

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein yaitu terdiri dari kepala udang, inokulan khamir laut, kapas, plastik warp, akuades dan molase. Sedangkan bahan yang digunakan dalam pembekuan hidrolisat protein kepala udang Vanname yaitu air, aluminium foil, Plastik *warp* dan tissue. Adapun bahan-bahan yang digunakan untuk analisis kandungan nutrisi yaitu terdiri dari silika gel, benang kasur, kertas saring, n-heksan, H₂SO₄, Tablet Kjedahl, akuades, H₃BO₃ dan indikator *methyl orange*, .

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan dalam pembuatan hidrolisat protein kepala udang Vanname, peralatan yang digunakan dalam penyimpanan dalam *freezer* hidrolisat protein kepala udang dan peralatan dalam pengujian proksimat pada hidrolisat protein kepala udang. Untuk peralatan yang digunakan dalam pembuatan hidrolisat protein kepala udang Vanname yaitu antara lain cooper, botol plastik, selang, beaker glass, timbangan digital, aerator, pipet volume. Sedangkan untuk peralatan yang digunakan dalam pembekuan hidrolisat protein kepala udang Vanname yaitu antara lain botol plastik, Baskom, Timbangan analitik, corong dan *freezer*. Adapun peralatan yang digunakan dalam analisis kandungan nutrisi pada hidrolisat protein kepala udang antara lain yaitu botol timbang, cawan petri, timbangan digital, desikator, oven, sample tube, *goldfish*, gelas piala, *muffle*, cawan porselin, *crushable tang*, destilasi, kompor listrik, destruksi, buret, *statif*, loyang, pipet tetes, *beaker glass*, pipet volume, bola hisap spatula, tabung reaksi dan rak tabung reaksi.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimen. Metode penelitian dengan eksperimen yaitu suatu metode penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel lain dengan kontrol yang dikendalikan (Sedarmayanti dan Syarifudin, 2002).

Berdasarkan uraian diatas, dalam penelitian ini terdapat dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama penyimpanan dalam *Freezer*. Untuk lama penyimpanan selama pembekuan yang digunakan yaitu kontrol (0 hari), selama 30 hari dan 180 hari penyimpanan. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kandungan nutrisi (kadar protein, kadar air, kadar lemak, dan kadar abu) hidrolisat protein kepala udang *Vanname*.

3.2.2 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan tiga perlakuan dan tiga kali ulangan. Adapun model rancangan percobaan disajikan pada tabel berikut.

Tabel 1. Rancangan Penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	I	II	III
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3

Keterangan:

- A : Kontrol (Tanpa Perlakuan)
- B : Penyimpanan Beku selama 30 hari (1 bulan)
- C : Penyimpanan Beku selama 180 hari (6 bulan)

Menurut Sastrosupadi (2000), Rancangan ini digunakan apabila percobaan mempunyai median atau tempat percobaan yang seragam atau

homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium.

Model Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \sum_{ij}$$

Y_{ij} = Hasil pengamatan dari perlakuan ke - i dan ulangan ke - j
 μ = Rataan Umum
 τ_i = Pengaruh perlakuan ke - i
 \sum_{ij} = Galat Percobaan dari perlakuan ke - i dan ulangan ke - j

Adapun untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang terjadi antara faktor perlakuan dilanjutkan pengujian dengan uji BNT taraf 5 % Dengan menggunakan Microsoft Excel Versi 2010. Adapun selang kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebesar 95 %. Prinsip dari metode Uji BNT sendiri yaitu dengan menentukan nilai indeks efektivitas yaitu dengan menentukan nilai terbaik dan terjelek dari suatu nilai hasil parameter yang digunakan. Kemudian nilai perlakuan yang diperoleh dikurangi dengan nilai terjelek yang selanjutnya nilai tersebut dibagi oleh hasil pengurangan dari nilai terbaik dikurangi dengan nilai terjelek.

