



**PENGEMBANGAN *TIME TEMPERATURE INDICATOR* BERBASIS
ENZIM LIPASE SEBAGAI INDIKATOR KESEGERAN
*CHICKEN NUGGET***

SKRIPSI

Oleh :

Zahra Puspa Diani

NIM 142210101016

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**PENGEMBANGAN *TIME TEMPERATURE INDICATOR* BERBASIS
ENZIM LIPASE SEBAGAI INDIKATOR KESEGRAN
*CHICKEN NUGGET***

SKRIPSI

diajukan untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

**Zahra Puspa Diani
NIM 142210101016**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orangtuaku tersayang, Ibu Dyah Soerjani dan (Alm.) Ayah Moch. Anie yang senantiasa membimbing dan merawat saya dengan sabar dan penuh kasih sayang serta yang selalu mendoakan dan memberi saya semangat tiap harinya;
2. Satu-satunya adik laki-laki yang kusayangi, Pandu;
3. Semua guru, dosen dan pendidik yang saya hormati mulai dari Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang telah mengajar dan membimbingi saya selama ini;
4. Sahabat dan teman-teman saya dari SD hingga Kuliah;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember

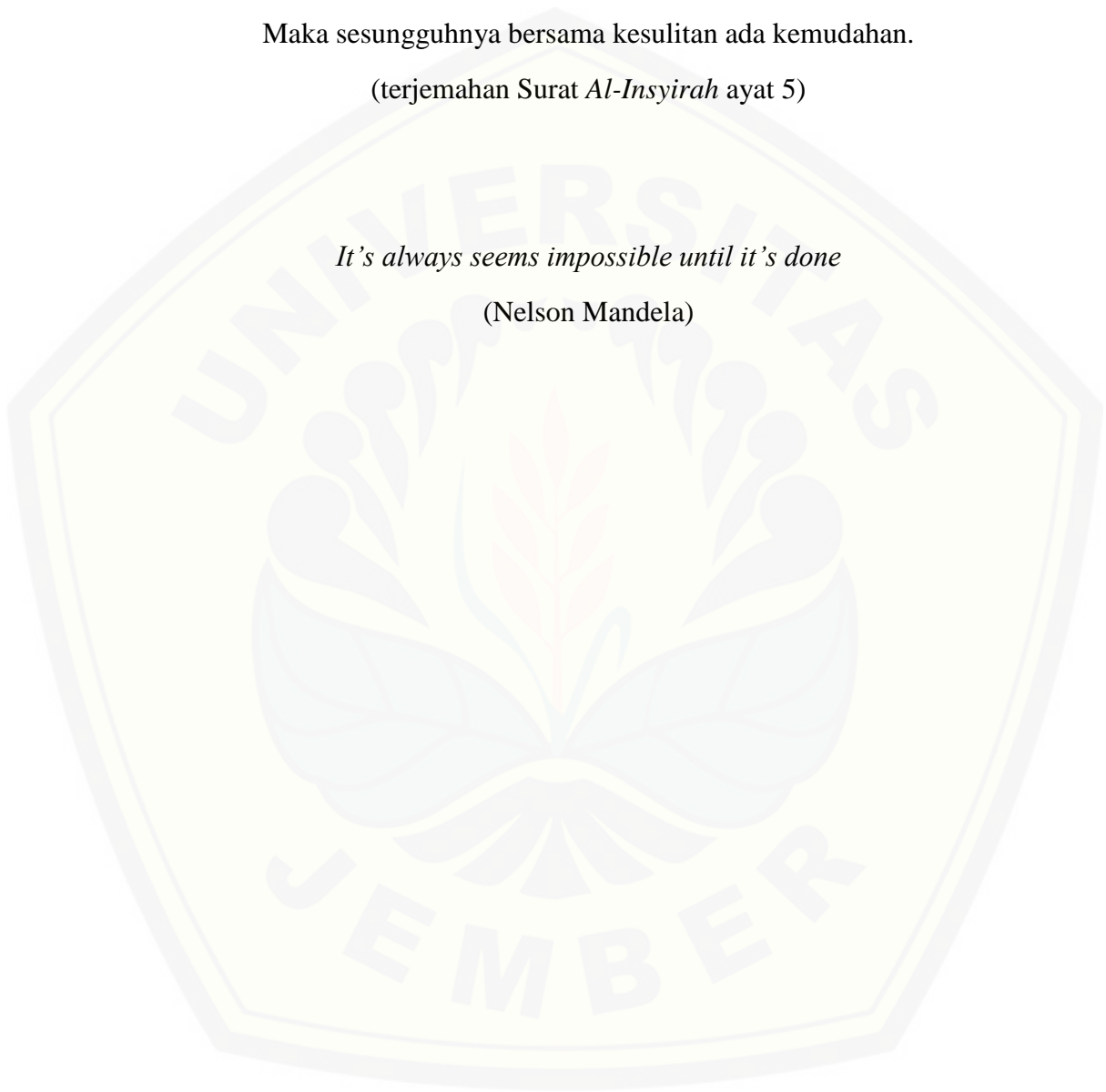
MOTTO

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.

(terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 5)

It's always seems impossible until it's done

(Nelson Mandela)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Zahra Puspa Diani

NIM : 142210101016

menyatakan dengan sesungguhnya bawa karya ilmiah yang berjudul “Pengembangan *Time Temperature Indicator* Berbasis Enzim Lipase Sebagai Indikator Kesegaran *Chicken Nugget*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan apda isntitusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 November 2018

Yang menyatakan,

Zahra Puspa Diani

NIM 142210101016

SKRIPSI

**PENGEMBANGAN *TIME TEMPERATURE INDICATOR* BERBASIS
ENZIM LIPASE SEBAGAI INDIKATOR KESEGARAN
*CHICKEN NUGGET***

Oleh:

Zahra Puspa Diani
NIM 142210101016

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Assoc. Prof Ari Satia N., S.F., Gdip.Sc, M.Sc-Res, Ph.D., Apt

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengembangan *Time Temperature Indicator* Berbasis Enzim Lipase Sebagai Indikator Kesegaran *Chicken Nugget*” karya Zahra Puspa Diani telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 30 November 2018

tempat : Ruang Multimedia Fakultas Farmasi Universitas Jember

Ketua,

Anggota I

Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.

Dwi Koko P., S.Farm., M.Sc., Apt

NIP 196902011994031002

NIP 198504282009121004

Anggota II,

Anggota III,

Assoc. Prof. Ari Satia Nugraha, S.F., GdipSc., M.Sc-Res., Ph.D.,SApt

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt

NIP 198504282009121004

NIP 197604142002122001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Pengembangan *Time Temperature Indicator* Berbasis Enzim Lipase Sebagai Indikator Kesegaran *Chicken Nugget*; Zahra Puspa Diani, 142210101016; 2018; 74 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dalam memenuhi kebutuhan pangan masyarakat yang serba praktis terdapat beberapa produk makanan siap saji yang hadir di pasaran salah satunya adalah jenis *frozen food*. *Frozen food* merupakan produk makanan siap saji yang disimpan pada suhu beku. Tujuan dari pembekuan makanan ini adalah untuk mengawetkan makanan dalam jangka panjang. Salah satu produk *frozen food* yang terkenal di pasaran adalah *chicken nugget*. Pada kenyataannya kebanyakan konsumen tidak menyimpan *chicken nugget* di tempat yang semestinya sehingga dapat mempengaruhi *shelf life* produk dan kualitas produk. Oleh karena itu diperlukan suatu sensor yang dapat memantau kesegaran *chicken nugget* yaitu *Time temperature Indicator* sehingga dapat mencegah terjadinya pembusukan makanan akibat kelalaian konsumen atau kesalahan teknis. Penelitian ini bertujuan mengetahui mekanisme pembuatan TTI sebagai sensor kesegaran *chicken nugget* serta untuk mengetahui hubungan antara laju perubahan warna TTI dengan kualitas produk.

Penelitian tentang pengembangan sensor TTI berbasis enzim lipase ini terdiri dari empat tahap yaitu optimasi perbandingan konsentrasi indikator *bromocresol purple* (BCP) dan substrat gliserol tributirat, optimasi konsentrasi enzim lipase, pembuatan TTI dan korelasi antara perubahan warna TTI terhadap penurunan kualitas *chicken nugget* yang meliputi uji pH, tekstur dan total mikroba pada penyimpanan suhu ruang dan suhu *chiller*.

Berdasarkan hasil optimasi, komposisi konsentrasi optimum larutan indikator BCP dan substrat gliserol tributirat untuk sensor TTI adalah BCP 1000 ppm : substrat gliserol tributirat 10% dengan perbandingan 1:1. Sedangkan konsentrasi enzim lipase yang optimum adalah 1,5 ppm (0,003 U) dengan perubahan warna TTI yang tidak terlalu cepat maupun lama yaitu selama 2 jam. Pembuatan sensor TTI

menggunakan dua membran kertas berdiameter 6 mm yang telah diimobilisasi dengan satu sisi berisi reagen (campuran antara larutan indikator BCP dengan substrat gliserol tributirat) dan sisi yang lain berisi enzim lipase. Kedua membran kertas tersebut diletakkan di atas plastik mika yang telah diberi *double tape* sebelumnya. Cara mereaksikan TTI adalah dengan cara menempel membran reagen dan membran enzim bersamaan dan warna awal sensor TTI yang awalnya berwarna ungu akan berubah menjadi kuning seiring dengan perubahan kualitas produk makanan.

Perubahan warna TTI pada suhu ruang berubah menjadi kuning setelah 4 jam penyimpanan sehingga dapat diketahui bahwa produk sudah tidak segar (tidak layak dikonsumsi). Hal ini dapat ditunjukkan dengan nilai total mikroba *chicken nugget* sebesar $1,1 \times 10^5$ CFU/g, nilai pH menurun dari 6,47 menjadi 5,40 serta nilai tekstur yang menurun dari 540,2 g/3mm menjadi 64g/3mm. Pada suhu *chiller* warna sensor TTI berubah menjadi kuning setelah sehari penyimpanan. Namun pada hasil uji total mikroba menunjukkan *chicken nugget* diatas ambang batas total mikroba yang diperbolehkan pada hari ke-2 penyimpanan yaitu sebesar $1,87 \times 10^5$ CFU/g, nilai pH yang menurun dari 6,49 menjadi 5,86 setelah sehari disimpan. Jadi dapat disimpulkan bahwa TTI dapat memonitor kesegaran *chicken nugget* yang berada dipasaran dalam kondisi penyimpanan suhu *chiller* dan suhu ruang.

PRAKATA

Alhamdulillahirabbilalamiin, Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala nikmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “*Pengembangan Time Temperature Indicator Berbasis Enzim Lipase Sebagai Indikator Kesegaran Chicken Nugget*”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih banyak kepada:

1. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, nasehat, bantuan, ide serta saran kepada penulis untuk penulisan skripsi ini;
2. Bapak Ari Satia N., S.F., Gdip.Sc, M.Sc-Res, Ph.D., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah membimbing, memberikan saran dan masukan dengan penuh kesabaran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
3. Bapak Dwi Koko P., S.Farm., M.Sc., Apt selaku dosen penguji serta dosen pembimbing akademik saya yang selalu memberikan masukan dan saran yang membangun selama penulis menempuh pendidikan dan menulis skripsi ini;
4. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt selaku dosen penguji serta dekan Fakultas Farmasi UNEJ yang memberikan masukan dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Ibu Dyah Soerjani, S.Kom dan adik Pandu yang selalu memberi penulis kasih sayang, dukungan, semangat, dan doa yang tak henti-hentinya dalam membantu penulis menyelesaikan skripsi ini;
6. (alm) ayah Moch. Anie yang selalu memberikan inspirasi kepada penulis untuk tetap menyelesaikan studi ini, semoga Allah selalu mengampuni dosa-dosa beliau selalu;
7. Ibu Wayan dan Mbak hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi, Mbak Parka dan Bu Widi selaku teknisi Laboratorium Biologi Farmasi, Bu Putu selaku teknisi Laboratorium di Faklutas Teknologi Pertanian serta Mas Hilmi dan Mbak

- Galen sebagai mahasiswa S2 UBAYA yang telah meluangkan waktu dan membantu penulis dalam pengerjaan penelitian skripsi ini;
8. Ni Putu Nurdika dan Liya Sanjaya sahabatku yang menemaniku di saat suka maupun duka dan tak pernah lelah memberikan dukungan dan semangat tak henti-hentinya dalam menyelesaikan studi ini (*Maybe I already have given up since long time ago if I don't know you guys*);
 9. Yuliana Ayu, sebagai teman seperjuangan tim TTI yang selalu mendukung dan menyemangatiku selalu dalam menyelesaikan skripsi ini;
 10. *Tripel position (갱거루) squads*: Illa (Ny. 강) dan Putu (Ny. 하) yang menjadi teman pelepas penat meluangkan hobi yang sama disela mengerjakan skripsi;
 11. Muslimah *squads* (Hasnia, Ain, Ayu, Liya, Hilma, Tununk, Mia), Ninik, Iped sebagai teman seperjuangan selama empat tahun terakhir yang selalu memberi semangat dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan studi ini;
 12. “Sidang umat *team*” (Mia, Milla, Eva dan Monica) yang selalu memberi semangat, dukungan dan yang tak pernah lupa mengingatkan untuk menjaga pola makan kepada penulis di saat mengerjakan skripsi;
 13. Sahabat SMA (Amadea, Puput, Nisa, Wilda, Tila, Radita, Rizky) yang tak pernah bosan dengan penulis dan selalu menanyakan kabar meskipun berpisah jarak;
 14. Teman seperjuangan skripsi tim Bio dan kemosensor yaitu Ari, Yanti, Rafli, Sheila, Rizki, Alfi, Osi, Ayu, Liya, Ain, Putu, Resa, Illa, Lelly, Arum dan Keke;
 15. Teman-teman dari BEMF BISA dan BEMF RANGER, ESSENSI dan LINGKAR yang telah menemani penulis berkembang menjadi orang yang lebih baik dengan pengalaman yang tak terlupakan selama 2 tahun terakhir di organisasi;
 16. Keluarga besar penulis, Pharmagen serta teman-teman SMA (AKUT, Hijabers Sukses), yang selalu mendukung dan mendoakan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
 17. *The last one for* ㅇㄴㅇ, ㅇㄱㅅ, and ㅅㅇㄴ. *Thank you for being my inspiration and teaching me not to give up to anything.*

DAFTAR ISI

	Halaman
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
SKRIPSI	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR PERSAMAAN	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan <i>Chicken Nugget</i>	5
2.1.1 Kerusakan <i>chicken nugget</i>	6
2.2 Tinjauan Sensor	7
2.2.1 Biosensor.....	7
2.2.2 Enzim Biosensor	8
2.2.3 Teknik Imobilisasi.....	10
2.3 Tinjauan <i>Time Temperature Indicator (TTI)</i>	12
2.3.1 Enzim lipase	13
2.3.2 Gliserol tributirat.....	15
2.3.3 <i>Bromocresol purple</i>	16
2.3.4 Mekanisme TTI.....	16
2.4 Tinjauan Program <i>ImageJ</i>	17
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	19
3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	19
3.3 Variabel Penelitian	19
3.3.1 Variabel bebas	19
3.3.2 Variabel terikat.....	19
3.3.3 Variabel terkendali	19
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	20
3.4.1 Alat.....	20
3.4.2 Bahan.....	20
3.5 Rancangan Penelitian	20

