

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi bahan untuk kultur khamir laut, bahan untuk pembuatan hidrolisat protein kepala ikan lele, dan bahan untuk analisis kimia. Bahan yang digunakan dalam kultur khamir laut adalah air laut, pupuk daun, gula pasir, stok khamir laut, kapas, plastik wrap, aquadest, kertas label, dan alkohol. Bahan yang digunakan dalam menghitung kepadatan sel khamir laut adalah air laut, gula pasir, pupuk daun, tissue, kertas label, kapas, dan alkohol. Bahan dalam pembuatan hidrolisat protein kepala ikan lele adalah kepala lele rebus yang telah dihaluskan, molase rebus, biakan khamir laut, akuades, kertas label, dan malam. Bahan yang digunakan pada analisa kadar abu dan analisa kadar air adalah sampel. Bahan yang digunakan dalam analisa kadar lemak adalah sampel HPI sebanyak 5 gr, kertas saring, tali, pelarut n-heksan. bahan yang digunakan pada analisa kadar protein adalah sampel HPI sebanyak 2 gr, aquadest, selenium, H_2SO_4 pekat, NaOH 40%, H_3BO_3 2%, indikator metil merah, HCl 0,01 N. Bahan yang digunakan dalam analisis profil asam amino adalah sampel HPI, kertas saring whatman, asam borat, akuabides, larutan o-phthaldehyde (OPA), methanol dan merkaptoetanol.

3.1.2 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah sebagai berikut: alat-alat yang digunakan dalam kultur khamir laut adalah botol bensin, aerator, selang aerasi, panci perebusan, kompor, gelas ukur, beaker glass, erlenmeyer, spatula, pipet cerologis, pipet volume, timbangan digital, dan bola hisap. Alat-alat yang digunakan untuk menghitung kepadatan khamir laut adalah tabung reaksi, rak

tabung reaksi, pipet tetes, *vortex mixer*, *haemocytometer* merk *neubauer improved*, *hand tally counter* dan mikroskop merk *olympus*. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein ikan adalah blower, pipa, selang aerasi, kran aerasi, botol plastik ukuran 600 mL, botol plastik berukuran 1500 mL, cawan petri, pisau, baskom, dan *food prossecor*. Peralatan yang digunakan untuk menganalisa kadar air adalah botol timbang, oven, desikator, jam atau stopwatch, timbangan analitik. Peralatan yang digunakan dalam analisa kadar abu adalah cawan krus, oven, desikator, botol timbang, timbangan analitik, jam atau stopwatch. Alat-alat yang digunakan untuk analisa kadar lemak adalah sebagai berikut: *goldfish*, oven, gelas piala, timbangan analitik, *crustable tank*, desikator, dan jam. Alat-alat yang digunakan dalam analisa kadar protein adalah sebagai berikut: gelas ukur merk *pyrex*, labu *kjehdahl*, dan buret.

3.1.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian Eksperimen pada dasarnya adalah ingin menguji hubungan suatu sebab dan akibat. Pengujian dilakukan dengan suatu sistem tertutup yang kondisinya terkontrol. Terdapat beberapa unsur dalam penelitian eksperimen yaitu: adanya situasi (kelompok) kontrol dan kelompok uji atau kelompok perlakuan, serta adanya intervensi peneliti (Hartanto, 2003).

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap, tahap pertama yaitu tahap penentuan fase logaritmik pertumbuhan khamir laut pada media air laut yang diberi gula sebagai sumber nutrient dan pupuk daun sebagai sumber nitrogen pertumbuhannya. Penentuan fase logaritmik ini dilakukan dengan cara menghitung kepadatan sel khamir laut tiap 12 jam yang dimulai dari jam ke 0 sampai jam ke 72 menggunakan *haemocytometer* pada mikroskop.

Tahap kedua yaitu penentuan formula pada pembuatan hidrolisat protein yaitu, kepala lele yang telah dihaluskan, molase rebus dan biakan khamir laut yang diambil pada fase logaritmik, adapun formula yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4:

Tabel 4. Formula Penelitian Pendahuluan Pembuatan HPI

No.	Jumlah kepala lele rebus halus (g)	Volume molase rebus (mL)	Jumlah khamir laut (mL)
1.	100	100	20
2.	100	200	20
3.	100	300	20
4.	100	400	20
5.	100	500	20
6.	100	600	20
7.	100	700	20

Penelitian pendahuluan pembuatan hidrolisat protein kepala ikan lele bertujuan untuk mengetahui formula yang tepat yang akan digunakan untuk penelitian utama. Dari ketujuh formula diatas dilakukan pengamatan selama 12 hari. Adapun pengamatan didasarkan pada jumlah randemen yang dihasilkan setiap tiga hari selama 12 hari, bau yang ditimbulkan, dan penampakan seperti ada tidaknya jamur pada botol-botol percobaan.

