

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* antara lain rumput laut *Eucheuma spinosum* yang diperoleh dari Madura, air, kertas label. Bahan saat pembuatan kitosan antara lain kulit udang windu, NaOH 3,5%, HCL 1 N, NaOH 50 %, aquades, air, kertas lakmus, kain putih dan kertas label. Bahan saat pembuatan tepung *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* adalah rumput laut *Sargassum filipendula*, *Eucheuma spinosum*, air dan kertas label. Sedangkan bahan pembuatan *Edible film* antara lain tepung rumput laut *Eucheuma spinosum*, tepung *Sargassum filipendula*, Kitosan, asam asetat glasial, aquades, kertas label, tisu, air dan *plasticizer* sorbitol.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan tepung *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* adalah baskom, nampan, loyang, pisau, talenan, grinder dan ayakan 100 mesh. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kitosan adalah beakerglass 1000 mL, spatula, *magnetic stirer*, blender, gelas ukur 100 mL, timbangan digital, *hotplate*, oven, loyang, nampan dan ayakan 100 mesh. Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam pembuatan *Edible film* adalah erlenmeyer 100 mL, spatula, *magnetic stirer*, nampan, plat plastik, oven, *hotplate*, timbangan digital dan gelas ukur 100 mL. Alat-alat yang digunakan dalam pengujian kadar air adalah botol timbang, oven, gunting, mortal dan alu, timbangan analitik, desikator dan *crushable tank*. Alat-alat yang digunakan pada uji kadar lemak adalah goldfish, gelas piala, oven, dan kondensor. Alat-alat yang

digunakan pada uji kadar protein antara lain alat dekstruksi, alat destilasi, timbangan, erlenmeyer, buret, statif, labu dekstruksi, mortal dan alu, gelas ukur, dan pipet tetes.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Setyanto (2015), penelitian eksperimen merupakan salah satu penelitian yang dilakukan dengan manipulasi serta mengontrol sebagian variabel bebas, dan melakukan pengamatan pada variabel bebas terhadap variabel terikat. Tujuannya adalah menemukan variasi yang muncul dengan adanya manipulasi tersebut. Keuntungan menggunakan penelitian eksperimen ada dua, yaitu pertama memberikan jawaban sementara dari pertanyaan pada suatu penelitian, kedua peneliti mampu mengontrol varian variabel.

3.2.2 Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variabel bebas berupa perbandingan formulasi bahan *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula* dan kitosan terhadap variabel terikat karakteristik kimia yaitu kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, karbohidrat dan organoleptik *edible film* (warna, rasa, tekstur, dan aroma).

3.2.3 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan pembuatan kitosan dari limbah kulit udang windu, kemudian pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula*.

3.2.3.1 Prosedur Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan beberapa langkah sebagai berikut:

1. Pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula*.

Listyana (2014), yang telah dimodifikasi yaitu, pertama Rumput laut jenis *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* dicuci bersih. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran dengan menggunakan pisau, selanjutnya dilakukan pengeringan pada sinar matahari, lalu rumput laut kering digiling menggunakan grinder selanjutnya dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan 100 mesh dan didapatkan tepung rumput laut. Skema kerja pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pembuatan Kitosan

Pembuatan kitosan dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap pertama pembuatan kitin dan tahap kedua pembuatan kitosan. Pembuatan kitin dan kitosan dilakukan berdasarkan Ramadhan *et al.*, (2010) pembuatan kitosan dilakukan dalam tiga tahap yaitu demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi. Pertama cangkang udang dikeringkan kemudian dihaluskan dimasukkan ke dalam gelas beker dengan ditambahkan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (w/v). Proses deproteinasi dilakukan diatas *hotplate* selama ± 2 jam pada suhu 65°C dengan pengadukan *magnetic stirrer*. Kulit disaring menggunakan kain blacu dan dicuci hingga pH netral. Setelah itu dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 2 jam. Dalam proses ini didapatkan crude kitin. Selanjutnya dilanjutkan tahap demineralisasi yaitu Crude kitin dimasukkan ke dalam gelas beker kemudian ditambahkan larutan HCl 1N dengan perbandingan antara crude kitin dengan larutan HCl 1:15%

(w/v). Pada proses ini dilakukan dengan pengadukan menggunakan *magnetik stirer* selama 60 menit pada suhu 65°C. Setelah itu crude kitin dicuci dan diperas pada kain blacu hingga pH netral, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 2 jam. Dalam proses ini akan menghasilkan kitin. Proses selanjutnya yaitu transformasi kitin menjadi kitosan, proses ini dilakukan dengan cara memasukkan kitin ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan larutan NaOH 50 % dengan perbandingan kitin dan larutan NaOH 1 : 10 (w/v). Dipanaskan dengan *hotplate* suhu 120°C selama 30 menit dengan pengadukan dengan *magnetic stirer*. Setelah itu menyaring campuran, kemudian mencucinya hingga didapatkan pH netral. Langkah selanjutnya adalah dengan mengeringkan di dalam oven dengan pada suhu 65°C selama 24 jam, sehingga diperoleh kitosan.

