

### 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari dua macam yaitu bahan yang digunakan untuk pembuatan tepung dan bahan untuk analisis kimia. Bahan baku pada pembuatan tepung adalah mangrove jenis *Avicennia marina* dengan karakteristik sebagai berikut untuk buah *Avicennia marina* (api-api) yang diambil dari pohon yaitu mempunyai tinggi  $\pm 10-15$  m, diameter pohon  $\pm 30-45$  cm, sedangkan untuk buah berupa kapsul yang membelah menjadi dua, dan mempunyai panjang 1-3 cm, kulit buah berwarna hijau kekuningan-kuningan, serta berbulu halus di luarnya yang diperoleh dari desa Wonorejo kecamatan Rungkut Kota Surabaya. Bahan lainnya yang diperlukan adalah Cuka Makan dengan merk "Dixi" yang didapatkan dari swalayan hypermart dan dari supplier yang berada di Kota Surabaya, serta plastik sebagai tempat sampel.

Sedangkan bahan-bahan pembantu yang digunakan untuk analisis kimia ialah aquadest,  $H_2SO_4$ , asam perklorat pekat ( $HClO_4$ ), indikator pp, asam nitrat pekat ( $HNO_3$ ), HCl, asam sulfat, tabelt kjeldahl, NaOH 0,1 N,  $Na_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$ , formaldehid, kertas saring, dan alkohol.

##### 3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua yaitu alat yang digunakan untuk proses pembuatan tepung dan alat-alat untuk analisis kimia. Alat yang digunakan untuk pembuatan tepung adalah blender, pisau, timbangan analitik, baskom plastik, sendok, termometer, oven, waterbath, beaker glass, dan ayakan.

Alat-alat yang digunakan untuk analisis kimia adalah AAS (*Atomic Absorption Spektrum*), oven, desikator, mikroburet, pH meter, sentrifuse, stirer,

statif, *glass ware*, muffle, kurs porselen, seperangkat goldfish, rangkaian alat analisis protein.

## 3.2 Metode Penelitian

### 3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode eksperimen. Metode eksperimen ialah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Suryasubrata, 1989). Tujuan dari penelitian eksperimen ialah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Nazir, 1988). Menurut Singa Rimbun dan Effendi (1983), penelitian eksperimen lebih mudah dilakukan dilaboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen.

### 3.2.2 Variabel

Variabel penelitian ialah sesuatu hal berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 1999). Menurut Koentjaraningrat (1983), variabel ialah faktor yang mengandung lebih dari satu nilai dalam metode statistik. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini dibedakan menjadi variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas ialah faktor yang menyebabkan suatu pengaruh karena perlakuan, sedangkan variabel terikat ialah faktor yang diakibatkan oleh pengaruh perlakuan tersebut.

Variabel bebas dalam penelitian ini ialah lama perendaman yang berbeda. Variabel terikat meliputi kadar Pb, kadar air, kadar protein, kadar lemak, kadar abu, kadar karbohidrat, kadar HCN, Kadar pH dan kadar Tannin. Uji organoleptik uji deskripsi digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik sensori

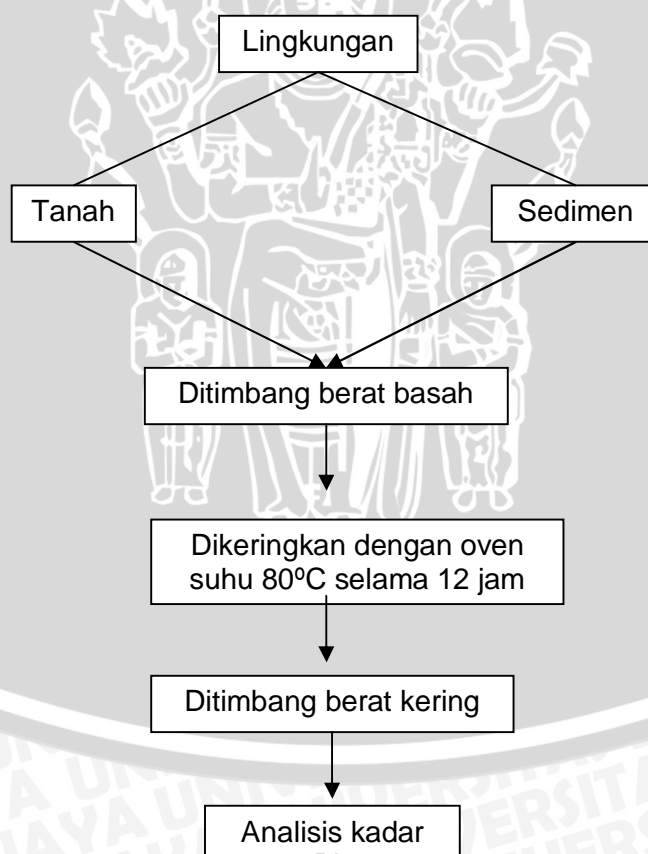
yang penting pada suatu produk dan memberikan informasi mengenai derajat atau intensitas karakteristik tersebut.

### 3.2.3 Rangkaian Penelitian

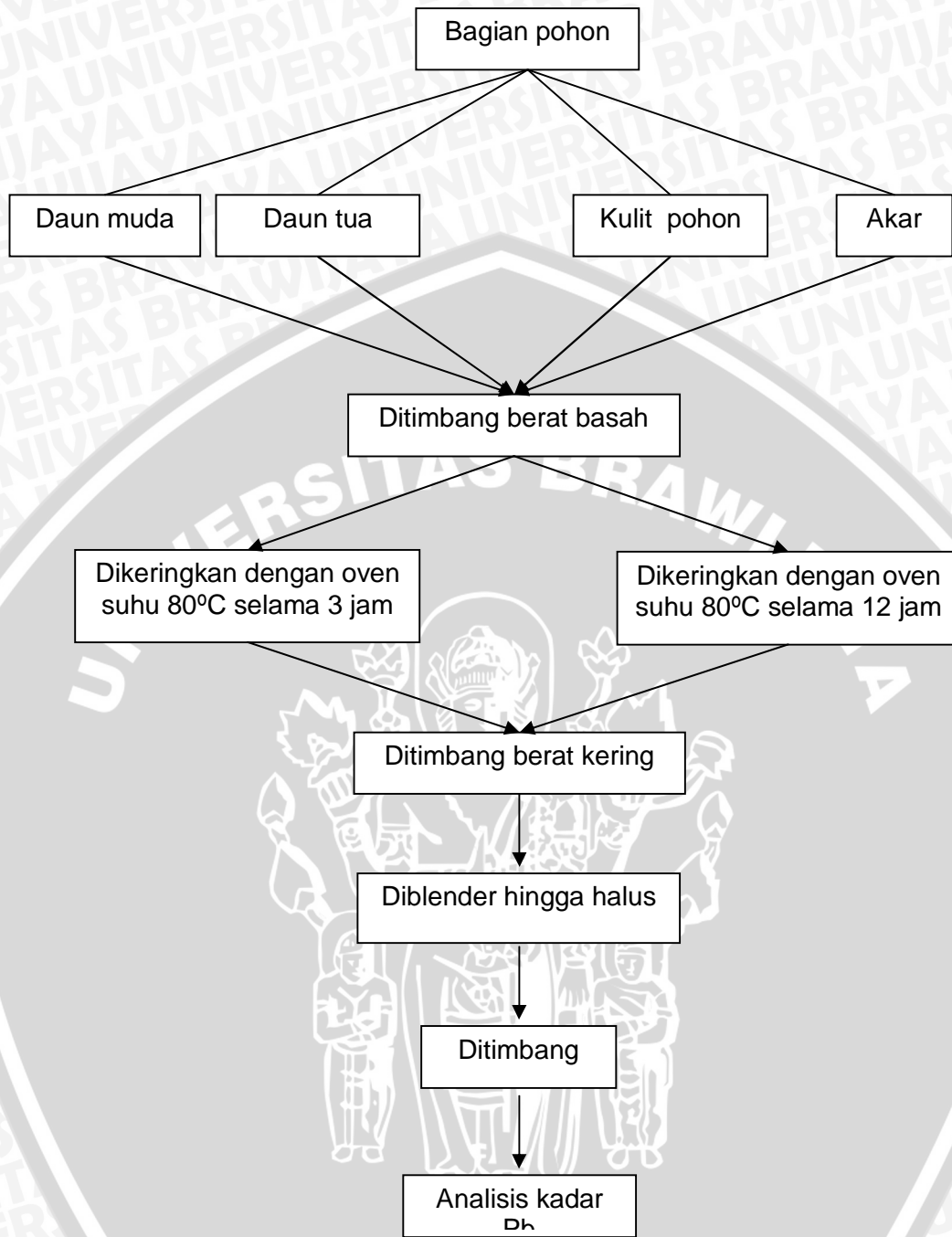
#### 3.2.3.1 Skema Kerja Penelitian Pendahuluan 1

Tujuan dari penelitian pendahuluan pertama adalah untuk mengetahui kadar Pb serta lingkungan hidup dari jenis mangrove *Avicennia marina* (api-api). Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap pertama yaitu penyiapan sampel dan tahap kedua yaitu analisis kadar Pb.

