

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode dan Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan untuk menguji pengaruh chitosan terhadap buah strawberry adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena pengaruh faktor luar dapat dikontrol dengan dilakukan di laboratorium dan kondisinya relatif homogen. Jumlah perlakuan yang digunakan ada 6 (enam) perlakuan yaitu satu perlakuan tanpa pelapis, satu perlakuan dengan plastik yang divakum dan empat konsentrasi chitosan yang berbeda. Adapun keempat konsentrasi chitosan yang digunakan terdiri atas 0,25%, 0,5%, 0,75% dan 1%.

Banyaknya pengulangan untuk setiap perlakuan diperoleh dari rumus pengulangan Rancangan Acak Lengkap, yaitu $t(r-1) \geq 20$, t adalah perlakuan (*treatment*) dan r adalah pengulangan (replikasi) (Gomez dan Arturo, 1995).

Jadi:	$t(r-1) \geq 20$	Keterangan: t = perlakuan (treatment) r = pengulangan (replikasi) 20 = derajat bebas untuk RAL
	$6(r-1) \geq 20$	
	$6r \geq 26$	
	$r = 4,3$	
	$r = 4$	

Berdasarkan perhitungan di atas maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan paling sedikit empat kali. Jika A adalah perlakuan tanpa pelapis, maka pengulangannya adalah A1, A2, A3 dan A4. Banyaknya galat adalah 24 yang terdiri atas 6 perlakuan dan 4 pengulangan.

Jumlah kelompok percobaan atau plot di susun secara acak yaitu sebagai berikut:

F4	F3	E1	B1	E2	F2
D1	B2	D2	A4	E3	F1
B4	A1	C3	D3	C2	D2
B3	C4	A3	E4	A2	C1

Gambar 3.1 Susunan Kelompok Percobaan

Keterangan:

- A : tanpa pelapis
- B : *coating* dengan plastik yang divakum atau hampa udara
- C : konsentrasi chitosan 0,25% (b/v)
- D : konsentrasi chitosan 0,5 % (b/v)
- E : konsentrasi chitosan 0,75% (b/v)
- F : konsentrasi chitosan 1% (b/v)

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

- a) Semua kulit udang yang digunakan untuk isolasi chitosan adalah satu jenis kulit udang Windu (*Penaeus monodon*). Kulit udang diperoleh dari restoran Bali Seafood di Bandung, dari jenis udang Windu (*Penaeus monodon*) yang telah dibekukan.
- b) Semua strawberry (*Fragraria ananassa*) dari satu sumber petani di Ciwidey yaitu strawberry varietas Festival. Strawberry dengan spesies, kondisi tanam, lingkungan, dan perawatan yang sama. Karakteristik buah yang digunakan meliputi:
 - 1) Daging buah sudah padat, agak kenyal, kematangan cukup masak.
 - 2) Kulit buah didominasi warna merah.
 - 3) Buah berumur 2 minggu sejak perbungaan
 - 4) Buah tidak mengalami kerusakan yang meliputi rusak fisik, bau, dan tekstur, serta berat rata-rata buah sebesar 10 gram.

Nurul Alfiah, 2013

Isolasi Chitosan Kulit Udang Dan Pemanfaatannya Pada Buah Strawberry (*Fragraria ananassa*)
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

2. Sampel Penelitian

- a) Strawberry (*Fragraria ananassa*) yang diberi perlakuan *edible coating* chitosan kulit udang dengan konsentrasi yang berbeda-beda.
- b) Strawberry (*Fragraria ananassa*) yang diberi perlakuan dengan plastik hampa udara sebagai pembanding dan buah strawberry tanpa pelapis.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di tiga laboratorium. Ketiga laboratorium tersebut yaitu Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI dan Laboratorium Kimia Analisis di ITB. Waktu yang digunakan yaitu Maret 2012-Januari 2013.

D. Alat

Tabel 3.1. Daftar Alat Penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1	Blender	1 buah	Merk National PT 25.221.03.015 BF
2	<i>Buret dan statif</i>	2 unit	-
3	Batang pengaduk	1 buah	-
4	Camera digital	1 unit	Canon Digital IXUS 85 IS
5	Gelas beaker	4 buah	Gelas pyrex ukuran 500 ml dan 250 ml
6	Gelas ukur	2 buah	Gelas pyrex ukuran 250 ml dan 100 ml
7	<i>Handrefraktometer</i>	1 buah	PT25.221.03.042 BF (6/8)
8	Homogenizer	2 unit	-
9	<i>Hot plate and magnetic stirrer</i>	2 buah	PT25.221.03.023BF (1/2)
10	Thermohyrometer	1 buah	-
11	Oven	1 buah	PT 25.221.03.036 BT