3. Tepung rumput laut dan kitosan selanjutnya dilakukan uji FTIR untuk mengetahui kompatibilitas antar bahan.

3.2.4 Penelitian Utama

Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui formulasi bahan yang tepat pada pembuatan *edible film* berbahan campuran tepung *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula*, dan kitosan dengan *plasticizer* sorbitol sehingga dapat menghasilkan karakteristik kimia dan organoleptik *edible film* kualitas baik.

3.2.4.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Pada Penelitian Utama

Pembuatan *edible film* pada penelitian pendahuluan dilakukan dengan menggunakan 9 perlakuan dengan 3 kali ulangan yang didapatkan dari perhitungan rumus sebagai berikut:

$$\begin{array}{ll}
 (n-1) (r-1) & \geq 15 \\
 (9-1) (r-1) & \geq 15 \\
 8 (r-1) & \geq 15 \\
 8r - 8 & \geq 15 \\
 8r & \geq 15 + 8
 \end{array}$$

$r \geq 23/8$
 $r \geq 2,875$ ulangan = dibulatkan keatas, jadi 3 kali ulangan

Penelitian utama dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji lanjut menggunakan BNT. Formulasi pembuatan *edible film* berbahan campuran tepung rumput laut *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula*, dan kitosan dengan *plasticizer* sorbitol 1% (v/v) dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 4. Formulasi *edible film*

Perlakuan (Perbandingan Tepung <i>Eucheuma spinosum</i> , <i>Sargassum filipendula</i> , dan kitosan)	Konsentrasi		
	1	2	3
A ₁	A ₁	A ₁	A ₁
A ₂	A ₂	A ₂	A ₂
A ₃	A ₃	A ₃	A ₃
A ₄	A ₄	A ₄	A ₄
A ₅	A ₅	A ₅	A ₅
A ₆	A ₆	A ₆	A ₆
A ₇	A ₇	A ₇	A ₇
A ₈	A ₈	A ₈	A ₈
A ₉	A ₉	A ₉	A ₉

Keterangan:

- A₁ : Konsentrasi *Sargassum filipendula*. (2%)
A₂ : Konsentrasi Kitosan (2%)
A₃ : Konsentrasi *Eucheuma spinosum* (2%)
A₄ : Konsentrasi *Sargassum sp* : Kitosan (1%:1%)
A₅ : Konsentrasi *Sargassum filipendula* : *Eucheuma spinosum* (1%:1%)
A₆ : Konsentrasi kitosan : *Eucheuma spinosum* (1%:1%)
A₇ : Konsentrasi *Sargassum filipendula*:kitosan:*E. spinosum* (1%:0,5%:0,5%)
A₈ : Konsentrasi *Sargassum filipendula*:kitosan:*E. spinosum* (0,5%:1%:0,5%)
A₉ : Konsentrasi *Sargassum filipendula*:kitosan:*E. spinosum* (0,5%:0,5%:1%)

3.2.4.2 Prosedur Penelitian Utama

Prosedur penelitian utama pembuatan *edible film* melalui beberapa tahap berikut:

1. Pertama dilakukan pembuatan *edible film* pembuatan *edible film* dilakukan dengan modifikasi pada penelitian Santacruz et al., (2015), yaitu pembuatan *edible film* kitosan yang dicampurkan dengan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* adalah

sebagai berikut: serbuk kitosan ditimbang sesuai perlakuan yang sudah ditentukan, kemudian dilarutkan dalam 80 mL asam asetat glasial 1% pada Erlenmeyer lalu dipanaskan diatas *hotplate stirrer* dengan suhu 50°C selama 20 menit. Dimasukkan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* ke dalam larutan kitosan. Ditambah aquades sampai volume mencapai 100 mL, lalu dipanaskan diatas *hotplate* suhu 50°C selama 15 menit, pada 5 menit terakhir proses pemanasan ditambahkan *plasticizer* sorbitol 1% (v/v). Setelah homogen *edible film* dituangkan dalam cetakan plat plastik, dan dioven pada suhu 65°C selama 24 jam. Proses pembuatan *edible film* dapat dilihat pada Lampiran 4.

