

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan terdiri dari bahan pembuatan karagenan, tepung agar (*Gracilaria verrucosa*), edible film dan bahan uji. Bahan untuk pembuatan karagenan antara lain: rumput laut *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum*, KOH 6%, Ca(OH)<sub>2</sub> 6%, KCl 1,5%, CaCl<sub>2</sub>, aquades, air tawar, tissue, koran, kertas label. Bahan untuk pembuatan agar antara lain : rumput laut *Gracilaria verrucosa*, NaOH 3%, aquades, dan air tawar. Bahan untuk pembuatan edible film terdiri dari karagenan mix kappa dan iota dan agar, aquades, kertas label, tissue, plastik dan air tawar, air bersih.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat proses penelitian dan alat analisa. Alat untuk proses penelitian dibedakan menjadi 3 bagian yaitu alat proses pembuatan karagenan, alat pembuatan agar-agar, dan alat proses pembuatan edible film. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan karagenan antara lain yaitu: baskom, timbangan digital, beaker glass 500 ml, beaker glass 1000 ml, *waterbath*, blender, spatula, nampan, sarung tangan, sendok, oven, saringan, mekatronik. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan agar-agar antara lain yaitu: baskom, timbangan digital, beaker glass 500 ml, beaker glass 1000 ml, *waterbath*, blender, spatula, nampan, sarung tangan, sendok, oven, saringan, mekatronik. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan edible film antara lain: beaker glass 500 ml, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 100 ml, timbangan digital, sendok, *magnetic stirrer*, *waterbath*, nampan, oven. Alat-alat yang digunakan untuk uji *tensile strength* dan perpanjangan antara lain penggaris, *tensile strength*. Alat-alat yang digunakan untuk uji ketebalan antara

lain *micrometer digimetic*. Alat-alat yang digunakan untuk uji transmisi uap air antara lain beaker glass 100 ml, desikator, timbangan digital, washing bottle. Dan alat-alat yang digunakan untuk uji kadar air antara lain botol timbang, oven, gunting, timbangan analitik, crushable tank.

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Metode**

Metode yang digunakan dalam penelitian pengaruh penggunaan konsentrasi platictizer berbahan mix SRC kappa–iota karagenan dan tepung agar (*Gracilaria verrucosa*) terhadap karakteristik edible film adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah suatu cara atau langkah-langkah yang digunakan peneliti untuk mencari sebab akibat antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti tersebut untuk mengeliminasi atau mengurangi faktor-faktor yang dapat mengganggu di dalam penelitian. Selanjutnya untuk mengetahui seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut maka dilakukan dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok percobaan.

#### **3.2.2 Variabel**

Variabel penelitian adalah gambaran sifat suatu benda dari obyek penelitian dengan bermacam-macam nilai. Variabel dibedakan menjadi 2 yaitu antara lain variabel bebas dan variable terikat. Variabel bebas merupakan variabel yang dipilih sebagai variable yang dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat, sedangkan variabel terikat merupakan variabel yang menjadi pusat percobaan (Nasir, 1998).

Penelitian ini menggunakan variabel bebas meliputi jenis platictizer adalah sorbitol dan gliserol dan konsentrasi dari platictizer, sedangkan variabel terikatnya adalah proses pembuatan edible film dari kappa-iota karagenan dan tepung agar dengan parameter uji meliputi uji kimia dan uji fisika. Uji fisika terdiri

dari uji perpanjangan, daya tarik dan uji ketebalan. Sedangkan uji kimia meliputi uji transmisi uap air, dan uji kadar air.

### 3.3 Rangkaian Penelitian

#### 3.3.1 Penelitian Pendahuluan

##### 3.3.1.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk menentukan compatible bahan kappa-iota karagenan dan tepung agar ( *Gracilaria verrucosa* ) yang diuji FTIR (Forrie Transform Infra Red) sebagai bahan pembuatan edible film dan pada penelitian pendahuluan menentukan konsentrasi mix kappa-iota karagenan dan tepung agar sebagai bahan pembuatan edible film yang digunakan sebagai acuan penelitian utama nantinya. Formulasi edible film pada penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Formulasi *edible film kappa* dan *iota* karagenan pada penelitian pendahuluan

Perlakuan ( kappa:iota:agar )	Formulasi			
	Kappa (gram)	Iota (gram)	Agar (gram)	Aquades (ml)
(A1) 0:1:3	0	0,5	1,5	100
(A2) 0:2:2	0	1	1	100
(A3) 0:3:1	0	1,5	0,5	100
(A4) 1:1:2	0,5	0,5	1	100
(A5) 1:2:1	0,5	1	0,5	100
(A6) 2:1:1	1	0,5	0,5	100
(A7) 2:0:2	1	0	1	100
(A8) 3:0:1	1,5	0	0,5	100
(A9) 1:0:3	0,5	0	1,5	100