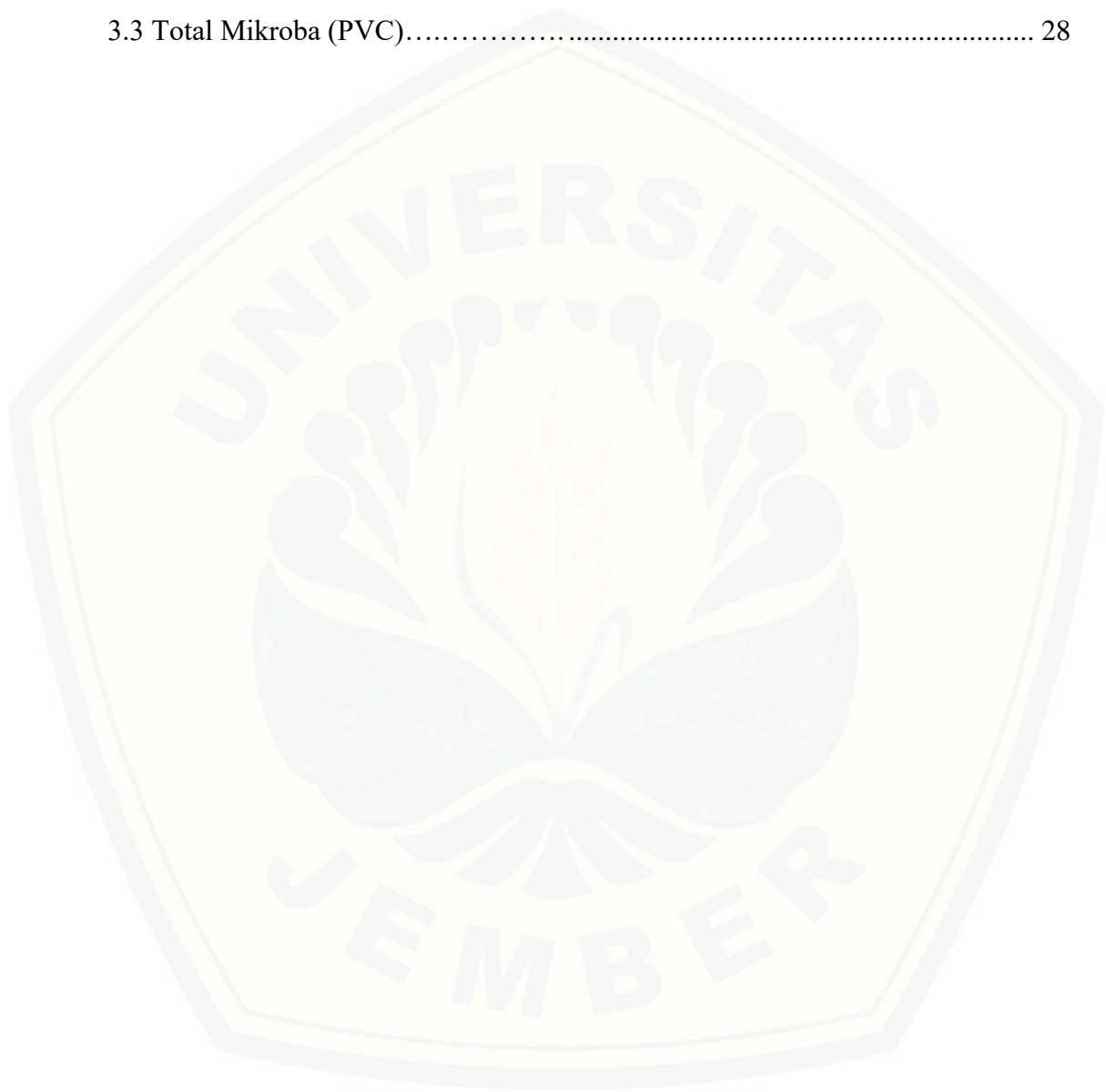
3.5.1 Rancangan Percobaan	20
3.5.2 Diagram Alur Penelitian	21
3.6 Pelaksanaan Penelitian	22
3.6.1 Pembuatan larutan dapar Tris.....	22
3.6.2 Pembuatan Larutan Indicator <i>Bromocresol Purple</i>	22
3.6.3 Pembuatan Larutan Substrat Gliserol Tributirat	22
3.6.4 Pembuatan TTI.....	22
3.6.5 Optimasi Fabrikasi TTI Bebas Enzim	23
3.6.6 Rancangan TTI.....	24
3.6.7 Aplikasi TTI pada sampel <i>chicken nugget</i>	25
3.6.8 Analisa data.....	25
3.7 Prosedur analisis	26
3.7.1 Karakteristik TTI.....	26
3.7.2 Pengukuran Parameter Kesegaran <i>Chicken nugget</i>	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Fabrikasi <i>Time temperature indicator</i> (TTI)	29
4.1.1 Pembuatan larutan reagen	30
4.1.2 Optimasi Konsentrasi Enzim Lipase.....	31
4.1.3 Pembuatan <i>Time Temperature Indicator</i>	34
4.2 Perubahan Kesegaran <i>Chicken Nugget</i> Pada Penyimpanan Suhu Ruang	35
4.2.1 Perubahan Warna TTI.....	35
4.2.2 Perubahan pH <i>chicken nugget</i>	36
4.2.3 Uji Total Mikroba <i>chicken nugget</i>	37
4.2.4 Pengamatan Tekstur <i>chicken nugget</i>	39
4.3 Perubahan Kesegaran <i>Chicken Nugget</i> pada Penyimpanan Suhu Chiller	41
4.3.1 Perubahan Warna Membran TTI	41
4.3.2 Perubahan pH <i>Chicken Nugget</i>	42
4.3.3 Uji Total Mikroba <i>Chicken Nugget</i>	43
4.3.4 Pengamatan Tekstur <i>Chicken Nugget</i>	45
4.4 Karakteristik <i>Time Temperature Indicator</i>	46
4.4.1 Stabilitas TTI.....	46
4.4.2 Reprodusibilitas TTI	48
4.5 Aplikasi TTI pada Kemasan <i>Chicken Nugget</i> sebagai Pendeteksi Perubahan Kesegaran	50
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Persyaratan chicken nugget menurut Badan Standarisasi Nasional No. SNI 6683:2014	5
2.2 Batas maksimum cemaran mikroba dalam produk olahan daging ayam.....	6
2.3 Contoh enzim yang digunakan dalam biosensor.....	9
4.1 Hasil optimasi konsentrasi substrat gliserol tributirat dan larutan indikator <i>bromocresol purple</i> (BCP).....	31
4.2 Hasil optimasi membran indikator TTI dengan berbagai konsentrasi enzim lipase dengan perbandingan konsentrasi substrat:indikator BCP 1:1	32
4.3 Data hasil pengamatan uji total mikroba chicken nugget pada suhu ruang	37
4.4 Hasil pengamatan perubahan warna TTI pada chicken nugget pada suhu <i>chiller</i>	41
4.5 Data hasil pengamatan uji total mikroba chicken nugget pada suhu <i>chiller</i> ...	44
4.6 Data Uji Stabilitas TTI.....	47
4.7 Data nilai mean RGB uji stabilitas TTI	47
4.8 Nilai reproduibilitas TTI pada penyimpanan suhu ruang dan <i>chiller</i>	49

DAFTAR PERSAMAAN

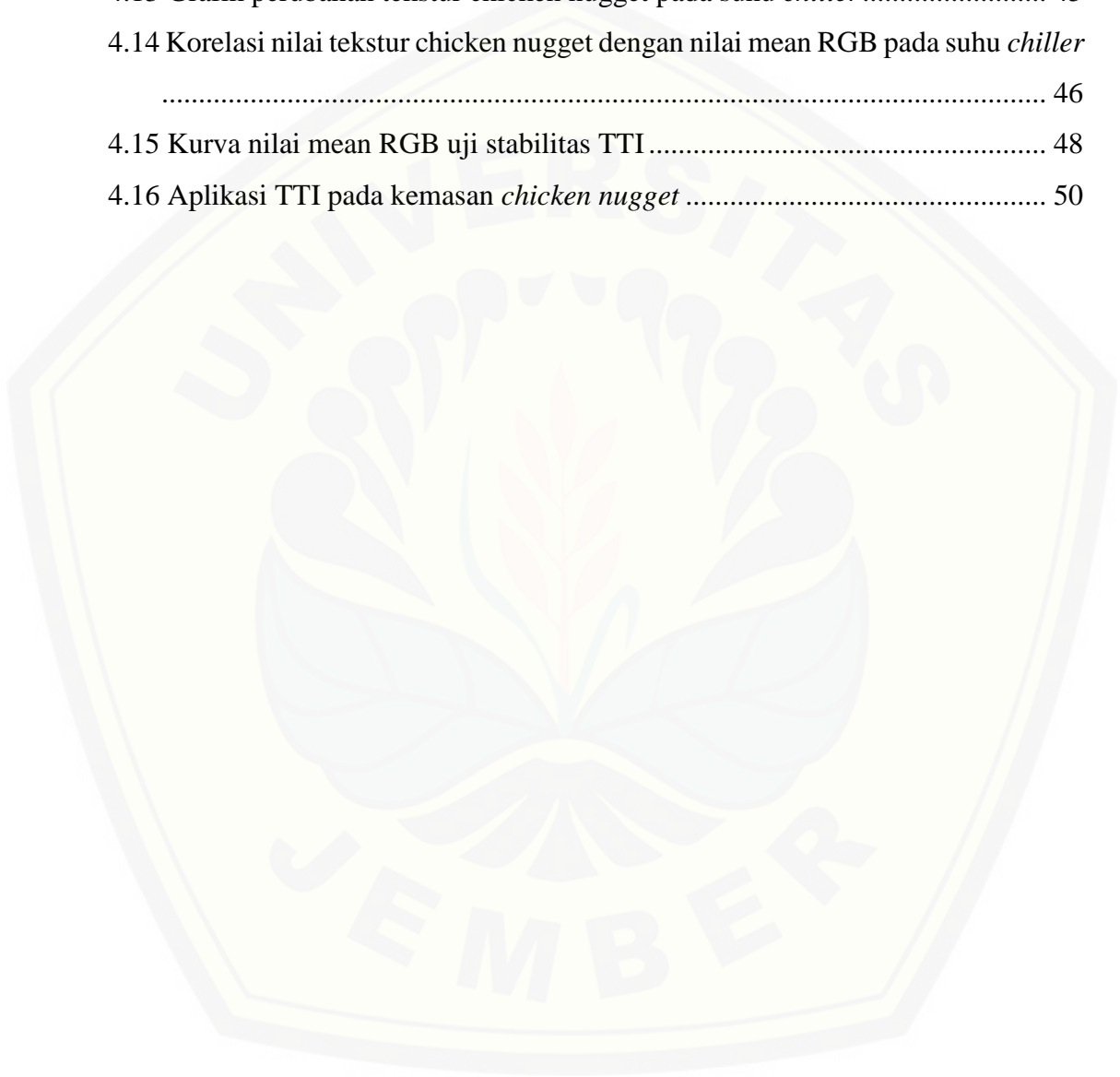
	Halaman
3.1 Standar Deviasi.....	26
3.2 Relatif Standar Deviasi.....	26
3.3 Total Mikroba (PVC).....	28



DAFTAR GAMBAR

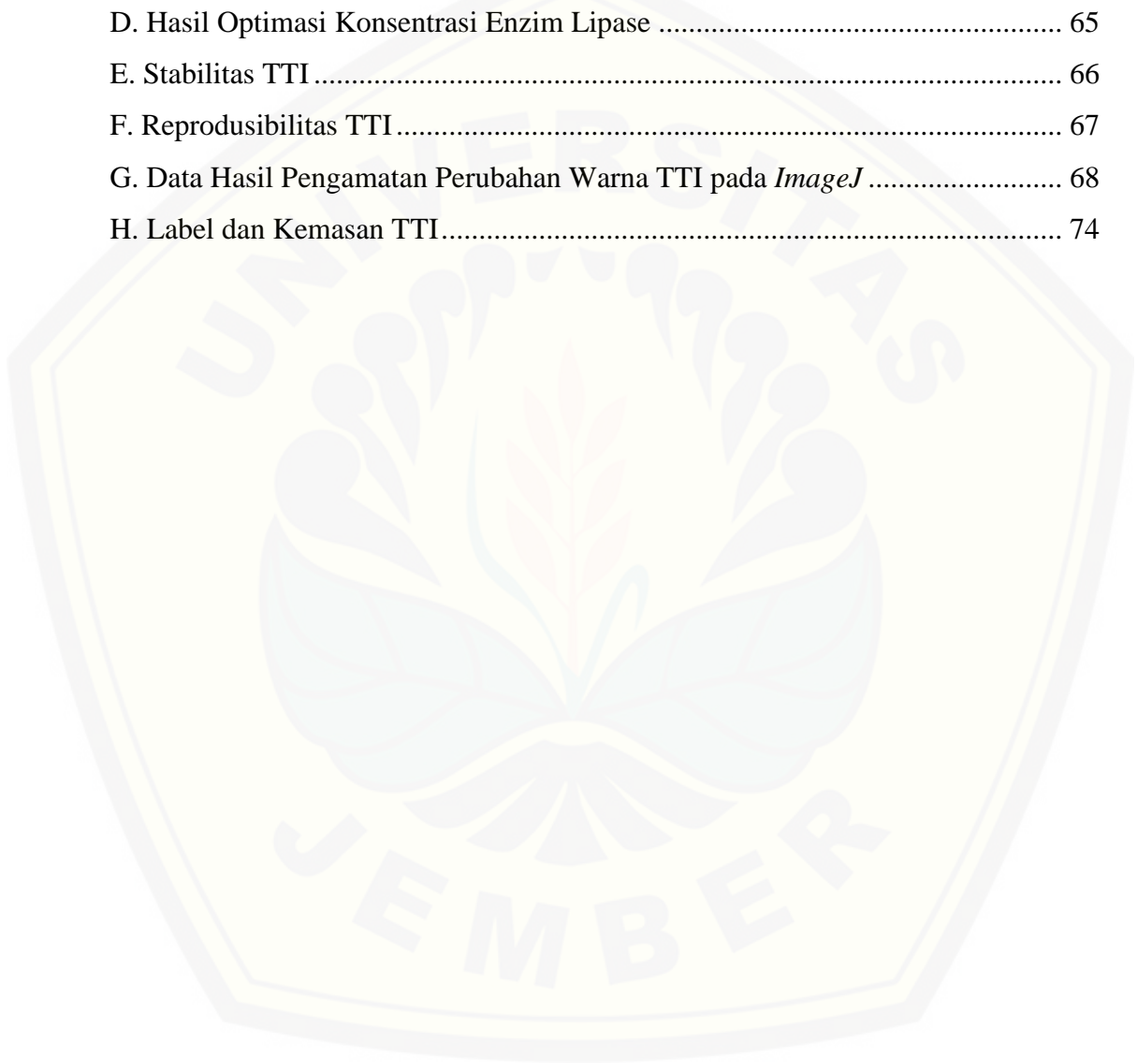
	Halaman
2.1 Skema kerja biosensor.....	8
2. 2 Skema prinsip kerja enzim biosensor.....	9
2.3 Metode Adsorpsi	11
2. 4 Metode <i>entrapment</i>	11
2.5 Metode <i>Cross-linking</i>	11
2.6 Metode Ikatan Kovalen.....	12
2. 7 Cara kerja <i>Time Temperature Indicator</i>	13
2. 8 Pemisahan lemak dengan lipase.....	14
2. 9 Struktur Kimia Gliserol Tributirat	15
2. 10 Struktur Kimia <i>Bromocresol Purple</i>	16
2. 11 Skema TTI.....	17
2. 12 Program <i>ImageJ</i>	17
2. 13 Cara perhitungan nilai RGB menggunakan <i>ImageJ</i>	18
3.1 Diagram Alur Penelitian	21
3.2 Desain Time-Temperature Indicator	24
3.3 Desain tanda perubahan warna TTI	25
4.1 Sensor Time-temperature Indicator.....	29
4.2 Grafik Perubahan Warna Membran Indikator:Substrat (1:1) dan Konsentrasi Enzim dengan berbagai konsentrasi.....	34
4.3 Desain TTI dan keterangan penggunaan.....	35
4.4 Perubahan pH chicken nugget pada penyimpanan suhu ruang.....	36
4.5 Korelasi perubahan warna TTI dengan nilai <i>mean</i> RGB pada suhu ruang.....	36
4.6 Total mikroba <i>chicken nugget</i> pada penyimpanan suhu ruang	38
4.7 Korelasi nilai total mikroba <i>chicken nugget</i> dengan nilai <i>mean</i> RGB pada penyimpanan suhu ruang	39
4.8 Perubahan tekstur <i>chicken nugget</i> pada suhu ruang.....	40
4.9 Korelasi antara perubahan nilai tekstur chicken nugget dengan nilai <i>mean</i> RGB pada suhu ruang	40

