

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

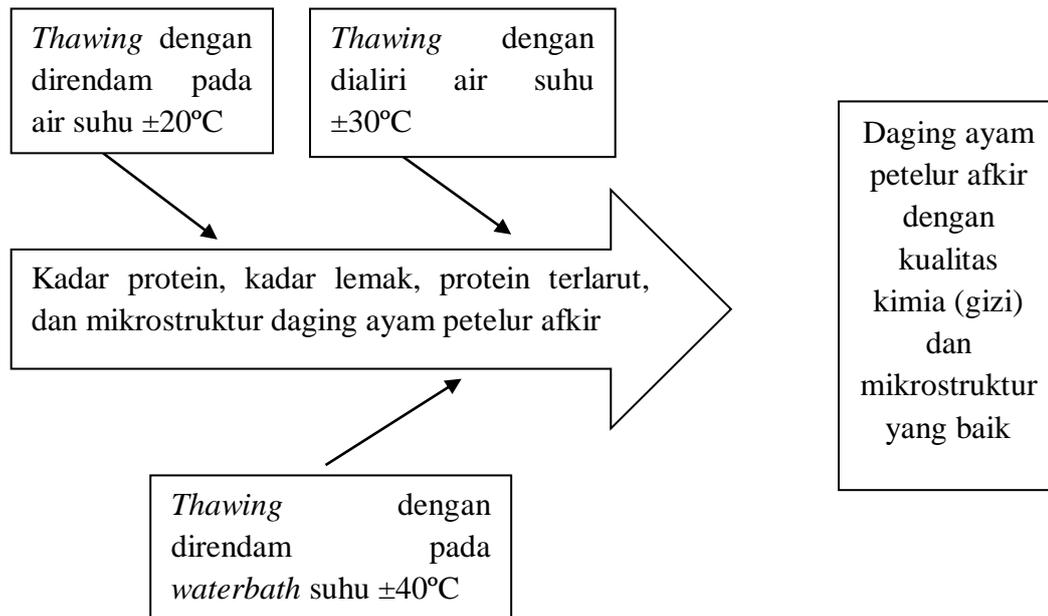
Penelitian ini terdiri dari proses pembekuan, proses *thawing* dan pengujian parameter yang meliputi pengujian kadar protein, kadar lemak, protein terlarut, dan mikrostruktur. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni – Desember 2019 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro dan UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

#### **3.1. Materi Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daging ayam petelur afkir bagian dada, aquades, aluminium foil, plastik *ziplock*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, HCl 0,1 N, NaOH 45%, indikator MR (*Metylen Red*) dan MB (*Metylen Blue*), kertas saring, dan eter. Alat – alat yang digunakan selama penelitian ini di antaranya *freezer storage*, oven, pisau, timbangan analitik (Tanita KD 321, China), *centrifuge* (K-Sentrifuge PLC Series, USA), milimeter tube, mortar, gelas beaker, tabung erlenmeyer, labu Kjeldahl, Soxhlet, *Scanning Electron Microscopy* (JEOL JSM-6510LA, Jepang) dan *waterbath*.

#### **3.2. Metode Penelitian**

Metode penelitian meliputi perancangan penelitian, penentuan hipotesis penelitian, pelaksanaan penelitian, uji parameter, dan analisis data yang diperoleh dari hasil percobaan.



Ilustrasi 1. Diagram *Fishbone* Penelitian Daging Ayam Petelur Afkir dengan Metode *Thawing* yang Berbeda

### 3.2.1. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 5 kali pengulangan. Perlakuan yang dilakukan yaitu metode *thawing* T1= dengan merendam daging ayam petelur afkir beku pada air biasa bersuhu  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  selama 13 menit; T2= daging ayam petelur afkir beku dialiri air biasa dengan suhu  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit; T3= daging ayam petelur afkir direndam pada air hangat bersuhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  (*waterbath*) selama 8 menit, sebagai acuan pembandingan kualitas maka dilakukan pemberian sampel kontrol yaitu daging segar tanpa perlakuan pembekuan dan *thawing*. Desain penelitian daging ayam petelur afkir beku dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Desain Penelitian Daging Ayam Petelur Afkir

Ulangan (U)	Perlakuan Metode Thawing		
	T1	T2	T3
U1	T1U1	T2U1	T3U1
U2	T1U2	T2U2	T3U2
U3	T1U3	T2U3	T3U3
U4	T1U4	T2U4	T3U4
U5	T1U5	T2U5	T3U5

Keterangan :

T1: daging ayam petelur afkir beku *dithawing* dengan merendam daging beku pada air biasa bersuhu  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  selama 13 menit

T2: daging ayam petelur afkir beku *dithawing* dengan dialiri air biasa bersuhu  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit

T3: daging ayam petelur afkir beku *dithawing* dengan direndam pada air hangat bersuhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  (*waterbath*) selama 8 menit

Model matematika (model linear aditif) yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  : angka pengamatan dari perlakuan ke-i (T0, T1, T2, T3) dalam kelompok ke-j (1, 2, 3, 4, 5)

$\mu$  : nilai tengah perlakuan

$\alpha_i$  : pengaruh dari perlakuan ke-i

$\epsilon_{ij}$  : pengaruh galat yang timbul dari perlakuan ke-i dalam kelompok ke-j

### 3.2.2. Hipotesis

Hipotesis empiris yang diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

H<sub>0</sub>: Perlakuan *thawing* tidak mempengaruhi kadar protein, kadar lemak, protein terlarut, dan mikrostruktur daging ayam petelur afkir secara signifikan.