3.3 Prosedur Penelitian

Adapun proses dalam penelitian meliputi pembuatan hidrolisat protein kepala udang Vanname, pemebekuan hidrolisat protein kepala udang Vanname dan analisis kandungan nutrisi pada hidrolisat protein kepala udang Vanname dengan menggunakan metode oven, metode *goldfish*, metode kjehdahl dan metode pengabuan langsung.

3.3.1 Prosedur Pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vanname (Fathony, 2014 yang telah dimodifikasi)

Adapun prinsip dalam pembuatan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vaname yaitu kepala udang Vanname dihidrolisis menggunakan inokulan khamir laut mix dan juga molase. Inokulan khamir laut mix merupakan inokulan khamir laut yang digunakan dari berbagai spesies. Menurut Kathiresan *et al.*

(2011) Khamir laut yang digunakan meliputi dari berbagai spesies yaitu *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum sp.*, *Pichia capsulata*, *Pichia fermentans*, *Pichia salicaria*, *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus dimennae* dan *Yarrowia lipolytica*. Tujuan dilakukan penambahan inokulan khamir laut pada kepala udang Vanname yaitu agar proses hidrolisis berlangsung cepat. Sedangkan Molase merupakan sisa dari hasil pembuatan gula. molase diperlukan sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral dan nutrisi bagi pertumbuhan mikroba sehingga dapat menghasilkan enzim. penambahan molase dilakukan sebagai sumber nutrisi pada khamir laut karena Menurut Garraway and Evans (1984), Khamir laut memerlukan bahan-bahan organik dan anorganik untuk keperluan hidupnya. Khamir mendapatkan energi dari ikatan karbon untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan yang berasal dari molekul sederhana seperti gula, asam organik atau alkohol. Karena molase mengandung senyawa gula, maka molase dapat menyediakan energi yang dibutuhkan untuk metabolisme di dalam sel sehingga pertumbuhan fungi dapat optimal. Selanjutnya dilakukan fermentasi selama 9 hari dengan tujuan agar didapatkan hidrolisat protein kepala udang Vanname dengan hasil optimal. Menurut Fathony (2014), Fermentasi selama 9 hari memberikan hasil yang optimal bagi hidrolisat karena khamir laut bekerja secara maksimal pada fase log hingga fase stasioner Untuk prosedur pembuatan hidrolisat protein kepala udang Vanname dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3.2 Prosedur Pembekuan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vanname (Aberoumand, 2013 yang telah dimodifikasi)

