 dan 0,4112. Artinya, secara statistik, perubahan pada waktu

ekstraksi dan konsentrasi enzim papain tidak memberikan perubahan yang berarti terhadap kadar protein dalam kondisi dan rentang yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 52. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein

Fit Statistics

Std. Dev.	0.7139		R²	0.8317
Mean	39.09		Adjusted R²	0.7755
C.V. %	1.83		Predicted R²	0.6486
			Adeq Precision	9.8087

Berdasarkan tabel hasil *Fit Statistic* kadar air menunjukkan nilai R² sebesar 0,8317. Nilai adjusted R² sebesar 0,7755 dan predicted R² sebesar 0,6486 maka selisih perbedaannya kurang dari 0,2 menunjukkan bahwa model dapat dikatakan baik. Nilai adeq precision lebih besar dari 4 yaitu sebesar 9,8087 yang berarti sudah menunjukkan sinyal yang memadai.

Tabel 53. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein

Coefficients in Terms of Coded Factors

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	39.32	1	0.2011	38.86	39.77	
A-pH Ekstraksi	1.45	1	0.2293	0.9296	1.97	1.0000
B-Waktu Ekstraksi	-0.4937	1	0.2524	-1.06	0.0772	1.0000
C-konsentrasi Enzim Papain	-0.2175	1	0.2524	-0.7885	0.3535	1.0000

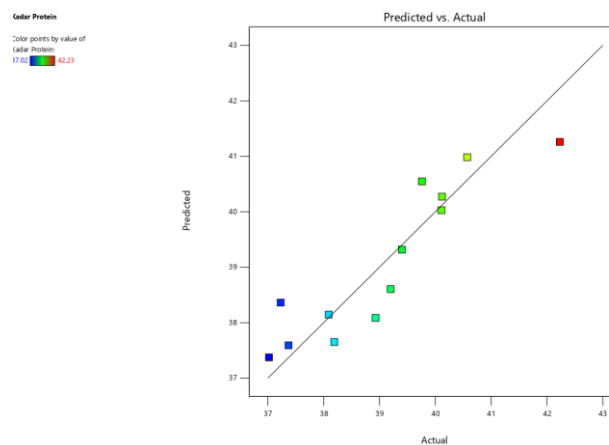
Persamaan model matematika untuk analisis respon kadar protein merupakan koefisien dari setiap faktor yang terdapat pada persamaan berikut:

$$Y = 39,32 + (A)1,45 - (B)0.4937 - (C)0,2175$$

Berdasarkan poliminial dapat disimpulkan bahwa komponen A (pH Ekstraksi) 1,45, Komponen B (waktu Ekstraksi) -0,4937, Komponen C (Konsentrasi Asam Asetat) -0,2175, berpengaruh terhadap respon kadar protein.

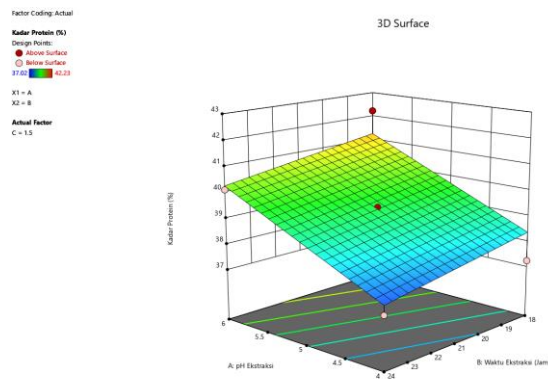
Komponen yang paling tinggi berkontribusi terhadap nilai analisis kadar protein pada produk kolagen dari kulit ikan nila hitam yaitu interaksi koefisien A (pH Ekstraksi), hal ini ditandai dengan interaksi A memiliki nilai yang paling tinggi yaitu sebesar 1,45 apabila dibandingkan dengan koefisien lainnya

Untuk melihat perbedaan antara data aktual formulasi dengan nilai prediksi yang didapatkan dari tabel ANOVA dapat dilihat pada Grafik *internally studentized residual* dari respons kadar protein pada berikut :



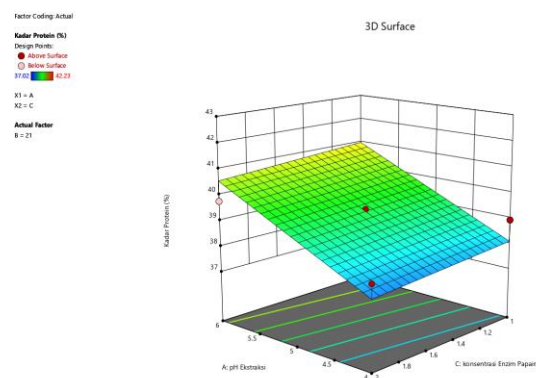
Gambar 35. Grafik Kenormalan *internally studentized residuals* Kadar Protein

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis 13 formula setiap titik mendekati garis normal, hal ini menunjukkan bahwa data hasil analisis menyebar normal dan model sesuai dengan asumsi dari ANOVA program *Design Expert*.



Gambar 36. Grafik 3D *Surface* Variabel AB Respons Kadar Protein

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AB terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar protein. Permukaan grafik menunjukkan gradasi warna dari biru ke hijau, kuning, hingga merah, yang merepresentasikan peningkatan kadar protein. Warna biru menunjukkan kadar protein yang rendah (sekitar 41,0%), sedangkan warna merah menunjukkan kadar protein yang tinggi (sekitar 47,5%). Warna-warna terang seperti kuning hingga merah muncul pada kombinasi pH tinggi dan waktu inkubasi yang lebih lama, yang mengindikasikan bahwa kondisi tersebut menghasilkan kadar protein yang lebih tinggi.



Gambar 37. Grafik 3D *Surface* Variabel AC Respons Kadar Protein

Berdasarkan gambar grafik tiga dimensi variabel AC terlihat hubungan antara pH ekstraksi dan waktu ekstraksi (perendaman) terhadap kadar portein. Permukaan grafik menunjukkan gradasi warna dari biru ke hijau hingga kuning, yang mengindikasikan peningkatan kadar protein. Warna biru menunjukkan kadar protein yang rendah (sekitar 41,2%), sedangkan warna kuning menunjukkan kadar protein yang lebih tinggi (sekitar 47,5%). Peningkatan kadar protein terutama terjadi karena kenaikan pH, sementara pengaruh konsentrasi enzim papain relatif lebih stabil. Kombinasi pH tinggi dan konsentrasi enzim papain yang cukup memberikan hasil kadar protein tertinggi.

Kadar protein yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 34,01% – 38,23%, lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Syahril dkk. (2022) yang berkisar sebesar 82,96%, dan lebih tinggi dari penelitian Noorman (2016) yang berkisar sebesar 10,27%.

4.2.2.5 Penentuan Kondisi Optimasi

Penentuan kondisi optimasi dilakukan dengan menggabungkan variabel bebas (pH Ekstraksi, waktu fermentasi dan konsentrasi enzim papain) dan variabel respon (kadar rendemen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein) dengan bantuan *Design Expert 13*.

Tujuan dilakukannya optimasi adalah untuk mendapatkan respon yang sesuai dengan keinginan (*desirability*).

Desirability merupakan tingkat keinginan untuk mencapai hasil terbaik. Proses optimasi dilakukan dengan menetapkan batasan (*goal*) untuk kriteria respons yang diinginkan, dengan memperhatikan rentang (*range*) yang dapat

dicapai serta tingkat kepentingan (*importance*). Penetapan goal dan importance dapat dilihat pada Tabel 54.

Pada setiap respon penelitian dilakukan penetapan *goal* dan juga *importance*. Menurut Syahrul, *et. al.* (2020), importance atau kepentingan dari suatu respon akan menentukan proses optimum yang dihasilkan oleh *Design Expert* 13. Nilai importance dari suatu respon dimulai dari nilai 1 (+) hingga 5 (+++++). Semakin tinggi nilai *importance*, maka akan semakin tinggi juga kepentingan dari suatu respon untuk dicapai dalam proses optimum yang dihasilkan.

Tabel 54. *Goal* dan *Importance* Pada Optimasi Kolagen Ekstraksi Enzimatis

Variabel/Respon	<i>Goal</i>	Batas Bawah	Batas Atas	<i>Importance</i>
A= pH Ekstraksi	<i>Is In Range</i>	4	6	5 (+++++)
B= Waktu Fermentasi	<i>Is In Range</i>	18	24	5 (+++++)
C= Konsentrasi enzim papain	<i>Is In Range</i>	1	2	5 (+++++)
Kadar Rendemen	<i>Maximize</i>	15	17	5 (+++++)
Derajat Keasaman (pH)	<i>Maximize</i>	4,5	7,2	5 (+++++)
Kadar Air	<i>Minimize</i>	10,2	12,53	3 (+++)
Kadar Protein	<i>Maximize</i>	37,02	42,23	5 (+++++)

Variabel berubah pH Ekstraksi dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat importance 5 (+++++). diharapkan dapat mempertahankan pH akhir pada produk kolagen.

Variabel berubah Waktu fermentasi dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat importance 5 (+++++).diharapkan dapat mengekstraksi kolagen tanpa mengakibatkan degradasi atau denaturasi.

Variabel berubah Konsentrasi enzim papain dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat *importance* 5 (+++++).diharapkan dapat mengekstraksi kolagen tanpa merusak struktur jaringannya.

Respon kadar rendemen dioptomalkan dengan *goal maximize* dengan tingkat *importance* 5 (+++++). Diharapkan rendemen kolagen memiliki kadar rendemen yang tinggi, karena kualitas kolagen dilihat dari Rendemen Kolagennya.

Respon Derajat keasaman (pH) dioptimalkan dengan *goal is in range* dengan tingkat *importance* 5 (+++++). Diharapkan pH kolagen memiliki pH yang tidak terlalu rendah dan tidak terlalu tinggi sesuai dengan SNI karena Respon kadar air dioptimalkan dengan *goal minimize* dengan tingkat *importance* 3 (+++). Kadar air yang diharapkan pada kolagen kulit ikan nila hitam yaitu memiliki kadar air yang tidak terlalu tinggi sesuai dengan SNI pada tahun, kadar air kolagen memiliki maksimal 13%.

Respon kadar protein dioptomalkan dengan *goal maximize* dengan tingkat *importance* 5 (+++++). Diharapkan protein kolagen memiliki kadar protein yang tinggi.

Setelah melakukan penetapan *goal* dan *importance* dari setiap variabel dan respon maka *Design Expert* akan memberikan rekomendasi optimasi terbaik beserta nilai *desirability* dan prediksi hasil pengujian respon. optimasi optimal kolagen dari kulit ikan nila hitam yang direkomendasikan oleh program *Design Expert* dapat dilihat pada Tabel 55.

