

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh kadar garam dan lama fermentasi terhadap mutu kecap ikan kuniran menggunakan enzim papain terdiri dari tiga jenis yaitu alat untuk pembuatan enzim papain, pembuatan kecap ikan kuniran dan alat untuk menguji kecap ikan sesuai dengan parameter yang diinginkan. Alat yang digunakan dalam pembuatan enzim papain adalah pisau, baskom, sentrifuge dan kulkas. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kecap ikan adalah: penggiling daging, pisau, botol kaca, baskom, sendok, kain blacu, timbangan digital dan *autoclave*. Sedangkan alat yang digunakan untuk analisis mutu produk adalah spektrofotometer, *sentrifuge*, *cuvet*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet serologis, pipet volum, bola hisap, desikator, *oven*, spatula, botol timbang, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, kompor listrik, *sample tube*, gelas piala, statif, buret dan laptop

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh kadar garam dan lama fermentasi terhadap mutu kecap ikan kuniran menggunakan enzim papain terdiri dari tiga jenis yaitu bahan untuk pembuatan enzim papain, pembuatan kecap ikan kuniran dan bahan untuk menguji kecap ikan sesuai dengan parameter yang diinginkan. Bahan yang digunakan dalam pembuatan enzim papain adalah getah buah pepaya, larutan buffer fosfat pH 7. Bahan yang digunakan dalam pembuatan kecap ikan adalah ikan kuniran (*Upeneus sulphureus*), garam dan enzim papain kasar (merek Paya). Bahan yang digunakan dalam pengujian kecap ikan sesuai dengan parameternya adalah kertas label,

kertas saring halus, benang kasur, benang kasur, BSA (*Bovine Serum Albumin*), biuret, indikator K_2CrO_4 5%, $AgNO_3$, dan aquades.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Eksperimen adalah suatu cara untuk mencari hubungan sebab akibat (hubungan kausal) antara dua faktor yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti dengan mengeliminasi atau mengurangi atau menyisihkan faktor-faktor lain yang mengganggu. Eksperimen selalu dilakukan dengan maksud untuk melihat akibat suatu perlakuan (Arikunto, 2013). Metode eksperimen menurut Jaedun (2011), adalah penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati atau diukur dampaknya. Penelitian eksperimen juga memberikan perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan sesuatu kejadian atau keadaan yang akan diteliti bagaimana akibatnya.

Penelitian ini dilakukan dalam 2 (dua) tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Perlakuan yang akan digunakan pada penelitian pendahuluan meliputi pembuatan enzim papain, mencari konsentrasi garam dan lama fermentasi terbaik yang nantinya digunakan pada penelitian utama. Pada penelitian utama dilakukan untuk mendapatkan persentase konsentrasi garam dan lama fermentasi yang tepat, sehingga dapat menghasilkan kecap ikan kuniran yang bermutu baik.

3.2.2 Variabel

Variabel adalah faktor yang mengandung lebih dari satu nilai dalam metode statistik. Variabel terdiri dari variabel bebas dan terikat. Menurut Jaedun (2011),

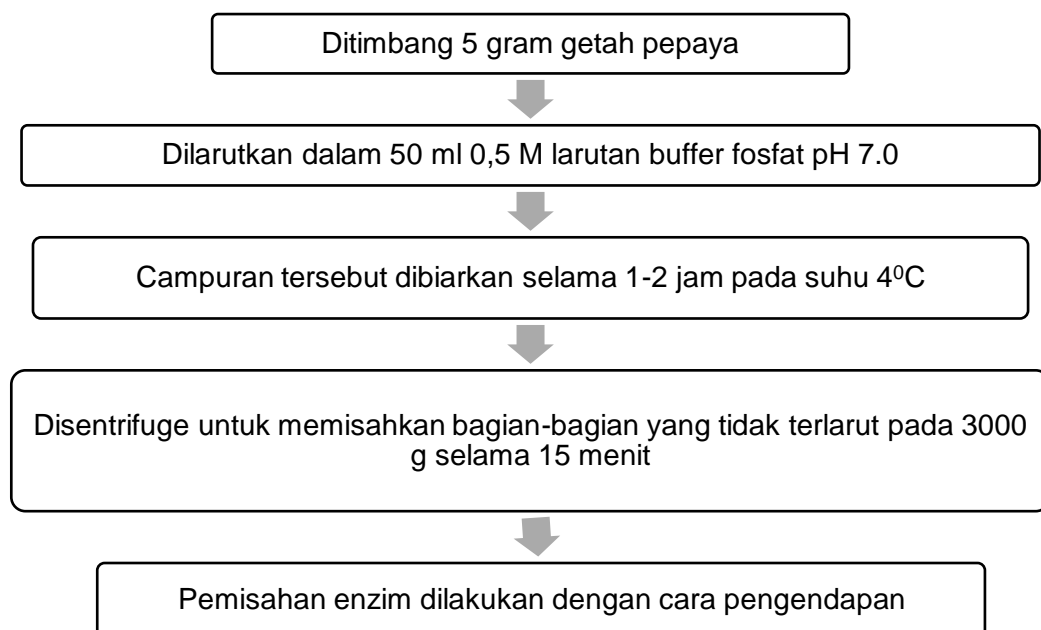
variabel bebas merupakan variabel yang akan dilihat pengaruhnya terhadap variabel terikat/dependen, atau variabel dampak. Sedangkan variabel terikat merupakan variabel hasil/dampak/akibat dari variabel bebas/perlakuan. Variabel terikat umumnya menjadi tujuan penelitian, sumber masalah, yang ingin ditingkatkan kualitasnya. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi garam yang ditambahkan, serta lama fermentasi yang diberikan dalam kecap ikan kuniran. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah rendemen, karakteristik kimia meliputi kadar protein, kadar air, kadar lemak, kadar abu, kadar karbohidrat. Uji organoleptik meliputi hedonik warna dan hedonik aroma.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

