

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk kultur khamir laut terdiri dari air laut, gula pasir, pupuk daun (hortigro), starter khamir laut, kapas, plastik *wrap*, dan plastik. Bahan-bahan yang digunakan untuk perhitungan kepadatan sel khamir laut terdiri dari stok khamir laut, gula pasir, pupuk daun (hortigro), kapas, alkohol, dan tissue. Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein terdiri dari kepala udang vaname (*L. vannamei*) yang didapatkan dari limbah proses pembekuan PT. Graha Makmur Cipta Pratama, Buduran, Sidoarjo, Jawa Timur sebagai bahan dasar pembuatan hidrolisat protein, bahan lain yang digunakan yaitu molase, akuades, dan inokulan khamir laut.

Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis kimia terdiri dari silika gel, benang kasur, kertas saring, n-heksan, H_2SO_4 , tablet kjeldahl, akuades, H_3BO_3 , NaOH, HCl, indikator *metil orange*, larutan OPA (*O-Phthaldehyde*), metanol, merkaptoetanol, BF_3 metanol, NaCl, Na_2SO_4 anhidrous, kertas label, dan minyak jagung.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kultur khamir laut terdiri dari botol kaca, kompor, panci perebusan, spatula, pipet volume, bola hisap, timbangan digital, *aerator*, selang, corong, dan *beaker glass*. Peralatan yang digunakan untuk perhitungan kepadatan sel khamir laut terdiri dari mikroskop, *Petroff-Hauser Chamber (Haemocytometer)*, mikropipet, *cover glass*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, *vortex mixer*, bola hisap, pipet volume, erlenmeyer, gelas

ukur, timbangan digital, spatula, *sprayer*, dan corong. Peralatan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein kepala udang vaname rebus terdiri dari kompor, panci, *waterbath*, *beaker glass*, timbangan digital, piring, bola hisap, pipet volume, botol, sentrifus, selang, aerator, kuvet, blender, dan *food processor*.

Alat-alat yang digunakan untuk analisis kimia terdiri dari pH meter, oven, desikator, botol timbang, loyang, *crushable tang*, *gold fisch*, sampel tube, gelas piala, gelas ukur, corong, timbangan digital, kuvet, sentrifus, pipet tetes, pipet volume, bola hisap, cawan petri, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, cawan porselen, destruksi, destilasi, statif, buret, *hot plate*, *muffle*, dan *High Performance Liquid Chromatography*.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang secara sengaja dilakukan oleh peneliti terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna diamati pengaruhnya (Jaedun, 2011). Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki seberapa besar dan ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 2005).

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu pembuatan kultur khamir laut untuk mendapatkan inokulan khamir laut yang dipanen pada fase pertumbuhan atau log. Setelah itu, inokulan yang didapat digunakan sebagai

biokatalisator dengan tujuan untuk mengetahui hidrolisat protein kepala udang vaname rebus yang optimal berdasarkan analisis proksimat, pH, kapasitas emulsi, dan daya buih, sehingga dari hasil yang terbaik digunakan untuk acuan dalam analisis kalsium dan profil asam amino.

3.2.2 Variabel

Variabel ialah suatu karakteristik yang memiliki dua atau lebih nilai atau sifat yang berdiri sendiri-sendiri. Variabel terdiri dari variabel bebas dan terikat. Variabel bebas ialah faktor yang menyebabkan suatu pengaruh sedangkan variabel terikat ialah faktor yang diakibatkan oleh pengaruh tersebut (hasil) (Sevilla *et al.*, 2006).

Penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah volume molase rebus dan lama fermentasi, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah analisis proksimat (meliputi kadar air, kadar lemak, kadar abu, kadar protein, dan kadar karbohidrat), pH, daya buih, kapasitas emulsi, profil asam amino, dan kalsium

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Prosedur Penentuan Fase Log Khamir Laut

Prosedur penentuan fase log dilakukan dengan pengamatan melalui *haemocytometer* dan mikroskop. Pengamatan dilakukan dengan mengamati setiap 12 jam sekali kultur khamir laut untuk diukur kepadatannya dengan menggunakan *haemocytometer* dan mikroskop.

