

3. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2015 bertempat di Pusat Inovasi (Pusinov) Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibonong, Bogor. Uji ukuran partikel di Balai Inkubator Teknologi BPPT, Puspitek, Serpong, Tangerang. Uji *bulk desity*, kapasitas dan stabilitas buih dan emulsi di Pusat Inovasi (Pusinov) Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibonong, Bogor. Uji kadar air, kadar protein, kelarutan dan bilangan peroksida di Laboratorium Balai Besar Industri Agro Kementrian Pertanian.

1.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan tepung ikan adalah beaker glass, *juice residue separator*, *water bath*, beaker glass ukuran 1L, pH meter, kain blacu, pipet, oven, ayakan ukuran 200 mesh. Alat yang digunakan untuk penggilingan tepung ikan adalah *Fomac Miller FCT-Z500*. Alat yang digunakan untuk uji partikel nano adalah *Particle Size Analyzer* (PSA Delsa Nano C Beckman Coulter), dan untuk mengukur derajat warna adalah alat *BYK Gardner*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan tepung ikan adalah ikan rucah segar yang berasal dari Tempat Pelelangan Ikan Muara Angke, Jakarta Utara. Aquades, NaOH dan es.

1.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Eksperimen dilakukan dengan perbedaan waktu penggilingan yaitu 0 menit (M0); 5 menit (M5); 10 menit (M10); dan 15 menit (M15), dengan 3 kali ulangan. Metode eksperimen ini dilakukan dengan membagi perlakuan menjadi 3 level waktu penggilingan untuk membuktikan hipotesa dengan adanya eksperimen kontrol sebagai pembanding.

3.3.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Perlakuan yang diterapkan berupa perbedaan lama penggilingan yaitu 0 menit (M0) (sebagai kontrol); 5 menit (M5); 10 menit (M10); dan 15 menit (M15). Dan tiap perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 3 kali.

Berdasarkan perlakuan yang diterapkan maka penelitian ini dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan metode analisa yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

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

Dimana:

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

μ = Nilai rata-rata tengah umum

M_i = Pengaruh perlakuan ke-5 menit (M1); 10 menit (M2); dan 15 menit (M3)