a. Penelitian Pendahuluan Tahap 1

Penelitian pendahuluan tahap 1 bertujuan untuk mendapatkan enzim papain. Prosedur pembuatan enzim papain menurut Suprayitno (1995)^a, dapat dilihat pada Gambar 5.

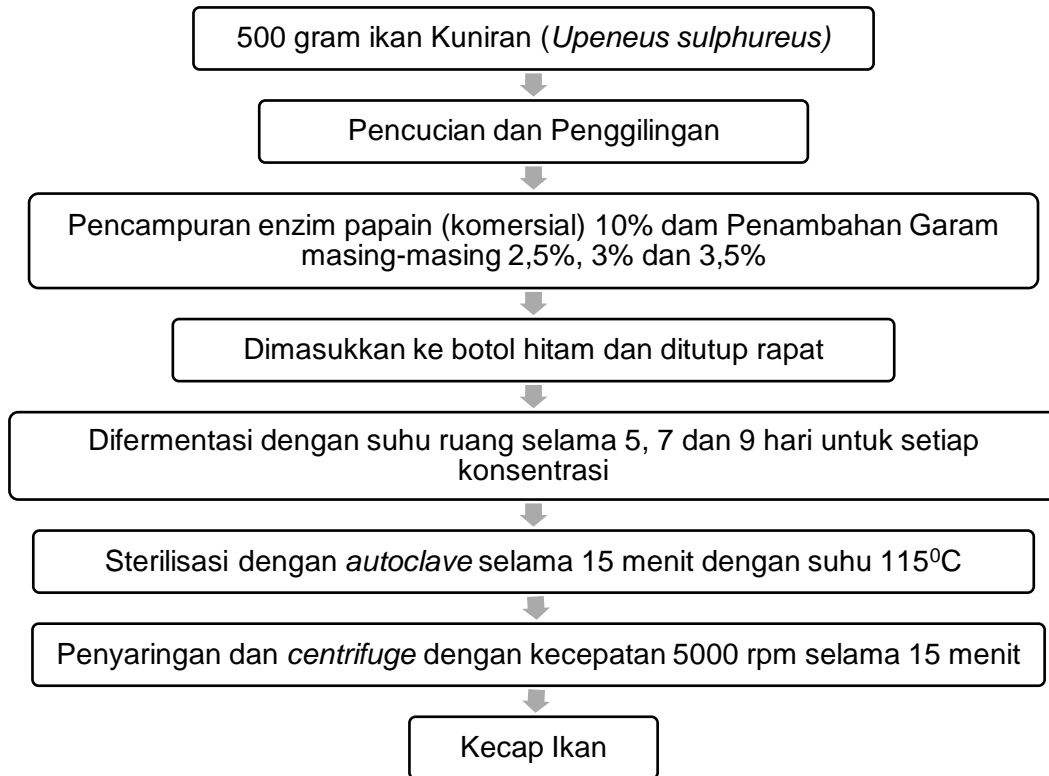


Gambar 5. Prosedur Pembuatan Enzim Papain (Suprayitno, 1995)^a

Pada penelitian tahap 1 diperoleh rendemen enzim papain sebesar 200 gram. Enzim yang diperoleh dari Penelitian Pendahuluan Tahap 1 digunakan untuk menentukan analisis pada penelitian utama. Selain enzim papain dari penelitian pendahuluan, penelitian ini juga menggunakan enzim komersial dengan merk Paya, yang memiliki komposisi gula, garam dan papain. Adapun perbandingan penambahan enzim papain dari penelitian tahap 1 dan enzim papain merk Paya adalah 3:7.

b. Penelitian Pendahuluan Tahap 2.