Tahap ketiga yaitu penelitian inti pembuatan hidrolisat protein kepala lele rebus dengan tiga formula terbaik yang diambil dari formula dari penelitian pendahuluan. Kemudian dari ketiga formula tersebut dilakukan analisa kualitas, adapun kualitas hidrolisat protein diukur berdasarkan rendemen, analisa proksimat, pH, emulsifikasi, daya buih, dan total asam amino.

3.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Menurut Hartanto (2003), variabel adalah semua ciri atau faktor yang dapat menunjukkan variasi. Berdasarkan fungsinya ada 3 macam variabel yaitu variabel bebas, terkontrol dan terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya atau faktor yang menjadi pokok permasalahan yang ingin

diteliti. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan dan dibuat sama antara kelompok yang diteliti. Variabel terikat yaitu variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi molase rebus yang berbeda antara lain 300 mL, 400 mL dan 500 mL. Selanjutnya lama fermentasi yang berbeda pula, yaitu dilakukan pengamatan terhadap fermentasi hari ke-3, hari ke-6, hari ke-9 dan hari ke-12. Berikutnya variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu pemberian inokulum khamir laut sebanyak 20 mL pada semua perlakuan. Sedangkan untuk variabel terikat adalah parameter yang diamati antara lain komposisi kimia (kandungan kadar protein, kadar lemak, kadar air, kadar abu dan karbohidrat), total asam amino, derajat keasaman (pH), emulsifikasi, daya buih pada hidrolisat protein kepala ikan lele (*Clarias sp.*).

Berdasarkan variabel bebas atau perlakuan, penelitian ini dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor yaitu volume molase rebus yang terdiri dari 300 mL, 400 mL, dan 500 mL dan lama fermentasi pada hari ke-3, hari ke-6, hari ke-9 dan hari ke-12. Sesuai rumus perhitungan dalam menentukan ulangan dalam suatu penelitian, penelitian ini dilakukan dengan 3 kali ulangan. Rumus perhitungan ulangan penelitian dan metode analisa sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

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

Keterangan:

t = Jumlah Perlakuan

r = Jumlah Ulangan

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

Keterangan:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor A level ke-l faktor B level ke-l, pada ulangan ke-k.

μ = Rataan umum.

α_i = Pengaruh faktor A pada level ke-i.

β_j = Pengaruh faktor B pada level ke-i.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interaksi antara A dan B pada faktor A level ke-l faktor B level ke-j.

ϵ_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor A level ke-l, faktor B level ke-j pada ulangan/kelompok ke-k.

Apabila hasil analisis keragaman (ANOVA) menunjukkan adanya pengaruh yang nyata/sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Tabel Duncan ini dilakukan supaya mengetahui perlakuan terbaik. Tabel Desain Rancangan Percobaan tersaji pada Tabel 5 berikut:

Tabel 5. Desain Rancangan Percobaan

	Perlakuan		Ulangan			Total	Rata-rata
	Lama Fermentasi	Volume Molase Rebus	1	2	3		
A		X	AX1	AX2	AX3		
		Y	AY1	AY2	AY3		
		Z	AZ1	AZ2	AZ3		
B		X	BX1	BX2	BX3		
		Y	BY1	BY2	BY3		
		Z	BZ1	BZ2	BZ3		
C		X	CX1	CX2	CX3		
		Y	CY1	CY2	CY3		
		Z	CZ1	CZ2	CZ3		
D		X	DX1	DX2	DX3		
		Y	DY1	DY2	DY3		
		Z	DZ1	DZ2	DZ3		
E		X	EX1	EX2	EX3		
		Y	EY1	EY2	EY3		
		Z	EZ1	EZ2	EZ3		

Keterangan:

A = Lama fermentasi 0 hari (kontrol)

B = Lama fermentasi 3 hari

C = Lama fermentasi 6 hari

D = Lama fermentasi 9 hari

E = Lama fermentasi 12 hari

X = Volume molase rebus sebanyak 300 mL

Y = Volume molase rebus sebanyak 400 mL

Z = Volume molase rebus sebanyak 500 mL

Parameter uji yang analisisnya menggunakan rancangan percobaan adalah semua uji yang dilakukan dalam penelitian ini. Data yang diperoleh dari hasil penghitungan pada parameter uji yang dilakukan kemudian dianalisis menggunakan SPSS versi 16.

