

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknobi-Pangan dan Laboratorium Produksi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta pada bulan Februari sampai Agustus 2018.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah oven (CO-9919 R), grinder (Maksindo), ayakan, erlenmeyer, *waterbath* (Mettler), kain saring, oven (3M-ecocell), kertas saring, timbangan analitik (Phoenix Instrument), gelas pengaduk, aluminium foil, petri dish, inkubator (Mettler), kapas, tabung reaksi, *moisture balance* (Phoenix Instrument BM-65), cawan aluminium, *furnace* (Furnace 1400), cawan, statif, buret, gunting, pisau, telenan, gelas beker, *magnetic stirrer* (IKAMAC), jarum ose, petridish, autoklaf (Hi-Clave HVE-50), baskom, kompor (Rinai), panci, saringan, sarung tangan, sendok, pinset, toples, gelas ukur, *trigalski*, plastik *cetik*, *vortex* (Phoenix Instrument RS-VA 10), *colony counter*, *color reader* (Conica Minolta CR-10), *texture analyzer* (Lloyd Instrument), seperangkat komputer *software Texture ProLite*, probe 41. *laminar airflow* (ESCO), *micropipet* (volume 100-1000 μ L), *microwave* (Elektrolux), aplikasi SPSS, kertas payung, karet, masker, jas lab, korek api dan tisu.

Bahan yang digunakan untuk persiapan sampel adalah kulit buah naga yang diperoleh dari Kebun Salsabila, Kaliurang, asam asetat 0,1 N, alkohol

70%, alkohol 80%, larutan pektin 1%, alkohol 95%, akuades, NaCl, NaOH 0,1 N, *phenophtalein*, NaOH 0,25 N, HCl 0,25 N, jeruk nipis, tapioka (Gunung Agung), CaCl₂ 1,6%, gliserol, biakan *Staphylococcus aureus*, medium *nutrient broth*, medium *Mannitol Salt Agar*, medium *Nutrient Agar*, sedotan, daging sapi, es batu, lada, putih telur, bawang putih, medium *Plate Count Agar*, katalisator N, H₂SO₄ pekat, asam berat, indikator BCEMr, NaOH 40%, HCl 0,02 N, dan indikator MR.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF). Faktor dalam penelitian ini ada dua yaitu pertama adalah variasi perlakuan (kontrol, pektin 10%, pektin 20% dan pektin 30% (b/b tapioka). Kedua adalah lama penyimpanan pada suhu ruang selama 4 hari. Penelitian masing-masing memperoleh pengulangan sebanyak tiga kali. Tabel rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Rancangan Percobaan *Edible Coating* Bakso

Hari (L)	Ulangan	Perlakuan			
		K	A	B	C
0	1	L0K1	L0A1	L0B1	L0C1
	2	L0K2	L0A2	L0B2	L0C2
	3	L0K3	L0A3	L0B3	L0C3
2	1	L2K1	L2A1	L2B1	L2C1
	2	L2K2	L2A2	L2B2	L2C2
	3	L2K3	L2A3	L2B3	L2C3
4	1	L4K1	L4A1	L4B1	L4C1
	2	L4K2	L4A2	L4B2	L4C2
	3	L4K3	L4A3	L4B3	L4C3

Keterangan:

Kontrol = Tanpa pelapisan *edible coating*

A = Pektin 10% (b/b tapioka)

B = Pektin 20% (b/b tapioka)

C = Pektin 30% (b/b tapioka)

D. Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap pengujian. Pertama adalah prosedur pembuatan pektin dan air perasan jeruk nipis. Kedua adalah pembuatan *edible coating*. Ketiga adalah pengujian zona hambat *edible coating*. Keempat adalah pembuatan bakso, kelima adalah pengawetan bakso, keenam uji sifat mikrobiologi, uji kimia uji fisik dan uji organoleptik dan ketujuh analisis data.

1. Persiapan Sampel (Suwoto dkk. 2017 dengan modifikasi)

Kulit buah naga yang sudah dipisahkan dari buahnya, dicuci dengan air mengalir hingga tidak tersisa dagingnya dan duri-duri yang berwarna coklat dihilangkan. Kulit buah naga merah yang sudah bersih, dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50 °C hingga kering. Kulit buah naga yang sudah kering, dihaluskan dengan *grinder* hingga halus dan diayak menggunakan ayakan untuk memisahkan sisa-sisa yang belum halus.

2. Proses Ekstraksi Pektin (Suwoto dkk. 2017 dengan modifikasi)

Kulit buah naga yang sudah halus ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan larutan asam asetat 0,1 N sebanyak 500 ml lalu diaduk hingga homogen. Larutan diekstraksi dengan *waterbath* dengan cara erlenmeyer diletakkan di atasnya dengan suhu 90 °C dengan lama ekstraksi 1 jam.

