

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dimana data dari pengamatan secara langsung dan sistematis terhadap kejadian dari objek yang diteliti. Rancangan percobaan yang diterapkan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan jumlah perlakuan sebanyak 6 perlakuan dan jumlah ulangan sebanyak 4 kali pengulangan. Adapun bahan yang digunakan adalah limbah selongsong larva BSF dari instar 4 menuju pre-pupa. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini dan cara pembuatan komposisi kitosan adalah sebagai berikut:

P0 = Tanpa perlakuan

P1 = 0,5 gr boraks

P2 = 0,5 gr kitosan BSF + 100 ml larutan asam asetat 1%

P3 = 1 gr kitosan BSF + 100 ml larutan asam asetat 1%

P4 = 1,5 gr kitosan BSF + 100 ml larutan asam asetat 1%

P5 = 2 gr kitosan BSF + 100 ml larutan asam asetat 1%

Konsentrasi yang digunakan tersebut mengacu pada hasil uji pendahuluan, bahwa pada Konsentrasi 1,5% pada hari ke-3 mampu mempengaruhi jumlah angka kuman dengan rata-rata jumlah angka kuman sebesar $2,8 \times 10^6$ kol/gr (Wardaniati dan Setyaningsih, 2009), sehingga range konsentrasi yang akan digunakan dalam penelitian adalah 0% (Kontrol); 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; dan Boraks 0,5% (sebagai pembandingan) penggunaan tambahan bakso yang sering digunakan masyarakat. Prosedur penelitian meliputi persiapan kitosan dan pembuatan bakso. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah penentuan derajat deasetilasi kitosan, penentuan nilai total koloni bakteri yang tumbuh selama penyimpanan (*Total Plate Count*), analisis kadar air, pengukuran pH dan Uji Organoleptik (warna, aroma, tekstur, rasa)

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah bakso sapi yang diproduksi sendiri dan menggunakan daging sapi segar yang diambil dari Pasar Impres, Gegerkalong Tengah, Bandung, dan sumber selongsong larva BSF yaitu dari CSR Pertamina RU VI Balongan, Indramayu.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2022 sampai April 2022. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Biologi Universitas Pendidikan Indonesia.

3.4 Alat dan Bahan

Penelitian ini membutuhkan alat dan bahan untuk mendukung berjalannya proses pembuatan kitosan selongsong larva BSF, dan pengaplikasian kitosan selongsong larva BSF pada bakso sapi. Alat dan bahan tersedia di Laboratorium Riset Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Tabel daftar alat dan bahan penelitian dapat dilihat pada Lampiran-1.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap persiapan

3.5.1.1 Penentuan lokasi dan sampel penelitian

Lokasi pengambilan sampel bakso dilakukan di Laboratorium Riset Universitas Pendidikan Indonesia. Sedangkan untuk bakso yang diberi perlakuan dengan pemberian kitosan selongsong larva *Black Soldier Fly* (*Hermetia illucens*) adalah bakso daging sapi.

3.5.1.2 Persiapan alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian berlangsung terlebih dahulu dipersiapkan,

diperiksa ketersediaan dan kelayakannya. Sebelum digunakan, Alat-alat dibersihkan menggunakan air bersih.

3.5.2 Tahap Penelitian

3.5.2.1 Preparasi selongsong larva *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)*

Sampel selongsong BSF sebanyak 2 kg dikumpulkan dan dicuci dengan air keran yang mengalir untuk menghilangkan kotoran. Selongsong yang telah dicuci kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 65°C selama 6 jam (Lin, *et al.*, 2021). Selanjutnya selongsong yang sudah kering digiling menggunakan alu dan mortar kemudian di ayak menggunakan ayakan berukuran 100 mesh.

3.5.2.2 Pembuatan Reagen

1) Pembuatan HCl 1,5 M

Dipipet HCl pekat 37% sebanyak 249 ml dan diencerkan dengan aquades dalam erlenmeyer 2000 ml hingga garis tanda.