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Prosedur Penentuan Fase Logaritmik Khamir Laut

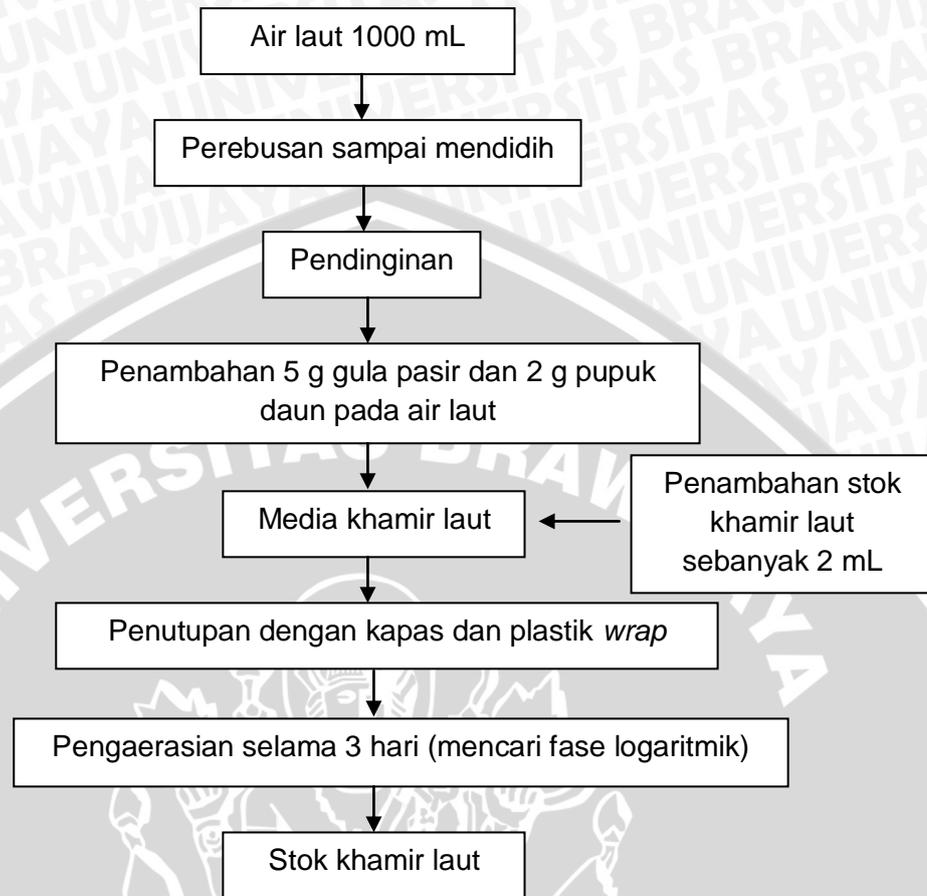
Prinsip dari penentuan fase log yaitu dengan cara perhitungan jumlah sel khamir laut menggunakan *haemositometer* pada mikroskop. Pengamatan dilakukan dengan mengamati setiap 12 jam sekali kultur khamir laut untuk diukur tingkat kepadatan atau jumlah sel khamir laut dengan menggunakan *haemositometer* yang dilihat melalui mikroskop. Kepadatan khamir laut diamati mulai dari hari jam ke-0 sampai jam ke-72.

Cara kerja yang pertama yang dilakukan dalam penentuan fase logaritmik yaitu mengkultur khamir laut. Menurut Fathoni (2014), prinsip kultur adalah perbanyak khamir laut yang dapat memproduksi protease, pada proses pertumbuhannya menggunakan media air laut dengan memanfaatkan gula sebagai sumber nutrisi, pupuk sebagai sumber nitrogen dan aerasi yang cukup sebagai suplai oksigen dalam pertumbuhannya. Khamir mampu mentransportasikan dan memanfaatkan senyawa nitrogen organik dan anorganik. Selama pertumbuhannya khamir laut menghasilkan senyawa-senyawa seperti nukleotida, asam amino, enzim dan faktor pertumbuhan yang belum diidentifikasi yang mampu menstimulasi pertumbuhan dan enzim. Suplai udara dalam perkembangbiakan khamir adalah kebutuhan untuk produksi biomassa yang optimal.

Adapun menurut Sukoso, (2012) prosedur dalam mengkultur khamir laut (lampiran 1) sebagai berikut:

- Bahan berupa air laut, gula pasir, pupuk, dan biakan khamir laut disiapkan.
- Air laut sebanyak 1000 mL disterilkan dengan direbus sampai mendidih (± 1 jam) kemudian didinginkan pada suhu kamar.
- Air laut steril yang sudah dingin dimasukkan ke dalam gelas kaca kemudian ditambahkan gula pasir 5 g sumber nutrisi dan pupuk daun 2 g sebagai sumber nitrogen lalu dihomogenkan sehingga diperoleh media khamir laut. Untuk perhitungan formula bahan tertera pada lampiran 2.
- Media khamir laut dimasukkan dalam botol kaca yang telah diesterilisasi terlebih dahulu.
- Starter khamir laut dimasukkan dalam media tersebut sebanyak 2 mL.
- Botol ditutup kapas dan plastik *warp* untuk menghindari kontaminasi dan hal yang tidak diinginkan serta masuknya udara sekitar selanjutnya kultur tersebut diberi aerasi.
- Aerasi dilakukan selama 3 hari untuk dilakukan pengamatan tingkat kepadatan sel khamir laut menggunakan hemositometer setiap 12 jam.

