

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Teknobia-Pangan, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta pada bulan Februari 2016 sampai Juni 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, oven, talenan, timbangan digital (Phoenix Instrument BTD-323), baskom plastik, erlenmeyer, *stirer*, gelas ukur, *hot plate*, sendok, *moizturizer balance* (Phoenix Instrument BM-65), *colour reader*, cawan aluminium, tabung reaksi, rak tabung reaksi, propipet, *Laminar Air Flow* (ESCO), autoklaf (Hi-Clave HVE-50), *texture analyzer* (Llyod Instrument), gunting, *colony counter*, petridish, inkubator (Memmert), blender (Miyako), sendok teh, panci, plastik bening, labu ukur, lemari asam, alat destilasi, gelas beker, buret, statif, trigalski, kulkas, mikropipet, mikrotip, jarum ose, kompor (Rinai), kain saring, kertas saring Whatman no 41, tanur, spektrofotometer, *probe*, vortex (Phoenix Instrument RS-VA 10).

Bahan yang digunakan adalah pati tapioka merk Gunung Agung, dan jeruk nipis yang didapat dari Superindo Yogyakarta, sedangkan bahan-bahan lainnya antara lain etanol 95%, asam asetat, iod 2%, *aquadest*, *aquadest* steril, kalium sorbat, gliserol, silika gel, Nutrien Agar, biakkan *Staphylococcus aureus*, daging ayam, bawang putih, lada, tepung tapioka, air, katalisator N, H₂SO₄ pekat, medium *Mannitol Salt Agar*, medium *Plate Count Agar*, asam berat,

indikator MR, indikator BCEMr, NaOH, kertas lakmus, batu didih, alkohol 70%, HCl, dan kertas payung.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) yang disusun dengan 2 faktor dan masing-masing faktor terdiri dari 3 level. Faktor pertama adalah perlakuan (tanpa pengemas, plastik, *edible coating* jeruk nipis 0%, *edible coating* jeruk nipis 1%) dan faktor kedua adalah lama penyimpanan (0, 1, 2, 3, dan 4 hari) masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rancangan Percobaan perbandingan perlakuan dan lama penyimpanan

Perlakuan	Ulangan	Lama Penyimpanan (hari)				
		0 (A)	1 (B)	2 (C)	3 (D)	4 (E)
Tanpa Pengemas	1	A _{w1}	B _{w1}	C _{w1}	D _{w1}	E _{w1}
	2	A _{w2}	B _{w2}	C _{w2}	D _{w2}	E _{w2}
	3	A _{w3}	B _{w3}	C _{w3}	D _{w3}	E _{w3}
Plastik	1	A _{x1}	B _{x1}	C _{x1}	D _{x1}	E _{x1}
	2	A _{x2}	B _{x2}	C _{x2}	D _{x2}	E _{x2}
	3	A _{x3}	B _{x3}	C _{x3}	D _{x3}	E _{x3}
<i>Edible Coating</i> Jeruk Nipis 0%	1	A _{y1}	B _{y1}	C _{y1}	D _{y1}	E _{y1}
	2	A _{y2}	B _{y2}	C _{y2}	D _{y2}	E _{y2}
	3	A _{y3}	B _{y3}	C _{y3}	D _{y3}	E _{y3}
<i>Edible Coating</i> Jeruk Nipis 1%	1	A _{z1}	B _{z1}	C _{z1}	D _{z1}	E _{z1}
	2	A _{z2}	B _{z2}	C _{z2}	D _{z2}	E _{z2}
	3	A _{z3}	B _{z3}	C _{z3}	D _{z3}	E _{z3}

D. Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap pengujian. Tahap pertama adalah prosedur pembuatan pati singkong dan pembuatan air perasan jeruk nipis. Tahap kedua adalah pembuatan *edible coating*. Tahap ketiga adalah

pengujian zona hambat *edible coating*. Tahap keempat adalah pembuatan bakso, dan tahap kelima adalah pengawetan bakso.

1. Proses Ekstraksi Pati (Meilina dkk., 2011) dengan modifikasi

Tapioka direndam dengan aquades sebanyak 5 kali berat tapioka yang akan diekstrak selama 45 menit. Selanjutnya tapioka dituangkan ke atas kain saring dan diperas sampai cairan keluar sebanyak mungkin. Cairan hasil perasan dituangkan kembali ke atas kain saring lain dan dibiarkan tanpa dilakukan pemerasan sampai tidak ada cairan yang turun dari kain saring. Filtrat yang dihasilkan kemudian didiamkan selama 12 jam. Endapan yang terbentuk disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no 41. Pati yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 5 jam.

