

3 METODE PENELITIAN

A. WAKTU DAN TEMPAT

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni 2005 sampai April 2006, di Laboratorium Pilot Plant *Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology Center* (SEAFAST Center) IPB dan Pengujian dilakukan di bagian Kimia, Mikrobiologi, dan Biokimia Pangan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB, serta laboratorium Pengolahan Balai Besar Pengembangan dan Pengendalian Hasil Perikanan (BBPPHP) Departemen Kelautan dan Perikanan, Jakarta.

B. BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daging merah ikan tuna beku yang diperoleh dari PT ISAAP (BONECOM) Jakarta. Daging merah tuna dibawa menggunakan *cold box styroform* yang telah diberi es curah. Adapun bahan tambahan untuk pembuatan nugget ikan adalah : tepung maizena, bawang putih, bawang merah, garam, merica. Bahan untuk pemucat adalah *titanium dioksida* (TiO_2) proanalisis yang diperoleh dari PT. BRATACO CHEMIKA Bogor. Untuk analisis nilai gizi protein secara *in vivo* digunakan tikus jenis *Sprague Dawley* (SD) jantan masa sapih antara 21 – 23 hari yang diperoleh dari Pusat Penelitian Gizi dan Makanan, Bogor. Komposisi ransum tikus yang diberikan sesuai rekomendasi AOAC (1984) yang dikutip Muchtadi (1993) yaitu meliputi sumber protein, sumber lemak, pati (maizena merk honig), selulosa, vitamin, mineral dan air.



Gambar 9 Tikus *Sprague Dawley* (SD) jantan yang digunakan dalam uji *in vivo*

Bahan yang digunakan untuk analisis kimia : a) penetapan kadar nitrogen (metode *Kjeldahl*) : NaOH 10 %, H₂SO₄ pekat, H₃BO₃ 3 %, HCl ; b) Pengukuran derajat putih: BaSO₄ ; c) Penetapan TBA : 0,5 -1,0 ml KI 25 %, aquades, larutan blanko, larutan TBA dan HCL ; d) Penetapan TVN : TCA 5 %, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M 2 %, NaOH 2 M, formaldehid 15 % ; e) Penetapan pH : aquades, tissue, larutan Buffer ; f) Penetapan total asam : NaOH 0,1 M, kalium hidrogen ptalat / (COOH)₂, indikator fenolftalein ; g) Penentuan lemak : dietyl eter ; h) Pengujian *in vivo* : enzim α -amilase, standar asam amino, standar asam lemak, anti oksidan merk nature-E, n-heksan, kloroform, formalin, alkohol, methanol, NaCl, NaOH, HCl, asam asetat, asam sulfat, akuades, dan gas N₂.

Alat yang digunakan dalam pembuatan dan penyimpanan *nugget* : *meat separator*, pisau *stainless*, talenan, baskom, *cold box*, blender, pengaduk, plastik PE, freezer, *deep fryer*, sodet, dan timbangan.

Alat yang digunakan untuk analisis kimia adalah whiteness meter, pH-meter, gelas piala, buret, pipet mikrometer, tabung reaksi, pengaduk, labu Erlenmeyer, gelas ukur, stirer, desicator, oven, alat destilasi dan blender,.

Alat yang digunakan untuk analisis mikrobiologi : cawan petri, jarum ose, obyek glass, mikroskop elektron, tabung reaksi, buret dan stirer

Alat yang digunakan untuk analisis organoleptik : pisau, wadah pencicip, sendok, garpu kecil, dan tabel angka acak.

Alat yang digunakan untuk analisis nilai gizi protein secara *in-vivo* adalah timbangan analitik, termometer, sentrifuse, oven, tanur, mikro-Kjeldahl, freezer, labu Erlenmeyer, labu takar, gelas piala, pipet, kertas saring, buret, cawan, hot plate, stirer, kandang metabolik tikus, wadah ransum, wadah minum, labu leher tiga, HPLC, GC, mikroskop, rotapavor dan labu pemisah.

C. PROSEDUR PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap :

Penelitian Pendahuluan

Dilakukan untuk menentukan konsentrasi *titanium dioksida* (TiO₂) yang efektif dalam memucatkan warna merah daging tuna. Cara pembuatan nugget daging merah tuna berdasarkan BBPPHP (2003) sebagai berikut : daging lumat

merah tuna yang telah siap (setelah *dithawing*, dicuci dan dipress) dibagi menjadi lima bagian. Setelah itu masing - masing bagian diberikan perlakuan penambahan TiO_2 sebagai berikut :