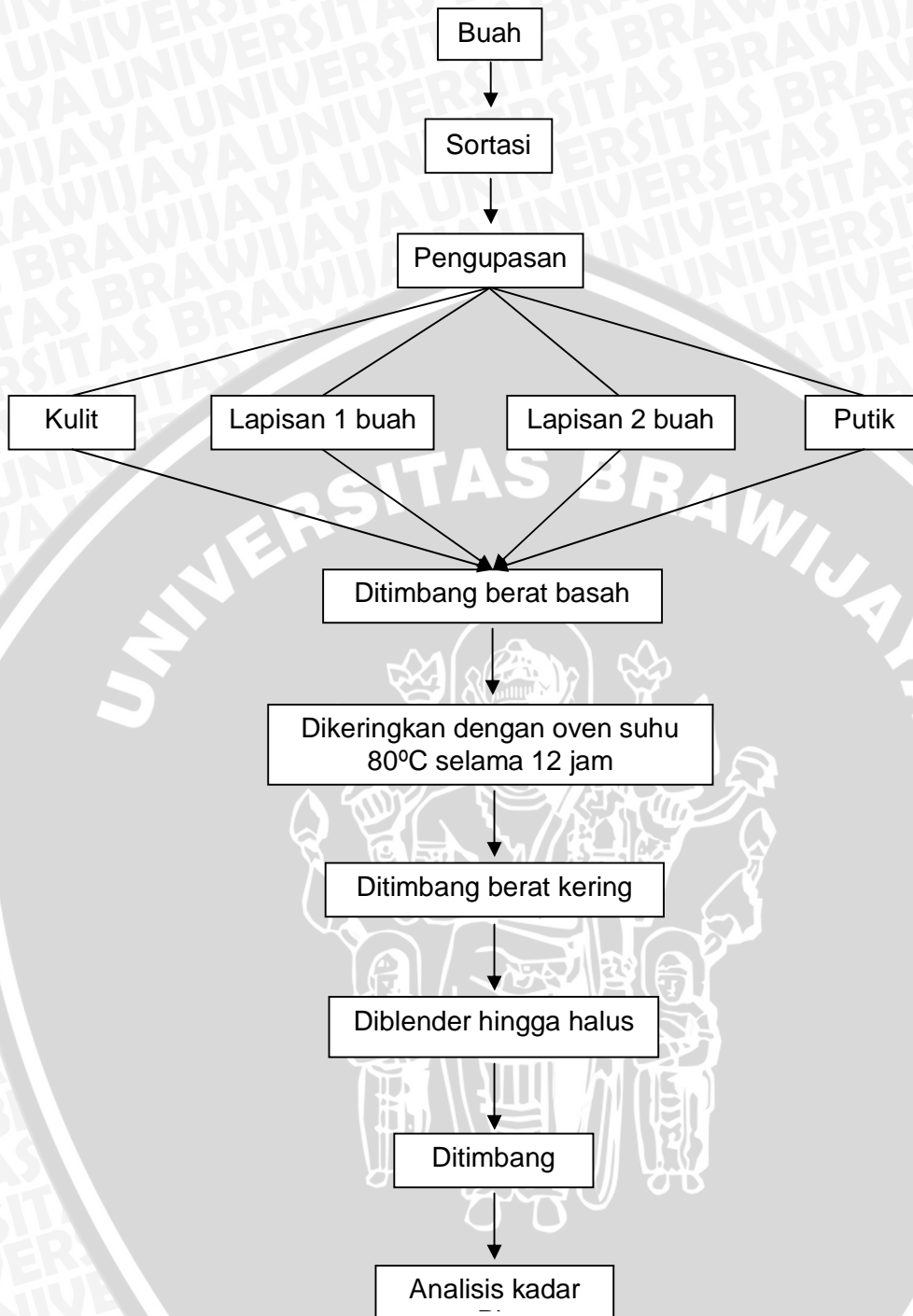
Untuk lebih jelasnya prosedur penelitian pendahuluan pada analisis kadar Pb pada dari daun muda, daun tua, akar, tanah, sedimen, dan bagian buah (kulit, buah bagian dalam, buah bagian luar, dan putik dapat dilihat pada Gambar 6, 7, dan 8.



**Gambar 6. Prosedur analisis Pb Tanah dan Sedimen (metode AAS)**  
(Sastrohamidjojo, 2001)



Gambar 7. Prosedur Analisis Pb Daun muda, Daun Tua, Kulit Pohon dan Akar *Avicennia marina* (Metode AAS) (Sastrohamidjojo, 2001)



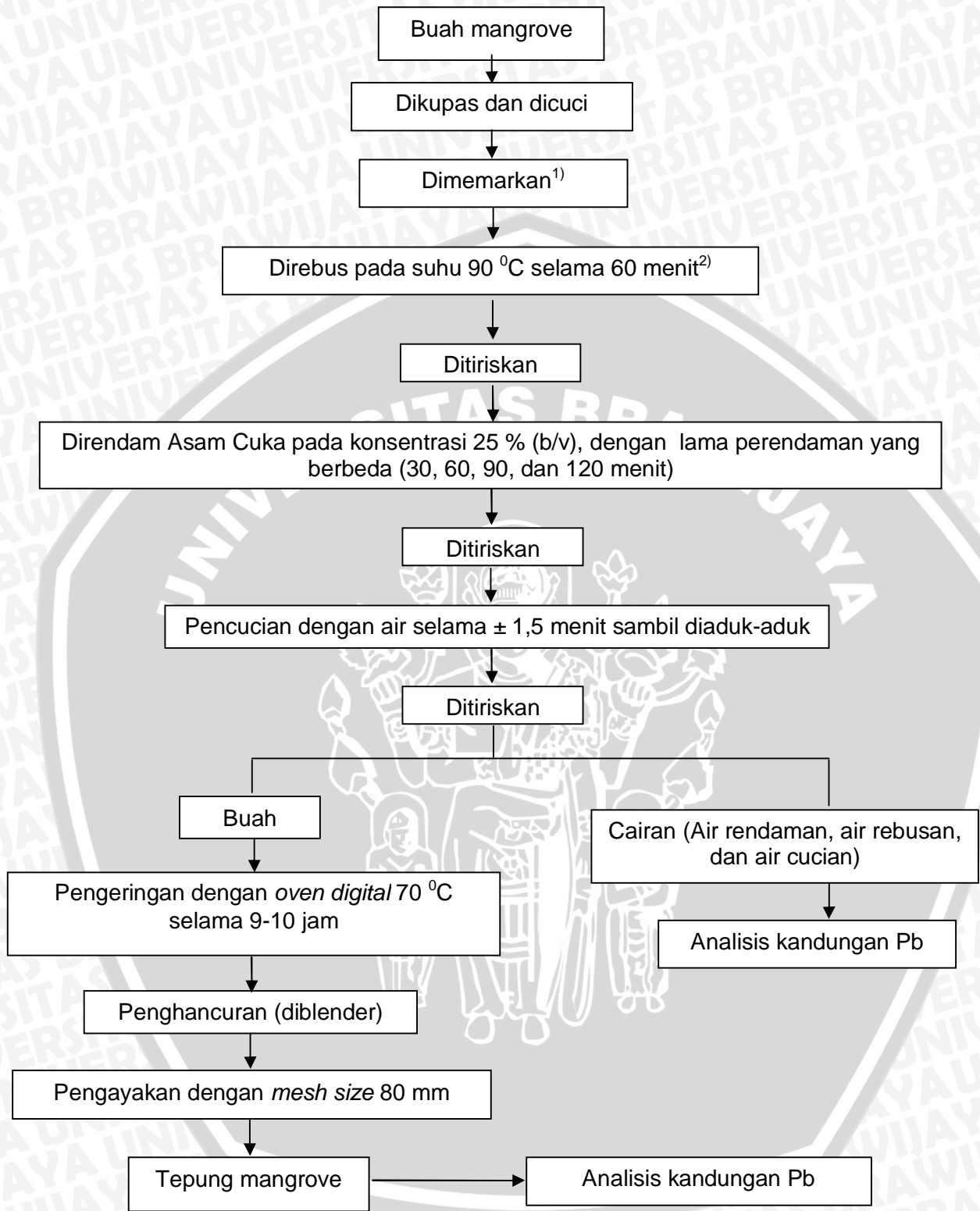
Gambar 8. Prosedur Analisis Pb Bagian-bagian Buah *Avicennia marina* (Metode AAS) (Sastrohamidjojo, 2001)

