

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial. Sampel yang digunakan berjumlah 24, dengan 8 perlakuan dan 3 kali ulangan pada jam ke 0 setelah perlakuan. Hanya perlakuan terbaik dan kontrol saja yang dilanjutkan ke waktu inkubasi 12 jam dan 24 jam. Air perasan buah belimbing wuluh dikombinasikan dengan garam NaCl untuk diuji keefektifannya terhadap ikan nila. Kemudian diuji sampel ikannya untuk mengetahui jumlah bakteri dengan metode TPC (*Total Plate Count*), dianalisa kadar air, dianalisa kadar protein dengan metode Kjeldahl, dan diuji organoleptik.

Data jumlah bakteri kemudian diolah dengan menggunakan statistik untuk mengetahui pengaruh penambahan kombinasi air perasan buah belimbing wuluh dengan garam terhadap jumlah bakteri, kadar air, kadar protein dan nilai organoleptik.

#### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2013 sampai dengan Juli 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan di Laboratorium Kimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Muhammadiyah Malang (UMM).

### **3.3 Variabel Penelitian**

#### **3.3.1 Variabel Terkontrol**

Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian “Pengaruh pemberian air perasan buah belimbing wuluh dan garam terhadap kualitas ikan nila” meliputi: lama perendaman 2 jam, inkubasi bakterinya 1 x 24 jam.

#### **3.3.2 Variabel Bebas**

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian “Pengaruh pemberian air perasan buah belimbing wuluh dan garam terhadap kualitas ikan nila” adalah konsentrasi antara air perasan buah belimbing wuluh dan garam, pengamatan dilakukan setelah waktu inkubasi 0 jam, 12 jam, dan 24 jam, akuades 175 ml.

#### **3.3.3 Variabel Terikat**

Variasi terikat yang digunakan dalam penelitian “Pengaruh pemberian air perasan buah belimbing wuluh dan garam terhadap kualitas ikan nila” meliputi: nilai TPC, kadar air, kadar protein, dan nilai organoleptik.

### **3.4 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.4.1 Alat-Alat Penelitian**

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, neraca analitik, seperangkat alat gelas, desikator, rotary *vacuum evaporator*, *shaker*, penyaring, *vacuum buchner*, kertas saring, *LAF*, *hot plate*, seperangkat alat destilasi, *autoclave*, *oven*, *incubator*, blender, pipet tetes, mikropipet, cawan petri, seperangkat alat Kjeldahl, dan krus porselen.

### 3.4.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, buah belimbing wuluh, garam (NaCl), ikan nila, bubuk nutrient agar, raksa (II) oksida (HgO), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), indikator metil merah, etanol 95 % (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), lempeng Zn, HCl 0,1 N, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4%, HgO, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, dan NaOH 0,1 N.

### 3.5 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini akan dilakukan dalam beberapa tahap yaitu:

1. Preparasi sampel
  - a. Preparasi buah belimbing wuluh
  - b. Preparasi ikan nila
2. Perlakuan air perasan buah belimbing wuluh dengan garam terhadap ikan segar dengan variasi waktu inkubasi
3. Penentuan jumlah bakteri pada ikan hasil perlakuan
4. Analisa kadar air
5. Analisa kadar protein dengan metode mikro Kjeldahl
6. Analisa organoleptik

### 3.6 Cara Kerja

#### 3.6.1 Preparasi Buah Belimbing Wuluh

Buah belimbing wuluh berukuran  $\pm 6$  cm (berwarna hijau tua) dicuci dengan air sampai bersih. Buah belimbing wuluh dipotong dan dihaluskan kemudian disaring sampai diperoleh air perasan buah belimbing wuluh.

### 3.6.2 Preparasi Sampling Ikan Nila

Ikan nila yang dipilih beratnya antara 40-50 g untuk setiap perlakuan, dicuci bersih kemudian dibuang insang dan isi perutnya langsung dibawa ke laboratorium untuk diberi perlakuan.

### 3.6.3 Perlakuan Air Perasan Buah Belimbing Wuluh dengan Garam Terhadap Ikan Segar

Perlakuan air perasan belimbing wuluh terhadap ikan segar dengan kombinasi garam (NaCl). Kombinasi perasan buah belimbing wuluh dengan garam, dengan perbandingan pada Tabel 3.1 ini.