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
13	Pisau	1 buah	-
14	Plastik tahan panas	1 pak	Isi 100 lembar (ukuran 20x10 cm)
15	Saringan teh	1 buah	-
16	Termometer alkohol	2 buah	-
17	Timbangan digital	1 buah	PT 25.221.03.018BF
18	<i>Vacuum diafragh pump</i>	1 buah	PT 25.221.03.018 BT (1/2)

E. Bahan

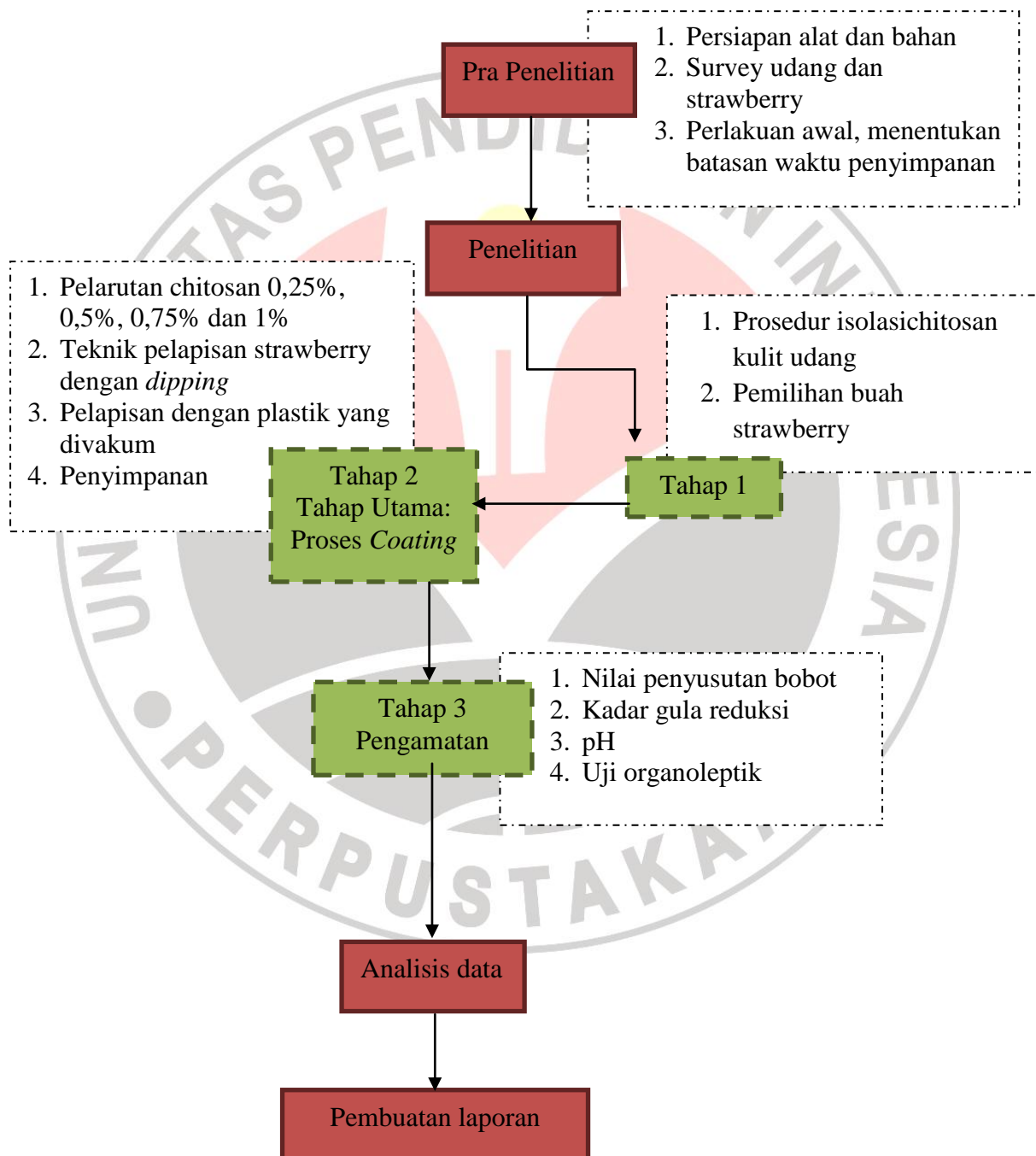
Tabel 3.2. Daftar Bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah	Spesifikasi
1	Akuades	60 liter	-
2	Akuades steril	2 liter	-
3	Asam asetat (p.a)	10 ml	-
4	HCl (p.a)	251,5 ml	Konsentrasi 12M
5	NaOH (p.a)	572 gram	-
6	Kulit udang (udang Windu)	1 kg	Jenis udang Windu (<i>Paneus monodon</i>)
7	Kemasan plastik kotak	100 kotak	Ukuran 14x7x2 cm
8	Kertas pH indikator	1 kotak	-
9	Strawberry	300 buah	<i>Fragraria ananassa</i> varietas Festival

