

BAB III

METODE PENELITIAN

Untuk mengetahui efektivitas penggunaan sari buah jeruk nipis terhadap ketahanan nasi, dilakukan penelitian di Laboratorium Riset Kimia Makanan dan Material Jurusan Pendidikan Kimia serta di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FPMIPA UPI selama kurang lebih 3 bulan yaitu sejak tanggal 23 Maret 2009 hingga 29 Juni 2009.

Dalam penelitian ini digunakan sampel nasi yang berasal dari beras jenis Setra Super dan buah jeruk nipis yang diperoleh dari Pasar Induk Soreang. Buah jeruk nipis tersebut diambil sari buahnya sebelum digunakan sebagai pengawet nasi.

3.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat penanak sekaligus penghangat nasi (*magic com*) merek Miyako (spesifikasi: model MCM-705; kapasitas 1,8 L; voltage 220-240 V ac; Watt 350-400w; frekwensi 50-60 Hz; No. 2506006399), spektrofotometer UV-Vis Shimadzu, alat pemeras buah jeruk, pisau, sendok, piring kecil, gelas kaca, neraca analitik, cawan porselen, desikator, oven, autoklap, pipet tetes, tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur 25 mL dan 50 mL, erlenmeyer, inkubator, gelas piala, batang pengaduk, pipet ukur, pipet volume, *coloni counter* merek Shimadzu, labu Kjeldhal 100 ml, pemanas listrik, pendingin gondok, labu ukur

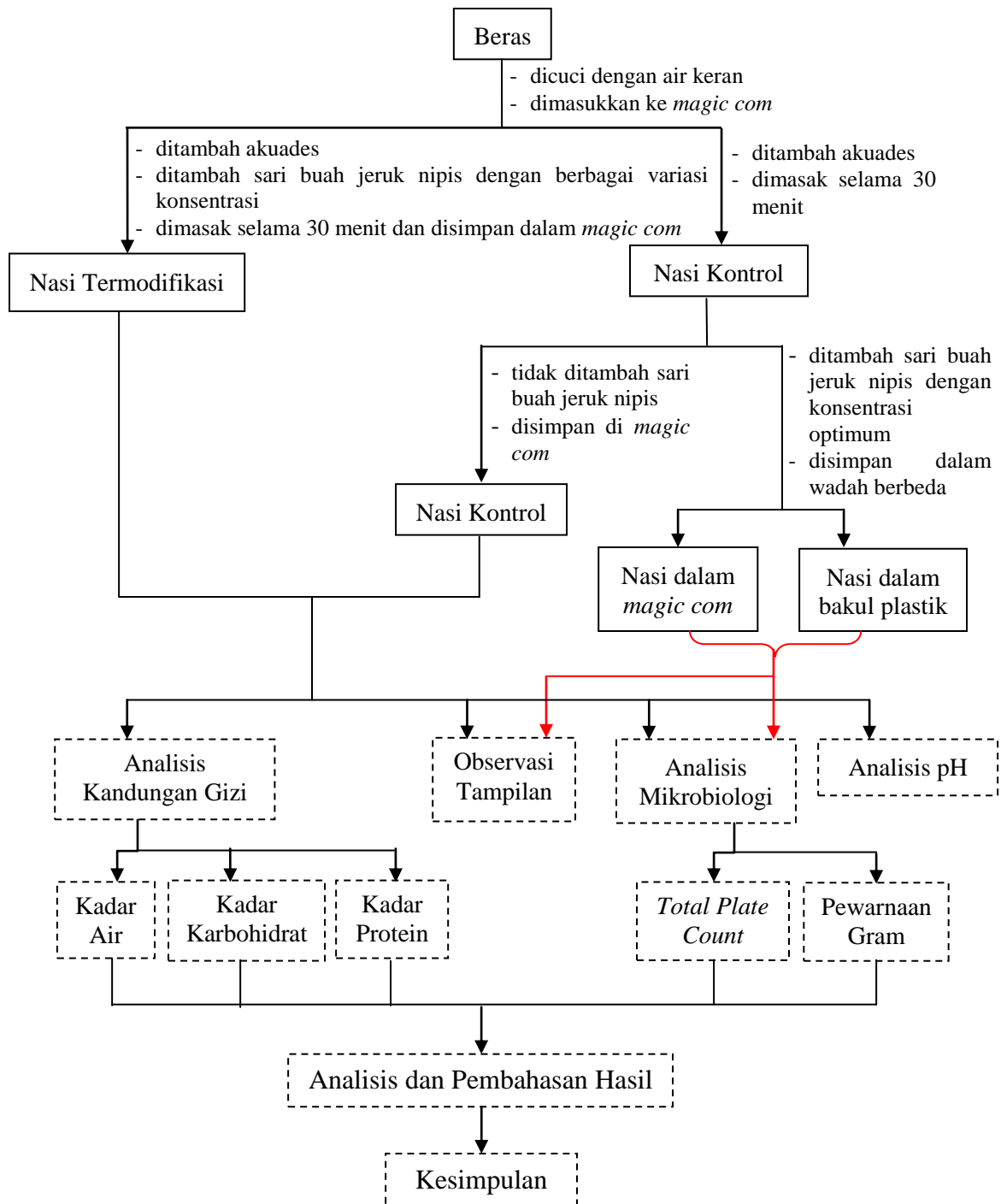
100 ml, corong kaca, pipet gondok 10 ml dan 25 ml, stop watch, buret 50 mL, gelas kimia 100; 250; 500 mL, labu Erlenmeyer 250 ml, labu dasar bulat 250 mL, piknometer 10 cc, mikroskop, pembakar spirtus, kaca preparat, dan jarum inokulasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras jenis Setra Super, buah jeruk nipis, medium Nutrien agar, akuades, campuran selen (serbuk SeO_2 , K_2SO_4 dan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), indikator campuran (larutan bromocresol green 0.1 % dan larutan merah metil 0,1% dalam alkohol 95% secara terpisah), larutan asam borat 3%, larutan asam klorida 0,01 N, larutan natrium hidroksida 0,10245 M, larutan asam klorida 3%, larutan natrium hidroksida 30%, kertas lakmus, indikator fenolftalein (PP), larutan Luff Schrool, larutan KI 20%, H_2SO_4 25%, larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$ 0,1 N, larutan kanji 0,5%, larutan kristal violet, larutan iodium, safranin, alkohol 96%.

