

BAB III TATA KERJA

31. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven (Memmert[®]), neraca analitik (Ohaus[®]), Inkubator (Jenaco[®]), Aw meter (AquaLab Lite[®]), tanur (thermolyne[®]), *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AA 7000 AAS Shimadzu[®]), Spektrofotometer (UV 1601 Shimadzu[®]), tabung *vessel microwave digestion*, kompor listrik, cawan krus, desikator, mortar dan stamper, desikator termodifikasi, RH meter, jangka sorong, kertas saring, kertas lakmus, dan alat-alat gelas yang biasa ada di Laboratorium.

32. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah permen jeli biji pinang diambil dari Pasir Salam Kecamatan Mangunreja Kabupaten Tasikmalaya, kemasan *metalized*, kemasan toples kaca, akuades, silika gel, NaCl, BaCl₂, K₄Fe(CN₃)₆, HCl, NaOH, H₂SO₄, KI, Na₂S₂O₃, HNO₃, SnCl₂, Pb(C₂H₃O₂)₂, fenoltalein, Zn asetat, perak ditiodietil karbamat, amilum, serbuk Zn, *Buffered Peptone Water* (BPW), *Plate Count Agar* (PCA), *Lauryl Suphate Tryptose Broth* (LSTB), *Escherichia Coli Broth* (ECB), *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB), *Lactose Broth* (LB), dan *Baird Parker Agar* (BPA).

33. Metode Penelitian

3.3.1. Penentuan Umur Simpan

Penentuan umur simpan permen jeli biji pinang dihitung dengan memasukkan data-data hasil percobaan ke dalam persamaan. Umur simpan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut ini (Syalfina, 2007):

$$t = \frac{i \cdot s}{k \cdot A \cdot \Delta P}$$

Keterangan:

= umur simpan produk (hari)

M_c = kadar air kritis (g H₂O/ g padatan)

M_i = kadar air awal produk (g H₂O/ g padatan)

W_s = bobot kering produk dalam kemasan (g padatan)

$\frac{k}{-}$ = permeabilitas uap air kemasan (g/m².hari.mmHg)

A = luas permukaan kemasan (m²)

ΔP = selisih antara tekanan udara di luar dan di dalam produk

A. Pengukuran Kadar Air Awal Produk (M_i)

Dipanaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu 105°C selama lebih kurang satu jam dan didinginkan dalam desikator selama 20 - 30 menit, kemudian ditimbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya). Dimasukkan 5 gram sampel ke dalam cawan lalu ditimbang. Dipanaskan cawan yang berisi sampel tersebut di dalam oven pada suhu 105°C selama tiga jam. Lalu dipindahkan ke dalam desikator dan didinginkan selama 20 - 30 menit kemudian ditimbang. Dilakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan diulangi kembali sampai perubahan berat antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval ≤ 2 mg. Lalu dihitung kadar air dalam sampel.

Perhitungan kadar air:

$$i = \frac{2}{2}$$

Keterangan:

M_i = Kadar air awal (g H₂O/ g padatan)

W_1 = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan (g)

W_2 = berat cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

B. Pengukuran Kadar Air Kritis (M_c)

Dilakukan preparasi larutan garam. Ditimbang NaCl sebanyak 200 gram dan dimasukkan ke dalam desikator termodifikasi. Ditambahkan 60 mL akuades dan diaduk. Desikator termodifikasi ditutup dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang (30°C), sehingga menghasilkan RH 76% (Rahmina, 2014). Sampel ditempatkan pada cawan, lalu dimasukkan ke dalam desikator termodifikasi. Sampel dilakukan uji organoleptik setiap hari selama 10 hari.