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

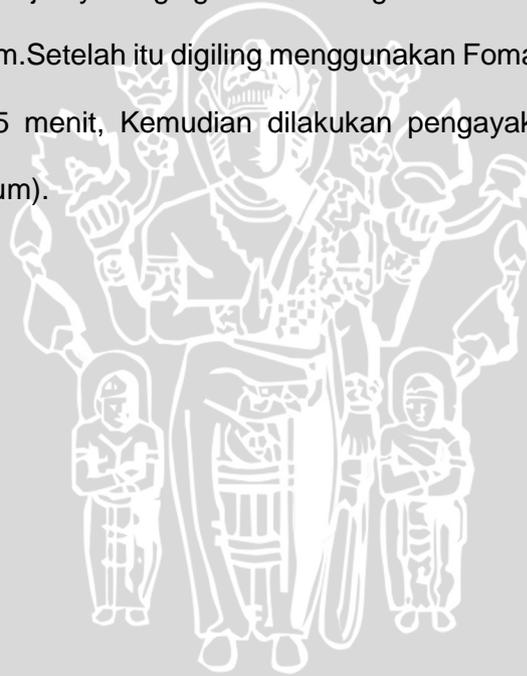
j = Ulangan

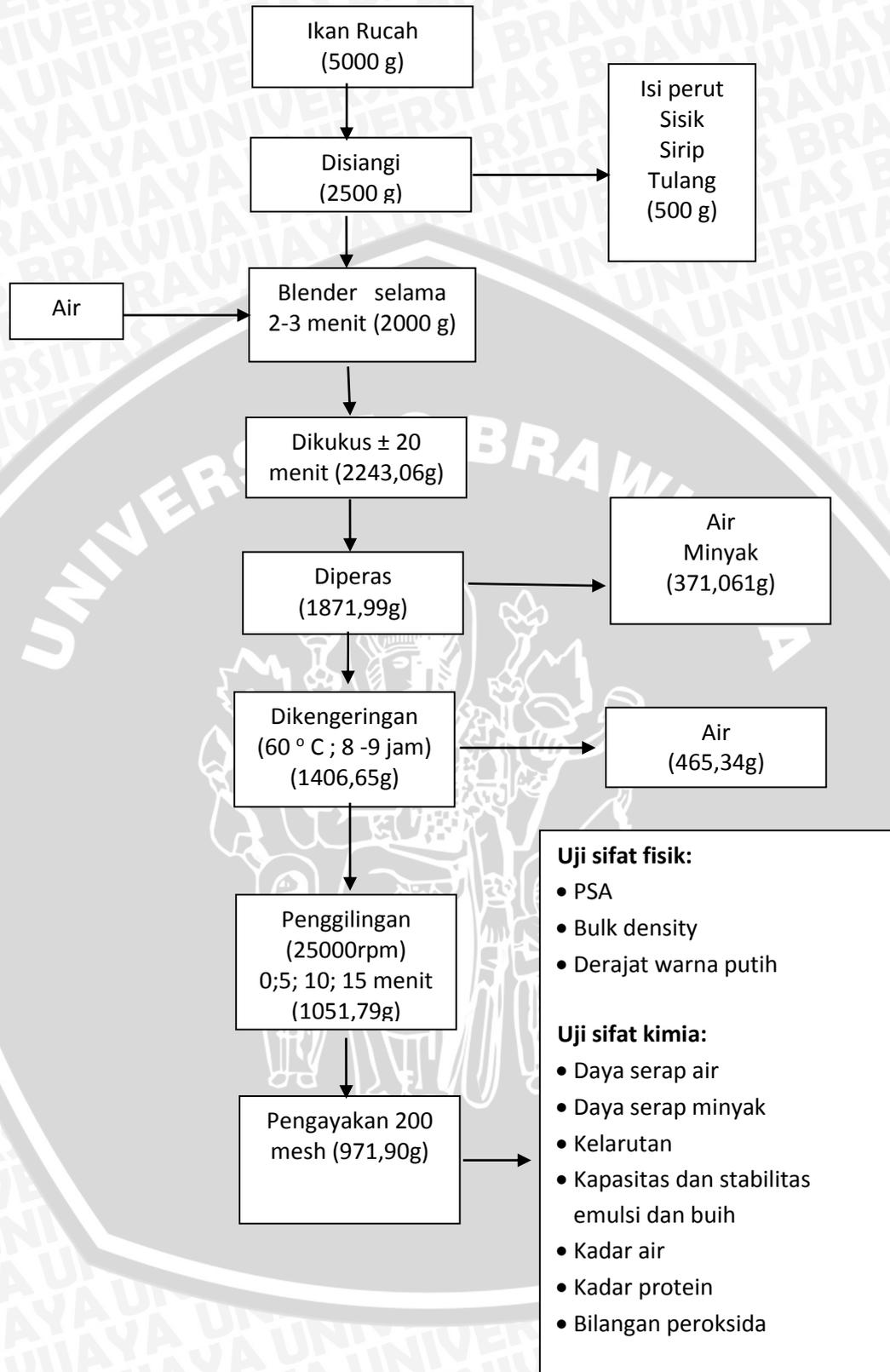
i = Perlakuan

3.3.2 Prosedur Penelitian

3.3.2.1 Pembuatan Tepung Ikan

Pembuatan tepung ikan menggunakan metode (Umar, 2013) dengan modifikasi. Tahapan proses pembuatan tepung ikan yaitu pembersihan ikan dari sisik, sirip, seluruh isi perut dan tulang. Kemudian dicuci bersih dengan perbandingan air 1:5, sebanyak kurang lebih 3 kali sampai bersih lalu daging ikan dicacah dan diblender selama 2-3 menit. Daging ikan yang telah halus ini kemudian dikukus selama ± 20 menit, kemudian didinginkan. Hasil kukusan ini kemudian diperas menggunakan kain blacu, untuk menghilangkan air dan minyak dari ikan tersebut. Selanjutnya daging ikan dikeringkan dalam oven, pada suhu 60°C selama $\pm 8 - 9$ jam. Setelah itu digiling menggunakan Fomac Miller FCT-Z500 selama 5, 10, dan 15 menit, Kemudian dilakukan pengayakan menggunakan ayakan 200 mesh ($74\mu\text{m}$).