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan pembuatan edible film berbahan mix kappa-iota karagenan dan tepung agar dengan 9 perbandingan

yang berbeda. Penelitian pendahuluan dilakukan 9 perlakuan. Sedangkan rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana, menurut Sasrosupadi (2000), RAL yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Dengan model umum untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}; \begin{matrix} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{matrix}$$

Keterangan:

- $Y_{ij}$  = nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- $\mu$  = nilai tengah umum
- $T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i
- $\epsilon_{ij}$  = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

Adapun banyaknya ulangan pada penelitian pendahuluan ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned} \text{Rumus ulangan} \longrightarrow & (n - 1) (r - 1) \geq 15 \\ & (9 - 1) (r - 1) \geq 15 \\ & 9 (r - 1) \geq 15 \\ & 9r - 9 \geq 15 \\ & 9r \geq 15 + 9 \\ & r \geq 24/9 \\ & r \geq 2,67, \end{aligned}$$

Keterangan:

- n = perlakuan
- r = ulangan.

Jadi, dari hasil perhitungan tersebut dapat diketahui bahwa jumlah ulangan pada penelitian pendahuluan sebanyak 2,67 ulangan atau jika dibulatkan menjadi 3 ulangan. Untuk lebih jelasnya mengenai jumlah ulangan pada penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Tabel 11.

**Tabel 11.** Penelitian Pendahuluan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A1	A1U1	A1U2	A1U3
A2	A2U1	A2U2	A2U3
A3	A3U1	A3U2	A3U3
A4	A4U1	A4U2	A4U3
A5	A5U1	A5U2	A5U3
A6	A6U1	A6U2	A6U3
A7	A7U1	A7U2	A7U3
A8	A8U1	A8U2	A8U3
A9	A9U1	A9U2	A9U3

Keterangan:

- A1 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (0 gram : 0,5 gram : 1,5 gram)  
 A2 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (0 gram : 1 gram : 1 gram)  
 A3 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (0 gram : 1,5 gram : 0,5 gram)  
 A4 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (0,5 gram : 0,5 gram : 1 gram)  
 A5 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (0,5 gram : 1 gram : 0,5 gram)  
 A6 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (1 gram : 0,5 gram : 0,5 gram)  
 A7 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (1 gram : 0 gram : 1 gram)  
 A8 : Konsentrasi Kappa : Iota : Agar (1,5 gram : 0 gram : 0,5 gram)

### 3.3.1.2 Prosedur Kerja Penelitian Pendahuluan

Prosedur kerja penelitian pendahuluan terdiri dari pembuatan karagenan, pembuatan agar, dan pembuatan edible film mix kappa-iota karagenan dan tepung agar. Pembuatan kappa karagenan didasarkan pada metode *gel press* penelitian Hernandez (2013), yang termodifikasi, yang telah dimodifikasi yaitu, pertama-tama rumput laut jenis dari *E. cottoni* dengan umur 40 hari ditimbang sebanyak 20 gram lalu dicuci bersih. Kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1:25 (b/v), lalu dipanaskan pada suhu 80–90°C selama 30 menit dengan menggunakan *waterbath*. Rumput laut yang telah dipanaskan, diblender selama 1 menit hingga menjadi pasta dan dilanjutkan dengan ekstraksi. Rumput laut jenis *E. cottoni* dipanaskan dengan suhu 80°C selama 2 jam dengan penambahan KOH 6% dengan alat *waterbath*. Hasil ekstraksi kemudian dinetralkan dengan HCl 0,2 N, penetralan HCl 0,2 N kemudian disaring dengan menggunakan kain saring hingga didapatkan residu dan filtrat. Residu tersebut ditambahkan dengan KCl 1,5% kemudian dibekukan selama 15 menit. Setelah

beku kemudian dikeringkan dan digiling sampai menjadi serbuk dan didapatkan *Refine Carrageenan*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 3 tentang skema kerja pembuatan karagenan.

Menurut Phillips dan Williams (2001), pembuatan karagenan *Eucheuma spinosum* dengan metode PNG terdiri dari beberapa tahapan. Pertama – tama rumput laut kering jenis *Eucheuma spinosum* ditimbang sebanyak 50 gram. Kemudian ditambahkan air dengan perbandingan 1 : 10 yaitu sebanyak 1.000 ml. Setelah itu, diekstraksi dengan KOH 6% atau sebanyak 60 gram. Hasil ekstraksi kemudian dicuci dengan air tawar bersih dan dipotong agar mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya dilakukan pemucatan warna, dan dilakukan pencucian kembali dengan air tawar hingga bersih. Hasil cucian kemudian dikeringkan dengan sinar matahari selama 2 sampai 3 hari. Kemudian dilakukan penggilingan sampai menjadi serbuk dan didapatkan semi-refine karagenan.

