

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya dan Laboratorium Pengolahan Pangan Fakultas Pertanian Universitas Tribuana Tungga Dewi. Waktu pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan April sampai dengan bulan Desember 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *cabinet dryer* (Furui FR-I), *waterbath* (Mettler WNB14RACK), timbangan analitik digital Ohaus tipe PA413, oven WTC Binder 7200 tipe E53 no. 89749, pH meter Horiba tipe f72, destilator, *vortex mixer ZX3 Velp*, *autoclave* (Daihan Labtech Type-LAC-5065SP), inkubator (Mettler IN55), *colony counter* Funke Gerber 8500, alat titrasi, *magnetic stirrer*, *laminary air flow*, lemari asam, desikator, gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, labu kjedhal, spatula, pipet ukur, corong, termometer, *filler*, blender, timbangan, aluminium foil, ayakan 80 mesh, kertas saring, dan plastik wrap.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kulit pisang kepok mentah dengan tingkat kematangan I (pisang dengan kulit yang masih hijau dan daging pisang masih keras), ikan nila merah hidup, kitosan bubuk komersial, gliserol, aquades, etanol 96%, asam asetat 1%, gliserol, larutan buffer pH 7, katalisator, media Nutrient Agar (NA), NaOH 50%, H₂SO₄, asam borat, HCl 0,2N.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial yang dilakukan dengan dua faktor. Faktor I adalah konsentrasi pektin kulit pisang (1%, 2%, dan 3%). Sedangkan faktor II adalah konsentrasi kitosan (1%, 2%, dan 3%). Semua perlakuan termasuk perlakuan kontrol akan dilakukan 3 kali ulangan. Pengaplikasian *edible coating* pektin kulit pisang dan kitosan ini dilakukan pada *fillet* ikan nila merah dengan menggunakan metode pencelupan 30 detik selama 2 kali. Pengamatan dilakukan secara periodik (0, 15, dan 30 jam) pada suhu ruang.

Tabel 1. Matriks Rancangan Percobaan

Pektin (P)	Kitosan (K)		
	K ₁	K ₂	K ₃
P ₁	P ₁ K ₁	P ₁ K ₂	P ₁ K ₃
P ₂	P ₂ K ₁	P ₂ K ₂	P ₂ K ₃
P ₃	P ₃ K ₁	P ₃ K ₂	P ₃ K ₃

Keterangan :

P1K1 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 1 %, Larutan Kitosan 1 %

P1K2 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 1 %, Larutan Kitosan 2 %

P1K3 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 1 %, Larutan Kitosan 3 %

P2K1 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 2 %, Larutan Kitosan 1 %

P2K2 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 2 %, Larutan Kitosan 2 %

P2K3 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 2 %, Larutan Kitosan 3 %

P3K1 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 3 %, Larutan Kitosan 1 %

P3K2 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 3 %, Larutan Kitosan 2 %