4.10 Hasil pengamatan perubahan pH chicken nugget pada suhu <i>chiller</i>	42
4.11 Korelasi antara nilai pH chicken nugget dengan nilai mean RGB TTI pada suhu <i>chiller</i>	43
4.12 Total mikroba chicken nugget pada penyimpanan suhu <i>chiller</i>	44
4.13 Grafik perubahan tekstur chicken nugget pada suhu <i>chiller</i>	45
4.14 Korelasi nilai tekstur chicken nugget dengan nilai mean RGB pada suhu <i>chiller</i>	46
4.15 Kurva nilai mean RGB uji stabilitas TTI.....	48
4.16 Aplikasi TTI pada kemasan <i>chicken nugget</i>	50



DAFTAR LAMPIRAN

A. Data Dan Hasil Analisis Uji pH.....	55
B. Data Dan Hasil Analisis Uji Mikroba	58
C. Data Dan Hasil Analisis Uji Tekstur <i>Chicken Nugget</i>	61
D. Hasil Optimasi Konsentrasi Enzim Lipase	65
E. Stabilitas TTI.....	66
F. Reprodusibilitas TTI.....	67
G. Data Hasil Pengamatan Perubahan Warna TTI pada <i>ImageJ</i>	68
H. Label dan Kemasan TTI.....	74



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi berbagai bidang selama beberapa tahun terakhir menyebabkan pola hidup masyarakat berubah. Masyarakat berusaha keras untuk tidak hanya memenuhi kebutuhan primer tetapi juga kebutuhan sekunder sehingga masyarakat semakin sibuk dalam memenuhi kebutuhannya. Akibatnya terjadi pergeseran pola konsumsi pangan masyarakat yang membuat masyarakat mencari sesuatu yang lebih praktis dan efisien. Hal inilah yang membuat banyak pengusaha industri makanan berinovasi mengembangkan berbagai produk makanan olahan siap saji seperti makanan kering hingga makanan siap saji.

Dalam memenuhi kebutuhan pangan masyarakat yang serba praktis, terdapat beberapa produk makanan siap saji yang hadir di pasaran. Salah satu makanan siap saji yang banyak tersedia dipasaran adalah *frozen food* yaitu suatu produk makanan yang sengaja dibekukan dan disimpan pada suhu beku (Windasari, 2012). Tujuan dari pembekuan makanan ini adalah untuk mengawetkan makanan dalam jangka panjang karena berkurangnya reaksi kimia dan pertumbuhan mikroba pada suhu rendah (Sun, 2011). Salah satu produk *frozen food* yang banyak digemari adalah *chicken nugget* yang terbuat dari olahan daging ayam dan dicetak dalam berbagai bentuk potongan yang dilapisi dengan tepung berbumbu (*battered & breaded*) (Windasari, 2012).

Chicken nugget harus disimpan pada suhu *freezer* dan memiliki *shelf life* kurang lebih 12 bulan (Boyer dan McKinney, 2009). Untuk mendapatkan *chicken nugget* yang berkualitas baik, selain bahan baku yang berkualitas tinggi maka diperlukan kontrol yang ketat termasuk dalam penyimpanan makanan beku tersebut (Erickson dan Hung, 1997). Pada kenyataannya kebanyakan konsumen tidak menyimpan makanan di tempat yang semestinya yaitu disimpan pada suhu *chiller* ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) bahkan pada suhu ruang ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) sehingga dapat mempengaruhi *shelf life*

produk dan kualitas produk. *Chicken nugget* yang disimpan pada suhu *chiller* dapat bertahan selama satu hingga dua hari dan harus segera dipanaskan saat akan dikonsumsi. Sedangkan, *chicken nugget* harus segera dikonsumsi maksimal 24 jam setelah pembelian apabila dibiarkan pada suhu ruang (Boyer dan McKinney, 2009). Temperatur merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi laju perkembangan mikroba pada makanan, yang pada akhirnya dapat menyebabkan terjadinya keracunan makanan (Rajan *et al.*, 2017). Oleh sebab itu perlu dikembangkan suatu alat sensor yang dapat memantau kesalahan penyimpanan suhu *nugget* di tempat yang suhunya berbeda dengan suhu *freezer* (seperti suhu ruang dan suhu *chiller*) untuk mencegah terjadinya pembusukan makanan akibat kelalaian konsumen atau kesalahan teknis. Tujuan ini hanya bisa dicapai menggunakan alat yang bernama *Time Temperature indicator* (TTI).

Sensor yang saat ini sedang banyak dikembangkan pada industri makanan adalah *Time Temperature Indicator* (TTI) yaitu suatu perangkat sederhana yang dilekatkan pada permukaan kemasan suatu produk yang menunjukkan hubungan antara waktu dan temperatur (Rajan *et al.*, 2017). Respon TTI biasanya jelas, *irreversible* dan sering diterapkan pada *frozen food* yang sensitif terhadap suhu seperti susu segar, daging, makanan laut dan *chicken nugget* (Rajan *et al.*, 2017). Dengan adanya sensor TTI pada kemasan *chicken nugget*, konsumen dapat mengetahui penurunan kualitas produk yang ditandai dengan adanya perubahan warna pada sensor.

Jenis TTI yang dikembangkan pada penelitian ini adalah TTI berbasis enzim. TTI berbasis enzim dibuat dengan memanfaatkan reaksi antara enzim *Aspergillus niger* lipase dengan gliserol tributirat. Gliserol tributirat digunakan sebagai substrat uji pada penentuan aktivitas lipase. Hal ini disebabkan aktivitas lipase lebih stabil dan dapat meningkat dua hingga tiga kali lebih tinggi aktivitasnya dibanding dengan substrat lain (Wu *et al.*, 2014). Desain label TTI terdiri dari dua kompartemen yang kemudian direkatkan pada plastik mika transparan. Kompartemen pertama berisi enzim lipase yang telah diimobilisasi, sedangkan pada kompartemen kedua berisi campuran larutan substrat gliserol tributirat dengan indikator *bromocresol purple* (BCP) yang telah diimobilisasi. Ketika alat tersebut

akan diaplikasikan di suatu produk, maka kedua membran tersebut disatukan sehingga reagen tersebut akan bereaksi dengan enzim seiring berjalannya waktu dan menyebabkan perubahan warna. Pemilihan indikator didasarkan pada perubahan warna yang disebabkan oleh penurunan pH yang merupakan hasil hidrolisis enzim dengan substrat lipid (Ahvenainen, 2003). Indikator *bromocresol purple* dipilih karena bekerja berdasarkan perubahan pH, mengalami perubahan warna yang jelas serta telah banyak diaplikasikan sebagai sensor label. TTI yang telah jadi diaplikasikan pada dua suhu yang berbeda yaitu pada suhu ruang dan suhu *chiller* kemudian diamati waktu bekerjanya berdasarkan pada perubahan warna. Produk *chicken nugget* dianggap tidak layak untuk dikonsumsi lagi jika label TTI berubah warna dari ungu menjadi kuning.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana optimasi perbandingan konsentrasi *reagen* BCP dan substrat gliserol tributirat pada fabrikasi TTI berbasis enzim sebagai sensor kesegaran *chicken nugget*?
2. Bagaimana laju perubahan intensitas warna TTI sebagai sensor kesegaran *chicken nugget* pada penyimpanan suhu ruang dan suhu *chiller*?
3. Bagaimana aplikasi TTI tersebut untuk mendeteksi kesalahan suhu penyimpanan pada sampel *chicken nugget* pada suhu ruang dan suhu *chiller*?

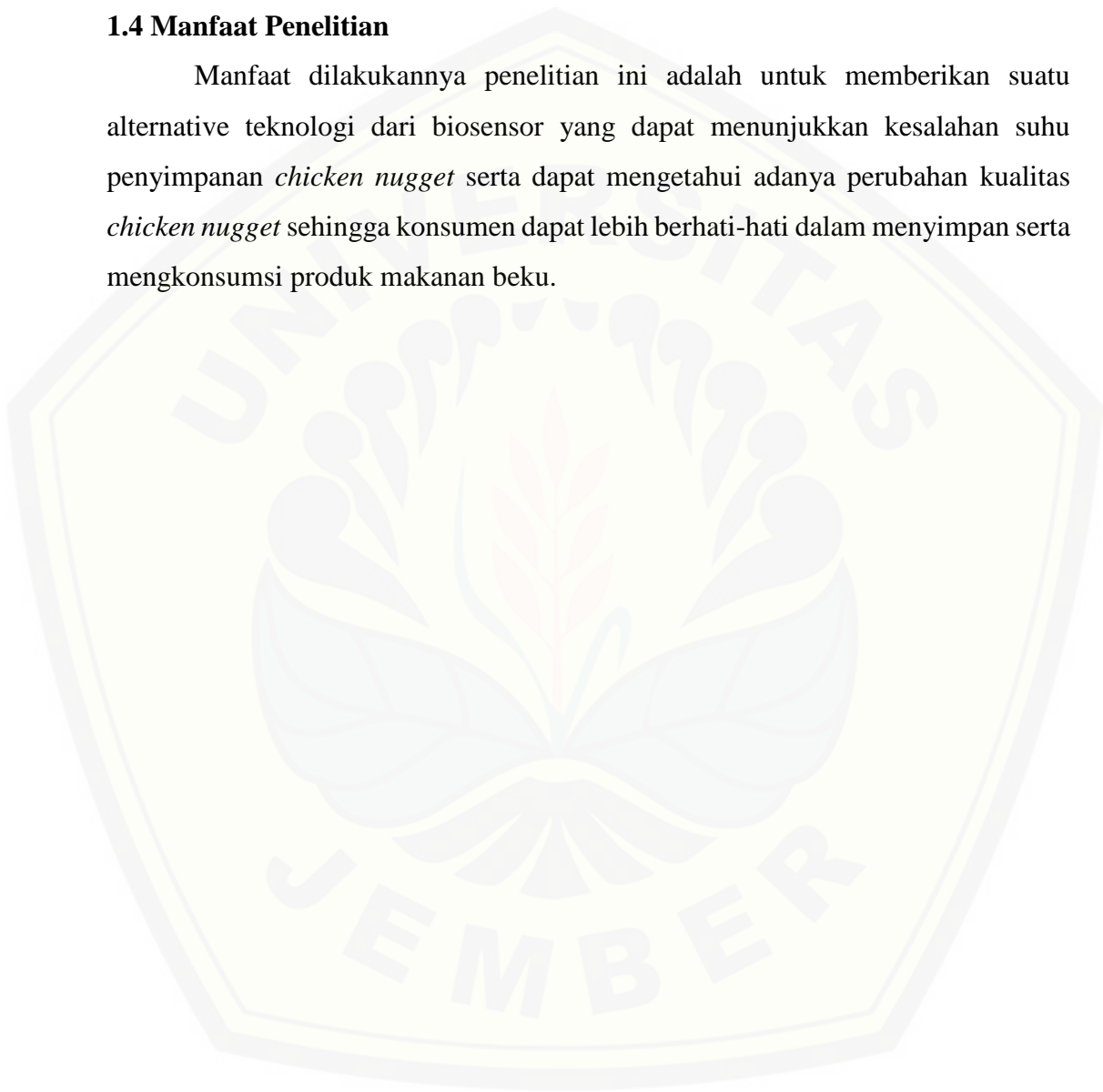
1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui optimasi rasio konsentrasi *reagen* BCP dan substrat gliserol tributirat pada fabrikasi TTI berbasis enzim sebagai sensor kesegaran *chicken nugget*.
2. Menentukan laju perubahan intensitas warna TTI sebagai sensor kesegaran *chicken nugget* pada penyimpanan suhu ruang dan suhu *chiller*.

