

**ANALISIS PENGHAMBATAN KOLAGEN DARI KULIT DAN TULANG  
BELUT SAWAH TERHADAP REAKSI OKSIDASI DARI RADIKAL  
BEBAS DENGAN METODE DPPH DAN FRAP**

(Analysis of Collagen Inhibition of Skin and Eel Bone Against Oxidation  
Reactions From Free Radicals With DPPH and FRAP Methods)

**SKRIPSI**



Oleh :  
**FERANSISKA MARENTINA WIDYASARI**  
**4161017**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI**  
**SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL**  
**SURAKARTA**  
**2020**

**ANALISIS PENGHAMBATAN KOLAGEN DARI KULIT DAN TULANG  
BELUT SAWAH TERHADAP REAKSI OKSIDASI DARI RADIKAL  
BEBAS DENGAN METODE DPPH DAN FRAP**

(Analysis of Collagen Inhibition of Skin and Eel Bone Against Oxidation  
Reactions From Free Radicals With DPPH and FRAP Methods)

**SKRIPSI**

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana  
Farmasi (S.Farm) pada Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu  
Kesehatan Nasional di Surakarta**

**Oleh :  
FERANSISKA MARENTINA WIDYASARI  
4161017**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI  
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL  
SURAKARTA  
2020**

SKRIPSI

ANALISIS PENGHAMBATAN KOLAGEN DARI KULIT DAN TULANG  
BELUT SAWAH TERHADAP REAKSI OKSIDASI DARI RADIKAL BEBAS  
DENGAN METODE DPPH DAN FRAP

Analysis of Collagen Inhibition of Skin and Eel Bone Against Oxidation  
Reactions From Free Radicals With DPPH and FRAP Methods

Oleh :  
FERANSISKA MARENTINA WIDYASARI  
4161017

Dipertahankan di hadapan Penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi Sekolah  
Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Pada tanggal : 27 Agustus 2020

Pembimbing Utama

Mengetahui,  
Ketua Program Studi S1 Farmasi  
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional

Apt. Dian Puspitasari, S.Farm., M.Sc

Apt. Lusita Martisiwi, S. Farm., M. Sc

Pembimbing Pendamping

Apt. Diah Pratimasari, M.Farm

Tim Penguji

Ketua : Nastiti Utami, S. Si., M. Sc

Anggota :

1. Tesia Aisyah Rahmania, S. Si., M.Pharm. Sci
2. Apt. Dian Puspitasari, S.Farm., M.Sc
3. Apt. Diah Pratimasari, M.Farm

1. ....

2. ....

3. ....

## **MOTTO**

“ Saat kita memperbaiki hubungan dengan ALLAH, niscaya ALLAH akan memperbaiki segala sesuatu untuk kita”

“ Learn from the past, live for today and plan for tomorrow”

“ Man lam yadzuq dzulla at ta'alumu saa'atan. Tajarro'a dzulla al jahli thula hayaatihi.”

*Dengan Menyebut Nama Allah SWT*

*Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang*

*“Dan orang-orang yang berjihad untuk (mencari keridhaan) Kami, benar-benar akan Kami tunjukkan kepada mereka jalan-jalan Kami. Dan sesungguhnya Alloh benar-benar beserta orang-orang yang berbuat baik.”*

*(Al-Ankabuut: 69)*

Karya ini saya persembahkan kepada

Bapak dan Ibu Tercinta,

Suamiku dan anakku tersayang,

Kakak dan semua yang aku sayangi

## HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, 07 September 2020

MATERAI  
TEMPEL  
C952AAHF587922801  
6000  
ENAM RIBU RUPIAH  
(Ferausiana Michella Vidyasari)



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “Analisis Penghambatan Kolagen dari Kulit dan Tulang Belut Sawah Terhadap Reaksi Oksidasi dari Radikal Bebas Dengan Metode DPPH dan FRAP” sebagai salah satu syarat menyanggah gelar Sarjana Farmasi di Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Lusia Murtisiwi, S. Farm., M. Sc., Apt., selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional atas saran dan masukan yang diberikan.
2. Dian Puspitasari, M. Sc., Apt., selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, nasehat serta bantuan dalam penyelesaian skripsi.
3. Diah Pratimasari, M. Farm., Apt selaku pembimbing pendamping yang selalu memberikan motivasi, pengarahan, bimbingan, nasehat dan teladan selama penyelesaian skripsi.
5. Nastiti Utami, S. Si., M. Sc selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
6. Tesia Aisyah Rahmania, S. Si., M.Pharm. Sci selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
7. Ibu Mulyani dan bapak Suwardi selaku orang tuaku yang selalu mendoakan, memberikan nasehat dan memberikan semangat dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi.
8. Suamiku Arga Gociwa dan anakku Haidar Evano Arfa Gociwa yang selalu menjadi sumber semangatku dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi.
9. Kakakku Dewi Kusuma Wardhani yang sudah berjuang membantu mendapatkan bahan baku penelitianku, menemaniku, dan selalu mendukungku dalam penelitian dan penyusunan skripsi.
10. Kakakku Agus Setiawan dan Arie Widhi Atmoko yang selalu mendukung dan

menyemangati dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi.