**Tabel 3.1 Kombinasi air perasan buah belimbing wuluh dengan garam**

No.	Perbandingan konsentrasi (air perasan buah : Garam)	Air perasan buah (mL)	Garam (g)
1	Kontrol	0	0
2	Garam (0:6)	0	1,5
3	1:5	0,25	1,25
4	2:4	0,5	1
5	3:3	0,75	0,75
6	4:2	1	0,5
7	5:1	1,25	0,25
8	Ekstrak (6:0)	1,5	0

Kombinasi air perasan buah belimbing wuluh dengan garam di atas kemudian dilarutkan ke dalam 175 mL akuades. Setelah itu ikan direndam dengan 175 mL akuades, ikan yang digunakan yaitu ikan nila yang dibuang isi perut dan insangnya. Perlakuan ini menggunakan tiga kali ulangan. Setelah direndam 2 jam ikan ditiriskan kemudian diletakkan di dalam wadah dan dibiarkan pada suhu ruang selama 0 jam yang kemudian di lakukan analisis untuk TPC, kadar air, protein, dan nilai organoleptiknya. Hanya perlakuan terbaik dan kontrol yang dilanjutkan pada waktu inkubasi 12 jam dan 24 jam.

### **3.6.4 Penentuan Jumlah Bakteri Pada Ikan Hasil Perlakuan (Ditjen Perikanan, 1988)**

#### **3.6.4.1 Pembuatan Media Agar (Ditjen Perikanan, 1988)**

Media yang digunakan adalah Nutrien Agar (NA) sebanyak 24 buah cawan petri. Caranya dengan melarutkan Beef extract 0,9 gr, Pepton 1,5 gr, bubuk agar 9 g ke dalam 300 mL akuades di dalam labu Erlenmeyer ukuran besar. Larutan tersebut kemudian disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121 °C. Setelah disterilkan suhu media dipertahankan pada 45-55 °C dalam oven.

#### **3.6.4.2 Perlakuan Terhadap Sampel (Ditjen Perikanan, 1988)**

Ikan hasil perlakuan diblender sampai halus. Diambil 5 gram ikan halus dan ditambah dengan 45 mL akuades, sehingga didapatkan larutan stok. Dari larutan contoh tersebut diambil 1 mL dengan pipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades untuk memperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Demikian seterusnya sampai diperoleh pengenceran (keempat dan kelima), (kelima dan keenam), dan (ketujuh dan kedelapan). Kemudian ke dalam setiap cawan petri ditambahkan 1 mL larutan sampel yang telah diencerkan dan 10 mL media NA, kemudian cawan petri digoyang-goyang agar NA merata, dibiarkan beberapa menit agar membeku. Lalu cawan petri disimpan dalam posisi terbalik di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 1 x 24 jam.

### 3.6.4.3 Perhitungan Bakteri (Ditjen Perikanan, 1988)

Koloni yang tumbuh diamati kemudian dihitung jumlahnya dengan metode hitung cawan, perhitungan yang dianggap benar hanya pada cawan yang terdapat pertumbuhan koloni diantara 30-300 cfu. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan kumpulan koloni yang besar dimana dapat dihitung sebagai satu koloni, jumlah bakteri dalam sampel dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Jumlah mikroba/mL/g sampel} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Pengenceran}} \quad \text{cfu}$$

Untuk mendapatkan hasil yang baik analisa jumlah bakteri ini menggunakan tiga kali ulangan, yang mana sesuai pada Tabel 3.1 pada waktu inkubasi 0 jam, lalu perlakuan terbaik dan kontrol yang dilanjutkan untuk waktu inkubasi 12 jam dan 24 jam untuk perhitungan jumlah koloni bakteri.