Uji organoleptik kekenyalan yang dilakukan adalah uji hedonik terhadap 15 panelis. Dari hasil uji skor hedonik kekenyalan, diambil rata-rata skor hedonik kekenyalan. Kadar air kritis ditetapkan pada skor penilaian 3 yaitu “agak tidak suka” karena pada penilaian agak tidak suka terhadap sampel berarti sampel sudah ditolak oleh konsumen. Penentuan nilai organoleptik meliputi uji hedonik (skala 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = suka, 5 = sangat suka) (Syalfina, 2007). Lalu dilakukan pengukuran kadar air kritis.

C. Nilai Total Padatan (Ws)

Penentuan nilai total padatan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Rahmina, 2014)

s S lid

S lid () ———

Keterangan:

Ws = nilai total padatan (g padatan)

Mo = kadar air awal (g H₂O/ g padatan)

Wo = bobot produk awal (g)

D. Permeabilitas Kemasan

Dilakukan preparasi larutan garam. Ditimbang BaCl₂ sebanyak 250 gram dan dimasukkan ke dalam desikator modifikasi. Ditambahkan 70 mL akuades dan diaduk. Desikator termodifikasi ditutup dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang (30°C), sehingga menghasilkan RH 90 %. Dimasukkan 10 gram silika gel ke dalam kemasan. Lalu kemasan dimasukkan ke dalam desikator termodifikasi. Ditimbang silika gel setiap hari selama 7 hari. Data yang didapat dibuat dalam grafik hubungan peningkatan massa dengan waktu. Diperoleh kemiringan (*slope*) digunakan untuk menghitung kecepatan tembus uap air pada bahan kemasan. Terakhir dilakukan perhitungan permeabilitas kemasan (Rahmina, 2014).

$$\text{Permeabilitas} = \frac{\text{sl pe la u penyerapan air} \frac{\text{g}}{\text{hari}}}{\text{luas kemasan (m}^2\text{) P (mm g)}}$$

E. Penentuan nilai luas penampang kemasan (A)

Kemasan diukur luas penampang menggunakan jangka sorong.

F. Penentuan selisih antara tekanan udara di dalam dan di luar produk (ΔP)

Penentuan selisih antara tekanan udara di luar dan di dalam produk dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Syalfina, 2007)

Keterangan:

ΔP = selisih antara tekanan udara di luar dan di dalam produk

P_o = Tekanan uap murni pada suhu tertentu (mmHg)

RH = Kelembaban udara (%)

A_w = Aktivitas air

3.3.2. Evaluasi Standar Mutu Permen Jeli

A. Kadar Air

Dipanaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu 105°C selama lebih kurang satu jam dan didinginkan dalam desikator selama 20 - 30 menit, kemudian ditimbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya). Dimasukkan 5 gram sampel ke dalam cawan lalu ditimbang. Dipanaskan cawan yang berisi sampel tersebut di dalam oven pada suhu 105°C selama tiga jam. Lalu dipindahkan kedalam desikator dan didinginkan selama 20 - 30 menit kemudian ditimbang. Dilakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan diulangi kembali sampai perubahan berat antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval ≤ 2 mg. Lalu dihitung kadar air dalam sampel.

Perhitungan kadar air:

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{---}}{2}$$

Keterangan:

W = berat cawan kosong (g)

W1 = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan (g)

W2 = berat cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

B. Kadar Abu

Dipanaskan cawan dalam tanur pada suhu 600°C selama lebih kurang satu jam dan didinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian

ditimbang dengan neraca analitik. Dimasukkan 5 – 10 gram sampel ke dalam cawan dan ditimbang. Lalu ditempatkan cawan yang berisi sampel tersebut ke dalam tanur sampai mencapai berat yang tetap. Dimasukkan ke dalam desikator dan didinginkan selama 30 menit kemudian timbang. Dihitung kadar abu dalam sampel.