Tabel 55. Rekomendasi Optimasi Optimal dari Program *Design Expert*.

Solutions
58 Solutions found

Number	pH Ekstraksi	Waktu Ekstraksi	Konsentrasi Enzim Papain	Rendemen Kolagen	Derajat Keasaman	Kadar Air	Kadar Protein	Desirability	
1	5.485	20.845	1.000	16.149	6.291	11.673	40.022	0.478	Selected
2	5.485	20.854	1.000	16.149	6.291	11.673	40.021	0.478	
3	5.484	20.820	1.000	16.149	6.291	11.674	40.025	0.478	
4	5.488	20.892	1.000	16.150	6.292	11.672	40.019	0.478	
5	5.480	20.776	1.000	16.147	6.290	11.675	40.027	0.478	
6	5.489	20.878	1.000	16.151	6.293	11.674	40.023	0.478	
7	5.478	20.750	1.000	16.146	6.288	11.675	40.028	0.478	
8	5.490	20.929	1.000	16.150	6.292	11.671	40.015	0.478	
9	5.493	20.958	1.000	16.152	6.294	11.671	40.016	0.478	
10	5.476	20.707	1.000	16.146	6.289	11.677	40.033	0.478	
11	5.472	20.665	1.000	16.144	6.286	11.677	40.034	0.478	
12	5.470	20.618	1.000	16.144	6.286	11.679	40.039	0.478	
13	5.499	21.065	1.000	16.154	6.295	11.668	40.006	0.478	
14	5.466	20.590	1.000	16.142	6.284	11.678	40.038	0.478	
15	5.499	21.103	1.000	16.153	6.293	11.665	40.000	0.478	
16	5.468	20.559	1.000	16.144	6.287	11.682	40.046	0.478	
17	5.506	21.150	1.000	16.156	6.298	11.666	40.001	0.478	
18	5.460	20.506	1.000	16.140	6.282	11.680	40.044	0.478	
19	5.462	20.434	1.000	16.143	6.287	11.686	40.058	0.478	
20	5.516	21.301	1.000	16.160	6.301	11.663	39.991	0.478	
21	5.451	20.462	1.000	16.134	6.275	11.677	40.038	0.478	
22	5.453	20.366	1.000	16.138	6.281	11.685	40.056	0.478	
23	5.513	21.363	1.000	16.157	6.296	11.657	39.977	0.478	
24	5.524	21.359	1.000	16.164	6.306	11.664	39.993	0.478	
25	5.437	20.227	1.000	16.130	6.272	11.684	40.056	0.478	
26	5.524	21.534	1.000	16.160	6.299	11.652	39.964	0.478	
27	5.439	20.100	1.000	16.134	6.279	11.694	40.080	0.478	
28	5.515	21.507	1.000	16.155	6.292	11.648	39.956	0.478	
29	5.518	21.560	1.000	16.155	6.292	11.646	39.951	0.478	
30	5.428	19.947	1.000	16.130	6.275	11.697	40.089	0.478	
31	5.423	19.870	1.000	16.128	6.273	11.699	40.095	0.478	
32	5.539	21.838	1.000	16.164	6.300	11.641	39.935	0.478	
33	5.400	19.662	1.000	16.118	6.261	11.698	40.098	0.478	
34	5.407	19.624	1.000	16.123	6.269	11.705	40.113	0.478	
35	5.403	19.571	1.000	16.121	6.267	11.706	40.116	0.478	
36	5.398	19.506	1.000	16.119	6.265	11.707	40.120	0.478	
37	5.581	22.150	1.000	16.185	6.326	11.647	39.943	0.478	
38	5.387	19.306	1.000	16.117	6.264	11.714	40.138	0.478	
39	5.379	19.262	1.000	16.112	6.258	11.711	40.133	0.478	
40	5.600	22.592	1.000	16.189	6.326	11.630	39.898	0.478	
41	5.367	19.027	1.000	16.109	6.256	11.719	40.154	0.478	
42	5.368	18.944	1.000	16.111	6.260	11.725	40.170	0.478	
43	5.620	22.765	1.000	16.199	6.338	11.632	39.898	0.478	

Terdapat beberapa optimasi yang direkomendasi oleh program *Design-Expert* 13 satu dari solusi yang ada dipilih sebagai optimasi yang optimal. Optimasi yang dipilih yaitu optimasi no 1 yang memiliki *desirability* sebesar 0,478 artinya optimasi tersebut dapat menghasilkan produk yang memiliki optimasiasi sekitar 47,8%.

4.2.2.6 Verifikasi Kondisi Optimal

Optimasi yang dihasilkan oleh *Design Expert* akan dianalisis kembali berdasarkan respon kimia yaitu Rendemen Kolagen, derajat keasaman (pH), kadar air, dan kadar protein. Tujuan dari tahap verifikasi adalah untuk mengetahui nilai aktual dari optimasi dan dibandingkan dengan prediksi yang dihasilkan oleh *Design Expert*. *Design Expert* akan menghasilkan *confidence interval* (CI) dan *prediction interval* (PI) untuk setiap nilai prediksi respon pada taraf signifikansi

5%. *Confident interval* (CI) merupakan rentang yang menunjukkan ekspektasi rata-rata hasil pengukuran berikutnya dan untuk mengatasi kesalahan acak dari banyaknya data. *Prediction interval* (PI) merupakan rentang yang menunjukkan ekspektasi hasil pengukuran respon berikutnya dengan kondisi yang sama (Engelen, 2015). Oleh karena itu, CI dan PI perlu dibandingkan untuk mengkonfirmasi bahwa hasil verifikasi berbeda pada kisaran menunjukkan nilai ketepatan respon. Rentang nilai *confidence interval* (CI) akan lebih kecil jika dibandingkan dengan rentang nilai *prediction interval* (PI), karena pengukuran prediction interval (PI) melibatkan beragam variasi sampel yang tidak diketahui untuk gambaran hasil sampel produk akhir berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan (Rahmadania, 2023).

Tabel 56. Hasil Verifikasi Optimasi Optimal

Respon	Prediksi	Aktual	Std. Dev	95% CI Low	95% CI High	95% PI Low	95% PI High
Rendemen Kolagen	15.9908	15.9908	0.348812	15.7685	16.2131	14.3325	17.6491
Derajat Keasaman (pH)	6.14127	6.14127	0.527709	5.80497	6.47757	3.63245	8.65009
Kadar Air	11.3692	11.3692	0.567952	11.0073	11.7312	8.66906	8.66906
Kadar Protein	39.3167	39.3167	0.713885	38.8617	39.7716	35.9227	42.7106

Berdasarkan hasil verifikasi optimasi optimal, respon Rendemen Kolagen memenuhi 95% *Prediction Interval* (PI) dan memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI). Respon Derajat keasaman (pH) tidak memenuhi 95% Prediction Interval (PI) dan tidak memenuhi 95% Confidence Interval (CI). respon kadar air memenuhi

95% *Prediction Interval* (PI) dan memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI). Respon kadar protein melebihi 95% *Prediction Interval* (PI) dan tidak memenuhi 95% *Confidence Interval* (CI).

4.2.2.7 Hasil Optimasi Terpilih

Berikut hasil analisis optimasi yang telah dilakukan terhadap respon rendemen kolagen beserta spesifikasi hasil lainnya.

Tabel 57. Hasil Analisis Optimasi Terpilih Ekstraksi Metode Enzimatis

Sampel	Variabel	Rendemen Kolagen	Derajat Keasaman (pH)	Kadar Air	Kadar Protein
Optimasi Terpilih	pH ekstraksi = pH 6	17%	7,2	12,11%	42,23%
	Waktu Fermentasi = 18 Jam				
	Konsentrasi Enzim Papain = 1,5%				

Hasil optimal yang terpilih metode enzimatis yang dicapai yaitu pH ekstraksi 6, waktu fermentasi 18 jam dan konsentrasi enzim papain 1,5%. Pada kondisi optimal tersebut rendemen kolagen yang dihasilkan 17% sedangkan untuk spesifikasi yang lainnya seperti pH menghasilkan pH 7,2, kadar air menghasilkan 12,11%, dan kadar protein menghasilkan 42,23%.

4.2.3 Perbandingan Spesifikasi Kolagen Yang Dihasilkan Metode Ekstraksi dengan Metode Enzimatis

Rendemen Kolagen yang dihasilkan dengan metode ekstraksi maserasi dengan rendemen tertinggi yaitu sebesar 14,48%, untuk spesifikasi yang lain seperti pH yaitu pH 6, Kadar Air 10,34%, dan kadar protein sebesar 34,01%, Sedangkan Rendemen Kolagen yang dihasilkan dengan metode ekstraksi enzimatis dengan rendemen tertinggi yaitu sebesar 17%, untuk spesifikasi yang lain seperti pH yaitu pH 7,2, Kadar Air 12,11%, dan kadar protein sebesar 42,23%

V. KESIMPULAN DAN SARAN

Setelah dilakukan analisis dan pembahasan terhadap data yang diperoleh selanjutnya ditarik kesimpulan sebagai jawaban terhadap identifikasi masalah sekaligus pembahasan hipotesis. Saran yang diajukan merupakan langkah lanjut dalam aplikasi kesimpulan di bahasan teknis.