Setelah 1 jam hasil ekstraksi yang diperoleh disaring dengan kain saring untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh didinginkan terlebih dahulu pada suhu ruang (27 °C), kemudian diendapkan

dengan etanol 80% dengan perbandingan 1:1. Filtrat diendapkan selama 48 jam. Endapan yang diperoleh akan berada di atas permukaan, kemudian disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan etanol 80 % untuk menghilangkan sisa asam yang menempel. Gel pektin yang sudah disaring dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 °C selama 24 jam. Pektin kering yang sudah didapat dihancurkan dengan diremas-remas dan ditimbang beratnya.

3. Uji Karakteristik Pektin

a. Identifikasi Pektin (Nurniswati dkk., 2016)

Larutan pektin 1 % yang sudah dibuat diambil 5 mL, kemudian etanol 95% ditambahkan sebanyak 5 mL, sehingga akan terbentuk endapan bening seperti gelatin dan menandakan bahwa itu pektin.

b. Persen Rendemen (Fitria, 2013)

Persen rendemen merupakan perbandingan berat pektin yang diperoleh dengan berat bahan baku kering setiap ekstraksi.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat total pektin yang diperoleh}}{\text{Berat bahan baku kering}} \times 100\%$$

c. Uji Kadar Air (Sembiring dkk., 2003)

Moisture balance disambungkan ke listrik, dihidupkan dan dikalibrasi angkanya. Cawan aluminium diletakkan di dalam dan dinolkan, lalu pektin sebanyak 1 gram diletakkan di dalam cawan aluminium. Penutup *moisture balance* ditutup dan tombol *start* ditekan, tunggu hingga terdengar tanda bahwa sudah selesai dan hasil dapat dilihat pada layar dan dicatat.

d. Uji Kadar Abu (Badan Standar Nasional, 2014)

Cawan yang digunakan untuk kadar abu, terlebih dahulu dikeringkan di dalam oven dengan suhu 100 °C selama 1 jam atau hingga berat cawan yang digunakan konstan. Setelah cawan konstan didinginkan di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang (B1). Sampel yang akan diuji kadar abunya ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam cawan.

Setelah cawan berisi sampel, cawan dimasukkan ke dalam tanur dan mulai dengan pembakaran menggunakan suhu 500 °C selama 8 jam. Setelah 8 jam tanur dimatikan dan tanur dapat dibuka setelah 6 jam. Kemudian sampel didinginkan di dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang (B2). Kadar abu dihitung dengan rumus

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{B1-B2}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

e. Uji Berat Ekivalen (Ranganna, 1979 dengan modifikasi)

Pektin sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan etanol 95 % sebanyak 2 ml dan 40 ml akuades yang sudah berisi 1 gram NaCl. Kemudian larutan digojog hingga homogen dan ditetaskan indikator *phenolptalein* sebanyak 5 tetes. Larutan dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berubah warna menjadi merah muda dan volume titrasi dicatat. Berat ekivalen dengan rumus berat ekivalen.

$$\text{Berat ekivalen} = \frac{\text{Berat contoh (mg)}}{\text{ml NaOH} \times N \text{ NaOH}}$$

f. Uji kadar metoksil (Ranganna, 1979)

Larutan hasil analisis berat ekuivalen yang diperoleh, ditambahkan larutan NaOH 0,25 N sebanyak 25 mL, selanjutnya digojog dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar (27 °C) dengan keadaan tertutup. Larutan HCl 0,25 N ditambahkan sebanyak 25 mL dan diteteskan sebanyak 3 tetes indikator *phenolptalein*. Larutan selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga warna berubah menjadi merah muda. Kadar metoksil dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Metoksil (\%)} = \frac{\text{ml NaOH} \times 31 \times \text{N NaOH}}{\text{bobot contoh (mg)}} \times 100\%$$

Keterangan:

Angka 31 adalah bobot molekul metoksil

4. Proses pembuatan air perasan jeruk nipis (Pradani, 2012)

Jeruk nipis dipotong menjadi 2 bagian. Potongan jeruk nipis diperas airnya yang dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Air perasan jeruk nipis disaring dengan kertas saring sampai mendapatkan cairan sebanyak 5 mL.