F. Prosedur Kerja

1. Alur Kerja dalam Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari pra penelitian, dilanjutkan dengan penelitian utama, analisis data dan pembuatan laporan. Berikut Gambar 3.2 pemaparan secara umum alur kerja dalam penelitian ini.



Gambar 3.2 Alur Kerja Penelitian

2. Tahap Persiapan (Pra Penelitian)

Pra penelitian dilakukan dengan survey lokasi dilakukan di daerah Bandung untuk memperoleh kulit udang. Restoran *seafood* menjadi sasaran utama untuk mendapatkan limbah kulit udang. Akhirnya dipilih Bali Seafood, restoran ini setiap harinya menghasilkan limbah kulit udang. Sehingga diperoleh kulit udang Windu (*Paneus monodon*).

Selain survey lokasi untuk mendapatkan kulit udang, survey lokasi juga dilakukan di daerah pertanian sebagai tempat pengambilan sampel utama bahan penelitian yaitu strawberry (*Fragraria ananassa*). Kegiatan ini dilakukan pada bulan Maret di daerah Ciwidey. Daerah Ciwidey digunakan sebagai lokasi sumber perolehan bahan karena daerah ini merupakan salah satu daerah pertanian strawberry yang cukup besar. Maksud dari survey lokasi pertanian yaitu untuk memperoleh tanaman strawberry dengan spesies, kondisi tanam, lingkungan, dan perawatan yang sama. Dengan demikian akan didapatkan buah strawberry yang sifatnya sama.

Di samping kegiatan di atas, dilakukan pula kegiatan penelitian awal terhadap penyimpanan buah strawberry pada ruangan dalam kondisi terbuka. Buah tersebut dibiarkan sampai kondisi buahnya membusuk, sehingga diperoleh batasan acuan waktu untuk penyimpanan. Selain itu, dilakukan pengukuran suhu dan kelembaban tempat penyimpanan.

3. Tahap Pelaksanaan

Pada tahap pelaksanaan dilakukan di tiga tempat yaitu Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Botani FPMIPA UPI dan Laboratorium Kimia Analisis ITB. Serangkaian proses isolasi chitosan sepenuhnya dilakukan di Laboratorium Fisiologi. Sedangkan tahap utama yaitu tahap penyimpanan buah strawberry dalam penelitian ini dilakukan di laboratorium Botani. Laboratorium Kimia Analisis merupakan tempat untuk melakukan uji FTIR sehingga dapat dilakukan analisis kadar chitosan berdasarkan hasil derajat deasetilasi. Hal ini berdasarkan pertimbangan ketersediaan alat serta ruang

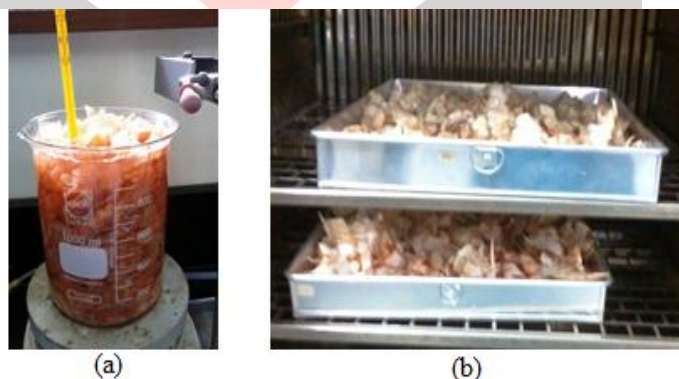
yang lebih mendukung dalam penyimpanan buah selama proses *coating* berlangsung.

a. Prosedur isolasi chitosan dari kulit udang

Prosedur isolasi chitosan dari kulit udang mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Puspawati dan Simpen pada tahun 2010 yang terdiri atas:

1) Pengeringan

Bahan yang digunakan dalam proses isolasi chitosan ini menggunakan kulit udang Windu (*Penaeus monodon*). Kulit udang dipisahkan dari bagian tubuh lainnya seperti kaki dan ekor. Bagian kulit udang yang dipakai adalah kulit bagian tubuh dan kepala. Untuk proses pengeringan, mula-mula kulit udang direbus, dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 110-120°C selama \pm satu jam (Gambar 3.2). Setelah kering, kulit udang digiling menggunakan blender sampai halus (Gambar 3.3) dan diayak menggunakan ayakan 0,25 mm.