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kondisi optimal metode maserasi yang dicapai yaitu pH ekstraksi 4, waktu ekstraksi 24 jam dan konsentrasi asam asetat 1M. Pada kondisi optimal tersebut rendemen kolagen yang dihasilkan 14,48% sedangkan untuk spesifikasi yang lainnya seperti pH menghasilkan pH 6, kadar air menghasilkan 10,34%, dan kadar protein menghasilkan 34,01%.
2. Kondisi optimal metode enzimatis yang dicapai yaitu pH ekstraksi 6, waktu fermentasi 18 jam dan konsentrasi enzim papain 1,5%. Pada kondisi optimal tersebut rendemen kolagen yang dihasilkan 17% sedangkan untuk spesifikasi yang lainnya seperti pH menghasilkan pH 7,2, kadar air menghasilkan 12,11%, dan kadar protein menghasilkan 42,23%.
3. Dari 2 metode yang digunakan antara ekstraksi metode maserasi dengan metode enzimatis, diketahui perbandingan metode yang hasilnya tinggi yaitu metode ekstraksi enzimatis.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat disampaikan yaitu sebagai berikut:

1. Dalam produk kolagen dari bahan baku kulit ikan nila hitam disarankan untuk metode maserasi agar menghasilkan kondisi yang optimal yaitu pada pH ekstraksi 4, waktu ekstraksi 24 jam, dan konsentrasi asam asetat 1 M.
2. Dalam produk kolagen dari bahan baku kulit ikan nila hitam disarankan untuk metode enzimatis agar menghasilkan kondisi yang optimal yaitu pada pH ekstraksi 6, waktu fermentasi 18 jam, dan konsentrasi enzim papain 1,5%
3. Perlu diperhatikan waktu dan suhu yang digunakan selama proses pembuatan kolagen karena mempengaruhi hasil atau kualitas dari kolagen.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainallaudia, F., F., Suminto dan R. A. Nugroho. 2017. **Pengaruh Pemberian Recombinant Growth Hormone (rGH) Dengan Dosis Berbeda Pada Pakan Komersial Terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan, Pertumbuhan dan Kelulushidupan Benih Ikan Patin (P. pangasius).** Jurnal Sains Akuakultur Tropis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro. Semarang. Vo.1 (1):1-9.
- Anggraini, Aridita; Yunianta. (2015). **Pengaruh Suhu dan Lama Hidrolisis Enzim Papain Terhadap Sifat Kimia, Fisik dan Organoleptik Sari Edamame.** Jurnal Pangan dan Agroindustri; 3(3): 1015 – 1025.
- Anggraini, T., Susilo, G., & Nurhayati, R. (2015). **Pengaruh pH dan konsentrasi substrat terhadap aktivitas papain.** *Jurnal Teknologi Pangan*, 10(2), 45–52.
- AOAC. 1995. **Official Methods of Analysis of The Association Analytical Chemist.** Washington D.C
- AOAC. 2003. **Official Methods of Analysis. 16th Ed (Revision 2).** AOAC. International. Gathersburg. M.D. USA,
- Ariffin, F., Bakar, J., Tan, C. P., Rahman, R. A., Karim, R., & Loi, C. C. (2009). **Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil.** *Food Chemistry*, 114(2), 561–564.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.087>
- Arumugam, G.K.S., Sharma, D., Balakrishnan, R.M., and Ettiyappan, J.B.P. (2018). **Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin.** *Sustainable Chemistry and Pharmacy*.
- Arvanitoyannis, I. S., & Ladas, D. (2008). **Application of enzymes in the food industry: A review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(3), 217–279.
- Asam terhadap Mutu Kolagen dari Kulit Ikan Patin,** Jurnal
- Astiana, I. (2016). **Optimasi ekstraksi kolagen dari limbah kulit ikan.** *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*, 5(1
- Asyiraf, N., 2011, **Extraction of Collagen From Fish Waste and Determination of Its Physico-chemical Characteristic, Final Project, Degree of Bachelor of Science (Hons.) Food Science and Technology, Faculty of Applied Sciences, University Teknologi MARA, Selangor**
- Badan Pusat Statistik, 2019, **Produktifitas Perikanan Indonesia**, Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Blanco, M.; Vázquez, J.A.; Pérez-Martín, R.I.; Sotelo, C.G. **Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology.** *Mar. Drugs* 2019, 17, 40.
- Cahyono, Bambang. 2010. **Budidaya Ikan Tawar : Ikan Gurami, Ikan Nila, Ikan Mas.** Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Cardoso, V.S., Quelemes, P.V., Amorin, A., Primo, F.L., Gobo, G.G., Tedesco, A.C., Mafud, A.C., Mascarenhas, Y.P., Corrêa, J.R., Kuckelhaus, S.A

- et al., 2014, *Collagen Based Silver Nanoparticles for Biological Applications: Synthesis and Characterization*, *Journal of Nanobiotechnology*, 12(36): 1-9
- Carvalho, A.M.; Marques, A.P.; Silva, T.H.; Reis, R.L. *Evaluation of the potential of collagen from codfish skin as a biomaterial for biomedical applications*. *Mar. Drugs* 2018, 16, 495.
- Da Trindade Alfaro, A.; Fonseca, G.G.; Balbinot, E.; de Souza, N.E.; Prentice, C. *Yield, viscosity, and gel strength of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin: Optimization of the extraction process*. *Food Sci. Biotechnol.* 2014, 23, 765–773.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**. Jakarta. Direktorat Jendral POM – Depkes RI.
- Devi, H.L.N.A., Suptijah, P., dan Nurilmala, M., 2017, **Efektifitas Alkali dan Dominggus, Malle, dkk. (2015). Isolasi dan Karakteristik Papain Dari Buah Pepaya (*Carica papaya L*) Jenis Daun Kipas**. *Ind. J. Chem. Res* ; (2): 182 – 189
- El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., & Looze, Y. (2019). *The cysteine protease papain from *Carica papaya*: A powerful allergen and its structure–function relationships*. *Phytochemistry*, 160, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.01.002>
- Engelen, B. (2015). *Applied statistics for engineers and scientists: Understanding confidence and prediction intervals in model verification*. Amsterdam: Springer
- Fahrul. 2005. **Kajian ekstraksi gelatin dari kulit ikan tuna (*Thunnus alalunga*) dan karakteristiknya sebagai bahan baku industri farmasi**. *Thesis*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., da Silva, E. G. P., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M., ... & Neto, B. B. (2007). **Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems**. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.051>
- Gildberg, A. (2004). Enzymes for the processing of seafood by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 231–248. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.003>
- Hardiyanti, N. (2017). *Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan nila menggunakan asam asetat*
- Hardiyanti, R. (2017). *Karakteristik kolagen dari limbah kulit ikan nila (*Oreochromis niloticus*)*. Skripsi. Universitas Diponegoro.
- Herawati, D. (2020). **Penetapan tirosin sebagai standar dalam analisis hasil hidrolisis protein**. *Jurnal Kimia dan Biokimia*, 15(1), 22–30.
- Herawati, E. (2020). *Biokimia Enzim dan Aplikasinya*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Hinterwaldner, R. 1977. *Technology of Gelatin Manufacture*. Dalam: Wiratmaja, Heidi. 2006 **Perbaikan Nilai Tambah Limbah Tulang Ikan Tuna (*Tunnus sp*) Menjadi Gelatin Serta Analisis Fisika-Kimia**. Skripsi. IPB, Bogor.

- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2005). **Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) skin.** *Food Chemistry*, 93(3), 475–484.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M., 2005, **Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*),** *Food Chemistry*, 93(1): 475-484.
- Kasim, S., 2013, **Ekstraksi Kolagen Tulang Rawan Ikan Pari (*Himantura gerrardi*) dan Kulit Ikan Tuna (*Thunnus* sp) Menggunakan Variasi Jenis Larutan Asam, Majalah Farmasi dan Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar.**
- Kementerian Kelautan, & Dan Perikanan, 2022, **Produksi hasil tangkap ikan, Kementrian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia**, Jakarta.
- Kezia, E., Widjanarko, S. B., Santoso, U., & Kusharto, C. M. (2017). **Optimal conditions for collagen hydrolysis.** *Enzyme Research*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/5956216>
- Khairuman, H.SP. dan K. Amri, 2012. **Pembesaran Nila di Kolam Air Deras. PT Agro Media Pustaka.** Jakarta. hal. 9-19.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). **Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions.** *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.001>
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). **Comparative study on characteristics of gelatin from skin of brownbanded bamboo shark and blacktip shark.** *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 164–171.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shahidi, F., 2010, **Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*),** *Food Science and Technology*, 43(1): 792–800.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. & Tanaka, M. 2005. **Characterization of acid – soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*).** *Food chem.* 89:363 – 372.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). **Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81.
- Kristy, Y. 2014. **Kolagen : Perbedaan Jenis Kolagen.** Jakarta
- Kumar, M.H., Spandana, V., Poonam, T., 2011, **Extraction and determination of collagen peptide and its clinical importance from tilapia fish scales (*Oreochromis niloticus*),** *International Research Journal of Pharmacy*, 2(10): 97-99.
- Lehninger, A. L., 2010, **Dasar-dasar Biokimia, Jilid 1**, Alih bahasa, Maggi Thenawijaya, Erlangga, Jakarta.

- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2015). **Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)**. *Food Hydrocolloids*, 45, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.010>
- Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., & Regenstein, J. M. (2012). **Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.018>
- Montgomery, D., C. 2017. *Design and Analysis of Experiments 9th Edition*. English: John Wiley & Sons, Inc
- Murachi, T. (1970). "Enzymatic Hydrolysis of Proteins: A Colorimetric Assay Using Tyrosine as a Standard". *Journal of Biochemistry*, 68(1), 45–52.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G., 2004, *Characterisation of acids soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)*, *Food Chemistry*, 85(1): 81–89.
- Nagai, T, and Suzuki, N., 2000, *Isolation of Collagen from Fish Waste Material Skin, Bone and Fins*, *Journal of Food Chemistry*, 68(3): 277–281
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2007). **Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)**. *Food Chemistry*, 104(2), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.053>
- Ngili, Y. 2013. **Protein dan Enzim**. Rekayasa Sains. Bandung.
- Noorman, D. A. (2016). **Optimasi ekstraksi kolagen dari kulit ikan dengan variasi pH, waktu, dan konsentrasi asam asetat**. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*, 9(1), 55–63.
- Noorman, R. (2016). *Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan kakap merah (*Lutjanus campechanus*)*. Skripsi. Universitas Hasanuddin.
- Nurhayati, Tazwir, dan Murniyati, 2013, **Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam dari Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**, *JPB Kelautan dan Perikanan*, 8(1): 85–92.
- Nurilmala, M., A.M. Jacoeb, dan R.A Dzaky, 2017, **Karakteristik Gelatin Kulit Ikan Tuna Sirip Kuning**. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 340 – 350.
- Nurmiah, S. (2013). **Optimasi multi-tujuan untuk penentuan kondisi terbaik pada proses pengeringan pangan** [Tesis Magister, Universitas Brawijaya]. Repositori UB. <http://repository.ub.ac.id/12345>
- Octaviani, R. (2017). **Optimasi proses produksi menggunakan pendekatan statistik Response Surface Methodology**. *Jurnal Teknik Industri Indonesia*, 12(2), 45–52.
- Pasupuleti, V. K., & Demain, A. L. (2010). *Protein hydrolysates in biotechnology*. Springer.
- Peng, Y., Glauert, V., Werkmeister, J. & Ramshaw, J., 2004. *Evaluation for*

