## 3. METODE PENELITIAN

## 3.1 Materi Penelitian

## 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan baku, bahan untuk kultur khamir laut, bahan untuk pembuatan hidrolisat protein kerang hijau, bahan untuk analisis kimia. Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan kerang hijau (*Perna viridis*) yang diperoleh dari Desa Banyu Urip, Ujungpangkah, Kabupaten Gresik. Bahan yang digunakan untuk mengkultur khamir laut adalah air laut, gula, pupuk, stok khamir laut, aquades, alkohol 70%, kapas, dan plastik wrap. Kemudian bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan hidrolisat protein kerang hijau adalah kerang hijau, molase rebus, dan inokulan khamir laut sebanyak 20 mL.

Bahan yang digunakan untuk analisis kimia yaitu untuk analisis proksimat (melingkupi kadar protein, kadar air, kadar lemak, kadar karbohidrat, dan kadar abu) antara lain silika gel, kertas saring, petroleum eter, aquades, dan tabel kjedhal, metil orange, NaOH, Borax, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Selanjutnya bahan yang digunakan untuk analisis pH, daya buih, dan emulsi yaitu aquades dan minyak jagung. Bahan berikutnya yang dibutuhkan untuk analisistotal asam amino antara lain kertas saring whatman, asam borat, aquabides, larutan o-phthaldehyde (OPA), methanol, dan merkaptoetanol.

## 3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan untuk pengkulturan khamir laut, pembuatan hidrolisat protein, analisis proksimat, analisis daya buih, analisis emulsi, analisis pH, dan analisis total asam amino. Peralatan

yang digunakan untuk mengkultur khamir laut antara lain botol kaca, aerator, selang aerator, gelas ukur, *beaker glass*, pipet volume, bola hisap, spatula, kompor, panci, dan timbangan digital. Selanjutnya peralatan yang digunakan untuk pembuatan hidrolisat protein kerang hijau antara lain kompor, panci, mortar dan alu, botol air mineral 600 ml, aerator, selang aerator, cawan petri, oven vakum, dan baskom.

Alat-alat yang dibutuhkan untuk analisis kimia yaitu analisis proksimat (melingkupi kadar protein, kadar air, kadar lemak, kadar karbohidrat, dan kadar abu) adalah oven, botol timbang, desikator, timbangan digital, *crushable tank*, loyang, nampan, mortar dan alu, labu Kjeldahl, gelas ukur, corong, tablet Kjeldahl, labu destilasi, erlenmeyer, pipet tetes, *sample tube*, *goldfisch*, cawan petri, gelas piala, kuvet, pipet volume, bola hisap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan porselen, timbangan analitik, *hot plate*, dan *muffle*. Kemudian peralatan yang dibutuhkan untuk analisis daya buih, emulsi, dan pH antara lain kuvet, pH meter, sentrifuse, dan rak tabung reaksi. Peralatan yang digunakan untuk analisis total asam amino adalah *waterbath*, *stirer*, pipet volume, bola hisap, mikro pipet, *blender*, *beaker glass*, timbangan digital, sendok, oven, sentrifuse, suhu ruang, *falcon*, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), dan *vortex mixer*.

## 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan suatu penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel yang lain dalam kondisi yang terkontrol secara ketat (Riduwan, 2009). Metode eksperimen pada penelitian ini dilakukan untuk mencapai tujuan yang utama yakni mengetahui pengaruh

perbedaan penambahan kadar molase rebus 100 mL, 200 mL, 300 mL, dan 400 mL (v/v) pada proses pembuatan hidrolisat protein kerang hijau.

Penelitian ini terdiri dan beberapa tahapan, diantaranya yaitu:

- I. Pendahuluan yang meliputi pengkulturan khamir laut dan perhitungan kepadatan sel khamir laut.
- II. Pembuatan hidrolisat protein dengan penambahan molase dengan konsentrasi (100 mL, 200 mL, 300 mL, dan 400 mL) dan lama fermentasi yang berbeda yang kemudian dilanjutkan dengan analisis proksimat, analisis kadar asam amino, analisis *foaming*, analisis pH, dan analisis emulsi.