Skema kerja kultur khamir laut tertera pada Gambar 4 berikut:



Gambar 4. Skema Kerja Kultur Khamir Laut (Sukoso, 2012)

Prosedur pengamatan tingkat kepadatan sel pada kultur khamir laut pada hemositometer yaitu diamati kepadatan khamir pada jam ke-0 sampai jam ke-72. Langkah pertama yang dilakukan sebelum dilakukan perhitungan hemositometri pada mikroskop yaitu dilakukan pengenceran pada kultur khamir laut tersebut. Pengenceran dilakukan dari 10^{-1} sampai 10^{-4} .

Adapun prosedur kerja perhitungan kepadatan sel khamir laut (lampiran 3) adalah sebagai berikut :

- Persiapan media untuk pengenceran kultur khamir laut. Komposisi media pengenceran yaitu 0,25 g gula pasir dan 0,1 g pupuk daun. Selanjutnya ditambahkan air laut yang sudah disterilisasi sebanyak 100 mL lalu dihomogenkan. Perhitungan media pengenceran tertera pada lampiran 4.

- Media khamir laut diambil sebanyak 9 mL dan dibuat pada masing-masing empat tabung reaksi untuk diberi perlakuan tingkat pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-4} .
- Kemudian untuk tabung reaksi 10^{-1} yang telah berisi media diberi kultur khamir laut sebanyak 1 mL yang telah diareasi, selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*.
- Dari tabung reaksi 10^{-1} yang telah dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} kemudian dari tabung reaksi tersebut dihomogenkan begitu seterusnya sampai 10^{-4} .
- Dari hasil pengenceran 10^{-4} diuji kepadatan sel khamirnya menggunakan hemositometer pada mikroskop.

Pengamatan kepadatan khamir laut dilakukan setiap 12 jam selama 72 jam dengan menggunakan hemositometer pada mikroskop yaitu dengan mengambil hasil pengenceran 10^{-4} dengan menggunakan mikropipet sebanyak 50 μ L atau 0,05 mL. lalu ditetaskan pada papan hemositometer dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

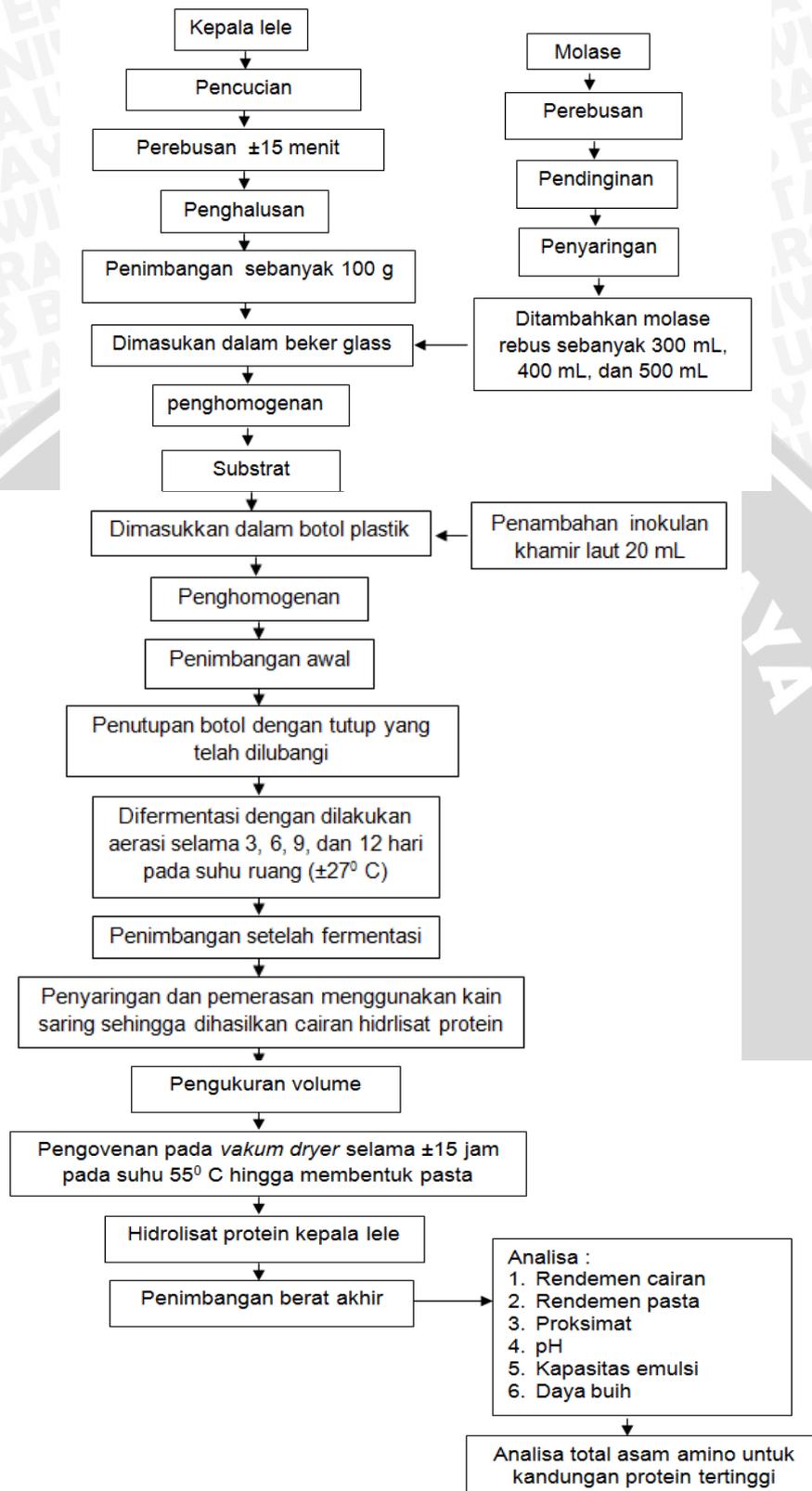
3.3.2 Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala ikan lele (*Clarias sp.*)