$$A0 = 0 \% \text{ TiO}_2$$

$$A1 = 0,25 \% \text{ TiO}_2$$

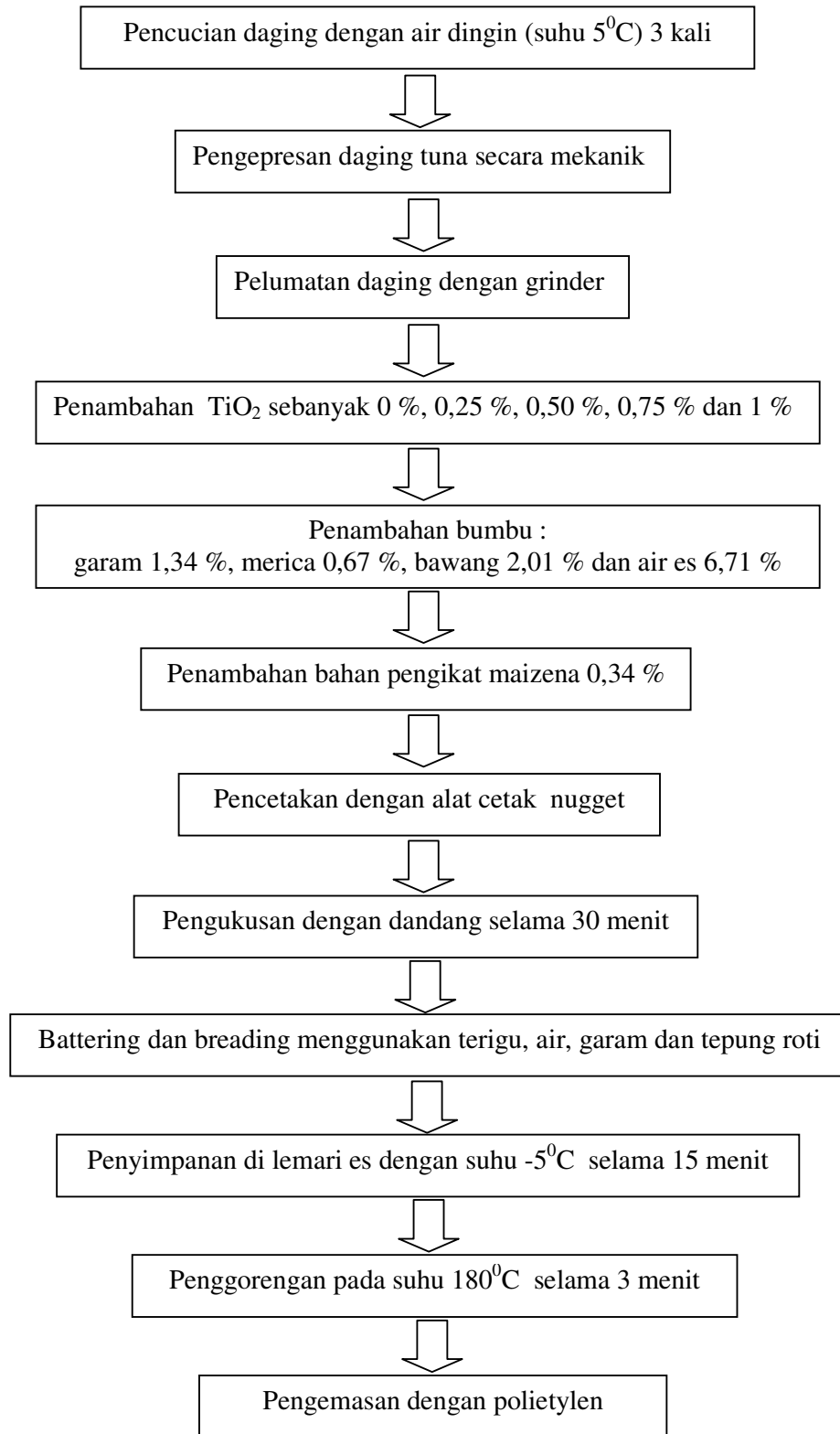
$$A2 = 0,50 \% \text{ TiO}_2$$

$$A3 = 0,75 \% \text{ TiO}_2$$

$$A4 = 1,00 \% \text{ TiO}_2$$

Adonan yang telah ditambahkan TiO_2 dimasukkan ke dalam *silent cutter* bersama dengan bahan lainnya yaitu : maizena (0,34%) , air es (6,71%), garam (1,34 %), merica (0,67%), bawang (2,01%) hingga terbentuk adonan yang homogen. Setelah itu dimasukkan ke dalam cetakan lalu dikukus dengan pengukus *steam* pada suhu 80°C selama 30 menit. Setelah matang dibiarkan dingin lalu dicelup ke dalam adonan *batter* (terigu, air dan garam) dan dilumuri tepung roti. *Nugget* yang telah dilumuri disimpan dalam lemari es selama 15 menit kemudian digoreng menggunakan *deep fryer electric* selama 3 menit dengan suhu 180°C . Cara pembuatan *nugget* daging putih tuna (kontrol) juga berdasarkan BBPPHP (2003). Cara pembuatan *nugget* daging merah tuna secara skematis dapat dilihat pada Gambar 10.