Penelitian pendahuluan tahap 2 bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi garam dan lama fermentasi terbaik yang akan dijadikan dasar acuan dalam penelitian utama. Penentuan konsentrasi garam dan lama fermentasi pada penelitian pendahuluan tahap 2 mengacu pada hasil terbaik pada penelitian Kurniawan (2008), yaitu konsentrasi garam 3% dengan lama fermentasi 7 hari. Konsentrasi garam 3% digunakan sebagai nilai tengah pada penelitian pendahuluan tahap 2, dengan range masing-masing 0,5%. Sehingga diperoleh konsentrasi garam 2,5%;3%;3,5%. Lama fermentasi yang digunakan dalam pembuatan kecap ikan pada penelitian pendahuluan tahap 2 adalah 5, 7 dan 9 hari. Lama fermentasi 7 hari digunakan sebagai nilai tengah pada penelitian pendahuluan tahap 2, dengan range masing-masing 2 hari. Sehingga diperoleh lama fermentasi 5, 7, 9 hari. Prosedur pembuatan kecap ikan kuniran pada penelitian pendahuluan tahap 2 dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Prosedur Pembuatan Kecap Ikan (Modifikasi Prasetyo, *et al.* 2012).

Adapun rata-rata kadar protein kecap ikan kuniran yang didapatkan pada penelitian pendahuluan tahap dua, dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rata-Rata Kadar Protein Penelitian Pendahuluan

Konsentrasi Garam	Lama Fermentasi	Ulangan			Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3		
2,5%	5 Hari	12,16	12,15	12,14	36,450	12,15±0,01
	7 Hari	12,76	12,77	12,74	38,270	12,76±0,02
	9 Hari	13,02	13,01	13,04	39,070	13,02±0,02
3%	5 Hari	11,68	11,66	11,69	35,030	11,68±0,02
	7 Hari	12,18	12,16	12,17	36,510	12,17±0,01
	9 Hari	12,39	12,47	12,55	37,410	12,47±0,08
3,5%	5 Hari	11,34	11,33	11,36	34,030	11,34±0,02
	7 Hari	11,75	11,71	11,73	35,190	11,73±0,02
	9 Hari	12,03	12,15	12,19	36,370	12,12±0,08
MAX						13,02±0,02
MIN						11,34±0,02

Sumber : Data Penelitian (2017).

Pada penelitian pendahuluan tahap dua didapatkan penambahan garam dan lama fermentasi yang optimum, yang menghasilkan kadar protein terlarut kecap ikan kuniran tertinggi, yaitu terdapat pada kecap ikan dengan penambahan garam sebanyak 2,5% dengan lama fermentasi 9 hari dengan kadar protein terlarut sebesar 13,02. Sedangkan kadar protein terendah, terdapat pada penambahan garam 3,5% dan lama fermentasi 5 hari, yaitu sebesar 11,34%. Kadar garam dan lama fermentasi ini digunakan sebagai dasar pada penelitian utama.

Dari hasil tersebut dapat diambil kesimpulan, bahwa semakin sedikit garam yang diberikan, maka semakin tinggi pula nilai kadar protein yang dihasilkan. Penurunan kadar protein terjadi karena terhambatnya aktivitas enzim protease pada konsentrasi larutan garam yang semakin tinggi sehingga jumlah protein yang terpecahkan menjadi asam amino menurun. Begitu juga semakin lama waktu fermentasi, maka semakin tinggi pula kadar protein yang dihasilkan. Hal tersebut disebabkan oleh semakin lama waktu fermentasi, protein yang terpecahkan oleh bantuan bakteri asam laktat semakin banyak (Kurniawan, 2008).

c. Penelitian Pendahuluan Tahap 3.

Penelitian pendahuluan tahap 3 bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia bahan baku sebelum dijadikan kecap ikan, serta untuk mengetahui profil asam amino pada daging ikan kuniran. Pada analisis proksimat meliputi kadar protein, kadar air, kadar abu, kadar lemak dan kadar karbohidrat. Sementara Profil Asam Amino terdiri dari asam amino essensial (treonin, metionin, lisin, leusin, isoleusin, fenilalanin, valin) dan asam amino non essensial (tirosin, serin, glisin, asam glutamat, asam aspartat, arginin, alanin, histidin).

Hasil analisis Profil Asam Amino daging ikan Kuniran didapatkan hasil yang tertera pada Tabel 6

Tabel 6. Komposisi Profil Asam Amino Daging Ikan Kuniran.

Parameter	Hasil Analisis Profil Asam Amino
Asam Aspartat	1,23
Asam Glutamat	1,80
Serin	0,50
Histidin	0,24
Glisin	0,54
Treonin	0,58
Arginin	0,66
Alanin	0,91
Tirosin	0,47
Metionin	0,45
Valin	0,63
Fenilalanin	0,57
Isoleusin	0,65
Leusin	1,01
Lisin	1,30
Jumlah	11,62

Sumber : Laboratorium Integrasi, Institut Pertanian Bogor.

Dari segi nutrisi asam amino dibagi menjadi 2 golongan, yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial. Asam amino non esensial adalah asam amino yang dapat disediakan oleh tubuh organisme melalui proses biosintesa yang rumit dari senyawa nitrogen yang terdapat dalam makanan, dan asam amino esensial adalah asam amino yang tidak dapat disintesa oleh tubuh. Untuk memenuhi kebutuhan protein, suatu organisme memerlukan tambahan asam amino esensial yang diperoleh dari bahan pangan atau pakan yang dikonsumsi (Elfita, 2014). Pada Tabel 6 terdapat beberapa asam amino esensial, yaitu Histidin, Treonin, Arginin, Metionin, Valin, Fenilalanin, Isoleusin, Leusin dan Lisin. Kemudian terdapat beberapa asam amino non esensial, yaitu Asam Aspartat, Asam Glutamat, Serin, Glisin, Alanin dan Tirosin.