H<sub>1</sub>: Perlakuan *thawing* mempengaruhi kadar protein, kadar lemak, protein terlarut, dan mikrostruktur daging ayam petelur afkir secara signifikan.

Hipotesis empiris tersebut dapat dijabarkan ke dalam hipotesis statistik atau hipotesis uji sebagai berikut.

H<sub>0</sub> :  $\mu_i = \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$  , tidak ada pengaruh berbagai cara *thawing* terhadap kadar protein, kadar lemak, protein terlarut, dan mikrostruktur daging ayam petelur afkir

H<sub>1</sub> :  $\mu_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$  (minimal ada satu  $\mu_i \neq 0$ ), minimal ada pengaruh berbagai cara *thawing* terhadap kadar protein, kadar lemak, protein terlarut, dan mikrostruktur daging ayam petelur afkir

Kriteria keputusan :

$F_{hitung} > F_{tabel}$  (Sig <0,05) maka H<sub>1</sub> diterima, H<sub>0</sub> ditolak

$F_{hitung} \leq F_{tabel}$  (Sig >0,05) maka H<sub>0</sub> diterima, H<sub>1</sub> ditolak

### 3.2.3. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dengan proses pengambilan sampel berupa ayam petelur afkir berumur  $\pm 90$  minggu yang dibeli pada tempat yang sama,

ayam petelur afkir kemudian dipotong dan *difillet* bagian dada, selanjutnya dilakukan penyimpanan daging ayam petelur afkir segar bagian dada dengan dibekukan di dalam *freezer storage* pada suhu  $\pm -22^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, selama dibekukan daging disimpan di dalam kemasan *ziplock* dan ditutup secara rapat. Sebelum dilakukan *thawing* pada sampel beku, terlebih dahulu dilakukan pengukuran suhu internal pada daging ayam petelur afkir dengan termometer *infrared* untuk memastikan telah mencapai suhu standar daging beku yang sesuai dengan ketentuan SNI-3924 (2009), karkas daging dikatakan beku apabila suhu inti daging minimum  $-12^{\circ}\text{C}$ .

Apabila suhu internal pada daging sudah sesuai, daging ayam petelur afkir mulai *dithawing* dengan masing-masing metode, *thawing* dengan direndam pada air biasa (*water immersion*) bersuhu  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  dilakukan dengan daging ayam petelur afkir beku diletakkan/direndam di dalam baskom berisi air biasa bersuhu  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 13$  menit. *Thawing* dengan dialiri air bersuhu  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  dilakukan dengan ayam diletakkan pada baskom berisi air dan diletakkan di atas keran air yang menyala (air berganti) dengan suhu  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 10$  menit, dan direndam pada air hangat dengan suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  (*waterbath*), perlakuan *thawing* ini dilakukan dengan daging ayam petelur afkir beku diletakkan atau direndam di dalam *waterbath* yang sebelumnya telah diisi air dan dipanaskan hingga mencapai suhu  $40^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 8$  menit.

Setelah daging ayam petelur afkir beku telah segar kembali, yang ditandai dengan tidak adanya bunga es, kemudian dilakukan pengujian kadar protein dengan metode Kjeldahl, pengujian lemak dengan metode Soxhlet, pengujian

protein terlarut dengan metode Bradford, dan pengujian mikrostruktur dengan metode SEM. Sebagai pembanding, sampel daging segar juga dilakukan pengujian kadar protein, kadar lemak, protein terlarut dan mikrostruktur.

#### **3.2.4. Parameter pengujian**

Parameter pengujian meliputi kadar protein, kadar lemak, protein terlarut dan mikrostruktur pada daging ayam petelur afkir.

**A. Uji Kadar Protein (Laksono *et al.*, 2012).** Pengujian kadar protein dengan metode Kjeldahl dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu tahap destruksi, destilasi, dan titrasi. Tahap destruksi dimulai dengan menimbang sampel sebanyak 0.5 gram dan dimasukkan ke dalam labu destruksi dan ditambahkan katalisator berupa selenium sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambah asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) pekat sebanyak 10 ml, sampel kemudian didestruksi dalam ruang asam hingga warna cairan menjadi jernih kehijauan. Hasil destruksi didinginkan, kemudian dilanjutkan ke tahap destilasi. Pada tahap destilasi terjadi pemecahan ammonium sulfat menjadi ammonia ( $NH_3$ ) dengan adanya penambahan NaOH hingga alkalis dan dipanaskan, asam standar yang digunakan sebagai penangkap adalah asam borat ( $H_3BO_4$ ) 4% sebanyak 20 ml dan ditambahkan indikator Metylen Red (MR) dan Metylen Blue (MB) sebanyak 2 tetes untuk mengetahui adanya asam dalam keadaan yang berlebihan. Sampel dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan 50 ml aquades dan 40 ml NaOH 45%. Destilasi berakhir hingga penangkap berubah warna dari ungu menjadi hijau. Destilat (hasil destilasi) kemudian dilanjutkan ke dalam proses titrasi. Pada tahap titrasi, penampung yang

digunakan adalah asam borat. Banyaknya asam borat yang bereaksi dengan ammonium dapat diketahui dengan proses titrasi asam menggunakan HCl 0.1 N, akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna larutan dari hijau menjadi ungu.