- collagen products for cosmetic application. Journal of Cosmetic Science*, 55(4), pp. 327-341.
- Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, 20(2): 255–265.
- Permata, Deivy Andhika. (2016). **Aktivitas Proteolitik Papain Kasar Getah Buah Pepaya dengan berbagai Metode Pengeringan**. Jurnal Teknologi Pertanian Andalas; 20(2): 58- 64.
- Poedjiadi, A. 2005. **Dasar-Dasar Biokimia**. UniversitasIndonesia Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F.M.T. 2005. **Dasar-Dasar Biokimia**. UI Press, Jakarta.
- Prabudi, M., Nurtama, B., & Purnomo, E. H. (2018). **Aplikasi Response Surface Methodology (RSM) dengan Historical Data pada Optimasi Proses Produksi Burger**. Jurnal Mutu Pangan: *Indonesian Journal of Food Quality*, 5(2), 109-115.
- Pranoto, Y., Lee, C.M., and Park, H.J., 2007. *Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ -carrageenan*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(5): 766–774.
- Rahayu Fadjar. (2015). **Pengaruh Waktu Ekstraksi terhadap Kualitas Kolagen**. Jurnal Akuatika.
- Raymundus, J.T., Mentang, F., Agustin, T.A., Onibala, H., Kaseger, B.E., Makapedua, D.M. dan Sanger, G. 2020. **Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Asam Asetat dan Lama Waktu Ekstraksi Kolagen dari Kulit Ikan Situhuk Hitam (Makaira indica)**. Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan. 8 (2), 44– 49.
- Rini, A. (2022). **Analisis aktivitas papain isolat dan papain pabrikan menggunakan metode spektrofotometri**. *Jurnal Biokimia Terapan*, 18(2), 101–108.
- Risnawati, Metty dan Sari Edi Cahyaningrum. 2013.” **Pengaruh Penambahan Ion Logam Ca Terhadap Aktivitas Enzim Papain**”. *UNESA Journal of Chemistry*. Volume 2 (1): 76-83.
- Risnawati, Metty, Cahyaningrum, Sari Edi. (2013). **Pengaruh Penambahan Ion Logam Ca²⁺ Terhadap Aktivitas Enzim Papain**. *Unesa Journal of Chemistry*; 2(1): 76-83.
- Safitri, Setyorini. 2014. **Cara Menggunakan pH Meter digital**. Tersedia : www.academia.edu. Diakses pada : 20 Juni 2024.
- Sahubawa, L., dan Putra, A.B.N., 2011, **Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat dan Waktu Ekstraksi Terhadap Mutu kolagen Limbah Kulit Ikan Nila Hitam**, Jurnal Teknosains, 1(1): 16-25.
- Said, A. 2007. **Budidaya Mujair dan Nila**. Azka Press. Jakarta. Hal 13.
- Sarker S.D., Latif Z., dan Gray A.I., 2006, *Nat-ural products isolation*. In: *Sarker SD, Latif Z, & Gray AI, editors. Natural Products Isolation. 2nd ed. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc.* 18: 6-10.
- Selvy, R., Susilo, G., & Prasetyo, A. (2016). **Pengaruh variasi pH dan waktu ekstraksi terhadap rendemen kolagen dari kulit ikan patin**. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*, 5(2), 89–96.
- Sembiring, TES, Reo, AR, Onibala, H., Montolalu, RI, Taher, N., Mentang, F., &

- Damongilala, LJ (2020). **Ekstraksi Kolagen Tulang Ikan Tuna (Thunnus sp) DENGAN ASAM KLOORIDA**. *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 8 (3), 107–110.
- Setyo, B.P. 2006. **Efek Konsentrasi Cromium dan Salinitas Berbeda Terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan Untuk Pertumbuhan Ikan Nila (Oreochromis niloticus)**. Tesis.Universitas Diponegoro. Semarang: 20- 25.
- Shavandi, A., Carne, A., Bekhit, A. A., & Bekhit, A. E.-D. A. (2017). **An improved method for solubilisation of collagen from bovine skin using pepsin in acetic acid**. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2419–2424. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2677-8>
- Sihombing, R. R., Simbolon, A., & Hutahaean, R. (2020). **Pengaruh konsentrasi asam asetat terhadap karakteristik kolagen dari kulit ikan lele**. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 25(1), 45–52.
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). **Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review**. *Journal of Functional Foods*, 21, 10–26.
- Simamora, G.R.R., Trilaksani, W. dan Uju. 2019. **Profiling Kolagen Gelembung Renang Ikan Patin (Pangasius sp.) Melalui Proses Enzimatis**. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22 (2), 299-310.
- Simat, T. J., & Steinhart, H. (1998). **Characterization of free and bound low molecular weight compounds in fish collagen hydrolysates**. *Food/Nahrung*, 42(3–4), 201–204.
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). **Characteristics and antioxidative activity of gelatin and gelatin hydrolysate from seabass (Lates calcarifer) skin as influenced by pretreatment**. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 110–118.
- Standar Nasional Indonesia. 2014. **Kolagen Kasar dari Kulit Ikan Syarat Mutu dan Pengolahan.. SNI 8076 :2014**.
- Stryer, L. 2000. **Biokimia**. Sadikin *et al*, Penerjemah ; Soebianto S, editor. Jakarta : EGC. Terjemahan dari : *Biochemistry*.
- Suhartono, M. T. (2011). **Enzim: Dasar teori dan aplikasinya**. Bandung: Alfabeta.
- Sumarno, Noegrohati S, Narsito dan Falah II. 2002. **Estimasi Kadar Protein dalam Bahan Pangan Melalui Analisis Nitrogen Total dan Analisis Asam Amino**. *Majalah Farmasi Indonesia*.
- Syahril, A., Yusuf, M., & Aulia, N. (2022). **Ekstraksi kolagen dari sisik ikan bandeng menggunakan metode asam**. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan Tropis*, 10(1), 30–36.
- Syahril, M., Putra, M. Y., & Ramadhani, N. F. (2022). **Karakteristik kolagen dari limbah kulit ikan patin (Pangasius hypophthalmus)**. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 95–102.
- Syahrul, R., Hermawan, D., & Mulyono, D. (2017). **Optimasi proses produksi menggunakan metode Response Surface Methodology (RSM) dan validasi model prediksi**. *Jurnal Teknologi dan Industri*, 16(2), 45–52.
- Tan, Y.; Chang, S.K. *Isolation and characterization of collagen extracted from*

- channel catfish (Ictalurus punctatus) skin*. *Food Chem.* 2018, 242, 147–155.
- Tangka'a, R. J., Mentang, F., Agustin, A. T., Onibala, H., Kaseger, B. E., Makapedua, D. M., & Sanger, G. (2020). **Pengaruh perbedaan konsentrasi asam asetat dan lama waktu ekstraksi kolagen dari kulit ikan situhuk hitam (*Makaira indica*)**. *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 8(2), 44–49.
- Taufiq, M. I., Kusumaningrum, I., dan Asikin, A. N. (2015). **Pemanfaatan ikan belida (*Notopterus chitala*) sebagai bahan baku pembuatan kerupuk kulit**. *Jurnal Teknologi Pertanian Universitas Mulawarman* 10(2) : 41–44.
- Voigt, R., 1995, **Buku Pelajaran Teknologi Farmasi**, Diterjemahkan oleh Soendani N. S., UGM Press, Yogyakarta.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). **Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*)**. *Food Chemistry*, 108(2), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.002>
- Widjaja, T. (1977). **Kualitas enzim papain dan aplikasinya**. *Jurnal Ilmu Pertanian*, 5(3), 78–85.
- Worthington Biochemical Corporation.** (2018). *Worthington Biochemical Corporation enzyme manual and tissue dissociation guide* (edisi cetak dan daring). Worthington Biochemical Corporation
- Yogiraj, Vijay et al, 2014. *Carica papaya Linn: An Overview*. *International Journal of Herbal Medicine*; 2 (5): 01-08.
- Yunia, L. (2007). **Dasar-dasar kimia dan pH dalam pangan**. Yogyakarta: Andi.
- Yusriah, Y. & Kuswytasari, N.D. (2013). **Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillium sp.*** *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 2(1): E48- E50.
- Zavareze, E. D. R., Pinto, V. Z., Klein, B., El Halal, S. L. M., Elias, M. C., & Dias, A. R. G. (2009). **Role of enzymatic treatment and time on the properties of protein isolates from rice bran**. *Food Chemistry*, 112(2), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.012>
- Zhang, F., Wang, A., Li, Z., He, S., & Shao, L. (2007). **Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*)**. *Food Chemistry*, 108(3), 830–836. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.040>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Aktivitas Enzim Papain Metode Spektrofotometer UV-Vis (Sari, 2021)

Sebanyak 0,1 gram tirosin ditimbang dan dilarutkan dengan 7 mL HCl 0,1 N dalam labu ukur kemudian ditambahkan aquadest sampai tanda batas 100 mL. Kemudian membuat larutan standar dengan deret 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm dan 100 ppm kemudian dilakukan uji spektrum dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 274 nm.

Pengujian aktivitas enzim papain dilakukan dengan metode Murachi yang dijelaskan oleh Sari (2021) dengan modifikasi. 1 mL enzim papain yang sudah diencerkan menggunakan aquades kemudian dicampur dengan 1 mL larutan kasein 1% lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Dihentikan reaksinya dengan menambahkan 2 mL larutan TCA 30% kemudian didiamkan selama 5 menit. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm (1.509,3 rcf) selama 20 menit. Kemudian supernatannya diambil dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 274 nm. Uji Aktivitas Enzim Protease (Papain) dihitung dengan rumus:

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{\text{tirosin} \times V \times Fp \times 100 \%}{P \times q}$$

Keterangan :

v = Volume total sampel (ml)

p = Jumlah enzim (ml)

q = Waktu inkubasi

fp = Faktor pengenceran

Lampiran 2. Pengujian Rendemen Kolagen (Fahrul, 2005)

Kulit ikan nila hitam utuh yang telah dibersihkan dari lendir (dicuci) dan diseka menggunakan lap, ditimbang bobotnya dengan timbangan digital. Setelah ditimbang, diperoleh bobot B1. Kemudian dilakukan pengujian sampai mendapatkan kolagen kering dan digunakan sebagai B2. Perhitungan rendemen kulit ikan nila hitam dihitung pada persamaan dibawah ini :

$$\text{Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Berat kulit ikan yang sudah dibersihkan

B2 = Berat kulit ikan nila yang sudah kolagen kering

Lampiran 3. Penentuan Nilai pH (Safitri, 2014)

Sediakan larutan yang akan diukur tingkat keasamannya, selanjutnya buka penutup elektroda pada alat pH menggunakan air khusus kemudian bersihkan dengan tissue sampai kering. Selanjutnya hidupkan alat pengukur pH lalu celupkan elektroda ke dalam cairan yang akan diukur. Kemudian tekan tombol yang bertuliskan MEAS lantas akan muncul kata HOLD dilayar, lalu tunggu beberapa saat hingga muncul angka pH yang menunjukkan nilai pH cairan tersebut.