11. Mbak Karni yang sudah setia menemani Arfa ketika saya sedang sibuk dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi.
12. Dhea, Ara selaku teman tim proyek penelitian yang sudah menemaniku selalu dalam penelitian.
13. Hangga, Criste, Rizki dan Garnes selaku teman satu angkatan yang selalu memberikan dukungan dalam proses penyusunan dan penelitian.
14. Teman-teman satu angkatan S1 Farmasi yang sudah berjuang bersama untuk mendapatkan gelar sarjana.
15. Staf dan Karyawan Program Studi-S1 Farmasi STIKES Nasional, Bagian Biologi Farmasi STIKES Nasional, Bagian Kimia Farmasi STIKES Nasional.
16. Pihak-pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan, baik moral maupun material. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan penelitian, ilmu pengetahuan maupun dunia medis. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Surakarta, 07 September 2020

PENULIS



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xvi
<b>INTISARI</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>BABI. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
A. Kolagen.....	5

B. Belut Sawah .....	6
1. Klasifikasi .....	7
C. Radikal Bebas .....	8
D. Antioksidan.....	9
E. Spektrofotometri .....	12
1. Pengertian Spektrofotometri .....	12
2. Prinsip Kerja Spektrofotometri .....	12
3. Hukum Lambeert-Beer .....	14
F. Metode Analisis DPPH .....	16
G. Metode FRAP .....	17
H. Landasan Teori.....	18
I. Hipotesis .....	20
J. Kerangka Konsep Penelitian.....	20
<b>BAB III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
A. Desain Penelitian .....	21
B. Alat dan Bahan .....	21
C. Variabel Penelitian .....	21
D. Prosedur Penelitian.....	22
E. Analisis Data .....	29
F. Alur Penelitian.....	31
G. Jadwal Penelitian .....	31
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
A. Isolasi Kolagen .....	32

B. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH .....	34
C. Uji Antioksidan dengan Metode FRAP .....	38
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>44</b>
A. Kesimpulan .....	44
B. Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>49</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur kolagen .....	6
Gambar 2. Morfologi Belut Sawah.....	7
Gambar 3. Instrument Spektrofotometer.....	13
Gambar 4. Reaksi Penghambatan Radikal DPPH .....	16
Gambar 5. Kerangka Konsep Penelitian .....	20
Gambar 6. Alur Penelitian.....	31
Gambar 7. Persamaan Reaksi Glisin dengan NaOH.....	33
Gambar 8. Mekanisme Reaksi Glisin dengan Asam Asetat.....	34
Gambar 9. Panjang Gelombang Maksimal DPPH.....	35
Gambar 10. Reaksi Penghambatan Radikal DPPH .....	38
Gambar 11. Reaksi FRAP dengan Antioksidan .....	39
Gambar 12. Panjang Gelombang Maksimum FRAP.....	40

## DAFTAR TABEL

Tabel.1 Tingkat Kekuatan Antioksidan .....	18
Tabel.2 Nilai IC <sub>50</sub> metode DPPH .....	37
Tabel 3. Nilai IC <sub>50</sub> metode FRAP.....	42

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan NaOH 0,1 M .....	50
Lampiran 2. Perhitungan Asam Asetat 0,5 M .....	51
Lampiran 3. Perhitungan NaCl 0,9 M.....	52
Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Kolagen .....	53
Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi DPPH.....	54
Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi FRAP .....	56
Lampiran 7. Proses Isolasi Kolagen .....	58
Lampiran 8. Pembuatan Standar Vitamin C.....	60
Lampiran 9. Pembuatan Larutan DPPH.....	61
Lampiran 10. Larutan Untuk Pengujian Antioksidan dengan DPPH .....	62
Lampiran 11. Pembuatan Reagen FRAP .....	63
Lampiran 12. Larutan Untuk Pengujian Antioksidan Dengan FRAP .....	64
Lampiran 13. Panjang Gelombang DPPH .....	65
Lampiran 14. OT Standar Pada Metode DPPH.....	66
Lampiran 15. OT Sampel Pada Metode DPPH .....	67
Lampiran 16. Absorbansi Kontrol DPPH .....	68
Lampiran 17. Tabel Hasil Pengukuran Vitamin C DPPH .....	69
Lampiran 18. Tabel Hasil Pengukuran Sampel DPPH Replikasi 1 .....	70
Lampiran 19. Tabel Hasil Pengukuran Sampel DPPH Replikasi 2.....	71
Lampiran 20. Tabel Hasil Pengukuran Sampel DPPH Replikasi 3.....	72
Lampiran 21. Tabel Hasil Pengukuran Sampel DPPH Replikasi 4.....	73