Perhitungan kadar abu:

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

Keterangan:

W = berat cawan kosong (g)

W1 = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan (g)

W2 = berat cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

C. Gula Reduksi dan Sukrosa

Ditimbang 5 gram sampel dan dimasukkan ke dalam labu ukur, ditambahkan 25 mL akuades lalu dikocok. Kemudian ditambahkan 5 mL $K_4Fe(CN)_6$ 3 N dan 5 mL Zn asetat 3 N. Kemudian diisi labu ukur sampai tanda batas, dikocok, dan disaring. Dipipet 25 mL hasil peyaringan dan ditambahkan 5 mL HCl 25 %, lalu dipanaskan selama 10 menit dan didinginkan. Kemudian ditambahkan 3 tetes fenolftalein, NaOH 20 % untuk mendapatkan pH yang netral. Kemudian pH dicek menggunakan pH kertas. Jika masih dalam pH yang asam maka ditambahkan kembali NaOH dan jika dalam pH yang basa ditambahkan HCl. Lalu diisi labu ukur sampai tanda batas dan dikocok, kemudian dipipet sebanyak 25 mL pada erlemmeyer dan ditambahkan 25 mL larutan Luff Schoorl. Direfluks selama 10 menit lalu didinginkan. Kemudian pada Erlenmeyer ditambahkan 40 mL H_2SO_4 4 N dan 2 gram KI. Lalu dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat 0,1 N dengan indikator amilum sebanyak 1 mL. Dilakukan pula pada larutan tidak inversi dengan penambahan sampel hasil penyaringan sebanyak 3 mL dan ditetapkan pula pada penetapan blanko dengan 25 ml akuades dan 25 ml larutan Luff Schoorl seperti cara diatas.

D. Cemar Logam untuk Pb, Cu, Hg, dan Sn

Ditimbang 1 gram sampel, lalu dimasukkan kedalam tabung vessel microwave digestion. Ditambahkan 10 ml asam nitrat dan didiamkan selama

15 menit. Kemudian tabung dimasukkan ke dalam alat vessel mikrowave digestion untuk di destruksi selama 10 menit pada suhu 200°C. Lalu didiamkan beberapa saat, kemudian dimasukkan ke labu ukur 100 ml dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Disiapkan larutan standar, lalu dibaca absorbansi larutan menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 324 nm untuk Cu, 283 nm untuk Pb, 286 nm untuk Hg dan Sn. Kemudian dilakukan perhitungan konsentrasi logam dalam sampel.

Perhitungan cemaran logam:

$$\text{Kons logam (mg/kg)} = \frac{C}{m}$$

Keterangan:

C = Kons logam dari kurva kalibrasi (mg/L)

V = Volume larutan akhir (ml)

m = bobot sampel (g)

E. Cemaran Arsen (As)

Ditimbang sampel sebanyak 10 gram, lalu dilarutkan dengan 100 mL akuades dan diaduk. Kemudian disaring, dan hasil penyaringan tersebut diambil sebanyak 35 mL kedalam botol pereaksi pada generator arsen. Ditambahkan 5 mL HCl pekat, 2 mL KI, dan 0,4 mL SnCl₂. Lalu didiamkan selama 15 menit. Dimasukkan kapas yang telah dibasahi larutan timbal asetat kedalam tabung penyaring. Kemudian larutan perak ditiodietil karbamat sebanyak 4 mL dimasukkan kedalam tabung penyerap dan dihubungkan tabung penyaring dengan tabung penyerap. Dimasukkan 3 gram serbuk Zn kedalam botol pereaksi dan segera ditutup kembali botol dan didiamkan selama 30 menit. Lalu dimasukkan larutan perak ditiodietil karbamat kedalam kuvet pada alat spektrofotometer, dibaca absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum 535 nm. Dilakukan pula pada larutan standar sesuai dengan perlakuan pada sampel. Kemudian dilakukan perhitungan konsentrasi logam dalam sampel.

