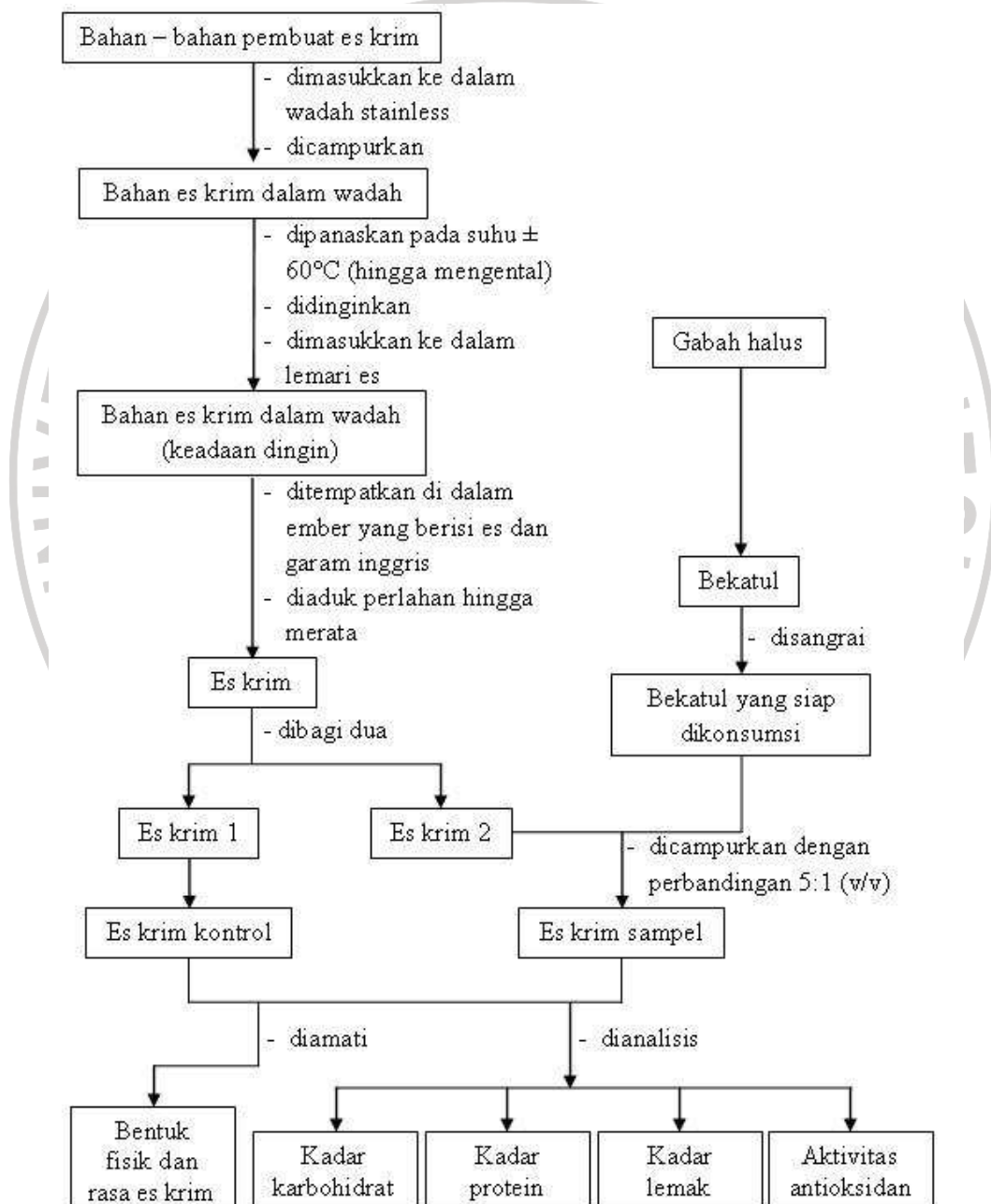


BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Alur penelitian ini seperti ditunjukkan pada diagram alir di bawah ini:



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap pekerjaan, antara lain preparasi bekatul, pembuatan es krim, analisis kadar karbohidrat, analisis kadar protein, analisis kadar lemak, dan uji aktivitas zat antioksidan pada es krim.