P3K3 = Konsentrasi ekstrak pektin kulit pisang 3 %, Larutan Kitosan 3 %

Kontrol = *Fillet* ikan tanpa penambahan pektin dan kitosan

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Pektin Kulit Pisang Kepok

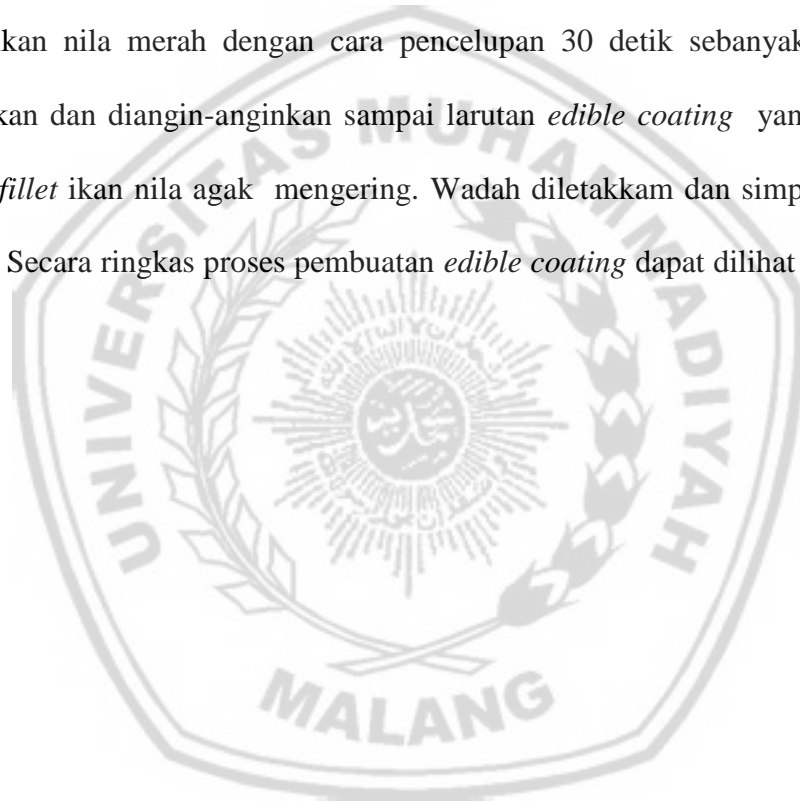
Kulit pisang diambil lalu ditimbang sebanyak 500 gram. Setelah itu dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih dan dilakukan pemotongan dengan ukuran 1x1 cm untuk memperluas permukaan. Kemudian kulit pisang dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* menggunakan suhu 55°C selama 48 jam. Selanjutnya, kulit pisang dihancurkan menggunakan blender menjadi bubuk, lalu dilakukan pengayakan dengan saringan 80 mesh. Selanjutnya 15 g bubuk kulit pisang ditambahkan 100 ml aquades dan 7% asam sitrat dan ekstraksi menggunakan *waterbath* dengan suhu 85°C selama 2 jam, saring menggunakan kertas saring dalam keadaan panas sehingga dihasilkan larutan filtrat pektin kulit pisang. Kemudian ditambahkan etanol 96% (1:1,5) dan diaduk hingga mengendap. Larutan selanjutnya diendapkan selama 24 jam. Pektin yang telah diendapkan disaring dengan kertas saring dan didapatkan endapan pektin basah. Selanjutnya pektin dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 3 jam. Setelah itu bubuk pektin kulit pisang di haluskan dengan cara di blender dan didapatkan bubuk pektin kering, kemudian disimpan untuk pembuatan *edible coating* (Andriasty, 2015). Secara ringkas proses ekstraksi pektin dapat dilihat pada Gambar 3.