Lampiran 22. Panjang Gelombang FRAP .....	74
Lampiran 23. OT Standar Pada Metode FRAP .....	75
Lampiran 24. OT Sampel Pada Metode FRAP .....	76
Lampiran 25. Absorbansi Kontrol FRAP .....	77
Lampiran 26. Tabel Hasil Pengukuran Vitamin C FRAP .....	78
Lampiran 27. Tabel Hasil Pengukuran Sampel FRAP Replikasi 1 .....	79
Lampiran 28. Tabel Hasil Pengukuran Sampel FRAP Replikasi 2 .....	80
Lampiran 29. Tabel Hasil Pengukuran Sampel FRAP Replikasi 3 .....	81
Lampiran 30. Tabel Hasil Pengukuran Sampel FRAP Replikasi 4 .....	82
Lampiran 31. Tabel Hasil Uji Statistika .....	83
Lampiran 32. Perhitungan nilai $IC_{50}$ vitamin C DPPH.....	91
Lampiran 33. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode DPPH replikasi 1.....	92
Lampiran 34. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode DPPH replikasi 2.....	93
Lampiran 35. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode DPPH replikasi 3.....	94
Lampiran 36. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode DPPH replikasi 4.....	95
Lampiran 37. Perhitungan nilai $IC_{50}$ vitamin C FRAP .....	96
Lampiran 38. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode FRAP replikasi 1 .....	97
Lampiran 39. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode FRAP replikasi 2.....	98
Lampiran 40. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode FRAP replikasi 3 .....	99
Lampiran 41. Perhitungan nilai $IC_{50}$ metode FRAP replikasi 4.....	100

## DAFTAR SINGKATAN

DPPH	: 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
IC <sub>50</sub>	: Inhibitory Concentration 50%
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TPTZ	: 2,4,6-tripyridil-striazine
OT	: Operating Time



## INTISARI

Kulit dan tulang belut sawah (*Monopterus albus*) mengandung senyawa kolagen yang dapat digunakan sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi kolagen dari kulit dan tulang belut sawah dan untuk mengetahui aktivitas antioksidan serta mengetahui aktivitas antioksidan metode FRAP dan metode DPPH berbeda bermakna atau tidak dalam mengukur aktivitas antioksidan.

Isolasi kulit dan tulang belut sawah yang dilakukan dengan praperlakuan menggunakan basa NaOH, dan hidrolisis menggunakan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), serta *salting out* menggunakan NaCl. Isolat yang didapatkan dianalisis aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dan FRAP.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH didapatkan rata-rata nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $24,28 \pm 0,42$  ppm. Pengujian menggunakan metode FRAP didapatkan rata-rata nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $20,83 \pm 0,24$  ppm. Analisis statistik menggunakan *One sample T-test* menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara metode DPPH dan FRAP.

Kata kunci : belut sawah, kulit, tulang, isolat, antioksidan, DPPH, FRAP

## ABSTRACT

The skin and bones of asian swamp eel (*Monopterus albus*) contain collagen compounds which can be used as antioxidants. This study aims to isolate collagen from the skin and bones of asian swamp eel and to determine the antioxidant activity and to determine the antioxidant activity using DPPH and FRAP method which are significantly different or not in measuring antioxidant activity.

The isolation of the skin and bones of asian swamp eel with pretreatment using the base NaOH, and hydrolysis using acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), and salting out using NaCl. The obtained isolates were analyzed for their antioxidant activity using the DPPH and FRAP methods.

The results of testing for antioxidant activity using the DPPH method obtained average  $\text{IC}_{50}$  values of  $24,28 \pm 0,42$  ppm. Tests using the FRAP method obtained average  $\text{IC}_{50}$  values of  $20,83 \pm 0,24$  ppm. Statistical analysis using the One sample T-test showed that there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the DPPH and FRAP methods.

Keywords: asian swamp eel, skin, bone, isolate, antioxidant, DPPH, FRAP

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. LATAR BELAKANG**

Kolagen adalah protein fibrosa yang menjadi komponen utama jaringan ikat, seperti pada tulang, tendon, kulit, pembuluh darah, dan kornea mata (Marks *et al.* 2014). Kolagen memiliki kandungan hidroksiprolin, prolin dan glisin sebagai antioksidan (Katili 2009). Kolagen mengandung hidroksilisin dan hidroksiprolin yaitu asam-asam amino yang terdapat dalam beberapa protein lain. Kolagen mengandung 35% glisin dan 11% alanin; sedangkan presentase asam amino yang lebih tinggi dimiliki oleh prolin dan 4-hidroksiprolin. Asam amino ini sangat sedikit ditemukan pada protein selain pada kolagen. Tubuh manusia secara alami mampu menghasilkan kolagen, namun jumlahnya akan berkurang semakin bertambahnya usia, sehingga dibutuhkan penambahan kolagen dari luar, salah satunya kolagen komersial. Kolagen pada industri non-pangan digunakan sebagai produk kesehatan dan kecantikan. Kolagen komersial sebagian besar bersumber dari sapi dan babi yang memiliki risiko penularan penyakit, serta kepercayaan bagi pemeluk agama Islam dan Hindu, sehingga diperlukan adanya sumber alternatif kolagen (Li *et al.* 2013).