Berdasarkan penelitian Jannah (2012), hasil tingkat kekeruhan dan pengamatan mikroskop menunjukkan bahwa pertumbuhan khamir laut pada hari ke-3 mempunyai tingkat kekeruhan yang paling tinggi dimana khamir laut

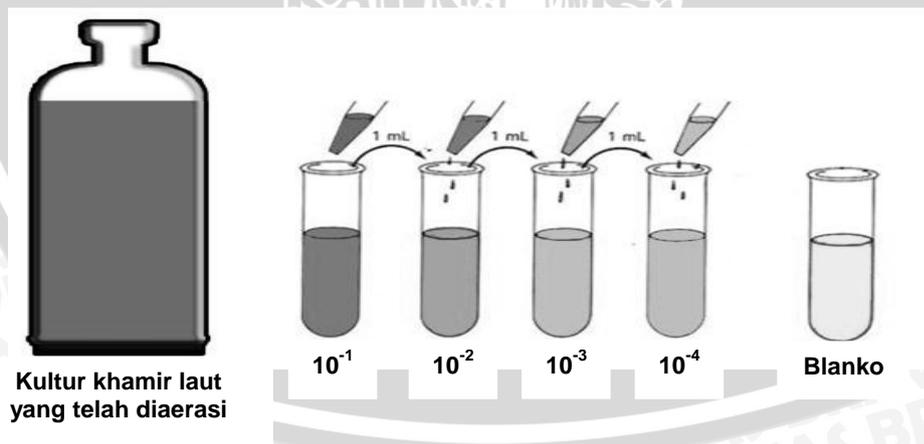
mengalami pembelahan sangat cepat dan dikenal dengan istilah fase log. Sedangkan menurut Alkili (2012) menyatakan bahwa pertumbuhan khamir laut yang paling tinggi terdapat pada hari ke-2. Oleh karena itu, dilakukan pengamatan kultur khamir laut mulai dari hari ke-0 sampai hari ke-4 untuk mengetahui tingkat pertumbuhan khamir laut yang paling optimum.

Prosedur pertama yang dilakukan dalam penentuan fase log yaitu mengkultur khamir laut. Tahapan dalam mengkultur khamir laut menurut Sukoso (2012) yaitu disiapkan bahan-bahan seperti air laut, gula pasir, pupuk daun, dan biakan khamir laut. Air laut sebanyak 1000 mL disterilkan dengan pemanasan sampai mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar. Air laut steril yang sudah dingin kemudian dimasukkan ke dalam botol gelas kaca, lalu ditambahkan gula pasir 0,5% sebagai sumber nutrisi dan pupuk daun 0,2% sebagai sumber nitrogen (v:b) serta dihomogenkan sehingga diperoleh media khamir laut. Lalu ditambah starter khamir laut sebanyak 0,2% dari air laut yang digunakan (v:v) dan dihomogenkan. Kultur khamir laut yang telah siap kemudian ditutup dengan kapas dan dilapisi plastik *wrap* untuk menghindari kontaminasi yang tidak diinginkan, lalu diberi aerasi yang cukup untuk menambah suplai oksigen dalam pertumbuhan khamir laut. Aerasi dilakukan selama empat hari untuk dilakukan pengamatan tingkat kepadatan sel khamir laut. Perhitungan dan diagram alir kultur khamir laut dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2.

Prosedur perhitungan kepadatan sel khamir laut yaitu pada hari pertama sampai hari ke-empat kultur khamir laut yang telah diaerasi diambil sebanyak 1 mL untuk dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-4} . Namun terlebih dahulu disiapkan media yang akan digunakan, adapun prosedur pembuatan media khamir laut menurut Alkili (2012) yaitu air laut sebanyak 100 mL disterilkan dengan pemanasan sampai mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar.

Lalu diambil air laut steril sebanyak 50 mL dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan gula pasir sebanyak 0,25% (b/v) dan pupuk daun sebanyak 0,1% (b/v) serta dihomogenkan. Perhitungan dan diagram alir pembuatan media pengenceran khamir laut dapat dilihat pada Lampiran 3 dan 4.