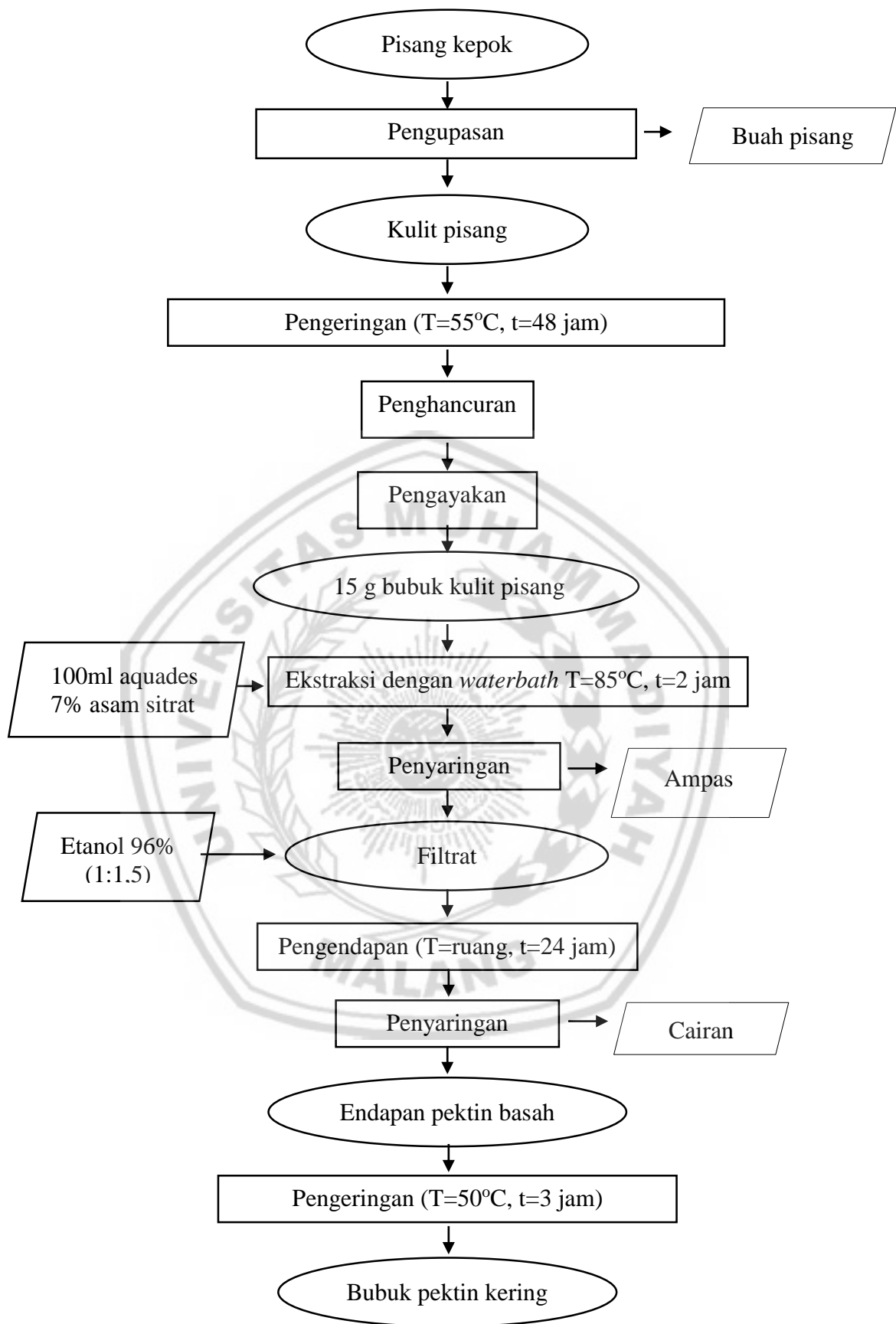
3.3.2 Pembuatan Larutan Kitosan

Pembuatan larutan kitosan yaitu 1 gram kitosan dicampur dengan 30 ml asam asetat 1% dan 100 ml aquades lalu dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian diendapkan selama 24 jam. Selanjutnya larutan disaring dengan kertas saring untuk memisahkan ampas dan dihasilkan larutan kitosan yang akan digunakan untuk pembuatan *edible coating*. Perlakuan ini juga dilakukan pada pembuatan larutan kitosan 2% dan 3%.