Kittiphattanabawon *et al.* (2010) menyatakan bahwa alternatif sumber kolagen dapat berasal dari bagian kulit dan tulang pada belut sawah. Dermis kulit belut sawah bagian abdomen terdiri atas dua lapisan yaitu *stratum laxum* dan *stratum compactum*. *Stratum compactum* merupakan lapisan serat kolagen yang

padat dan memberikan kekuatan mekanis dari kulit belut sawah. *Stratum compactum* lebih berkembang daripada *stratum laxum* dan dibentuk oleh kumpulan serat kolagen padat yang sejajar dengan permukaan kulit. Tulang memiliki matriks hialin yang homogen dan jernih. Kolagen yang merupakan zat perekat tulang banyak terkandung pada matriks yang berserabut. Kolagen yang ada di dalam tulang dapat memberikan elastisitas.

Pemanfaatan kulit dan tulang belut sawah sebagai sumber kolagen berpotensi sebagai sumber kolagen alternatif. Fungsi kolagen dalam bidang kosmetik yaitu sebagai bahan aktif untuk meningkatkan kelembaban kulit, menjaga elastisitas kulit, dan mencegah tanda-tanda penuaan pada kulit akibat radikal bebas. Kolagen pada produk kosmetik pelembab kulit dapat berperan sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga mampu menghambat kerusakan sel (Sarma *et al.*, 2010).

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya metode DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*) dan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Aktivitas antioksidan DPPH dinyatakan dalam persentase penghambatannya terhadap radikal DPPH yang dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentrate 50*) (Andayani *et al.* 2008), yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang efektif, sederhana dan baik digunakan dalam pelarut organik, khususnya etanol pro analisis, serta sensitif untuk menguji aktivitas antioksidan dalam ekstrak. Akan tetapi, metode DPPH

kurang sensitif untuk mengukur aktivitas antioksidan selain senyawa fenol (Andayani *et al.* 2008). Metode lain yang dapat digunakan untuk mengukur antioksidan adalah metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Metode ini dapat menentukan kandungan antioksidan total dari suatu bahan berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  sehingga kekuatan antioksidan suatu senyawa dianalogikan dengan kemampuan mereduksi dari senyawa tersebut. Pengukuran antioksidan dengan metode FRAP lebih cepat dan sederhana. (Halvorsen, *et al.*, 2002).

Penelitian ini dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dan FRAP untuk mengetahui dari kedua metode yang digunakan berbeda bermakna atau tidak untuk menentukan aktivitas antioksidan dari kolagen dari kulit dan tulang belut sawah.

## **B. RUMUSAN MASALAH**

Berdasarkan pada latar belakang permasalahan yang telah diuraikan di atas, maka dapat diuraikan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah kolagen dari kulit dan tulang belut sawah memiliki aktivitas antioksidan?
2. Apakah metode FRAP dan metode DPPH berbeda bermakna untuk mengukur aktivitas antioksidan?

## **C. TUJUAN PENELITIAN**

Berdasarkan pada penelitian ini, maka dapat diuraikan beberapa tujuan penelitian sebagai berikut:

1. Mengisolasi kolagen dari kulit dan tulang belut sawah dan mengetahui aktivitas antioksidan dari kolagen kulit dan tulang belut sawah.
2. Mengetahui aktivitas antioksidan metode FRAP dan metode DPPH berbeda bermakna atau tidak dalam mengukur aktivitas antioksidan.

## **D. MANFAAT PENELITIAN**

Berdasarkan pada penelitian ini, maka dapat diuraikan beberapa manfaat penelitian sebagai berikut:

1. Dapat mengetahui aktivitas antioksidan dari kulit dan tulang dari belut sawah
2. Dapat mengetahui bahwa metode FRAP dan DPPH berbeda bermakna dalam mengukur aktivitas antioksidan

## **BAB III**

### **METODELOGI PENELITIAN**

#### **A. DESAIN PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan sampel kolagen yang diambil dari kulit dan tulang belut sawah. Tahap pertama ekstraksi kolagen dengan perendaman dalam larutan NaOH 0,1 M dan dilanjutkan perendaman dalam larutan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 0,5 M. Setelah didapatkan ekstrak kering dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dari kolagen kulit dan tulang belut sawah dengan perbandingan metode DPPH dan metode FRAP dan dianalisis statistik dengan metode *One Sampel t Test*.

#### **B. ALAT DAN BAHAN**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini seperti alat gelas (*Iwaki pyrex*), timbangan elektrik (*Ohaus*), spektrofotometri UV-Vis (*Shimidzu*). Bahan-bahan yang digunakan adalah kulit dan tulang belut sawah, NaOH teknis,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  teknis, DPPH (*1,1 Difenil-2-Pikrilhidrazil*) (*Sigma*) p.a, TPTZ (*Sigma*) p.a, asam askorbat p.a, etanol p.a, *buffer* asetat teknis, dan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  teknis.

#### **C. VARIABEL PENELITIAN**

##### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi kolagen yang terdapat pada kulit dan tulang belut sawah (*Monopterus albus*).

## 2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dari kulit dan tulang belut sawah (*Monopterus albus*) menggunakan metode DPPH dan metode FRAP

## 3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah pelarut, suhu, cahaya, panjang gelombang dan *operating time*.