2) Pembuatan Larutan NaOH 3,5%

Ditimbang NaOH pellet sebanyak 17,5 g dan dilarutkan dengan aquades dalam *beaker glass* 500 ml hingga garis tanda.

3) Pembuatan Larutan NaOH 60%

Ditimbang NaOH pellet sebanyak 60 g dan dilarutkan dengan aquades dalam *beaker glass* 100 ml hingga garis tanda.

4) Pembuatan Larutan Asam Asetat 1% (v/v)

Dipipet 4 ml Asam asetat 100% dan diencerkan dengan aquades dalam labu ukur 400 ml sampai garis tanda.

3.5.2.3 Ekstraksi Kitin dan Kitosan

Proses ekstraksi kitin dari limbah selongsong BSF dan kulit dilakukan melalui 3 (tiga) tahapan proses yang terdiri dari demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi (Wahyuni *et al.*, 2020).

1) Proses Demineralisasi

Sebanyak 100 g serbuk selongsong larva *Black Soldier Fly* yang sudah dihaluskan hingga berukuran 100 mesh ditambahi larutan HCl 1,5 M dengan perbandingan 1:15 (b/v). Serbuk selongsong larva *Black Soldier Fly* dan larutan HCl 1,5 M dicampur dalam erlenmeyer 2000 ml pada suhu 60-70°C selama 4 jam. sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm. padatan yang diperoleh dicuci dengan aquades beberapa kali sampai pH netral. Padatan dikeringkan dalam oven pada temperatur 80°C selama 24 jam, serbuk selongsong larva *Black Soldier Fly* yang diperoleh tanpa mineral. lalu didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang.

2) Proses Deproteinasi

Deproteinasi adalah untuk menghilangkan protein yang terdapat dalam sampel (Purwanti, 2014). Serbuk selongsong hasil demineralisasi ditambahi dengan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (b/v) antara pelarut dengan sampel. campuran dimasukkan kedalam *beaker glass* 1000 ml, dipanaskan pada suhu 60-70°C selama 4 jam sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm. padatan yang diperoleh dicuci dengan aquades beberapa kali sampai pH netral. padatan yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam. kemudian didinginkan dalam desikator dan timbang. Kemudian dilakukan proses depigmentasi atau penghilangan pigmen melalui perendaman 100 ml

larutan KMnO_4 1% dan dilanjutkan dengan perendaman 100 ml asam oksalat 1% dilakukan selama 30 menit, kemudian dilakukan proses netralisasi dan penyaringan.

3) Proses Deasetilasi

Sintesis kitosan melalui proses deasetilasi menggunakan metode Knorr (Khan *et al.*, 2002). Hasil yang diperoleh dari proses deproteinasi (kitin) dilanjutkan dengan proses deasetilasi dengan menambahkan NaOH 60% dengan perbandingan 1:20 (b/v). Campuran diaduk dan dipanaskan pada suhu 100-110°C selama 4 jam dengan kecepatan pengadukan 50 rpm. Padatan yang diperoleh dicuci dengan aquades beberapa kali sampai pH netral. Padatan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam kemudian didinginkan dalam desikator \pm 30 menit dan ditimbang sampai berat konstan.

3.5.2.4 Penentuan Derajat Deasetilasi

Untuk mengetahui derajat deasetilasi kitosan, digunakan uji *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Pengukuran spektra dengan sampel kitosan berbentuk serbuk. Pengukuran ini didasarkan pada perbandingan absorbansi panjang gelombang 1655cm^{-1} dan absorbansi pada panjang gelombang 3450cm^{-1} (Baxter *et al.*, 1992). Perhitungan derajat deasetilasi dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut :

$$\% DD = 1 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right] \times 100\%$$

Keterangan :

A_{1655} = Absorbansi pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1}

A_{3450} = Absorbansi pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1}

1,33 = Tetapan yang diperoleh dari perbandingan A1655/A3450 untuk kitosan dengan asetilasi penuh.

3.5.2.5 Pembuatan Larutan Stok Kitosan

Serbuk kitosan sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2 gr ditambah dengan 100 ml larutan asam asetat 1% (Wardaniati dan Setyaningsih, 2009).