## 3.3 Variabel Penelitian

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. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan. Variabel terikat yaitu variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas (Hartanto, 2003).

Variabel bebas dari penelitian ini adalah pengaruh variasi konsentrasi molase rebus yang ditambahkan dalam proses pembuatan hidrolisat protein kerang hijau dengan konsentrasi molase rebus masing-masing 100 mL, 200 mL, 300 mL, dan 400 mL dan lama fermentasi yang berbeda (3, 6, 9 dan 12 hari).

Variabel terikat meliputi sifat kimia dari hidrolisat protein kerang hijau yaitu kadar air, kadar lemak, kadar protein, kadar karbohidrat, kadar abu, pH, emulsi, foaming, dan kadar total asam amino.

# 3.4 Rancangan Percobaan

Rancangan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor yaitu volume molase rebus yang terdiri dari 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL dan lama fermentasi pada hari ke-0 (kontrol), hari ke-3, hari ke-6, hari ke-9, dan hari ke-12. Model rancangan percobaan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Rancangan Data Pengamatan Hidrolisat Protein Kerang Hijau dengan Penambahan Molase Rebus dan Lama Fermentasi yang Berbeda

Perlakuan		Ulangan				
Lama Fermentasi (hari)	volume molase rebus (mL)	ı	II	Ш	Total	Rerata
0	100 mL					
	200 mL		<b>P</b>			
	300 mL	1 4	$\sim$			
	400 mL		$\supset$	5	3	
3	100 mL					
	200 mL		1			
	300 mL			1		
	400 mL			5J		
6	100 mL	39				
	200 mL	197	U,			
	300 mL					
	400 mL	MI				
9	100 mL					
	200 mL	ШΛ	14/2			
	300 mL	<i>y</i> 7	JU			
	400 mL					
12	100 mL					
	200 mL					
	300 mL					
	400 mL					

Data yang diperoleh akan dilakukan analisa dengan menggunakan ANOVA (Analysis of Variance) menggunakan uji F dengan membandingkan antara F hitung dengan F tabel.

- Jika F hitung < F tabel 5%,maka perlakuan tidak berbeda nyata.</li>
- Jka 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.

Apabila dari hasil perhitungan didapatkan pebedaan yang nyata (F hitung > F tabel 5%) maka dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan yang terbaik.

## 3.5 Prosedur Penelitian

## 3.5.1 Kultur Khamir Laut

Prosedur pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dilakukannya pengkulturan khamir laut.

Adapun prosedur kultur khamir laut adalah sebagai berikut:

- Bahan berupa air laut 1000 mL, gula 5 g, pupuk daun 2 g, dan stok khamir laut (sebagai starter) disiapkan sebanyak 2 mL.
- Air laut dipanaskan sampai mendidih kemudian didinginkan pada suhu kamar.
- Air laut yang sudah direbus kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca yang sebelumnya sudah disterilkan dengan air mendidih.

- Ditambahkan gula pasir 0,5% (b/v) dan pupuk 0,2% (b/v) lalu dihomogenkan sehingga diperoleh media khamir laut masing-masing botol kaca berisi 990 mL.
- Media kultur khamir laut tersebut ditambahkan starter khamir laut sebanyak 10 mL.
- Selang aerasi yang sudah disterilkan dengan perebusan dalam air mendidih, dimasukkan ke dalam botol kaca tempat kultur khamir laut untuk mengalirkan udara sebagai suplai oksigen.
- Pada permukaan botol kaca ditutup kapas dan plastik *wrap* untuk menghindari kontaminasi yang tidak diinginkan. Selanjutnya kultur khamir laut tersebut diberi aerasi dengan menggunakan aerator.
- Aerasi dilakukan selama 72 jam untuk dilakukan pengamatan kepadatan dan kekeruhan sel khamir laut setiap 12 jam sekali.
- Didapatkan stok khamir laut baru *mix*.