Asam amino dikelompokkan berdasarkan sifat kimia rantai samping tersebut menjadi empat kelompok. Rantai samping dapat membuat asam amino bersifat asam lemah, basa lemah, hidrofilik jika polar, dan hidrofobik jika non polar. Kandungan bagian asam amino polar yang tinggi dalam protein meningkatkan kelarutannya dalam air (Suprayitno dan Sulistiyati, 2017). Pada Tabel 6 terdapat

beberapa asam amino yang memiliki sifat polar, diantaranya Asam Aspartat, Asam Glutamat, Serin, Histidin, Glisin, Treonin, Arginin dan Lisin. Kemudian terdapat beberapa asam amino yang bersifat non polar, diantaranya Alanin, Tirosin, Metionin, Valin, Fenilalanin, Isoleusin dan Leusin.

Hasil analisis uji proksimat daging ikan kuniran didapatkan hasil yang tertera pada Tabel 7.

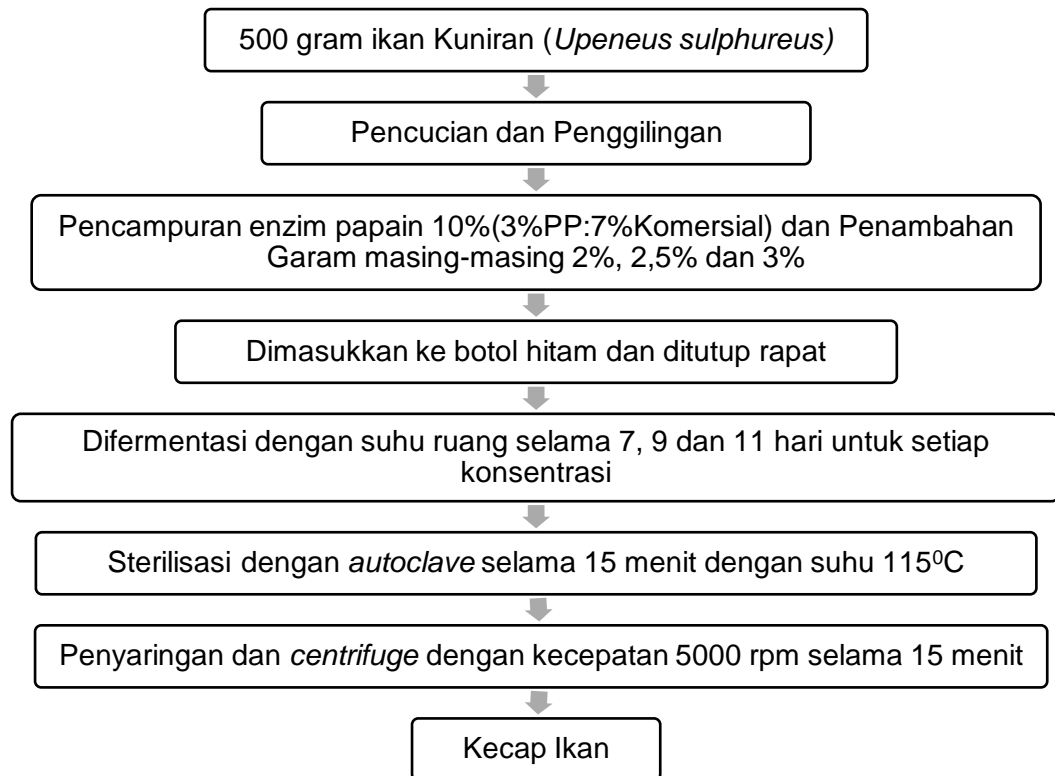
Tabel 7. Komposisi Gizi Daging Ikan Kuniran.

Parameter	Hasil Analisis Proksimat (%)
Kadar Protein	18,55
Kadar Lemak	0,95
Kadar Air	74,10
Kadar Abu	3,90
Kadar Karbohidrat	2,50

Sumber : Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan FTP UB.

3.3.2 Penelitian Utama

Penelitian utama bertujuan untuk mendapatkan kadar garam dan lama fermentasi yang tepat sehingga dapat menghasilkan kecap ikan kuniran yang bermutu baik. Tahapan penelitian utama dimulai dari persiapan sampel ikan kuniran yang sebelumnya sudah dilakukan pengujian Proksimat dan Profil Asam Amino ikan kuniran dan dinyatakan layak untuk selanjutnya dijadikan kecap ikan. Pada penelitian utama parameter uji yang dilakukan yaitu Rendemen, kadar protein, kadar lemak, air, abu, karbohidrat, kadar NaCl, Uji Organoleptik Kecap Ikan (Warna dan Aroma) dan Profil Asam Amino. Prosedur pembuatan kecap ikan pada penelitian utama dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Prosedur Pembuatan Kecap Ikan (Modifikasi Prasetyo, *et al.* 2012).