### 3.2.3.2 Skema Kerja Penelitian Pendahuluan 2

Pada penelitian pendahuluan kedua bertujuan mengetahui lama perendaman 30, 60, 90, dan 120 menit dalam larutan asam cuka dengan konsentrasi 25% untuk menghasilkan kadar Pb paling rendah yang selanjutnya akan digunakan pada proses penelitian inti.

Untuk lebih jelasnya prosedur penelitian pendahuluan pembuatan tepung mangrove *Avicenia marina* (api-api) dapat dilihat pada Gambar 10 berikut ini:





**Gambar 9. Hasil modifikasi skema proses pembuatan tepung mangrove**

<sup>1)</sup>Hasil penelitian Yoga, 2010

<sup>2)</sup>Hasil penelitian Alis, 2009

### 3.2.3.3 Penelitian Inti

Hasil terbaik yang diperoleh pada penelitian pendahuluan, akan dikembangkan lagi pada penelitian Inti. Pada penelitian inti bertujuan untuk mencari lama waktu perendaman dalam larutan Asam cuka optimum untuk mereduksi logam berat Pb pada tepung *Avicennia marina* (api-api) yang paling tinggi. Adapun lama waktu perendaman dengan larutan Asam cuka yang digunakan adalah 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit dan 90 menit dengan empat kali ulangan dengan konsentrasi asam cuka 15%. Perlakuan yang dilakukan pada penelitian utama dapat dilihat pada Tabel 7. Adapun prosedur pembuatan tepung mangrove dapat dilihat pada Gambar 10.

Prosedur Pelaksanaan Penelitian:

#### 1) Persiapan bahan baku

Buah mangrove *Avicennia marina* (api-api) disortasi dan dibuang kulit luarnya. Sortasi dilakukan untuk memilih buah yang cukup umur (5 – 8 bulan) sebagai bahan baku tepung dan menghilangkan kotoran atau sampah dari bahan baku. Sortasi dilakukan untuk memisahkan/menghilangkan bahan baku dari ulat dan untuk menghilangkan tannin. Buah mangrove yang telah selesai disortasi dilakukan preparasi dengan cara dimemarkan. Hasil dari penelitian pendahuluan saudara Yoga (2011) sebelumnya menunjukkan kadar Pb pada tiap-tiap perlakuan yaitu dimemarkan 0,443 ppm, dibiarkan utuh 0,747 ppm, diiris 0,608, dan dibelah empat 0,830 ppm, perlakuan terbaik dengan kadar Pb yang rendah yaitu perlakuan buah yang dimemarkan dengan kadar Pb 0,443 ppm. Perbandingan aquadest : buah mangrove = 2:1. Bila buah mangrove yang dipakai 500 gram, maka aquadest yang digunakan 1000 ml.



## 2) Perebusan

Buah mangrove yang telah bersih direbus dengan aquadest pada suhu 90°C selama 60 menit hingga setengah matang (setengah empuk). Perebusan ini bertujuan untuk mematangkan buah dan melunakkan tekstur buah. Perebusan dilakukan dengan menggunakan pemanas waterbath. Penggunaan suhu dan lama waktu perebusan yang digunakan diperoleh dari penelitian sebelumnya (Alis, 2009).

## 3) Proses penirisan I

Penirisan dilakukan untuk mengurangi kandungan air yang terserap pada bahan setelah proses perebusan. Penirisan dilakukan dengan menggunakan saringan teh. Penirisan dilakukan hingga tidak ada lagi tetesan air dari bahan.

## 4) Proses perendaman (*soaking*)

Lama perendaman yang berbeda untuk mengetahui lama waktu perendaman optimal asam cuka dengan konsentrasi 15% sehingga dapat mereduksi Pb pada tepung *Avicennia marina* yang terbaik. Lama waktu perendaman yang digunakan adalah 15, 30, 45, 60, 75 dan 90 menit. Selain itu perendaman dengan larutan asam cuka diambil dari Cuka dengan merk "Dixi" yang mempunyai komposisi 25% dalam 650 ml. Adapun perhitungan jumlah larutan asam cuka 15% 1000 ml yang dibutuhkan adalah sebagai berikut :

$$\text{Rumus: } V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$1000 \cdot 15 = V_2 \cdot 25$$

$$V_2 = 600 \text{ ml}$$

Jadi larutan asam cuka yang dibutuhkan adalah 600 ml dari larutan asam cuka merk "Dixi" ditambahkan dengan 400 ml aquadest, maka jadilah larutan asam cuka 15% 1000 ml.

Lama waktu ini didapatkan dari penelitian pendahuluan (PP) 2 dengan lama perendaman 30, 60, 90, dan 120 menit. Hasil terbaik yang didapat ialah 120 menit. Dari hasil terbaik lama waktu perendaman ini kemudian menjadi 15, 30, 45, 60, 75 dan 90 menit, hal ini dikarenakan pada lama perendaman 120 menit menghasilkan bau asam cuka yang terlalu menyengat sehingga diturunkan menjadi 90 menit karena dengan lama perendaman 90 menit mampu menurunkan Pb menjadi 0,46 ppm.

Buah mangrove yang sudah dimemarkan kemudian ditimbang dan direndam dalam larutan Asam cuka 15% selama 15, 30, 45, 60, 75 dan 90 menit pada suhu ruang sambil diaduk-aduk kurang lebih selama  $\pm 1$  menit. Hal ini sesuai dengan (Hartanti, 1998) yang menyatakan bahwa waktu perendaman berpengaruh nyata terhadap penurunan logam berat, semakin lama waktu yang digunakan maka logam berat yang tereduksi semakin banyak.

#### **5) Proses penirisan II**

Penirisan dilakukan untuk mengurangi kandungan air yang terserap pada bahan setelah proses perendaman. Penirisan dilakukan dengan menggunakan saringan teh. Penirisan dilakukan hingga tidak ada lagi tetesan air dari bahan.

#### **6) Proses pencucian**

Proses pencucian dilakukan dengan menambahkan air PDAM sebanyak 1000 ml atau hampir sama dengan jumlah penambahan aquadest pada saat proses perendaman menggunakan Asam cuka 15%. Adapun tujuan dari pencucian ini adalah untuk mengurangi larutan asam cuka yang masih menempel pada bahan baku serta mengurangi logam berat Pb yang juga masih menempel pada bahan baku.

### 7) Proses penirisan III

Penirisan dilakukan untuk mengurangi kandungan air yang terserap pada bahan setelah proses pencucian. Penirisan dilakukan dengan menggunakan saringan teh. Penirisan dilakukan hingga tidak ada lagi tetesan air dari bahan.

### 8) Proses pengeringan

Pengeringan adalah suatu peristiwa perpindahan massa dan energi yang terjadi dalam pemisahan cairan atau kelembaban dari suatu bahan sampai batas kandungan air yang ditentukan dengan menggunakan gas sebagai fluida sumber panas dan penerima uap cairan. Tujuan pengeringan adalah untuk mengawetkan makanan dan untuk meminimalkan biaya distribusi (Anonymous, 2009).