Pembuatan tepung agar menurut Kumar dan Fotedar (2009) di bagi menjadi 2 tahap. Proses pertama yaitu pra perlakuan dan yang kedua yaitu proses pembuatan tepung agar. Proses pra perlakuan, pertama *Gracilaria verrucosa* direndam dalam larutan CaO 0,5 % selama 2 jam. Setelah perendaman dilakukan pengeringan di oven pada suhu 60°C selama 8 jam. Pada saat setelah dioven, rumput laut *Gracilaria verrucosa* dapat di simpan dalam plastik atau di proses selanjutnya menjadi tepung agar. Proses kedua yaitu pembuatan tepung agar *Gracilaria verrucosa*. Pertama - tama timbang rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 20 gram. Setelah itu, dilakukan perendaman selama 1 jam dengan suhu 25°C pada aquades dengan perbandingan 1:200 (b/v). Selanjutnya dilakukan perendaman pada larutan NaOH 3% selama 3 jam pada suhu ruang dan dilanjutkan dengan pemanasan selama 1 jam pada waterbath suhu 80°C. Setelah itu dilakukan penetralan dengan air mengalir dan

dilanjutkan penambahan aquades 1:200 (b/v) yang kemudian di blender. Setelah proses di blender selama 4 menit, dilakukan proses pemanasan selama 2,5 jam dalam waterbath pada pH 7 – 7,5 dengan suhu 100°C. Selanjutnya dilakukan dengan proses memisahkan filtrat dan residu dengan menggunakan kain blacu dan dilakukan pendinginan filtrat sampai membentuk gel. Pada saat setelah membentuk gel, dilakukan pengeringan dengan pada suhu 60°C selama 24 jam hingga menjadi selembaran agar yang selanjutnya di blender menjadi tepung agar.

Sedangkan prosedur pembuatan edible film didasarkan pada penelitian Tamaela dan Lewerissa (2007) yaitu, pertama kappa-iota karaginan dan tepung agar sesuai perlakuan yang di tentukan ditimbang sebanyak total bahan 2 gram. Kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditambahkan 100 ml aquades. Selanjutnya dipanaskan di atas hot plate stirrer dengan suhu 85°C selama 30 menit atau sampai homogen. Saat dipanaskan, larutan ditambahkan sorbitol sebagai plasticizer sebanyak 1 ml. Setelah homogen, larutan dicetak pada plat plastik dan dikeringkan selama 24 sampai 36 jam dengan suhu 55°C. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 6 tentang skema kerja pembuatan edible film.

### **3.3.2 Penelitian Utama**

#### **3.3.2.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan**

Dari hasil penelitian pendahuluan, perlakuan terbaik digunakan sebagai acuan dimana pada penelitian inti didapatkan hasil, faktor perlakuan pertama terdiri dari faktor terdiri dari faktor konsentrasi plasticizer gliserol (A1) yang terdiri dari 3 perlakuan 2% (B1); 3% (B2); 4% (B3). Sedangkan faktor perlakuan kedua plasticizer sorbitol (A2) yang terdiri dari 3 perlakuan 2% (B1); dan 3% (B2); 4% (B3).

Adapun banyaknya ulangan pada penelitian utama ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned} \text{Rumus ulangan} &\longrightarrow (n - 1) (r - 1) \geq 15 \\ &(6 - 1) (r - 1) \geq 15 \\ &5 (r - 1) \geq 15 \\ &5r - 5 \geq 15 \\ &5r \geq 15 + 5 \\ &r \geq 20/5 \\ &r \geq 4, \end{aligned}$$

Keterangan:

n = perlakuan  
r = ulangan.

Jadi, dari hasil perhitungan tersebut dapat diketahui bahwa jumlah ulangan pada penelitian utama sebanyak 4 ulangan. Untuk lebih jelasnya mengenai jumlah ulangan pada penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Tabel 12.

**Tabel 12.** Rancangan Desain pada Penelitian Utama

Jenis plasticizer	Konsentrasi plasticizer	Ulangan			
		1	2	3	4
A1	B1	A1B1	A1B1	A1B1	A1B1
	B2	A1B2	A1B2	A1B2	A1B2
	B3	A1B3	A1B3	A1B3	A1B3
A2	B1	A2B1	A2B1	A2B1	A2B1
	B2	A2B2	A2B2	A2B2	A2B2
	B3	A2B3	A2B3	A2B3	A2B3

Keterangan : A1B1 = jenis plasticizer gliserol dengan kosentrasi 2% (2ml)

A1B2 = jenis plasticizer gliserol dengan kosentrasi 3% (3ml)

A1B3 = jenis plasticizer gliserol dengan kosentrasi 4% (4ml)

A2B1 = jenis plasticizer sorbitol dengan kosentrasi 2% (2ml)

A2B2 = jenis plasticizer sorbitol dengan kosentrasi 3% (3ml)

A2B3 = jenis plasticizer sorbitol dengan kosentrasi 4% (4ml)

Berdasarkan faktor tersebut maka penelitian utama ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (Analysis of Variance) dan dianalisis lebih lanjut dengan Uji Duncan dengan aplikasi SPSS 16.0. Kemudian dilakukan pemilihan perlakuan terpilih.