Perhitungan cemaran logam:

$$\text{Kons logam (mg/kg)} = \frac{C}{m}$$

Keterangan:

C = Kons logam dari kurva kalibrasi (mg/L)

V = Volume larutan akhir (ml)

m = bobot sampel (g)

F. Cemarannya Angka Lempeng Total

Sebanyak 25 gram sampel dimasukkan ke dalam wadah steril yang sudah berisi 225 ml larutan *Buffered peptone water* (BPW) 0,1 % steril, kemudian dihomogenkan ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} diambil kemudian diencerkan menggunakan BPW 9 ml sebagai pengenceran 10^{-2} , lalu diulangi kembali sampai dengan pengenceran 10^{-5} . Selanjutnya dari masing-masing pengenceran diambil 1 ml untuk dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dituang media cair *Plate Count Agar* (PCA) sebanyak 20 ml dan dihomogenkan dengan cara menggeserkan cawan horizontal atau membentuk angka delapan dan dibiarkan menjadi padat. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik. Dicatat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai 250 koloni setelah 48 jam.

G. Cemarannya Mikroba *Escherichia coli*

Pengujian jumlah *Escherichia coli* dilakukan dengan dua tahap yaitu uji pendugaan dan uji konfirmasi. Uji pendugaan dilakukan dengan menimbang 25 gram sampel lalu dimasukkan ke dalam wadah steril yang sudah berisi 225 ml larutan *Buffer Peptone Water* (BPW) 0,1 % steril. Kemudian dihomogenkan, ini merupakan merupakan larutan pengenceran 10^{-1} . Lalu dipindahkan 1 ml larutan pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW 0,1 % untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-3} . Dipipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung *Lauryl Sulphate Tryptose Broth* (LSTB) yang berisi tabung Durham. Kemudian diinkubasi pada temperatur 35°C selama 48 jam. Lalu diperhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung Durham. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas. Kemudian pada uji konfirmasi dilakukan dengan memindahkan biakan positif dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung LSTB ke dalam

tabung *Escherichia Coli Broth* (ECB) yang berisi tabung Durham. Lalu diinkubasikan ECB pada temperatur 45°C selama 24 jam, jika hasilnya negatif diinkubasikan kembali selama 48 jam. Kemudian diperhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung Durham. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas. Kemudian digunakan tabel Most Probable Number (MPN) untuk menentukan nilai MPN berdasarkan jumlah tabung ECB yang positif mengandung gas di dalam tabung Durham sebagai jumlah *E.coli* per mililiter atau per gram.

H. Cemaran Bakteri *Coliform*

Pengujian jumlah *Coliform* dilakukan dengan dua tahap yaitu uji pendugaan dan uji konfirmasi. Uji pendugaan dilakukan dengan menimbang 25 gram sampel lalu dimasukkan kedalam wadah steril yang sudah berisi 225 ml larutan *Buffer Peptone Water* (BPW) 0,1 % steril. Kemudian dihomogenkan, ini merupakan merupakan larutan pengenceran 10^{-1} . Lalu dipindahkan 1 ml larutan pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW 0,1 % untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-3} . Dipipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung *Lauryl Sulfate Tryptose Broth* (LSTB) yang berisi tabung Durham. Kemudian diinkubasi pada temperatur 35°C selama 48 jam. Lalu diperhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung Durham. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas. Kemudian pada uji konfirmasi dilakukan dengan memindahkan biakan positif dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung LSTB ke dalam tabung *BGLBB* yang berisi tabung Durham. Kemudian diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 48 jam. Lalu diperhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung Durham. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas. Kemudian digunakan tabel Most Probable Number (MPN) untuk menentukan nilai MPN berdasarkan jumlah tabung *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) yang positif sebagai jumlah koliform per mililiter atau per gram.