Parameter yang diamati adalah derajat putih *nugget* dengan menggunakan *Whiteness meter*, uji kadar protein dengan metode Kjeldhal dan uji organoleptik *nugget* dengan metode *different test* panelisnya adalah mahasiswa IPB. Form uji perbedaan (Difference from control test) dapat dilihat pada Lampiran 1.

Gambar 10 Cara pembuatan *nugget* tuna

Penelitian Lanjutan 1

Dari hasil penelitian pendahuluan diperoleh konsentrasi TiO_2 1 % efektif digunakan dalam memucat warna merah daging tuna. Sehingga *nugget* yang disimpan pada perlakuan penyimpanan beku adalah *nugget* daging merah tuna dengan perlakuan penambahan TiO_2 1 % yang memiliki derajat putih yang sama dengan *nugget* daging putih (kontrol). *Nugget* didinginkan terlebih dahulu kemudian dibekukan dengan *blast freezer* pada suhu -32°C selama 20 menit. Setelah beku, *nugget* dikemas dengan plastik lalu disimpan dalam *freezer* dengan suhu -18°C sampai -20°C .

Perlakuan penyimpanan beku adalah sebagai berikut :

DP = *nugget* daging putih penyimpanan 0 bulan (kontrol)

B0 = *nugget* daging merah penambahan TiO_2 1 % penyimpanan 0 bulan

B1 = *nugget* daging merah penambahan TiO_2 1 % penyimpanan 1 bulan

B2 = *nugget* daging merah penambahan TiO_2 1 % penyimpanan 2 bulan

Parameter yang diamati pada penelitian lanjutan 1 adalah pengamatan proksimat *nugget* yang meliputi : protein, lemak, air, dan abu serta mutu *nugget* meliputi : pH, TVN, TPC, bilangan peroksida, TBA, dan histamin.

Penelitian Lanjutan 2

Hasil pengujian proksimat yaitu uji protein dari masing-masing sampel *nugget* daging putih penyimpanan 0 bulan ; *nugget* daging merah penambahan TiO_2 1 % penyimpanan 0 bulan ; *nugget* daging merah penambahan TiO_2 1 % penyimpanan 1 bulan ; *nugget* daging merah penambahan TiO_2 1 % penyimpanan 2 bulan diperoleh kadar nitrogen berdasarkan metode Kjeldahl (AOAC, 1990).. Setelah kadar nitrogen dari masing-masing sampel *nugget* diketahui maka dihitung jumlah protein contoh *nugget* yang dibutuhkan untuk komposisi pembuatan ransum tikus sesuai standar AOAC (1984) yang dikutip Muchtadi (1993) dengan menggunakan rumus seperti yang terdapat pada Tabel 5. Setelah diketahui jumlah protein contoh maka dicampurkan seluruh bahan campuran ransum sesuai dengan standar AOAC (1984) yang dikutip Muchtadi (1993).

Nugget yang telah berbentuk tepung tersebut dicampurkan ke dalam ransum tikus percobaan dan diberikan selama masa penelitian berlangsung.

Tikus yang digunakan adalah jenis *Sprague Dawley* jantan yang berumur 21 – 23 hari yang baru disapih dengan berat rata-rata sekitar 25 g. Sebanyak 30 ekor tikus jantan dipersiapkan untuk penelitian ini. Sebelum percobaan dimulai, tikus diadaptasikan di lingkungan laboratorium selama 4 hari. Pada masa adaptasi, tikus diberi ransum kasein (BDH Chem, LTD, London) sebagai sumber protein dicampur dengan bahan-bahan lain (minyak jagung, vitamin, mineral, tepung maizena dan selulosa).

Minyak yang digunakan untuk melengkapi ransum adalah minyak jagung. Campuran mineral terdiri dari 139,3 g NaCl ; 079 g KI ; 389,0 g KH_2PO_4 ; 57,3 g MnSO_4 anhyd ; 381,4 g CaCO_3 ; 27,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,548 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,477 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Vitamin untuk ransum terdiri dari 2000 IU vit A ; 200 IU vit D ; 10 IU vit B₁ ; 0,5 mg Menadione ; 200 mg Choline ; 10 mg Inositol ; 4 mg Niacin ; 4 mg Ca-D panthotenat ; 0,5 mg Riboflavin ; 5 Thiamine HCl ; 0,5 mg Piridoksin ; 0,2 g asam Folat ; 0,04 mg Biotin ; 0,003 mg vit B₁₂ dan glukosa untuk membuat ransum menjadi 100 persen digunakan tepung maizena.