3.4 Rancangan Penelitian

Analisis data yang digunakan dalam penelitian utama ialah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Perlakuan percobaan pada penelitian ini meliputi perbedaan kadar garam (X) dan lama fermentasi (Y). suatu percobaan faktorial bila perlakuannya terdiri dari kombinasi lengkap antar level (antar taraf) dari dua faktor atau lebih dan masing-masing faktor terdiri dari dua taraf atau lebih. Pada faktor kadar garam (X) terbagi menjadi tiga yaitu 2% (X1), 2,5% (X2) dan 3% (X3). Pada lama fermentasi (Y) terbagi menjadi tiga taraf yaitu 7 hari (Y1), 9 (Y2), dan 11 hari (Y3). Interaksi kedua faktor dilakukan dengan 3 ulangan. Hal tersebut sesuai dengan persamaan :

$$(n-1) (r-1) \geq 15$$

Dimana :

$$n = \text{perlakuan}$$

r = ulangan

Sehingga banyaknya ulangan dapat dihitung sebagai berikut:

$$((3.3) - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(9 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,875 \text{ (3 kali ulangan)}$$

Metode pengujian data yang digunakan adalah analisis keragaman (ANOVA) dimana jika terdapat pengaruh yang nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan uji lanjut Tukey menggunakan aplikasi *software* SPSS 16.0 dengan taraf 5%. Model statistika yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor konsentrasi sari nenas taraf ke-l, faktor lama fermentasi taraf ke-j, pada ulangan ke -k

M = Rataan umum

A_i = Pengaruh faktor konsentrasi garam pada taraf ke-i

B_j = Pengaruh faktor lama fermentasi pada taraf ke-j

$(AB)_{ij}$ = Interaksi antara faktor konsentrasi garam dan faktor lama fermentasi pada faktor konsentrasi taraf ke-l, faktor lama fermentasi taraf ke-j

E_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor konsentrasi taraf ke-l, ke faktor lama fermentasi taraf ke-j pada ulangan ke-k.

Model rancangan percobaan pada Penelitian Utama dapat dilihat pada Tabel 8:

Tabel 8. Model Rancangan Pada Penelitian Utama

Perlakuan		Perlakuan Kombinasi	Ulangan		
1	2		1	2	3
X1	Y1	X1Y1	X1Y1.1	X1Y1.2	X1Y1.3
	Y2	X1Y2	X1Y2.1	X1Y2.2	X1Y2.3
	Y3	X1Y3	X1Y3.1	X1Y3.2	X1Y3.3
X2	Y1	X2Y1	X2Y1.1	X2Y1.2	X2Y1.3
	Y2	X2Y2	X2Y2.1	X2Y2.2	X2Y2.3
	Y3	X2Y3	X2Y3.1	X2Y3.2	X2Y3.3
X3	Y1	X3Y1	X3Y1.1	X2Y1.2	X3Y1.3
	Y2	X3Y2	X3Y2.1	X3Y2.2	X3Y2.3
	Y3	X3Y3	X3Y3.1	X3Y3.2	X3Y3.3

Desain rancangan percobaan pada penelitian utama adalah

X1Y1 = Kadar Garam 2%, lama fermentasi 7 hari.

X1Y2 = Kadar Garam 2%, lama fermentasi 9 hari.

X1Y3 = Kadar Garam 2%, lama fermentasi 11 hari.

X2Y1 = Kadar Garam 2,5%, lama fermentasi 7 hari.

X2Y2 = Kadar Garam 2,5%, lama fermentasi 9 hari.

X2Y3 = Kadar Garam 2,5%, lama fermentasi 11 hari.

X3Y1 = Kadar Garam 3%, lama fermentasi 7 hari.

A3B2 = Kadar Garam 3%, lama fermentasi 9 hari.

A3B3 = Kadar Garam 3%, lama fermentasi 11 hari.

3.5 Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan pada penelitian utama kecap ikan kuniran menggunakan enzim papain ini antara lain Uji Rendemen, kadar air, lemak, abu, protein, karbohidrat, kadar NaCl dan Uji Organoleptik Kecap Ikan (aroma dan warna) serta asam amino.