### 3.3.2.2 Prosedur Penelitian Utama

Prosedur kerja penelitian inti melalui langkah:

1. Pembuatan edible film dengan dua jenis plasticizer yang berbeda, yaitu gliserol dan sorbitol. Proses pembuatan edible film menurut (Tamaela dan Lewerissa 2008), yang telah dimodifikasi yaitu timbang tepung karagenan sebanyak 2 gram, masukkan kedalam erlenmeyer kemudian panaskan dengan 80 ml aquades diatas hot plate stirrer pada suhu 85°C selama 15 menit, tambahkan dengan plasticizer masing-masing 2% (2 ml), 3% (3 ml), dan 4% (4 ml) dan volumenya dijadikan 100 ml. Larutan kemudian dituang dalam pelat plastik selanjutnya dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 55°C selama 24 jam.
2. Dilakukan uji karakteristik edible film diantaranya Uji ketebalan, Tensile strength dan uji perpanjangan, Uji Transmisi Uap Air, dan uji kadar air.
3. Dilakukan analisa sidik ragam (ANOVA) dan jika berbeda nyata dilakukan uji lanjut Duncan.
4. Pemilihan perlakuan terpilih
5. Dilakukan Uji SEM.

### 3.4 Prosedur Analisis Parameter Uji

#### 3.4.1 Prosedur Analisis Kimia

##### 3.4.1.1 Analisis Laju Transmisi Uap Air (Amaliya dan Putri, 2014)

Analisis laju transmisi uap air dilakukan dengan cara *edible film* dipotong berdiameter  $\pm 5$  cm dan diletakkan diantara dua wadah (minuman gelas). Wadah 1 diisi air dan wadah ke 2 diisi dengan silika gel yang telah diketahui beratnya (konstan). Kemudian didiamkan selama 1 jam dan transmisi uap air dihitung dengan rumus:

$$\text{Transmisi uap air} = \frac{W}{A}$$

### 3.4.1.2 Analisis Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 2003)

Penentuan kadar air menurut Sudarmadji *et al.* (2003) sebagai berikut, sampel seberat 3 gram dimasukkan kedalam cawan alumunium. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 4-6 jam. Setelah itu sampel yang kering ditimbang lalu dihitung berat konstannya dan didapatkan hasil kadar air.

Rumus perhitungan kadar air menurut Sudarmadji *et al.* (2003), adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{bobot sampel awal (g)} - \text{bobot sampel akhir (g)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

### 3.4.2 Prosedur Analisis Fisika

#### 3.4.2.1 Analisis *Tensile Strength* dan *Elongasi* (Amaliya dan Putri, 2014)

Analisis *tensile strength* dan *elongasi* dilakukan dengan menggunakan alat Imada *Force Measurement* tipe ZP-200N. Dengan mengikuti prosedur kerja alat maka akan mendapatkan data untuk *tensile strength* dan *elongasi edible film*. Dari alat tersebut akan didapatkan data untuk gaya (*force*) yang diperlukan untuk memutuskan *edible film* dan perpanjangan *edible film* sampai *edible film* tersebut putus. Berikut ini adalah rumus untuk menghitung *tensile strength* dan *elongasi edible film*:

$$\text{Tensile strength (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Gaya}}{\text{Satuan luas (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Elongasi (\%)} = \frac{\text{Perpanjangan edible film (cm)}}{\text{Panjang awal edible film}} \times 100\%$$

#### 3.4.2.2 Pengukuran Ketebalan (Pranoto, 2007)

Pengukuran ketebalan *edible film* diukur dengan menggunakan *hand micrometer* dengan ketelitian 0,01 mm pada beberapa titik, kemudian dirata – rata. Ketebalan *film* dinyatakan dalam satuan *micrometer* (µm). Pengukuran ketebalan digunakan untuk menghitung kekuatan renggang putus.

### 3.4.3 Analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*) pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mikrostruktur sampel *edible film mix kappa iota* karaginan dengan tepung agar. Menurut Setiani *et al.* (2013), analisis morfologi terhadap penampang atas *film* bioplastik dilakukan dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) JEOL JSM-6360LA. Dengan cara sampel *edible film* ditempelkan pada *set holder* dengan perekat ganda, kemudian dilapisi dengan logam emas dalam keadaan vakum. Setelah itu, sampel dimasukkan pada tempatnya di dalam SEM, kemudian Gambar topografi diamati dan dilakukan perbesaran 5000 kali.

