

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan dari bulan Maret hingga Juli dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan preparasi sampel, ekstraksi sampel kacang-kacangan, dan analisis spektrofotometer UV-Vis.
- 2) Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan analisis spektrofotometer UV-Vis.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Pada penelitian ini digunakan spatula, eppendorf, neraca analitik, labu Erlenmeyer 100 mL, labu ukur 10 mL, labu ukur 50 mL, labu ukur 100 mL, pipet volumetrik, corong kaca, shaker, sentrifugasi, vortex, dan instrumen Spektrofotometer UV-Mini 1240 shimadzu.

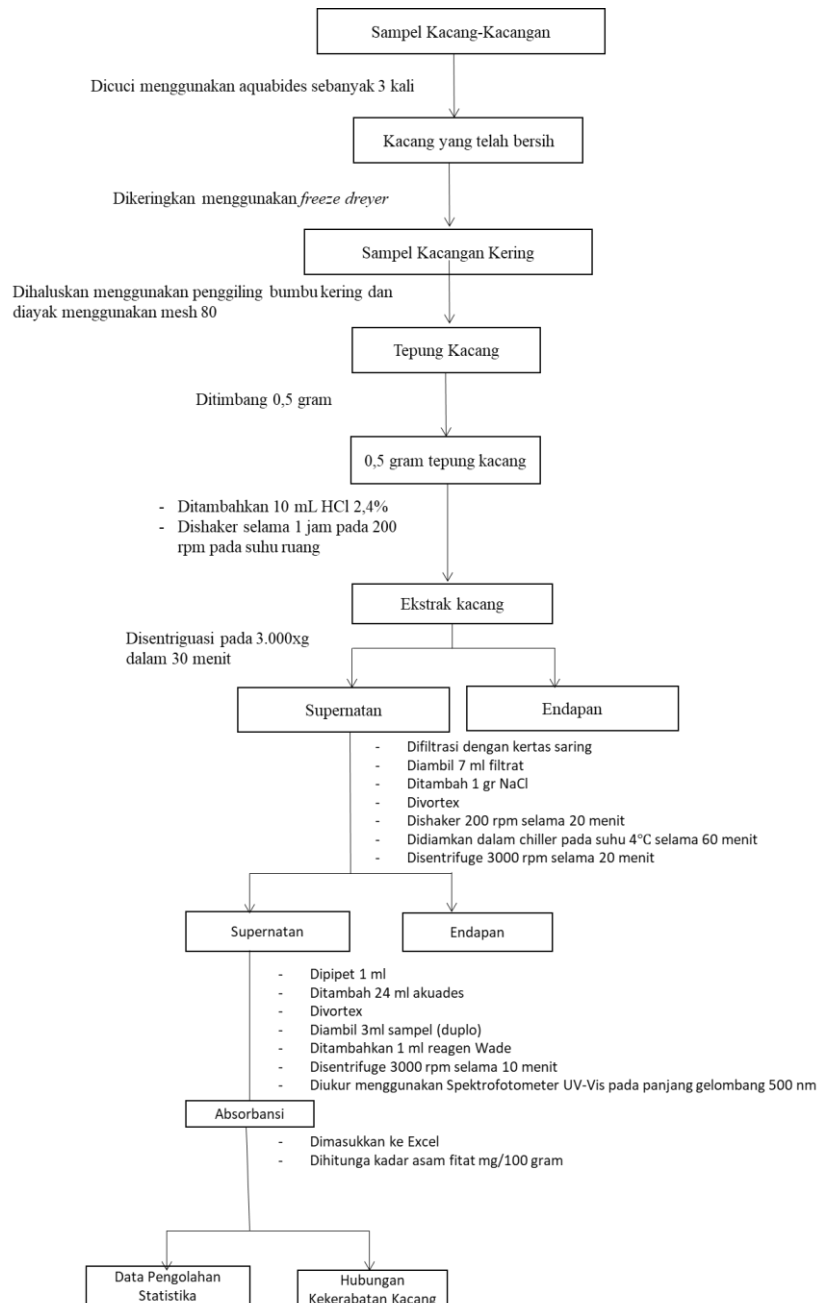
##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kacang lurik (*Arachis hypogaea* var. *Lurikensis*), kacang gude (*Cajanus cajan*), kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), kacang beras (*Vigna unguiculata*), kacang panjang hitam (*Vigna unguiculata*), kacang merah (*Phaseolus vulgaris*), kacang borlotti (*Phaseolus vulgaris* var. *Cranberry*), kacang buncis putih (*Phaseolus vulgaris*), kacang kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus*), kacang hijau (*Vigna radiata*), kacang azuki (*Vigna angularis*), kacang koro benguk (*Mucuna pruriens*), dan kacang komak (*Lablab purpureus*),

larutan stok asam fitat, larutan HCl 2,4%, NaCl, reagen wade ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) dan akuades.

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

Berikut merupakan bagan alir metodologi pada penelitian ini.



**Gambar 3. 1.** Bagan Alir Penelitian

### 3.4 Tahapan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari penelitian yang dilakukan oleh Gao *et al*, pada tahun 2007 dengan beberapa penyesuaian. Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

#### 3.4.1 Pembuatan Deret Larutan Standar

Konsentrasi larutan standar dibuat mulai dari 5, 15, 25, 35, 45, 100, 200, dan 300 ppm. Larutan stok standar dibuat larutan deret standar 100, 200, 300 ppm dengan memasukan 0,01 mL; 0,02 mL; dan 0,03 mL larutan stok ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Sebanyak 22,5 mL larutan standar asam fitat 100 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan akuades hingga tanda batas untuk membuat larutan standar 45 ppm. Selanjutnya diambil 1,1; 3,3; 5,6; 7,8 mL larutan standar 45 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan akuades hingga tanda batas untuk membuat larutan standar 5, 15, 25, 35 ppm.