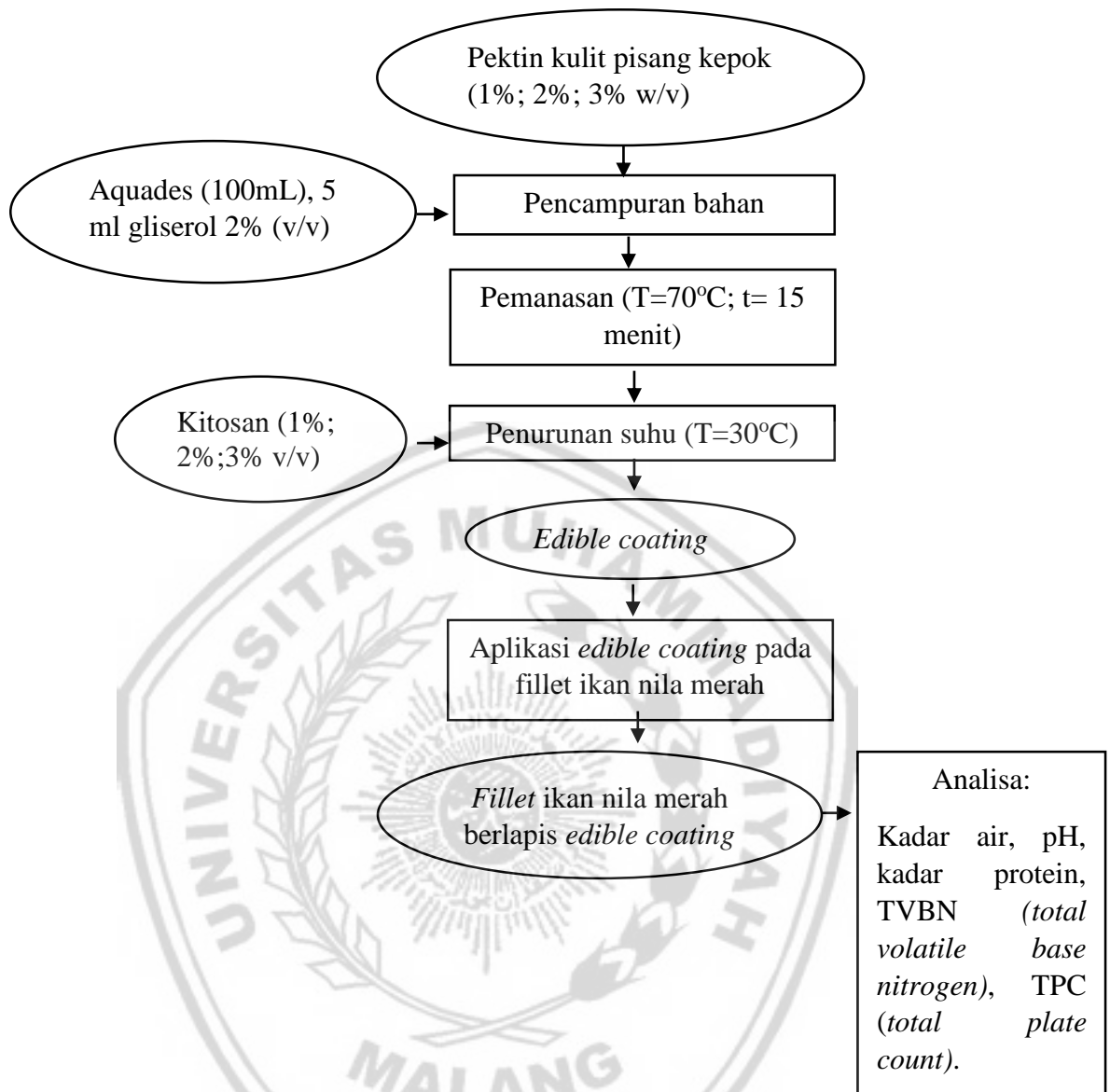
3.3.3 Pembuatan Larutan *Edible*

Sebanyak 100 ml aquades dipanaskan hingga mencapai suhu 70°C, ditambahkan bubuk pektin kulit pisang sesuai perlakuan kemudian aduk selama ± 3 menit dengan *magnetic stirrer* pada suhu 70°C. Sebanyak 5 ml gliserol 2% (v/v) dimasukkan dan aduk selama ± 1 menit. Larutan didinginkan pada suhu kamar sampai suhu sekitar 25-30°C. Larutan kitosan ditambahkan sesuai dengan perlakuan, diaduk hingga rata. *Edible coating* yang telah jadi, diaplikasikan pada *fillet* ikan nila merah dengan cara pencelupan 30 detik sebanyak 2 kali, lalu ditiriskan dan diangin-anginkan sampai larutan *edible coating* yang menempel pada *fillet* ikan nila agak mengering. Wadah diletakkan dan simpan pada suhu ruang. Secara ringkas proses pembuatan *edible coating* dapat dilihat pada Gambar 4.





Gambar 1. Diagram pembuatan pektin kulit pisang kepok (Andriasty, 2015 dimodifikasi)



Gambar 2. Diagram alir pembuatan *edible coating*

3.4 Metode Pengujian

3.4.1 Analisis Kadar Air Metode Gravimetri (Sudarmaji dkk, 1997)

1. Bahan dibuat menjadi bubuk atau bahan dihaluskan
2. Cawan porselen ditimbang dan dicatat beratnya
3. Sampel yang telah berupa bubuk ditimbang kedalam cawan porselen sebanyak 2 gram
4. Cawan porselen yang telah diisi sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 5 jam atau lebih tergantung bahan yang dianalisa
5. Cawan porselen didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang
6. Cawan porselen dipanaskan kembali selama 30 menit dan kemudian didinginkan dalam desikator dan setelah dingin kemudian ditimbang. Perlakuan ini diulangi sampai memperoleh berat konstan (selisih penimbangan secara berurutan setelah dipanaskan selama 30 menit kurang dari 0,2 mg)
7. Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{Berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{Berat sampel (gram)} \times 1000} \times 100\%$$