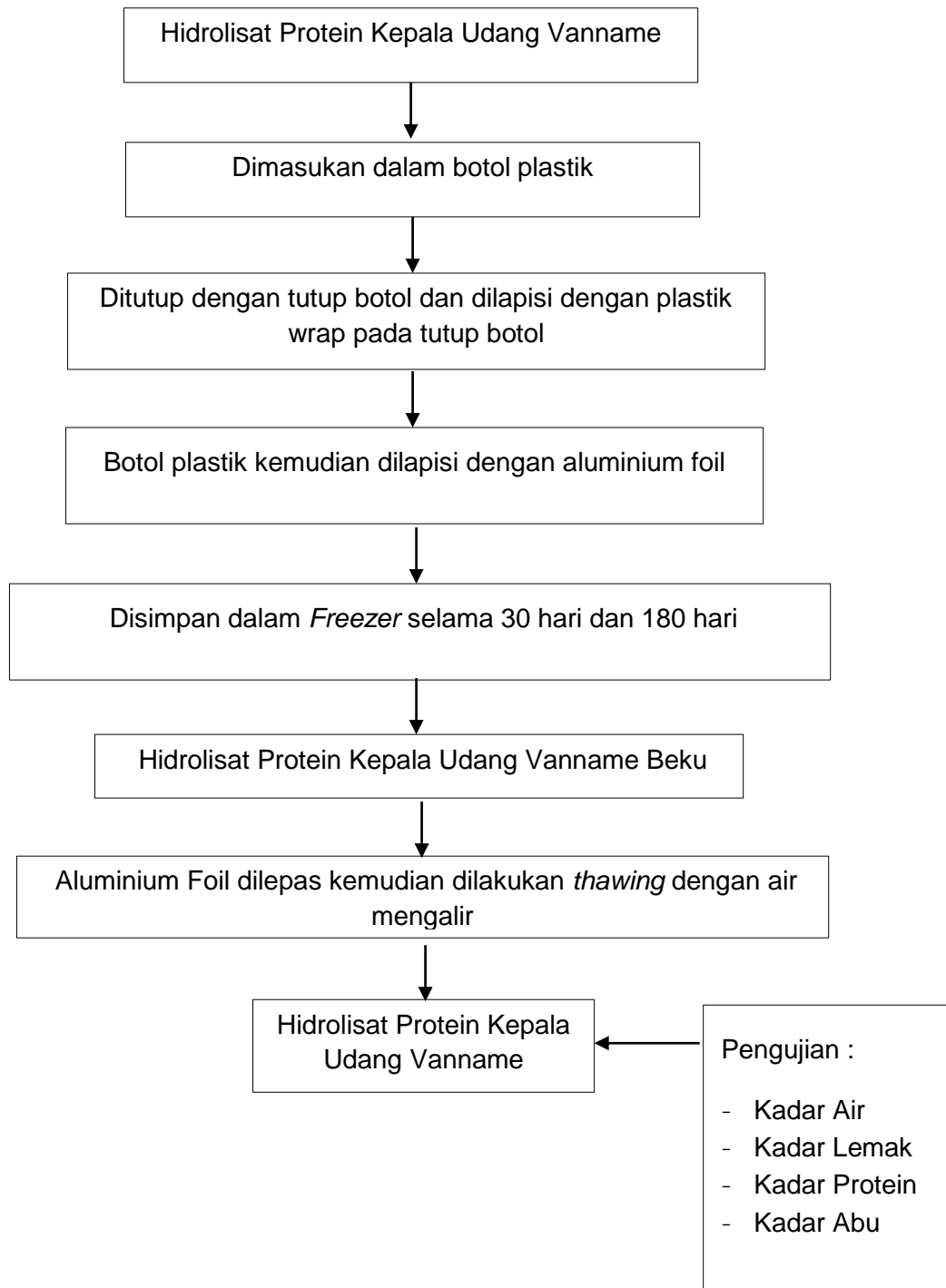
Menurut Heen dan Karsti (1965), dalam menyimpan produk perikanan beku dibutuhkan suhu yang cukup rendah. Penyimpanan dengan suhu (-10 °C) mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Namun untuk aktivitas kimia belum terhenti sepenuhnya dan masih berlangsung hingga beberapa minggu.

Sehingga untuk menghentikan aktivitas kimia pada produk perikanan dibutuhkan penyimpanan suhu rendah yaitu antara (-18 °C) hingga (-20 °C).

Selama penyimpanan dengan suhu rendah, bahan pangan akan awet selama beberapa hari atau minggu tergantung dari bahan pangannya contohnya bahan pangan yang kandungan airnya tinggi akan lebih cepat rusak. Penyimpanan produk beku bisa bertahan selama sebulan atau kadang-kadang beberapa bulan (Winarno, *et al.*, 1980). Penyimpanan pada suhu rendah selama 30 hari memberikan efek pada nutrisi pada bahan pangan diantaranya terjadinya penurunan nutrisi meskipun tidak signifikan. Akan tetapi kandungan nutrisi masih terjaga dengan baik (Aberoumand, 2013). Umumnya pada bahan pangan yang disimpan selama suhu rendah akan bertahan hingga 6 bulan atau lebih tergantung kondisi pada bahan pangan tersebut serta suhu yang digunakan (Whittle, 1997).

Adapun Menurut Suzuki (1981), untuk mempertahankan kualitas produk perikanan yang dibekukan diperlukan syarat-syarat dalam penyimpanannya antara lain: 1) Bahan mentah yang didapatkan harus segar, 2) Proses pembekuan harus dilakukan secara cepat, 3) dilakukan penyimpanan pada suhu rendah (dibawah 0 °C). Selain itu juga dilakukan pembungkusan pada produk dengan bahan pengemas yang tahan lama terhadap pengaruh oksidasi dan juga agar tidak terjadi kontaminasi dengan udara luar. Adapun bahan pengemas yang cocok digunakan yaitu aluminium foil. Sifat pengemas aluminium foil tidak dapat tembus cahaya, uap air dan gas serta tahan terhadap suhu pembekuan (-85 °C) hingga (-370 °C) (Edward, 1987).