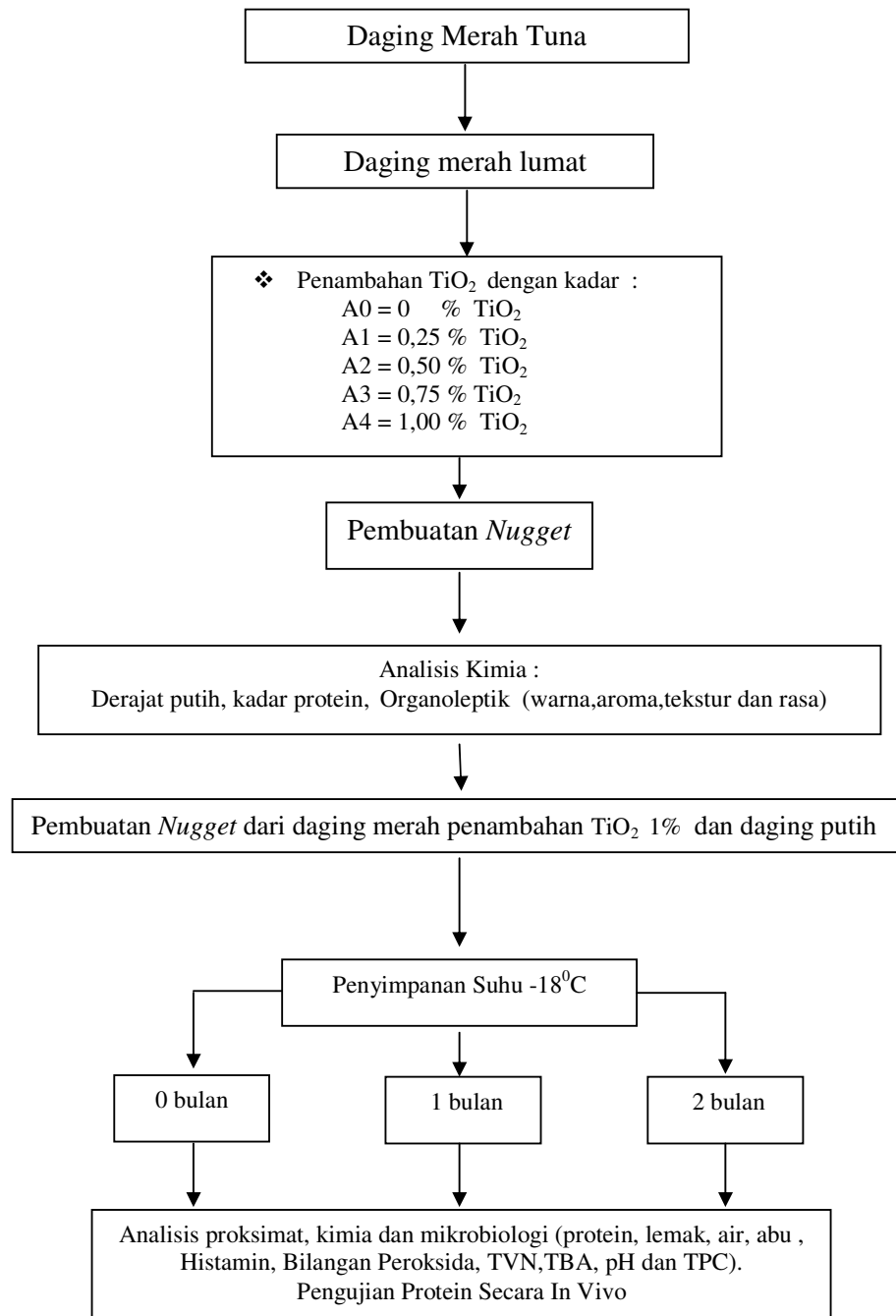
Tikus-tikus tersebut dibagi dalam enam grup, masing-masing grup terdiri dari lima ekor tikus. Perbedaan berat badan antar kelompok tidak boleh lebih dari 5 g. Tikus-tikus tersebut dikandangkan sendiri-sendiri pada kandang metabolik yang dapat menampung urin dan feses (Gambar 11). Keenam grup tikus dengan perlakuan ransum adalah sebagai berikut :

- A = ransum kasein sebagai standar
- B = ransum non protein.
- C = ransum tepung *nugget* daging putih tuna
- D = ransum tepung *nugget* daging merah tuna penyimpanan 0 bulan
- E = ransum tepung *nugget* daging merah tuna penyimpanan 1 bulan
- F = ransum tepung *nugget* daging merah tuna penyimpanan 2 bulan



Gambar 11 Kandang metabolik dan wadah penampung urin dan feses tikus

Tikus diberi makan secara *ad libitum*, berat badan tikus ditimbang setiap dua hari sekali. Kadar nitrogen dalam ransum, urin dan feses ditentukan berdasarkan metode Kjeldahl. Nilai-nilai tersebut kemudian digunakan untuk mengukur keseimbangan nitrogen. Parameter nilai gizi protein yang diamati pada penelitian lanjutan 2 yaitu : daya cerna sejati, nilai biologis (*biological value*) dan NPU (*net protein utilization*). Prosedur penelitian secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12 Prosedur penelitian

D. ANALISIS SAMPEL

1. Uji Proksimat

a. Kadar Air (AOAC, 1984).