Setelah media yang akan digunakan siap, langkah selanjutnya adalah perhitungan kepadatan sel khamir laut dengan menggunakan *haemocytometer*. Prosedur kerja yang digunakan yaitu diambil 9 mL media khamir laut dan dimasukkan pada masing-masing lima tabung reaksi untuk diberi perlakuan tingkat pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-4} dan sebagai blanko. Tabung reaksi 10^{-1} yang telah berisi media diberi dengan kultur khamir laut sebanyak 1 mL yang telah diaerasi, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Setelah itu, dari tabung reaksi 10^{-1} yang telah dihomogenkan diambil sebanyak 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} dan dihomogenkan, serta dilakukan dengan cara yang sama sampai tabung reaksi 10^{-4} . Selanjutnya, dari hasil pengenceran 10^{-4} diuji kepadatan khamir laut dengan *haemocytometer*. Proses pengenceran dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Proses Pengenceran Bertingkat Khamir Laut

Pengamatan kepadatan khamir laut juga dilakukan setiap hari dengan menggunakan pengamatan mikroskop, menurut Jannah (2012) yaitu dengan mengambil kultur khamir laut yang telah diaerasi dengan menggunakan pipet tetes lalu ditetaskan di *objek glass* dan ditutup dengan *cover glass*. *Preparate* kultur khamir laut selanjutnya diamati dibawah mikroskop.

Pada pengamatan tingkat kepadatan khamir laut, fase log ditandai dengan pertumbuhan sel yang sangat tinggi dibandingkan dengan fase lainnya. Fase log adalah fase dimana mikroorganisme mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan dapat dikatakan sebagai pertumbuhan eksponensial. Pada fase ini kebutuhan akan energi lebih tinggi dan sel menjadi lebih sensitif terhadap lingkungannya. Oleh karena itu, pada fase ini mikroba termasuk didalamnya khamir laut banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya (Waluyo, 2007).

3.3.2 Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname Rebus

Pada pembuatan hidrolisat protein kepala udang vaname rebus, prosedur kerja pertama yang dilakukan yaitu membuat kepala udang vaname rebus. Penggunaan lama waktu proses perebusan kepala udang vaname dalam penelitian ini mengacu pada penelitian Irma *et al.*, (1997), kepala udang windu direbus dengan menggunakan suhu 55°C selama 15 menit yang akan digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein.

Pada penelitian ini juga menggunakan molase (tetes tebu) rebus, dimana proses perebusannya dilakukan sampai mendidih karena sifat dari molase adalah sumber karbon yang dapat menggantikan penggunaan gula sehingga mudah mengalami karamelisasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Winarno

(2004) bahwa karamelisasi merupakan salah satu reaksi pencoklatan non enzimatis. Apabila gula cair dipanaskan secara terus-menerus melampaui suhu titik leburnya (160°C), misalnya pada suhu 170°C , maka akan terjadi karamelisasi sukrosa. Pada penelitian ini menggunakan penambahan molase rebus dan lama fermentasi berbeda. Perlakuan penelitian dengan berbagai variabel dapat dilihat pada Tabel 4.