Tahapan yang digunakan dalam prosedur pembekuan hidrolisat protein kepala udang *Vanname* meliputi pengemasan produk dan pembekuan produk. Adapun prosedur kerja dapat dilihat pada Gambar 1. :



Gambar 1. Pembekuan Hidrolisat Protein Kepala Udang Vanname

(Aberoumand, 2013 yang telah dimodifikasi)

3.4 Pengujian Kandungan Nutrisi

Adapun pengujian yang dilakukan pada penelitian ini yaitu analisis proksimat yang meliputi pengujian terhadap kadar air, kadar protein, kadar lemak, dan kadar abu.

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

Analisis kadar air pada hasil hidrolisat protein kepla udang *Vanname* yang telah dibekukan menggunakan metode pengeringan atau pengovenan. Adapun prinsip dari metode pengovenan dalam analisis kadar air yaitu dengan cara mengeringkan sampel pada oven dengan suhu 100-105 °C hingga berat yang terdapat pada sampel menjadi konstan. Metode ini dilakukan dengan cara mengeluarkan air dari bahan akibat proses pemanasan. Untuk prosedur kerja pada analisis kadar air yaitu sebagai berikut:

- Preparasi pada alat yaitu cawan kosong beserta tutupnya dikeringkan dalam oven selama 24 jam dengan suhu 105 °C.
- Kemudian cawan kosong beserta tutupnya dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit agar dapat menyerap uap air.
- Kemudian cawan kosong beserta tutupnya ditimbang menggunakan timbangan digital dan dicatat sebagai berat A.
- Selanjutnya sampel yang telah dioven ambil sebanyak 5 gram dan catat sebagai berat B.
- Selanjutnya setelah ditimbang, sampel kemudian dimasukkan kedalam cawan yang telah dioven sebelumnya.
- Cawan berisi sampel dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100-105 °C selama 3-5 jam.
- Setelah dilakukan pengeringan dengan oven, cawan berisi sampel dipindah dalam desikator selama 15 menit.

- Setelah itu dilakukan penimbangan pada cawan yang berisi sampel dan dicatat sebagai berat C.
- Kemudian dianalisis kadar air berdasarkan pengurangan berat dari bahan yang merupakan banyaknya kadar air dalam bahan. Sehingga persentase kadar air dalam bahan dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut ini.

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

Dimana:

- A : Berat konstan pada cawan kering beserta tutupnya sebelum digunakan
- B : Berat pada sampel awal sebelum dioven
- C : Berat cawan berisi sampel yang telah dioven beserta tutup cawan

3.4.3 Kadar Lemak (Sudarmaji *et al.*, 1989)

Adapun analisis kadar lemak pada hasil hidrolisat protein kepala udang *Vanname* beku menggunakan metode *goldfish*. Dalam metode *goldfish*, prinsipnya yaitu dengan cara ekstraksi pada sampel. Ekstraksi merupakan pemisahan lemak pada sampel dengan cara mensirkulasikan pelarut lemak ke dalam sampel yang akan diujikan sehingga senyawa yang tidak dapat larut dalam pelarut tersebut.

Prosedur kerja dalam analisis kadar lemak pada hasil hidrolisat protein kepala udang *vanname* beku adalah sebagai berikut:

- Pengeringan pada sampel beserta kertas saring dan benang kasur ke dalam oven dengan suhu 105 °C selama 24 jam.
- Sampel, kertas saring dan benang kasur yang telah dikeringkan kemudian didinginkan dengan menggunakan desikator selama 15 menit
- Setelah didinginkan, sampel kemudian ditimbang sebanyak 2 gram. Dilakukan juga penimbangan kertas saring dan benang kasur.