Lampiran 4. Prosedur Analisis Kadar Air Metode Gravimetri (AOAC dalam Sudarmadji dkk, 2010)

Cawan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Cawan kemudian diangkat dan dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit, atau sampai cawan tidak terasa panas lagi, kemudian ditimbang dan dicatat beratnya (W0). Kemudian, 2 gram sampel ditempatkan dalam cawan yang diketahui beratnya dan ditimbang (W1), diikuti dengan pengeringan selama 3 jam pada suhu 105°C sampai beratnya tetap/konstan. Cawan kemudian dikeluarkan, dan dimasukkan ke dalam desikator selama 15 sampai 30 menit. Cawan beserta isinya ditimbang, dikeringkan kembali selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator sebelum ditimbang kembali (W2).

Rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(W1-W2)}{(W1-W0)} \times 100 \%$$

Keterangan:

W0 = cawan konstan

W1 = cawan konstan + sampel

W2 = cawan konstan + sampel kering

Lampiran 5. Prosedur Analisis Kadar Protein Metode Kjeldahl (AOAC dalam Sudarmadji dkk, 2010)

Dilakukan penimbangan pada sampel sebanyak 2 gram, kemudian, masukkan sampel ke dalam labu Kjeldahl 100 ml, diberi batu didih, tambahkan 5 gram K₂SO₄, 0,25 gram CuSO₄, dan tambahkan 20 ml H₂SO₄ pekat, lalu lakukan destruksi (pemanasan dalam keadaan mendidih). Setelah itu, larutan

didinginkan terlebih dahulu. Pindahkan ke dalam labu 50 ml dan encerkan dengan aquadest hingga tanda batas. Masukkan 10 ml sampel ke dalam alat destilasi, tambahkan 30 ml NaOH 30%, 5 ml Na₂SO₃ 5%, 2 butir batu didih, 2 butir granula zink (Zn) dan lakukan destilasi. Tambahkan 10 ml HCl 0,1N pada penampung destilat dan lakukan proses destilasi. Titrasi dengan larutan NaOH 0,1N dengan ditambahkan indikator PP hingga berwarna merah muda.

Rumus :

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$$

$$\% \text{ Protein} = \%N \times \text{Faktor Konversi}$$

Keterangan:

N = Normalitas NaOH standar yang digunakan

Vb = mL HCl untuk titrasi blanko

Vs = mL HCl untuk titrasi sampel

FP = Faktor pengenceran yang digunakan

BAN = Berat atom nitrogen (14,008)

Ws = Berat sampel dalam gram

Lampiran 6. Kebutuhan Bahan dan Biaya Penelitian

Tabel 58. Biaya Produksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam

Keterangan	Kebutuhan	Biaya	Total (Rp)
Bahan Baku			
Kulit Ikan Nila Hitam	20 Kg	30.000/Kg	600.000
Enzim Papain	120 gram	424.000	424.000
Peralatan			
Botol Kaca	26 Pcs	8.000	208.000
Botol Plastik	26 Pcs	3.500	91.000
Stereofoam ukuran 2 Kg	2 Pcs	20.000	40.000
Lain – lain		176.000	176.000
Jumlah			1.539.000

Tabel 59. Biaya Analisis Produk

Keterangan	Harga/Sampel (Rp)	Sampel	Total (Rp)
Ekstraksi Enzimatis			
Freezedrying	25.000/ Jam (Kapasitas 8)	13 (17,5 Jam)	875.000
pH	3.000	13	39.000
Kadar Air	3.000	13	39.000
Kadar Protein	55.000	13	715.000
Ekstraksi Maserasi			
Freezedrying	25.000/ Jam (Kapasitas 8)	13 (27 Jam)	1.350.000
Ph	3.000	13	39.000
Kadar Air	3.000	13	39.000
Kadar Protein	55.000	13	715.000
Biaya Laboratorium			250.000
Jumlah			4.061.000

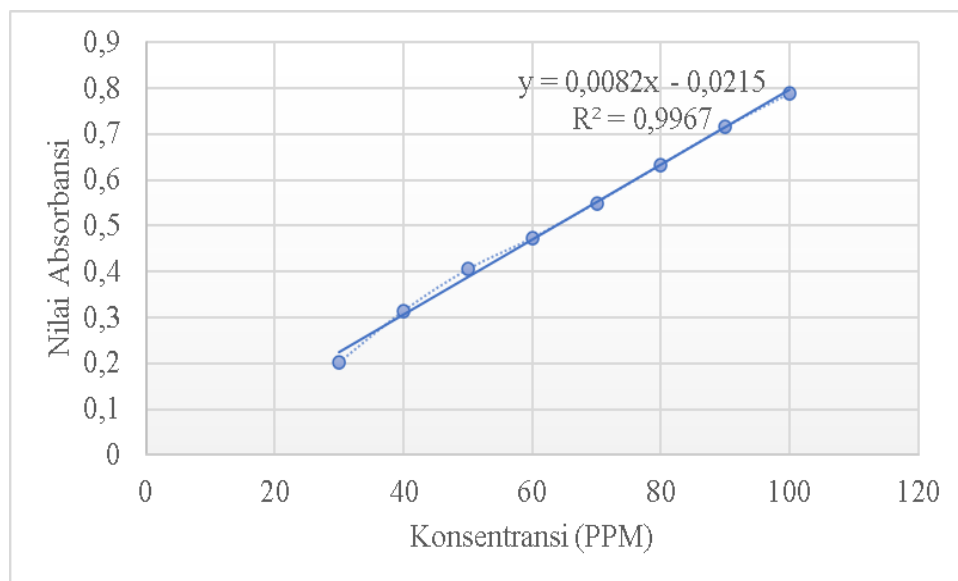
Tabel 60. Total Biaya Keseluruhan Penelitian

Total Biaya Kegiatan Penelitian	Jumlah (Rp)
Biaya Produksi Kolagen Kulit Ikan Nila Hitam	1.539.000
Biaya Analisis Produk	4.061.000
Total Keseluruhan	5.600.000

Lampiran 7. Uji Aktivitas Enzim Papain

Tabel 61. Absorbansi Larutan Tirosin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
30	0,202
40	0,314
50	0,405
60	0,473
70	0,550
80	0,633
90	0,715
100	0,788



Gambar 38. Kurva Larutan Tirosin Standar

Tabel 62. Aktivitas Enzim Papain Murni Powder

Absorbansi	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
0,494	83,821

Tabel 63. Aktivitas Enzim Papain Produk

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
1	5	21	1,5	14,86 (±0,44)
2	6	18	1,5	13,895 (±1,12)
3	4	18	1,5	10,37 (±2,14)
4	5	18	1	10,69 (±0,28)
5	6	21	1	10,225 (±0,54)
6	4	24	1,5	8,045 (±0,23)
7	5	24	1	19,703 (±0,63)
8	5	18	2	8,962 (±0,82)
9	6	21	2	18,5 (±0,30)
10	5	24	2	10,945 (±0,64)
11	4	21	2	12,12 (±1,40)
12	6	24	1,5	21,805 (±1,75)
13	4	21	1	15,48 (±1,54)

Rumus :

$$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{P \times q} \times 100\%$$

Keterangan :

v = Volme total sampel (ml)

p =Jumlah enzim (ml)

q = Waktu inkubasi

fp = Faktor pengenceran

Tabel 64. Perhitungan Uji Aktivitas Enzim

<i>Run</i>	Unit/mL
1	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{11,38 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 15,17\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{10,91 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 14,55\ \text{Unit/mL (UA2)}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $= 14,86\ \text{Unit/mL}$
2	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{11,02 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 14,69\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{9,82 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 13,10\ \text{Unit/mL (UA2)}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $= 13,895\ \text{Unit/mL}$
3	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{8,91 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 11,88\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{6,65 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 8,86$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{11,88 + 8,86}{2}$ $= 10,37\ \text{Unit/mL}$
4	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$

<i>Run</i>	Unit/mL
	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{8,17 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 10,89\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{7,87 \times 4 \times 10}}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{7,87 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 10,49\ \text{Unit/mL}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{10,89 + 10,49}{2}$ $= 10,69\ \text{Unit/mL}$
5	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{7,96 \times 4 \times 10}}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{7,96 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 10,61\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{7,38 \times 4 \times 10}}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{7,38 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 9,84\ \text{Unit/mL (UA2)}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{10,61 + 9,84}{2}$ $= 10,225\ \text{Unit/mL}$
6	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{6,16 \times 4 \times 10}}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{6,16 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 8,21\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{5,91 \times 4 \times 10}}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{5,91 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 7,88\ \text{Unit/mL (UA2)}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{8,21 + 7,88}{2}$ $= 8,045\ \text{Unit /mL}$
7	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{15,11 \times 4 \times 10}}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{15,11 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$

<i>Run</i>	Unit/mL
	$= 20,146 \text{ Unit/mL (UA1)}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{14,45 \times 4 \times 10}}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{14,45 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 19,26 \text{ Unit/mL (UA2)}$ $Unit \text{ Aktivitas} = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit \text{ Aktivitas} = \frac{20,146 + 19,26}{2}$ $= 19,703 \text{ Unit/mL}$
8	$Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{7,16 \times 4 \times 10}}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{7,16 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 9,546 \text{ Unit/mL (UA1)}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{6,28 \times 4 \times 10}}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{6,28 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 8,38 \text{ Unit/mL}$ $Unit \text{ Aktivitas} = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit \text{ Aktivitas} = \frac{9,546 + 8,38}{2}$ $= 8,963 \text{ Unit/mL}$
9	$Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{14,03 \times 4 \times 10}}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{14,03 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 18,71 \text{ Unit/mL (UA 1)}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{13,72 \times 4 \times 10}}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{13,72 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 18,29 \text{ Unit/mL}$ $Unit \text{ Aktivitas} = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit \text{ Aktivitas} = \frac{18,71 + 18,29}{2}$ $= 18,5 \text{ Unit/mL}$
10	$Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{X \times Y \times Fp}{\frac{p \times q}{8,55 \times 4 \times 10}}$ $Uji \text{ Aktivitas (UA)} = \frac{8,55 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 11,4 \text{ Unit/mL}$

<i>Run</i>	Unit/mL
	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{7,87 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 10,49\ \text{Unit/mL}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{11,4 + 10,49}{2}$ $= 10,945\ \text{Unit/mL}$
11	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{9,83 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 13,11\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{8,35 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 11,13\ \text{Unit/mL (UA2)}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{13,11 + 11,13}{2}$ $= 12,12\ \text{Unit/mL}$
12	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{17,28 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 23,04\ \text{Unit/mL (UA1)}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{15,43 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 20,57\ \text{Unit/mL (UA2)}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{23,04 + 20,57}{2}$ $= 21,805\ \text{Unit/mL}$
13	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{12,43 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 16,57\ \text{Unit/mL}$ $Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{X \times Y \times Fp}{p \times q}$