## **D. PROSEDUR PENELITIAN**

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yaitu

### 1. Isolasi kolagen

#### a. Pra-perlakuan

Ekstraksi diawali dengan memisahkan kulit belut dengan cara menguliti dan memisahkan tulang dari dagingnya, setelah didapatkan kulit dan tulang dari belut sawah kemudian dilakukan deproteinisasi dengan cara perendaman kulit dan tulang belut sawah (*Monopterus albus*) menggunakan larutan natrium hidroksida (NaOH) 0,1 M dengan perbandingan (1:10 (b/v)) pada suhu 2-8°C agar protein non kolagen hilang. Kulit belut sawah (*Monopterus albus*) direndam selama 6 jam dengan penggantian pelarut setiap 3 jam, sedangkan tulang belut sawah (*Monopterus albus*) direndam selama 24 jam dengan penggantian pelarut 6 jam. Selanjutnya kulit dan tulang hasil perendaman



dipisahkan dari larutan NaOH dan dicuci menggunakan akuades sampai pH netral (Schmidt, 2016; Idrus *et al.*, 2018; Fawzya *et al.*, 2016).

#### b. Hidrolisis Kimia

Tahap kedua adalah proses hidrolisis dilakukan dengan merendam kulit dan tulang hasil perendaman NaOH direndam dalam larutan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) dengan konsentrasi 0,5 M dengan perbandingan (1:10 (b/v)) selama 48 jam pada suhu 2-8°C. Larutan ekstrak ditambahkan garam NaCl 0,9 M dan diaduk sampai terbentuk gumpalan putih dalam larutan, kemudian didiamkan sampai terbentuk gumpalan putih dalam larutan. Tahap selanjutnya larutan disaring, gumpalan yang tersaring merupakan kolagen basah. Sampel dicuci dengan akuades sampai pH netral. Kolagen dikeringkan dengan cara dikering anginkan pada suhu kamar (Ramdhani dan Aida, 2016; Schmidt, 2016; Idrus *et al.*, 2018; Fawzya *et al.*, 2016).

### 2. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

#### a. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH yang digunakan dibuat dengan cara menimbang saksama 15,77 mg DPPH kemudian dilarutkan menggunakan etanol p.a dalam labu ukur 100 mL hingga mencapai tanda batas.

#### b. Penyiapan Larutan Standar Induk Vitamin C 400 ppm

Larutan standar induk vitamin C yang digunakan dibuat dengan cara menimbang saksama 2 mg vitamin C dan dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 5 mL hingga tanda batas.

c. Penyiapan Larutan Standar Kerja Vitamin C

Larutan standar induk vitamin C dipipet sebanyak 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30 $\mu$ l, 40  $\mu$ l dan 50  $\mu$ l kedalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH diakhir saat akan di ukur serapannya dan dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 0,8 ppm, 1,6 ppm, 2,4 ppm, 3,2 ppm, dan 4,0 ppm. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 525 nm.

d. Pembuatan larutan kontrol

Larutan DPPH dipipet sebanyak 4 mL pada labu ukur 5 mL kemudian dicukupkan hingga batas, kemudian dihomogenkan dan di inkubasi selama 15 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang 525 nm.

e. Penyiapan Stok Sampel

Larutan stok sampel dibuat dengan cara menimbang seksama isolat kolagen kulit dan tulang belut sawah sebanyak 100 mg dicukupkan dalam labu ukur 100 mL dengan etanol sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

f. Penyiapan Sampel Kerja

Larutan kerja dibuat dengan melakukan pengenceran dari larutan stok sampel 1000 ppm dengan berbagai konsentrasi yaitu 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm.

g. Penentuan *operating time* larutan Standar

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 20  $\mu\text{l}$  standar induk vitamin C ditambah 4,0 mL larutan pereaksi DPPH kemudian dicukupkan kedalam labu ukur 5 mL dan dihomogenkan dengan stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya setiap 1 menit pada panjang gelombang 525 nm. *Operating time* ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu.

h. Penentuan *operating time* larutan Sampel

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 20  $\mu\text{l}$  larutan stok sampel ditambah 4,0 mL larutan pereaksi DPPH kemudian dicukupkan kedalam labu ukur 5 mL dan dihomogenkan dengan stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya setiap 1 menit pada panjang gelombang 525 nm. *Operating time* ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu.

i. Penentuan panjang gelombang maksimal

Larutan DPPH dipipet sebanyak 4 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan dengan etanol hingga batas. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimal.

j. Penentuan  $\text{IC}_{50}$  dengan Metode DPPH

Larutan sampel masing-masing dipipet 50  $\mu\text{l}$ , 75  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 125 $\mu\text{l}$  dan 150  $\mu\text{l}$  ditambah larutan DPPH sebanyak 4 mL pada labu ukur 5 mL

kemudian dicukupkan dengan etanol hingga batas, kemudian dihomogenkan dan di inkubasi selama 17 menit, sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal.

### 3. Uji aktivitas antioksidan metode FRAP

#### a. Pembuatan Larutan Reagen FRAP

##### 1) *Buffer* Asetat

*Buffer* asetat dengan pH 3,6 dibuat dari 187 mg natrium asetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) yang ditambahkan dengan 16 mL asam asetat pekat dan dilarutkan dengan akuades hingga tepat 250 mL dalam labu ukur.