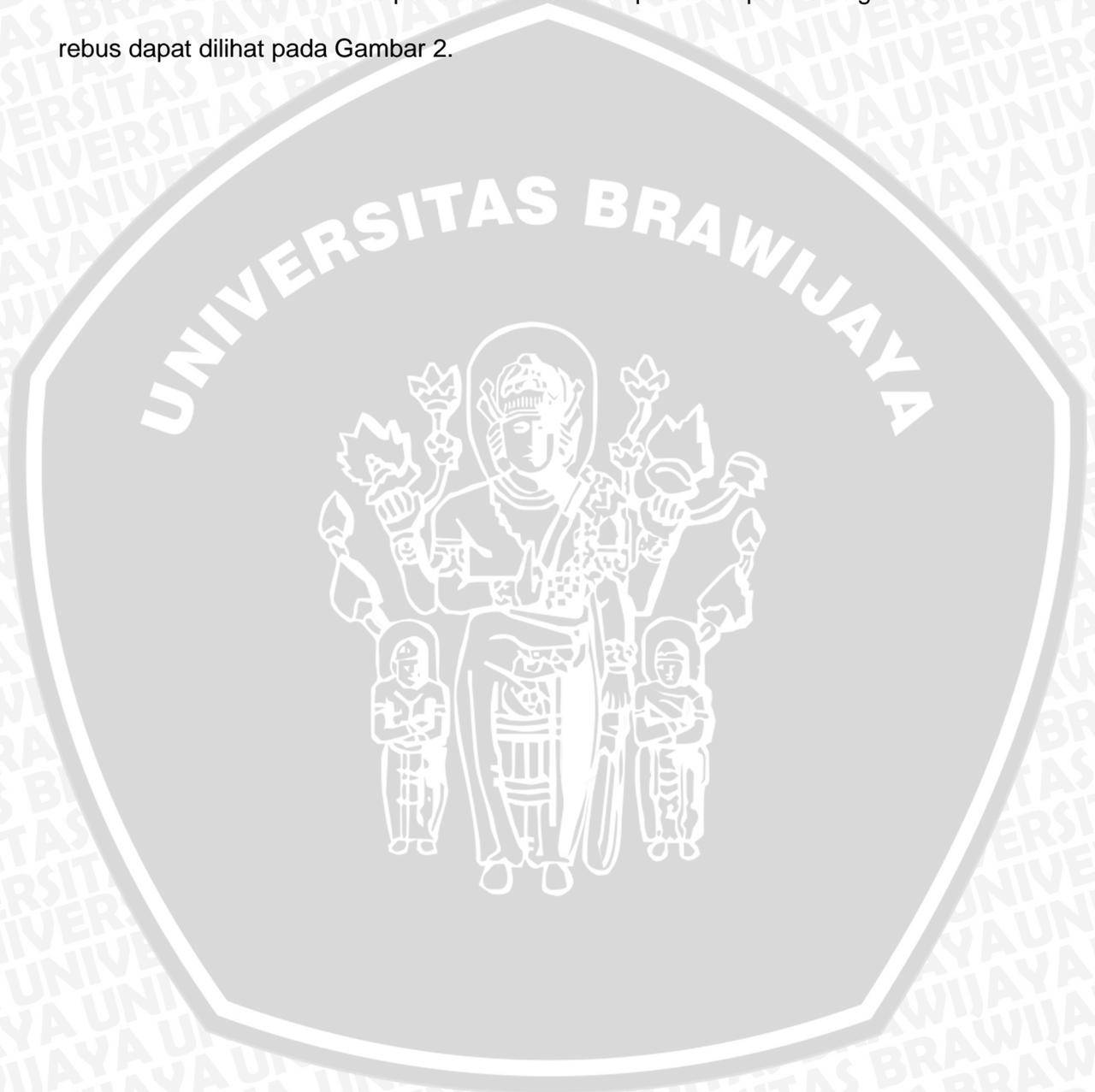
Tabel 4. Perlakuan Penelitian dengan Berbagai Variabel