<i>Run</i>	Unit/mL
	$Uji\ Aktivitas\ (UA) = \frac{10,79 \times 4 \times 10}{1 \times 30}$ $= 14,39\ \text{Unit/mL}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{UA1 + UA2}{2}$ $Unit\ Aktivitas = \frac{16,57 + 14,39}{2}$ $= 15,48\ \text{Unit/mL}$

Lampiran 8. Hasil Analisis Rendemen Kolagen Metode Ekstraksi Maserasi

Tabel 65. Hasil Analisis Rendemen

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Rendemen %
1	6	21	0,5	14,02
2	5	24	1,5	12,92
3	5	21	1	13,68
4	5	24	0,5	13,56
5	5	18	1,5	12,68
6	6	21	1,5	12,32
7	6	24	1	13,77
8	4	21	1,5	13,22
9	4	18	1	12,47
10	5	18	0,5	12,49
11	6	18	1	12,33
12	4	24	1	14,48
13	4	21	0,5	13,22

Perhitungan Rendemen Metode Ekstraksi Maserasi :

Rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Bobot Sebelum

B2 = Bobot Sesudah

Tabel 66. Perhitungan Rendemen Kolagen

Run	Rendemen Kolagen
1	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,608}{40} \times 100\%$ $= 14,02\%$
2	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,168}{40} \times 100\%$ $= 12,92\%$
3	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,472}{40} \times 100\%$ $= 13,68\%$
4	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,424}{40} \times 100\%$ $= 13,56\%$
5	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,072}{40} \times 100\%$ $= 12,68\%$
6	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{4,928}{40} \times 100\%$ $= 12,32\%$
7	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,508}{40} \times 100\%$ $= 13,77\%$
8	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,328}{40} \times 100\%$ $= 13,22\%$
9	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{4,988}{40} \times 100\%$ $= 12,47\%$
10	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{4,996}{40} \times 100\%$ $= 12,49\%$
11	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{4,932}{40} \times 100\%$

Run	Rendemen Kolagen
	= 12,33%
12	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,792}{40} \times 100\%$ = 14,48%
13	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{5,328}{40} \times 100\%$ = 13,22%

Lampiran 9. Hasil Analisis Rendemen Kolagen Metode Ekstraksi Enzimatis

Tabel 67. Hasil Analisis Rendemen

Run	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Rendemen %
1	5	21	1,5	15,78
2	6	18	1,5	17
3	4	18	1,5	15,20
4	5	18	1	16,46
5	6	21	1	16,34
6	4	24	1,5	15
7	5	24	1	15,10
8	5	18	2	15,33
9	6	21	2	16,27
10	5	24	2	16,56
11	4	21	2	15,48
12	6	24	1,5	16,78
13	4	21	1	15,16

Perhitungan Rendemen Metode Ekstraksi Enzimatis :

Rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{B2}{B1} \times 100\%$$

Keterangan :

B1 = Bobot Sebelum

B2 = Bobot Sesudah

Tabel 68. Perhitungan Rendemen Kolagen

<i>Run</i>	Rendemen Kolagen
1	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,312}{40} \times 100\%$ $= 15,78\%$
2	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,8}{40} \times 100\%$ $= 17,00\%$
3	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,08}{40} \times 100\%$ $= 15,20\%$
4	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,584}{40} \times 100\%$ $= 16,46\%$
5	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,536}{40} \times 100\%$ $= 16,34\%$
6	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6}{40} \times 100\%$ $= 15\%$
7	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,04}{40} \times 100\%$ $= 15,10\%$
8	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,132}{40} \times 100\%$ $= 15,33\%$
9	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,508}{40} \times 100\%$ $= 16,27\%$

<i>Run</i>	Rendemen Kolagen
10	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,624}{40} \times 100\%$ $= 16,56\%$
11	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,192}{40} \times 100\%$ $= 15,48\%$
12	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,712}{40} \times 100\%$ $= 16,78\%$
13	$\% \text{ Rendemen} = \frac{B_2}{B_1} \times 100\%$ $\% \text{ Rendemen} = \frac{6,064}{40} \times 100\%$ $= 15,16\%$

Lampiran 10. Hasil Analisis Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Metode Ekstraksi Maserasi

Tabel 69. Hasil Analisis Derajat Keasaman (pH)

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	pH %
1	6	21	0,5	6,5
2	5	24	1,5	5,1
3	5	21	1	6,5
4	5	24	0,5	5
5	5	18	1,5	5,5
6	6	21	1,5	4,1
7	6	24	1	4,3
8	4	21	1,5	6
9	4	18	1	6,5
10	5	18	0,5	6,5
11	6	18	1	5,2
12	4	24	1	6
13	4	21	0,5	6,5

Lampiran 11. Hasil Analisis Pengukuran Derajat Keasaman (pH) Metode Ekstraksi Enzimatis

Tabel 70. Hasil Analisis pH

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	pH %
1	5	21	1,5	6,5
2	6	18	1,5	7,2
3	4	18	1,5	4,5
4	5	18	1	6,5
5	6	21	1	7
6	4	24	1,5	4,5
7	5	24	1	4,6
8	5	18	2	5,5
9	6	21	2	6,8
10	5	24	2	6,9
11	4	21	2	5,7
12	6	24	1,5	6,7
13	4	21	1	5,5

Lampiran 12. Hasil Analisis Kadar air Metode Ekstraksi Maserasi

Tabel 71. Hasil Analisis Kadar Air

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Kadar Air %
1	6	21	0,5	10,68
2	5	24	1,5	10,46
3	5	21	1	9,18
4	5	24	0,5	9,33
5	5	18	1,5	10,21
6	6	21	1,5	10,51
7	6	24	1	9,44
8	4	21	1,5	9,68
9	4	18	1	9,37
10	5	18	0,5	11,43
11	6	18	1	11,88
12	4	24	1	10,34
13	4	21	0,5	9,61

Perhitungan Kadar Air Metode Ekstraksi Maserasi :

Rumus :

$$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = Cawan konstan

W1 = Cawan konstan + sampel

W2 = Cawan konstan + sampel kering

Tabel 72. Perhitungan Kadar Air

<i>Run</i>	Kadar Air
1	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{26,626 - 26,519}{26,626 - 25,624} \times 100\%$ $= 10,68\%$
2	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{25,618 - 25,513}{25,618 - 24,614} \times 100\%$ $= 10,46\%$
3	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{25,977 - 25,884}{25,977 - 24,964} \times 100\%$ $= 9,18\%$
4	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{24,287 - 24,192}{24,287 - 23,269} \times 100\%$ $= 9,33\%$
5	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{30,913 - 30,809}{30,913 - 29,894} \times 100\%$ $= 10,21\%$
6	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{26,628 - 26,522}{26,628 - 25,619} \times 100\%$ $= 10,51\%$

Run	Kadar Air
7	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{23,364 - 23,270}{23,634 - 22,238} \times 100\%$ $= 9,44\%$
8	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{26,201 - 26,104}{26,201 - 25,201} \times 100\%$ $= 9,68\%$
9	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{26,968 - 26,874}{26,968 - 25,965} \times 100\%$ $= 9,37\%$
10	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{23,472 - 23,357}{23,472 - 22,466} \times 100\%$ $= 11,43\%$
11	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{23,373 - 23,254}{23,373 - 22,371} \times 100\%$ $= 11,88\%$
12	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{24,232 - 24,128}{24,232 - 23,226} \times 100\%$ $= 10,34\%$
13	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{25,411 - 25,314}{25,411 - 24,402} \times 100\%$ $= 9,61\%$

Lampiran 13. Hasil Analisis Kadar air Metode Enzimatis

Tabel 73. Hasil Analisis Kadar Air

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Kadar Air %
1	5	21	1,5	12,53
2	6	18	1,5	12,11
3	4	18	1,5	10,2
4	5	18	1	12,22
5	6	21	1	11,87
6	4	24	1,5	10,67
7	5	24	1	10,7
8	5	18	2	10,85
9	6	21	2	11,97
10	5	24	2	11,25
11	4	21	2	10,56
12	6	24	1,5	11,14
13	4	21	1	10,45

Perhitungan Kadar Air Metode Ekstraksi Enzimatis :

Rumus :

$$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = Cawan konstan

W1 = Cawan konstan + sampel

W2 = Cawan konstan + sampel kering

Tabel 74. Perhitungan Kadar Air

<i>Run</i>	Kadar Air
1	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{24,579 - 24,579}{23,579 - 23,581} \times 100\%$ $= 12,53\%$
2	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{32,076 - 31,955}{32,076 - 31,077} \times 100\%$ $= 12,11\%$
3	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{30,976 - 30,854}{30,976 - 29,977} \times 100\%$ $= 10,2\%$
4	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{23,404 - 23,282}{23,404 - 22,406} \times 100\%$ $= 12,22\%$
5	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{27,623 - 27,504}{27,623 - 26,621} \times 100\%$ $= 11,87\%$
6	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{31,127 - 31,020}{31,127 - 30,125} \times 100\%$ $= 10,67\%$
7	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{23,364 - 23,270}{23,634 - 22,238} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{25,209 - 25,102}{25,209 - 24,209} \times 100\%$ $= 10,7\%$
8	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{32,079 - 31,970}{32,079 - 31,079} \times 100\%$ $= 10,85\%$
9	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $Kadar\ air\ (\%) = \frac{30,894 - 30,774}{30,894 - 29,892} \times 100\%$ $= 11,97\%$
10	$Kadar\ air\ (\%) = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$

<i>Run</i>	Kadar Air
	$\text{Kadar air (\%)} = \frac{26,723 - 26,610}{26,723 - 25,719} \times 100\%$ $= 11,25\%$
11	$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $\text{Kadar air (\%)} = \frac{25,108 - 25,002}{25,108 - 24,104} \times 100\%$ $= 10,56\%$
12	$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $\text{Kadar air (\%)} = \frac{25,211 - 25,099}{25,211 - 24,206} \times 100\%$ $= 11,14\%$
13	$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100\%$ $\text{Kadar air (\%)} = \frac{25,214 - 25,109}{25,214 - 24,209} \times 100\%$ $= 10,45\%$

Lampiran 14. Hasil Analisis Kadar Protein Metode Maserasi

Tabel 75. Hasil Analisis Kadar Protein

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Asam Asetat (M)	Kadar Protein %
1	5	21	1	35,81
2	6	21	0,5	37,56
3	5	18	1,5	36,46
4	5	24	1,5	34,21
5	6	18	1	38,23
6	4	24	1	34,01
7	6	21	1,5	36,12
8	4	18	1	34,15
9	5	18	0,5	36,22
10	5	24	0,5	35,23
11	4	21	0,5	34,18
12	6	24	1	36,89
13	4	21	1,5	34,27