##### 2) Larutan 2,4,6-tripyridil-striazine (TPTZ).

Sebanyak 150 mg TPTZ dilarutkan dalam HCl hingga tepat 50 mL. Larutan HCl dibuat dengan melarutkan 0,828 mL HCl pekat dalam 250 mL akuades.

##### 3) Larutan $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 270 mg  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur hingga tepat 100 mL.

##### 4) Pembuatan Pereaksi FRAP.

Reagen FRAP dibuat dengan cara mencampurkan 62,5 mL buffer asetat, 6,25 mL larutan TPTZ dan 6,25 larutan  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , lalu ditambahkan akuades hingga tepat 250 mL dalam labu ukur.

b. Penyiapan Larutan Standar Induk Vitamin C 400 ppm

Larutan standar induk vitamin C yang digunakan dibuat dengan cara menimbang saksama kurang lebih 2 mg vitamin C dan dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 5 mL kemudian dicukupkan dengan etanol hingga tanda batas.

c. Penyiapan Larutan Standar Kerja Vitamin C

Larutan vitamin C sebanyak 40  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 60  $\mu$ l, 70  $\mu$ l, dan 80  $\mu$ l, dipipet dari larutan induk vitamin C kedalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan 4 mL larutan FRAP dan dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 3,2 ppm, 4,0 ppm, 4,8 ppm, 5,6 ppm, dan 6,4 ppm. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm.

d. Pembuatan larutan kontrol

Larutan FRAP dipipet sebanyak 4 mL pada labu ukur 5 mL kemudian dicukupkan hingga batas, kemudian dihomogenkan dan di inkubasi selama 15 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm.

e. Penyiapan Stok Sampel

Larutan stok sampel dibuat dengan cara menimbang seksama isolat kolagen kulit dan tulang belut sawah sebanyak 100 mg dalam 100 mL etanol sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

f. Penyiapan Sampel Kerja

Larutan kerja dibuat dengan melakukan pengenceran dari larutan stok sampel 1000 ppm dengan berbagai konsentrasi yaitu 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm.

g. Penentuan *operating time* larutan standar

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 20  $\mu$ l standar induk vitamin C ditambah 4,0 mL larutan pereaksi FRAP kemudian dicukupkan kedalam labu ukur 5 mL dan dihomogenkan dengan stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya setiap 1 menit pada panjang gelombang 595 nm. *Operating time* ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu.

h. Penentuan *operating time* larutan sampel

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 20  $\mu$ l larutan stok sampel ditambah 4,0 mL larutan pereaksi FRAP kemudian dicukupkan kedalam labu ukur 5 mL dan dihomogenkan dengan stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya setiap 1 menit pada panjang gelombang 595 nm. *Operating time* ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang stabil pada menit tertentu.

k. Penentuan panjang gelombang maksimal

Larutan FRAP dipipet sebanyak 4 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan dengan etanol hingga batas. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur

panjang gelombangnya dari 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimal.

i. **Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP**

Prosedur pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara, larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm. Larutan FRAP dipipet sebanyak 4 mL dan sampel dipipet sebanyak 50 µl, 75 µl, 100 µl, 125 µl, 150 µl ke dalam labu ukur kemudian dicukupkan 5 mL dihomogenkan dan didiamkan selama 25 menit pada suhu 37°C, lalu diamati absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.

### **E. ANALISIS DATA**

Pada uji antioksidan kolagen kulit dan tulang belut sawah menggunakan metode DPPH dapat dianalisis dengan menggunakan persentase inhibisi radikal bebas kulit dan tulang belut sawah dengan rumus :

$$\% \text{inhibisi} = \left( 1 - \frac{As}{Ak} \right) \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

Ak = serapan kontrol

As = serapan sampel

Pengujian DPPH dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan data dari perolehan nilai persentase inhibisi dan konsentrasi pada sampel kemudian

dibandingkan dengan persentase inhibisi dan konsentrasi pada standar vitamin C yang dapat dihitung dengan rumus :

$$y = a + bx \dots\dots\dots (1)$$

dimana :

y = Variabel terikat

a = Intersep

b = Slope/ Koefisien regresi

x = Variabel bebas

Pada uji antioksidan kolagen kulit dan tulang belut sawah menggunakan metode FRAP dapat dianalisis dengan menggunakan persentase inhibisi radikal bebas kulit dan tulang belut sawah dengan rumus :

$$\%inhibisi = \left(1 - \frac{As}{Ak}\right) \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