3.4.2 Analisis pH (Suwetja, 2007)

Penentuan pH dapat dilakukan dengan menggunakan pH meter, dengan urutan kerja sebagai berikut:

1. Sampel ditimbang sebanyak ± 3 g kemudian dihaluskan
2. pH meter di kalibrasi dengan larutan buffer pH 7
3. Sampel diukur dengan menggunakan pH meter
4. Nilai pH sampel akan tertera pada layar alat

3.4.3 Analisis Kadar Protein Metode Kjeldhal (Sudarmaji, 2003)

1. Sampel ikan 1 gram dimasukkan kedalam labu kjedahl
3. Menambah 1 pucuk sendok katalisator dan 2 ml H₂SO₄
4. Setelah itu didestruksi, dengan suhu rendah sampai tinggi 450°C dan dilakukan dalam lemari asam 2-3 jam (larutan sampai jernih), diangkat dan didinginkan dengan aquades 15 mL
6. Alat pada destilasi diangkat kemudian ditambahkan NaOH 40% sebanyak 15 mL dipanaskan selama 15 menit
7. NH₃ yang terbentuk ditampung dalam Erlenmeyer yang berisi 5 mL asam borat
8. Larutan dalam Erlenmeyer ditampung dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna hijau muda menjadi ungu muda
9. Volume HCL yang dipakai dicatat

$$\text{Total nitrogen (\%)} = \frac{\text{Vol} \times \text{N} \times 14,008 \times 100\%}{\text{W} \times 1000}$$

$$\text{Kadar protein (\%)} = \text{N total} \times \text{FK}$$

Keterangan :

N= normalitas (0,2)

W= berat sampel

V= volume larutan HCl

FK = 6,25

3.4.4 Uji Aktivitas Antibakteri total volatile bases (TVBN) (Apriyantono dkk., 1989)

1. 5 gram sampel (ikan/daging) yang sudah digiling ditimbang
2. 15 ml larutan TCA 5 % ditambahkan, *vortex* sampai sampel homogen

3. Ekstrak TCA dipisahkan dengan cara penyaringan atau sentrifuse selama 10 menit
4. 5 ml ekstrak TCA dimasukkan ke dalam alat destilasi kjeldahl semimikro. Tambahkan 5 ml NaOH 2 M
5. Dilakukan distilasi dimana destilat ditangkap dengan 15 ml HCL 0,01 M sampai mencapai 30 ml
6. Beberapa tetes merah fenol ditambahkan ke dalam destilat, lalu titrasi dengan NaOH 0,01 M sampai berubah warna menjadi merah keunguan

$$TVN \text{ (mg/100 g)} = \frac{14 (300 + W) \times (15 - V_1) \times 0,01 \times 100}{5 \quad M}$$

Keterangan :

W = Kadar air pada bahan

V₁ = Volume titrasi

M = Massa

3.4.5 Analisis Total Koloni (Waluyo, 2005)

1. Berat bahan yang telah dihaluskan ditimbang
2. Media dan alat yang sudah di sterilisasi sebelumnya disiapkan
3. Media dari agar dibuat dan dituang pada cawan petri
4. Larutan dibuat sebagai pengencer sebanyak 9 mL
5. Pengenceran dimulai dengan memasukkan sampel sebanyak 10 mL (campuran 1 mL/1 gram sampel dengan 9 mL larutan)
6. 1 mL diambil dari larutan pengencer pertama dan dimasukkan kedalam larutan pengencer 9 mL sampai mencapai pada pengenceran yang diharapkan
7. 2/3 pengencer terakhir diambil dan ditanam pada cawan petri yang berisi media dengan menggunakan suntikan

8. Kemudian di inkubasi pada inkubator selama 24 jam

9. Koloni dihitung dengan *coloni counter* dengan rumus:

$$\sum \text{mikroba (CFU/gram)} = \frac{\sum \text{mikroba}}{1/\text{pengenceran}}$$

3.5 Analisis Data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan Uji DMRT pada taraf 5%. Apabila terjadi berbeda nyata atau interaksi pada masing-masing perlakuan maka data yang sudah diperoleh akan dilanjutkan dengan uji pembeda menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple range Test*) pada taraf 5%.