1.6 Prosedur Analisis Parameter

3.6.1 Analisis Rendemen

Pada proses hidrolisis dengan menggunakan enzim, substrat yang digunakan akan diubah menjadi produk hidrolisat. Persentase banyaknya produk hidrolisat yang dihasilkan terhadap berat bahan baku sebelum dihidrolisis disebut rendemen produk hidrolisat. Terlarutnya komponen gizi seperti lemak, protein dan mineral selama proses hidrolisis mempengaruhi besarnya rendemen produk hidrolisat yang dihasilkan (Shahidi, *et al.* 1995). Rendemen dapat dihitung dengan:

1. Ditimbang berat sampel campuran semua bahan sebelum pemasakan menggunakan neraca analitik
2. Ditimbang berat akhir yang dihasilkan setelah proses pemasakan dengan neraca analitik
3. Prosentase rendemen yan dihasilkan dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen(\%)} = \frac{\text{massa produk kecap}}{\text{massa bahan baku}} \times 100\%$$

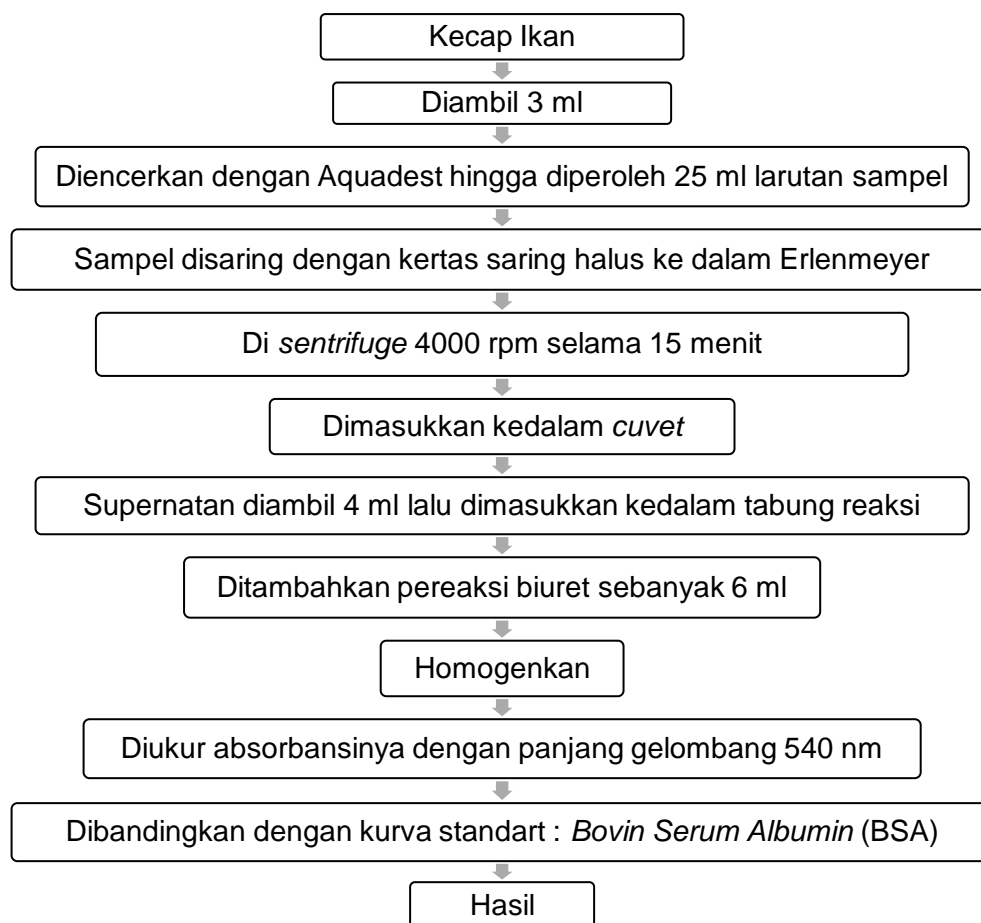
3.6.2 Analisis Kadar Protein

Protein sebagai salah satu komponen bahan adalah senyawa kompleks yang terdiri dari unit-unit asam amino yang bergabung dengan ikatan peptida. Komponen ini merupakan sumber N dan substrat yang sangat disukai oleh mikroba terutama penyebab pembusukan. Pembusukan oleh mikroba akan sangat cepat pada bahan pangan berprotein tinggi bila ditunjang oleh faktor lain seperti kandungan air yang memadai dan juga A_w yang optimal. Protein juga dapat diubah menjadi energi bila diperlukan sehingga merupakan sumber energi cadangan bersama-sama lemak atau lipid (Sasmito, 2005). Ditambahkan oleh Yuniarti, *et al.* (2013), ketahanan protein oleh suhu tinggi sangat terkait dengan asam amino

penyusun protein tersebut sehingga hal ini yang menyebabkan kadar protein menurun dengan semakin meningkatnya suhu pemanasan.

Analisis kadar protein dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan reagen biuret. Menurut Machin (2012), reagen Biuret mengandung CuSO_4 . Biuret dibentuk dengan pemanasan urea dan mempunyai struktur mirip dengan struktur peptida dari protein. Prinsip reaksi biuret adalah reaksi antara tembaga sulfat dalam alkali dengan senyawa yang berisi dua atau lebih ikatan peptida seperti protein yang memberikan warna ungu biru yang khas. Fungsi reagen biuret adalah untuk membentuk kompleks sehingga yang dikandung dapat diidentifikasi. Reaksi biuret ini bersifat spesifik dengan pereaksi biuret.