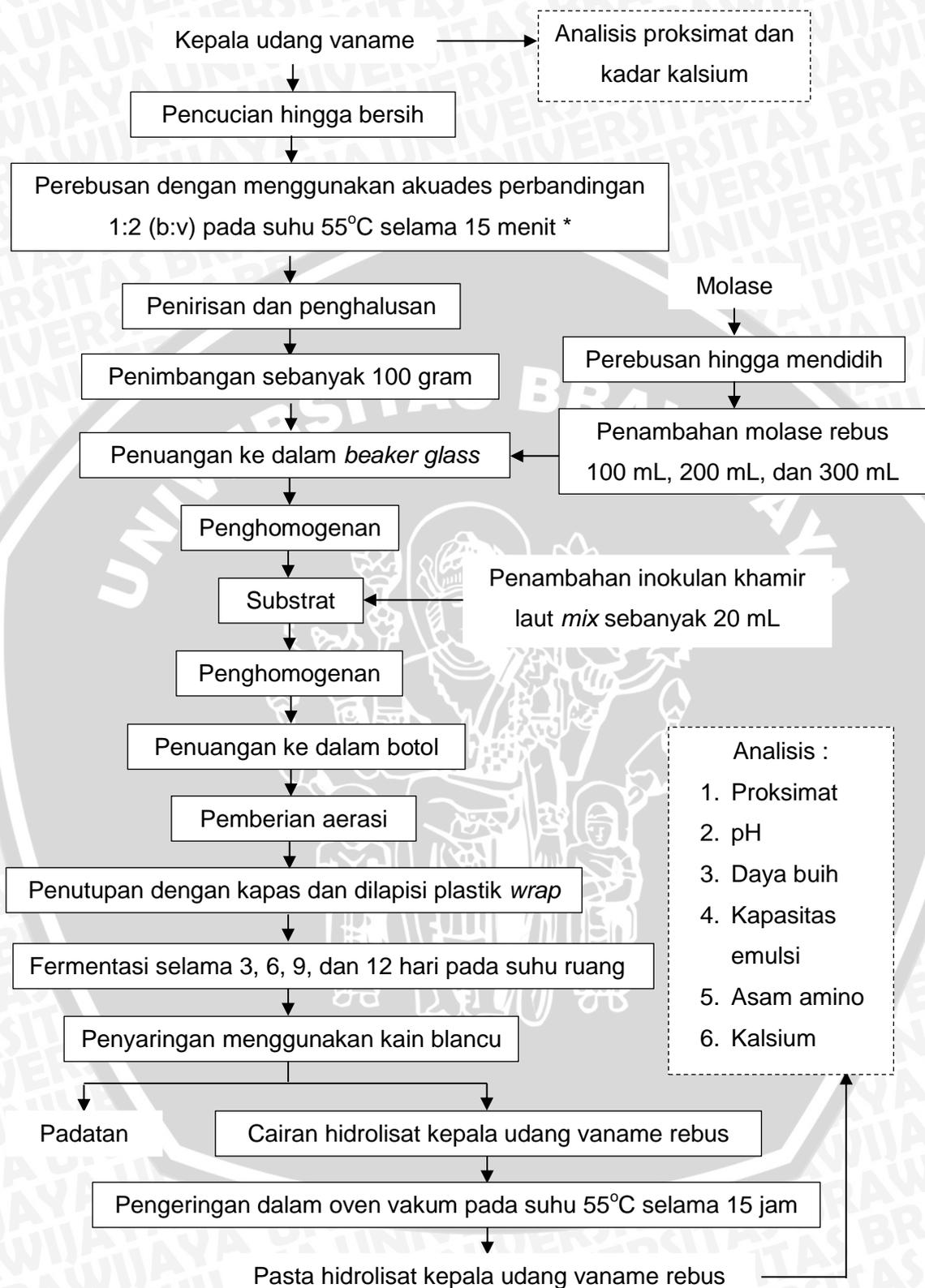
Perlakuan	Molase Rebus			
	E	F	G	
Lama Fermentasi	A	AE	AF	AG
	B	BE	BF	BG
	C	CE	CF	CG
	D	DE	DF	DG

Keterangan : A = lama fermentasi 3 hari E = molase rebus 100 mL
 B = lama fermentasi 6 hari F = molase rebus 200 mL
 C = lama fermentasi 9 hari G = molase rebus 300 mL
 D = lama fermentasi 12 hari

Prosedur pembuatan hidrolisat protein kepala udang vaname rebus yaitu kepala udang vaname dicuci hingga bersih lalu direbus dengan menggunakan akuades perbandingan 1:2 (b:v) pada suhu 55°C selama 15 menit. Setelah itu ditiriskan dan dihaluskan dengan menggunakan blender. Lalu ditimbang sebanyak 100 gram untuk masing-masing perlakuan dan dimasukkan ke dalam botol. Kemudian ditambahkan molase rebus dengan konsentrasi berbeda yaitu 100 mL, 200 mL, 300 mL, dan dihomogenkan. Substrat yang telah siap, ditambah inokulan khamir laut sebanyak 10 mL, kemudian ditutup dan diberi aerasi yang cukup untuk menambah suplai oksigen dalam pertumbuhan khamir laut. Lalu difermentasi selama 3, 6, 9, dan 12 hari pada suhu ruang. Kemudian sampel disaring dengan menggunakan kain blacu hingga didapatkan cairan hidrolisat protein. Lalu dikeringkan dengan menggunakan oven vakum pada suhu

55°C sampai menjadi pasta hidrolisat protein kepala udang vaname dan dilakukan pengujian yang meliputi analisis proksimat, pH, daya buih, dan kapasitas emulsi. Sampel dengan hasil terbaik digunakan dalam uji profil asam amino dan kalsium. Prosedur pembuatan hidrolisat protein kepala udang vaname rebus dapat dilihat pada Gambar 2.