Prinsip dari pembuatan hidrolisat yaitu melakukan suatu pemecahan substrat dengan bantuan air atau H_2O dan adanya penambahan enzim untuk memecah substrat tersebut menjadi komponen yang lebih sederhana. Prosedur yang dilakukan dalam penelitian utama (Lampiran 5) ini yaitu langkah pertama dengan mempersiapkan bahan baku ikan lele (*Clarias sp.*). Dalam penelitian ini untuk bahan baku awal menggunakan bahan baku kepala ikan lele (*Clarias sp.*) rebus. Kemudian dihaluskan menggunakan penghalus daging. Tujuan dihaluskan yaitu supaya bahan baku lebih mudah bercampur dengan komponen bahan-bahan yang lain, kemudian ditimbang seberat 100 g.

Pada dasarnya komposisi gizi bahan pangan terdiri dari empat komponen utama yaitu air, protein, karbohidrat dan lemak. Jumlah masing-masing komponen tersebut berbeda-beda pada bahan pangan tergantung dari sifat alamiah bahan misalnya, kekerasan, citarasa dan warna (Fathoni, 2014) .

Langkah selanjutnya yaitu dilakukan penambahan molase rebus yang telah dingin dengan berbagai konsentrasi yang berbeda yaitu 300 mL, 400 mL dan 500 mL. Tujuan diberikan perlakuan yang berbeda pada molase rebus yaitu untuk mengetahui tingkat efektifitas molase rebus tersebut dalam proses pembuatan hidrolisat protein kepala ikan lele (*Clarias sp.*). Selanjutnya ditambahkan inokulan khamir laut sebanyak 20 mL. Pada tahap ini digunakan inokulan khamir laut dari hasil penentuan fase logaritmik khamir laut karena pada fase tersebut pertumbuhan khamir laut menunjukkan pertumbuhan tertinggi. Disamping itu tujuan digunakan khamir laut yaitu sebagai *starter* dalam proses hidrolisis pada kepala ikan lele (*Clarias sp.*). Setelah itu dilakukan proses fermentasi, dimana dilakukan pengamatan pada hari ke-0 sebagai kontrol ke-3, 6, 9 dan 12. Tujuan dibuat lama fermentasi yang berbeda yaitu untuk mengetahui tingkat efektifitas fermentasi dalam proses pembuatan hidrolisat protein kepala ikan lele (*Clarias sp.*). Langkah berikutnya diperas menggunakan kain saring. Tujuan diperas yaitu untuk memisahkan antara cairan dan endapan pada sampel hidrolisat protein tersebut. Kemudian cairan hidrolisat protein dioven vakum selama ± 15 jam pada suhu 55° C.

Selanjutnya analisis kimia yang dilakukan diantaranya analisis proksimat. Kemudian dari hasil kadar protein tertinggi dilakukan uji total asam amino. Selain itu juga dilakukan pH, emulsifikasi, dan daya buih. Skema kerja pembuatan hidrolisat protein kepala lele rebus dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema Kerja Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Lele (*Clarias sp.*) Rebus (Budy, 2014)

3.3.3 Prosedur Analisa

3.3.3.1 Rendemen Cairan dan Pasta Hidrolisat Protein Kepala Ikan Lele

Rendemen adalah jumlah prosentase akhir setelah proses dan dinyatakan dalam % (berat/berat). Menurut Budy (2014), proses hidrolisis menggunakan enzim yang dihasilkan khamir laut akan merubah substrat menjadi produk hidrolisat. Prosentase banyaknya produk hidrolisat yang dihasilkan dari bahan baku sebelum dilakukan hidrolisis disebut rendemen produk hidrolisat.