#### 3.4.2 Pembuatan Larutan HCl 2,4%

Larutan HCl 2,4% dibuat dengan mengencerkan larutan stok HCl 37%. Sebanyak 65 mL larutan HCl 37% dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL lalu ditambahkan akuades hingga tanda batas.

#### 3.4.3 Pembuatan Reagen Wade

Reagen wade merupakan larutan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,03% mengandung asam sulfosalisilat 0,3% dalam akuades.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ditimbang sebanyak  $\pm 0,03$  gram dan ditambahkan  $\pm 0,3$  gram asam sulfosalisilat kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades. Larutan campuran  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan asam sulfosalisilat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan akuades hingga tanda batas. Reagen wade disimpan dalam botol vial gelap untuk kemudian digunakan dalam analisis kandungan asam fitat.

### 3.4.4 Pembuatan Kurva Standar

Larutan standar asam fitat digunakan untuk membandingkan konsentrasi asam fitat dan serapannya dengan serapan yang dihasilkan dari uji kandungan asam fitat. Sebanyak 3 mL larutan deret standar berbagai konsentrasi (5, 15, 25, 35, 45, 100, 200, dan 300 ppm) dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Lalu ditambahkan 1 mL reagen wade dan di sentrifuge selama 5 detik. Setelah itu larutan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Sampel yang telah siap ukur akan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 500 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades 3 mL dan ditambahkan 1 ml reagen wade dengan pengukuran menggunakan metode yang sama.

### 3.4.5 Ekstraksi Sampel Kacang

Pada penelitian ini, ekstraksi dilakukan pada sampel kacang berupa tepung. Sampel tepung kacang ditimbang sebanyak 0,5 gram untuk setiap jenis kacang, setiap sampel kacang diberi identitas sesuai jenis kacang yang digunakan, seperti kacang lurik (K. Lurik), kacang gude (K. Gude), kacang tunggak (K. Tunggak), kacang beras (K. Beras), kacang panjang hitam (K. Panjang Hitam), kacang merah (K. Merah), kacang borlotti (K. Borlotti), kacang buncis putih (K. Buncis Putih), kacang kecipir (K. Kecipir), kacang hijau (K. Hijau), kacang azuki (K. Azuki), kacang koro benguk (K. Koro Benguk), dan kacang komak (K. Komak). Adapun data penimbangan dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Tepung kacang akan diekstrak dengan 10 mL HCl 2,4%. Adapun perhitungan pembuatan larutan untuk ekstraksi sampel dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Campuran tepung kacang dengan pelarut kemudian di ekstrak selama satu jam menggunakan shaker dengan kecepatan 200 rpm pada suhu ruang. Setelah diekstraksi, sampel disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan kemudian disaring menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan diambil 7 mL dan ditambahkan 1 gram NaCl lalu divortex dan kemudian di shaker kembali pada 200 rpm selama 20

menit. Larutan yang telah dishaker disimpan dalam *chiller* pada suhu 4 °C selama 60 menit dan kemudian disentrifugasi kembali pada 3000 rpm selama 20 menit. Dilakukan pengenceran pada sampel sebanyak 25 kali, supernatan diambil 1 mL dan ditambahkan 24 mL akuades yang selanjutnya dihomogenkan dengan vortex.

#### **3.4.6 Analisis Asam Fitat Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis**

Metode analisis dengan spektrofotometer UV-Vis untuk penentuan kandungan asam fitat diadaptasi dari Gao *et al.*, (2007) dengan sedikit perubahan. Pada analisis ini, digunakan spektrofotometer UV-Mini 1240 Shimadzu dengan panjang gelombang 500 nm.

Sampel yang telah dilakukan pengenceran diambil 3 mL sebanyak 2 kali untuk dilakukan pengulangan dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Pada masing-masing tabung eppendorf berisi sampel ditambahkan 1 mL reagen wade yang selanjutnya dihomogenkan dengan vortex selama 5 detik dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diukur menggunakan instrumen spektrofotometer UV-V dengan panjang gelombang 500 nm. Untuk blanko digunakan akuades dengan diberikan perlakuan yang sama seperti sampel. Setelah di analisis menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis, data hasil analisis berupa absorbansi untuk setiap sampel.

#### **3.4.7 Pengolahan Data Statistik**

Data absorbansi yang telah didapatkan didapat selanjutnya akan diolah menggunakan Excel. Hasilnya diberikan sebagai rata-rata plus atau minus standar deviasi (SD) dan selanjutnya akan dilakukan analisis varians satu arah (ANOVA) menggunakan perangkat lunak SPSS 13. Selanjutnya dilakukan perbandingan menggunakan uji Duncan dan perbedaannya dianggap signifikan pada  $p < 0,05$ . Adapun pengolahan data menggunakan software Ms. Excel dan SPSS yang dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Dari data yang telah didapatkan selanjutnya akan dibandingkan dengan dengan pohon kekerabatan filogenetik dari ketiga

belas sampel yang dibuat dan dianalisis menggunakan *perangkat lunak* MEGA 11.