Pengujian kadar protein menurut Wijaya dan Yuniarta (2015), dapat dilihat pada Gambar 8 berikut:



Gambar 8. Metode Uji Kadar Protein

3.6.3 Analisis Kadar Air

Kadar air merupakan faktor penting dalam proses kerusakan dan pembusukan bahan pangan. Hal ini disebabkan fungsi air yang sangat kompleks, dimana dapat menjadi pelarut yang baik untuk berbagai jenis komponen bahan seperti vitamin, substrat dan lainnya. Mobilitas enzim juga sangat dibantu oleh ketersediaan air dalam bahan pangan, sehingga kandungan air yang tinggi membantu proses enzimatik. Dengan adanya enzim dan substrat yang tinggi maka proses kerusakan bahan akibat proses enzimatik akan sangat tinggi. Disamping itu air juga merupakan media yang sangat menunjang keaktifannya yang sangat merugikan (Sasmito, 2005).

Analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan oven. Kadar air dihitung sebagai persen berat, artinya berapa gram berat contoh dengan yang selisih berat dari contoh yang belum diuapkan dengan contoh yang telah dikeringkan. Jadi kadar air dapat diperoleh dengan menghitung kehilangan berat contoh yang dipanaskan. Pertama, sampel ditimbang sebanyak 2 gram pada cawan petri yang telah diketahui beratnya. Cawan tersebut dimasukkan ke dalam oven selama 3 - 5 jam pada suhu 105 °C atau sampai beratnya menjadi konstan. Sampel kemudian dikeluarkan dari oven dan dimasukkan ke dalam desikator dan segera ditimbang setelah mencapai suhu kamar. Bahan tersebut dimasukkan kembali ke dalam oven sampai tercapai berat yang konstan (selisih antara penimbangan berturut-turut 0.20 gram) (Wijaya dan Yuniarta, 2015). Perhitungan kadar air adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{Berat Awal} - \text{Berat Akhir}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

3.6.4 Analisis Kadar Abu

Abu adalah zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan organik. Kandungan abu dan komposisinya tergantung pada macam bahan dan cara

pengabuannya. Kadar abu ada hubungannya dengan mineral suatu bahan. Tujuan dari penentuan abu total adalah untuk menentukan baik tidaknya suatu proses pengolahan; untuk mengetahui jenis bahan yang digunakan dan penentuan abu total berguna sebagai parameter nilai gizi bahan makanan (Sudarmadji, *et al.* 1989). Kadar abu dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{Berat Akhir} - \text{Berat Kurs Porselen}}{\text{Berat Awal}} \times 100\%$$

3.6.5 Analisis Kadar Lemak

Kadar lemak merupakan zat makanan yang penting untuk kesehatan tubuh manusia. Selain itu lemak juga terdapat pada hampir semua bahan pangan dengan kandungan yang berbeda-beda (Winarno, 2002). Sebagai komponen bahan pangan, lemak banyak dijumpai, baik dalam bahan pangan nabati maupun hewani (Sasmito dan Suprayitno, 2012). Menurut Ketaren (2008), lemak terdiri dari trigliserida campuran, yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak rantai panjang. Lemak tersebut jika dihidrolisis akan menghasilkan 3 molekul asam lemak rantai panjang dan 1 molekul gliserol. Penentuan kadar lemak suatu bahan dapat dilakukan dengan menggunakan Soxhlet apparatus. Cara ini dapat digunakan untuk ekstraksi minyak dari bahan yang mengandung minyak. Rumus untuk mengetahui jumlah kadar lemak yang terkandung pada kecap ikan adalah:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(B-A)}{\text{berat contoh (g)}} \times 100\%$$

Keterangan

A: berat botol timbang atau cawan porselen dengan lipida

B: berat botol timbang atau cawan porselen kosong

3.6.6 Analisis Kadar Karbohidrat

Karbohidrat merupakan sumber energi bagi bahan pangan dan juga mikroba yang tumbuh di dalamnya. Kandungan karbohidrat yang tinggi dalam bahan pangan dapat mengalami kerusakan oleh adanya reaksi pencoklatan

(Sasmito, 2005). Walaupun jumlah yang dapat dihasilkan oleh 1 gram karbohidrat hanya 4 kkal, tetapi bila dibandingkan dengan protein dan lemak, karbohidrat merupakan sumber kalori yang murah. Karbohidrat juga berperan penting dalam menentukan karakteristik bahan makanan, misalnya rasa, warna, tekstur dan lain-lain (Winarno, 2002). Metode yang digunakan pada pengujian kadar karbohidrat adalah metode *by different*. Metode *by different* yaitu dengan perhitungan melibatkan kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak. Berikut ini adalah persamaan yang digunakan dalam menghitung kadar karbohidrat dengan metode *by different*.