Adapun prosedur penentuan rendemen cairan hidrolisat protein kepala ikan lele adalah:

1. Dilakukan penimbangan berat awal cairan hidrolisat protein yang telah dibeli inokulan khamir laut.
2. Difermentasi selama 3, 6, 9, dan 12 hari.
3. Ditimbang berat akhir pada tiap-tiap botol percobaan yang telah ditentukan lama waktu fermentasinya.
4. Kemudian dihitung menggunakan rumus rendemen yaitu

$$\frac{\text{Volume akhir} \times 100\%}{\text{Volume awal}}$$

Adapun prosedur penentuan rendemen pasta hidrolisat protein kepala ikan lele adalah:

1. Berat awal yang diukur adalah berat akhir dari rendemen cairan hidrolisat protein.
2. Berat akhir yang diukur adalah setelah pengovenan yaitu hidrolisat protein yang telah menjadi pasta.
3. Kemudian dihitung menggunakan rumus rendemen yaitu

$$\frac{\text{Berat akhir} \times 100\%}{\text{Berat awal}}$$

3.3.3.2 Prosedur Analisa Proksimat

Menurut Mulyani dan Sukesri (2011) analisis proksimat dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui komponen utama dalam suatu bahan yang pada umumnya terdiri dari kadar air, kadar lemak, kadar abu, kadar protein, dan kadar karbohidrat. Analisis ini perlu dilakukan karena menyediakan data kandungan utama dari suatu bahan makanan.

a. Kadar Air (Andarwulan *et al.*, 2011)

Metode pengujian kadar air yang digunakan yaitu metode pengeringan atau menggunakan oven. Prinsip analisis kadar air menggunakan metode oven yaitu mengeringkan sampel dalam oven pada suhu 100°C - 105°C sampai diperoleh berat konstan. Metode ini dilakukan dengan cara mengeluarkan air dari bahan dengan bantuan panas.

Prosedur kerja dalam pengujian kadar air (Lampiran 5) sebagai berikut:

- Cawan kosong beserta tutupnya di oven selama 24 jam dengan suhu 105°C.
- Cawan kosong beserta tutupnya dimasukkan ke dalam desikator bertujuan untuk penguapan panas dan uap air selama ±15 menit.
- Cawan kosong beserta tutupnya ditimbang dengan timbangan digital lalu dicatat sebagai berat A.
- Sampel ditimbang dengan berat 5 g dan dicatat sebagai berat B.
- Sampel dimasukkan ke dalam cawan yang telah dioven sebelumnya.
- Cawan yang berisi sampel dioven suhu 105°C selama 3-4 jam.
- Cawan yang berisi sampel dipindahkan ke dalam desikator dan ditunggu selama ±15 menit.
- Cawan yang berisi sampel ditimbang dan dicatat sebagai berat C.
- Dihitung kadar air sesuai dengan rumus % kadar air sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{B - (C - A)}{B} \times 100\%$$

Keterangan : A = berat botol timbang yang sudah konstan
B = berat sampel awal
C = berat cawan dan sampel kering yang sudah konstan

b. Kadar Lemak (Sudarmadji *et al.*, 2003)

Metode yang digunakan dalam uji kadar lemak yaitu metode ekstraksi *goldfish*. Prinsip dari metode ini yaitu menghitung prosentase kadar lemak dengan melarutkan lemak pada sampel dengan menggunakan pelarut non polar. Keuntungan dari metode ini yaitu sangat praktis dan mudah pemakaiannya. Selain itu pelarut yang sudah dipakai dalam metode ini dapat dipakai kembali.

Prosedur yang dilakukan dalam pengujian kadar lemak menggunakan metode *goldfish* (Lampiran 7) yaitu bahan atau sampel yang telah dihaluskan sebanyak 2 g, dimasukkan kedalam timble dan dipasang dalam tabung penyangga yang pada bagian bawahnya berlubang. Bahan pelarut yang digunakan ditempatkan pada beakerglas dibawah tabung penyangga. Bila dipanaskan uap pelarut akan naik dan didinginkan oleh kondensor sehingga akan mengembun dan menetes pada sampel demikian terus menerus sehingga bahan atau sampel akan dibasahi oleh pelarut dan lipid akan terekstraksi dan selanjutnya akan tertampung pada beakerglass kembali. Setelah dipanaskan 3 – 4 jam, pemanas dimatikan, kemudian dilakukan hal yang sama pada sampel lain akan tetapi pelarut diganti yang baru. Selanjutnya residu dioven dalam 105⁰C sampai berat konstan. Berat residu ini dinyatakan sebagai minyak atau lemak yang ada pada bahan pangan. Selanjutnya dihitung kadar lemaknya menggunakan rumus % kadar lemak sebagai berikut:

$$\% \text{ kadar lemak} = \frac{\{(a + b) - c\} \times 100\%}{a}$$

keterangan: a = berat awal (g)
b = berat kertas saring (g)
c = berat akhir (g)

c. Kadar Abu (Andarwulan *et al.*, 2011)