3.2. Bagan Alir Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan penambahan sari buah jeruk nipis pada nasi dalam berbagai variasi konsentrasi sari buah jeruk nipis, waktu penambahan sari buah jeruk nipis, dan tempat penyimpanan nasi yang telah ditambahkan sari buah jeruk nipis sehingga akan diperoleh kondisi optimal penggunaan sari buah jeruk nipis dan tempat penyimpanan nasi untuk menjaga ketahanan/mengawetkan nasi.

Untuk lebih jelasnya, penelitian ini melalui tahapan-tahapan yang secara garis besar digambarkan dalam bagan alir penelitian sebagai berikut.



Gambar 3.1 Bagan alir proses penelitian

3.3. Tahapan Penelitian

3.3.1. Preparasi Sari Buah Jeruk Nipis

Pada tahap ini, sebanyak buah jeruk nipis dicuci bersih dan dipotong menjadi dua bagian kemudian diperas menggunakan alat pemeras jeruk sehingga diperoleh sari buah jeruk nipis. Sari buah tersebut dimasukkan ke botol plastik dan disimpan pada suhu 4-5°C, kemudian ditentukan berat jenis; kadar asam sitrat; dan pH-nya, serta diamati kestabilannya.

Penentuan Berat Jenis Sari Buah Jeruk Nipis

Pada penentuan massa jenis ini, sari buah jeruk nipis dimasukkan ke dalam piknometer 10 mL dengan tutup tanpa termometer yang kering dan sudah diketahui bobotnya. Sari buah jeruk nipis diisi sampai melebihi tanda tera, kemudian piknometer ditutup. Sisa-sisa sari buah jeruk nipis yang terdapat pada piknometer dibersihkan, kemudian piknometer tersebut ditimbang. Massa jenis sari buah jeruk nipis dapat diketahui melalui persamaan berikut ini:

$$\text{Berat Jenis} = \frac{w}{v}$$

Keterangan: BJ = berat jenis
w = bobot sampel
v = volume piknometer

Data hasil pengukuran berat jenis tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan besar konsentrasi sari buah jeruk nipis yang ditambahkan ke dalam sampel nasi dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Berat Jenis } (\rho) = \frac{\text{berat zat } (w)}{\text{volume zat } (v)}$$