Ak = serapan kontrol

As = serapan sampel

Pengujian FRAP dapat dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan data dari perolehan persentase inhibisi dan konsentrasi pada sampel kemudian dibandingkan dengan persentase inhibisi dan konsentrasi pada standar vitamin C yang dapat dihitung dengan rumus :

$$y = a + bx \dots\dots\dots (2)$$

dimana :

y = Variabel terikat



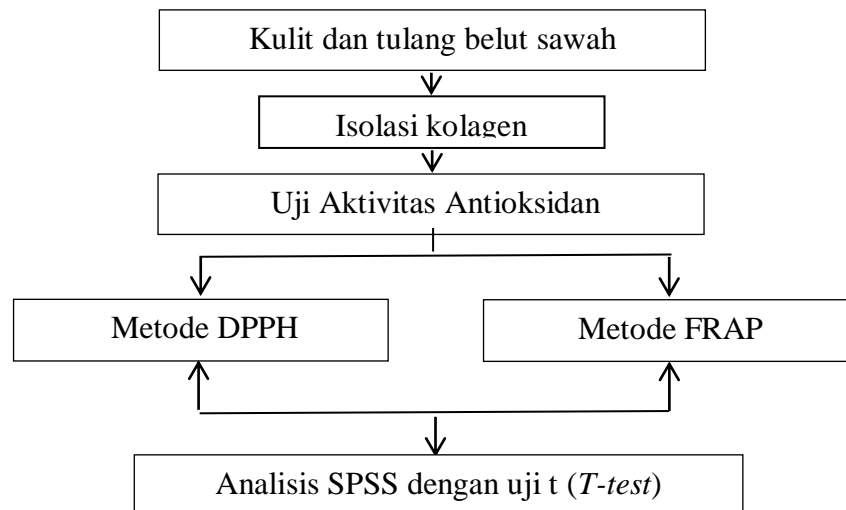
a = Intersep

b = Slope/ Koefisien regresi

x = Variabel bebas

Perbandingan antara metode DPPH dan metode FRAP dapat dilihat perbedaannya yang dapat dihitung dengan menggunakan analisis statistik menggunakan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) dengan uji t (*T-test*).

#### F. ALUR PENELITIAN



**Gambar 6. Alur Penelitian**

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Isolat kolagen dari kulit dan tulang belut sawah memiliki aktivitas antioksidan sangat aktif yang telah dibuktikan dengan analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometer.
2. Hasil uji statistika menggunakan SPSS metode *One sample T-test* yang didapatkan menunjukkan bahwa metode DPPH dan FRAP berbeda signifikan dalam pengukuran aktivitas antioksidan isolat kolagen kulit dan tulang belut sawah.

#### **B. Saran**

Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan mengenai metode isolasi dan uji kualitatif antioksidan kolagen dari kulit dan tulang belut sawah sebelum dilakukan uji kuantitatif dengan spektrofotometer serta perlu dilakukan validasi metode antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aberoumand, A. 2012. Proximate composition of less known some processed and fresh fish species for determination of the nutritive values in Iran. *Journal of Agricultural Technology* 8(3): 917-922.
- Adam, F., Thiam S,C., and Yahya, S. 2013. Bio-template Synthesis of Silika-Ruthenium Catalyst of Benzylolation of Toluene. *Journal of Physical Science*.Vol. 24. No. 1. Pp. 29-35
- AG.Suyono, 2013. *Metode Penelitian Kuantitatif*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Aida ariani, Galang Ramdhani F.G. 2016. *Pengambilan Kolagen Pada Sisik Ikan Dari Limbah Pabrik Fillet Ikan Menggunakan Metode Ekatraksi Asam (skripsi)*. Institut teknologi sepuluh nopember : Surabaya
- Andayani, R., Maimunah, & Lisawati, Y., 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum L.*). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 13, 31-37.
- Asehnoune K., Strassheim D., Mitra S., Kim J.Y., Abraham E. 2005. *Involvement of reactive oxygen species in toll-like receptor 4-dependent activation of NF- $\kappa$ B*. *J Immunol*. 172: 2522-29.
- Barrett Kim E .2013. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Ganong* . Jakarta : EGC Medical
- Benzie, Iris F.F dan Strain, J.J. 2003. “*The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power : The FRAP Assay*”.*Analytical Biochemistry*. 239 : 70-76.
- Cho SM, Gu YS, Kim SB. 2005. *Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (Thunnus albacares) skin gelatin compared to mammalian gelatins*. *Food Hydrocolloids*. 19:221- 229.
- Departemen Kesehatan RI. 2014. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 5*. Jakarta: Depkes RI, p441-448.
- Draelos, Z. D., dan Lauren A. Thaman. (2006). *Cosmetic Formulation of Skin Care Product*. New York: Taylor and Francis Group. Hal. 11.