Perhitungan Kadar Protein Metode Ekstraksi Maserasi :

Rumus:

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$$

$$\% \text{ Protein} = \%N \times \text{Faktor Konversi}$$

Keterangan:

N = Normalitas NaOH standar yang digunakan

Vb = mL HCl untuk titrasi blanko

Vs = mL HCl untuk titrasi sampel

FP = Faktor pengenceran yang digunakan

BAN = Berat atom nitrogen (14,008)

Ws = Berat sampel dalam gram

Tabel 76. Perhitungan Kadar Protein

<i>Run</i>	Kadar Protein
1	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 17,70) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,022 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,73% %Protein = %N × Faktor Konversi %Protein = 5,73 × 6,25 = 35,81%
2	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 17,20) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,041 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 6,01% %Protein = %N × Faktor Konversi %Protein = 6,01 × 6,25 = 37,56%
3	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 17,50) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,033 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,83% %Protein = %N × Faktor Konversi

Run	Kadar Protein
	%Protein = $5,834 \times 6,25 = 36,46\%$
4	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 18,40) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,017 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,473% %Protein = %N $\times$ Faktor Konversi %Protein = $5,473 \times 6,25 = 34,21\%$
5	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 17,40) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,027 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 6,117% %Protein = %N $\times$ Faktor Konversi %Protein = $6,117 \times 6,25 = 38,23\%$
6	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 18,10) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,029 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,441% %Protein = %N $\times$ Faktor Konversi %Protein = $5,441\% \times 6,25 = 34,01\%$
7	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 17,19) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,052 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,779% %Protein = %N $\times$ Faktor Konversi %Protein = $5,779 \times 6,25 = 36,12\%$
8	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 18,30) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,046 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,463% %Protein = %N $\times$ Faktor Konversi %Protein = $5,463 \times 6,25 = 34,15\%$
9	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,20 - 17,80) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,046 \times 1000} \times 100\%$ %Nitrogen = 5,95%

Run	Kadar Protein
	$\% \text{Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{Protein} = 5,95 \times 6,25 = 36,22\%$
10	$\% \text{Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{\frac{Ws \times 1000}{(26,20 - 17,50) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = \frac{2,033 \times 1000}{2,033 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = 5,637\%$ $\% \text{Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{Protein} = 5,637 \times 6,25 = 35,23\%$
11	$\% \text{Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{\frac{Ws \times 1000}{(26,20 - 18,20) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = \frac{2,069 \times 1000}{2,069 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = 5,468\%$ $\% \text{Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{Protein} = 5,468 \times 6,25 = 34,18\%$
12	$\% \text{Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{\frac{Ws \times 1000}{(26,20 - 17,60) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = \frac{2,055 \times 1000}{2,055 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = 5,903\%$ $\% \text{Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{Protein} = 5,903 \times 6,25 = 36,89\%$
13	$\% \text{Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{\frac{Ws \times 1000}{(26,20 - 18,30) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = \frac{2,038 \times 1000}{2,038 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{Nitrogen} = 5,484\%$ $\% \text{Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{Protein} = 5,484 \times 6,25 = 34,27\%$

Lampiran 15. Hasil Analisis Kadar Protein Metode Enzimatis

Tabel 77. Hasil analisis kadar protein

<i>Run</i>	Faktor I pH Ekstraksi	Faktor II Waktu Ekstraksi (Jam)	Faktor III Konsentrasi Enzim Papain (%)	Kadar Protein %
1	5	21	1,5	39,4
2	6	18	1,5	42,23
3	4	18	1,5	37,23
4	5	18	1	40,11
5	6	21	1	40,57
6	4	24	1,5	37,02
7	5	24	1	37,37
8	5	18	2	38,09
9	6	21	2	39,76
10	5	24	2	39,2
11	4	21	2	38,19
12	6	24	1,5	40,12
13	4	21	1	38,93

Perhitungan Kadar Protein Metode Ekstraksi Enzimatis :

Rumus:

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$$

$$\% \text{ Protein} = \%N \times \text{Faktor Konversi}$$

Keterangan:

N = Normalitas NaOH standar yang digunakan

Vb = mL HCl untuk titrasi blanko

Vs = mL HCl untuk titrasi sampel

FP = Faktor pengenceran yang digunakan

BAN = Berat atom nitrogen (14,008)

Ws = Berat sampel dalam gram

Tabel 78. Perhitungan Kadar protein

<i>Run</i>	Kadar Protein
1	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,50 - 17,00) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,054 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = 6,304\%$ $\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{ Protein} = 6,304\% \times 6,25 = 39,4\%$
2	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,50 - 16,10) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,049 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = 6,917\%$ $\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{ Protein} = 6,917\% \times 6,25 = 43,23\%$
3	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,50 - 17,60) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,036 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = 5,958\%$ $\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{ Protein} = 5,958\% \times 6,25 = 37,23\%$
4	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,50 - 16,90) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,039 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = 6,417\%$ $\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{ Protein} = 6,417\% \times 6,25 = 40,11\%$
5	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,50 - 16,80) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,037 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = 6,491\%$ $\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{ Protein} = 6,491\% \times 6,25 = 40,57\%$
6	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = \frac{(26,50 - 17,70) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,025 \times 1000} \times 100\%$ $\% \text{ Nitrogen} = 5,923\%$ $\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{ Protein} = 5,923\% \times 6,25 = 37,02\%$
7	$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(Vb - Vs) \times N \text{ NaOH} \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$

<i>Run</i>	Kadar Protein
	$\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 17,60) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,029 \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = 5,979\%$ $\%Protein = \%N \times \text{Faktor Konversi}$ $\%Protein = 5,979\% \times 6,25 = 37,37\%$
8	$\% Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 17,40) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,035 \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = 6,095\%$ $\%Protein = \%N \times \text{Faktor Konversi}$ $\%Protein = 6,095\% \times 6,25 = 38,09\%$
9	$\% Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 17,10) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,014 \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = 6,361\%$ $\%Protein = \%N \times \text{Faktor Konversi}$ $\%Protein = 6,361 \times 6,25 = 39,76\%$
10	$\% Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 17,20) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,044 \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = 6,201\%$ $\%Protein = \%N \times \text{Faktor Konversi}$ $\%Protein = 6,201\% \times 6,25 = 39,20\%$
11	$\% Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 17,40) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,030 \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = 6,110\%$ $\%Protein = \%N \times \text{Faktor Konversi}$ $\%Protein = 6,110\% \times 6,25 = 38,19\%$
12	$\% Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times Fp \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 16,90) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,038 \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = 6,420\%$ $\%Protein = \%N \times \text{Faktor Konversi}$ $\%Protein = 6,420\% \times 6,25 = 40,12\%$
13	$\% Nitrogen = \frac{(Vb - Vs) \times N NaOH \times FP \times BAN}{Ws \times 1000} \times 100\%$ $\%Nitrogen = \frac{(26,50 - 17,30) \times 0,0973 \times 10 \times 14,008}{2,013 \times 1000} \times 100\%$

<i>Run</i>	Kadar Protein
	$\% \text{Nitrogen} = 6,229\%$ $\% \text{Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor Konversi}$ $\% \text{Protein} = 6,229\% \times 6,25 = 38,93\%$

Lampiran 16. Anova Modell, Fit Statistic, dan Coefficient in Terms of Coded Factors Respon Ekstraksi Maserasi

Anova for Linear Model

Tabel 79. Anova Analisis Rendemen Kolagen

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	3.56	3	1.19	4.63	0.0319	significant
	A-pH Ekstraksi	0.1128	1	0.1128	0.4396	0.5239	
	B-Waktu Ekstraksi	2.90	1	2.90	11.32	0.0083	
	C-Konsentrasi Asam Asetat	0.5460	1	0.5460	2.13	0.1787	
	Residual	2.31	9	0.2566			
	Cor Total	5.87	12				

Tabel 80. Hasil *Fit Statistic* Rendemen Kolagen

	Std. Dev.	0.5066	R²	0.6067
	Mean	13.17	Adjusted R²	0.4756
	C.V. %	3.85	Predicted R²	0.1775
			Adeq Precision	6.1477

Tabel 81. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	13.17	1	0.1405	12.85	13.49	
	A-pH Ekstraksi	-0.1188	1	0.1791	-0.5239	0.2864	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	0.6025	1	0.1791	0.1973	1.01	1.0000
	C-Konsentrasi Asam Asetat	-0.2612	1	0.1791	-0.6664	0.1439	1.0000

Anova for Linear Model

Tabel 82. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	6.17	3	2.06	6.47	0.0126	significant
A-pH Ekstraksi	3.00	1	3.00	9.44	0.0133	
B-Waktu Ekstraksi	1.36	1	1.36	4.28	0.0684	
C-Konsentrasi Asam Asetat	1.81	1	1.81	5.68	0.0410	
Residual	2.86	9	0.3178			
Cor Total	9.03	12				

Tabel 83. Hasil *Fit Statistic* Derajat Keasaman (pH)

Std. Dev.	0.5637		R²	0.6832
Mean	5.67		Adjusted R²	0.5776
C.V. %	9.94		Predicted R²	0.3797
			Adeq Precision	6.9554

Tabel 84. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Derajat Keasaman (pH)

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	5.67	1	0.1564	5.32	6.02	
A-pH Ekstraksi	-0.6125	1	0.1993	-1.06	-0.1616	1.0000
B-Waktu Ekstraksi	-0.4125	1	0.1993	-0.8634	0.0384	1.0000
C-Konsentrasi Asam Asetat	-0.4750	1	0.1993	-0.9259	-0.0241	1.0000

Anova for 2FI Model

Tabel 85. Anova Analisis Kadar Air
Response 1: Kadar Air (1)

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	7.22	6	1.20	6.07	0.0226	significant
	A-pH	1.54	1	1.54	7.77	0.0317	
	B-Waktu Ekstraksi	1.38	1	1.38	6.95	0.0387	
	C-Konsentrasi asam Asetat	0.0045	1	0.0045	0.0228	0.8850	
	AB	2.91	1	2.91	14.67	0.0087	
	AC	0.0144	1	0.0144	0.0726	0.7965	
	BC	1.38	1	1.38	6.97	0.0386	
	Residual	1.19	6	0.1982			
	Cor Total	8.41	12				

Tabel 86. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air

Fit Statistics

	Std. Dev.	0.4452	R²	0.8586
	Mean	10.16	Adjusted R²	0.7173
	C.V. %	4.38	Predicted R²	0.7172
			Adeq Precision	8.2186

Tabel 87. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air

Coefficients in Terms of Coded Factors

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	10.16	1	0.1235	9.86	10.47	
	A-pH	0.4387	1	0.1574	0.0536	0.8239	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.4150	1	0.1574	-0.8002	-0.0298	1.0000
	C-Konsentrasi asam Asetat	-0.0237	1	0.1574	-0.4089	0.3614	1.0000