5. Pembuatan *edible coating* dari pektin kulit buah naga merah dan tapioka dengan penambahan perasan jeruk nipis (Layuk dkk., 2001 dengan modifikasi)

Tapioka ditimbang 2 % (b/b total) dan ditambahkan akuades 80 ml, lalu dipanaskan pada suhu 70 °C selama 25 menit menggunakan *magnetic stirrer*. Pektin kulit buah naga ditambahkan dengan berbagai variasi yaitu 10 % ; 20 % ; 30 % (b/b tapioka) serta ditambahkan CaCl₂ 1,6 % (b/b pektin) dan dipanaskan pada suhu 50 °C selama 15 menit. Setiap variasi ditambahkan gliserol 1 ml dan akuades hingga 100 ml. Pemanasan

dilanjutkan hingga suhu 80 °C selama 15 menit. Edible ditunggu hingga dingin lalu dimasukan air perasa jeruk nipis sebanyak 10 % (v/v total) dan diaduk hingga homogen.

6. Uji aktivitas antibakteri pada *edible coating* menggunakan metode sumuran (Reeves dkk., 1978 dengan modifikasi)

Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* dalam agar miring diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasi pada 20 ml medium NB. Biakan digojog dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Suspensi bakteri yang sudah diinkubasi diambil sebanyak 100 µl dan diinokulasikan ke dalam medium NA secara *spread plate*. Medium NA dibuat sumuran sebanyak 4 sumuran dengan perforator nomor 3 dengan diameter lubang 6 mm. *Edible coating* masing-masing variasi dan air perasa jeruk nipis dimasukkan ke dalam sumuran. Medium yang sumurannya sudah terisi diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Luas zona hambat dapat dihitung dengan rumus:

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

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

Keterangan:

d_1 = diameter sumuran (cm)

d_2 = rata-rata diameter zona hambat (cm)

7. Pembuatan bakso (Suprapti, 2003 dengan modifikasi)

Daging sapi segar tanpa lemak sebanyak 500 gram yang sudah dibersihkan lemak permukaannya dan dihaluskan menggunakan *food processor* bersama es batu. Daging kemudian ditambahkan bumbu-bumbu seperti lada sebanyak 1 sendok teh, bawang putih 3 siung, bawang putih

digoreng sebanyak 5 siung yang sudah ditumbuk, 1 buah putih telur dan tapioka sebanyak 7 sendok makan. Saat semua bahan sudah dimasukkan, adonan dicampur dan diuleni hingga kalis. Setelah adonan menjadi kalis, didiamkan selama 10 menit. Kemudian, adonan dibentuk menjadi bentuk bakso yaitu bola-bola dan dimasukkan ke dalam air mendidih. Saat bakso sudah mengapung di permukaan bakso ditiriskan karena itu tanda bakso sudah matang.

8. Pelapisan *edible coating* pada bakso (Warkoyo dkk., 2014 dengan modifikasi)

Bakso dengan perlakuan dicelupkan dalam larutan *edible coating* selama 5 menit. Setelah itu, bakso yang sudah dilapisi ditiriskan dan dikeringkan sampai keringnya sempurna, kemudian disimpan di tempat tertutup pada suhu kamar (27 °C). Penyimpanan dilakukan selama 4 hari yang disertai dengan pengamatan pada hari ke-0, ke-2 dan ke-4. Bakso dengan perlakuan kontrol dilakukan dengan tanpa pelapisan *edible coating* dan dimasukan ke dalam tempat tertutup dan disimpan pada suhu kamar (27 °C)

9. Uji sifat mikrobiologi bakso

a. Angka Lempeng Total (Badan Standar Nasional, 2014)

Sampel bakso diambil sebanyak 1 gram, dihaluskan dan dilarutkan dalam 9 ml akuades steril sebagai larutan pengencer yang akan dihomogenkan menggunakan vortex sebagai pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilakukan sampai pengenceran 10^{-5} dengan cara sama seperti sebelumnya yaitu larutan dari pengenceran sebelumnya diambil 1000 μ l dan dimasukkan ke dalam larutan pengencer akuades steril

9 ml. Masing-masing pengenceran yang telah dibuat, diambil sebanyak 1000 µl, dimasukkan ke dalam pada petri yang masih kosong. Kemudian medium *plate count agar* (PCA) dituangkan. Petri yang sudah berisi sampel dan medium dihomogenkan dengan mengoyangkan petri membentuk angka delapan. Secara teknik dapat disebut *pour plate*. Setelah diinokulasikan sampel diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37 °C. Koloni yang tumbuh akan terlihat dan dihitung dengan *colony counter*. Total mikroorganisme dapat dihitung dengan rumus:

$$ALT = \frac{\Sigma c}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2) \times d]}$$

Keterangan:

C : total koloni dari seluruh cawan yang dihitung

n1 : jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n2 : jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d : pengenceran pertama yang dihitung

b. Uji *Staphylococcus aureus* (Badan Standar Nasional, 2014)