3.5.2.6 Proses Pembuatan Bakso

Pembuatan bakso daging sapi mengacu pada metode (Sutaryo dan Mulyani, 2004). 2 kg daging sapi bagian gandum dipotong-potong dan dihaluskan menggunakan blender dengan penambahan 400 gram es batu. Selanjutnya ditambahkan 60 gram garam, 800 gram tepung tapioka, 60 gram bawang putih yang sudah dihaluskan, dan 10 gram merica. Semua bahan dicampur hingga homogen, kemudian adonan yang dihasilkan dicetak bulat dengan berat tiap bulatan 15 g. Perebusan bakso selama 30 menit dalam air mendidih hingga matang, kemudian dilakukan penirisan.

3.5.2.7 Proses Aplikasi Kitosan Sebagai Pengawet Bakso (Coating)

Bakso yang digunakan dalam penelitian ini diproduksi sendiri, dilanjutkan dengan tahap aplikasi kitosan sebagai pengawet bakso. Serbuk kitosan sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2 gr ditambah dengan 100 ml larutan asam asetat 1%. Campuran diaduk selama 1 jam, lalu disaring. Bahan untuk aplikasi yaitu bakso. Bakso dibuat dengan berbahan dasar daging sapi. Aplikasi dilakukan dengan cara merendam bakso pada larutan kitosan selama 60 menit (Wardaniati dan Setyaningsih, 2009). Selanjutnya bakso daging sapi

ditiriskan, kemudian bakso dimasukkan ke dalam wadah plastik dan disimpan dalam suhu ruangan. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 4 hari berturut-turut.

3.5.2.8 Pembuatan Media *Plate Count Agar* (PCA)

Serbuk medium PCA sebanyak 29 g dilarutkan ke dalam 1650 ml aquades kemudian dipanaskan pada *Hot plate stirrer* dengan suhu 80 ° C selama 10 menit. Setelah itu, larutan pengencer pada tabung reaksi dan media ditutup dengan aluminium foil lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121° C dan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit (Wulandari, 2016).

3.5.2.9 Uji *Total Plate Count* (TPC)

Pengujian *Total Plate Count* (TPC) dilakukan untuk menunjukkan jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk dengan cara menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar. Produk makanan dapat dikategorikan aman jika total koloni bakteri TPC tidak melebihi 1×10^8 *coloni forming unit/ml* (CFU/ml) (SNI, 2008). Pada penghitungan TPC ini menggunakan metode cawan tuang atau *pour plate* (Yunita *et al.*, 2015).

Sampel bakso daging sapi ditimbang sebanyak 1 g dan di potong menjadi bagian kecil, lalu masukkan sampel kedalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml, homogenkan dengan vortex (pengenceran 10^{-1}), kemudian lanjutkan dengan pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} setelah itu masukkan kedalam cawan petri kemudian dicampur dengan media PCA dan tutup rapat, lebih jelasnya berikut merupakan prosedur metode cawan tuang (*pour plate*) menurut Yunita *et al.*, (2015) :

- 1) Sebanyak 1 ml sample yang akan diuji dipindahkan dengan mikropipet steril kedalam larutan 9 ml aquades steril untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} kemudian dihomogenkan menggunakan vortex.
- 2) Lakukan hal yang sama seperti point pertama hingga pengenceran 10^{-6}
- 3) Sebanyak 1 ml suspensi (media kultur) dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} diinokulasikan pada cawan petri kosong sebanyak dua kali (duplo)
- 4) Penuangan media PCA sebanyak 15 ml yang masih cair ke setiap cawan petri.
- 5) Pencampuran media dengan suspensi dengan memutar cawan petri mengikuti pola angka delapan.
- 6) Inkubasi sampel pada suhu 37°C selama dua hari.
- 7) Koloni yang tumbuh pada media kemudian dihitung dengan alat *colony counter*.