I. Cemarannya Mikroba *Salmonella*

Ditimbang sampel sebanyak 25 gram secara aseptik kemudian dimasukkan ke dalam wadah steril yang sudah berisi 225 ml larutan *Lactose Broth* (LB) 0,1 % steril, kemudian dihomogenkan. Dipindahkan suspensi ke dalam Erlenmeyer, lalu diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 jam. Kemudian diaduk perlahan biakan dan dipindahkan masing-masing 1 ml ke dalam media 10 ml TTB, sedangkan untuk media RV pindahkan 0,1 ml ke dalam 10 ml RV. Sampel dengan dugaan cemaran *Salmonella sp* tinggi (high microbial load), diinkubasikan media RV pada temperatur 42°C selama 24 jam, sedangkan untuk media TTB diinkubasi pada temperatur 43°C selama 24 jam. Sampel dengan dugaan cemaran *Salmonella sp* rendah (low microbial load) diinkubasikan media RV pada temperatur 42°C selama 24 jam. Sedangkan untuk media TTB diinkubasi pada temperatur 35°C selama 24 jam. Diambil dua atau lebih koloni dengan jarum ose dari masing-masing media pengayaan yang telah diinkubasikan, dan diinokulasikan pada media HE, XLD dan BSA. Diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 jam. Untuk BSA apabila belum jelas dapat diinkubasikan kembali selama 24 jam. Diamati koloni *Salmonella* pada media HE terlihat berwarna hijau kebiruan dengan atau tanpa titik hitam (H₂S). Pada media XLD koloni terlihat merah muda dengan atau tanpa titik mengkilat atau terlihat hampir seluruh koloni hitam. Pada media BSA koloni terlihat keabu-abuan atau kehitaman, kadang metalik, media disekitar koloni berwarna coklat dan semakin lama waktu diinkubasi akan berubah menjadi hitam.

J. Cemarannya Mikroba *Staphylococcus aureus*

Sebanyak 25 gram sampel dimasukkan ke dalam wadah steril yang sudah berisi 225 ml larutan *Buffered peptone water* (BPW) 0,1 % steril, kemudian dihomogenkan ini merupakan larutan dengan pengenceran 10⁻¹ diambil kemudian diencerkan menggunakan BPW 9 ml sebagai pengenceran 10⁻², lalu diulangi kembali sampai dengan pengenceran 10⁻⁵. Kemudian dituangkan 20 ml media BPA yang sudah ditambah dengan *egg yolk tellurite emulsion* (5 ml ke dalam 95 ml media BPA) pada masing-masing cawan yang akan digunakan dan biarkan sampai memadat. Lalu dipipet 0,4 ml suspensi dari

setiap pengenceran, dan diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media *Baird Parker Agar* (BPA) yang sudah memadat. Lalu diratakan suspensi di atas permukaan media agar dengan menggunakan batang gelas (*hockey stick*), dan dibiarkan sampai suspensi terserap. Kemudian diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 48 jam pada posisi terbalik. Dipilih cawan petri yang mengandung jumlah koloni 20 - 200. Apabila cawan petri pada pengenceran terendah berisi < 20 koloni dan atau > 200 koloni, maka dilanjutkan penghitungan koloni pada cawan petri dengan pengenceran yang lebih tinggi.

K. Cemar Mikroba Kapang dan Khamir

Sebanyak 25 gram sampel dimasukkan ke dalam wadah steril yang sudah berisi 225 ml larutan *Buffered peptone water* (BPW) 0,1 % steril, kemudian dihomogenkan ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} diambil kemudian diencerkan menggunakan BPW 9 ml sebagai pengenceran 10^{-2} . Dilakukan persiapan dan homogenisasi sampel. Dipipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} ke dalam cawan petri steril secara duplo. Dituangkan 20 ml PDA ke dalam masing-masing cawan petri. Digoyangkan cawan petri sehingga tercampur merata. Dibiarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku. Dimasukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 hari. Dihitung koloni kapang/khamir dan dinyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang/khamir per gram sampel. Dipilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10-150 koloni setiap cawan petri. Dihitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Pada koloni kapang biasanya buram dan berbulu sedangkan pada koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).