Analisis kadar abu dilakukan dengan metode pengabuan kering yaitu menggunakan suhu tinggi pada tanur pengabuan (*furnace*). Prinsip dari metode ini yaitu abu dalam bahan ditetapkan dengan menimbang residu hasil pembakaran komponen bahan organik pada suhu 550°C. Pembakaran dilakukan tanpa adanya nyala api sampai terbentuk abu berwarna putih keabuan dan mencapai berat konstan.

Prosedur kerja analisis kadar abu menggunakan metode pengabuan langsung (lampiran 8) yaitu langkah awal cawan pengabuan yang sudah disiapkan dibakar dahulu dalam tanur dengan suhu 105° C. Kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Kemudian sampel dimasukkan kedalam cawan lalu ditimbang sebanyak 5 – 10 g. Cawan yang berisi sampel di panaskan dalam pembakar *burner* dengan api sedang untuk menguapkan bahan organik yang ada sampai sampel tidak berasap lagi dan berwarna hitam. Kemudian sampel dipindahkan kedalam tanur dan dipanaskan dalam suhu 300°C. Selanjutnya suhu dinaikkan hingga mencapai 550° C dengan waktu 5-7 jam. Setelah itu cawan diambil dengan hati –hati. Ditimbang dan dihitung menggunakan rumus untuk menentukan % kadar abu. Rumus perhitungan % kadar abu sebagai berikut:

$$\% \text{ abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan: W_2 = Berat cawan dan sampel setelah pengabuan (g)

W_0 = Berat cawan kosong (g)

W_1 = Berat cawan dan sampel sebelum pengabuan (g)

d. Kadar Protein (Andarwulan *et al.*, 2011)

Metode yang digunakan dalam analisis protein yaitu menggunakan metode Kjeldahl. Metode ini sangat umum digunakan dalam menentukan kadar protein

dalam bahan pangan. Prinsip dalam menggunakan metode ini yaitu pengujian dilakukan dengan beberapa tahapan antara lain tahap penghancuran (destruksi), tahap netralisasi dan distilasi, tahap titrasi.

Pada tahap destruksi, sampel sebanyak 0,1 – 0,5 g dimasukkan kedalam labu Kjeldahl lalu ditambahkan 3-10 mL HCl 0,02 N dan dilakukan pemanasan pada suhu sekitar 370°C. Tahap ini perlu dilakukan karena bertujuan untuk membebaskan nitrogen dari sampel. Untuk mempercepat proses penghancuran biasanya dilakukan penambahan merkuri oksida (HgO) atau dengan potassium sulfat. Pada proses ini dilakukan dalam labu Kjeldahl. Setelah semua bahan masuk pada labu Kjeldahl selanjutnya dididihkan diatas pemanas listrik selama 1 – 1,5 jam sampai cairan menjadi jernih. Pembentukan cairan jernih menunjukkan bahwa semua komponen organik yang ada dalam sampel sudah dihancurkan dan nitrogen sudah terbebas. kemudian didinginkan lalu ditambahkan sedikit demi sedikit air.

Proses destruksi selesai dilanjutkan dengan tahap netralisasi dan distilasi. Setelah larutan dalam labu dingin, larutan tersebut dituangkan ke dalam alat destilasi. Labu Kjeldahl dibilas dengan air 5-6 kali hingga tidak ada hasil destruksi yang tertinggal. Pada alat destilasi, dibagian bawah kondensor dipasang erlenmeyer yang berisi 5 mL larutan H_3BO_3 dan 2 tetes indikator. Dilakukan penambahan air untuk memasitikan ujung dari alat destilator terendam larutan asam borat. Lalu dilakukan penambahan alkali (NaOH) pekat sebanyak 8-10 mL untuk menetralkan asam sulfat. Adanya larutan NaOH pekat ini, maka ammonium sulfat akan dipecah menjadi gas amoniak. Melalui proses distilasi, gas amoniak ini kemudian akan menguap dan ditangkap oleh asam borat (H_3BO_3) membentuk $NH_4H_2BO_3$. Hasil destilasi (destilat) ditampung hingga kira-kira 15 mL destilat dalam Erlenmeyer.