Cawan aluminium dikeringkan dalam oven pada suhu 105⁰C selama 15 menit, kemudian didinginkan lalu ditimbang (A). Sampel ditimbang sebanyak 5 gram (B). Setelah itu cawan berisi sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 105⁰C selama 6 jam kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap (C). Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%wb)} = \frac{[B - (C - A)]}{B} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar Air (\%db)} = \frac{[B - (C - A)]}{C - A} \times 100 \%$$

b. Kadar Abu (AOAC, 1984)

Sampel ditimbang sebanyak 1-5 gram, lalu dimasukkan ke dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobot tetapnya. Sampel diarakkan di atas Bunsen dengan nyala api kecil hingga berasap, selanjutnya dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 500-600⁰C sampai menjadi abu yang berwarna putih. Cawan yang berisi abu didinginkan dalam desikator dan dilakukan penimbangan hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{BeratAbu(g)}}{\text{BeratSampel(g)}} \times 100 \%$$

c. Kadar Protein (AOAC, 1984)

Sampel dihitung sebanyak 0,5-3 g lalu dimasukkan ke dalam labu kjeldahl dan didestruksi dengan menggunakan 20 ml asam sulfat pekat dengan pemanasan sampai terjadi larutan berwarna jernih. Larutan hasil destruksi diencerkan dan didestilasi dengan penambahan 10 ml NaOH 10 %. Destilat ditampung dalam 25 ml larutan H₃BO₃ 3 %. Larutan H₃BO₃ dititrasi dengan larutan HCl standar dengan menggunakan metal merah sebagai indikator.

Dari hasil titrasi ini total nitrogen dapat diketahui. Kadar protein sampel dihitung dengan mengalikan total nitrogen dan faktor koreksi.

$$\text{Total Nitrogen (\%)} = \frac{\text{mltitran} \times \text{NHCl} \times \text{fk} \times 14}{\text{BobotSampel}} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar Protein (\%)} = \text{Total Nitrogen} \times 6,25$$

d. Kadar Lemak (AOAC, 1984)

Labu lemak yang ukurannya sesuai dengan alat ekstraksi soxhlet dikeringkan dalam oven. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot tetap. Sebanyak 5 g sampel dibungkus dengan kertas saring, kemudian ditutup dengan kapas wool yang bebas lemak. Kertas saring yang berisi sampel tersebut dimasukkan dalam alat ekstraksi soxhlet, kemudian dipasang alat kondensor ditasnya dan labu lemak di bawahnya.

Pelarut dietil eter atau petroleum eter dituangkan ke dalam labu lemak secukupnya sesuai dengan ukuran yang digunakan. Selanjutnya dilakukan refluks minimum 5 jam sampai pelarut yang turun kembali ke labu lemak berwarna jernih. Pelarut yang ada di dalam labu lemak didestilasi dan ditampung. Kemudian labu lemak yang berisi hasil ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 105⁰C. Selanjutnya didinginkan dalam desikator dan dilakukan penimbangan hingga diperoleh bobot tetap.

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{\text{BeratLemak}(g)}{\text{BeratSanpel}(g)} \times 100 \%$$

2. Total Volatile Base Nitrogen/TVN (Apriyantono *et al.*, 1989)

Sampel sebanyak 100 gram yang sudah digiling dimasukkan ke dalam waring blender. Kemudian ditambah 300 ml larutan TCA 5 % dan diblender sampai homogen. Dipisahkan ekstrak TCA dengan cara penyaringan atau sentrifuse. Ekstrak TCA sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam alat destilasi Kjeldahl semimikro dan ditambahkan 5 ml NaOH 2 M. Selanjutnya didestilasi, di mana destilat ditangkap dengan 15 ml HCl 0,01 M standar. Ke dalam destilat ditambahkan beberapa tetes merah fenol, lalu dititrasi dengan NaOH 0,01 M standar sampai tercapai titik akhir.