### 3.6.5 Analisa Kadar Air pada Ikan Hasil Perlakuan (AOAC, 1990)

Analisa kadar air dilakukan pada semua sampel ikan hasil perlakuan pada jam ke 0, dan setelah diketahui perlakuan terbaiknya maka dilakukan lagi untuk waktu inkubasi 12 jam dan 24 jam untuk diuji kadar airnya. Selain itu juga digunakan kontrol ikan segar tanpa perlakuan. Krus porselen dimasukkan dalam oven pada temperatur 100-105 °C dan setelah 60 menit dikeluarkan lalu didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian ditimbang. Prosedur tersebut dilakukan berulang-ulang dengan selang waktu yang sama sampai tercapai berat konstan. Selanjutnya ditimbang  $\pm 4$  g sampel dan dimasukkan

dalam krus porselen tersebut. Kemudian dimasukkan dalam oven temperature 105 °C selama 60 menit. Setelah 60 menit dikeluarkan lalu didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian ditimbang. Prosedur tersebut dilakukan berulang-ulang dengan selang waktu yang sama sampai tercapai berat konstan. Dilakukan tiga kali perulangan. Kadar air dihitung dengan rumus (AOAC, 1990):

$$Mc = \frac{B - F}{B - G} \times 100 \%$$

Mc = Kadar air ( % b/b )

G = Berat wadah kosong (g)

B = G + berat sampel (g)

F = G + berat sampel kering (g)

### 3.6.6 Analisa Kadar Protein Kasar pada Ikan Hasil Perlakuan dengan Metode Mikro Kjeldahl (Sudarmaji dkk, 2007)

Analisis protein kasar dilakukan pada semua sampel ikan hasil perlakuan. Sesuai Tabel 3.1 pada jam ke 0, setelah didapat perlakuan terbaik maka dilanjutkan waktu inkubasinya 12 jam dan 24 jam kemudian diuji kadar proteinnya. Selain itu juga digunakan kontrol ikan segar tanpa perlakuan. Adapun cara yang dilakukan adalah ikan hasil perlakuan dihaluskan dan ditimbang sebanyak 2 g, kemudian dimasukkan dalam labu Kjeldahl, ditambah 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan campuran Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - HgO (20:1). Semua bahan dipanaskan dalam labu Kjeldahl di dalam lemari asam sampai berhenti berasap dan pemanasan diteruskan sampai mendidih dan cairan sudah menjadi jernih (kurang lebih 4 jam). Pemanasan ditambahkan kurang lebih 30 menit, pemanasan dihentikan dan

sampel dibiarkan sampai dingin. Selanjutnya 35 mL akuades ditambahkan dalam labu Kjeldahl dan ditambahkan perlahan-lahan larutan natrium hidroksida 45 % sebanyak 8,5 mL. Labu Kjeldahl dipasang dengan segera pada alat destilasi. Labu Kjeldahl dipanaskan perlahan-lahan sampai lapisan cairan tercampur, kemudian dipanaskan sampai mendidih.

Destilat ditampung dalam Erlenmeyer yang telah berisi 6,5 mL larutan  $H_3BO_3$  4 % dan ditambahkan indikator merah metal sebanyak 5 tetes dan ditampung sebanyak 25 mL. Selanjutnya dititrasi dengan HCL 0,1 N. Titik akhir titrasi tercapai jika terjadi perubahan warna larutan dari merah menjadi kuning. Kadar protein dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Kadar} = \frac{V \text{ titrasi} \times \text{NHCL} \times 14,008 \times 6,25 \times 100\% \times \text{tk}}{\text{Berat sampel (g)} \times 1000}$$

### 3.6.7 Analisa Organoleptik pada Ikan Hasil Perlakuan (SNI 01-2346-2006)

Analisa organoleptik dilakukan pada semua sampel ikan hasil. Sesuai Tabel 3.1 pada jam 0, setelah didapat perlakuan terbaik di dilakukan uji organoleptiknya dengan waktu inkubasinya 12 jam dan 24 jam. Selain itu juga digunakan kontrol ikan segar tanpa perlakuan. Adapun cara yang digunakan adalah masing-masing sampel ikan hasil perlakuan diambil dan ditempatkan pada wadah yang bersih yang seragam dan diberi label. Pelaksanaan uji organoleptik/sensori menggunakan indra manusia sebagai alat utama untuk menilai mutu produk perikanan dan cara penilaian menggunakan uji skor. Proses analisis organoleptik meliputi uji kenampakan warna, tekstur, dan aroma ikan

melalui bentuk kuisisioner pada 15 responden, proses analisis tersebut dilakukan di tempat yang kondisinya seragam untuk mencegah pegaruh lingkungan terhadap responden