3. Menentukan apakah TTI dapat diaplikasikan untuk mendeteksi kesalahan suhu penyimpanan sampel *chicken nugget* pada suhu ruang dan suhu *chiller*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah untuk memberikan suatu alternative teknologi dari biosensor yang dapat menunjukkan kesalahan suhu penyimpanan *chicken nugget* serta dapat mengetahui adanya perubahan kualitas *chicken nugget* sehingga konsumen dapat lebih berhati-hati dalam menyimpan serta mengkonsumsi produk makanan beku.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Chicken nugget*

Menurut SNI (2014), *Chicken nugget* merupakan produk olahan ayam yang dibuat dari campuran daging ayam dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain yang dicetak, diberi bahan pelapis, dengan atau tanpa digoreng dan dibekukan. *Nugget* dibuat dari berbagai macam daging yaitu daging ayam, daging sapi dan ikan. Komposisi bahan dalam pengolahan naget penting karena dapat menunjang citarasa terutama penambahan garam dan rempah-rempah. Selain dari segi komposisi bahan, ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi dan diperhatikan untuk menjaga mutu naget seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Persyaratan *chicken nugget* menurut Badan Standarisasi Nasional No. SNI 6683:2014

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
	1.1 Bau	-	normal
	1.2 Rasa	-	normal
	1.3 Tekstur	-	normal
2	Benda Asing	-	Tidak boleh ada
3	Kadar air	% (b/b)	Maks. 50
4	Protein (N x 6,25)	% (b/b)	Min. 12
5	Lemak	% (b/b)	Maks. 20
6	Karbohidrat	% (b/b)	Maks. 20
7	Kalsium (Ca)	Mg/100g	Maks. 30/50*
8	Cemaran logam		
	8.1 Kadmium (Cd)	Mg/kg	Maks. 0,1
	8.2 Timbal (Pb)	Mg/kg	Maks 1,0
	8.3 Timah (Sn)	Mg/kg	Maks. 40
	8.4 Merkuri (Hg)	Mg/kg	Maks. 0,03
9	Cemaran arsen (As)	Mg/kg	Maks. 0,5
10	Cemaran mikroba		
	10.1 Angka lempeng total	Koloni/g	Maks. 1×10^5
	10.2 Koliform	APM/g	Maks. 10
	10.3 <i>E. coli</i>	APM/g	< 3
	10.4 <i>Salmonella sp.</i>	-	Negatif/25 g
	10.5 <i>S. aureus</i>	Koloni/g	Maks. 1×10^2
	10.6 <i>C. perfringens</i>	Koloni/g	Maks. 1×10^2

CATATAN * Berlaku untuk *chicken nugget* dengan penambahan keju atau susu

Sumber: Badan Standarisasi Nasional, 2014

Awal mula ditemukannya produk *chicken nugget* berasal dari produk utama suatu perusahaan atau rumah potong. Saat dilakukan proses pemilihan dan pemeriksaan (*selecting and grading*) ditemukan produk-produk yang tidak memenuhi standar jual perusahaan karena adanya kecacatan pada suatu produk. Produk-produk yang tidak lolos tersebut diolah kembali menjadi *chicken nugget* sehingga lebih bernilai dan mengurangi resiko kerugian (Murtidjo, 2003).

2.1.1 Kerusakan *chicken nugget*

Daging ayam adalah salah satu bahan makanan yang mudah mengalami pembusukan akibat kerusakan biologis seperti enzim dan mikroorganisme pembusuk, sehingga diperlukan penanganan yang khusus untuk mempertahankan mutunya. Hal yang menyebabkan pembusukan tersebut adalah kandungan glikogen pada daging ayam relatif rendah, sehingga akumulasi asam selama pasca mortem relatif rendah dibanding daging sapi, kambing, dan kuda (Hidayati dan Aisyiyah, 2007).

Berdasarkan keterangan BSN (2009), koloni mikroba yang mengkontaminasi produk olahan daging, daging unggas dan daging hewan buruan yang dihaluskan (Tabel 2.2) adalah koliform, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, dan *Clostridium perfringens*. Bakteri tersebut dapat menyebabkan kerusakan hingga keracunan daging yang dikenal dengan *foodborne disease* (Gustiani, 2009).

Tabel 2.2 Batas maksimum cemaran mikroba dalam produk olahan daging ayam

	Jenis cemaran mikroba	Batas maksimum
Daging olahan dan daging ayam olahan (bakso, sosis, naget, burger)	ALT (30°C, 72 jam)	1 x 10 ⁵ koloni/g
	APM Koliform	10/g
	APM <i>E. coli</i>	< 3/g
	<i>Salmonella sp</i>	Negative/25 g
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ² koloni/g
	<i>Clostridium perfringens</i>	1 x 10 ² koloni/g

Sumber: Badan Standarisasi Nasional, 2009

Faktor-faktor yang menyebabkan *chicken nugget* cepat mengalami pembusukan akibat bakteri antara lain:

a) pH

Secara umum, bakteri memiliki pH minimum untuk pertumbuhan yaitu sekitar 4,0-4,5 dan pH optimum 6,8-7,2 sedangkan pH maksimum antara 8,0 hingga 9,0. Pada pH optimum, bakteri tumbuh dengan mudah dan menyebabkan kerusakan bahan pangan. Daging ayam segar memiliki rentang pH 5,5-6,0 dan meningkat sebanding dengan lamanya penyimpanannya (Mielmann, 2006).

b) Temperatur

Pertumbuhan mikroba terjadi saat daging berada pada suatu kondisi yang memungkinkan mikroba tersebut tumbuh. Saat temperature naik secara optimum, bahan kimia dan reaksi-reaksi enzim di dalam proses sel menyebabkan pertumbuhan menjadi lebih cepat. Namun, ketika temperatur berada konidisi diatas temperature optimum pertumbuhan bakteri tidak akan terjadi (Windasari, 2012).

Untuk mencegah terjadinya pertumbuhan mikroba pada daging maka dapat dilakukan dengan menyimpannya pada kondisi beku. Penyimpanan pada kondisi beku dapat menghambat atau memperlambat aktivitas mikroba untuk tumbuh dan ebrkembang. Hal ini dikarenakan sejumlah besar air yang digunakan sebagai media pertumbuhan mikroba menjadi kristal es (Erickson dan Hung, 1997).

2.2 Tinjauan Sensor

2.2.1 Biosensor

Biosensor didefinisikan sebagai alat terintegrasi yang mampu memberikan informasi analitik baik secara kualitatif maupun kuantitatif menggunakan material biologi atau biomolekul (seperti jaringan, mikroorganisme, enzim, sel, antibodi, DNA, dll) yang dihubungkan dengan sebuah elemen transduksi (Kuswandi, 2010). Dari definisi ini dapat disimpulkan bahwa sebuah biosensor bekerja secara selektif terhadap analit tertentu (Kuswandi, 2010). Skema kerja biosensor dapat dilihat pada gambar 2.1 berikut.



Gambar 2.1 Skema kerja biosensor (Kuswandi, 2010)

Untuk bisa bekerja secara optimal, biosensor terdiri dari tiga elemen penting yaitu bio-rekognisi (pendeteksian secara biomolekul/biokimia), bagian transduksi (pengubah sinyal) dan bagian pemrosesan sinyal. Pada bagian bio-rekognisi terdapat biomolekul/bioelemen seperti enzim, antibodi, DNA, sel yang ditempatkan di permukaan sensor. Kegiatan ini disebut dengan imobilisasi. Sedangkan pada bagian transduksi terdiri dari transducer fisika kimia yang bisa berupa elektrokimia, optik, termometri, *piezoelektric* atau *magnetic*. Pada bagian pemrosesan sinyal terdiri dari sirkuit elektronik yang berfungsi untuk memproses sinyal menjadi sinyal listrik yang kemudian hasilnya ditampilkan pada monitor/data. Biosensor banyak diaplikasikan di bidang kesehatan seperti memonitor gas-gas dan analit dalam darah serta di bidang farmasi dan industri seperti uji control kualitas dan kuantitas obat dan kosmetik (Kuswandi, 2010).

2.2.2 Enzim Biosensor

Enzim Biosensor merupakan salah satu jenis biosensor. Enzim biosensor merupakan piranti analitik yang menggunakan enzim sebagai elemen sensor dengan sebuah transduser untuk menghasilkan sinyal yang proporsional dengan konsentrasi dari target analit seperti substrat, inhibitor, atau *activator*. Dari perubahan konsentrasi proton atau dikonsumsinya gas-gas tertentu (seperti NH_3 , O_2 , CO_2), cahaya emisi, absorpsi atau reflektansi, perubahan massa, panas yang diproduksi oleh transduser dan enzim maka akan menghasilkan sebuah sinyal. Sinyal yang dihasilkan lalu dikonversi menjadi respon sinyal yang dapat diukur berupa arus, absorpsi cahaya, tegangan, perubahan massa atau temperature melalui transduksi elektrokimia, optik, *piezoelektric* ataupun termometrik. Lalu sinyal tersebut

diproses lebih lanjut untuk dianalisis (Kuswandi, 2010). Berikut skema kerja enzim biosensor seperti gambar 2.2



Gambar 2.2 Skema prinsip kerja enzim biosensor (Kuswandi, 2010)

Enzim biosensor bekerja berdasarkan reaksi katalis. Dari hasil reaksi katalis tersebut maka dapat diukur konsentrasi (berupa molekul-molekul kecil) yang terbentuk atau hilang. Molekul-molekul kecil tersebut berupa produk yang dihasilkan, reaktan/substrat yang dikonsumsi serta inhibitor yang menghambat reaksi. Suatu alat yang dapat mengukur molekul-molekul kecil yang terbentuk atau hilang tersebut dinamakan katalitik biosensor (Kuswandi, 2010).

Hingga saat ini ada 3000 lebih enzim yang telah dikarakterisasi dan dikelompokkan ke dalam enam kelas utama sesuai dengan jenis reaksi katalisnya (oksidoreduktasi, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase). Namun, hanya beberapa golongan yang cocok untuk digunakan dalam pengembangan biosensor seperti oksidoreduktase, hidrolase, dan ligase.

Tabel 2.3 Contoh enzim yang digunakan dalam biosensor

Reaktan	Enzyme
Kolesterol	Kolesterol oksidase
Ester	<i>Chymotrypsin</i>
Glukosa	Glukosa Oksidase
Hidrogen Peroksida	Katalase
Peptida	Tripsin
<i>Starch</i>	Amilase
Sukrosa	Invertase
Urea	Urease
Asam Urea	Uricase

Sumber : Kuswandi, 2011

Dalam sebuah sistem biosensor berbasis enzim, satu atau lebih enzim bisa digunakan dalam sistem biosensor untuk mendeteksi target analit. Berdasarkan

jumlah enzim yang digunakan, maka sistem enzim biosensor dibagi menjadi tiga golongan yaitu: sistem dengan enzim tunggal, enzim ganda dan multi enzim.

Contoh sistem enzim biosensor yang menggunakan enzim tunggal adalah biosensor untuk deteksi etanol dengan menggunakan enzim alkohol oksidase serta biosensor untuk logam berat dengan enzim urase. Sedangkan, contoh biosensor menggunakan enzim ganda (sistem bienzim) adalah biosensor untuk asetilkolin, yang menggunakan dua jenis enzim yaitu asetilkolinesterase dan koline oksidase. Pada biosensor dengan menggunakan multi-enzim digunakan tiga jenis enzim untuk mendeteksi target analit. Salah satu contoh sistem multienzim biosensor adalah pengembangan biosensor untuk penentuan kesegaran ikan (Kuswandi, 2010).

2.2.3 Teknik Imobilisasi

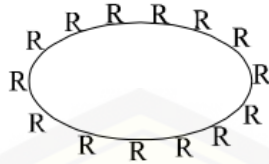
Menurut Kuswandi (2011), imobilisasi enzim penting dilakukan pada enzim biosensor agar enzim bekerja pada rentang pH dan temperature yang lebih lebar serta lebih stabil dalam penyimpanannya. Dengan imobilisasi enzim, enzim dapat digunakan berkali-kali pada waktu tertentu, lebih mudah digunakan serta dapat dimanipulasi.

Metode imobilisasi enzim yang digunakan dalam biosensor dibagi menjadi dua golongan yaitu secara fisika dan kimia. Imobilisasi enzim secara fisika terdiri dari adsorpsi dan *entrapment*. Sedangkan imobilisasi secara kimia meliputi *cross-linking* dan ikatan kovalen dari enzim. Berikut beberapa teknik imobilisasi enzim (Kuswandi, 2010):

a. Adsorpsi

Teknik ini merupakan teknik yang paling sederhana dan menggunakan sedikit preparasi. Secara prinsip, imobilisasi ini bekerja berdasarkan kontak antara enzim dengan adsorben. Meskipun cara kerjanya mudah dan tidak menyebabkan enzim menjadi tidak aktif namun metode ini memiliki kelemahan. Metode ini dapat membuat enzim menjadi terdesorpsi dari permukaan adsorban/sensor. Teknik ini

lebih cocok digunakan untuk biosensor enzim yang sekali pakai (*disposable biosensor*) (Kuswandi, 2010).



Gambar 2.3 Metode Adsorpsi (Kuswandi, 2010)

b. *Entrapment*

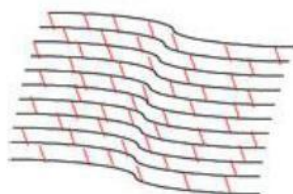
Pada metode ini dilakukan pemerangkapan enzim ke dalam matrix polimer yang terbentuk. Dengan cara ini, enzim akan tertahan dalam matrik/struktur polimer tersebut, sehingga analit (substrat, inhibitor, atau activator) dapat berdifusi ke dalam polimer tersebut. Matriks yang biasa digunakan dalam imobilisasi enzim secara *entrapment* tersebut adalah *polyacrylamide gel*, *hydrogel*, *silicone*, dan *polyethyleneamine*. (Kuswandi, 2010)



Gambar 2.4 Metode *entrapment* (Kuswandi, 2010)

c. *Cross-linking*

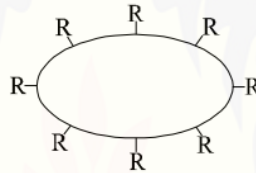
Imobilisasi enzim secara kimia ini terkenal dengan prosedur yang relative mudah. Pada teknik ini, molekul enzim diikat secara *cross-link* dengan agen *cross-linking* (bovin serum albumin atau glutaradehyde). Kelemahan dari jenis imobilisasi ini adalah kemungkinan enzim menjadi inaktif karena ikatan yang terbentuk selama proses *cross-linking* berlangsung (Kuswandi, 2010).



Gambar 2.5 Metode *Cross-linking* (Kuswandi, 2010)

d. Ikatan kovalen

Teknik imobilisasi enzim secara kimia ini adalah yang paling populer. Kelebihan teknik ini meliputi ikatan yang terbentuk dengan enzim lebih stabil sehingga tidak mudah diputus oleh pengaruh pH serta temperatur. Ikatan enzim dilakukan dengan cara mengaktivasi gugus fungsi padatan pendukung dengan menggunakan reagen tertentu, pengikatan enzim terhadap gugus aktif lalu pencucian enzim yang tidak terikat pada pada gugus aktif tersebut (Kuswandi, 2010).