Perhitungan :

$$\text{TVN (mg N/100 g)} = \frac{14(300 + W) \times (15 - V) \times 0,01}{5} \times \frac{100}{M}$$

Keterangan : 14 = Bobot atom nitrogen

V = Volume NaOH 0,01 M yang dibutuhkan untuk titrasi

M = Berat sampel (g)

W = Jumlah air (kadar air) yang ada dalam bahan (g)

3. Derajat Putih (Fardiaz, 1989)

Derajat putih dilakukan dengan menggunakan *whiteness meter*. Standar warna putih yang digunakan untuk kalibrasi adalah BaSO₄ yang diasumsikan derajat putih 100 %. Prinsip pengukurannya adalah berdasarkan jumlah sinar yang dipantulkan oleh permukaan sampel yang diukur dibandingkan warna standar.

4. Total Plate Count/TPC (Fardiaz, 1987)

Pembuatan media agar dengan cara mencampurkan 23 g *nutrient* agar ke dalam 1 liter aquades dalam gelas piala. Larutan yang terbentuk dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih sehingga semua agar terlarut. Sterilisasi (121⁰C, 1 atm) dilakukan terhadap larutan agar beserta peralatan lain yang akan digunakan seperti pipet, dan blender dalam autoklaf selama 15 menit. Larutan agar disimpan dalam pemanas air bersuhu 45⁰C. Pembuatan larutan pengencer dengan pencampuran 8,5 g NaCl ke dalam 1000 ml akuades. Larutan pengencer kemudian disterilisasi.

Pembuatan larutan sampel dengan mencampurkan 1 g bahan dan dihomogenkan bersama larutan pengencer sebanyak 9 ml sampai larutan menjadi homogen. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan sampel yang sudah homogen tersebut dengan menggunakan pipet steril, lalu kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan pengencer sehingga terbentuk pengenceran 10⁻¹ kemudian larutan tersebut dikocok sampai homogen. Pengenceran dilakukan menurut kebutuhan penelitian. Pemipetan dilakukan dari masing-masing tabung pengenceran sebanyak 1 ml larutan sampel dan dipindahkan ke dalam cawan petri steril secara duplo dengan menggunakan pipet steril. Media agar ditambahkan ke dalam cawan

petri dengan metode tuang sebanyak 20 ml dan digoyangkan sampai merata. Cawan petri (agar yang sudah membeku) diinkubasi dengan posisi terbalik dalam inkubator bersuhu 37⁰C selama 48 jam. Perhitungan koloni bakteri pada cawan yang telah diinkubasi dihitung berdasarkan jumlah yang layak dihitung (30-300 koloni). Perhitungan jumlah bakteri total per gram dapat dihitung dengan memperhitungkan jumlah pada tingkat pengenceran dan pada cawan petri dengan menggunakan koloni counter atau hand counter.

5. pH (Apriyantono *et al.*, 1989)

- Menyalakan pH meter sampai diperoleh keadaan stabil selama 15 sampai 30 menit. Sampel sebanyak 10 g ditambah dengan 50 ml akuades dan kemudian diblender.
- Elektroda pH meter dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Kemudian pH meter dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan buffer pH 7 lalu dikeringkan dengan *tissue*.
- Elektroda dicelupkan ke dalam larutan sampel dan nilai pH dapat diketahui setelah diperoleh pembacaan yang stabil dari pH meter.
- Catat pH sampel

6. Analisis Histamin (BBPPHP, 2001)

- Timbang 10 g contoh dalam beaker glass 250 ml dan tambahkan 50 ml metahanol, blender hingga homogen
- Panaskan di atas waterbath selama 15 menit pada suhu 60⁰C. Dijaga sample dalam kondisi tertutup, diinginkan hingga suhu kamar.
- Tuangkan contoh ke dalam labu takar 100 ml dan tepatkan hingga volume labu dengan metanol.
- Saring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung dalam botol contoh. Pada tahap ini filtrat contoh dapat disimpan dalam refrigerator.
- Timbang 3 g resin untuk setiap kolom dalam beaker glass 250 ml.
- Kemudian tambahkan 15 ml NaOH 2 N/g resin untuk mengubah resin menjadi bentuk OH.