Pengeringan merupakan proses penghilangan sejumlah air dari material. Dalam pengeringan, air dihilangkan dengan prinsip perbedaan kelembaban antara udara pengering dengan bahan makanan yang dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan *oven digital* dengan suhu 70°C selama 9-10 jam. Pengeringan pada suhu 70°C menghasilkan tepung yang memiliki daya serap air, kadar abu, kadar pati dan kadar protein yang lebih besar (Lidiasari *et al.*, 2006). Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air pada tepung mangrove *Avicennia marina* (api-api).

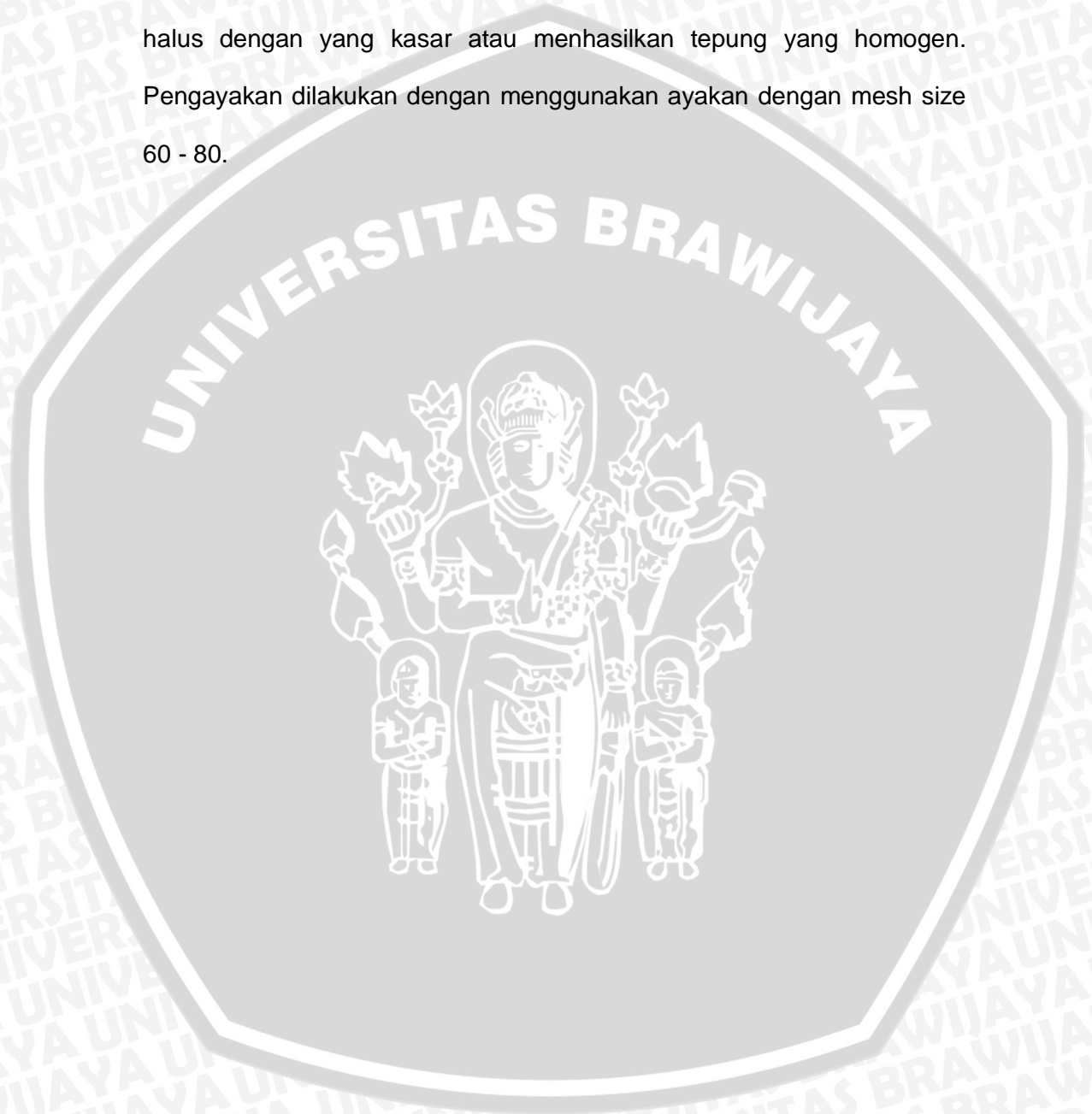
### 9) Penepungan

Setelah proses pengeringan selesai dilakukan proses penepungan harus segera dilakukan sebelum kadar air bertambah. Penepungan dilakukan dengan menggunakan blender hingga halus. Pemplenderan dilakukan selama 2 - 3 menit. Pemplenderan dilakukan berulang-ulang

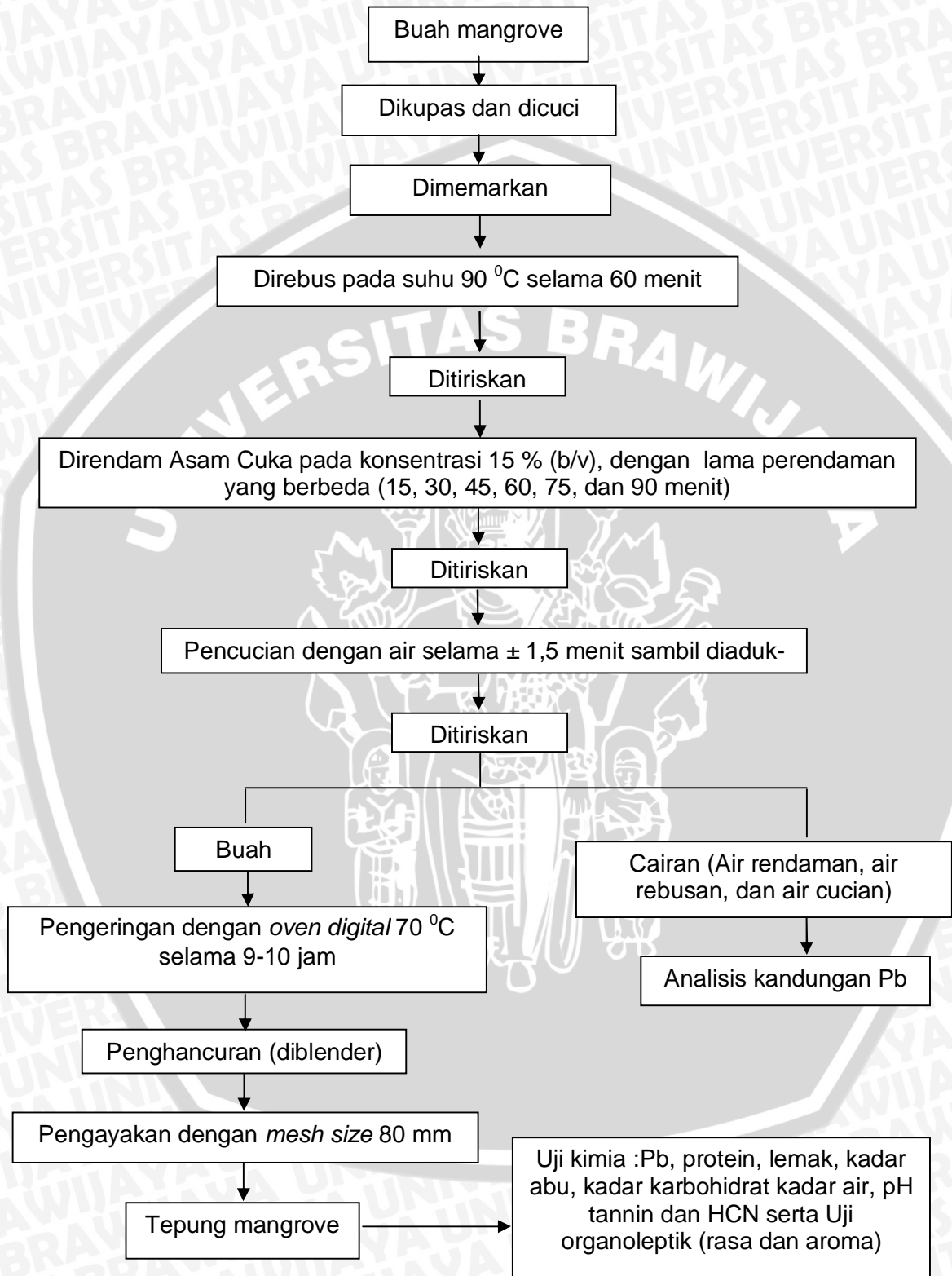
untuk menghasilkan tepung yang homogen. Pemplenderan bertujuan untuk memperoleh tekstur tepung buah mangrove yang halus.