Selanjutnya destilat yang tertampung didalam Erlenmeyer kemudian ditrasi diatas *magnetic stirrer* dengan menggunakan larutan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Penetapan yang sama juga dilakukan untuk blangko yang akan digunakan sebagai faktor koreksi dalam perhitungan.

Perhitungan:

Persen nitrogen pada contoh dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\%N = \frac{(\text{ml HCl contoh} - \text{blangko}) \times \text{Normalitas} \times 14,007 \times 100 \%}{\text{mg contoh}}$$

Kadar Protein dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Protein} = \%N \times F$$

dimana F = Faktor konversi = $100/(\%N \text{ dalam protein contoh})$

e. **Kadar Karbohidrat (Andarwulan *et al.*, 2011)**

Secara umum uji karbohidrat yaitu menggunakan karbohidrat *by difference*. Artinya kandungan tersebut diperoleh dari hasil pengurangan angka 100 dengan presentasi komponen lain (air, abu, lemak dan protein). Bila hasil pengurangan ini dikurangi dengan presentasi serat, maka akan diperoleh kadar karbohidrat yang dapat dicerna oleh tubuh.

3.3.3.3 Prosedur Uji pH (Budy, 2014)

Nilai pH menunjukkan derajat keasaman suatu bahan, dimana pH merupakan ion hidrogen yang terdapat di dalam larutan. Prinsip dari pengukuran pH berdasarkan pengukuran aktifitas ion hidrogen secara potensiometri atau elektrometri dengan menggunakan pH meter. pH adalah faktor kimia yang sangat mempengaruhi keawetan makanan atau bahan makanan, dimana mikroba-mikroba hanya dapat hidup dan berkembang biak dalam lingkungan dengan kondisi pH tertentu.

Prosedur dalam pengukuran pH antara lain:

- Elektroda dikeringkan dengan kertas *tissue* dan selanjutnya dibilas dengan air suling.
- Bilas elektroda dengan contoh uji.
- Celupkan elektroda ke dalam contoh uji sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap.

Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter.

3.3.3.4 Prosedur Uji Emulsifikasi (Rieuwpassa *et al.*, 2013)

Prinsip dari pengujian emulsifikasi yaitu membuat sistem heterogen yang tersusun atas dua fase cairan yang tidak tercampur tetapi cairan yang satu terdispersi dengan baik dalam cairan yang lain. Daya kerja emulsifier terutama disebabkan oleh bentuk molekulnya yang dapat terikat baik pada minyak maupun air. Ada dua tipe emulsi yaitu minyak dalam air (o.w) dan emulsi air dalam minyak (w/o) (Rita, 2011).

Prosedur pengujian emulsifikasi yaitu:

- Sampel ditimbang sebanyak 5 g.
- Sampel tersebut dimasukkan kedalam cuvet kemudian ditambahkan 20 mL air dan 20 mL minyak jagung.
- Dihomogenisasi selama 1 menit lalu disentrifus pada 7500 rpm selama 5 menit.
- Kapasitas emulsi dihitung menggunakan rumus.

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

3.3.3.5 Prosedur Uji Daya Buih (Rieuwpassa *et al.*, 2013)

Daya buih sangat dipengaruhi oleh jumlahnya protein yang terhidrolisis selama proses, tetapi tidak dapat untuk menentukan stabilitas buih atau

sebaliknya. Buih adalah bentuk disperse koloida gas dalam cairan. Daya buih protein sangat dipengaruhi sifat topografikal dan sifat kimia dari sifat permukaan protein (*surface protein*). Selain itu, sifat fisikokimia terutama dari sifat molekul proteinnya juga menentukan keberhasilan terbentuknya kondisi sifat fungsional (Fathoni, 2014).

Prosedur pengujian daya buih antara lain:

- Sampel ditimbang sebanyak 1 g
- Sampel ditambahkan ke dalam 10 mL air dan dihomogenisasi selama 1 menit
- Sampel dipindahkan kedalam 25 mL beaker glass
- Dilihat kapasitas busa yang terbentuk dan dihitung kapasitas busanya dibandingkan dengan kapasitas volume awal.
- Dihitung kapasitas busa menggunakan rumus

$$\text{Kapasitas busa} = \frac{\text{volume busa yang terbentuk}}{\text{volume awal}} \times 100\%$$

3.3.3.6 Prosedur Uji Total Asam Amino (Liputo *et al.*, 2013)

Asam Amino dianalisis menggunakan HPLC, prinsip analisis asam amino ini adalah asam amino dari protein dibebaskan melalui hidrolisis dengan HCl6N. Hidrolisat dilarutkan dengan buffer sodium sitrat dan masing-masing asam amino tersebut akan dipisahkan dengan menggunakan HPLC. Sebelum dilakukan proses hidrolisis, terlebih dahulu dilakukan ekstraksi protein dengan menggunakan metode Kjeldahl. Adapun prosedur kerja analisa total asam amino tertera pada Lampiran 9.