Berat zat (w) = berat jenis (ρ) x volume zat (v)

$$\% \text{Sari buah jeruk nipis} = \frac{\text{berat sari buah jeruk nipis (g)}}{\text{berat beras (g)} + \text{berat air (g)}} \times 100\%$$

Penentuan Kadar Asam Sitrat dalam Sari Buah Jeruk Nipis

Penentuan ini dilakukan untuk mengetahui kestabilan asam sitrat dalam sari buah jeruk nipis selama masa penyimpanan. Kadar asam sitrat ini ditentukan dengan metode titrasi asam basa. Sari buah jeruk nipis dimasukkan ke labu Erlenmeyer 250 mL, kemudian ditambahkan akuades dan indikator fenolftalein. Setelah itu, sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 M sampai berwarna merah muda. Kadar asam sitrat dapat diketahui melalui persamaan berikut:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$M_1 = \frac{V_2 \times M_2}{V_1}$$

$$M = \frac{n}{V}$$

$$n = M \times V$$

$$\frac{w}{Mr} = M \times V$$

$$\frac{w}{V} = M \times Mr$$

Keterangan: M_1 = molaritas asam sitrat (mol.L^{-1})
 M_2 = molaritas NaOH (mol.L^{-1})
 V_1 = volume asam sitrat (mL)
 V_2 = volume NaOH (mL)
 n = jumlah mol zat (mol)
 M = molaritas zat (mol.L^{-1})
 V = volume larutan (L)
 w = massa zat (g)
 Mr = massa relatif zat (g.mol^{-1})

Penentuan pH Sari Buah Jeruk Nipis

Penentuan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat keasaman sari buah jeruk nipis. pH sari buah jeruk nipis ini dilakukan setiap kali akan digunakan. Sari buah jeruk nipis dimasukkan ke gelas kimia 100 mL, kemudian diukur pH-nya menggunakan pHmeter yang telah dikalibrasi.

Penentuan Stabilitas Sari Buah Jeruk Nipis dalam Nasi

Pengujian ini dilakukan untuk menentukan apakah terdapat kerusakan pada asam sitrat selama proses pemasakan beras. Penentuan stabilitas sari buah jeruk nipis ini dilakukan melalui metoda spektrofotometri, yaitu membuat kurva serapan sari buah jeruk nipis pada panjang gelombang 190-300 nm (*Rusdiana, tanpa tahun*).

Sari buah jeruk nipis dimasukkan ke dalam dua buah gelas kimia yang berbeda (gelas A dan B). Sari buah jeruk nipis yang ada di dalam gelas kimia A dididihkan di atas api bunsen, sedangkan sari buah jeruk nipis yang ada di gelas kimia B disimpan pada suhu ruangan. Setelah mendidih, sejumlah sari buah jeruk nipis tersebut dimasukkan ke labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan akuades sampai tanda tera. Begitu juga dengan sari buah jeruk nipis yg ada di gelas kimia B. Setelah itu, kedua larutan sampel diukur serapannya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 190-300 nm.

3.3.2. Pembuatan Nasi

Pada tahap ini, sebanyak beras dicuci bersih dengan air kran. Setelah itu beras dimasukkan ke *magic com* (penanak sekaligus penghangat nasi) dan ditambah akuades. Untuk penentuan konsentrasi optimum, sari buah jeruk nipis dengan

berbagai variasi konsentrasi ditambahkan sebelum menanak nasi (setelah dilakukan penambahan akuades ke *magic com* yang telah berisi beras), beras kemudian dimasak selama ± 30 menit. Nasi yang telah matang selanjutnya disimpan dan dihangatkan terus-menerus di dalam *magic com*, kemudian diamati ketahanannya, ditentukan waktu kadaluarsanya dihitung jumlah bakterinya, diukur pH-nya, serta ditentukan kadar air; karbohidrat; dan proteinnya.