#### 10) Pengayakan

Pengayakan dilakukan untuk memisahkan butiran tepung yang halus dengan yang kasar atau menghasilkan tepung yang homogen. Pengayakan dilakukan dengan menggunakan ayakan dengan mesh size 60 - 80.



Untuk lebih jelasnya prosedur pembuatan tepung mangrove *Avicennia marina* (api-api) pada penelitian inti disajikan pada Gambar 10 berikut ini.



Gambar 10. Prosedur pembuatan tepung mangrove *Avicennia marina* (api-api) pada penelitian inti

### 3.2.4 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian inti ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana. Hasilnya dianalisis dengan menggunakan ANOVA dengan menggunakan minitab 14.

**Tabel 4. Perlakuan Penelitian Inti**

No.	Lama Perendaman dalam larutan asam cuka 15%	Ulangan			
		1	2	3	4
1.	15 menit (A)				
2.	30 menit (B)				
3.	45 menit (C)				
4.	60 menit (D)				
5.	75 menit (E)				
6.	90 menit (F)				

Parameter uji yang dilakukan pada penelitian utama pembuatan tepung *Avicennia marina* (api-api) adalah analisis kadar timbal (Pb), air, protein, abu, lemak, karbohidrat, HCN, pH dan Tannin. Kemudian dilakukan pemilihan perlakuan terbaik kadar Pb menurut Zeleny (1982).

#### 3.2.4.1 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian utama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan lima perlakuan dan empat kali ulangan. Selain perlakuan pada penelitian ini, semua media percobaan dalam keadaan lingkungan lainnya serba sama atau homogen (Yitnosumarto, 1991).

Metode analisis yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = Nilai tengah umum

$T_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$e_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$j$  = Ulangan

$I$  = Perlakuan

Model rancangan percobaan yang digunakan disajikan pada Tabel 8.

**Tabel 5. Model Rancangan Percobaan Penelitian Utama**

Perlakuan	Ulangan				Total
	1	2	3	4	
A	A1	A2	A3	A4	TA
B	B1	B2	B3	B4	TB
C	C1	C2	C3	C4	TC
D	D1	D2	D3	D4	TD
E	E1	E2	E3	E4	TE
F	F1	F2	F3	F4	TF
Total					

Keterangan :

A : Perendaman dengan Asam Cuka selama 15 menit

B : Perendaman dengan Asam Cuka selama 30 menit

C : Perendaman dengan Asam Cuka selama 45 menit

D : Perendaman dengan Asam Cuka selama 60 menit

E : Perendaman dengan Asam Cuka selama 75 menit

F : Perendaman dengan Asam Cuka selama 90 menit

Langkah selanjutnya adalah membandingkan antara F hitung dengan F tabel :

- Jika  $F_{hitung} < F_{tabel 5\%}$ , maka perlakuan tidak berbeda nyata.
- Jika  $F_{hitung} > F_{tabel 1\%}$ , maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.
- Jika  $F_{tabel 5\%} < F_{hitung} < F_{tabel 1\%}$ , maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

Kemudian menentukan varietas mana yang lebih potensial dengan mencari nilai pembandingnya seperti BNT (Beda Nyata Terkecil). BNT adalah suatu kriteria yang dapat dipakai untuk melakukan uji statistik antara sepasang harga rata-rata yang telah direncanakan (Hairuman, 2004).

### 3.2.5 Prosedur Analisis Parameter Uji

Analisis uji tepung buah mangrove meliputi analisis kimia yaitu kadar timbal (Pb), karbohidrat, protein, lemak, air, abu, HCN, pH dan Tannin.

#### 3.2.5.1 Analisis Logam Berat (Pb) (Metode AAS)

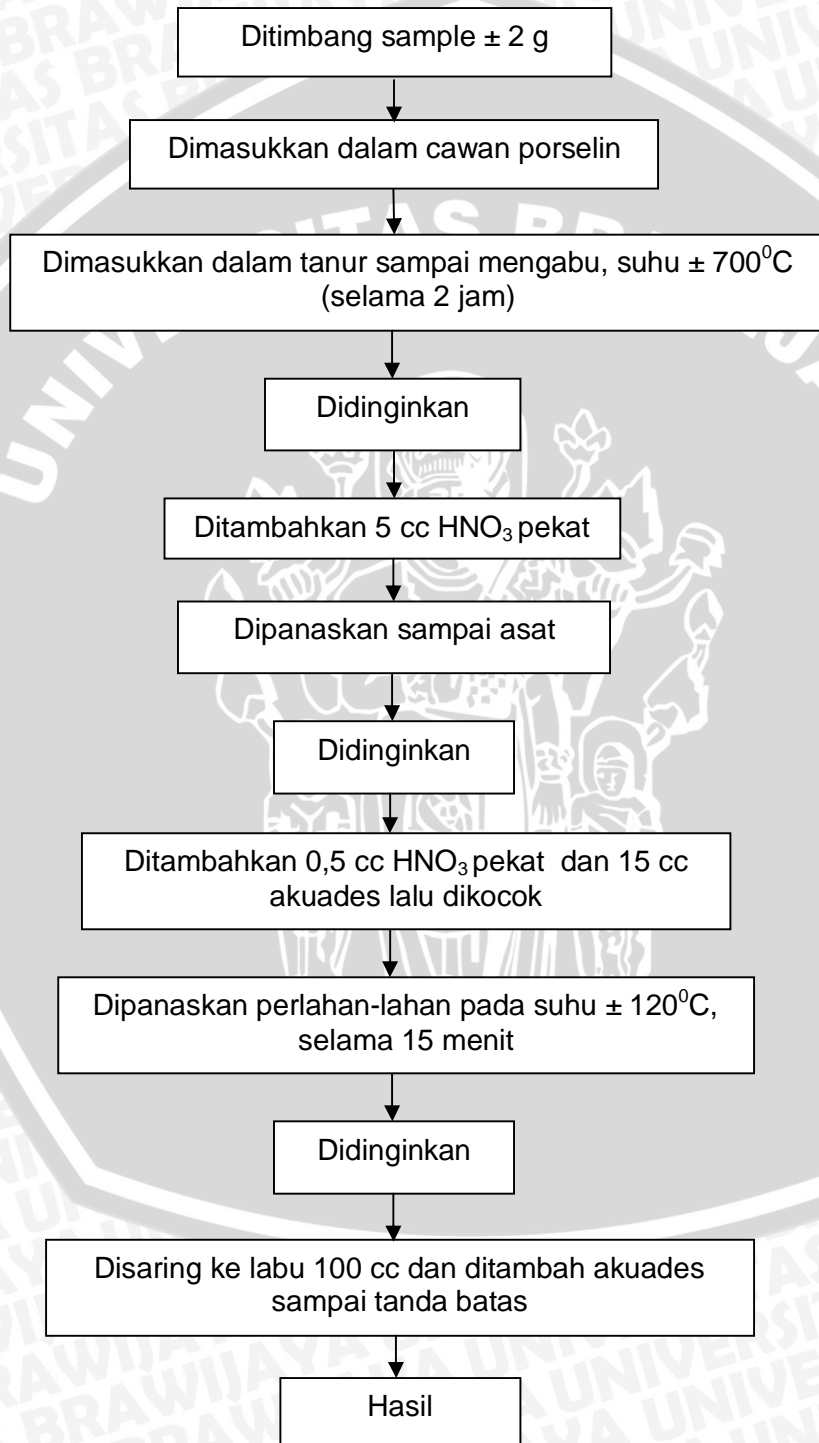
Menurut Sastroamidjojo (2001), Penentuan kadar logam berat timbal (Pb) menggunakan metode spektrofotometer AAS dengan menggunakan prinsip absorpsi cahaya oleh atom. Atom-atom menyerap cahaya tersebut dengan panjang gelombang tertentu, bergantung pada sifat unsur.