Gambar 1. Skema kerja pembuatan tepung ikan rucah

3.3.3 Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati berupa sifat fisik tepung ikan yaitu ukuran partikel tepung menggunakan metode *Particle Size Analyzer* (PSA), bulk density (Okezie dan Bello, 1988), danderajat warna putih (Hutching, 1999).Kemudian dilakukan uji sifat kimia yaitu analisis uji kelarutan (Satheet *al.*, 1982), daya serap air(Eilly, 1990), daya serap minyak(Beuchat, 1977), analisis kapasitas dan stabilitas emulsi (Franzen dan Kinsella, 1976), analisis kapasitas dan stabilitas buih (Widowati *et al.*, 1988), bilangan peroksida, kadar air dan kadar protein.Setelah itu pemilihan perlakuan terbaik dengan metode De Garmo.

3.3.4 Prosedur Analisis Parameter

3.3.4.1 Metode Uji *Particle Size Analyzer* (PSA)

Pengamatan partikel tepung ikan menggunakan Delsa nano buatan Beckman Coulter untuk melihat ukuran partikel tepung ikan. Sempel berbentuk serbukdilarutkan kedalam pelarutnya agar larutan tersebut homogen. Pelarut yang digunakan agar sampel partikel tepung ikan dapat terdispersi adalah aquades. Setelah itu diaduk dengan menggunakan sonikator dan dimasukkan ke dalam tabung pada perangkat Delsa Nano atau kufet tipe Delsa™ Nano Merk Beckman Counter, kemudian disinari dengan laser diode pada suhu 25°C, hasil pengukuran akan keluar secara otomatis dalam bentuk *print out*.

Ukuran partikel dan distribusinya dapat ditentukan dengan metode hamburan cahaya dinamis.Dalam metode tersebut fluktuasi waktu pada saat posisi partikel yang berubah tiap waktu karena pergerakan, dengan hamburan cahaya dari partikel tersebut dapat diukur.Partikel bergerak acak sehingga fluktuasi acak dengan hamburan cahaya dapat dianalisis menggunakan fungsi autokorelasi.Untuk partikel yang berukuran kecil dengan gerak yang cepat dan

intensitas fluktuasi yang cepat, maka fungsi autokorelasi adalah fungsi eksponensial peluruhan yang cepat dengan besar inti peluruhan yang konstan (Beckman, 2008). Sehingga diketahui difersitas partikel tersebut.

3.3.4.2 Bulk density

Pengukuran *bulk density* dilakukan mengacu pada metode Okezie dan Bello (1988). Sampel dimasukkan ke dalam sebuah gelas ukur 10 ml yang telah diketahui beratnya. Gelas ukur yang telah berisi sampel diketuk-ketukkan ke meja > 30 kali hingga tak ada lagi rongga ketika sampel ditepatkan menjadi 10 ml. gelas ukur yang berisi sampel tersebut kemudian ditimbang. *bulk density*(g/ml) dapat dihitung dari hasil pembagian berat sampel dengan volumenya (10ml). Pengukuran densitas kamba dilakukan dua kali ulangan.

3.3.4.3 Analisis Derajat Warna Putih

Analisis derajat warna putih menggunakan metode modifikasi Hutching (1999) menggunakan Chomameter CR-200 Minolta. Pengukuran dilakukan dengan meletakkan sampel di dalam wadah sampel yang sudah tersedia dan selanjutnya dilakukan pengukuran pada skala nilai L, a, b. Nilai L menyatakan parameter kecerahan yang mempunyai nilai dari 0 (hitam) sampai 100 (putih). Nilai a menyatakan cahaya pantul yang menghasilkan warna kromatik campuran merah-hijau dengan nilai +a (positif) dari 0 – 100 untuk warna merah dan nilai –a (negative) dari 0 – (-80) untuk warna hijau. Notasi b menyatakan warna kromatik campuran biru kuning dengan nilai +b (positif) dari 0 – 70 untuk kuning dan nilai – b (negative) dari 0 – (-70) untuk warna biru. Selanjutnya dihitung nilai derajat putih dengan standar derajat putih yang digunakan yaitu BaSO₄ melalui persamaan:

$$\text{Derajat putih } (X) = 100 \sqrt{(100 L)^2 + (a^2 + b^2)}$$

$$\text{Derajat putih (\%)} = \frac{x}{110,8} 100\%$$

3.3.4.4 Kadar Air

Cara penentuan kadar air adalah sebagai berikut; cawan porselin beserta tutup dikeringkan dalam oven selama 15 menit, kemudian didinginkan selama 20 menit dalam desikator, setelah dingin, beratnya ditimbang. Sampel sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam cawan dan ditutup; disimpan dalam oven selama 6 jam pada suhu 100°C sampai 102°C. Selanjutnya cawan beserta tutupnya dipindahkan ke dalam desikator dan setelah dingin ditimbang kembali. Pengeringan diulang lagi sehingga diperoleh berat cawan beserta tutupnya yang konstan. Perhitungan kadar air sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air \% (Basis Basah)} = \frac{(A - B)}{B} \times 100\%$$

Dimana : A = Berat awal bahan

B = Berat bahan setelah dikeringkan

3.3.4.5 Daya Serap Air

Bahan yang akan diukur sebanyak 1 g diletakan di atas kertas saring, ditambahkan air hangat (suhu 40 °C) sebanyak 10 g dan didiamkan selama 3 menit (Elly, 1990). Air yang keluar ditampung kemudian ditimbang. Daya serap air dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Daya serap air (\%)} = \frac{a - b}{c} \times 100\%$$

Keterangan :

A = berat air mula-mula(g)

B = berat air keluar (g)

3.3.4.6 Kadar Protein
C = berat sampel (g)

Larutan sampel hasil destruksi dipindahkan ke dalam labu takar 50mL dan diencerkan hingga tanda batas. Larutan dipipet sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam alat destilasi, lalu ditambah 10 mL NaOH 30 %. Campuran tersebut didestilasi dan evaluatnya ditampung dalam 10 mL H₃BO₃ 3% dan 2 tetes indikator tashiro. Destilasi dilakukan hingga diperoleh destilat sebanyak 75 mL. Selanjutnya destilat dititrasi dengan HCL 0,1 N sampai warna hijau berubah menjadi ungu. Kadar N total di dalam sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Protein} = \frac{10 \times \text{mL HCl} \times 14 \times 100\%}{\text{berat sampel}}$$

Keterangan:

10 = faktor pengenceran

mL HCl = Volume HCL yang dipakai untuk mentitrasi destilat

NHCl = Normalitas HCl yang digunakan

14 = BM nitrogen (g/mol)

3.3.4.7 Kelarutan

Kelarutan protein tepung ikan ditentukan berdasarkan metode yang dilaporkan oleh Sathe *et al* (1982). Sebanyak 10 mg sampel tepung bebas lemak dilarutkan ke dalam 10 ml air, lalu pH larutan diatur dari 1,0 – 12,0 dengan menggunakan NaOH 1,0 N dan HCl 1,0 N (untuk nilai pH dari 3,0 – 5,0 dilakukan pengukuran dengan interval pH 0,2). Lalu disentrifugasi untuk memisahkan supernatant yang kemudian dianalisis menggunakan metode Lowry. Pereaksi Lowry adalah campuran 50 ml NaOH 0,1 N yang mengandung 2% natrium karbonat dan 1 ml natrium tartarat yang mengandung CuSO₄ 5%.

3.3.4.8 Daya Serap Minyak

Daya serap lemak/minyak (Beuchat, 1977) sampel sebanyak 1 g dimasukkan kedalam tabung sentrifus lalu ditambahkan dengan 10 ml minyak nabati, kemudian diaduk dengan spatula dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu disentrifus pada 3.000 rpm selama 30 menit. Volume minyak yang bebas atau tidak terserap oleh sampel, diukur dengan gelas ukur. Rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Daya serap minyak } \left(\frac{g}{g}\right) = \left(\frac{g \text{ minyak awal} - \text{akhir}}{g \text{ sampel}}\right)$$