3.2.1 Tahap Preparasi Bekatul

Karena bekatul yang digunakan berasal dari gabah halus hasil penggilingan kedua dari padi, maka perlu dilakukan pengayakan gabah halus (dedak) agar bekatul terpisah dari gabah. Langkah pertama adalah dengan mengayak gabah halus yang masih segar (baru) diayak sebanyak lima kali dengan menggunakan saringan yang seukuran dengan saringan teh (saringan yang paling halus yang dijual secara umum). Langkah kedua setelah proses pengayakan manual dilakukan dengan cara mengayak kembali bekatul hingga ukuran 80 mesh dengan menggunakan mesin pengayak. Pengerjaan pengayakan dengan menggunakan mesin dilakukan di Tekmira.

Langkah terakhir adalah pengeringan bekatul yang dilakukan dengan cara memanaskannya di atas wajan kering (disangrai). Penyangraian dilakukan pada suhu $\pm 50-60^{\circ}\text{C}$ untuk mencegah denaturasi protein. Proses ini dilakukan untuk menghambat kerja enzim lipase yang dapat menghidolisis lemak menjadi asam lemak bebas.

3.2.2 Tahap Pembuatan Es Krim

Pembuatan es krim melibatkan penggunaan beberapa alat, diantaranya adalah wadah logam stainless, ember kecil (yang ukurannya sedikit lebih besar dari wadah logam), pengaduk, *freezer*, dan lemari es. Sedangkan bahan – bahan yang digunakan antara lain adalah susu bubuk *full cream*, gula pasir, *wheapcream*, serbuk selulosa atau gelatin (yang digunakan sebagai *stabilizer*), air, dan zat penambah rasa.

Pada pembuatan es krim, yang pertama dilakukan adalah menentukan komposisi dari tiap bahan dasar es krim. Menurut literatur, agar mendapat es krim dengan tekstur yang baik maka komposisinya adalah: air sebanyak 60%; susu bubuk 20%; *wheapcream* 4-5% (tergantung pada kandungan krim dalam susu); gula pasir 15%; dan *stabilizer* 0,3-0,5% dari total massa bahan 1 kg.

Selain bahan – bahan tersebut diperlukan juga suatu *emulsifier* atau zat pengemulsi. Zat pengemulsi ini berupa protein yang sebenarnya sudah ada di dalam susu, tetapi jika diperlukan dapat pula digunakan sedikit putih telur sebagai *emulsifier*. Kadar emulsifier yang dibutuhkan sebanyak 0,3-0,5% dari total massa bahan. (Effendi, F., 2006).

Pembuatan es krim kontrol

Bahan – bahan pembuatan es krim dicampurkan di dalam suatu wadah yang terbuat dari logam stainless dan dihomogenkan. Setelah homogen, adonan tersebut dipanaskan pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ sambil diaduk perlahan hingga mengental. Pemanasan dihentikan setelah adonan mengental, yang menandakan telah terbentuk emulsi dari air dan lemak yang dicampurkan.

Adonan yang telah dipanaskan kemudian dibiarkan hingga dingin. Setelah dingin kemudian adonan dimasukkan ke dalam lemari es dan didiamkan selama \pm 4 jam jika menggunakan *stabilizer* nabati (serbuk selulosa), atau \pm 24 jam jika menggunakan *stabilizer* hewani (gelatin).

Setelah didiamkan beberapa lama di dalam lemari es, wadah dan adonan dimasukan ke dalam ember, yang ukurannya lebih besar daripada wadah, yang berisi es batu yang dicampur dengan garam Inggris. Adonan diaduk perlahan-lahan dan diusahakan agar semua bagian adonan menyentuh dinding wadah. Pengadukan dilakukan selama \pm 45 menit hingga es krim memadat. Es krim dipindahkan ke dalam wadah lain yang bersih dan steril, lalu disimpan di dalam freezer.

Fortifikasi bekatul terhadap es krim

Pada tahap ini bekatul dicampurkan dengan es krim yang sudah jadi (es krim kontrol). Es krim dibiarkan mencair pada suhu kamar, kemudian dicampurkan dengan bekatul yang siap dikonsumsi (yang dihasilkan pada tahap preparasi bekatul). Perbandingan bekatul dan es krim yang dicampurkan sebesar 1:5 (v/v). Es krim yang telah dicampurkan (es krim sampel penelitian) dipadatkan kembali dengan cara yang sama seperti pada saat memadatkan es krim kontrol.