##### A. Sampel Padat :

1. Ditimbang sampel  $\pm 2$  g dan dimasukkan dalam cawan porselin
2. Dimasukkan ke dalam tanur sampai mengabu pada suhu  $\pm 700^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam, dinginkan
3. Ditambahkan 5 cc  $\text{HNO}_3$  pekat dan dipanaskan sampai asat, dinginkan
4. Ditambahkan 0,5 cc  $\text{HNO}_3$  pekat dan 15 cc aquades dan kocok dengan batang pengaduk



5. Dipanaskan perlahan-lahan pada suhu  $\pm 120^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit kemudian didinginkan
6. Disaring ke labu 100 cc dan ditambahkan aquades sampai tanda batas
7. Baca dengan AAS dengan memakai lampu katode yang sesuai



Gambar 11. Prosedur Penentuan Logam Berat (Pb) Pada Sampel Padat

**B. Sampel Cair :**

1. Diambil contoh 25 cc
2. Ditambahkan 5 cc HNO<sub>3</sub> pekat dan dipanaskan sampai asat, didinginkan.

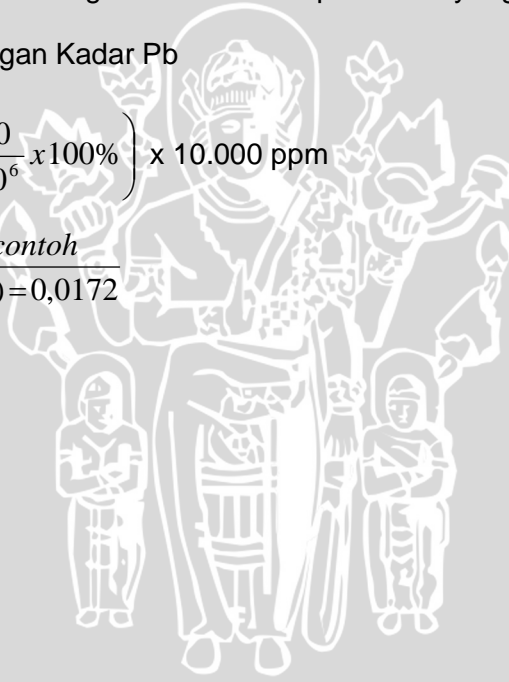
Ditambahkan 0,5 cc HNO<sub>3</sub> pekat 15 cc aquades dan kocok dengan batang pengaduk

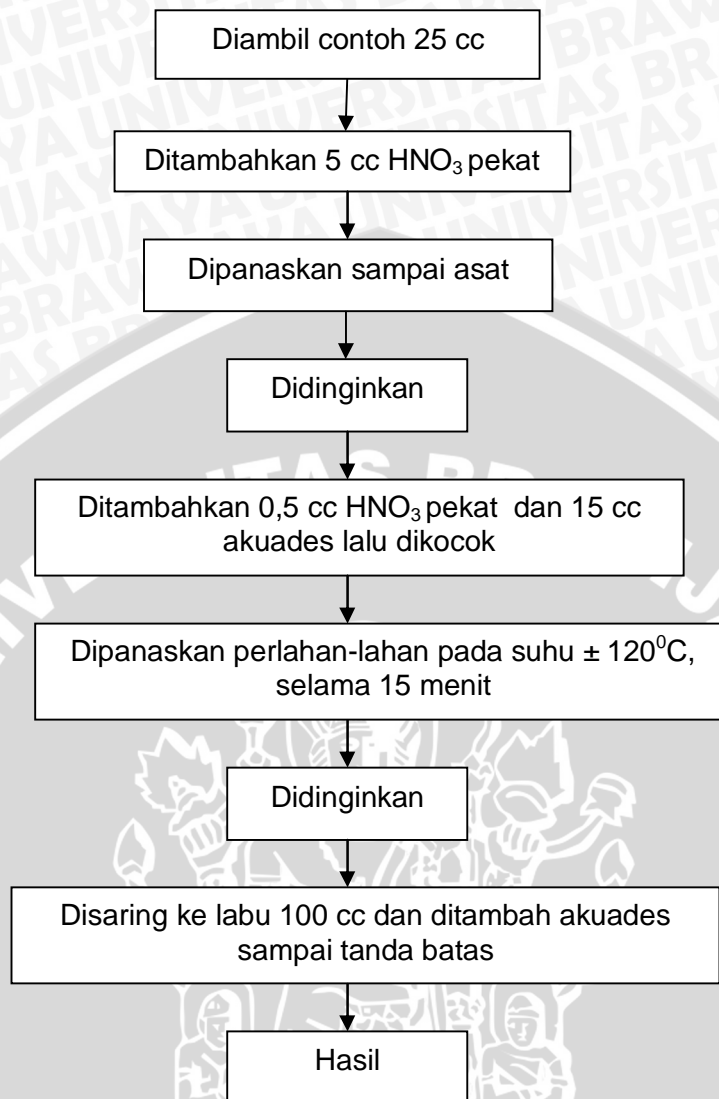
3. Dipanaskan perlahan-lahan pada suhu  $\pm 120^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit kemudian diangkat, didinginkan
4. Disaring ke labu 100 cc
5. Ditambahkan aquades sampai tanda batas
6. Baca dengan AAS dengan memakai lampu katode yang sesuai

Rumus Perhitungan Kadar Pb

$$\% = \left( \frac{\text{ppm} \times 10}{bc(\text{gr}) \times 10^6} \times 100\% \right) \times 10.000 \text{ ppm}$$

$$\text{ppm} = \frac{\text{abs contoh}}{\text{slop}(A)=0,0172}$$





**Gambar 12. Prosedur Analisis Penentuan Logam Berat (Pb) Pada Sampel Cair**

### 3.2.5.2 Analisis Kadar Air (Metode Pengeringan / Thermogravimetri)

Kadar air dapat didefinisikan sebagai jumlah air bebas yang terkandung dalam bahan yang dapat dipisahkan dengan cara fisis seperti penguapan dan destilasi (Sumardi dan Sasmito, 2007). Penentuan kadar air dengan menggunakan metode pengeringan (Thermogravimetri) dalam oven dengan cara memanaskan sampel pada suhu 100-105 °C sampai diperoleh berat konstan (Sudarmadji *et al.*, 1996).

Perlakuan yang dilakukan dalam penentuan kadar air ini yaitu :

1. Dikeringkan botol timbang bersih dalam oven bersuhu 105 °C selama semalam dengan tutup ½ terbuka
2. Dimasukkan dalam desikator selama 15-30 menit dan timbang beratnya
3. Ditimbang sampel sebanyak 2 gram dan masukkan dalam botol timbang
4. Dikeringkan dalam oven bersuhu 105 °C diamati setiap 2 jam sampai berat konstan
5. Didinginkan dalam desikator selama 15-30 menit
6. Ditimbang berat botol timbang dan sampel
7. Dihitung kadar airnya menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Air (\% WB)} = \frac{(\text{berat botol timbang} + \text{berat sampel}) - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

### 3.2.5.3 Analisis Kadar abu (Metode Kering)

Menurut Winarno (2002) Sebagian besar bahan makanan, yaitu sekitar 96% terdiri dari bahan organik dan air. Sisanya terdiri dari unsur-unsur mineral. Unsur mineral juga dikenal sebagai zat organik atau kadar abu. Dalam proses pembakarannya, bahan-bahan organik terbakar tetapi zat anorganiknya tidak, karena itu disebut abu.

Kadar abu menggambarkan kandungan mineral dari sampel bahan makanan. Yang disebut kadar abu adalah material yang tertinggal bila bahan makanan dipijarkan dan dibakar pada suhu sekitar 500 – 800 °C. Semua bahan organik akan terbakar sempurna menjadi air dan CO<sub>2</sub> serta NH<sub>3</sub>, sedangkan elemen tertinggal sebagai oksidasinya (Sediaoetama, 2000).