Keterangan :

* Irma *et al.*, (1997)

Gambar 2. Diagram Alir Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname Rebus (Modifikasi Bueno-solano *et al.*, 2008)

3.4 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor (faktor volume molase rebus dan lama fermentasi) dengan 3 kali ulangan. Rancangan penelitiannya adalah sebagai berikut dan dapat dilihat pada Tabel 5.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

- Y_{ijk} = nilai pengamatan untuk faktor A level ke-i dan faktor B level ke-j pada ulangan ke-k
- μ = rata-rata umum
- α_i = pengaruh faktor A pada level ke-i (i = volume molase rebus 100 mL, 200 mL, dan 300 mL)
- β_j = pengaruh faktor B pada level ke-j (j = lama fermentasi 3, 6, 9, dan 12 hari)
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = interaksi antara A dan B pada faktor A level ke-i dan faktor B level ke-j
- ϵ_{ijk} = galat percobaan untuk faktor A level ke-i dan faktor B level ke-j pada ulangan ke-k

Tabel 5. Rancangan Penelitian pada Berbagai Ulangan

Perlakuan		Ulangan			Total
Lama Fermentasi	Konsentrasi Molase	I	II	III	
3 Hari	100 mL	A1	A2	A3	TA
	200 mL	B1	B2	B3	TB
	300 mL	C1	C2	C3	TC
6 Hari	100 mL	D1	D2	D3	TD
	200 mL	E1	E2	E3	TE
	300 mL	F1	F2	F3	TF
9 Hari	100 mL	G1	G2	G3	TG
	200 mL	H1	H2	H3	TH
	300 mL	I1	I2	I3	TI
12 Hari	100 mL	J1	J2	J3	TJ
	200 mL	K1	K2	K3	TK
	300 mL	L1	L2	L3	TL

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon yang diukur dilakukan analisis keragaman (ANOVA atau *Analysis of Variance*) dan jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut Duncan pada taraf 5% dengan SPSS versi 16.

3.5 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan meliputi rendemen, analisa proksimat (kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, dan kadar karbohidrat *by difference*), pH, daya buih, kapasitas emulsi, profil asam amino, dan kalsium

3.5.1 Rendemen (Purbasari, 2008)

Rendemen merupakan jumlah persentase sampel akhir setelah proses dan dinyatakan dalam % (persen). Rendemen produk hidrolisat protein merupakan persentase banyaknya produk hidrolisat yang dihasilkan terhadap bahan baku yang digunakan sebelum hidrolisis.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat akhir hidrolisat (setelah diperas/dikeringkan) (gram)

B = Berat awal sampel setelah pencampuran (gram)

3.5.2 Analisis Proksimat

3.5.2.1 Analisis Kadar Air Metode Termogravimetri (Sudarmadji *et al.*, 1989)

Analisis kadar air dengan metode termogravimetri dilakukan dengan cara mengeluarkan air dari dalam bahan pangan atau disebut dengan penguapan air yang dilakukan dengan cara pemanasan. Prosedur analisis kadar air dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.5.2.2 Analisis Kadar Abu Metode Gravimetri (Sudarmadji *et al.*, 1989)

Kadar abu merupakan zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan organik. Prinsip dari analisis kadar abu adalah mengoksidasi semua zat organik pada suhu tinggi yaitu sekitar 500-600°C dan kemudian melakukan penimbangan zat yang tertinggal setelah proses pembakaran tersebut. Prosedur analisis kadar abu dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.5.2.3 Analisis Kadar Protein Metode Kjeldahl (Sudarmadji *et al.*, 1989)

Analisis kadar protein dengan menggunakan metode kjeldahl terbagi menjadi tiga yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi. Prinsip dari metode ini adalah sampel didestruksi dengan penambahan asam kuat pekat (asam sulfat) serta proses pemanasan pada suhu tinggi, sehingga dihasilkan larutan berwarna jernih mengandung ammonium sulfat. Setelah itu, dinetralkan dengan menggunakan alkali pekat dan didestilasi. Destilat yang diperoleh kemudian ditampung ke dalam beaker yang berisi larutan asam borat. Prosedur analisis kadar air dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.5.2.4 Analisis Kadar Lemak Metode *Goldfish* (Sudarmadji *et al.*, 1989)

Metode *goldfish* merupakan metode yang digunakan untuk ekstraksi lemak, dimana labu ekstraksinya dirancang agar pelarut hanya melewati sampel tanpa merendam sampel. Prinsip dari metode ini adalah sampel yang telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam *thimble* dan di pasang dalam tabung penyangga yang berlubang pada bagian bawah. Pelarut diletakkan dalam *beaker glass* yang berada di bawah tabung penyangga. Pada saat dipanaskan, pelarut akan naik dan didinginkan oleh kondensor sehingga akan mengembun dan menetes pada sampel, sehingga bahan akan dibasahi oleh pelarut dan lemak akan terekstraksi yang selanjutnya tertampung pada *beaker glass* kembali. Prosedur analisis kadar lemak dapat dilihat pada Lampiran 8.