Gambar 3.3. (a) Kulit udang direbus; (b) Kulit udang dioven



Gambar 3.4. Kulit Udang Digiling

2) Ekstraksi chitin dari kulit udang

(a) Penghilangan mineral (demineralisasi)

Serbuk kulit udang ditambah dengan HCl 1,5M dengan perbandingan 1:15 (b/v). Campuran dipanaskan pada suhu 70-80°C selama 4 jam sambil diaduk pada 50 rpm menggunakan homogenizer. Padatan dari serbuk kulit udang kemudian dipisahkan dapat dilakukan dengan cara disaring dari sisa campuran. Setelah disaring, padatan yang diperoleh dicuci dengan akuades untuk menghilangkan HCl yang tersisa. Pencucian dengan akuades ini dilakukan sampai pH netral. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH indikator pada bagian serbuk kulit udang yang dalam kondisi basah. Padatan dikeringkan dengan oven pada suhu 70°C selama 24 jam sehingga diperoleh serbuk kulit udang tanpa mineral. Serbuk kulit udang tanpa mineral ini selanjutnya ditimbang untuk mengetahui beratnya.

(b) Penghilangan protein (deproteinasi)

Untuk menghilangkan protein, digunakan NaOH 3,5%. Serbuk kulit udang tanpa mineral hasil demineralisasi dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditambahkan larutan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (b/v). Campuran serbuk kulit udang tanpa mineral dengan NaOH 3,5% selanjutnya dipanaskan pada suhu 65-70°C. Proses deproteinasi ini selama 4 jam sambil dilakukan pengadukan pada 50 rpm menggunakan homogenizer dan termometer sebagai pengukur suhunya. Setelah 4 jam, padatan dipisahkan dari sisa campuran NaOH dengan cara disaring dan didinginkan serta dicuci dengan akuades berkali-kali sampai pH netral, sehingga diperoleh chitin. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH indikator pada bagian serbuk kulit udang yang dalam kondisi basah. Chitin yang diperoleh selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100°C selama ± 2 jam. Kemudian dilakukan penimbangan terhadap serbuk chitin kering yang merupakan hasil tahap deproteinasi.

(c) Optimasi deasetilasi chitin menjadi chitosan

Proses deasetilasi chitin menjadi chitosan dilakukan dengan penambahan NaOH 60%. Serbuk chitin dari hasil tahap deproteinasi dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditambahkan larutan NaOH 60% dengan perbandingan 1:20. Proses deasetilasi ini dilakukan pada suhu 120°C, digunakan termometer sebagai pengukur suhunya. Proses ini berlangsung selama 4 jam, serta menggunakan homogenizer pada kecepatan 50rpm. Setelah 4 jam, padatan dipisahkan dari sisa campuran NaOH dengan cara disaring dan didinginkan serta dicuci dengan akuades berkali-kali sampai pH netral. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan kertas pH indikator pada bagian serbuk chitin yang dalam kondisi basah. Selanjutnya, padatan yang sudah netral tersebut selanjutnya dikeringkan pada suhu 70-80°C menggunakan oven selama 24 jam yang mengacu pada penelitian Rahayu dan Purnavita pada tahun 2007. Setelah serbuk kering, tahap penting berikutnya yaitu dilakukan karakterisasi chitosan dengan spektrofotometer FTIR. FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis ITB untuk mengetahui derajat deasetilasi dari serbuk chitosan. Derajat deasetilasi dapat diketahui berdasarkan nilai absorbansi gugus fungsi dengan menganalisis spektra hasil FTIR.

(d) Penentuan derajat deasetilasi

Hasil uji FTIR menunjukkan nilai absorbansi dari gugus fungsi pada sampel. Adapun derajat deasetilasi ditentukan untuk mengetahui seberapa besar chitin yang sudah berubah menjadi chitosan. Derajat deasetilasi chitosan ditentukan berdasarkan rumus:

$$DD = 100 - \left\{ \left(\frac{A_{1654,6}}{A_{3441,2}} \right) \times 100 \right\} / 1,33 \quad (\text{Khan, et al., 2002})$$

(e) Proses pelarutan chitosan kulit udang

Pada penelitian ini, konsentrasi chitosan yang digunakan adalah 0,25%, 0,5%, 0,75%, dan 1%. Hal ini mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Harianingsih (2010). Serbuk chitosan yang sudah diketahui derajat deasetilasinya ditimbang sebanyak 1 gram. Dilarutkan dengan asam asetat 2% pada suhu 40°C selama 30 menit diatas *magnetic stirrer*. Didapatkan chitosan 1% (b/v), untuk konsentrasi 0,25%, 0,5%, dan 0,75% dilakukan dengan teknik pengenceran menggunakan akuades steril.