Metode yang digunakan dalam analisis kadar abu ini adalah menggunakan metode kering. Prinsip kerja dari metode ini adalah didasarkan pada berat residu pembakaran (oksidasi dengan suhu tinggi sekitar 500-650 °C)

terhadap semua senyawa organik dalam bahan. Abu dalam bahan pangan ditetapkan dengan menimbang sisa mineral hasil pembakaran bahan organik pada suhu tinggi sekitar 500-650 °C (Sumardi dan Sasmito, 2007). Prosedurnya penentuan kadar abu adalah sebagai berikut :

1. Dikeringkan porselen dalam oven pada suhu 105 °C selama semalam
2. Dimasukkan desikator selama 15 – 30 menit
3. Ditimbang berat porselen
4. Ditimbang sampel kering halus sebanyak 2 gram
5. Dimasukkan sampel dalam porselen dan abukan dalam muffle bersuhu 650°C sampai seluruh bahan terabukan (abu berwarna keputih-putihan)
6. Dimasukkan dalam desikator selama 15 – 30 menit
7. Ditimbang beratnya
8. Dihitung kadar abunya menggunakan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat porselen}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

#### 3.2.5.4 Analisis Kadar Protein (Metode Titrasi Formol)

Protein merupakan suatu zat makanan yang amat penting bagi tubuh karena zat ini disamping berfungsi sebagai zat pembangun dan pengatur. Protein adalah sumber asam amino yang mengandung unsur C, H, O dan N yang tidak dimiliki oleh lemak atau karbohidrat. Molekul protein mengandung pula fosfor, belerang dan ada jenis protein yang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Winarno, 2002).

Tujuan analisis kadar protein dalam bahan makanan adalah untuk menerka jumlah kandungan protein dalam bahan makanan, menentukan tingkat kualitas protein dipandang dari sudut gizi dan menelaah protein sebagai salah satu bahan kimia. Penentuan protein berdasarkan jumlah N menunjukkan

banyaknya protein kasar, karena selain protein juga terikat senyawa N bukan protein misalnya urea, asam nukleat, amonia, nitrit, nitrat, asam amino, amida, purin dan pirimidin (Sudarmadji, *et al.*, 2003).

Analisis kadar protein menggunakan metode titrasi formol. Larutan protein dinetralkan dengan basa (NaOH) lalu ditambahkan formalin akan membentuk dimethylol. Dengan terbentuknya dimethylol ini berarti gugus aminonya sudah terikat dan tidak akan mempengaruhi reaksi antara asam dengan basa NaOH sehingga akhir titrasi dapat diakhiri dengan tepat. Indikator yang digunakan adalah pp, akhir titrasi bila tepat terjadi perubahan warna menjadi merah muda yang tidak hilang dalam 30 detik. Cara kerja pengujian protein metode titrasi formol antara lain (Anonymous, 2010) :

1. menghaluskan dan menimbang sampel basah sebanyak 2 gram
2. Ditambahkan aquadest sebanyak 40 ml
3. Dimasukkan kuvet dan disentrifuse 2000 rpm 15 menit dan 1000 rpm 15 menit
4. Saring dengan kertas saring sehingga diperoleh supernatan (Jika supernatan yang diperoleh masih keruh masing-masing ditambahkan TCA 1 ml, disentrifuse 2000 rpm selama 10 menit, diambil supernatannya)
5. Tambah supernatan dengan aquadest sebanyak 100 ml
6. Diambil 1 ml larutan dan diencerkan 20x (ditambah 19 ml aquadest)
7. Diambil 10 ml dan dimasukkan erlenmeyer
8. Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam
9. Ditambahkan 2 ml formaldehid dan indikator pp 3 tetes
10. Dititrasi 0,1 N NaOH

Perhitungan kadar N terlarut dan kadar P menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% N = \frac{(\text{titrasi sampel} - \text{titrasi blanko}) \text{ ml} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times \text{FP} \times 100\%}{\text{Berat sampel} \times 1000}$$

$$\% P = \% N \times 6,25$$

### 3.2.5.5 Analisis Karbohidrat (Pati)

Karbohidrat banyak terdapat dalam bahan nabati, baik berupa gula sederhana, heksosa, pentosa, maupun karbohidrat dengan berat molekul yang tinggi seperti pati, pektin, selulosa, dan lignin (Winarno, 2002). Adapun penentuan kadar Karbohidrat khususnya pati menurut Sudarmadji, et al. (1997):

- timbang 2-5 g contoh yang berupa bahan padat yang telah dihaluskan atau bahan cair dalam gelas piala 250 ml, tambahkan 50 ml aquadest dan aduk selama 1 jam. Suspensi disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan aquadest sampai volume filtrat 250 ml. Filtrat ini mengandung karbohidrat yang terlarut dan dibuang
- Untuk bahan yang mengandung lemak, maka pati yang terdapat sebagai residu pada kertas saring dicuci 5 kali dengan 10 ml ether, biarkan ether menguap dari residu, kemudian dicuci lagi dengan 150 ml alkohol 10% untuk membebaskan lebih lanjut karbohidrat yang terlarut
- residu dipindahkan secara kuantitatif dari kertas saring ke dalam erlenmeyer dengan pencucian 200 ml aquadest dan tambahkan 20 ml HCL  $\pm$  25% (berat jenis 1,125), tutup dengan pendingin balik dan panaskan diatas penangas air mendidih selama 2,5 jam
- setelah dingin netralkan dengan larutan NaOH 45% dan encerkan sampai volume 500 ml, kemudian saring. Tentukan kadar gula yang dinyatakan

sebagai glukosa dari filtrat yang diperoleh. Penentuan glukosa seperti pada penentuan gula reduksi. Berat glukosa dikalikan merupakan berat pati.

### 3.2.5.6 Analisis Kadar Lemak (Metode Goldfish)

Metode yang digunakan adalah metode Goldfish, dimana prinsipnya menurut Sudarmadji *et al.*, (1996) adalah mengekstraksi lemak dari sampel dengan pelarut seperti petroleum ether dan dilakukan dengan alat ekstraksi Goldfish. Prosedurnya adalah sebagai berikut :

1. Langkah pertama adalah sampel dikeringkan dalam oven suhu 105 °C selama semalam untuk menghilangkan air dalam sampel.
2. Sampel kering dan halus ditimbang sebanyak 2 gram. Setelah itu sampel tadi diletakkan di atas kertas saring yang telah dikeringkan dan diketahui beratnya. Dilipat menjadi persegi lalu diikat dengan tali. Fungsinya sebagai membran penahan panas ampas sampel sehingga dapat keluar hanya lemak yang larut kerana petroleum ether atau petroleum benzene.
3. Kemudian dimasukkan dalam sampel tube dan dipasang tepat di bawah kondensor rangkaian alat goldfish. Bahan pelarut yang digunakan ditempatkan pada gelas piala dan dipasang tepat di bawah kondensor sampai rapat dan tidak dapat diputar lagi.
4. Lalu kran air pendingin diputar dan dialirkan ke kondensor dan alat dinyalakan. Bila gelas piala dipanaskan, uap pelarut akan naik dan didinginkan oleh kondensor sehingga akan mengembun dan menetes pada sampel. Demikian terus-menerus sehingga bahan akan dibasahi oleh pelarut dan lipida akan terekstraksi dan selanjutnya tertampung pada gelas piala.
5. Ekstraksi dilakukan selama 3 jam. Setelah selesai maka alat dimatikan dan kertas saring berisi sampel diambil, setelah tetapan petroleum ether atau benzene dari sampel berhenti, lalu dikeringkan dalam oven suhu 105 °C



sampai 30 menit dan ditimbang berat timbel agar sisa petroleum ether atau benzene teruapkan sehingga tidak mengganggu berat akhir.