2. *Edible film* yang sudah kering selanjutnya diambil dari plat plastik dan dilakukan pengujian sifat kimia dan organoleptik *edible film*. Pengujian yang dilakukan diantaranya kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak (AOAC, 2006), karbohidrat (Winarno, 2004), dan uji organoleptik (Moedjiharto, 2000) seperti, warna, aroma, rasa dan tekstur.
3. Dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA) dan jika berbeda nyata dilakukan uji lanjut menggunakan BNT.
4. Pengambilan perlakuan terbaik dengan menggunakan analisis De Garmo.
5. Dilakukan uji Serat Pangan, dan Uji Iodium.

3.2.5 Parameter Uji

3.2.5.1 Analisis Kadar air (AOAC, 2006)

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara pemanasan. Prinsip metode oven ini adalah pemanasan sampel pada suhu (100 - 105 °C) hingga mencapai berat konstan. Sampel yang telah dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 1 – 2 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya. Selanjutnya dikeringkan

dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 3 – 5 jam tergantung bahannya, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Panaskan lagi dalam oven selama 30 menit, dinginkan dalam desikator dan ditimbang. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg). pengurangan berat merupakan banyaknya air dalam bahan.

$$\%Wb = \frac{(A+B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

WB = kadar air basah

A = Berat Botol timbang

B = Berat Sampel

C = Berat botol timbang dan sampel setelah dioven

3.2.5.2 Analisis Kadar Protein (AOAC, 2006)

Metode yang digunakan untuk uji kadar protein adalah dengan cara makro-Kjeldahl. Prinsip pengujiannya yaitu dengan cara destruksi, destilasi dan titrasi. Pertama sampel yang telah dihaluskan ditimbang 1 g dan dimasukkan dalam labu kjeldahl. Kemudian ditambahkan 7,5 g $K_2S_2O_8$ dan 0,35 g HgO dan terakhir ditambahkan H_2SO_4 pekat. Dipanaskan labu kjeldahl dalam almari asam sampai berhenti mengeluarkan asap. Pemanasan diteruskan kurang lebih selama 1 jam. Matikan pemanas dan bahan dibiarkan agar dingin. Kemudian ditambahkan 100 mL aquades dalam labu kjeldahl yang didinginkan dalam almari es dan beberapa lempeng Zn, juga ditambahkan 15 mL larutan K_2S 4% dan terakhir perlahan ditambahkan larutan NaOH 50% sebanyak 50 mL. Pasang labu kjeldahl pada alat destilasi, panaskan labu perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur, kemudian panaskan dengan cepat sampai mendidih. Distilat kemudian ditampung dalam Erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 mL larutan standar HCl (0,1 N) dan 5 tetes indikator metal merah. Lakukan distilasi samapi distilat yang tertampung sebanyak 75 mL. titrasi distilah yang telah didapatkan menggunakan standar NaOH (0,1 N).

$$\%N = 14 \times \frac{(\text{mL NaOH contoh} - \text{mL NaOH blanko})}{\text{gram contoh} \times 1000} \times 14,008$$

$$\% \text{Protein} = \%N \times \text{faktor konversi}$$

Keterangan:

%N = jumlah kandungan nitrogen bahan

14 = nomor masa nitrogen

14,008 = normalitas dari H_2SO_4

3.2.5.3 Analisis Kadar Lemak (AOAC, 2006)

Penentuan kadar lemak menggunakan metode goldfish. Pertama-tama timbang 5 g bahan kering selanjutnya haluskan bahan dan pindahkan ke dalam kertas saring yang dibentuk sedemikian rupa sehingga dapat membungkus bahan dan dapat masuk dalam thimble atau pembungkus bahan yang terbuat dari alumina yang porous. Thimble dipasang pada sample tube atau gelas penyangga yang bagian bawahnya terbuka, tepat di bawah kondensor alat distilat goldfish. Pelarut dimasukkan dalam gelas piala. Gelas piala kemudian dipasang pada kondensor secara tepat dan tidak dapat untuk diputar lagi. Alirkan air untuk pendingin ke kondensor, dan naikan pemanas listrik hingga menyentuh bagian bawah gelas piala dan nyalakan pemanasnya. Ekstraksi ini dilakukan selama 3-4 jam, setelah ekstraksi selesai, pemanas dimatikan pemanas listrik dan turunkan. Kemudian jika sudah tidak terdapat tetesan pelarut, ambil thimble dan sisa bahan dalam gelas penyangga. Gelas piala sebagai penampung pelarut dipasang kembali seperti semula, dan dilanjutkan pemanasan samapi pelarut menguap dan tertampung pada gelas piala penampung pelarut. Pelarut yang telah tertampung masih dapat untuk digunakan kembali.

$$\% \text{Kadar lemak} = \frac{(\text{berat awal sampel} + \text{berat kertas saring} + \text{berat tali}) - \text{berat akhir}}{\text{berat awal sampel}} \times 100\%$$