- Aduk menggunakan stirer-plate selama 30 menit.
- Tuang cairan pada bagian atas dan ulangi penambahan NaOH (basa) dengan jumlah yang sama.
- Cuci/bilas resin dengan aquadest sebanyak 3 kali.
- Saring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan cuci kembali dengan aquadest.
- Siapkan resin segar setiap minggu dan simpan dalam aquadest.
- Masukkan galasswool dalam kolom resin setinggi $\pm 1,5$ cm.
- Masukkan resin dalam kolom resin setinggi ± 8 cm, pertahanakan volume air yang berada di atas resin ± 1 cm, jangan dibiarkan kering.
- Letakkan labu takar 50 ml yang sudah berisi 5 ml HCl 1 N dibawah kolom resin guna menampung elusi contoh yang dilewatkan pada kolom resin.
- Pipet 1 ml filtrat contoh, masukkan dalam kolom resin, kran kolom resin dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 ml.
- Seketika tinggi cairan ± 1 cm diatas resin, tambahkan aquadest dan biarkan cairan berelusi. Lakukan demikian seterusnya hingga labu takar tepat 50 ml. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam refrigator.
- Siapkan tabung reaksi 50 ml duplo, tambahkan :
 - 5 ml contoh
 - 10 ml HCl 0,1 N, kocok
 - 3 ml NaOH 1 N, kocok, dalam waktu 5 menit harus sudah ditambah 1 ml OPT 0,1 %, kocok dan biarkan selama 4 menit.
 - 3 ml H₃PO₄ 3 N, kocok dan sample sesegera mungkin dibaca dengan alat spektrofotometer Ex : 350 nm dan Em : 444 nm
- Standar diberlakukan sama seperti pada persiapan pembacaan contoh. Untuk blanko digunakan HCl 0,1 N.
- dalam waktu 90 menit standar dan sample harus sudah dibaca flouresensinya pada instrumen fluorometer.

Perhitungan :

- Masukkan nilai konsentrasi dan fluoresensi dari larutan standar dalam program/persamaan linier untuk mendapatkan kurva standar (kurva kalibrasi). Nilai koefisien regresi (r) slope (b) dari intercept (a) digunakan untuk menghitung konsentrasi contoh. Masukkan nilai fluoresensi contoh ke dalam persamaan regresi standar ($y = a + bx$) dimana :

y = fluoresensi contoh

a = intercept

b = slope

x = konsentrasi contoh

- Setelah didapat nilai konsentrasi contoh (x); kalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat contoh. Nyatakan hasil dalam satuan mg/100 g contoh.

7. Analisis Bilangan Peroksida (Apriyantono *et al.* 1989)

Timbang sampel seberat 200 mg yang telah dilarutkan dengan heksan dalam tabung reaksi. Tambahkan 0,5 ml larutan Potasium Iodida , 0,5 ml larutan Aluminium klorida dan heksan 1 ML, campur (kocok) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Tambahkan 15 ml HCl 0,01 N dan 0,5 ml larutan pati campur sampai merata. Pindahkan larutan ke dalam tabung sentrifus selama 3 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Lapisan bawah (fase cair) ditetapkan absorbansinya pada 560 nm (Total lapisan air adalah 16,5ml). Blanko ditetapkan seperti pada penetapan contoh.

8. Analisis TBA (Apriyantono *et al.* 1989)

Sampel seberat 10 gram dimasukkan kedalam blender (waring blender), lalu ditambah dengan 50 ml aquades dan dilumatkan selama 2 menit. Pindahkan secara kuantitatif kedalam labu destilasi sambil dicuci dengan 4,75 ml aquades. Tambahkan 2,5 ml 4 M HCl sampai pH 1,5, batu didih dan pencegah buih (*anti foaming agent*). Pasang labu destilasi pada alat destilasi,

panaskan sampai didapat 50 ml destilat selama 10 menit. Aduk destilat yang didapat dan pipetkan 5 ml ke dalam tabung reaksi tertutup . Kemudian tambahkan 5 ml pelarut TBA dan panaskan selama 35 menit dalam air mendidih. Dinginkan selama 10 menit kemudian baca absorbansinya (A) pada $\lambda = 5,28$ nm dengan larutan blanko sebagai titik nol (blanko terdiri dari 5 ml aquadest dan 5 ml pereaksi). Bilangan TBA dinyatakan dalam mg malonaldehid per kg sampel. Bilangan TBA = 7,8 D. Bilangan TBA dapat diketahui dengan rumus :

$$\text{mg malonaldehid per kg sampel} = \frac{3}{\text{berat sampel}} \times \text{absorban} \times 7,8$$

9. Penentuan Kadar Protein (AOAC, 1984)

Kadar protein ditetapkan dengan metode Micro Kjeldhal bahan ditimbang 1 g dimasukkan kedalam labu Kjeldahl. Tambahkan 5 ml H₂SO₄ pekat dan setegah sendok selenium mixture, lalu dipanaskan untuk menghilangkan uap SO₂. Pemanasan mula-mula dengan api kecil lalu api hijau hingga terbentuk larutan berwarna jernih kehijauan. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur (100 ml) dan diencerkan sampai tanda tera. Kemudian diambil 10 ml dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan 10 ml NaOH 30 %, lalu disuling. Destilasi dilakukan sampai uap destilasi tidak bereaksi basa (diuji dengan kertas pH). Hasil destilasi ditampung dalam 20 ml larutan asam boraks (H₃BO₃ 3 %), dititrasikan dengan HCl standar menggunakan merah methil

Perhitungan :

$$\% \text{ Total Nitrogen} = \frac{\text{ml HCl} \times \text{NHCl} \times \text{Fp} \times 14,007}{\text{mg sampel}} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar protein} = \% \text{ total nitrogen} \times \text{Fk}$$