Analisis pati tapioka, meliputi :

a) Uji Kadar Abu (Sudarmadji dkk., 1997)

Pertama-tama cawan porselin dipanaskan dalam oven, kemudian diletakkan dalam eksikator dan ditimbang sampai beratnya konstan. Sampel pati sebanyak 2 gram. Sampel dipijarkan dalam tanur dengan suhu 550°C selama 8 jam sampai diperoleh abu berwarna keputih-putihan. Cawan porselin didinginkan dan dieksikator. Kadar abu sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$Kadar\ abu = \frac{[(berat\ cawan + abu) - berat\ cawan]}{berat\ sampel\ awal} \times 100\%$$

b) Uji Kadar Air (Sembiring, 2009) dengan modifikasi

Alat *moisturizer balance* dihidupkan dan dinolkan angkanya. Sebanyak 10 gram sampel pati ditempatkan dalam cawan aluminium. Alat *moisturizer balance* ditutup dan ditunggu sampai memberikan tanda. Angka yang tercatat pada alat *moisturizer balance* dibaca dan dicatat kadar airnya.

c) Penentuan Kadar Amilosa Pati Singkong (Retnaningtyas dan Putri, 2014)

Pati 100 mg ditambah dengan 1 ml etanol 95% dan 9 ml NaOH 1 N dan dipanaskan sampai terjadi gelatinisasi pati. Larutan dibiarkan dingin dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan air sampai tanda tera di labu ukur. Sebanyak 5 ml dari larutan campuran tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Setelah itu, larutan campuran ditambah 1 ml asam asetat 1 N dan 2 ml larutan iod. Kemudian ditambah air sampai batas tera dan didiamkan selama 20 menit. Absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 590 nm dan dihitung kadar amilosanya menggunakan rumus :

$$\% \text{ Amilosa} = \frac{X \cdot \text{faktor pengenceran}}{\text{gr sampel} \cdot 1000} \times 100\%$$

Keterangan :

X : hasil perhitungan dari pengukuran absorbansi sampel

2. Prosedur Pembuatan Air Perasan Jeruk Nipis (Pradani, 2012)

Jeruk nipis di potong menjadi 2 bagian. Kemudian, jeruk nipis diperas dan airnya dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Air perasan jeruk nipis disaring menggunakan kertas saring sampai didapatkan cairan sebanyak 5 ml. Setelah itu air perasan jeruk nipis yang didapat dibuat dengan berbagai konsentrasi dan divortex.

3. Pembuatan *Edible Coating* dari pati singkong dan konsentrasi air perasan jeruk nipis (Warkoyo dkk., 2015) dengan modifikasi

Proses Pembuatan *edible coating* yaitu sampel pati ditimbang dengan konsentrasi 2% (b/vtotal) dan ditambah *aquadest* sampai dengan 100 ml. Kemudian, ditambah dengan gliserol 10% (b/v) dan kalium sorbat 0,6% (b/v). Setelah itu, larutan dipanaskan di atas *hotplate stirrer* sampai terjadi gelatinisasi (suhu $\pm 85^{\circ}\text{C}$) dan dipertahankan selama 5 menit. Suspensi hasil pemanasan didinginkan hingga suhu 37°C . Setelah itu, ditambahkan ekstrak antibakteri dengan konsentrasi 0%, 0,2%, 0,5%, dan 1% (v/vtotal) dan diaduk kembali dengan *stirrer* supaya homogen.

4. Uji Antibakteri Berdasarkan luas zona hambat dengan metode sumuran (Pelczar dan Chan, 1988 dengan modifikasi)

Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* dari agar miring diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan pada 20 ml medium NB. Inokulum dikocok, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Inokulum bakteri yang telah diinkubasi diinokulasikan pada medium MSA dalam petridish sebanyak 100 μl secara *spread plate*, lalu medium dibuat 4 sumuran menggunakan perforator nomor 3 dengan diameter lubang 6 mm.

