

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi penelitian

##### 3.1.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* antara lain Rumput laut *Eucheuma spinosum* yang diperoleh dari Madura, air, kertas label. Bahan saat pembuatan kitosan antara lain kulit udang windu, NaOH 3,5%, HCL 1 N, NaOH 50 %, aquades, air, kertas lakmus, kain blacu dan kertas label. Bahan saat pembuatan tepung *Sargassum filipendula* adalah Rumput laut *Sargassum filipendula*, air dan kertas label. Bahan pembuatan *Edible film* antara lain tepung rumput laut *Eucheuma spinosum*, Kitosan, tepung *Sargassum filipendula*, asam asetat glasial, aquades, kertas label, tisu, air dan *plasticizer* gliserol.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam pembuatan tepung *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* adalah baskom, nampan, loyang, pisau, talenan, grinder dan ayakan 100 mesh. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan kitosan adalah beakerglass 1000 mL, spatula, *magnetic stirer*, blender, gelas ukur 100 mL, timbangan digital, *hot plate*, oven, loyang, nampan dan ayakan 100 mesh. sedangkan alat-alat yang digunakan dalam pembuatan *Edible film* adalah erlenmeyer 100 mL, spatula, *magnetic stirer*, nampan, plat plastik, oven, *hotplate*, timbangan digital dan gelas ukur 100 mL. Alat yang digunakan untuk pengujian proksimat adalah botol timbang dan tutup, oven, timbangan analitik, desikator, *crushable tank*, timbangan digital, nampan, talenan, pisau, mortal dan alu, loyang, gelas piala, cawan petri, *gold fish*, gelas ukur 100 mL, sample tube, gelas ukur 250 mL, cuvet, sentrifuge, pipet tetes,

tabung reaksi, waterbath, spektrofotometri, labu ukur, beaker glass 50 mL, kurs porselin, dan muffle.

### 3.2 Metode penelitian

#### 3.2.1 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Sugiyono (2012), penelitian eksperimen dapat diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendalikan. Serta ditambahkan oleh Margono (2005,) bahwa dalam melakukan eksperimen peneliti memanipulasikan suatu stimulan, treatment atau kondisi-kondisi *eksperimental*, kemudian menobservasi pengaruh yang diakibatkan oleh adanya perlakuan atau manipulasi tersebut.

#### 3.2.2 Variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variabel bebas berupa perbandingan komposisi bahan yang berbeda antara *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula* dan kitosan terhadap variabel terikat karakteristik kimia dan organoleptik *edible film* yaitu Protein, Lemak, Karbohidrat, Kadar air, Kadar abu, warna, rasa, bau dan tekstur.

### 3.3 Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan pertama dilakukan untuk mendapatkan bahan baku yang digunakan untuk pembuatan *edible film* pada penelitian utama. Penelitian pendahuluan pertama dilakukan dengan pembuatan kitosan dari limbah kulit udang windu, kemudian pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* kemudian masing-masing bahan dilakukan pengujian FTIR untuk mengetahui kompatibilitas bahan.

### 3.3.1 Prosedur penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan beberapa langkah sebagai berikut:

1. Pembuatan Tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula*

Pembuatan tepung rumput laut dilakukan berdasarkan pada penelitian Listyana (2014), yang telah dimodifikasi yaitu, pertama Rumput laut jenis *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* dicuci bersih. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran dengan menggunakan pisau, selanjutnya dilakukan pengeringan pada sinar matahari, lalu rumput laut kering digiling menggunakan grinder selanjutnya dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan 100 mesh dan didapatkan tepung rumput laut. Skema kerja pembuatan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada lampiran skema kerja pembuatan tepung rumput laut.