Anova for Linear Model

Tabel 88. Anova Analisis Kadar Protein

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	21.93	3	7.31	27.44	< 0.0001	significant
	A-pH	18.57	1	18.57	69.74	< 0.0001	
	B-Waktu Ekstraksi	2.78	1	2.78	10.46	0.0103	
	C-Konsentrasi asam Asetat	0.5671	1	0.5671	2.13	0.1785	
	Residual	2.40	9	0.2663			
	Cor Total	24.32	12				

Tabel 89. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein**Fit Statistics**

	Std. Dev.	0.5161		R²	0.9014
	Mean	35.64		Adjusted R²	0.8686
	C.V. %	1.45		Predicted R²	0.7837
				Adeq Precision	14.7672

Tabel 90. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein**Coefficients in Terms of Coded Factors**

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	35.64	1	0.1431	35.32	35.97	
	A-pH	1.52	1	0.1825	1.11	1.94	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.5900	1	0.1825	-1.00	-0.1772	1.0000
	C-Konsentrasi asam Asetat	-0.2662	1	0.1825	-0.6790	0.1465	1.0000

Lampiran 17. Anova for Linear Modell, Fit Statistic, dan Coeficient in Terms of Coded Factors Respon Ekstraksi Enzimatis

Anova for Linear Model

Tabel 91. Anova Analisis Rendemen Kolagen

Response 1: Kadar Rendemen

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	4.97	3	1.66	13.61	0.0011	significant
	A-pH Ekstraksi	4.89	1	4.89	40.17	0.0001	
	B-Waktu Ekstraksi	0.0378	1	0.0378	0.3108	0.5908	
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.0420	1	0.0420	0.3456	0.5711	
	Residual	1.10	9	0.1217			
	Cor Total	6.06	12				

Tabel 92. Hasil *Fit Statistic* Rendemen Kolagen

Fit Statistics

	Std. Dev.	0.3488	R²	0.8194
	Mean	15.88	Adjusted R²	0.7592
	C.V. %	2.20	Predicted R²	0.6051
			Adeq Precision	8.4454

Tabel 93. Estimasi Koefisien dari Tiap Faktor Respons Rendemen Kolagen

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	15.99	1	0.0983	15.77	16.21	
	A-pH Ekstraksi	0.7102	1	0.1120	0.4567	0.9636	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.0687	1	0.1233	-0.3477	0.2102	1.0000
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.0725	1	0.1233	-0.2065	0.3515	1.0000

Anova for Linear Model

Tabel 94. Anova Analisis Derajat Keasaman (pH)

Response 1: Kadar pH

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	9.42	3	3.14	11.28	0.0021	significant
	A-pH Ekstraksi	9.09	1	9.09	32.63	0.0003	
	B-Waktu Ekstraksi	0.1250	1	0.1250	0.4489	0.5197	
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.2112	1	0.2112	0.7586	0.4064	
	Residual	2.51	9	0.2785			
	Cor Total	11.93	12				

Tabel 95. Hasil *Fit Statistic* Derajat Keasaman (pH)

Fit Statistics

	Std. Dev.	0.5277	R²	0.7899
	Mean	5.99	Adjusted R²	0.7199
	C.V. %	8.81	Predicted R²	0.5732
			Adeq Precision	8.1529

Tabel 96. Estimasi Koefisien dari Tiap Respon Derajat Keasaman (pH)

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	6.14	1	0.1487	5.80	6.48	
	A-pH Ekstraksi	0.9683	1	0.1695	0.5848	1.35	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.1250	1	0.1866	-0.5471	0.2971	1.0000
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.1625	1	0.1866	-0.2596	0.5846	1.0000

Anova for Linear Model

Tabel 97. Anova Analisis Kadar Air

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	4.34	3	1.45	4.49	0.0346	significant
	A-pH Ekstraksi	3.97	1	3.97	12.30	0.0066	
	B-Waktu Ekstraksi	0.3280	1	0.3280	1.02	0.3396	
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.0465	1	0.0465	0.1442	0.7130	
	Residual	2.90	9	0.3226			
	Cor Total	7.25	12				

Tabel 98. Hasil *Fit Statistic* Kadar Air

	Std. Dev.	0.5680	R²	0.5993
	Mean	11.27	Adjusted R²	0.4658
	C.V. %	5.04	Predicted R²	0.3280
			Adeq Precision	5.3475

Tabel 99. Estimasi Koefisien dari Tiap Respon Kadar Air

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	11.37	1	0.1600	11.01	11.73	
	A-pH Ekstraksi	0.6398	1	0.1824	0.2272	1.05	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.2025	1	0.2008	-0.6567	0.2517	1.0000
	C-konsentrasi Enzim Papain	-0.0763	1	0.2008	-0.5305	0.3780	1.0000

Anova for Linear Model

Tabel 100. Anova Analisis Kadar Protein

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	22.66	3	7.55	14.82	0.0008	significant
	A-pH Ekstraksi	20.33	1	20.33	39.89	0.0001	
	B-Waktu Ekstraksi	1.95	1	1.95	3.83	0.0821	
	C-konsentrasi Enzim Papain	0.3785	1	0.3785	0.7426	0.4112	
	Residual	4.59	9	0.5096			
	Cor Total	27.25	12				

Tabel 101. Hasil *Fit Statistic* Kadar Protein

Fit Statistics

	Std. Dev.	0.7139	R²	0.8317
	Mean	39.09	Adjusted R²	0.7755
	C.V. %	1.83	Predicted R²	0.6486
			Adeq Precision	9.8087

Tabel 102. Estimasi Koefisien dari Tiap Respon Kadar Protein

Coefficients in Terms of Coded Factors

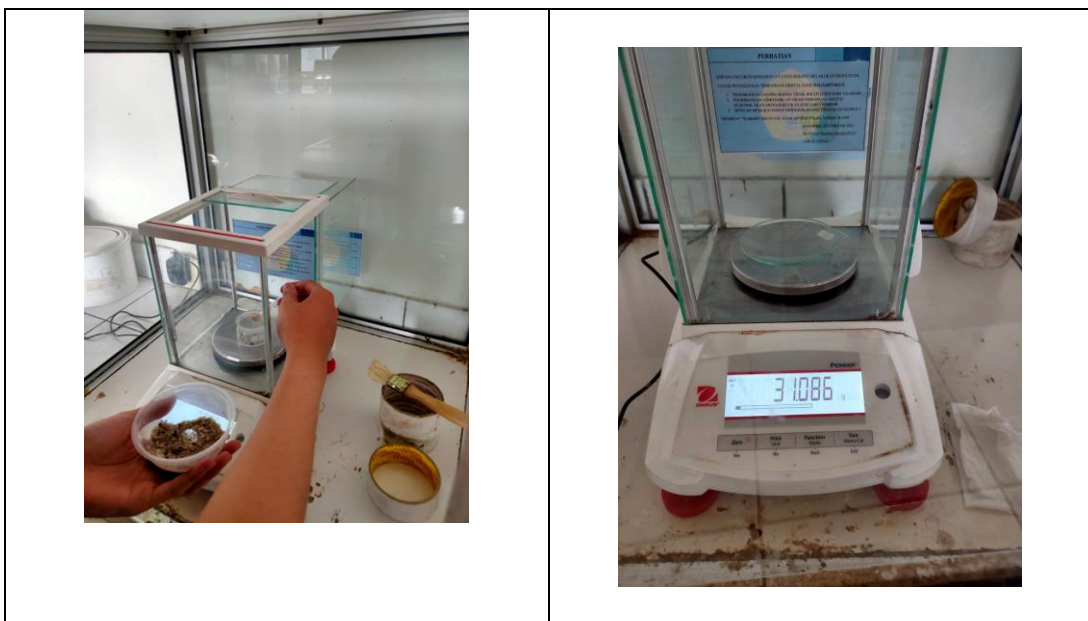
	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	39.32	1	0.2011	38.86	39.77	
	A-pH Ekstraksi	1.45	1	0.2293	0.9296	1.97	1.0000
	B-Waktu Ekstraksi	-0.4937	1	0.2524	-1.06	0.0772	1.0000
	C-konsentrasi Enzim Papain	-0.2175	1	0.2524	-0.7885	0.3535	1.0000

Lampiran 18. Dokumentasi Proses pembuatan kolagen dari kulit ikan nila Hitam

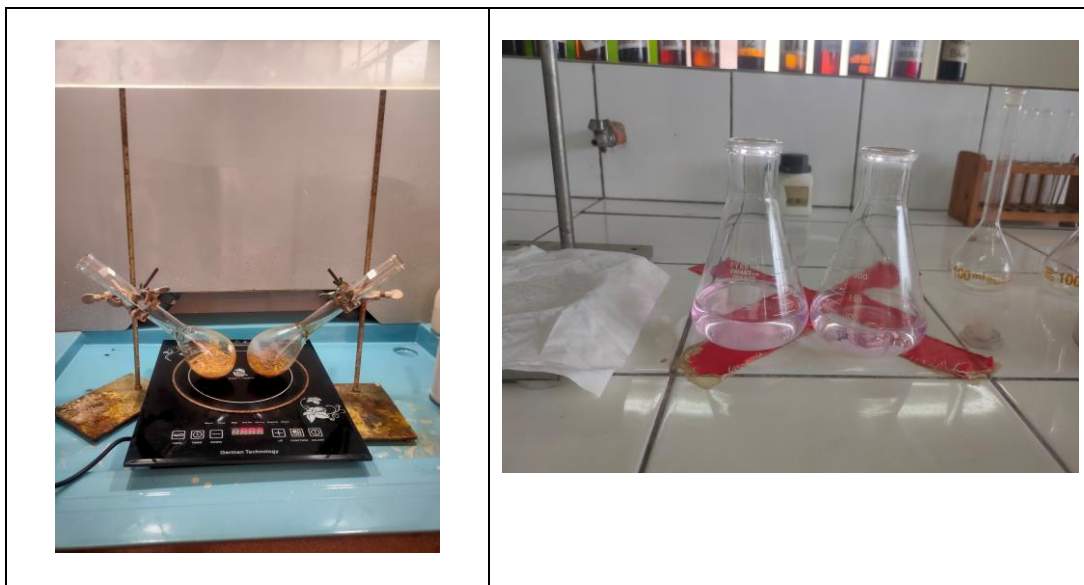


Lampiran 19. Dokumentasi Analisis kolagen dari kulit ikan nila Hitam

Gambar 39. Analisis Uji Aktivitas Enzim Papain Powder dan Produk



Gambar 40. Analisis Uji Kadar Air



Gambar 41. Analisis Uji Kadar Protein