# 3.5.2 Perhitungan Kepadatan Sel Khamir Laut (Sukoso, 2012)

Prosedur perhitungan kepadatan sel khamir laut dilakukan secara langsung menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan dilakukan pengenceran sampai 10<sup>-4</sup> agar kepadatan sel dapat mudah dihitung. Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut:

- Air laut dipanaskan sampai mendidih, agar mikroorganisme kontaminan mati
- Dibuat media pengenceran dengan menggunakan air laut yang sudah steril tersebut sebanyak 50 mL kemudian ditambahkan gula pasir 0,5% (b/v) dan pupuk sebanyak 0,2% (b/v).

- Media pengenceran tersebut dimasukkan ke dalam empat tabung reaksi masing-masing yang berisi sebanyak 9 mL untuk digunakan sebagai media pengenceran 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-4</sup>.
- Biakan khamir laut diambil sebanyak 1 mL. Pengambilan cuplikan tersebut dilakukan setiap 12 jam, yakni mulai jam ke-0 sampai jam ke-72.
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10<sup>-1</sup> yang sudah berisi media pengenceran dan dilakukan pengenceran sampai 10<sup>-4</sup>. Pada setiap pengenceran dihomogenkan degan menggunakan *vortex mixer*.
- Dihitung kepadatan sel khamir laut pada pengenceran 10<sup>-4</sup> di bawah mikroskop dengan menggunakan alat *haemocytometer*.
- Dalam menghitung kepadatan sel dibantu dengan alat hand tally counter.
   Adapun prosedur kerja perhitungan kepadatan sel dengan alat haemocytometer adalah sebagai berikut:
  - Dibersihkan *haemocytometer* dengan alkohol 70% lalu dikeringkan dengan tissue.
  - Diletakkan cover glass di atas alat hitung.
  - Ditambahkan 1 tetes khamir laut dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung.
  - Dibiarkan sejenak sehingga sel diam di tempat.
  - Diletakkan alat hitung pada meja benda kemudian cari fokusnya pada perbesaran 400 x
  - Dilakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jka dalam satu kotak kecil terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk makan perhitungan akan tidak akurat dan diperlukan pengenceran dengan perbandingan 1:5 atau 1:10.

- Dihitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran.
- Rumus perhitungan kotak pada *Haemocytometer* sebagai berikut:

Jumlah sel/mL = rata-rata jumlah bakteri setiap kotak  $x \frac{1}{4} x 10^6 x$  faktor pengenceran

# 3.5.3 Pembuatan Hidrolisat Protein Kerang Hijau

Penentuan volume molase yang optimal untuk ditambahkan pada proses pembuatan hidrolisat protein kerang hijau, prosedur kerja pertama yang dilakukan yaitu membuat substrat dari kerang hijau. Penggunaan berat daging kerang hijau yang digunakan pada penelitian pendahuluan ini mengacu pada penelitian terdahulu Faharudin (2002) pada ikan peperek yaitu dengan menggunakan substrat berupa daging peperek yang halus sebanyak 100 gram dengan volume optimal molase yang ditambahkan yaitu 30 mL dan volume optimal khamir laut yaitu 30 mL. Pada penelitian ini volume molase yang ditambahkan ada empat perlakuan yaitu 100 mL, 200 mL, 300 mL, dan 400 mL. sedangkan untuk volume khamir laut yang ditambahkan yaitu 20 mL.

Prosedur pembuatan hidrolisat protein kerang hijau adalah:

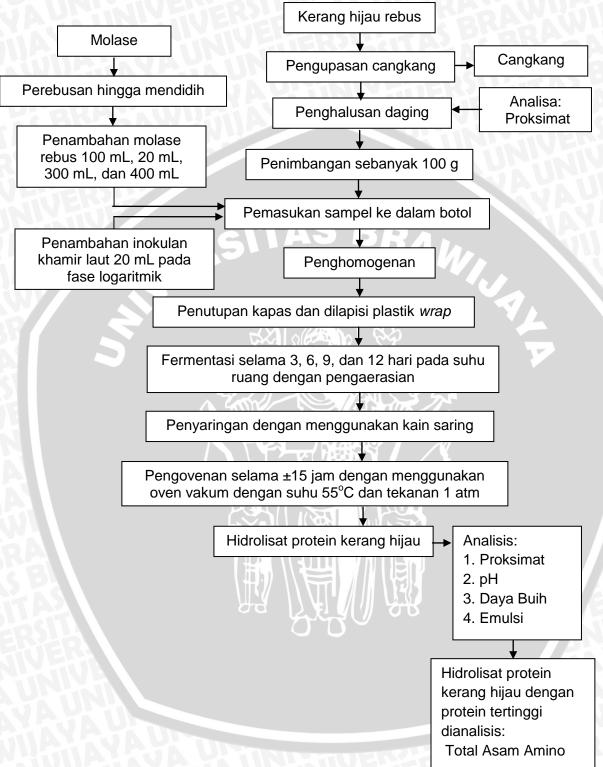
- Kerang hijau dipisahkan dari cangkangnya, dicuci dari kotoran dan lendir kemudian direbus
- Daging kerang hijau yang telah direbus dihaluskan dan ditimbang sebanyak
   100 g untuk masing-masing perlakuan.
- Daging kerang hijau yang telah halus kemudian ditambahkan dengan molase rebus sesuai dengan perlakuan 100 mL, 200 mL, 300 mL, dan 400 mL.
- Daging kerang hijau yang telah ditambahkan molase sesuai perlakuan 100 mL, 200 mL, 300 mL, dan 400 mL setelah itu ditambahkan 20 mL inokulan

BRAWIIAYA

khamir laut, kemudian ditutup dengan plastik *wrap* dan difermentasi selama 12 hari pada suhu ruang (±27°C).

Pemilihan waktu inkubasi dan suhu pada penelitian pendahuluan, mengacu pada waktu dan suhu optimal pada penelitian Faharudin (2002) dengan menggunakan khamir laut jenis mix untuk menghidrolisis protein ikan peperek. Skema kerja pembuatan hidrolisat protein dapat dilihat pada Gambar 2.





Gambar 2. Skema Kerja Pembuatan Hidrolisat Protein Kerang Hijau

## 3.5.4 Prosedur Analisis Proksimat

## 3.5.4.1 Kadar Air

Analisis kadar air pada hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus dilakukan dengan menggunakan metode *Thermogravimetri*. Prinsipnya menguapkan air yang ada dalam bahan dengan jalan pemanasan. Kemudian menimbang bahan sampai berat konstan yang berarti semua air sudah diuapkan. Bahan yang telah mengalami pengeringan lebih bersifat higroskopis. Oleh karena itu selama pendinginan sebelum penimbangan, bahan harus ditempatkan dalam ruang tertutup yang kering misalnya dalam desikator yang telah berisi zat penyerap air seperti silika gel (Sudarmadji *et al.*, 1989).

Prosedur kerja analisis kadar air menurut Sudarmadji *et al.*, (1997) adalah sebagai berikut:

- Botol timbang yang bersih dengan tutup setengah terbuka dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam.
- Botol timbang dikeluarkan dari dalam oven dan segera ditutup kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
- Ditimbang botol timbang dalam keadaan kosong.
- Ditimbang sampel sebanyak 1 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya.
- Dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3-5 jam tergantung bahannya. Kemudian dinginkan dalam desikator dan ditimbang. Perlakuan diulang sampai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg).

- Pengurangan berat merupakan banyaknya air dalam bahan.
- Rumus perhitungan kadar air dalam bahan pangan sebagai berikut:

Kadar Air=
$$\frac{b-(c-a)}{(c-a)}$$
x 100%

Dimana: a = berat botol timbang kering setelah di oven (g)

b = berat sampel awal (g)

c = berat botol timbang dan sampel setelah di oven (g)

## 3.5.4.2 Kadar Protein

Analisa kadar protein pada hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus menggunakan metode kjeldahl. Prinsipnya yaitu dengan menentukan jumlah nitrogen (N) total yang terkandung dalam suatu bahan pangan. Penentuan protein berdasarkan jumlah N menunjukkan protein kasar (crude protein) karena selain protein juga terikut senyawa N bukan protein misalnya urea, asam nukleat, amoniak, nitrat, nitrit, amida, purin dan pirimidin. Analisa kadar protein dengan cara penentuan jumlah N total ini dilakukan untuk mewakili jumlah protein yang ada. Analisa kadar protein dengan metode Kjeldahl terdiri dari tiga tahap yaitu, destruksi, destilasi, dan titrasi (Sudarmadji *et al.*, 1989).