Edible coating dengan konsentrasi jeruk nipis 0%, 0,2%, 0,5%, dan 1% ditambahkan pada setiap sumuran yang berbeda sebanyak 10 µl. Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Luas zona hambat yang terbentuk dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Luaszonahambat} = 3,14 \times \left\{ \left(\frac{d_2}{2} \right)^2 - \left(\frac{d_1}{2} \right)^2 \right\}$$

$$d_2 = \frac{d \text{ terpanjang} + d \text{ terpendek}}{2}$$

Keterangan :

d_1 = diameter sumuran (cm)

d_2 = rata-rata diameter zona hambat (cm)

5. Tahap pembuatan bakso (Wibowo, 2005) dengan modifikasi

Daging ayam sebanyak 500 g dibersihkan dari lemak permukaan dan dipotong kecil-kecil dan dihaluskan. Setelah daging dihaluskan, ditambahkan lada 1 sdt, bawang putih 2 siung, dan tapioka 150 g dan diaduk sampai tercampur rata. Adonan yang dicampur diuleni sampai kalis, dan adonan didiamkan selama 10 menit. Kemudian, adonan dicetak menjadi butiran bakso menggunakan sendok teh dan dimasukkan ke dalam air yang sudah mendidih. Jika bakso sudah mengapung ke atas, butiran bakso diangkat dan ditiriskan.

6. Pelapisan *Edible Coating* pada Bakso (Warkoyo dkk., 2015) dengan modifikasi

Bakso dicelupkan pada larutan *edible coating* yang masih selama 5 menit. Setelah itu, bakso yang telah dilapisi ditiriskan dan dikeringkan

menggunakan oven selama 30 menit dengan suhu 50°C kemudian disimpan dalam tempat steril pada suhu kamar.

7. Tahap pengawetan Bakso

Bakso terlebih dahulu dicuci dan ditiriskan. Pengawetan bakso diberi 4 perlakuan masing-masing perlakuan berjumlah 1 bakso tanpa pengemas, bakso dibungkus dengan plastik bening, bakso dilapisi dengan *coating* tanpa antibakteri, dan *coating* diberi antibakteri jeruk nipis. Penyimpanan bakso dilakukan pada suhu kamar dan diamati pada hari ke-0 sampai hari ke-4. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk uji mikrobiologis (uji total mikrobial dan uji *Staphylococcus aureus*) dan uji organoleptik (warna, tekstur, dan lendir), sedangkan uji kimia (uji kadar air dan uji kadar protein), dan uji fisik (warna, tekstur) dilakukan pada hari ke-0 dan pada hari ke-4.

8. Uji Sifat Mikrobiologi

a) Uji Total Mikrobial (Fardiaz dan Margino, 1993)

Sampel bakso diambil sebanyak 10 gram dan dilarutkan ke dalam 90 mL *aquadest* steril kemudian divortex selama 2 menit sampai tercampur homogen. Pengenceran 10^{-1} larutan diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam *aquadest* steril pengenceran 10^{-2} dan dibuat seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} masing-masing diambil sebanyak 0,1 mL dan diinokulasikan pada medium *Plate Count Agar* dalam petri secara *spread plate* kemudian diratakan dengan trigalski. Setelah itu, petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh

dihitung menggunakan *colony counter*. Jumlah total mikroorganisme dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Koloni per cawan} = \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{cawan}} \times 1/\text{pengenceran}$$

b) Uji *Staphylococcus aureus* (Badan Standarisasi Nasional, 2011)

Secara aseptis sampel bakso sapi diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil. Sampel bakso sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam wadah steril. Sampel bakso sapi diencerkan dengan 45 ml larutan *aquadest* steril kemudian divortex selama 2 menit sampai tercampur homogen untuk pengenceran 10^{-1} .

Pengenceran diambil sebanyak 100 mikroliter dan diinokulasikan ke medium *Mannitol Salt Agar* kering dalam petri secara *spread plate* lalu diratakan dengan trigalski. Inokulum dibiarkan kira-kira 10 menit hingga terserap ke dalam medium *Mannitol Salt Agar* kering. Apabila inokulum belum terserap, cawan petri diletakkan dalam inkubator dengan posisi menghadap ke atas sekitar 1 jam. Setelah itu, cawan petri dibalik dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Koloni *Staphylococcus aureus* pada *Mannitol Salt Agar* mempunyai ciri-ciri koloni kuning, dikelilingi zona kuning serta mengubah warna medium MSA dari merah menjadi kuning. Jumlah koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh di medium dicatat dan ditentukan dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{\{(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)\} \times d}$$