3.5.2.5 Analisis Kadar Karbohidrat *by Difference* (Andarwulan *et al.*, 2011)

Kandungan karbohidrat biasanya diberikan sebagai karbohidrat total *by difference*, artinya kandungan tersebut diperoleh dari hasil pengurangan 100% dengan % komponen lain (air, abu, lemak dan protein).

$$\text{Kadar karbohidrat (\%)} = 100\% - \% \text{ kadar (air + abu + lemak + protein)}$$

3.5.3 Nilai pH (Sudarmadji *et al.*, 1989)

Penetapan nilai pH dilakukan setelah pH meter dikalibrasi terlebih dahulu. Sampel sebanyak 1 mL ditambahkan dengan aquades perbandingan 1:10 (v:v), lalu dihomogenkan. Setelah itu, elektoda dibilas dengan menggunakan aquades dan dikeringkan. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan sampel dan pengukuran pH dapat di set. Elektroda dibiarkan tercelup beberapa saat sampai diperoleh nilai pH yang stabil dan kemudian dicatat nilai pH sampel yang didapat.

3.5.4 Kapasitas Emulsi (Rieuwpassa *et al.*, 2013)

Kapasitas emulsi yang baik bila bahan dapat menyerap air dan minyak secara seimbang. Prinsip dari kapasitas emulsi protein bergantung pada keseimbangan ikatan hidrofilik dan lipofilik. Kapasitas emulsi diukur dengan cara 5 gram sampel ditambahkan dengan 20 mL akuades dan 20 mL minyak jagung, kemudian dihomogenkan selama 1 menit. Lalu disentrifus pada 7500 rpm selama 5 menit. Kapasitas emulsi dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kapasitas emulsi} = \frac{\text{volume emulsi setelah disentrifus}}{\text{volume awal}} \times 100\%$$

3.5.5 Daya Buih (Rieuwpassa *et al.*, 2013)

Buih merupakan bentuk dispersi koloid gas dalam cairan. Prinsip dari daya buih yaitu kekuatan protein dalam memerangkap gas, dimana kapasitas buih bergantung pada fleksibilitas molekul dan sifat fisiko kimia protein. Sampel sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 10 mL akuades dan dihomogenkan selama 1 menit.

Kapasitas busa dilihat dari busa yang terbentuk dibandingkan dengan kapasitas volume awal. Stabilitas busa merupakan rasio dari kapasitas busa selama waktu observasi dibandingkan dengan kapasitas busa awal.

3.5.6 Analisis Profil Asam Amino (AOAC, 1995)

Penentuan profil asam amino dari hidrolisat protein kepala udang vaname rebus menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Senyawa kompleks (protein) akan terlebih dahulu masuk ke dalam kolom bagian utama dari HPLC, kemudian senyawa kompleks tersebut akan dipisah-pisah menurut ikatan kimianya terutama rantai karbonnya. Senyawa yang mempunyai rantai karbon panjang akan terdeteksi paling akhir. Prosedur analisis profil asam amino dapat dilihat pada Lampiran 9.

3.5.7 Analisis Kalsium (SNI-06-6989.56-2005)

Unsur mineral dikenal sebagai bahan anorganik atau kadar abu. Didalam tubuh unsur mineral berfungsi sebagai zat pembangun dan pengatur, salah satunya kalsium. Prinsip dari metode ini adalah pembahan asam klorida dilanjutkan dengan pemanasan yang bertujuan untuk melarutkan analit kalsium dan menghilangkan zat-zat pengganggu. Penambahan lantan klorida bertujuan untuk menekan efek ionisasi kalsium dan diukur serapannya dengan SSA menggunakan gas esetilen-udara. Prosedur analisis kalsium dapat dilihat pada Lampiran 10.