- Sampel yang telah ditimbang kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas saring yang diikat dengan benang kasur
- Kemudian sampel yang telah dibungkus kemudian diletakkan kedalam sampel *tube goldfish* dan juga dilakukan pemasangan dibawah kondensor.
- Kemudian dilakukan pemasangan pada gelas piala yang telah diisi n- heksan sebanyak 50 ml
- Pengaliran air pada kondensor dan naikan pemanas goldfish sampai menyentuh gelas piala dan dibiarkan selama 3-4 jam
- Setelah itu pemanas kemudian dihentikan dan sampel kemudian diambil.
- Sampel kemudian dikeringkan kedalam oven pada suhu 105 °C hingga berat konstan
- Sampel yang telah dikeringkan kemudian didinginkan dengan menggunakan desikator selama 15 menit
- Kemudian dilakukan penimbangan akhir pada sampel
- Kemudian dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

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

3.4.4 Kadar Protein (Sudarmaji *et al.*, 1989)

Adapun analisis kadar protein pada hasil hidrolisat protein kepala udang vanname beku menggunakan metode kjeldahl. Prinsip dari metode kjeldahl yaitu didasarkan pada jumlah kadar nitrogen total pada sampel. Metode kjeldahl mempunyai 3 tahapan dalam analisis yaitu destruksi, destilasi dan yang terakhir titrasi. Untuk prosedur kerja dari metode kjeldahl adalah sebagai berikut :

- Timbang sampel yang akan diuji sebanyak 2 gram
- Kemudian dimasukkan dalam labu kjeldahl

- Kemudian ditambahkan 15 mL larutan H₂SO₄ dan 1/3 tablet Kjeldahl
- Kemudian labu kjeldahl di panaskan selama 2-3 jam pada suhu 370 °C hingga larutan menjadi jernih dan tidak berasap
- Kemudian ditambahkan 100 mL akuades dan 50 mL NaOH dan selanjutnya didestilasi
- Destilat kemudian di tampung pada Erlenmeyer yang berisi 50 mL H₃BO₃ dan selanjutnya tetesi dengan indicator metyl orange sebanyak 1 tetes
- Kemudian dilakukan penistitrasian pada destilat dengan H₂SO₄ 0,3 N hingga didapatkan perubahan warna menjadi merah muda
- Kemudian dilakukan perhitungan kadar protein pada sampel dengan rumus berikut ini.

$$\text{Kadar Protein} = \frac{(\text{mL titrasi H}_2\text{SO}_4 + \text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ blanko}) \times N \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 14,007 \times 6,25}{\text{Berat sampel (g)} \times 1000} \times 100\%$$

3.4.5 Kadar Abu (Sudarmaji *et al.*, 1989)

Adapun analisis kadar abu pada hasil hidrolisat protein kepala udang vanname beku menggunakan metode pengabuan kering. Prinsip dari metode pengabuan kering yaitu dengan mengoksidasi semua zat organik pada sampel dengan suhu tinggi, yaitu sekitar 500-600 °C dan kemudian dilakukan penimbangan terhadap zat yang tertinggal pada sampel setelah proses pembakaran tersebut. Adapun prosedur kerja untuk metode pengabuan kering adalah sebagai berikut .:

- Cawan porselen kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam dengan suhu 105 °C.
- Setelah dikeringkan kemudian cawan porselen kemudian didinginkan dengan menggunakan desikator selama 15 menit.

- Kemudian dilakukan penimbangan berat awal pada cawan porselein setelah itu sampel diambil sebanyak 2 gram dan diletakkan kedalam cawan porselen.
- Kemudian dilakukan pengarangan diatas kompor listrik.
- Kemudian sampel dimasukan didalam *muffle* dengan suhu 600 °C dan dilakukan pengamatan setiap 15 menit hingga sampel berubah menjadi putih keabu-abuan.
- Kemudian di keluarkan dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit
- Kemudian dilakukan penimbangan akhir dan dilakukan perhitungan dengan rumus berikut ini.

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat Cawan Porselen}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$