3.2.3 Penentuan Kadar Karbohidrat dengan Metode Luff Schoorl

Penetapan kadar karbohidrat dengan metode Luff Schoorl dalam percobaan ini dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu:

1. Pembuatan larutan Luff Schoorl
2. Penetapan kadar karbohidrat sebelum inversi, dan
3. Penetapan kadar karbohidrat setelah inversi kuat.

Penetapan sebelum inversi dilakukan untuk mengetahui jumlah gula pereduksi yang terdapat dalam sampel. Sedangkan penetapan setelah inversi kuat dilakukan untuk menentukan kadar karbohidrat di dalam suatu sampel yang mengandung polisakarida.

Alat – alat yang diperlukan dalam penentuan kadar karbohidrat ini antara lain gelas kimia 100 mL, gelas ukur 10 mL, gelas ukur 25 mL, labu ukur 100 mL, pipet volumetrik 5 mL, pipet volumetrik 10 mL, labu Erlenmeyer 250 mL, corong kaca, botol timbang, dan neraca analitik. Sedangkan bahan – bahan yang digunakan antara lain sampel gula yang akan dianalisis, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N, KI 20%, H_2SO_4 25%, NaOH 20%, HCl 6,76%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 anhidrat, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan larutan kanji 0,1%.

Metode Analisis

a. Pembuatan larutan Luff Schoorl

Larutan I dibuat dengan cara melarutkan ± 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 mL aquades, kemudian ditambah dengan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dalam 50 mL aquades. Sedangkan larutan II dibuat dengan cara menimbang $\pm 143,8$ g Na_2CO_3 anhidrat dan dilarutkan sedikit demi sedikit dalam 100 mL aquades hangat, lalu dibiarkan hingga dingin pada suhu kamar. Selanjutnya kedua larutan dicampurkan dan dimasukkan kedalam labu ukur

1000 mL, dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas. Larutan dalam labu kemudian dikocok dan disimpan satu malam.

b. Preparasi sampel

Sebanyak 12,5 gram sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 25 mL aquades. Larutan kemudian disaring, dan filtratnya ditampung dalam labu ukur 100 mL. Larutan kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

Larutan blanko dibuat dari 5 mL larutan Luff-Schoorl dan 5 mL aquades. Larutan blanko dididihkan selama 3 menit lalu didinginkan. Larutan yang telah dingin kemudian ditambah 3 mL H_2SO_4 25% dan 2 mL KI 20%. Larutan kemudian dititrasi dengan larutan standar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dengan indikator larutan kanji 0,1%.

c. Analisis sebelum inversi

Sebanyak 5 mL filtrat gula (sampel/kontrol) dipipet menggunakan pipet volumetrik dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Kemudian ditambah 5 mL larutan Luff-Schoorl, 5 mL aquades dan satu butir batu didih. Labu yang berisi campuran larutan kemudian dididihkan selama 3 menit, lalu didinginkan.

Larutan yang telah dingin kemudian ditambah 3 mL H_2SO_4 25% dan 2 mL KI 20%. Larutan kemudian dititrasi dengan larutan standar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dengan indikator larutan kanji 0,1%. Titrasi sampel dan kontrol dilakukan sebanyak dua kali (duplo).

d. Analisis setelah inversi kuat

Sebanyak 50 mL filtrat gula (sampel/kontrol) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambah 20 mL aquades dan 10 mL HCl 6,76% dan dikocok. Labu kemudian dimasukkan ke dalam penangas dengan suhu 60°C sambil digoyang selama 3 menit, lalu didiamkan dalam penangas selama 7 menit. Setelah itu didinginkan hingga suhu 20°C. Larutan gula invert dinetralkan dengan NaOH 20% hingga pH larutan disekitar 7, kemudian diencerkan dengan menambahkan aquades hingga tanda batas.

Sebanyak 5 mL larutan gula invert (sampel/kontrol) dipipet menggunakan pipet volumetrik dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Kemudian ditambah 5 mL larutan Luff-Schoorl, 5 mL aquades dan satu butir batu didih. Labu yang berisi campuran larutan kemudian dididihkan selama 3 menit, lalu didinginkan.