Prosedur analisis kadar protein menurut Sudarmadji *et al.*, (1989) adalah sebagai berikut:

- Dihaluskan dan ditimbang sampel sebanyak 1 g.
- Sampel dimasukkan labu Kjeldahl dan ditambahkan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat di dalam ruang asam.
- Ditambahkan tablet Kjeldahl sebagai katalisator.
- Campuran bahan didestruksi dan didinginkan. Hasil destruksi dimasukkan ke dalam labu destilasi.

- Ditambahkan aquades, 3 tetes indikator PP dan 75 mL NaOH pekat untuk selanjutnya didestilasi.
- Destilat ditampung sebanyak 100 mL dalam erlenmeyer yang berisi 25 mL larutan H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> dari tetes indikator MO (*Metyl Orange*).
- Dititrasi larutan yang diperoleh dengan 0,02 N HCl sampai berwarna merah muda.
- Rumus perhitungan kadar protein sebagai berikut:

%N= 
$$\frac{\text{mL HCL (sampel-blanko)N HCl x 14,008}}{\text{Berat sampel (g) x 1000}} \times 100\%$$

% Protein = % N x faktor konversi

# 3.5.4.3 Kadar Lemak

Analisis kadar lemak pada hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus dengan menggunakan metode *Goldfisch*. Menurut Sudarmadji *et* al., (1989), bahan sampel yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam thimble dan dipasang dalam tabung penyangga yang pada bagian bawahnya berlubang. Bahan pelarut yang digunakan ditempatkan dalam beakerglas di bawah tabung penyangga. Bila beakerglas dipanaskan uap pelarut akan naik dan didinginkan oleh kondensor sehingga akan mengembun dan menetes pada sampel demikian terus-menerus sehingga bahan akan dibahasi oleh pelarut dan lipida akan terekstraksi dan selanjutnya akan tertampung ke dalam beakerglass kembali. Setelah ekstraksi selesai (3-4 jam), pemanas dimatikan dan sampel berikut penyangganya diambil dan diganti dengan beakerglas yang ukurannya sama dengan tabung penyangga. Pemanas dihidupkan kembali sehingga pelarut akan diuapkan lagi dan diembunkan serta tertampung ke dalam beakerglas yang

terpasang di bagian bawah kondensor. Dengan demikian pelarut yang tertampung ini dapat dimanfaatkan untuk ekstraksi yang lain. Residu yang ada dalam bekerglas yang dipasang pada pemanas selanjutnya dikeringkan dalam oven 100°C sampai berat konstan. Berat residu ini dinyatakan sebagai minyak atau lemak yang ada dalam bahan. Seperti halnya cara menimbang residu dalam thimble sesudah ekstraksi berakhir dan sudah dikeringkan sampai berat konstan. Selisih bobot sampel sebelum dan bobot residu sesduah ekstraksi dan sudah dikeringkan merupakan lemak yang ada dalam bahan. Keuntungan cara ekstraksi *Goldfisch* adalah pelarut yang sudah dipakai dapat diperoleh kembali.

Prosedur kerja analisis kadar lemak pada hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus adalah sebagai berikut:

- Bahan ditimbang sebanyak 5 g kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama semalam untuk mendapatkan sampel kering.
- Dimasukkan kertas saring bersamaan dengan sampel selama semalam.
- Dimasukkan kertas saring ke dalam desikator selama 15 menit dan sampel ditumbuk halus dan ditimbang sebanyak 2 g.
- Ditimbang berat kertas saring dengan menggunakan timbangan analitik.
- Dibungkus sampel dengan kertas saring lalu dimasukkan sampel tube *Goldfisch* dan dipasang di bawah kondensor *Goldfisch*.
- Dipasang gelas piala yang telah diisi petroleum eter dan dikunci.
- Dialirkan air pada kondensor dan naikan pemanas *Goldfisch* sampai menyentuh gelas piala dan biarkan selama 3-4 jam.
- Dimatikan pemanas setelah selesai dan ditunggu dingin lalu sampel dimasukkan ke dalam oven suhu 105°C sampel berat konstan lalu dimasukkan dalam desikator selama 15 menit.