10. Uji Organoleptik (Meilgaard *et al.*, 1999)

Uji organoleptik yang dilakukan terhadap *nugget* ikan adalah uji penampakan fisik yang meliputi warna, aroma, rasa dan tekstur. Uji organoleptik ini menggunakan uji pembeda (*different test*) dengan kisaran nilai yang digunakan adalah 0-6 untuk masing-masing atribut. Nilai 0 = tidak

berbeda ; 1 = sedikit berbeda ; 2 = hampir berbeda ; 3 = berbeda ; 4 = lebih dari berbeda ; 5 = sangat berbeda dan 6 = sangat berbeda sekali. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 17 panelis mahasiswa IPB.

11. Penentuan Mutu Protein Secara *In Vivo*

Tikus yang digunakan adalah jenis *Sprague Dawley* jantan yang berumur 21-23 hari yang baru disapih dengan berat rata-rata sekitar 25 g. . Sebelum percobaan dimulai, tikus diadaptasikan di lingkungan laboratorium selama 4 hari. Pada masa adaptasi, tikus diberi ransum kasein (BDH Chem, LTD, London) sebagai sumber protein dicampur dengan bahan-bahan lain (minyak jagung, vitamin, mineral, tepung maizena dan selulosa). Sebanyak 30 ekor tikus jantan dari species *Sprague Dawley* dipersiapkan untuk percobaan ini. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dengan perlakuan ransum adalah sebagai berikut : A = ransum kasein sebagai standar ; B = ransum non protein ; C = ransum tepung *nugget* daging putih tuna ; D = ransum tepung *nugget* daging merah penyimpanan beku 0 bulan ; E = ransum tepung *nugget* daging merah penyimpanan beku 1 bulan ; F = ransum tepung *nugget* daging merah penyimpanan beku 2 bulan. Perbedaan berat badan antar kelompok tidak boleh lebih dari 5 g. Komposisi ransum yang diberikan disesuaikan AOAC (1984) yang dikutip Muchtadi (1993), yaitu :

Tabel 5 Komposisi ransum yang dianjurkan untuk penetapan PER

Bahan campuran	Jumlah (%)
Protein	$X = 1,60 \times 100 / \% N \text{ sampel (10 \% protein)}$
Minyak	$= 8 - (X \times \% \text{ ekstrak eter} / 100)$
Vitamin	$= 1$
Mineral	$= 5 - (X \times \% \text{ kadar abu} / 100)$
Selulosa	$= 1 - (X \times \% \text{ kadar serat kasar} / 100)$
Air	$= 5 - (X \times \% \text{ kadar air} / 100)$
Pati jagung	$= \text{ untuk membuat } 100 \%$

Berat badan tikus ditimbang setiap dua hari sekali, sedangkan banyaknya konsumsi ransum ditimbang setiap hari. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum* (sekitar 15 g berat kering setiap hari). Di bagian bawah kandang ditempatkan wadah penampung urin dan feses. Setiap 2 hari sekali

urin dan feses dikumpulkan ke dalam botol dan disimpan pada refrigerator (4°C). Ke dalam botol yang berisi urin ditambahkan 1 ml H_2SO_4 10 % untuk mencegah kehilangan nitrogen. Pada penentuan nilai biologis dan daya cerna kandungan nitrogen urin dan feses dilakukan secara mikro Kjeldahl.

a. Nilai Biologis (NB)

Dilakukan dengan cara membandingkan jumlah nitrogen yang ditahan dengan jumlah nitrogen yang diserap. Percobaan dilakukan selama 10 hari.

$$\text{NB} = \frac{I - (F - Fm) - (U - Ue)}{I - (F - Fm)}$$

dimana :

I = N yang dikonsumsi dari ransum

F = N feses pada hewan dengan ransum berprotein

U = N urin pada hewan dengan ransum berprotein

Fm = N feses pada hewan dengan ransum non protein

Ue = N urin pada hewan dengan ransum non protein

b. Daya Cerna Sejati

Kondisi perlakuan sama seperti perlakuan sebelumnya. Dihitung dengan rumus :

$$\text{DC} = \frac{I - (F - Fm)}{I} \times 100 \%$$

c. NPU (Net Protein Utilization)

$$\text{NPU} = \text{NB} \times \text{DC sejati}$$

E. ANALISIS DATA

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA) kemudian dilanjutkan dengan uji *t-Student* atau uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Steel dan Torrie, 1995).

Model persamaan RAL adalah sebagai berikut :

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

Di mana :

- Y_{ij} = Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- μ = Rataan (nilai tengah umum)
- α_i = Pengaruh perlakuan ke-i ($i= 1,2,3\dots$)
- ϵ_{ij} = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.