- Fake Li, et al. 2013. *Does risk for ovarian malignancy algorithm excel human epididymis protein 4 and Ca125 in predicting epithelial ovarian cancer: A meta-analysis. BMC Cancer* , 1-18.
- Fawzuya YN, Chasanah E, Poernomo A, Khirzin MH, 2016. *Isolasi Dan Karakterisasi Parsial Kolagen dari Teripang Gama (Stichopus Variegatus) Jpb Kelautan dan Perikanan Vol. 11 No.1, 91-100.*
- Fidrianny I., Ruslan K., Saputra J., 2013, *Antioxidant Activities of Different Polarity Extracts from Cashew (Anacardium occidentale L.) Leaves and Isolation of Antioxidant Compound.* Bandung, 3-12.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hal. 419, 425.
- Griebel, C. P., Halvorsen, J., Golemon, T. B. & Day, A. A., 2013. *Management of Spontaneous Abortion. American Family Physician, 72(7), pp. 1243-1250.*
- Halvorsen, B.L., Holte, Kari., Myhrstad, Mari C. W., Barikmo, I., Hvattum Erlend, Remberg Siv Fagertun, Wold Anne-Brit, Haffner Karin, Baugerod Halvard, Andersen Lene Frost, Moskuang Jan, Jacobs David R, Blomhoff Rune. 2002. A Systematic Screening of Total Antioxidant in Dirty Plants. *Journal of Nutrition.*
- Idris, A. Minarni, R. dan Irwan, S. 2018. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis.* Vol.13 :105-113.
- Jayanti, R.T. 2011. *Pengaruh pH, Suhu Hidrolisis Enzim A-Amilase dan Konsentrasi Ragi Roti untuk Produksi Etanol Menggunakan Pati Bekatul.* Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Katili, A. S. 2009. Struktur Komunitas Echinodermata Pada Zona Intertidal Di Gorontalo. *Jurnal Penelitian dan Pendidikan, Volume 8 Nomor 1, Maret 2009* , 51-61.
- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Shahidi F. 2010. *Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (Chiloscyllium punctatum).* Food Chem 119: 1519-1526.
- Kumalaningsih, S. 2008. *Antioksidan, Sumber dan Manfaatnya. Antioxidant Center Online.* Diunduh tanggal 15 Maret 2013 dari <http://antioxidant.center/index.php/antioksidan/3.-antioksidan-sumber-manfaatnya.html>. Hal: 1-5.

- Liu D, Wei G, Li T, Hua J, Lu J, Regenstein JM, Zhou P. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. 172:836–843.
- Marks, D. B., Marks, A. D., & Smith, C. M. 2014. *Biokimia kedokteran dasar : sebuah pendekatan klinis (1 ed.)*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Marzuki, Asnah. 2012. *Kimia Analisis Farmasi*. Makassar : Dua Satu Press
- Mbaoji, F. N., Ezike, A. C., Nworu, C.S., Onyeto, C. A., Nwabunike, I. A., Okoli, I. C., & Akah, P. A. *Antioxidant And Hepatoprotective Potentials Of Stemonocoleus Micranthus Harms ( Fabaceae ) Stem Bark Extract, 2016; 8(7)*.
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Mayes, P.A (2008). *Harpes's Illustrated Biochemistry (26th ed)*. Toronto : McGraw-Hill Companies,inc.
- Nanda Afrizan, Zainuddin, Cut Dahlia Iskandar, Dian Masyitha, Winaruddin, Ummu Balqis. *Struktur Histologi Kulit Belut Sawah (Monopterus Albus) Histology Of Skin Of Rice Field Eels (Monopterus Albus)*, 2018: 2(1):196-205
- Nugraheni, 2007, *Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Dan Ekstrak Etanol Daun Tempuyang (Sunchus Ervensis L.) Serta Penentuan EC50 Dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil)*, Skripsi, 36-39, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi, Semarang
- Oliveira C, Bernardo RT, Capelozza ALA. *Mandibular condyle morphology on panoramic radiographs of asymptomatic temporomandibular joints. Int J Dent 2014; 8 (3): 114-8.*
- Quinones, D. & Ghaly, E.S. 2008. Formulation and Characterization of Nystatin Gel. *PRHSJ (San Juab, PR.) Vol. 27 No. 1*
- Rizky nurul yaqin, muzakir baits, mamat pratama. 2018. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tomat Buah (Lycopersicon Esculentum Mill, Var. Pyriforme Alef) Dan Daun Tomat Sayur (Lycopersicon Esculentum Mill, Var. Commune Bailey) Dengan Metode Dpph (1,1-Diphenyl-2- Picryl Hydrazil)*. Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia Makassar
- Rohman A., Riyanto S., Dan Utari D, 2006 Antioxidant Activities Total Phenolic And Flavonoid Contents Of Etyl Aetate Extract Of Mengkudu Fruit And Its Fraction. *Majalah Farmasi Indonesia* 17. 136-142

- Roy, Ruslan dan Haryanto, Bagus. (2009). *Pembesaran Belut di Dalam Tong & Kolam Terpal*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Saanin, H. 1968. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Binacipta. Bandung.
- Sarma, A. D., Mallick, A. R., & Ghosh, A. 2010. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Condition : An Overview. *International Journal of Pharma Science and Research*, 1(3), 185-192.
- Sayuti, K.; Rina Yenrina. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*; Andalas Univesity Press: Padang
- Schmidt, M. M., Dornelles, R.C.P, Mello, R.O., Kubota, E.H., Mazutti, M.A., Kempka, A.P.& Demiate, I.M. 2016. Collagen extraction process. Mini Review. *International Food Research Journal*, 23 (3), 913-922.
- Syarifuddin Idrus., Sugeng Hadinoto.,& Joice P. M Kolanus. 2018. Karakterisasi Kolagen Gelembung Renang Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*) Dari Perairan Maluku Menggunakan Ekstraksi Asam. *Biopropal Industri, Volume 9 Nomor 2, Desember 2018, 87-94*
- Vichitphan, S., Vichitphan, K.,& Sirikhansaeng, P. 2005. Flavonoid content and antioksidan activity of krachaidum (*Kaemferia parviflora*) Wine. *Journal of Science Technology* (7): 97- 105.