- Dihitung kadar lemak dengan rumus:

% Kadar Lemak= 
$$\frac{(a+b)-c}{a}$$
 x 100%

dimana: a = berat awal (g)

b = berat kertas saring (g)

c = berat akhir (g)

## 3.5.4.4 Kadar Abu

Analisis kadar abu pada hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus dengan menggunakan metode langsung (cara kerja). Prinsip kerja dari penentuan kadar abu adalah membakar bahan dalam tanur atau tungku (tumace) dengan suhu sekitar 500-600°C selama waktu tertentu (6-8 jam) sehingga seluruh unsur utama pembentukan senyawa organik (C, H, O, N) habis terbakar dan berubah menjadi gas dan sisanya adalah abu yang merupakan kumpulan dari mineral-mineral (Sudarmadji et al., 1997).

Prosedur kerja analisis kadar abu pada hidrolisat protein kerang hijau dengan penambahan molase rebus menurut Sudarmadji *et al.*, (1997), adalah sebagai berikut:

- Kurs porselen bersih dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C selama semalam
- Kurs porselen dimasukkan desikator selama 15-30 menit kemudian ditimbang
- Sampel ditimbang sebanyak 2 g
- Sampel dimasukkan dalam kurs proselen dan diabukan dalam *muffle* bersuhu 650°C sampai seluruh bahan terabukan (abu berwarna keputih-putihan).
- Dimasukkan kurs porselen dan abu ke dalam desikator dan ditimbang berat abu setelah dingin.

- Rumus perhitungan kadar abu dalam bahan pangan sebagai berikut:

# 3.5.4.5 Kadar Karbohidrat (Andarwulan et al., 2011)

Analisis karbohidrat pada hidrolisat protein kerang hijau dengan penambahan molase rebus dilakukan secara *Carbohydrate by difference*, yaitu hasil pengurangan dari 100% dengan kadar air, kadar abu, kadar lemak, dan kadar protein sehingga kadar karbohidrat tergantung pada faktor pengurangannya. Hal ini karena karbohidrat sangat berpengaruh terhadap gizi lainnya. Perhitungan *Carbohydrate by difference* adalah penentuan karbohidrat dalam bahan pangan secara kasar.

% kadar karbohidrat = 100% - ( % kadar protein + % kadar air + % kadar lemak + %

% kadar karbohidrat = 100% - ( % kadar protein + % kadar air + % kadar lemak + % kadar abu)

# 3.5.5 Prosedur Analisis pH

Prosedur analsis pH yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Elektroda dibilas dengan menggunakan akuades
- Celupkan elektroda ke dalam *sample* uji sampai pH meter menunjukkan angka pembacaan yang tetap
- Catat hasil yang tertera pada tampilan pH meter.

## 3.5.6 Prosedur Analisis Emulsi

Prosedur pengujian emulsi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Sampel ditimbang sebanyak 1,25 g
- Sampel dimasukkan ke dalam kuvet kemudian ditambahkan 5 mL aquades dan 5 mL minyak jagung.
- Dihomogenkan dengan cara dikocok selama 1 menit.
- Disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 3750 rpm.
- Kapasitas emulsi dihitung menggunakan rumus

## 3.5.7 Prosedur Analisis Daya Buih

Prosedur pengujin daya bih pada peneltian ini adalah sebagai berikut:

- Sampel ditimbang sebanyak 1 g.
- Dimasukkan sampel ke dalam kuvet dan ditambahkan 10 mL aquades.
- Diukur tinggi awal pada kuvet yang berisi sampel dan aquades
- Dihomogenkan dengan cara dikocok selama 1 menit
- Diukur kembali tinggi buih yang terbentuk pada kuvet.
- Dihitung kapasitas busa menggunakan rumus