Larutan yang telah dingin kemudian ditambah 3 mL H₂SO₄ 25% dan 2 mL KI 20%. Larutan kemudian dititrasikan dengan larutan standar Na₂S₂O₃ dengan indikator larutan kanji 0,1%. Titrasi sampel dan kontrol dilakukan sebanyak dua kali (duplo).

e. Perhitungan kadar karbohidrat dalam sampel

Kadar karbohidrat ditentukan berdasarkan penghitungan kadar glukosa, yang ditentukan dengan rumus berikut ini:

$$V_{\text{tiosulfat } 0,1\text{N}} = \frac{(V_{\text{titran blanko}} - V_{\text{titran sampel}}) N_{\text{tiosulfat}}}{0,1\text{N}}$$

$$\text{Massa glukosa} = 2,6167 \text{ g/mL} \times V_{\text{tiosulfat } 0,1\text{N}}$$

$$\text{Kadar Glukosa} = \frac{\text{massa glukosa} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{massa sampel}} \times 100\%$$

dan kadar karbohidrat dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Kadar Karbohidrat} = 0,90 \times \text{Kadar Glukosa}$$

(Sudarmadji, 1989)

3.2.4 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Kjeldahl

Dalam metode ini kadar protein ditentukan berdasarkan kandungan N total dari sampel. Sampel didestruksi terlebih dahulu kemudian diencerkan dan dititrasi dengan HCl 0,1N.

Penentuan kadar protein dengan metode Kjeldahl ini melibatkan penggunaan beberapa alat, antara lain labu destruksi (labu Kjeldahl), set alat destilasi, *heating mantle*, spatula, buret mikro 5 mL, pipet volumetrik 5 mL, pipet filter, neraca analitik, labu ukur 50 mL, labu Erlenmeyer 125 mL, gelas kimia 1L, dan corong gelas.

Sedangkan bahan – bahan yang diperlukan antara lain asam sulfat pekat, NaOH 30%, H₃BO₃ 3%, HCl 0,1N, boraks (Na₂B₄O₇.10H₂O), etanol 95%, aquades bebas CO₂, indikator Tashiro (campuran metil merah 0,2% dan metil biru 0,1% dengan perbandingan volume 1:1), dan garam Kjeldahl (campuran CuSO₄.5H₂O dan K₂SO₄ dengan perbandingan massa 1:3).

Metode Analisis

a. Destruksi sampel

Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam labu Kjeldahl dan ditambahkan 5 gram garam Kjeldahl sebagai katalis, serta beberapa batu didih.

Campuran dipanaskan dalam 10 mL H₂SO₄ pekat sehingga terjadi destruksi hingga larutan jernih. Larutan yang telah didestruksi kemudian didinginkan.

b. Penentuan kadar N total

Larutan sampel hasil destruksi dipindahkan ke dalam labu takar 50 mL dan diencerkan hingga tanda batas. Larutan dipipet sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam alat destilasi, lalu ditambah 10 mL NaOH 30%. Campuran tersebut didestilasi dan eluatnya ditampung dalam 10 mL H₃BO₃ 3% dan 2 tetes indikator tashiro. Destilasi dilakukan hingga diperoleh destilat sebanyak 75 mL, selanjutnya destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai warna hijau berubah menjadi ungu.

Kadar N total di dalam sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%N \text{ dalam contoh} = \frac{10 \times \text{mL HCl} \times N \text{ HCl} \times 14 \times 100\%}{\text{berat sampel}}$$

Dimana: 10 = faktor pengenceran

mL HCl = volume HCl yang dipakai untuk mentitrasi destilat

N HCl = Normalitas HCl yang digunakan

14 = BM nitrogen (g/mol)

(SNI 01-2891-1992 butir 7.1)

3.2.5 Penentuan Kadar Lemak

Dalam metode ini kadar lemak dari sampel ditentukan berdasarkan jumlah dari massa trigliserida dan massa asam lemak bebas yang tersisa setelah sampel diekstrak dengan pelarut lemak.

Alat – alat yang diperlukan dalam penentuan kadar lemak dengan metode ekstraksi pelarut ini antara lain gelas kimia 100 mL, gelas kimia 250 mL, corong pisah 250 mL, corong kaca, kertas saring, pemanas, dan neraca analitik. Bahan – bahan yang diperlukan antara lain sampel yang berupa kedua jenis es krim, n-Heksana, etanol 95%, aquades, Na_2CO_3 1%, Na_2SO_4 anhidrat, dan H_2SO_4 10%.