Pada penentuan waktu penambahan sari buah jeruk nipis dan tempat penyimpanan nasi optimum, sari buah jeruk nipis dengan konsentrasi optimum ditambahkan pada nasi yang telah matang. Sampel nasi tersebut disimpan di dua tempat yang berbeda yaitu di dalam *magic com* dan di dalam bakul plastik, kemudian diamati ketahanannya, ditentukan waktu kadaluarsanya, dan dihitung jumlah bakterinya.

3.3.3. Pengamatan Ketahanan Nasi

Sifat ketahanan nasi ini ditunjukkan oleh beberapa parameter, seperti bau, warna, dan rasa nasi. Pengujian ini dilakukan dengan cara memeriksa kondisi nasi setiap selang waktu 12 jam.

3.3.4. Observasi Tampilan

Observasi tampilan pada penelitian ini dilakukan sesuai dengan SNI 01-2346-2006 tentang Petunjuk Pengujian Organoleptik dan atau Sensori. Adapun jenis observasi yang dilakukan adalah uji deskripsi dan uji kesukaan (hedonik). Observasi tampilan ini dilakukan di rumah peneliti yang bertempat di Soreang, Bandung.

Uji deskripsi dilakukan dengan menggunakan panelis agak terlatih, yaitu anggota keluarga peneliti dan dilakukan pada jam dimana nasi selesai dibuat. Hal bertujuan agar panelis dapat merasakan sifat sensorik nasi yang ditambah sari buah jeruk nipis serta nasi yang tidak diberi apa-apa (kontrol). Adapun karakteristik nasi yang ingin diketahui meliputi rasa, aroma, warna, dan tekstur (keempukan). Pada pengujian ini panelis harus mendeskripsikan sifat sensorik nasi pada lembar uji deskripsi.

Uji kesukaan (hedonik) dilakukan untuk mengetahui waktu kadaluarsa nasi. Panelis akan memberikan nilai mutu dalam besaran numerik (1-7) terhadap satu seri bahan uji yaitu nasi kontrol dan nasi termodifikasi. Nilai yang semakin besar menunjukkan bahwa sampel tidak disukai oleh panelis (*Susiwi, 2009*).

3.3.5. Analisis Mikrobiologi Nasi

Analisis mikrobiologi ini meliputi penghitungan jumlah total bakteri dengan metode pengenceran cawan tuang dan pewarnaan Gram. Analisis ini dilakukan setiap selang waktu 24 jam di laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Penghitungan jumlah koloni dalam sampel ini dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap isolasi serta penumbuhan kultur bakteri dan tahap penghitungan jumlah koloni menggunakan *coloni counter*.

Isolasi dan Penumbuhan Kultur Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara mencampurkan sampel dengan akuades steril kemudian menghaluskannya menggunakan blender, sehingga diperoleh stok sampel dengan pengenceran 10^{-1} . Pengenceran kemudian dilakukan dari 10^{-2} sampai

10^{-4} . Untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} , diambil 1 mL dari stok sampel dengan pengenceran 10^{-1} dicampur 9 mL akuades. Untuk mendapatkan pengenceran 10^{-3} , diambil 1 mL dari pengenceran 10^{-2} dicampur 9 mL akuades. Sedangkan untuk mendapatkan pengenceran 10^{-4} , diambil 1 mL dari pengenceran 10^{-3} dicampur 9 mL akuades. Selanjutnya stok pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} dimasukkan ke cawan Petri yang telah diisi dengan medium Nutrien agar, dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Pengerjaan isolasi dan penumbuhan bakteri ini dilakukan secara duplo (Afrianto, 2008).

Penghitungan Jumlah Koloni Menggunakan Coloni Counter.

Setelah bakteri diinkubasi selama 1 x 24 jam, jumlah koloninya dihitung menggunakan *coloni counter*. Penghitungannya dilakukan dengan cara menempatkan cawan Petri yang telah ditumbuhi bakteri di atas lensa. Koloni kemudian dihitung dengan menekan pena yang secara otomatis akan memunculkan angka yang menyatakan jumlah koloni tersebut. Penghitungan koloni juga dilakukan terhadap bakteri yang telah diinkubasi selama 2 x 24 jam. Setelah itu jumlah sel mikroba dapat diketahui dengan cara:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{volume sampel}} \times \text{jumlah pengenceran}$$

Pewarnaan Gram

Untuk meyakinkan bahwa bakteri yang terdapat pada sampel adalah *Bacillus cereus*, maka dilakukan pewarnaan Gram pada bakteri yang telah ditumbuhkan pada medium agar. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara olesan bakteri tersebut dengan

larutan kristal violet, larutan lugol, dan larutan safranin kemudian mengamatinya dengan mikroskop.