Sampel bakso diambil sebanyak 1 gram, dihaluskan dan dilarutkan dalam 9 ml akuades steril sebagai larutan pengencer yang akan dihomogenkan menggunakan vortex sebagai pengenceran 10⁻¹. Pengenceran dilakukan sampai pengenceran 10⁻² dengan cara sama seperti sebelumnya yaitu larutan dari pengenceran sebelumnya diambil 1000 µl dan dimasukkan ke dalam larutan pengencer akuades steril 9 ml. Masing-masing pengenceran yang telah dibuat, diambil sebanyak 100 µl dan diinokulasikan pada medium *Mannitol Salt Agar* (MSA) secara *spread plate*. Sampel diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C. Koloni *Staphylococcus aureus* mempunyai ciri-ciri berwarna kuning, dikelilingi zona kuning dan akan mengubah warna medium

MSA yang dari awalnya merah menjadi kuning. *Staphylococcus aureus*

dihitung dengan rumus

$$ALT = \frac{\Sigma C}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2) \times d]}$$

Keterangan:

C : total koloni dari seluruh cawan yang dihitung

n1 : jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n2 : jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d : pengenceran pertama yang dihitung

10. Uji kimia bakso

a. Uji Kadar Air (Badan Standar Nasional, 2014)

Moisture balance disambungkan ke listrik, dihidupkan dan dikalibrasi angkanya. Cawan aluminium diletakkan di dalam dan dinolkan, lalu pektin sebanyak 1 gram diletakkan di dalam cawan aluminium. Penutup *moisture balance* ditutup dan tombol *start* ditekan, tunggu hingga terdengar tanda bahwa sudah selesai dan hasil dapat dilihat pada layar dan dicatat.

b. Uji kadar protein dengan metode mikro Kjeldahl (Badan Standar Nasional, 2014)

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 dan didinginkan. Cairan yang sudah dingin dimasukkan ke dalam alat destilasi dan ditambahkan akuades sebanyak 10 mL, kemudian didestilasi dengan NaOH 40 % sebanyak 20 mL. Hasil yang sudah didestilasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi 5 ml H₃BO₃.

Kemudian hasil destilasi dititrasi dengan HCl 0,02 N sampai warna menjadi merah muda yang awalnya biru muda. Kadar protein dihitung dengan rumus

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

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

Keterangan:

N : nitrogen

D : protein

14,009 : bobot atom nitrogen

6,25 : faktor protein untuk daging

11. Uji fisik bakso

a. Pengukuran warna (Jowitt dkk., 1987)

Warna permukaan bakso diukur dengan *color reader*. Skala yang digunakan adalah L (kecerahan), a (warna kromatik campuran merah-hijau), b (warna kromatik biru-kuning). *Color reader* ditempelkan pada bakso pada tiga bagian yang berbeda. Hasil pengukuran yang berupa nilai L, a, dan b dicatat dan dihitung dengan rumus:

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

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

b. Analisis Tingkat Kekenyalan (Winarni, 1995)

Analisis kekenyalan menggunakan *Texture Analyzer*, dipastikan semua perangkat terhubung. Sampel bakso dipotong menjadi bentuk kubus dengan ukuran 3 cm. Jarum penusuk (*probe*) sudah dipasang dan sudah diatur mendekati sampel. Bakso diletakkan di atas meja objek. Program komputer dioperasikan untuk menjalankan probe dan dipastikan nilai pada monitor adalah nol, kemudian menu *start test*

dipilih, sehingga *probe* dapat bekerja dan akan kembali ke posisi semula. Hasil akan muncul grafik bakso pada layar komputer. Hasil analisa tekstur dapat dibaca dan di *print*. Kekenyalan dilihat dari jarak yang ditempuh pada tekanan kedua yang nanti dibandingkan dengan jarak tempuh pada tekanan pertama.

12. Uji organoleptik (Susiwi, 2009 dengan modifikasi)

Organoleptik yang diamati untuk perbedaan kualitas adalah warna, lendir, bau dan tekstur bakso yang dilapisi *edible coating* dengan semua perlakuan variasi yang ada. Penelitian ini akan dilakukan oleh pencicip perseorangan (*individual expert*) yaitu peneliti sendiri yang akan memberikan skala numerik (*skoring*) antara satu sampai lima.

13. Analisis data (Gaspersz, 1994)

Data yang telah didapat dianalisis dengan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95 %. Jika hasil menunjukkan hasil yang beda nyata, maka dilanjutkann dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat letak beda nyata antara perlakuan dengan program SPSS.