Metode Analisis

Sampel yang akan dianalisis ditimbang sebanyak 1 g, lalu dicairkan dengan cara pemanasan. Setelah cair, sampel dilarutkan dalam campuran pelarut yang terdiri dari 35 mL n-Heksana dan 6,5 mL etanol 95%.

Larutan sampel dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah 12,5 mL Na_2CO_3 1%. Corong pisah kemudian dikocok selama ± 30 detik atau hingga pengocokan merata, lalu didiamkan hingga terbentuk dua fasa larutan. Fasa air (bagian bawah) dipisahkan dan ditampung dalam penampung air.

Larutan yang tersisa di dalam corong pisah ditambah 1,5 mL etanol 95% dan 5 mL Na_2CO_3 1%, dan corong pisah kembali dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua fasa. Fasa air (bagian bawah) kembali dipisahkan dan ditampung dalam penampung air. Proses pembilasan ini dilakukan hingga tiga kali. Larutan yang tersisa setelah tiga kali pembilasan ditambah 6,5 mL aquades, dan corong pisah kembali dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua fasa. Fasa air kembali dipisahkan dan ditampung dalam penampung air, dan larutan yang tersisa di dalam corong pisah dipindahkan ke dalam gelas kimia yang telah diketahui massanya (yang dicatat sebagai massa gelas awal).

Gelas kimia yang berisi larutan hasil ekstraksi dipanaskan pada suhu sekitar 60-65°C hingga massa cairan tidak berubah lagi (konstan). Pemanasan dihentikan setelah massa cairan dalam gelas kimia konstan, lalu gelas kimia dan isinya dibiarkan pada suhu kamar hingga dingin. Gelas beserta isinya kemudian ditimbang dalam keadaan dingin dan massanya dicatat sebagai massa gelas akhir. Selisih massa gelas awal dan massa gelas akhir dicatat sebagai massa trigliserida.

Larutan yang ditampung dalam penampung air (pada proses sebelumnya) dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya ke dalam corong pisah ditambahkan 1,5 mL H₂SO₄ 10 %, lalu dikocok. Sebanyak 12,5 mL n-Heksana ditambahkan ke dalam corong pisah yang berisi larutan, kemudian corong kembali dikocok hingga pengocokan merata lalu didiamkan hingga terbentuk dua fasa. Fasa heksan (bagian atas) dipisahkan dan ditampung dalam penampung heksan.

Larutan yang tersisa di dalam corong pisah kembali dibilas dengan 12,5 mL n-Heksana sebanyak dua kali. Fasa heksan dari ketiga kali pembilasan dipisahkan dan ditampung dalam penampung heksan.

Larutan dalam penampung heksan kemudian ditambah 1 g Na₂SO₄ anhidrat, kemudian larutan disaring menggunakan corong kaca dan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan dari proses penyaringan ditampung dalam gelas kimia yang telah diketahui massanya (yang dicatat sebagai massa gelas awal).

Filtrat dalam gelas kimia kemudian dipanaskan pada suhu ± 60-65°C hingga massa cairan dalam gelas kimia konstan. Gelas kimia beserta isinya kemudian dibiarkan pada suhu kamar hingga dingin, lalu gelas dan isinya ditimbang dan

massanya dicatat sebagai massa gelas akhir. Selisih massa gelas awal dan massa gelas akhir dicatat sebagai massa asam lemak bebas.

(Sudarmadji, 1984)

3.2.6 Analisis Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif dengan Metode Radikal DPPH

Alat – alat yang diperlukan dalam uji aktivitas zat antioksidan ini antara lain gelas kimia 100 mL, gelas ukur 10 mL, tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, dan batang pengaduk. Sedangkan bahan – bahan yang diperlukan diantaranya es krim sampel, es krim kontrol, metanol, dan serbuk DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal.

Metode Analisis

Larutan DPPH 200 ppm dibuat dengan cara menimbang secara teliti 10 mg DPPH dan melarutkannya di dalam metanol hingga 50 mL. Masing – masing sampel yang akan diuji dicairkan dengan pemanasan lalu dibiarkan hingga dingin. 2 mL sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu 1 mL metanol dan 5 mL larutan DPPH ditambahkan ke dalam masing masing tabung reaksi. Isi masing – masing tabung reaksi dikocok hingga merata lalu didiamkan beberapa saat. Setelah didiamkan, perubahan warna pada tiap sampel diamati dan dibandingkan.

(Prakash, 2001)