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

3.6.7 Analisis Kadar NaCl (Metode Mohr)

Perlakuan yang dilakukan dalam menentukan kadar *NaCl* kecap ikan adalah: 5 ml sampel diambil dan ditambahkan 100 ml *aquadest* kemudian dipanaskan sampai mendidih. Kemudian diencerkan menjadi 125 ml. Lalu diambil 12,5 ml dan dimasukkan dalam erlenmyer, kemudian ditambah indikator K_2CrO_4 5% sebanyak 1,5 ml. Kemudian dititrasi dengan AgNO_3 0,1 N sampai terbentuk endapan merah bata. Presentase kadar NaCl dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ kadar NaCl} = \frac{\text{ml AgNO}_3 \times 0,1 \times \text{Fp} \times \text{BM NaCl (58,46)} \times 100\%}{\text{mg sampel}}$$

3.6.8 Uji Organoleptik Hedonik

Uji organoleptik yang akan dilakukan pada produk kecap ikan kuniran dengan penambahan enzim papain dan lama fermentasi yang berbeda meliputi aroma dan warna. Uji organoleptik yang dilakukan berdasarkan uji penerimaan hedonik. Uji hedonik merupakan pengujian yang paling banyak digunakan untuk mengukur tingkat kesukaan terhadap produksi. Tingkat kesukaan ini disebut skala hedonik. Skala hedonik dapat direntangkan atau diciutkan menurut rentangan

skala yang di kehendaki. Pada uji hedonik panelis memberikan penilaian angka sesuai dengan skala hedonik yang disediakan berdasarkan tingkat kesukaan. Pada uji ini panelis mengemukakan tanggapan pribadi suka atau tidak suka, disamping itu juga mengemukakan tingkat kesukaannya. Tingkat kesukaan disebut juga skala hedonik. Skala hedonik di transformasikan ke dalam skala numerik dengan angka menaik menurut tingkat kesukaan (Susiwi, 2009).

Penilaian organoleptik dilakukan terhadap aroma dan warna kecap ikan hasil fermentasi selama 7, 9 dan 11 hari yang akan dilakukan oleh 15 orang panelis semi terlatih. Adapun skala hedonik yang digunakan adalah :

Keterangan:

1 = Sangat tidak suka

2 = Tidak suka

3 = Agak tidak suka

4 = Biasa

5 = Cukup suka

6 = Suka

7 = Sangat suka

3.7.9 Uji Profil Asam Amino.

Salah satu analisis asam amino adalah dengan kromatografi partisi cair atau sering disebut HPLC. Metode ini akhir-akhir ini banyak digunakan dalam analisis asam amino. Metode ini telah ditunjang oleh peralatan yang baik dan modern, menggunakan kolom yang efisien dibawah tekanan besar sehingga dilakukan dalam waktu yang singkat dan memberi hasil yang tepat. Untuk mendeteksi asam amino, dapat menggunakan detektor UV, sinar tampak dan floresensi. Dalam hal ini asam amino harus diderivatisasi terlebih dahulu supaya dapat membentuk derivat yang dapat menyerap cahaya UV, tampak atau fluorensi (Rediatning dan Kartini, 1987).

Analisis asam amino dengan menggunakan HPLC menurut Azka, *et al.* (2015), terdiri dari empat tahap, yaitu: tahap pembuatan hidrolisat protein, pengeringan, derivatisasi dan injeksi serta analisis asam amino.

a. Pembuatan Hidrolisat Protein

Sampel ditimbang sebanyak 0,1 gram dan dihancurkan. Sampel yang telah hancur ditambahkan HCl 6 N sebanyak 10 mL yang kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama 24 jam. Pemanasan dilakukan untuk mempercepat reaksi hidrolisis.

b. Pengeringan Sampel

Penyaringan bertujuan agar larutan yang dihasilkan benar-benar bersih, terpisah dari padatan. Hasil saringan diambil sebanyak 30 µL dan ditambahkan dengan 30 µL larutan pengering. Larutan pengering dibuat dari campuran metanol, pikotiosianat dan trietilamin dengan perbandingan 4:4:3.

c. Derivatisasi

Larutan derivatisasi sebanyak 30 µL ditambahkan pada hasil pengeringan, larutan derivatisasi dibuat dari campuran metanol, natrium asetat dan trietilamin dengan perbandingan 3:3:4. Proses derivatisasi dilakukan agar detektor mudah untuk mendeteksi senyawa yang ada pada sampel, selanjutnya dilakukan pengenceran dengan cara menambahkan 20 mL asetonitril 60% atau buffer natrium asetat 1 M, lalu dibiarkan selama 20 menit.

d. Injeksi ke HPLC

Hasil saringan diambil sebanyak 40 µL untuk diinjeksikan ke dalam HPLC. Perhitungan konsentrasi asam amino yang ada pada bahan dilakukan dengan pembuatan kromatogram standar dengan menggunakan asam amino yang telah siap pakai yang mengalami perlakuan yang sama dengan sampel. Kadar asam amino dalam bahan dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{Asam Mino} = \frac{\text{Luas area sampel} \times C \times Fp \times BM}{\text{Luas Area Standar} \times \text{Bobot Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

C = Konsentrasi standar asam amino ($\mu\text{g/mL}$)

FP = Faktor pengenceran

BM = Bobot molekul dari masing-masing asam amino (g/mol)