Rumus perhitungan jumlah koloni bakteri menurut (Fardiaz, 2004) sebagai berikut:

$$\text{Jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.5.2.10 Uji Kadar Air

Pemeriksaan kadar air digunakan metode pengeringan atau oven (*Thermogravimetri*). Menurut Legowo (2005), prosedur dan perhitungan kadar air dengan metode pengeringan oven adalah sebagai berikut : pertama-tama disiapkan cawan porselin yang telah diberi kode sesuai kode sampel, kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu $100 - 105^{\circ}\text{C}$ selama + 1 jam. Setelah 1 jam, cawan porselin diambil dan dimasukkan dalam desikator + 15 menit, kemudian cawan porselin ditimbang. Sampel sebanyak 1 - 2

g ditimbang dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya. Kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 100 –105 °C selama 4 - 6 jam, setelah di oven sampel ditimbang hingga tercapai bobot konstan, jika belum konstan sampel dimasukan ke dalam oven lagi selama 1 jam, dimasukan desikator, kemudian lakukan penimbangan hingga tercapai bobot konstan. Bobot dianggap konstan apabila selisih penimbangan tidak melebihi 0,2 mg. Setelah didapatkan bobot konstan Kadar air dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$Kadar\ Air = \frac{(BC + BS) - (BC + BS\ \text{setelah\ dioven})}{BS} \times 100\%$$

Keterangan :

BC : Berat Cawan

BS : Berat Sampel

3.5.2.11 Pengukuran pH

Sampel seberat 10 g dicincang halus kemudian dicampur dengan 10 ml aquades. Sebelum pengukuran, elektroda pH meter dicuci dengan aquades, pH sampel diukur pada pH netral (7,0), kemudian elektroda pH meter dicuci kembali dengan aquades yang akan digunakan untuk pengukuran pH bakso (Bouton *et al.*, 1972).

3.5.2.12 Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan uji hedonik atau kesukaan dengan skala 1-5. Parameter yang diamati meliputi warna, aroma, tekstur dan rasa. Panelis diberi wadah yang berisi sampel bakso daging sapi yang telah dilapisi dengan berbagai konsentrasi larutan kitosan dan waktu penyimpanan yang berbeda-beda. Pengujian dilakukan oleh 15 orang panelis. Panelis yang digunakan dalam penelitian ini adalah panelis yang menyukai bakso,

mengetahui cita rasa bakso dan mengetahui tekstur bakso yang segar (Erlina, 2021).

3.5.2.13 Teknik Pengumpulan data

Data penelitian ini diperoleh melalui uji laboratorium yaitu data derajat deasetilasi kitosan, jumlah koloni bakteri, dan sifat fisik kimia bakso daging sapi yang meliputi kadar air, derajat keasaman (pH), dan organoleptik. Teknik pengumpulan data yang digunakan yaitu obeservasi eksperimen. Uji pengawetan dilakukan selama 4 hari pada wadah dengan penyimpanan suhu ruang (28°C). Wadah disusun dan diberi tanda P0 (Tanpa perlakuan), P1 (Kitosan 0,5%), P2 (Kitosan 1%), P3 (Kitosan 1,5%), P4 (Kitosan 2%) dan P5 (Boraks 0,5%) secara acak untuk menandai perlakuan dan ulangan dalam penelitian.

Setelah dilakukan perlakuan, kemudian dilakukan uji pertumbuhan mikroba dan uji fisik dan kimia pada bakso tersebut. Perendaman dilakukan 1 kali pada awal penelitian dan pengamatan dilakukan selama 4 hari berturut-turut. Parameter yang di amati dalam penelitian ini adalah penentuan derajat deasetilasi, penentuan nilai total koloni bakteri yang tumbuh selama penyimpanan (*Total Plate Count*), analisis kadar air, pengukuran pH dan Uji Organoleptik (warna, aroma, tekstur, rasa).