3.3.4.9 Kapasitas dan Stabilitas Emulsi

Pengukuran kapasitas emulsi dilakukan dengan mencampur sebanyak 0,5 g sampel dan 25 ml air. Sampel diatur pHnya hingga 8 sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 5 menit. Sebanyak 25 ml larutan sampel ditambahkan 25 ml minyak kedelai. Campuran didispersikan dengan blender selama 1 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 300 rpm selama 10 menit (modifikasi Franzen dan Kinsella, 1976). Volume emulsi dapat diukur dengan persamaan:

$$\text{kapasitas emulsi } (\%) = \frac{V_{ct}}{V_{tot.t}} \times 100\%$$

Keterangan:

V_{ct} = volume campuran teremulsi

V_{tott} = volume total dalam tabung

Untuk mengamati stabilitas emulsi selama waktu tertentu, emulsi yang sudah terbentuk disimpan selama beberapa lama pada suhu ruang. Volume emulsi diamati pada menit ke-10; 20; 30; 40; 50; 60. Kemudian dicatat dan dibuat kurva kestabilan emulsinya.

3.3.4.10 Kapasitas dan Stabilitas Buih

Sebanyak 2 g sampel dilarutkan dalam 100 ml akuades dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 1 menit. Larutan tersebut kemudian diatur pH hingga 8 dan dikocok dengan waring blender selama 2 menit (Widowati *et al.*, 1988). Dihitung volume buih sebelum dan sesudah dikocok, kemudian kapasitas buih dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{kapasitas buih (\%)} = \frac{V_{bsd}}{V_{alp}} \times 100\%$$

V_{alp} = volume awal larutan protein

V_{bsd} = volume buih sebelum dikocok

Uji terhadap kapasitas buih ini dilakukan sebanyak 2 kali ulangan. Selain itu juga diamati stabilitas buih pada menit ke-10; 20; 30; 40; 50; 60 dan dibuat kurva stabilitas buih terhadap waktu.

3.3.4.11 Bilangan Peroksida

Penentuan tingkat ketengikan dengan menghitung bilangan peroksida menggunakan metode Sudarmadji *et al* (1997). Ditimbang 5 g sampel dalam 250 ml erlenmeyer bertutup dan ditambahkan 30 ml larutan asam asetat-kloroform (3:2). Larutan digoyangkan sampai bahan terlarut semua. Ditambahkan 0,5 ml larutan jenuh KI dan didiamkan selama 1 menit, digoyangkan kemudian ditambahkan 30 ml aquades. Kemudian dititrasi dengan 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sampai warna kuning hampir hilang. Kemudian ditambah 0,5 ml larutan pati 1%. Lanjutkan titrasi sampai warna biru mulai hilang.

Angka peroksida dinyatakan dalam milligram oksigen dari peroksida dalam setiap 100 g contoh.

$$\text{Angka peroksida } \left(\frac{\text{mgO}_2}{100\text{mg}} \right) = \frac{(\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times N \text{ thio} \times 1000}{\text{berat sampel (g)}}$$

3.3.4.12 Prosedur Pemilihan Perlakuan Terbaik

Untuk menentukan perlakuan terbaik digunakan metode Indeks efektifitas De Garmo dengan metode prosedur pembobotan sebagai berikut:

- Mengelompokkan parameter.
- Diberikan bobot 0 – 1 pada setiap parameter pada masing-masing kelompok.

$$\text{Pembobotan} = \frac{\text{Nilai total setiap parameter}}{\text{total setiap parameter}}$$

Menghitung nilai efektifitas dengan rumus:

$$NE = \frac{N_p - N_{tj}}{N_{tb} - N_{tj}}$$

Keterangan: NE = Nilai efektifitas

N_p = Perlakuan

N_{tj} = Nilai terjelek

N_{tb} = Nilai terbaik

Untuk parameter dengan rerata semakin besar semakin baik maka nilai terendah sebagai nilai terjelek dan nilai tertinggi sebagai nilai terbaik. Sebaliknya untuk parameter dengan nilai terjelek dan nilai terendah sebagai nilai terbaik.

- Dihitung Nilai Produk (NP) yaitu perkalian NE dengan bobot nilai.
- Dijumlahkan nilai produk dari semua parameter pada tiap kelompok. kelompok yang mempunyai nilai produk tertinggi adalah perlakuan terbaik pada kelompok parameter.
- Kelompok terbaik dipilih dengan memilih perlakuan yang memiliki NP tertinggi.