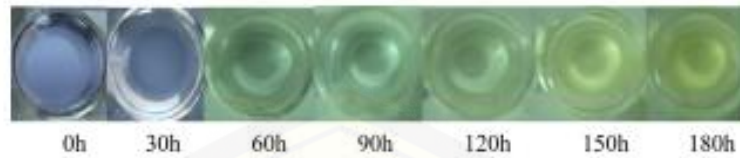


Gambar 2.6 Metode Ikatan Kovalen (Kuswandi, 2010)

2.3 Tinjauan *Time Temperature Indicator* (TTI)

Time Temperature indicator dapat didefinisikan sebagai perangkat sederhana yang menyediakan informasi visual dari perubahan suhu selama distribusi dan penyimpanan sehingga mencegah terjadinya kesalahan pengaturan suhu pada pangan yang didinginkan atau dibekukan (Retno, 2015). *Time temperature* yang didesain akan ditempel pada permukaan kemasan suatu produk pangan dan dirancang untuk mengintegrasikan riwayat kumulatif suhu dan waktu sehingga akan mencerminkan kualitas dari produk tersebut (Windasari, 2012). Riwayat waktu dan suhu divisualisasikan pada perubahan warna dan indikator ini. Ciri-ciri utama dari konsep indikator ini tergantung pada jenis indikator dan prinsip kerja fisikokimianya (Ahvenainen, 2003). Berikut cara kerja *Time temperature*

indikator berdasarkan perubahan warna indikator dan riwayat waktu dan suhu pada gambar 2.7 (Wu *et al.*, 2014) :



Gambar 2.7 Cara kerja Time-temperature Indicator (Wu *et al.*, 2014)

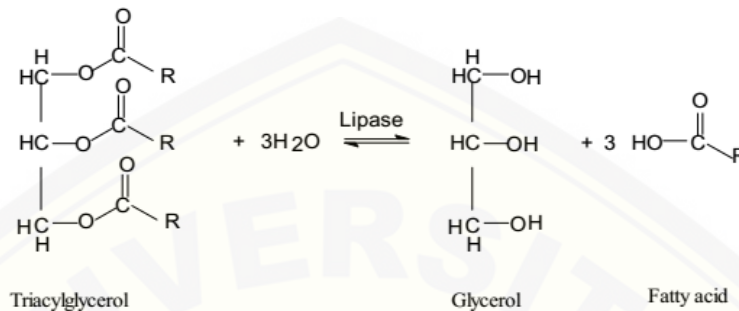
Prinsip kerja TTI berupa perubahan *irreversible* mekanis, kimia, elektrokimia, enzimatik atau mikrobiologis yang dinyatakan sebagai respon yang terlihat dalam bentuk perubahan warna indikator. Respons yang terlihat demikian memberikan indikasi kumulatif kondisi penyimpanan produk pangan yang terkena TTI. Pada umumnya semakin tinggi temperatur yang dipaparkan pada indikator *Time temperature indicator*, maka semakin cepat perubahan warna terjadi dan semakin cepat pula indikator yang mendeteksi akhir dari umur simpan suatu produk (Ahvenainen, 2003).

Menurut Ahvenainen (2003), TTI berisi dua kompartemen terpisah yang dibalut dalam kantong plastik mini. Satu kompartemen mengandung larutan enzim seperti enzim lipase pancreas dan kompartemen lain mengandung substrat lipid yang diserap dalam pembawa PVC dan dilarutkan dalam bentuk suspensi dan campuran indikator pH. Contoh substrat yang biasa dipakai dalam TTI adalah *glycerine tricaproate* (tricaproin), tripelargonin, *tributyryn* (gliserol tributirat) dan campuran ester dari alkohol polivalen dan asam organik (Ahvenainen, 2003).

2.3.1 Enzim lipase

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator reaksi-reaksi kimia dalam sistem biologi dan memiliki daya katalitik yang tinggi. Enzim mampu meningkatkan kecepatan reaksi hingga satu juta kali lebih cepat dibanding reaksi-reaksi tanpa enzim. Molekul enzim juga memiliki tingkat spesifisitas tertentu terhadap substrat dari reaksi yang dikatalisisnya (Kusumadjaja dan Dewi, 2005).

Lipase (E.C.3.1.1.3) merupakan salah satu enzim yang dapat larut dalam air dan bekerja dengan mengkatalisis hidrolisis ikatan ester dan substrat lipid seperti triasilgliserol menjadi gliserol dan asam lemak, seperti terlihat pada Gambar 2.8 (Svendsen, 2000).



Gambar 2.8 Pemisahan lemak dengan lipase (Svendsen, 2000)

Lipase diproduksi dari beberapa mikroorganisme, hewan maupun tumbuhan. Lipase mikroorganisme lebih sering diaplikasikan di dunia industri dikarenakan stabilitasnya yang lebih baik, spesifisitas substrat dan biaya produksi lebih rendah bila dibandingkan dengan sumber yang lain. Selain itu, keanekaragaman hayati mikroorganisme yang luas dapat meningkatkan penemuan lipase yang baru demi kemajuan bioteknologi. Jamur diakui sebagai produsen lipase terbaik dan hingga saat ini merupakan sumber yang lebih dipilih karena jamur dapat menghasilkan lipase secara ekstraseluler yang memfasilitasi ekstraksi dari media fermentasi. Salah satu spesies yang paling banyak digunakan untuk produksi lipase adalah *Aspergillus sp.* (Contesini *et al.*, 2010).

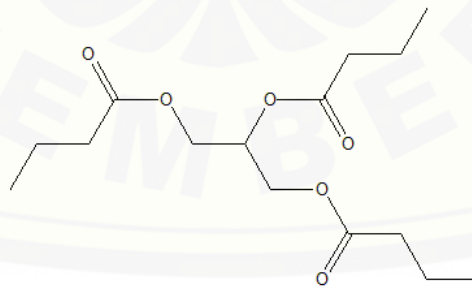
Aspergillus sp. adalah kelompok jamur berfilamen yang mengandung lebih dari 180 spesies yang bermanfaat bagi kesehatan manusia termasuk 20 spesies yang digunakan sebagai bahan makanan dan industri enzim, Meskipun memiliki banyak spesies namun hanya dua spesies yang dikategorisasikan dalam Daftar Aman (GRAS) oleh FDA di Amerika Serikat yaitu *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger* (Contesini *et al.*, 2010).

Aspergillus niger lipase banyak digunakan di industri terutama industri makanan dan deterjen. *A. niger* digunakan untuk pemberi aroma pada makanan dengan cara mensintesis ester alkohol terpen dari asam lemak rendah (Iwai *et al.*,

1980). Selain pada industri makanan, *A. niger* juga bisa diaplikasikan pada industri deterjen. Hal ini dikarenakan kehebatan lipase dalam menghilangkan noda lemak pada kain. Enzim lipase lebih dipilih daripada deterjen sintesis konvensional karena kemampuannya dalam melakukan proses pencucian pada suhu yang lebih rendah serta lebih ramah lingkungan (Contesini *et al.*, 2010). Baru-baru ini *Aspergillus niger* juga dikembangkan sebagai bahan utama pembuatan *Time temperature indicator* berbasis enzim. Berdasarkan penelitian Dan Wu *et al.* (2014), TTI didesain berdasarkan reaksi antara *A. niger* lipase dan gliserol tributirat. *Aspergillus niger* lipase digunakan karena harganya yang ekonomis, dapat dipatenkan serta memiliki potensi komersialisasi yang baik (Wu *et al.*, 2014).

2.3.2 Gliserol tributirat

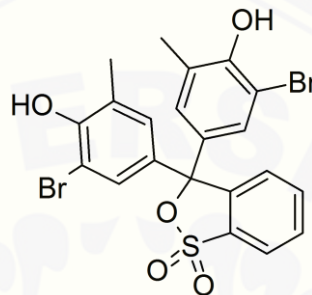
Gliserol tributirat (tributirin) merupakan substrat yang biasa digunakan sebagai pelapis plastik untuk ester selulosa atau sebagai penentuan aktivitas lipase. Pada pembuatan *time temperature indicator* berbasis enzim, gliserol tributirat bekerja sebagai substrat uji. Dengan gliserol tributirat, enzim lipase akan lebih stabil dan aktivitasnya meningkat dua hingga tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan gliserol trioleat dan minyak zaitun (Wu *et al.*, 2014). Berikut struktur kimia dari gliserol tributirat seperti pada gambar 2.9.



Gambar 2.9 Struktur Kimia Gliserol Tributirat

2.3.3 *Bromocresol purple*

Bromocresol purple (*5,5'-dibromo-o-cresol sulphonphthalein*) adalah indikator yang sering digunakan untuk mengukur serum albumin, mengukur pH serta kebutuhan fotografi. Indikator *Bromocresol purple* akan berubah menjadi warna kuning pada pH di bawah 5,2 dan menjadi ungu di atas pH 6,8. Pada gambar 2.10 menunjukkan struktur kimia dari *Bromocresol purple* (Riyanto *et al.*, 2014).

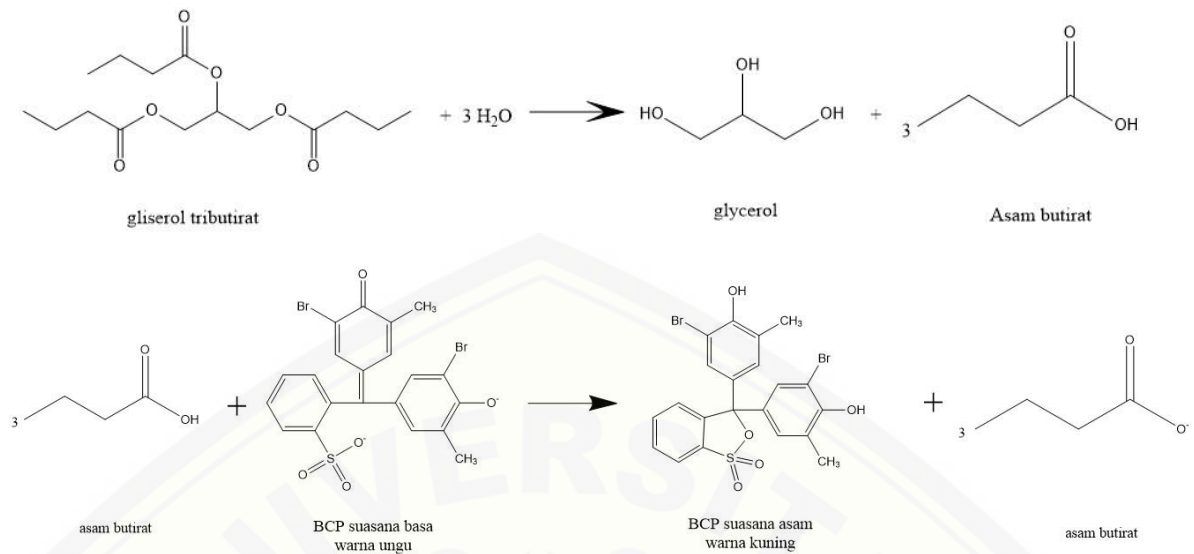


Gambar 2.10 Struktur Kimia *Bromocresol purple* (Biotechnology Information, 2018)

2.3.4 Mekanisme TTI

Prinsip TTI bekerja berdasarkan pada perubahan warna yang disebabkan karena penurunan pH dari hasil hidrolisis enzim dan substrat lipid. Pada aktivasi, enzim dan substrat dicampur sehingga menembus penghalang yang memisahkan dua kompartemen. Hidrolisis substrat gliserol tributirat dan enzim lipase menyebabkan pelepasan asam lemak dan penurunan pH yang ditandai dengan berubahnya warna indikator *bromocresol purple* (BCP). Warna awal dan warna akhir indikator BCP pada TTI di suatu reaksi memungkinkan pengenalan visual yang lebih mudah dan evaluasi perubahan warna yang dapat diukur secara instrumental (Ahvenainen, 2003).

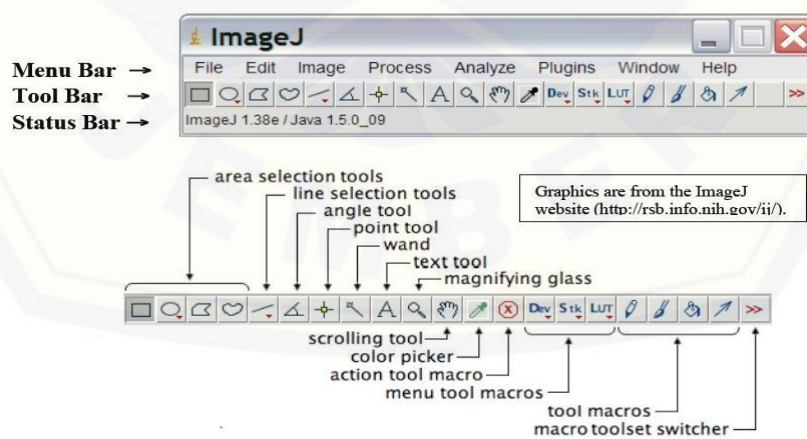
Perubahan warna yang terlihat dalam BCP disebabkan karena adanya transfer proton dari BCP ke asam butirat atau sebaliknya (Ito dan Yamamoto, 2010). Ketika asam butirat direaksikan dengan BCP dalam larutan dapar dengan pH tinggi, maka BCP dalam bentuk basa konjugat akan menerima proton dari asam lemak sehingga menjadi BCP. Hal ini mengakibatkan perubahan warna BCP yang semula berwarna ungu (pada suasana basa) menjadi warna kuning (suasana asam).



Gambar 2.11 Skema TTI

2.4 Tinjauan Program *ImageJ*

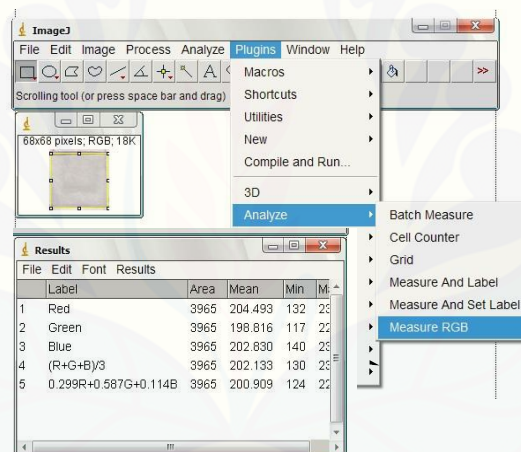
ImageJ adalah suatu program analisis yang dibuat oleh *National Institutes of Health* yang digunakan untuk menganalisis gambar yang ada. Program ini berisi menu-menu *bar* seperti, *tool bar*, *status bar* seperti yang dilihat pada gambar 2.12.

Gambar 2.12 Program *ImageJ* (Sinking, 2007)

Saat kursor berada di atas gambar, maka *ImageJ* akan menampilkan nilai koordiant dan koordinat tersebut akan diukur dalam pixel/detik. Pixel merupakan titik tunggal

dalam pencitraan atau elemen terkecil dari gambar yang dapat dikenali (Reinking, 2007).

Pada program ImageJ, untuk menentukan nilai RGB dihitung berdasarkan nilai perhitungan dari tiga warna yang mewakili warna primer yaitu merah, hijau dan biru. Dipilih warna merah, hijau dan biru karena warna-warna tersebut adalah warna cahaya yang menghasilkan spektrum serta dapat bercampur satu sama lain untuk membentuk warna apapun. Saat intensitas tertinggi dari setiap warna dicampurkan bersama-sama, maka diperoleh cahaya putih. Apabila intensitas tiga warna tersebut sama dengan nol akan menghasilkan warna hitam. Cara perhitungan nilai RGB dengan menggunakan program ImageJ dapat dilihat pada gambar 2.13.



Gambar 2.13 Cara perhitungan nilai RGB menggunakan *ImageJ* (Reinking, 2007)

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sensor Kimia dan biosensor Fakultas Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai sejak Januari 2018 hingga selesai.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah laju perubahan warna membran dari warna ungu menjadi kuning pada *Time temperature Indicator*.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah perubahan pH, perubahan warna membrane sebagai *Time temperature Indicator*, total mikroba terhitung dan perubahan tekstur pada *chicken nugget*.