b. Pemilihan buah strawberry

Karakteristik buah yang digunakan meliputi:

- 1) Daging buah sudah padat, agak kenyal, kematangan cukup masak.
- 2) Kulit buah didominasi warna merah dan memiliki kaliks.
- 3) Buah berumur 2 minggu sejak perbungaan
- 4) Tidak rusak fisik, bau, dan tekstur, serta berat rata-rata buah sebesar 10 gram.
- 5) Buah yang digunakan adalah buah yang baru dipanen dan pada hari yang sama langsung dilakukan perlakuan.

c. Proses pelapisan (*coating*) pada buah strawberry (*Fragraria ananassa*)1) *Coating* dengan chitosan

Teknik yang digunakan pada proses pelapisan ini adalah dengan teknik pencelupan atau *dipping*. Semua buah strawberry yang telah dipanen pagi hari, setelah tiba dari Ciwidey, disortir dan dicuci dengan air mengalir. Setelah dicuci, buah dikeringkan menggunakan *tissue*. Buah yang sudah kering selanjutnya dicelupkan pada larutan chitosan yang telah disediakan (periode *dipping*) selama 30 detik. Setelah 30 detik, buah diangkat dan diletakkan pada kotak plastik tanpa ditutup. Setiap kotak plastik berisi sepuluh buah strawberry. Pada penelitian ini dilakukan enam perlakuan dan empat kali pengulangan, sehingga

terdapat 24 galat. Kemudian buah strawberry yang telah diletakkan pada kotak plastik disimpan pada suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) selama 5 hari dengan mengacu pada kurun waktu yang diperoleh dari penelitian awal.

2) *Coating* dengan plastik hampa udara (perlakuan pembanding)

Sama seperti tahap sebelumnya yaitu buah strawberry yang telah dipanen pagi hari, setelah tiba dari Ciwidey, disortir dan dicuci dengan air mengalir. Setelah dicuci, buah dikeringkan menggunakan *tissue*. Sepuluh buah strawberry yang sudah kering dengan berat yang relatif sama (setiap buah ± 10 gram) dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Udara yang ada dalam plastik dikeluarkan dengan menggunakan alat *vacuum diafragh pump* dan ujung plastik diikat dengan karet.

d. Perolehan Data

Pertama kali dilakukan pengujian dalam perolehan data yaitu sebelum tahap *coating* sebagai data awal. Pengamatan dilakukan setiap hari dan pengujian secara berkala yang meliputi:

1) Penyusutan bobot yaitu dilakukan penimbangan setiap hari selama waktu penyimpanan yaitu sebelum dan selama buah memasuki proses *coating*. Persentase penyusutan dilakukan dengan:

$$\% \text{ susut bobot} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\% \text{ (Lestari, 2008)}$$

2) Pengukuran kadar gula dengan menggunakan *handrefraktometer*, yaitu dengan mengukur total padatan terlarut sebagaimana yang telah dilakukan Mukaromah *et al.* (2010) dan Saparianti (2005). 5 gram atau setengah bagian buah dihaluskan, diambil sari buahnya dengan kain halus untuk disaring dan diperas, diteteskan pada lensa alat *handrefraktometer*. Setiap melakukan pengukuran, lensa dibersihkan dengan akuades. Angka yang muncul pada layar pembiasan adalah nilai total padatan terlarut yang merupakan kadar gula pada buah strawberry.

- 3) Pengamatan pH yaitu menggunakan kertas pH indikator dengan cara buah strawberry disayat, ditempelkan pada kertas pH indikator lalu disesuaikan dengan standarisasi pH.
- 4) Pengamatan secara uji organoleptik dilakukan dengan memberikan kuisioner pada 6 panelis berdasarkan SNI 2011. Pengujian ini terdiri atas penampilan umum dan citarasa. Penampilan umum meliputi warna dan tekstur. Sedangkan untuk citarasa meliputi aroma dan rasa. Uji organoleptik dilakukan pada akhir masa penyimpanan. Analisis data hasil uji organoleptik mengacu pada aturan perhitungan yang telah ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia tahun 2011.

4. Tahap Analisis Data

Selama pengamatan berlangsung, dilakukan juga pencatatan data. Data yang diperoleh selama pengamatan dianalisis. Ternyata, data yang diperoleh tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji statistika. Sehingga analisis data dilakukan dengan deskriptif.