## 3.5.8 Prosedur Analisis Total Asam Amino

Analisis kandungan asam amino pada hidrolisat protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus dilakukan dengan menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Prinsip analisa asam amino dengan metode HLPC yaitu hidrolisa protein pada sampel. Untuk mengetahui jenis dan jumlah asam amino penyusun protein maka protein diisolasi dan bahan kemudian

dihidrolisa. Hidrolisa protein dapat menggunakan asam atau alkali atau dengan performat. Hidrolisat diinjeksikan pada HPLC dengan kolom penukar kation spherogel amino acid 40% 250 mm. Agar dapat diketahui jenis dan jumlah asam aminonya maka diinjeksikan pula standar asam amino yang telah diketahui jenis dan jumlahnya (Sudarmadji *et al.*, 1997).

Prosedur kerja analisis kandungan asam amino pada hidrolisa protein kerang hijau rebus dengan penambahan molase rebus menggunakan metode HLPC (*High Performance Liquid Performance*) menurut Sudarmadji *et al.*, (1997) adalah sebagai berikut:

- Ditimbang bahan sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer bertutup basah.
- Ditambahkan 50 mL petroleum eter dan diaduk dengan pengaduk magnet selama
   5 menit untuk mengekstraksi lipidanya.
- Disaring dengan kertas saring whatmann no.41 dan dicuci residunya dengan petroleum ether 10 mL filtratnya dituang.
- Residu diekstraksi dengan 25 mL daram encer (NaCl 5%) dalam erlenmeyer,
   diaduk dengan pengaduk magnetik selama 10 menit. Lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm.
- Dipisahkan beningnya dan residu diekstraksi 3 kali dengan garam encer seperti di atas. Lalau beningannya dikumpulkan dan ditambahkan aquades sehingga volumenya 100 mL.
- Diambil 10 mL beningan dan tambahkan 60 mL larutan TCA 10% dalam erlenmeyer dan diaduk dengan pengaduk magnet ± 1 mwnit sampel endapan protein terbentuk.
- Sentrifugasi campuran di atas selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan endapan (protein).

- Dekantasi beningnya dan dibuan lalu residunya dikeringkan dengan ditiupkan gas nitrogen.
- Hidrolisis dengan asam klorida
- Ditimbang 50 mg protein, masukkan ke dalam tabung reaksi yang tertutup ulir (dengan volume 10-15 mL), tambahkan 4 mL HCl 6N.
- Dialirkan gas nitrogen selama 1 menit ke dalam menghilangkan udara dalam tabung tersebut, kemudian tutup rapat-rapat.
- Dipanaskan campuran di atas dalam oven selama 24 jam pada temperatur
   110°C.
- Setelah dingin, dibuka tutup tabung reaksi tersebut, tuangkan isinya ke dalam botol alas bulat 50 mL. Cuci tabung reaksi bekasnya beberapa kali dengan larutan HCl 0,01 N.
- Uapkan semua campuran di atas dalam "rotary evaporator" sampai kering dengan temperatur pemanas sekitar 40°C, tambahkan 2 mL NaOH 0,01 N, biarkan dalam keadaan terbuka pada temperatur kamar selama sekitar 4 jam, tambahkan 6 mL HCl 0,02 N, kemudian encerkan larutan ini dengan eluen HPLC yang mempunyai pH paling rendah sehingga volumenya menjadi 25 mL.
- Penentuan dengan HPLC
- Cuplikan diambil dengan mikrosiring sebanyak 20µl dan diinjeksikan ke dalam alat HPLC yang telah disiapkan.
- Kromatogram sampel yang keluar dapat dikonsultasikan dengan kromatogram standar asam amino yang telah diketahui jenis dan kadarnya.
- Standar diinjeksikan sebelum dan setelah 3-4 kali injeksi sampel.

NIVERSITAS D A LATTAVA

- Untuk mengetahui jenis asam amino dapat dengan membandingkan waktu retensinya dengan standar. Sedangkan untuk mengetahui banyaknya asam amino dapat membandingkan antara luasan puncak sampel dengan standar.
- Jika diperoleh kromatogram sampel sangat berbeda jauh dengan luasan standar maka dapat mengubah banyaknya cairan sampel yang diinjeksikan.