3.3.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah suhu penyimpanan *chicken nugget* yang diletakkan pada suhu *chiller* ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) dan suhu ruang ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$).

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas ukur, gelas piala, labu ukur, pipet tetes, pipet volume, pipet mikro, batang pengaduk, *ball filler*, plat tetes, pinset, vial, *hotplate*, *scanner* Canon LiDe120, *ImageJ*, pH meter, *cooler box* (Technoplast).

3.4.2 Bahan

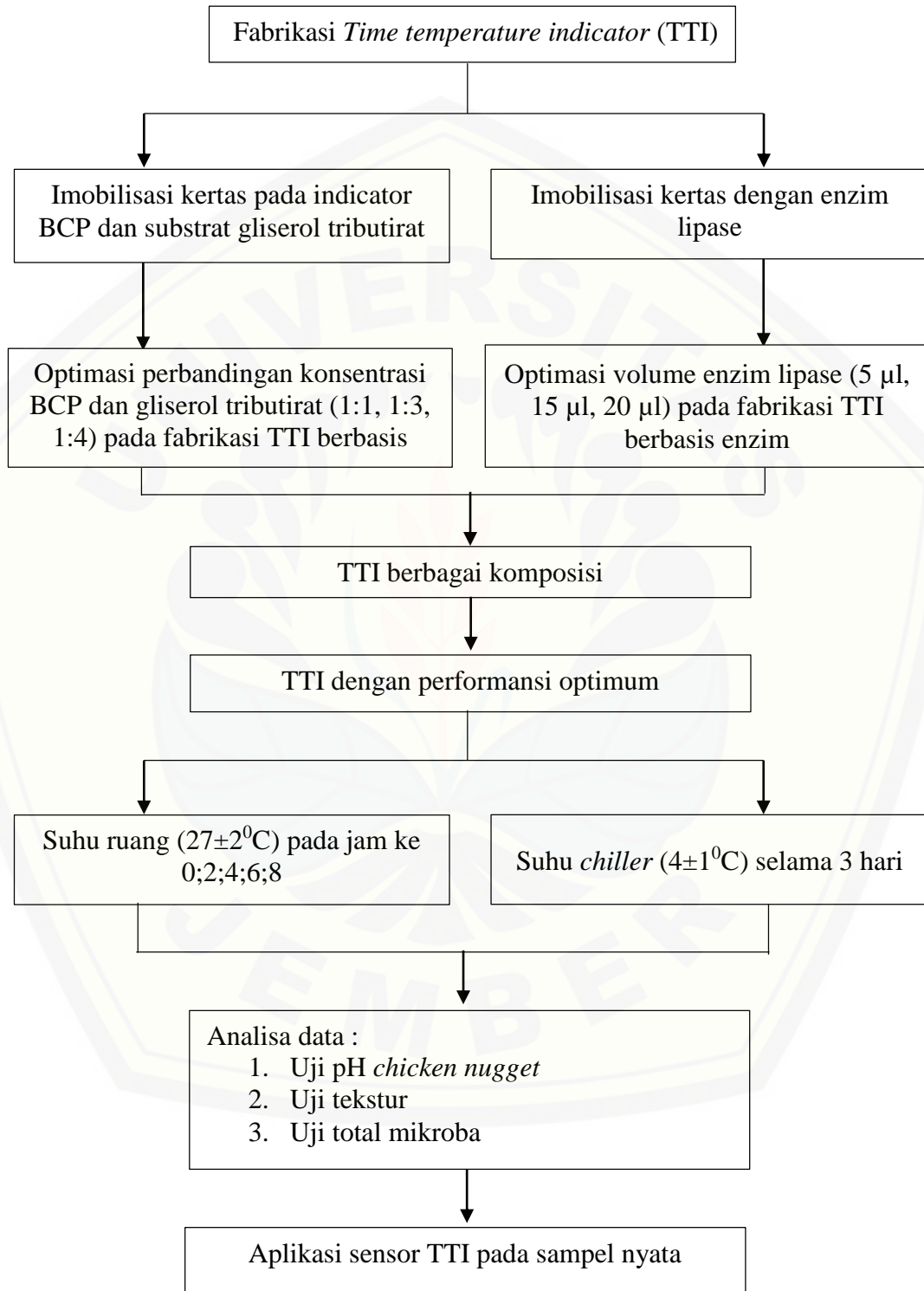
Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *chicken nugget* “*Champ*” yang dibeli di Golden Market, *Aspergillus niger* lipase (Sigma Aldrich), larutan *gliserol tributirat*, *Bromocresol purple* (Merck KGaA), larutan dapar tris (pH 9.0) 0,1 M, CaCl_2 0,15 M, NaCl 3 M, etanol pekat, aquades steril, kertas saring *Whatman* no 1 diameter 125 mm, plastik mika, media agar (*PCA/Plate Count Agar*).

3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini bersifat identifikasi terhadap tingkat kesegaran *chicken nugget* dengan perubahan warna *Time temperature Indicator (TTI)* yang terdiri dari enzim lipase *Aspergillus niger* serta campuran larutan indikator *Bromocresol purple* dan substrat *gliserol tributirat* yang telah diimobilisasi pada kertas saring *whatman*. Sensor TTI kemudian ditempatkan dibagian luar kemasan *chicken nugget* untuk mengetahui kesalahan suhu dalam penyimpanan. Parameter yang dilakukan meliputi parameter kesegaran (uji pH, uji tekstur, dan total mikroba) dan perubahan intensitas warna sensor pada *chicken nugget* dengan temperature yang bervariasi yaitu pada suhu *chiller* ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) dan suhu ruang ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

3.5.2 Diagram Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Pembuatan larutan dapar Tris

Pembuatan larutan dapar dilakukan dengan melarutkan 15 mg Tris dengan 3,75 ml CaCl_2 0,15 M, dan 10 ml NaCl 3 M ke dalam gelas piala. Kemudian diamati dengan standar pH 9 menggunakan pH meter.

3.6.2 Pembuatan Larutan Indikator *Bromocresol Purple*

Pembuatan larutan indikator *Bromocresol purple* (BCP) dilakukan dengan membuat larutan induk 1000 ppm dengan cara melarutkan 100 mg BCP ke dalam etanol 95% 2 ml dan 8 ml aquabidest. Lalu, larutan induk BCP diencerkan menjadi 1000 ppm dengan cara mengambil 0.1 ml BCP dan dilarutkan ke dalam 0.9 ml etanol dan air (dengan perbandingan 2:8).

3.6.3 Pembuatan Larutan Substrat Gliserol Tributirat

Larutan substrat gliserol tributirat dipipet sebanyak 450 μl menggunakan mikropipet lalu dimasukkan ke dalam labu ukur. Kemudian larutan substrat tersebut diencerkan dengan larutan dapar tris pH 9 hingga 5 ml.

3.6.4 Pembuatan TTI

a. Imobilisasi enzim lipase *Aspergillus niger*

Imobilisasi enzim lipase dilakukan dengan cara men-*stirrer* larutan enzim lipase selama 15 menit. Lalu, kertas saring *Whatman* yang telah dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter 6 mm itu dibasahi oleh larutan enzim yang dipipet sejumlah volume tertentu menggunakan mikropipet. Kertas saring *Whatman* yang telah dibasahi lalu dikeringkan dengan cara didiamkan selama 15 menit sebelum akan digunakan.

b. Imobilisasi campuran larutan indikator BCP dan substrat gliserol tributirat

Imobilisasi campuran larutan indikator BCP dan substrat gliserol tributirat. Pertama, mencampur larutan BCP dan gliserol tributirat dengan memipet sejumlah volume tertentu ke dalam vial. Setelah itu, dilakukan pembasahan kertas saring dengan cara men-*stirrer* campuran larutan substrat dan indikator selama 15 menit. Lalu, kertas saring *Whatman* yang telah dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter 6 mm itu dibasahi oleh campuran larutan substrat dan indikator yang dipipet sebanyak 15 μ l menggunakan mikropipet. Kertas saring *Whatman* yang telah dibasahi lalu dikeringkan dengan cara didiamkan selama 15 menit sebelum akan digunakan.

3.6.5 Optimasi Fabrikasi TTI Bebas Enzim

a. Optimasi Rasio Konsentrasi BCP dan Gliserol Tributirat

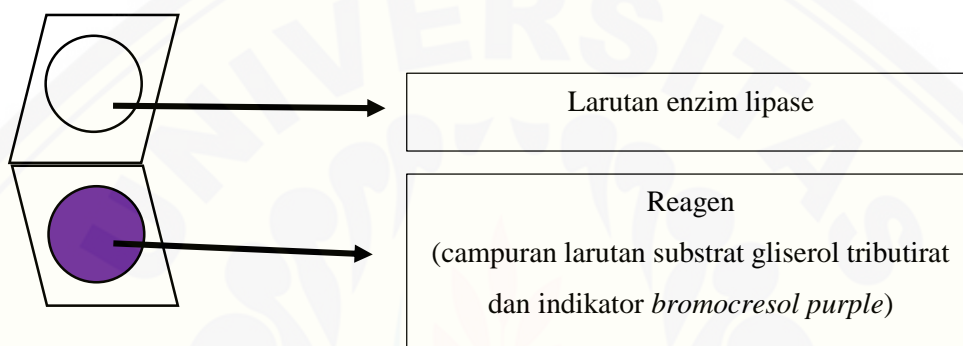
Optimasi rasio konsentrasi BCP dan gliserol tributirat bertujuan untuk mengetahui ratio konsentrasi optimum indikator dan substrat yang mempengaruhi laju perubahan warna dari sensor TTI. Perbandingan ratio konsentrasi indikator BCP dan substrat gliserol tributirat yang digunakan dalam penelitian adalah 1:1, 1:3, dan 1:4. Optimum bila konsentrasi yang digunakan memberikan warna ungu dengan nilai RGB yang paling tinggi.

b. Optimasi Konsentrasi Enzim lipase

Pembuatan larutan enzim lipase *Aspergillus niger* dilakukan dengan membuat larutan induk 1000 ppm dengan menimbang 10 mg *Aspergillus niger* lalu dilarutkan dengan 10 ml larutan dapar Tris (pH 9). Setelah itu, larutan enzim lipase dibuat dengan berbagai konsentrasi yaitu 0,5 ppm (0,001 U), 1,5 ppm (0,003 U) dan 2 ppm (0,004 U). Optimum bila konsentrasi enzim *Aspergillus niger* lipase menunjukkan perubahan warna yang intens dari ungu menjadi kuning saat direaksikan dengan campuran larutan indikator dan substrat.

3.6.6 Rancangan TTI

Rancangan *Time temperature Indicator* dilakukan untuk mempermudah interpretasi kondisi *chicken nugget* sehingga mudah diamati penurunan kualitas dari *chicken nugget* akibat kesalahan selama penyimpanan. Desain sensor ini terdiri dari dua membran terpisah yang kemudian direkatkan pada plastik mika transparan. Membran pertama mengandung larutan enzim dan membrane kedua mengandung campuran larutan substrat gliserol tributirat dan indikator BCP sebagai sensor kesegaran *chicken nugget*. Desain TTI diterangkan pada gambar 3.2 berikut:



Gambar 3.2 Desain Time-Temperature Indicator

Desain TTI diaplikasikan sebagai pendeteksi kesegaran *chicken nugget*. TTI yang telah terfabrikasi diberi penanda kualitas *chicken nugget* yang terdiri “segar”, “masih segar” dan “tidak segar”. TTI yang terpapar di suhu ruang dan *chiller* selama beberapa hari akan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Selama optimasi perubahan warna pada TTI dimulai dari jam ke-0, jam ke-2, jam ke-4, jam ke-6 dan jam ke-8 pada suhu ruang dan hari ke-0 hingga hari ke-3 pada suhu *chiller*. Lalu dilakukan pengamatan terhadap nilai pH, uji tekstur dan total mikroba yang kemudian dikorelasikan dengan perubahan warna pada TTI. Data inilah yang kemudian digunakan saat memberi tanda kesegaran *chicken nugget* pada TTI.

Desain TTI dibuat berbentuk bulat dengan diameter 6 mm dengan warna awal dari membran indikator yaitu warna ungu yang menunjukkan bahwa *chicken nugget* dalam keadaan segar. Setelah disimpan pada suhu ruang, maka warna dari membran indikator berubah menjadi violet yang menunjukkan *chicken nugget*

masih segar dan bila sampel *chicken nugget* sudah tidak segar maka warna TTI berubah menjadi kuning.



Gambar 3.3 Desain tanda perubahan warna TTI

3.6.7 Aplikasi TTI pada sampel *chicken nugget*

TTI diaplikasikan pada kemasan *chicken nugget* untuk mendeteksi kesalahan dalam suhu penyimpanan. Pengamatan perubahan membran TTI dilakukan pada suhu ruang ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) pada jam ke 0;2;4;6;8, sedangkan pada suhu *chiller* ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) dilakukan pengamatan setiap hari selama tiga hari. Perubahan dari TTI kemudian dianalisis dengan perubahan kualitas dari sampel *chicken nugget* berdasarkan parameter uji kebusukan yaitu perubahan pH, perubahan tekstur, dan total mikroba.

3.6.8 Analisa data

Pengolahan data penelitian menggunakan metode deskriptif dan analisis. Data hasil pengamatan ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik untuk mempermudah interpretasi data. Pengamatan terhadap perubahan TTI dilakukan tiap 2 jam selama 8 jam untuk TTI di suhu ruang dan tiap hari di suhu *chiller* lalu diambil gambarnya. Hasil gambar tersebut lalu dianalisis menggunakan *ImageJ* dan didapatkan nilai *mean* RGB. Dari data hasil pengamatan tersebut dilakukan perhitungan standar deviasi (SD) dan relative standar deviasi (RSD). Standar deviasi dan koefisien variasi (RSD) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum |Xd - \bar{Xd}|^2}{n-1}} \dots\dots\dots(3.1)$$

$$RSD = \frac{SD}{x} \times 100\% \dots\dots\dots(3.2)$$

Keterangan:

SD : standar deviasi

RSD : relative standar deviasi

X : rata-rata hitung

N : jumlah data

3.7 Prosedur analisis

3.7.1 Karakteristik TTI

a. Pengamatan Intensitas Warna TTI

Warna TTI dari kesegaran ini diukur menggunakan *software ImageJ* dengan mengukur nilai *mean* RGB. Proses pengambilan gambar dilakukan dengan melakukan proses *scanning* menggunakan *scan* tipe Canon LiDe120, kemudian hasil scan tersebut diaplikasikan pada *ImageJ* dan ditentukan nilai *mean* RGB.

b. Stabilitas TTI

Pengujian stabilitas TTI dilakukan dengan membungkus membran reagen (campuran indikator dan substrat) dengan *plastic wrap* lalu dimasukkan ke dalam *plastic flip* dan disimpan selama beberapa hari pada dua kondisi yang berbeda. Uji stabilitas TTI dilakukan tujuh hari pada suhu ruang dan setiap hari di suhu *chiller* kemudian diamati perubahan warnanya apakah stabil dengan tetap mempertahankan warna ungu pada membran indikator dan tidak berwarna pada membran enzim selama masa penyimpanan. Selanjutnya dilakukan pengukuran *mean* RGB untuk mengetahui perubahan respon dari membrane indikator selama penyimpanan. Sensor TTI dapat digunakan apabila TTI memberikan perubahan respon sebesar <15% dari respon sensor awal (Kuswandi, 2010).

c. Reprodusibilitas TTI

Reprodusibilitas TTI dapat dinyatakan sebagai kepresisian respon TTI terhadap analit yang diukur pada waktu yang berbeda dengan kondisi yang relatif sama. Pada penelitian ini, reprodusibilitas sensor ditentukan dengan menghitung standar deviasi relatif (RSD) dari 3 kali replikasi terhadap TTI dengan kondisi yang berbeda yaitu pada kondisi suhu ruang setiap harinya selama 3 hari yang berbeda dan pada kondisi suhu *chiller* pada setiap minggu selama 3 minggu. Reprodusibilitas TTI dikategorikan baik apabila kesesuaian respon TTI yang satu dengan yang lainnya dinyatakan dengan $RSD < 5\%$. Data diukur menggunakan nilai Δ mean RGB dan dihitung nilai RSD.