Keterangan :

$\sum C$: jumlah koloni pada cawan petri
 n_1 : jumlah petri pada pengenceran pertama
 n_2 : jumlah petri pada pengenceran kedua
 D : pengenceran pertama yang dihitung

9. Uji Kimia

a) Uji Kadar Air Bakso (Sembiring, 2009)

Alat *moisturizer balance* dihidupkan dan dinolkan angkanya. Sebanyak 2 gram sampel bakso setiap perlakuan ditempatkan dalam cawan aluminium. Alat *moisturizer balance* ditutup dan ditunggu sampai memberikan tanda. Angka yang tercatat pada alat *moisturizer balance* dibaca dan dicatat kadar airnya.

b) Uji Kadar Protein (Sudarmadji dkk., 1997)

Penentuan kadar protein menggunakan metode mikro kjeldal. Sampel bakso sebanyak 0,2 gram dimasukkan ke dalam labu dan ditambahkan katalisator N sebanyak 1 gram dan H₂SO₄ pekat sebanyak 5 ml untuk didestruksi dalam lemari asam sampai cairan menjadi jernih kemudian didinginkan. Cairan yang sudah dingin dituangkan ke dalam alat destilasi, lalu ditambah dengan asam berat sebanyak 5 ml dan 3 tetes indikator BCEMr, NaOH 40% sebanyak 25 ml hingga warna biru pada kertas lakmus dan batu didih. Larutan HCl 0,02 N sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambah dengan 5 tetes indikator

MR sebagai penampungan. Kemudian filtrat tersebut dititrasi dengan HCl 0,02 N sampai berwarna kuning jerami. Kadar protein dapat dihitung dengan rumus :

$$\%N = \frac{(V \text{ titrasi} \times N \text{ HCl} \times 14,009)}{g \text{ sampel}} \times 100\%$$

$$\%P = (\%N) \times 6,25$$

Keterangan :

N : nitrogen
D : protein

10. Uji Fisik

a) Pengukuran Warna (Jowitt dkk., 1987)

Warna permukaan baksodiukur menggunakan *colour reader*. Skala yang digunakan adalah skala L (kecerahan), a (warna kromatik campuran merah-hijau), b (warna kromatik biru-kuning) Pengujian dilakukan dengan menempelkan sensor pada bakso dan menembakkan sinar pada tiga bagian yang berbeda. Nilai L dapat menunjukkan kecerahan bakso. Hasil pengukuran yang berupa nilai L, a, dan b dicatat serta dihitung x, y, %x, %y, dan %z dengan menggunakan rumus :

$$x = \frac{a + 1,75 L}{5,645 L + a - 3,012 b}$$

$$y = \frac{1,786 L}{5,645 L + a - 3,012 b}$$

b) Analisis Tekstur menggunakan *Lyod Instrument* (Winarni, 1995)

Sampel bakso dipotong dengan bentuk kubus dan seragam kemudian diletakkan di atas meja objek. Tombol enter pada komputer

ditekan hingga jarum penetrometer (*probe*) akan menekan sampel bakso sampai tidak dapat ditekan lagi. Secara otomatis, jarum penetrometer akan ditarik lagi ke atas, setelah itu alat *Universal Testing Instrument* akan menampilkan grafik bakso pada layar komputer. Hasil analisa tekstur bakso dapat dibaca dari hasil *print out* komputer.

11. Uji Organoleptik (Susiwi, 2009)

Metode pengujian organoleptik dalam standar ini adalah uji yang digunakan untuk melihat perbedaan kualitas sensori yang meliputi warna, tekstur, dan lendir pada sampel bakso yang terpapar udara, terbungkus plastik, terlapisi *edible coating* jeruk nipis 0%., dan *edible coating* yang diberi antibakteri jeruk nipis 1%. Pada penelitian ini, panelis yang digunakan merupakan pencicip perseorangan (*individual expert*), yaitu peneliti sendiri yang akan menyatakan besaran kesan yang diperolehnya melalui bentuk skala numerik (*skoring*).

12. Analisis Data (Gaspersz, 1994)

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika hasilnya menunjukkan hasil yang beda nyata, maka dilanjutkan dengan Duncan's *Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui letak beda nyata antara perlakuan dengan menggunakan program SPSS 16.0.