6. Perhitungan kadar lemak menggunakan rumus :

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

### 3.2.5.7 Analisis HCN

Berbagai macam bahan makanan baik hewani maupun nabati sering kali secara alamiah mengandung senyawa-senyawa yang bersifat rasio. Senyawa beracun yang dapat menimbulkan keracunan akut pada umumnya sudah dikenal oleh masyarakat, seperti ubi kayu (singkong) yang mengandung HCN. HCN ini dikeluarkan bila komoditi tersebut dihancurkan, dikunyah, mengalami pengirisan, atau rusak. Bila termakan HCN sangat cepat terserap oleh alat pencernaan dan masuk ke aliran darah, tergantung kadar hidrogen sianida dapat menyebabkan sakit sampai menimbulkan kematian. Penurunan kadar HCN pada ubi kayu pahit yang mengalami perendaman, dengan kadar penurunan yang berbeda berdasarkan lamanya waktu perendaman yang dilakukan. Semakin lama waktu perendaman yang dilakukan semakin besar pula kadar HCN yang menurun, yaitu pada waktu perendaman 24 jam kadar rata-rata HCN turun hingga 93,31% dari berat HCN sebelum perendaman (Sitepu, 2009).

Prosedur penentuan kadar HCN adalah seperti dijelaskan berikut ini:

1. Timbang sampel sebanyak  $\pm 20$  g. Masukkan ke dalam labu destilasi leher tiga 500 cc, ditambah 10 cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:9. Kemudian dibiarkan 2 jam.
2. Kemudian ditambahkan lagi 100 cc aquades.
3. Kemudian didestilasi uap dan ditampung dengan NaOH 2,5 % 20 cc sampai volume 150 cc.
4. Destilasi dihentikan dan hasil destilasi dititrasasi dengan AgNO<sub>3</sub> 0,02 N sampai terbentuk warna merah keruh. Catat volume penitrasasinya.

### 3.2.5.8 Analisis Tannin (Ranganna, 1986)

Kadar tanin buah dari perlakuan ethanol baik dengan cara pencelupan ke dalam larutan etanol dan perlakuan dengan uap ethanol serta kontrol diamati pada hari ke dua, empat dan delapan setelah perlakuan (Ranganna, 1986). Prosedur penentuan kadar tanin adalah seperti dijelaskan berikut ini:

1. Sebanyak  $\pm 1$  g sampel yang telah dihaluskan digunakan untuk penentuan kandungan tannin.
2. Ditambahkan 80 cc air suling, dididihkan selama 10 menit dan kemudian didinginkan.
3. Dimasukkan ke dalam labu takar 100 cc, kemudian ditambah aquades sampai tanda batas, dikocok dan disaring.
4. 25 cc larutan dimasukkan dalam erlenmeyer 250 cc, ditambah 20 cc indigo, ditambah 750 cc air suling dan ditambah 1 cc  $\text{KMnO}_4$  sampai warna biru berubah menjadi hijau.
5. Dilakukan titrasi dengan  $\text{KMnO}_4$  0,0253 N sampai berwarna kuning keemasan.
6. Kandungan tanin dalam sampel dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Kandungan tannin (\%)} = \frac{(\text{Vol larutan} - \text{BL}) \times 0,0241 \times 0,006225}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

Reagen  $\text{KMnO}_4 \longrightarrow 1,3330 \text{ gram } \text{KMnO}_4 / \text{L} = 0,0253 \text{ N}$

### 3.2.5.9 Nilai pH

Nilai pH adalah keasaman atau kebasaan suatu larutan dengan konsentrasi  $\text{H}^+$  dan ion  $\text{OH}^-$  yang kecil. Nilai pH merupakan salah satu parameter untuk menentukan kemunduran mutu bahan pangan. Prinsip dari analisis pH adalah konsentrasi ion  $\text{H}^+$  dalam sampel yang bersifat buffer diukur dengan

menggunakan potensiometer (pH-meter). Berikut ini adalah prosedur Analisis Nilai pH:

- pH meter distandarisasi dengan larutan *buffer* sesuai range pH sampel (4 dan 7).
- Timbang 5 gram sampel halus yang homogen.
- Masukkan dalam beaker glass dan tambahkan aquades (1:2) aduk sampai homogen.
- Ukur dengan pH-meter, tunggu sampai konstan. Tiap kali selesai pengukuran elektode dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan tissue

#### 3.2.5.10 Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik adalah pengujian yang didasarkan pada proses pengindraan. Pengindraan diartikan sebagai suatu proses fisio-psikologis, yaitu kesadaran atau pengenalan alat indra akan sifat-sifat benda karena adanya rangsangan yang diterima alat indra yang berasal dari benda tersebut. Pengindraan dapat juga berarti reaksi mental (*sensation*) jika alat indra mendapat rangsangan (*stimulus*). Reaksi atau kesan yang ditimbulkan karena adanya rangsangan dapat berupa sikap untuk mendekati atau menjauhi, menyukai atau tidak menyukai akan benda penyebab rangsangan (Wagiyono, 2003).

Uji deskripsi digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik sensori yang penting pada suatu produk dan memberikan informasi mengenai derajat atau intensitas karakteristik tersebut. Uji ini dapat membantu mengidentifikasi variabel bahan tambahan (*ingredien*) atau proses yang berkaitan dengan karakteristik sensori tertentu dari produk. Informasi ini dapat digunakan untuk pengembangan produk baru, memperbaiki produk atau proses dan berguna juga untuk pengendalian mutu rutin (Ebook, 2006).

Dalam Uji organoleptik harus dilakukan dengan cermat karena memiliki kelebihan dan kelemahan. Uji organoleptik memiliki relevansi yang tinggi dengan mutu produk karena berhubungan langsung dengan selera konsumen. Selain itu, metode ini cukup mudah dan cepat untuk dilakukan, hasil pengukuran dan pengamatannya juga cepat diperoleh. Dengan demikian, uji organoleptik dapat membantu analisis usaha untuk meningkatkan produksi atau pemasarannya. Uji organoleptik juga memiliki kelemahan dan keterbatasan akibat beberapa sifat indrawi tidak dapat dideskripsikan. Manusia merupakan panelis yang terkadang dapat dipengaruhi oleh kondisi fisik dan mental, sehingga panelis dapat menjadi jenuh dan menurun kepekaannya. Selain itu dapat terjadi pula salah komunikasi antara manajer dan panelis (Anonymous, 2011).

### 3.3 Penentuan Perlakuan Terbaik dengan Zeleny (Zeleny, 1982)

Untuk menentukan kombinasi perlakuan terbaik digunakan metode *Multiple attribute* dengan prosedur pembobotan sebagai berikut:

1. Menentukan nilai ideal pada masing-masing parameter

Nilai ideal adalah nilai yang sesuai dengan pengharapan, yaitu maksimal atau minimal dari suatu parameter. Untuk parameter dengan rerata semakin tinggi semakin baik, maka nilai terendah sebagai nilai terjelek dan nilai tertinggi sebagai nilai terbaik. Sebaliknya untuk parameter dengan nilai terendah semakin baik, maka nilai tertinggi sebagai nilai terjelek dan nilai terendah sebagai nilai terbaik.

2. Menghitung derajat kerapatan ( $d^*$ )

Derajat kerapatan dihitung berdasar nilai ideal untuk masing-masing parameter.

Bila nilai ideal ( $d^*$ ) min, maka:

$$d^* i = \frac{\text{nilai kenyataan yang mendekati ideal}}{\text{nilai ideal dari masing – masing alternatif}}$$

Bila nilai ideal ( $d^*i$ ) maks, maka:

$$d^* i = \frac{\text{nilai ideal masing – masing alternatif}}{\text{nilai kenyataan yang mendekati ideal}}$$

### 3. Menghitung jarak kerapatan ( $L_p$ )

Dengan asumsi semua parameter penting, jarak kerapatan dihitung

berdasarkan jumlah parameter =  $1/\text{jumlah parameter}$

$L_1$  = menjumlah derajat kerapatan dari semua parameter pada masing-masing perlakuan. Hasil penjumlahan dikurangkan 1.

$$L_1(\lambda, k) = 1 - \sum_{i=1}^n (\lambda_i (1 + d_i^k))$$

$$L_2(\lambda, k) = \left\{ \sum_{i=1}^n \lambda_i^2 (1 + d_i^k)^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$L^\infty = \text{maks} \{ \lambda_i (1 + d_i^k) \}$$

$L^\infty$  dipilih nilai maksimal dari perhitungan diatas.

4. Perlakuan terbaik dipilih dari perlakuan yang mempunyai nilai  $L_1$ ,  $L_2$  dan  $L^\infty$  minimal