3.7.2 Pengukuran Parameter Kesegaran *Chicken nugget*

a. Uji Tekstur

Sampel *chicken nugget* yang telah ditiriskan diletakkan tepat dibawah jarum penetrometer *Rheotex*, kemudian menekan tombol start hingga ujung jarum sampai menyentuh permukaan *chicken nugget* dan terdengar bunyi (tanda selesai). Setelah itu, pengamatan dilanjutkan dengan membaca angka yang ditunjukkan oleh *Rheotex* dengan satuan milligram (mg).

b. Uji pH

Sampel *chicken nugget* yang telah dihancurkan lalu diambil sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam gelas piala. Lalu dihomogenkan dengan 10 ml aquades dan diukur menggunakan pH meter yang sebelumnya telah dikalibrasi dengan pH meter.

c. Uji Total Mikroba (ALT)

Alat yang digunakan dalam analisa total mikroba dilakukan dalam kondisi steril. Sampel dihancurkan sebanyak 1,0 g lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9,0 ml aquadest steril lalu dikocok hingga larutan homogen. Dari larutan tersebut diperoleh larutan induk lalu diambil sebanyak 1,0 ml dan masukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9,0 ml aquadest steril. Dari larutan tersebut diperoleh

pengenceran 10^{-1} kemudian diambil 1,0 ml dan masukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9,0 ml aquadest steril untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} , demikian seterusnya sampai diperoleh pengenceran 10^{-9} . Dari masing-masing hasil pengenceran diambil 1,0 ml kemudian dimasukkan dalam cawan petri dan dituangi 10 ml media agar (PCA) yang telah didinginkan ($47-50^{\circ}\text{C}$). Cawan petri digoyangkan sampai merata dan biarkan sampai memadat. Cawan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut (Fardiaz, 1993) :

$$N = \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)]} \times (d) \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan :

N = Jumlah koloni per mL atau gram dari produk

$\sum C$ = Jumlah semua koloni pada semua *plate* terhitung

n_1 = Jumlah *plate* pada pengenceran pertama

n_2 = Jumlah *plate* pada pengenceran kedua

d = Pengenceran pertama yang didapatkan

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan berikut ini :

1. Kondisi optimum proses fabrikasi TTI berbasis enzim lipase adalah dengan menggunakan indikator *bromocresol purple* (BCP) dengan konsentrasi 1000 ppm, substrat gliserol tributirat dengan konsentrasi 10% dengan perbandingan indikator : substrat sebesar 1:1 dan konsentrasi enzim lipase adalah 1,5 ppm (0,003 U).
2. Profil perubahan warna TTI dapat dilihat dari nilai *mean RGB* yang diamati tiap 2 jam selama 6 jam pengamatan pada penyimpanan di suhu ruang dan suhu *chiller*.
3. Perubahan kesegaran chicken nugget dapat dilihat dari adanya perubahan warna pada TTI yang diawali dari warna ungu menandakan chicken nugget masih segar sedangkan apabila warna TTI berubah menjadi kuning menunjukkan chicken nugget sudah tidak layak untuk dikonsumsi. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan uji kualitas chicken nugget (uji pH, uji tekstur dan total mikroba) yang mana semakin lama chicken nugget dibiarkan pada suhu ruang dan *chiller* maka kualitas chicken nugget semakin menurun.
4. TTI dapat diaplikasikan pada sampel *chicken nugget* dengan cara ditempelkan pada kemasan luar kemasan yang dapat memberikan informasi kepada konsumen tentang kesegaran *chicken nugget* yang tidak ditempatkan pada tempat yang tepat yaitu pada suhu ruang atau suhu *chiller* melalui perubahan warna dari ungu menjadi kuning.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian tentang pengembangan *Time temperature Indicator* adalah sebagai berikut :

- 5.2.1 Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi formula untuk pembuatan TTI menggunakan indikator *bromocresol purple* dan substrat gliserol tributirat yang memiliki stabilitas yang baik dan dapat digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama
- 5.2.2 Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengembangan *Time temperature Indicator* khususnya yang berbasis enzim lipase khususnya dari jamur *Aspergillus niger*



DAFTAR PUSTAKA

- Ahvenainen, R. 2003. *Novel Food Packaging Techniques*. Edisi 1st editio. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Boyer, R. dan J. McKinney. 2009. Food storage guidelines for consumers. *Virginia Cooperative Extension*. 348-960:1-12.
- BSN. 2014. Chicken nugget (naget ayam). (ICS 67.120.10):1-36.
- Contesini, F. J., D. B. Lopes, G. A. MacEdo, M. D. G. Nascimento, dan P. D. O. Carvalho. 2010. Aspergillus sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 67(3-4):163-171.
- Erickson, M. C. dan Y.-C. Hung. 1997. *Quality in Frozen Food*. Edisi 1st editio. Georgia: Springer Science+Business Media Dordrecht. May 2012.
- Fardiaz, S., 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: P.T. Raja Grafindo Persada.
- Fernandez-Lopez, J., E. Sayas-Barbera, T. Munoz, E. Sendra, C. Navarro, dan J. A. Perez-Alvarez. 2008. Meat effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich steaks. 78:143-152.
- Gustiani, E. 2009. Pengendalian cemaran mikroba pada bahan pangan asal ternak (daging dan susu) mulai dari peternakan sampai dihidangkan. *Jurnal Litbang Pertanian*. 28(80):96-100.
- Hidayati, A. dan S. Aisyiyah. 2007. Aplikasi teknik pembuatan chicken nugget dalam upaya peningkatan pendapatan ibu-ibu rumah tangga di wilayah kelurahan dinoyo malang. 1-10.
- Ito, S. dan D. Yamamoto. 2010. Mechanism for the color change in bromocresol purple bound to human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*. 411(3-4):294-295.
- Iwai, M., S. Okumura, dan Y. Tsujisaka. 1980. Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 44(11):2731-2732.
- Kurnia, D. R. D. 2010. Studi aktivitas enzim lipase dari aspergillus niger sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan monoasilgliserol. 39-40.
- Kusumadjaja, A. P. dan R. P. Dewi. 2005. Penentuan kondisi optimum enzim papain dari pepaya burung varietas jawa. *Indo J. Chem*. 5(2):147-151.

- Kuswandi, B., 2010. *Biosensor: Konsep, Desain & Eksperimentasi*. Jember: LP3 dan UPT Penerbitan UNEJ.
- Mielmann, A. 2006. Food Spoilage Characteristics of *Chryseobacterium* Species. University of the Free State.
- Murtidjo, 2003. *Pemotongan dan Penanganan Daging Ayam*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Rajan, V. M., K. Gurunathan, dan V. Shukla. 2017. Development and evaluation of time-temperature integrator for monitoring high temperature thawing of frozen buffalo meat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 41(4):496–505.
- Reinking, L. 2007. Imagej basics. *Word Journal Of The International Linguistic Association*. (June):1–22.
- Retno, D. 2015. Kemasan Cerdas. Jakarta: Majalah Keamanan Pangan. 2015. Halaman 14–15.
- Riyanto, R., I. Hermana, dan S. Wibowo. 2014. Characteristics of plastic indicator for early warning indicator of fish freshness in a plastic packaging. *JPB Perikanan*. 9(2):153–163.
- Sun, D. W. 2011. *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. Edisi 2nd Editio. Boca Raton: CRC Press. *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*.
- Svendsen, A. 2000. Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1543(2):223–238.
- Windasari, D. 2012. Pengembangan Time Temperature Indicator Berbasis Asam Asetat Dan Campuran Bromothymol Blue Dan Methyl Red Untuk Penentuan Kesegaran Chicken Nugget. Universitas Jember.
- Wu, D., S. Hou, J. Chen, Y. Sun, X. Ye, D. Liu, R. Meng, dan Y. Wang. 2014. Development and characterization of an enzymatic time-temperature indicator (tti) based on aspergillus niger lipase. *LWT - Food Science and Technology*. 1–5. .

LAMPIRAN A. DATA DAN HASIL ANALISIS UJI pH

5.2.3.1 Suhu ruang

Jam		0	2	4	6
Replikasi	I	6,55	6,34	5,40	4,63
	II	6,44	6,24	5,37	4,56
	III	6,42	6,32	5,44	4,65
Rata-rata		6,47	6,30	5,40	4,61

Jam ke-0 (control)

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(6,47-6,55)^2+(6,47-6,44)^2+(6,47-6,42)^2}}{2} \\
 &= \frac{\sqrt{0,0064+0,0009+0,0025}}{2} \\
 &= \sqrt{0,0049} \\
 &= 0,07
 \end{aligned}$$

Jam ke-2

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(6,30-6,34)^2+(6,30-6,24)^2+(6,30-6,32)^2}}{2} \\
 &= \frac{\sqrt{0,0016+0,0036+0,0004}}{2} \\
 &= \sqrt{0,0028} \\
 &= 0,05
 \end{aligned}$$

Jam ke-4

$$SD = \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\sqrt{(5,40-5,40)^2+(5,40-5,37)^2+(5,40-5,44)^2}}{2} \\
 &= \frac{\sqrt{0+0,0009+0,0016}}{2} \\
 &= \sqrt{0,00125} \\
 &= 0,04
 \end{aligned}$$

Jam ke-6

$$\begin{aligned}
 \text{SD} &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(4,61-4,63)^2+(4,61-4,56)^2+(4,61-4,65)^2}}{2} \\
 &= \frac{\sqrt{0,0004+0,0025+0,0016}}{2} \\
 &= \sqrt{0,00225} \\
 &= 0,05
 \end{aligned}$$

5.2.3.2 Suhu *Chiller*

Hari		1	2	3
Replikasi	I	5,76	4,65	4,46
	II	5,87	4,80	4,60
	III	5,95	4,92	4,83
Rata-rata		5,86	4,79	4,63

Hari ke-0

$$\begin{aligned}
 \text{SD} &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(5,86-5,76)^2+(5,86-5,87)^2+(5,95-5,86)^2}}{3-1} \\
 &= \frac{\sqrt{0,01+0,0001+0,0081}}{2} \\
 &= \sqrt{0,0091}
 \end{aligned}$$

$$= 0,095$$

Hari ke-2

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(4,79-4,65)^2+(4,79-4,8)^2+(4,79-4,92)^2}}{3-1} \\ &= \frac{\sqrt{0,0196+0,0001+0,0169}}{2} \\ &= \sqrt{0,0183} \\ &= 0,135 \end{aligned}$$

Hari ke-3

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(4,63-4,46)^2+(4,63-4,60)^2+(4,63-4,83)^2}}{3-1} \\ &= \frac{\sqrt{0,0289+0,0009+0,04}}{2} \\ &= \sqrt{0,0349} \\ &= 0,187 \end{aligned}$$

LAMPIRAN B. DATA DAN HASIL ANALISIS UJI MIKROBA

1. Suhu ruang

Pengenceran jam ke-	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Total mikroba (logCFU/g)
0		35	15			3,597
		27	10			
2		80	43			4,068
		87	47			
4			95	30		5,038
			90	25		
6				50	28	5,765
				45	15	

Jam ke-0 (kontrol)

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(35+27)+(15+10)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{87}{2,2} \times 10^2 \\
 &= 3,9 \times 10^3 \text{ CFU/g} \\
 &= 3,597 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

Jam ke-2

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(80+87)+(43+47)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{257}{2,2} \times 10^2 \\
 &= 1,2 \times 10^4 \text{ CFU/g} \\
 &= 4,068 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

Jam ke-4

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(95+90) + (35+20)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{240}{2,2} \times 10^3 \\
 &= 1,1 \times 10^5 \text{ CFU/g} \\
 &= 5,037 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

Jam ke-6

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(35+27) + (15+10)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{128}{2,2} \times 10^4 \\
 &= 5,8 \times 10^5 \text{ CFU/g} \\
 &= 5,765 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

2. Suhu *chiller*

Pengenceran jam ke-	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Total mikroba (logCFU/g)
0		35	8			3,612
		40	10			
1		95	38			4,061
		80	40			
2			140	65		5,274
			135	73		
3				62	51	6,023
				65	54	

Hari ke-0 (control)

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(35+40)+(8+10)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{90}{2,2} \times 10^2 \\
 &= 4,09 \times 10^4 \text{ CFU/g} \\
 &= 3,612 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

Hari ke-1

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(95+80)+(38+40)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{253}{2,2} \times 10^2 \\
 &= 1,15 \times 10^4 \text{ CFU/g} \\
 &= 4,061 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

Hari ke-2

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(140+135)+(65+73)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{413}{2,2} \times 10^3 \\
 &= 1,87 \times 10^5 \text{ CFU/g} \\
 &= 5,274 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

Hari ke-3

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)]} \times (d) \\
 &= \frac{(35+27)+(15+10)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]} \times 10^2 \\
 &= \frac{232}{2,2} \times 10^4 \\
 &= 1,1 \times 10^6 \text{ CFU/g} \\
 &= 6,023 \text{ logCFU/g}
 \end{aligned}$$

**LAMPIRAN C. DATA DAN HASIL ANALISIS UJI TEKSTUR
CHICKEN NUGGET**

1. Suhu ruang (distance = 3mm)

Jam ke-	Titik lubang					Rata-rata	SD
	1	2	3	4	5		
0	674	536	614	434	443	540,2	104,99
2	61	58	73	67	66	65	5,79
4	64	65	71	60	60	64	4,53
6	84	91	84	87	73	83,8	6,69

Jam ke-0

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(540,2-674)^2+(540,2-536)^2+(540,2-614)^2+(540,2-434)^2+(540,2-443)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{17902,44+17,64+106,2+5446,44+11278,44+9447,84}}{4} \\
 &= \sqrt{11023,2} \\
 &= 104,99
 \end{aligned}$$

Jam ke-2

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(65-61)^2+(65-58)^2+(65-73)^2+(65-67)^2+(65-66)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{16+49+64+4+1}}{4} \\
 &= \sqrt{33,5} \\
 &= 5,79
 \end{aligned}$$