2. Pembuatan Kitosan

Pembuatan kitosan dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap pertama pembuatan kitin dan tahap kedua pembuatan kitosan. Pembuatan kitin dan kitosan dilakukan berdasarkan Ramadhan *et al.*, (2015) pembuatan kitosan dilakukan dalam tiga tahap yaitu demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi. Pertama cangkang udang dikeringkan kemudian dihaluskan dimasukkan ke dalam gelas beker dengan ditambahkan natrium hidroksida 3,5% dengan perbandingan 1:10 (w/v). Proses deproteinasi dilakukan selama  $\pm 2$  jam pada suhu  $65^{\circ}$  C dengan pengadukan *magnetic stirrer*. Kulit udang dicuci hingga pH netral. Setelah itu dikeringkan dalam oven pada suhu  $80^{\circ}$  C selama 2 jam. Dalam proses ini didapatkan crude kitin. Selanjutnya dilanjutkan tahap demineralisasi yaitu Crude kitin dimasukkan ke

dalam gelas beker kemudian ditambahkan larutan HCl 1N dengan perbandingan antara crude kitin dengan larutan HCl 1:15% (w/v). Pada proses ini dilakukan dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirer* selama 1 jam pada suhu 65°C. Setelah itu crude kitin dicuci hingga pH netral, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80° C selama 2 jam. Dalam proses ini akan menghasilkan kitin. Proses selanjutnya yaitu transformasi kitin menjadi kitosan, Proses ini dilakukan dengan cara memasukkan kitin ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan larutan NaOH 50 % dengan perbandingan kitin dan larutan NaOH 1 : 20 (w/v). Campuran direbus dengan suhu 120°C selama 30 menit dengan pengadukan dengan *magnetic stirer*. Setelah itu diperas dengan kain blacu, kemudian mencucinya hingga didapatkan pH netral. Langkah selanjutnya adalah dengan mengeringkan di dalam oven dengan pada suhu 65°C selama 24 jam, sehingga diperoleh kitosan. Kitosan yang diperoleh, kemudian ditimbang dan dicatat.

3. Pengujian FTIR dilakukan di laboratorium Sentral Mineral dan Material Maju Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang.

#### 3.4 Penelitian utama

Penelitian utama dilakukan untuk mendapatkan perbandingan formulasi bahan *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula* dan Kitosan dengan *Plasticizer* gliserol terhadap karakteristik kimia dan organoleptik *Edible film*. Selanjutnya dilakukan pembuatan *edible film* berbahan campuran *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula* dan kitosan dengan menggunakan 9 perbandingan yang berbeda. Jenis *plasticizer* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gliserol dengan menggunakan konsentrasi 1% (v/v).

Pembuatan *edible film* pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 9 perlakuan dengan 3 kali ulangan yang didapatkan dari perhitungan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 (n-1)(r-1) &\geq 15 \\
 (9-1)(r-1) &\geq 15 \\
 8(r-1) &\geq 15 \\
 8r - 8 &\geq 15 \\
 8r &\geq 15 + 8 \\
 R &\geq 23/8 \\
 r &\geq 2,875 \text{ ulangan} = \text{dibulatkan keatas, jadi 3 kali ulangan}
 \end{aligned}$$

Formulasi pembuatan *edible film* berbahan campuran tepung rumput laut *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula* dan kitosan pada penelitian utama dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Formulasi *edible film* pada penelitian utama  
Perlakuan (perbandingan Tepung *Eucheuma spinosum*, *Sargassum filipendula* dan Kitosan)

	Konsentrasi		
	1	2	3
A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>
A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>
A <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>
A <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>
A <sub>5</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>5</sub>
A <sub>6</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>6</sub>
A <sub>7</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>7</sub>
A <sub>8</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>8</sub>
A <sub>9</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>9</sub>

Keterangan:

- A<sub>1</sub> : Konsentrasi *E. spinosum* : *Sargassum filipendula*: Kitosan (0:2:0)% (b/v)  
 A<sub>2</sub> : Konsentrasi *E. spinosum* : *Sargassum filipendula* : Kitosan (0:0:2)% (b/v)  
 A<sub>3</sub> : Konsentrasi *E. spinosum* : *Sargassum filipendula* : Kitosan (2:0:0)% (b/v)  
 A<sub>4</sub> : Konsentrasi *E. spinosum* : *Sargassum filipendula* : Kitosan (0:1:1)% (b/v)  
 A<sub>5</sub> : Konsentrasi *E. spinosum* : *Sargassum filipendula* : Kitosan (1:1:0)% (b/v)  
 A<sub>6</sub> : Konsentrasi *E. spinosum* : *Sargassum filipendula* : Kitosan (1:0:1)% (b/v)  
 A<sub>7</sub> :Konsentrasi *E. spinosum*:*Sargassum filipendula*:Kitosan(0,5:1:0,5)% (b/v)  
 A<sub>8</sub> :Konsentrasi *E. spinosum*:*Sargassum filipendula*:Kitosan(0,5:0,5:1)% (b/v)  
 A<sub>9</sub> :Konsentrasi *E. spinosum*:*Sargassum filipendula*:Kitosan(1:0,5:0,5)% (b/v)

### 3.4.1 Prosedur penelitian utama

Prosedur penelitian utama pembuatan *edible film* melalui beberapa tahap sebagai berikut:

1. Prosedur pembuatan *edible film* dilakukan dengan dasar penelitian menurut Santacruz *et al.*, (2015) yaitu pembuatan *edible film* kitosan yang dicampurkan dengan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *Sargassum filipendula* adalah sebagai berikut: serbuk kitosan ditimbang sesuai perlakuan yang sudah ditentukan, kemudian dilarutkan kedalam 80 mL asam asetat glasial 1%, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu dipanaskan diatas hotplate stirer pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya masukkan tepung rumput laut *Eucheuma spinosum* dan *sargassum filipendula* kedalam larutan kitosan, tambahkan aquades sampai volume mencapai 100 mL, selanjutnya dipanaskan diatas hotplate suhu 50°C selama 15 menit, pada saat proses pemanasan tambahkan dengan *plasticizer* gliserol 1 % (v/v). Setelah homogen *edible film* dituangkan dalam cetakan plat plastik, dan dioven pada suhu 65°C selama 24 jam.
2. *Edible film* yang sudah kering selanjutnya diambil dari plat plastik dan dilakukan pengujian sifat kimia dan organoleptik untuk mengetahui karakteristik *edible film*. Pengujian yang dilakukan diantaranya Protein, Karbohidrat, Lemak, kadar abu, kadar air dan Uji organoleptik meliputi warna, rasa, tekstur, aroma.
3. Hasil dianalisa dengan menggunakan analisa sidik ragam (ANOVA) dan jika hasil berbeda nyata, maka uji dilanjutkan dengan menggunakan uji lanjut duncan.
4. Dari hasil pengujian dipilih perlakuan terbaik dengan menggunakan analisa De Garmo.
5. Setelah didapatkan perlakuan terbaik selanjutnya dilakukan pengujian Serat pangan dan Iodium.

### 3.4.2 Parameter uji

#### 3.4.2.1 Analisis kadar Air (Association of Official Analytical Chemistry, 1970)

Uji kadar air dilakukan dengan cara sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1-2 g dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya. Sampel dikeringkan dalam oven suhu 100-105<sup>o</sup> C selama 3-5 jam tergantung bahannya. Selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Prosedur diulangi sampai tercapai berat sampel yang konstan (selisih antara penimbangan kurang dari 0,2 mg). Perhitungan kadar air berdasarkan berat basah sebagai berikut:

$$\%Wb = \frac{(\text{Berat awal}-\text{berat akhir})}{\text{berat awal}} \times 100 \%$$

#### 3.4.2.2 Analisa kadar Protein (Association of Official Analytical Chemistry, 1970)

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode makro-Kjeldahl. Prinsip pengujian metode makro-Kjeldahl yaitu dengan cara dekstruksi, destilasi dan titrasi. Sampel yang akan dianalisa dihaluskan kemudian ditimbang 1 g dan dimasukkan dalam labu kjeldahl. Selanjutnya ditambahkan 7,5 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dan 0,35 g HgO dan terakhir ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Labu kjeldahl yang berisi sampel dan larutan selanjutnya dipanaskan dalam almari asam sampai berhenti mengeluarkan asap. Pemanasan diteruskan kurang lebih selama 1 jam. Matikan pemanas dan bahan dibiarkan agar dingin. Kemudian ditambahkan 100 mL aquades dalam labu kjeldahl yang didinginkan dalam almari es dan beberapa lempeng Zn, juga ditambahkan 15 mL larutan K<sub>2</sub>S 4% dan terakhir perlahan ditambahkan larutan NaOH 50% sebanyak 50 mL. Pasang labu kjeldahl pada alat destilasi, panaskan labu perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur, kemudian panaskan dengan cepat sampai mendidih. Hasil destilasi kemudian ditampung dalam erlenmeyer yang berisi 50