3.3.6. Teknik Analisis Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah data mentah yang belum memiliki makna. Agar data hasil penelitian memiliki makna dan memberikan jawaban atas permasalahan yang diajukan, maka data harus diolah terlebih dahulu sehingga dapat memberikan arahan untuk pengkajian lebih lanjut. Adapun data yang akan diinterpretasikan secara statistik adalah data jumlah bakteri dari tiap sampel dengan menggunakan uji t-student pasangan sepadan *one-tailed* dengan $\alpha = 0,05$, sehingga dapat disimpulkan apakah penggunaan sari buah jeruk nipis berpengaruh terhadap ketahanan nasi yang disimpan dala *magic com* dan dapat diperoleh juga konsentrasi yang efektif dalam menjaga ketahanan nasi tersebut. Berikut ini adalah cara perhitungannya.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum D^2 - [(D)^2 \div np]}{np - 1}}$$

$$\overline{SD} = \sqrt{\frac{SD}{np}}$$

$$Uji t = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\overline{SD}}$$

Keterangan: SD = standar deviasi
 D = *differences*
 np = n populasi
 1 = nilai konstan
 \overline{SD} = kesalahan baku distribusi sampling
 \bar{X} = rata-rata kelompok 1
 \bar{Y} = rata-rata kelompok 2

Kemudian diuji tingkat kesalahan dengan taraf kepercayaan (α) = 0,05% dan derajat kebebasan (db) = np - 1.

t_{hitung} kemudian dibandingkan dengan t_{tabel} (dengan terlebih dahulu menentukan *one tailed*). Jika $t_{hitung} > t_{tabel}$ maka ada perbedaan yang berarti, sedangkan jika $t_{hitung} < t_{tabel}$ maka tidak ada perbedaan yang berarti.

3.3.7. Analisis pH Nasi

Tujuan dilakukannya analisis ini adalah untuk mengetahui ada-tidaknya perubahan pH pada sampel nasi setelah ditambahkan sari buah jeruk nipis untuk nasi termodifikasi) dan mengalami masa pengawetan tertentu (baik untuk nasi kontrol maupun nasi termodifikasi). Analisis ini hanya dilakukan pada saat sampel nasi selesai dibuat (jam ke-0) dan pada akhir penelitian (jam ke-72). Metode yang digunakan dalam penentuan pH ini adalah dengan menggunakan pHmeter. Pada penentuan pH ini sampel nasi dimasukkan ke gelas kimia, kemudian dihaluskan dan ditambah akuades. Setelah itu larutan sampel nasi ditentukan pH-nya menggunakan pHmeter yang telah dikalibrasi.

3.3.8. Analisis Kandungan Gizi Nasi

3.3.8.1. Preparasi Sampel

Sebelum dilakukan analisis kandungan gizi terhadap nasi kontrol dan kelima nasi termodifikasi (yang telah ditambahkan sari jeruk nipis) diperlukan preparasi terhadap masing-masing sampel. Langkah yang dilakukan dalam preparasi ini adalah menghomogenkan sampel dengan cara menggerus sampel hingga halus.