Jam ke-4

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(64-64)^2+(64-65)^2+(64-71)^2+(64-60)^2+(64-60)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{0+1+49+16+16}}{4} \\
 &= \sqrt{20,5} \\
 &= 4,53
 \end{aligned}$$

Jam ke-6

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(83,8-84)^2+(83,8-91)^2+(83,8-84)^2+(83,8-87)^2+(83,8-73)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{0,04+51,84+0,04+10,24+116,64}}{4} \\
 &= \sqrt{44,7} \\
 &= 6,69
 \end{aligned}$$

2. Suhu *chiller* (distance = 3mm)

Hari ke-	Titik lubang					Rata-rata	SD
	1	2	3	4	5		
0	763	616	517	450	402	549,6	143,80
1	200	180	170	152	155	171,4	19,62
2	171	125	188	161	123	153,6	28,70
3	190	152	99	150	174	153	34,41

Hari ke-0 (kontrol)

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(549,6-763)^2+(549,6-616)^2+(549,6-517)^2+(549,6-450)^2+(549,6-402)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{45539,56+4408,96+1062,76+9920,16+21785,76}}{4} \\
 &= \sqrt{20679,3} \\
 &= 143,80
 \end{aligned}$$

Hari ke-1

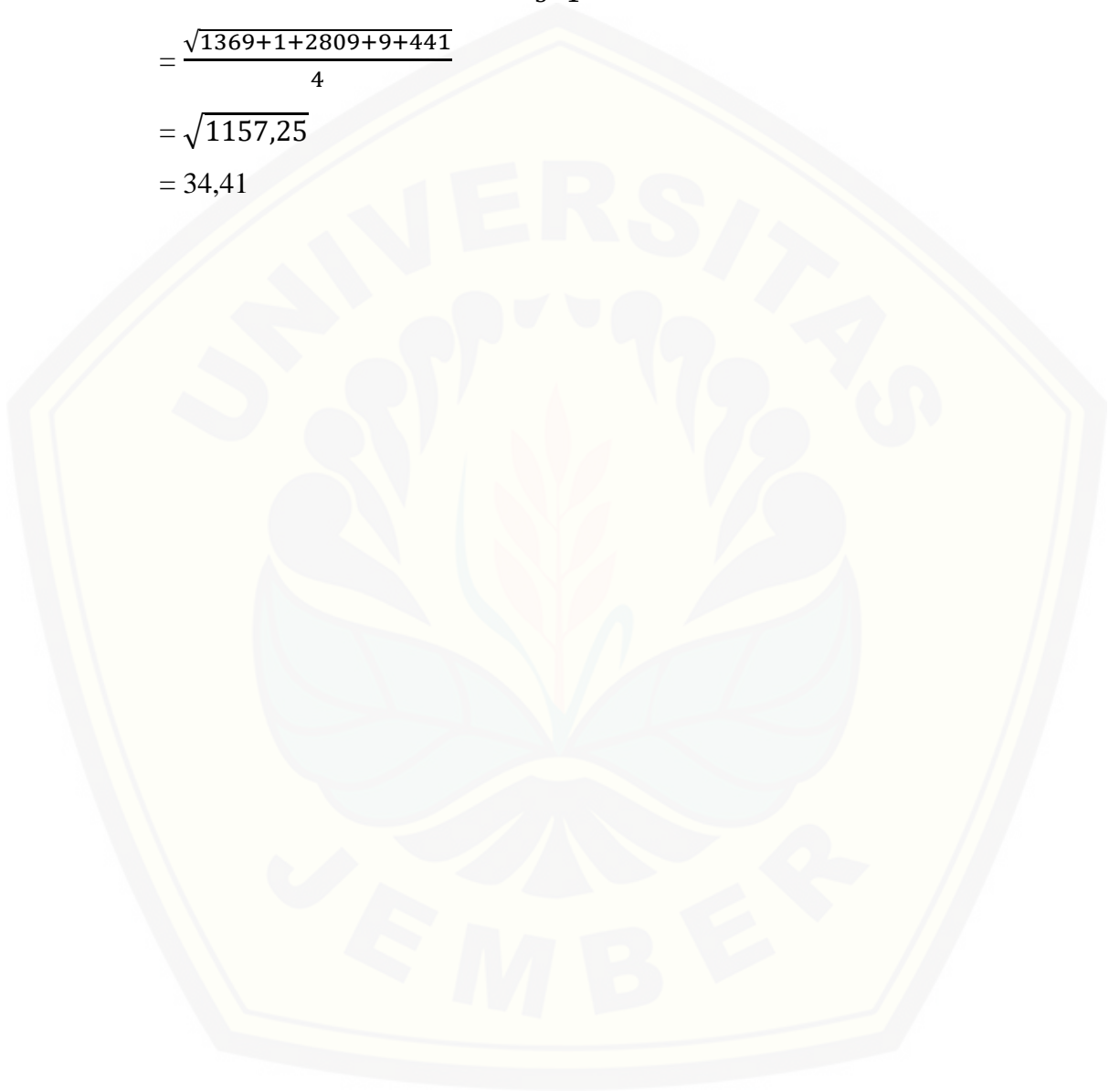
$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(171,4-200)^2+(171,4-180)^2+(171,4-170)^2+(171,4-152)^2+(171,4-155)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{817,96+73,96+1,96+376,36+268,96}}{4} \\
 &= \sqrt{384,8} \\
 &= 19,61
 \end{aligned}$$

Hari ke-2


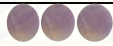



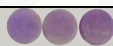









$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(153,6-171)^2+(153,6-125)^2+(153,6-188)^2+(153,6-161)^2+(153,6-123)^2}}{5-1} \\
 &= \frac{\sqrt{303,76+817,96+1183,36+54,76+936,36}}{4} \\
 &= \sqrt{824,05} \\
 &= 28,70
 \end{aligned}$$

Hari ke-3









$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(153-190)^2+(153-152)^2+(152-99)^2+(153-150)^2+(153-174)^2}}{5-1} \\ &= \frac{\sqrt{1369+1+2809+9+441}}{4} \\ &= \sqrt{1157,25} \\ &= 34,41 \end{aligned}$$



**LAMPIRAN D. HASIL OPTIMASI KONSENTRASI ENZIM
LIPASE**

Konsentrasi enzim lipase	Gambar TTI	Jumlah	Replikasi			Δ Mean RGB	SD	RSD (%)	Perubahan respon (%)
			I	II	III				
0,5 ppm (0,001 U)		0	130,61	135,61	148,64	138,29	9,31	6,73	0
		1	137,84	135,36	149,92	141,04	7,79	5,52	1,99
		2	137,46	136,34	147,52	140,44	6,16	4,39	1,55
		4	153,86	137,83	159,73	150,47	11,34	7,53	8,81
		6	158,89	147,02	177,74	161,22	15,50	9,61	16,58
1,5 ppm (0,003 U)		0	133,70	133,13	123,61	130,14	5,67	4,36	0
		1	145,57	151,98	155,01	150,85	4,82	3,19	15,91
		2	155,30	158,22	155,34	156,29	1,67	1,07	20,09
		4	164,19	165,53	159,11	162,94	3,39	2,08	25,20
		6	172,31	164,80	162,53	166,55	5,12	3,07	27,98
2 ppm (0,004 U)		0	126,10	133,82	135,03	131,65	4,84	3,68	0
		1	154,36	163,65	171,75	163,25	8,70	5,33	24,00
		2	155,08	165,76	172,16	164,33	8,63	5,25	24,82
		4	160,33	168,85	176,76	168,58	8,22	4,87	28,05
		6	171,27	173,68	182,02	175,66	5,64	3,21	33,43

LAMPIRAN E. STABILITAS TTI

Hari ke-	Gambar TTI	Replikasi			Δ <i>Mean RGB</i>	SD	% RSD	% Perubahan respon
		I	II	III				
0		116,15	99,78	102,09	106,01	8,86	8,35	0
1		120,19	98,34	99,79	106,11	12,22	11,52	0,09
2		120,32	98,65	99,85	106,27	12,18	11,46	0,25
3		118,54	107,23	102,04	109,27	8,44	7,72	3,08
4		121,67	109,41	100,66	110,58	10,55	9,54	4,31
5		119,14	113,73	110,60	114,49	4,32	3,77	8
6		128,84	118,48	152,03	133,12	17,18	12,90	25,57
7		132,31	120,67	166,87	139,95	24,03	17,17	32,02

LAMPIRAN F. REPRODUSIBILITAS TTI





	Jam ke-	Hari ke-		
		1	2	3
Ruang	0	2.544	1.277	4.262
	2	1.233	1.889	4.346
	4	1.587	0.774	2.526
	6	2.078	1.23	2.486
<i>Chiller</i>	Hari ke-	Minggu ke-		
		1	2	3
	0	4.488	1.895	1.534
	1	1.364	2.747	2.641
	2	4.616	4.962	4.283
	3	4.249	4.381	5.224

LAMPIRAN G. DATA HASIL PENGAMATAN PERUBAHAN WARNA TTI PADA IMAGEJ

1. Suhu ruang

Indikator BCP : Substrat gliserol tributirat (1:1)

Volume enzim lipase = 15 μ l

Jam	Gambar TTI	Replikasi			Rata- rata <i>Mean</i> <i>RGB</i>	SD	% RSD	% Peru- bahan respon
		I	II	III				
0		133,697	133,125	123,605	130,14	5,67	4,36	0
2		155,301	158,215	155,339	156,29	1,67	1,07	20,09
4		164,187	165,53	159,107	162,94	3,39	2,08	25,20
6		172,313	164,801	162,531	166,55	5,12	3,07	27,98

Perhitungan SD, % RSD serta % perubahan respon TTI pada suhu ruang :

Jam ke-0 (kontrol)

$$\begin{aligned}
 \text{SD} &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(130,14-133,697)^2+(130,14-133,125)^2+(130,14-123,605)^2}}{3-1} \\
 &= \frac{\sqrt{12,65+8,91+42,71}}{2} \\
 &= \sqrt{32,133} \\
 &= 5,67
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\ &= \frac{5,67}{130,14} \times 100\% \\ &= 4,36\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{(130,14 - 130,14)}{130,14} \times 100\% \\ &= 0\%\end{aligned}$$

Jam ke-2

$$\begin{aligned}SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2 + (x-x_2)^2 + (X-x_3)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(156,29-155,301)^2 + (156,29-158,215)^2 + (156,29-155,339)^2}}{3-1} \\ &= \frac{\sqrt{0,978+3,705+0,904}}{2} \\ &= \sqrt{2,79} \\ &= 1,67\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\ &= \frac{1,67}{156,29} \times 100\% \\ &= 1,07\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{(156,29 - 130,14)}{130,14} \times 100\% \\ &= 20,09\%\end{aligned}$$

Jam ke-4

$$\begin{aligned}SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2 + (x-x_2)^2 + (X-x_3)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(162,94-164,187)^2 + (162,94-165,53)^2 + (162,94-159,107)^2}}{3-1} \\ &= \frac{\sqrt{1,56+6,71+14,69}}{2}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= \sqrt{11,48} \\
 &= 3,39 \\
 \%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\
 &= \frac{3,39}{162,94} \times 100\% \\
 &= 2,08\% \\
 \% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{(162,94 - 130,14)}{130,14} \times 100\% \\
 &= 25,20\%
 \end{aligned}$$





Jam ke-6

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2 + (x-x_2)^2 + (x-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(166,55-172,313)^2 + (166,55-164,801)^2 + (166,55-162,531)^2}}{3-1} \\
 &= \frac{\sqrt{33,21+3,06+16,15}}{2} \\
 &= \sqrt{26,21} \\
 &= 5,12 \\
 \%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,12}{166,55} \times 100\% \\
 &= 3,07\% \\
 \% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{(166,55 - 130,14)}{130,14} \times 100\% \\
 &= 27,98\%
 \end{aligned}$$

2. Suhu chiller

Indikator BCP : Substrat gliserol tributirat (1:1)

Volume enzim lipase = 15 μ l

Hari	Gambar TTI	Replikasi			Rata- rata <i>Mean</i> <i>RGB</i>	SD	% RSD	% Peru- bahan respon
		I	II	III				
0		131,628	125,741	136,24	131,20	5,26	4,01	0
1		169,879	170,493	169,653	170,01	0,43	0,26	29,58
2		174,19	170,205	173,344	172,58	2,10	1,22	31,54
3		172,521	171,13	179,372	174,34	4,41	2,53	32,88

Perhitungan SD, % RSD serta % perubahan respon TTI pada suhu ruang :

Hari ke-0 (kontrol)

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(131,20-131,628)^2+(131,20-125,741)^2+(131,20-136,24)^2}}{3-1} \\
 &= \frac{\sqrt{0,18+29,80+25,40}}{2} \\
 &= \sqrt{27,69} \\
 &= 5,26
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,26}{131,20} \times 100\% \\
 &= 4,01\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{(131,20 - 131,20)}{131,20} \times 100\% \\
 &= 0\%
 \end{aligned}$$

Hari ke-1

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(170,01-172,521)^2+(170,01-171,13)^2+(170,01-179,372)^2}}{3-1} \\
 &= \frac{\sqrt{6,31+1,25+87,65}}{2} \\
 &= \sqrt{47,60} \\
 &= 0,43 \\
 \%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,43}{170,01} \times 100\% \\
 &= 0,26\% \\
 \% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{(170,01-131,20)}{131,20} \times 100\% \\
 &= 29,58\%
 \end{aligned}$$

Hari ke-2

$$\begin{aligned}
 SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\
 &= \frac{\sqrt{(172,58-174,19)^2+(172,58-170,205)^2+(172,58-173,344)^2}}{3-1} \\
 &= \frac{\sqrt{2,59+5,64+0,58}}{2} \\
 &= \sqrt{4,41} \\
 &= 2,10 \\
 \%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\
 &= \frac{2,10}{172,58} \times 100\% \\
 &= 1,22\% \\
 \% \text{Perubahan respon} &= \frac{(\text{mean RGB sampel} - \text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\
 &= \frac{(172,58-131,20)}{131,20} \times 100\% \\
 &= 31,54\%
 \end{aligned}$$

Hari ke-3

$$\begin{aligned}SD &= \frac{\sqrt{(x-x_1)^2+(x-x_2)^2+(X-x_3)^2}}{n-1} \\&= \frac{\sqrt{(174,34-172,521)^2+(174,34-171,13)^2+(174,34-179,372)^2}}{3-1} \\&= \frac{\sqrt{3,31+10,30+25,32}}{2} \\&= \sqrt{19,47} \\&= 4,41 \\%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\&= \frac{4,41}{174,34} \times 100\% \\&= 2,53\% \\%Perubahan respon &= \frac{(\text{mean RGB sampel}-\text{mean RGB blanko})}{\text{mean RGB blanko}} \times 100\% \\&= \frac{(174,34-131,20)}{131,20} \times 100\% \\&= 32,88\%\end{aligned}$$

LAMPIRAN H. LABEL DAN KEMASAN TTI



Label TTI



Kemasan luar TTI