3.6 Analisis Data

Nilai derajat deasetilasi kitosan dan pH yang diperoleh diukur dengan standar yang sudah ditetapkan. Data hasil pengujian *Total Plate Count* (TPC), dan kadar air yang diperoleh dianalisis dengan Software IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, USA) menggunakan metode *Analysis of Variances* (ANOVA). Bila terdapat perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT)

Hening Nafisati Azizah, 2022

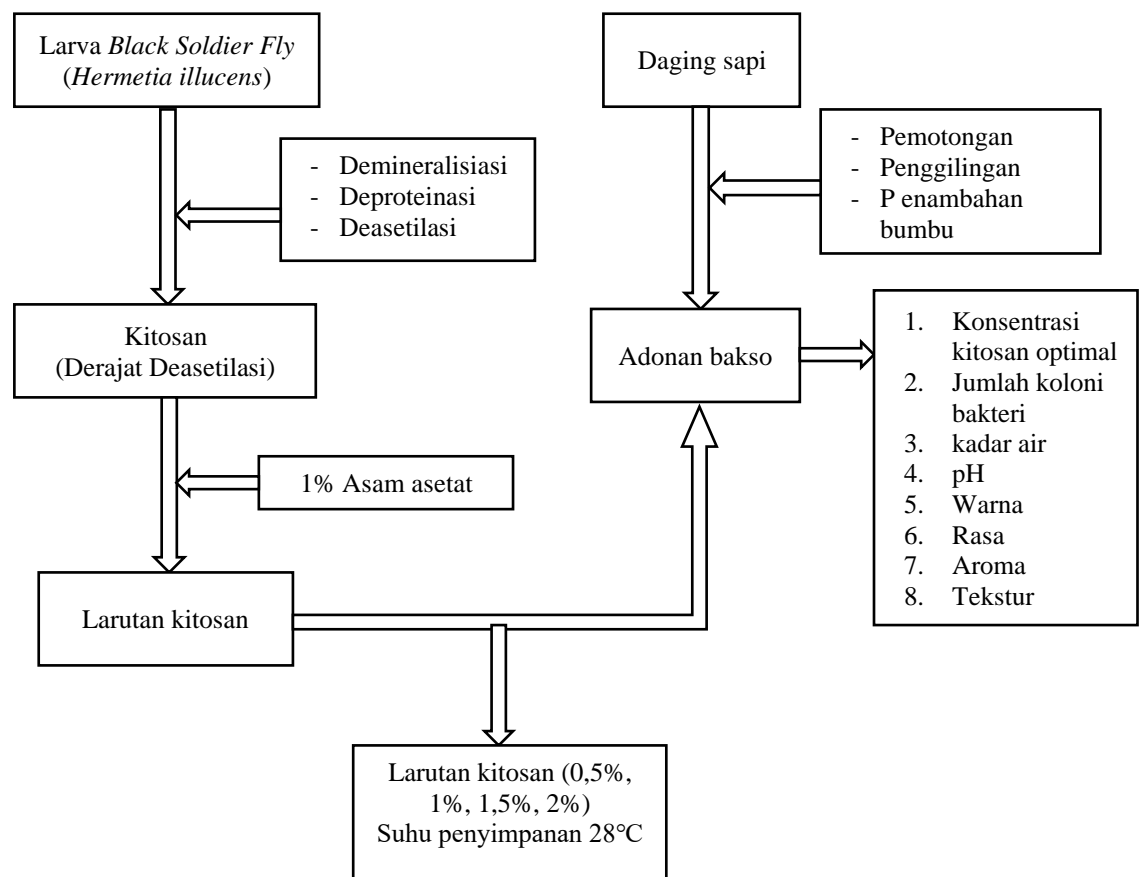
PEMANFAATAN KITOSAN SELONGSONG LARVA BLACK SOLDIER FLY (*Hermetia illucens* L.) SEBAGAI BAHAN PENGAWET BAKSO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pada $p < 0,05$. Kemudian untuk data hasil pengujian organoleptik dianalisis menurut statistik non parametrik dengan uji *Friedman* dengan menggunakan Software IBM SPSS Statistics 22.

3.7 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada diagram alir pada Gambar 3.1 dibawah ini



Gambar 3. 1 Diagram Alur Penelitian Pemanfaatan Kitosan Selongsong Larva Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) sebagai Bahan Pengawet Bakso.