3.2.5.4 Analisis Kadar Abu (AOAC, 2006)

Prosedur penentuan kadar abu pertama yang harus dilakukan yaitu mengeringkan bahan yang akan kita gunakan. Kemudian haluskan bahan dan timbang bahan hingga kurang lebih 2 sampai 10 g, serta timbang juga kurs porselin yang telah kering. Bahan dimasukkan dalam kurs porselin dan dipijarkan diatas muffle sampai didapatkan abu berwarna keputih-putihan. Selanjutnya kurs porselin dan abu dimasukkan dalam desikator dan setelah dingin timbang berat abu.

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{\text{berat akhir-berat kurs porselin}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.2.5.5 Analisis Kadar Karbohidrat (Winarno, 2004)

Analisa kandungan kadar karbohidrat dapat dilakukan dengan menggunakan cara perhitungan kasar atau sering disebut *Carbohydrate by Diffrence*. Artinya analisis kandungan karbohidratnya melalui suatu perhitungan. Perhitungan *Carbohydrate by Diffrence* merupakan suatu cara dalam menentukan kadar karbohidrat suatu bahan makanan secara kasar, kemudian diperoleh hasil dan dicatat dalam daftar komposisi bahan makanan.

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

3.2.5.6 Uji Organoleptik (Moedjiharto, 2000)

Metode penelitian indrawi dengan menggunakan indera pengecap (uji rasa), pembau (bau), peraba (tekstur), penglihatan (penampakan dan warna). Prinsip pengujian indrawi yaitu mengambil contoh yang dibandingkan dengan yang akan dinilai yang diletakkan pada wadah yang bersih. Pada penelitian ini menggunakan uji perbedaan atau *difference test*. Tujuan uji ini adalah untuk melihat apakah ada perbedaan sifat sensori antara contoh yang diujikan, sehingga dapat diperoleh pengaruh dari tiap perlakuan suatu proses pengolahan.

Perbedaan yang dapat dilihat yaitu lebih kecil, sama besar atau lebih besar dari standar.

Multiple comparison merupakan uji yang digunakan pada organoleptik *edible film*. Pada pengujian ini suatu standart atau *reference* yang dikenal dengan kode R dan disajikan dengan contoh lain yang telah diberi kode. Kemudian panelis diminta untuk menilai contoh-contoh yang telah diberi kode dan dibandingkan dengan contoh *reference*.

3.2.5.7 Analisis Serat Pangan (AOAC, 1995)

Penentuan kadar serat pangan dilakukan dengan cara pertama menimbang 1 gram sampel dan dimasukkan ke dalam beakerglass 400 mL kemudian ditambahkan 50 mililiter 0,1 M buffer natrium fosfat pH 6, diaduk dan ditambahkan 0,1 mL enzim termamyl. Ditutup beakerglass dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 100°C selama 15 menit dan digoyang setiap 5 menit. Didinginkan sampel pada suhu kamar dan diatur pH menjadi 7,5 dengan penambahan 10 mL larutan 0,275 N NaOH. Tambahkan 5 gram protease dan ditambahkan 0,1 mL larutan enzim. Ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 30 menit. Didinginkan dan ditambahkan 10 mL 0,325 larutan HCl dan diatur pH hingga 4,0-4,6. Kemudian ditambahkan 0,3 mL amyloglukosidase dan ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada 60°C selama 30 menit dengan agitasi yang berkelanjutan. Ditambahkan 280 mL 95% etanol dan dipanaskan 60°C serta dipresipitasi pada suhu kamar selama 60 menit. Disaring dengan krus yang telah diberi celite 0,1 mg yang diratakan dengan etanol 78%. Selanjutnya dicuci residu dalam krus dengan 20 mL etanol 78% (3 kali), 10 mL etanol 95% (2 kali) dan 10 mL aseton (1 kali). Kemudian dikeringkan residu dalam oven vakum 70% selama semalam atau dioven dengan suhu 105°C sampai berat konstan.

3.2.5.8 Analisis Kadar Iodium (Febrianti *et al.*, 2013)

Analisis kadar iodium dapat dilakukan dengan metode Spektrofotometer UV-vis berdasarkan pada pembentukan kompleks amilum-iodium dengan oksidator iodat. Prosedur pengujian dimulai dengan menyiapkan sampel sebanyak 2 gram kemudian ditambah dengan larutan Iodida 100 ppm dipipet 0,3 mL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambah larutan KIO_3 54,6 ppm sebanyak 1 mL, ditambah 5 tetes H_2SO_4 , dan ditambah indikator amilum 1 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm sampai 750 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