mL larutan standar HCl (0,1 N) dan 5 tetes indicator metal merah. Destilasi dilakukan sampai distilat yang tertampung sebanyak 75 mL. Titrasi distilat yang telah didapatkan diukur menggunakan standar NaOH (0,1 N). Kemudian hasil %Protein dihitung menggunakan rumus dibawah ini:

$$\%N = 14 \times \frac{(\text{ml NaOH contoh} - \text{ml NaOH blanko})}{\text{gram contoh} \times 1000} \times 14,008$$

$$\%Protein = \%N \times \text{faktor konversi}$$

#### 3.4.2.3 Analisis kadar Lemak (Association of Official Analytical Chemistry, 1970)

Pengujian kadar lemak dilakukan dengan menggunakan metode goldfish. Untuk pengujian kadar lemak yang pertama dilakukan adalah digunakan kertas saring dan tali yang beratnya ditimbang sebagai berat A. kemudian sampel sebanyak 3-5 g dibungkus dengan kertas saring dan diikat tali sebagai berat B dan dimasukkan selongsong. Beaker glass sebagai berat C diisi 50 mL n-hexan, kemudian beaker glass dan selongsong dipasang pada alat ekstraksi goldfish selama 4 jam. Selongsong dengan sampel diganti dengan labu khusus hingga hexan tersisa sedikit. Beaker glass berisi lemak dari oven vacuum 80°C, kemudian beaker glass dioven selama 1,5 jam. Setelah itu dimasukkan kedalam desikator selama 1 jam dan ditimbang beratnya sebagai berat D. perhitungan kadar lemak dapat menggunakan rumus :

$$\text{kadar lemak (\%)} = \frac{D-C}{B-A} \times 100 \%$$

#### 3.4.2.4 Analisis Kadar abu (Association of Official Analytical Chemistry, 1970)

Pengujian kadar abu dilakukan berdasarkan metode AOAC (1970), penentuan kadar abu dilakukan dengan cara ditimbang sampel sebanyak 1 g dan dimasukkan dalam cawan porselin yang sudah diketahui bobot awalnya.



Sampel diarangkan pada hotplate hingga berasap. Kemudian proses pengabuan pada muffle dengan suhu 600°C sampai menjadi abu yang berwarna putih. Setelah didapatkan sampel yang telah menjadi abu cawan porselin dikeluarkan dari muffle dan didinginkan dalam desikator. Dilakukan penimbangan hingga diperoleh beratnya. Kadar abu dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{berat abu (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

#### 3.4.2.5 Analisis kadar Karbohidrat (winarno, 2002)

Pengujian karbohidrat dilakukan dengan perhitungan kasar (*proximate analysis*) atau disebut *Carbohydrate by Difference*. Yang dimaksud dengan *proximate analysis* adalah suatu analisis dimana kandungan karbohidrat termasuk serat kasar diketahui bukan melalui analisis melainkan melalui perhitungan sebagai berikut:

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

Perhitungan *Carbohydrate by Difference* adalah penentuan karbohidrat dalam bahan makanan secara kasar. Pada prinsipnya, kadar karbohidrat dapat diketahui dengan cara pengurangan berat awal terhadap kadar air, protein, abu dan lemak. Sehingga dapat diasumsikan sisa berat sampel merupakan kandungan karbohidrat secara keseluruhan.