3.3.8.2 Penentuan Kadar Air

Metode yang dilakukan dalam penentuan kadar air ini adalah dengan mengeringkan sampel dalam oven. Sejumlah sampel nasi ditimbang di dalam cawan porselen yang sebelumnya telah diketahui beratnya. Sampel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 3 jam (tutup cawan dibuka). Sampel didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang sampai diperoleh berat yang konstan. Kadar air dalam sampel tersebut dapat ditentukan melalui persamaan berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

Keterangan : W = Berat sampel awal (g)
 W₁ = Berat cawan + sampel awal (g)
 W₂ = Berat cawan + sampel akhir (g)

3.3.8.3 Penentuan Kadar Karbohidrat dengan Metode Luff Schroll

Pembuatan Pereaksi Luff Schoorl

Pembuatan pereaksi Luff Schoorl diawali dengan melarutkan Na₂CO₃ anhidrat aquades. Selanjutnya, ditambahkan asam sitrat yang telah dilarutkan dengan aquades sambil diaduk. Kemudian, ditambahkan lagi CuSO₄.5H₂O yang telah dilarutkan dalam aquades. Campuran dipindahkan ke dalam labu takar 1 L, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Larutan tersebut dibiarkan semalam hingga kotoran dapat mengendap.

Cara Kerja Penentuan Kadar Karbohidrat

Sejumlah sampel nasi ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL. Selanjutnya, ke dalam sampel ditambahkan larutan HCl 3%,

dididihkan selama 3 jam dengan cara pendinginan tegak (direfluks). Larutan didinginkan dan dinetralkan dengan NaOH 30% kemudian ditambahkan CH₃COOH 3% agar suasana larutan sedikit asam. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas, dihomogenkan, lalu disaring. Sejumlah filtrat dipipet ke dalam labu erlenmeyer 500 mL, lalu ditambahkan pereaksi Luff Schoorl dan beberapa batu didih serta aquades. Campuran tersebut dipanaskan sampai mendidih selama ± 3 menit. Pendidihan dilanjutkan selama 10 menit. Campuran didinginkan dengan segera dalam bak berisi es. Setelah dingin, pada campuran tadi ditambahkan 25 mL H₂SO₄ 25% dan 15 mL KI 20% secara perlahan-lahan. Selanjutnya, campuran dititrasi secepatnya dengan larutan baku Na₂S₂O₃ 0,1 N menggunakan kanji 0,5% sebagai indikator. Langkah di atas dilakukan sebanyak tiga kali.

Kadar karbohidrat dalam sampel nasi dapat ditentukan melalui persamaan berikut :

$$\text{Kadar Glukosa} = \frac{W_1 \times F_p}{W} \times 100 \text{ gram bahan pangan}$$

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

Keterangan : W = Berat sampel (g)

W₁ = Glukosa yang terkandung dalam 1 mL titran (mg)

F_p = Faktor pengenceran

Penentuan kadar karbohidrat ini dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia (LIPI) Bandung.

3.3.8.4 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Mikro Kjeldhal

Proses penentuan kadar protein dengan metode Mikro Kjeldahl dibagi menjadi dua tahap yaitu, tahap destruksi sampel dan tahap penentuan kadar protein.

Destruksi Sampel

Sejumlah sampel nasi dimasukkan ke labu Kjeldahl dan ditambahkan garam Kjeldahl sebagai katalis yang berupa campuran $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan K_2SO_4 dengan perbandingan massa 1:3 serta beberapa batu didih. kemudian dipanaskan dalam 10 mL H_2SO_4 pekat sehingga terjadi destruksi sampai larutan jernih, lalu didinginkan.

Penentuan Kadar Protein

Larutan sampel dipindahkan ke dalam labu takar 50 mL dan diencerkan hingga tanda batas. Sejumlah larutan dipipet dan dimasukkan ke dalam alat destilasi dan ditambah 10 mL NaOH 30 %. Campuran tersebut didestilasi dan eluatnya ditampung dalam gelas kimia yang telah berisi larutan H_3BO_3 3% dan indikator tashiro. Destilasi dilakukan hingga diperoleh destilat sebanyak $\frac{3}{4}$ gelas kimia, selanjutnya destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai warna destilat berubah dari hijau menjadi ungu.

Kadar protein dalam sampel nasi dapat ditentukan melalui persamaan berikut :

$$\text{Kadar protein} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 0,014 \times Fk \times fp}{w}$$

Keterangan: V_1 = volume HCl yang digunakan untuk menitar blanko
 V_2 = volume HCl yang digunakan untuk menitar sampel
 N = normalitas HCl yang digunakan
 Fk = faktor koreksi secara umum (6,25)
 fp = faktor pengenceran
 w = bobot sampel

Penentuan kadar protein ini juga dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia (LIPI) Bandung.