Kadar protein dihitung dengan rumus:

$$N = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml Blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14,007 \times 100}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Protein} = \% N \times 6,25$$

Keterangan:

ml HCl	: Volume titrasi sampel
ml Blanko	: Volume titrasi blanko
N HCl	: Normalitas HCl (0.1)
14,008	: Berat atom hidrogen

**3.2.4.1. Uji Kadar Lemak (AOAC, 2005).** Kadar lemak diuji dengan metode ekstraksi Soxhlet yang dinyatakan dalam persen. Metode ekstraksi Soxhlet dimulai dengan persiapan kertas saring dengan ukuran 11,7 cm x 14,5 cm yang kemudian dikeringkan selama 1 jam dalam oven dengan suhu 105 °C. Kertas saring tersebut dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit yang kemudian ditimbang. Sampel daging ditimbang seberat ± 1,5 gram (A), kemudian sampel diletakkan di tengah kertas saring, kertas saring lalu dilipat. Sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 105 °C selama 4 jam kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang kembali hingga konstan (B). Sampel yang telah konstan dimasukkan ke dalam alat Soxhlet dengan cairan pelarut lemak ± 2,5 – 3 kali volume labu ekstraksi, ekstraksi dapat berlangsung hingga 6 jam. Sampel yang telah diekstraksi dikeluarkan dari alat dan diangin-anginkan selama

30 menit pada suhu ruang, kemudian dioven selama 1 jam dan setelah itu dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit. Penimbangan dilakukan kembali apabila selisih penimbangan tidak melebihi 0.2 mg (C). Perhitungan kadar lemak dapat dilakukan dengan rumus :

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{\text{Berat B}-\text{Berat C}}{\text{Berat A}} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat A : Berat sampel (g)  
Berat B : Berat sampel setelah dioven (g)  
Berat C : Berat sampel setelah diekstrak (g)

**3.2.4.2. Uji Protein Terlarut (Walker, 2002).** Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Persiapan pereaksi Bradford dilakukan dengan cara melarutkan 5 mg *coomassie brilliant blue* G-250 dalam 2,5 ml etanol 95% (v/v), lalu ditambahkan dengan 5 ml asam fosfat 85% (v/v). Jika telah larut dengan sempurna, maka ditambahkan aquades hingga 250 ml dan disaring dengan kertas saring Whatman no. 1 dan diencerkan 5 kali sesaat sebelum digunakan. Konsentrasi protein ditentukan dengan cara memasukkan 0,1 ml enzim ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml pereaksi Bradford, diinkubasi selama 5 menit dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 465-595 nm. Demikian pula untuk larutan standar dilakukan sama seperti larutan sampel dengan mengganti larutan sampel dengan BSA pada konsentrasi antara 0,11– 1,0 mg/ml. Berdasarkan hasil pembacaan spektrofotometer UV-Vis berupa nilai absorbansi dari setiap sampel dan larutan standar BSA diperoleh kurva standar,

dari kurva standar tersebut diperoleh persamaan regresi linier yang nantinya dapat digunakan untuk memperoleh rata-rata kadar protein terlarut dari setiap sampel.

**3.2.4.3. Uji Mikrostruktur (SEM) (Sujatno *et al.*, 2015).** Pengujian SEM menggunakan sampel yang berupa daging ayam petelur afkir bagian dada beku yang telah *dithawing* menggunakan berbagai metode. Daging dipreparasi dengan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 4 jam, setelah kering dilanjutkan pengujian mikrostruktur dengan SEM. Dimulai dengan meletakkan sampel diatas SEM *specimen holder* menggunakan *carbon double tip* dengan bagian penampang lintang diarahkan secara vertikal keatas atau lensa obyektif. Ruang pada sampel divakum hingga  $10^{-6}$  torr kemudian dioperasikan dengan standar parameter operasi yang meliputi high voltage 20 kV, spot size 50, dan work distance 10 mm. Hasil yang diperoleh berupa gambar mikrostruktur.

### **3.2.5. Analisis Data**

Data hasil pengujian kadar protein, kadar lemak, dan protein terlarut dilakukan dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan taraf signifikansi 95% untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan. Apabila terdapat pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*). Analisis data dilakukan dengan bantuan program aplikasi IBM SPSS 24.0 *for Windows*. Data hasil pengujian mikrostruktur dilakukan pengujian secara deskriptif dan dibandingkan dengan literatur yang komparatif.