#### 3.4.2.6 Analisis Organoleptik (Moedjiharto, 2000)

Pengujian organoleptik dilakukan dengan cara pengujian sensori atau indrawi yaitu merupakan cara pengujian yang dilakukan secara obyektif dengan menggunakan indera manusia sebagai alat utama untuk pengukuran daya penerimaan terhadap makanan. Sasaran alat indera ini terdiri dari 4 atribut mutu yaitu warna, aroma, rasa dan tekstur.

Pengujian organoleptik dilakukan menggunakan pengujian multiple comparison. Pengujian multiple comparison dilakukan dengan menggunakan sampel dengan kode R dan disajikan kepada panelis dengan macam-macam contoh lain yang berkode. Panelis diminta untuk memberikan nilai terhadap contoh yang berkode dibandingkan dengan contoh R.

#### **3.4.2.7 Analisis kadar Iodium (Febrianti *et al.*, 2013)**

Analisis kadar Iodium dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometer Uv-vis berdasarkan pembentukan kompleks amilum-iodium menggunakan oksidator iodat. Cara analisa pengujiannya adalah sebagai berikut:

Pertama sampel ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditambahkan  $H_2SO_4$  0,1 N sebanyak 50 mL, lalu di shacker selama 15 menit untuk mendapatkan filtratnya, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dengan tambahan aquades sampai tanda batas kemudian dihomogenkan. Langkah selanjutnya larutan yang sudah homogen diambil 10 mL kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Lalu, tambahkan 1 mL  $H_2SO_4$  4 N dan larutan KI 10% sebanyak 1 mL kemudian dikocok lagi. Langkah terakhir yaitu ditambahkan 1 mL indikator amilum dan dikocok hingga homogen kemudian dilihat hasilnya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 400 nm sampai 750 nm setelah itu dicatat absorbansinya.

#### **3.4.2.8 Analisis kadar Serat Pangan (Association of Official Analytical Chemistry, 1995)**

Penentuan kadar serat pangan dilakukan dengan cara pertama menimbang 1 gram sampel dan dimasukkan ke dalam beakerglass 400 mL kemudian ditambahkan 50 mililiter 0,1 M buffer natrium fosfat pH 6, diaduk dan

ditambahkan 0,1 mL enzim termamyl. Ditungkat beakerglass dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 100°C selama 15 menit dan digoyang setiap 5 menit. Didinginkan sampel pada suhu kamar dan diatur pH menjadi 7,5 dengan penambahan 10 mL larutan 0,275 N NaOH. Tambahkan 5 gram protease dan ditambahkan 0,1 mL larutan enzim. Ditungkat dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 30 menit. Didinginkan dan ditambahkan 10 mL 0,325 larutan HCl dan diatur pH hingga 4,0-4,6. Kemudian ditambahkan 0,3 mL amyloglukosidase dan ditungkat dengan aluminium foil dan diinkubasi pada 60°C selama 30 menit dengan agitasi yang berkelanjutan. Ditambahkan 280 mL 95% etanol dan dipanaskan 60°C serta dipresipitasi pada suhu kamar selama 60 menit. Disaring dengan krus yang telah diberi celite 0,1 mg yang diratakan dengan etanol 78%. Selanjutnya dicuci residu dalam krus dengan 20 mL etanol 78% (3 kali), 10 mL etanol 95% (2 kali) dan 10 mL aseton (1 kali). Kemudian dikeringkan residu dalam oven vakum pada suhu 70% selama semalam atau dioven dengan suhu 105°C sampai berat konstan.

#### **3.4.2.9 Penentuan perlakuan terbaik dengan metode De Garmo (De Garmo *et al.*, 1984)**

Setelah diperoleh hasil analisa semua parameter selanjutnya dilakukan Penentuan perlakuan terbaik dengan menggunakan metode De Garmo, prinsipnya yaitu dengan menentukan nilai indeks efektivitas, yaitu dengan menentukan nilai terbaik dan terjelek dari suatu nilai hasil parameter yang digunakan. Nilai perlakuan yang telah didapat dikurangi dengan nilai terjelek yang kemudian nilai ini akan dibagi oleh hasil pengurangan dari nilai terbaik dikurangi dengan nilai terjelek.