

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Maret hingga Juli dengan tempat kegiatan di Laboran Riset Kimia Makanan Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan germinasi, fermentasi, penepungan sampel tempe dan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV VIS. Serta Laboratorium Kimia Dasar Analitik Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan pengeringan sampel menggunakan oven.

3.2 Alat dan Bahan

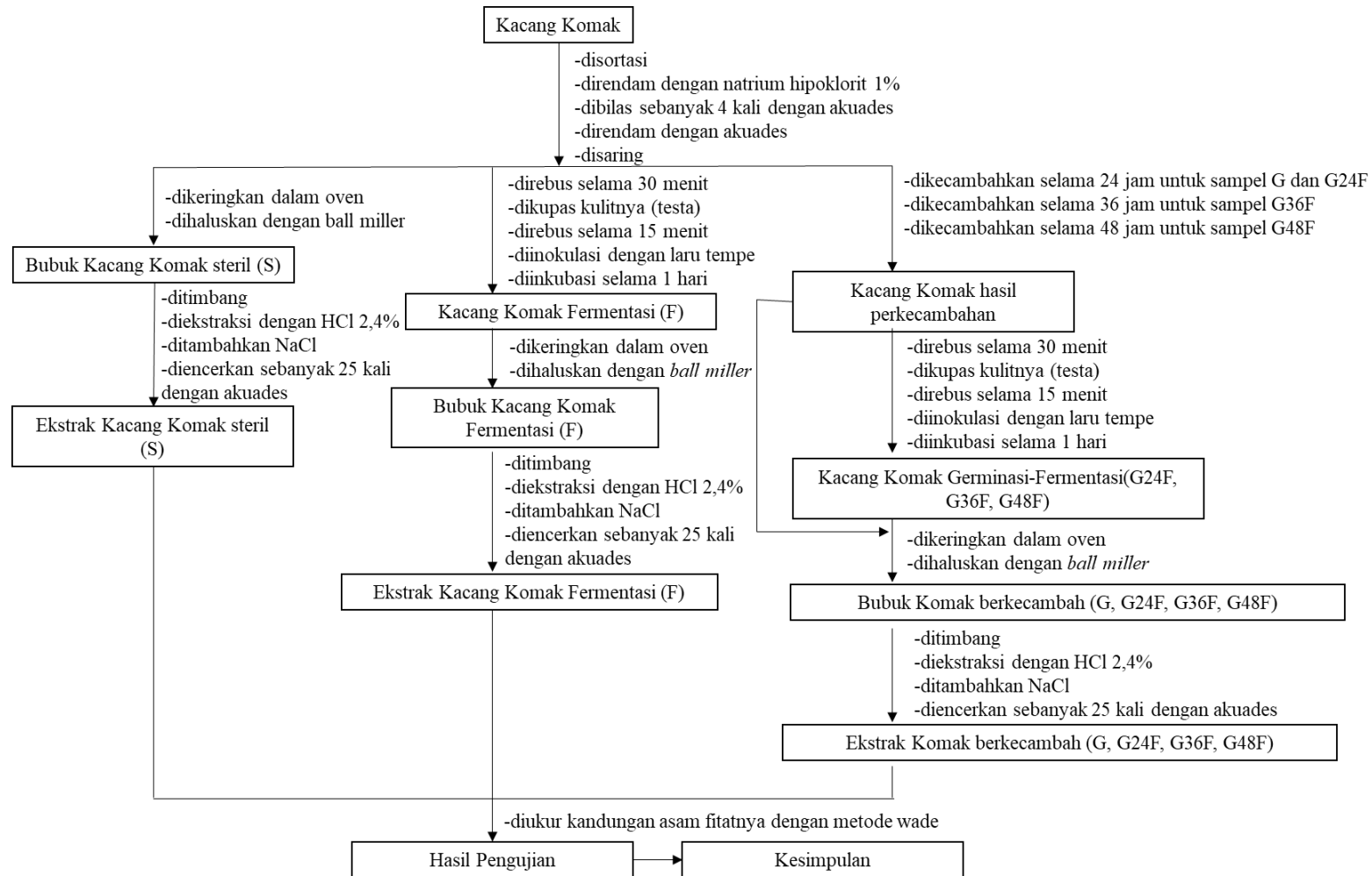
3.2.1 Alat

Pada penelitian ini, untuk proses perkecambahan digunakan alat *germinator* yang dilengkapi dengan *power supply* 24V/3A, *timer*, *temperature control* DC, *heating mat* 12 V, *mist maker* DC 12V, *mini fan* 3V, probe, toples, *tray* plastik. Untuk keperluan sterilisasi digunakan autoklaft. Tahap pembuatan tempe digunakan panci listrik (GOTO), wadah plastik, kantong plastik ukuran 10x20 (AA), dan lilin. Tahap inkubasi digunakan inkubator yang dilengkapi dengan *heating mat* AC 220V (Nomoy), *thermo digital* sensor TPM-10. Selanjutnya untuk pengeringan dan penggilingan sampel digunakan oven (B-One), *aluminium foil*, penggiling bumbu kering dan ayakan ukuran 80 mesh. Kemudian untuk ekstraksi dan pengukuran kadar asam fitat digunakan mikro pipet ukuran 1000-5000 μ L (DragonLab), *white tip* mikropipet 5000 μ L, vortex shaker (Scigolex MX-S), sentrifuge (Kokusan H-103N), tabung falcon 15 dan 50 mL (NEST), pipet ukur 25 mL, erlenmayer 50 dan 100 mL, instrumen Spektrofotometer UV Vis (UV mini 1240). Alat lain seperti neraca analitik (Mettler Toledo ME204), *freezer* (GEA freezer Royal-Kincool), gelas kimia berukuran 300-400 mL, batang pengaduk, spatula, labu ukur 250 mL, gelas ukur 50 dan 100 mL, pipet tetes dan pinset.

3.2.2 Bahan

Kacang komak (*Lablab purpureus*) yang berasal dari Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, akuades, laru tempe yang mengandung jamur *Rhizopus Oligosporus* yang di produksi oleh PT. Aneka fermentasi Indonesia, alkohol 0,07%, natrium hipoklorit 1%, natrium hipoklorit 2,3%, asam klorida 2,4%, asam sulfosalisilat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dan *cheese cloth*.

3.3 Tahapan Penelitian



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

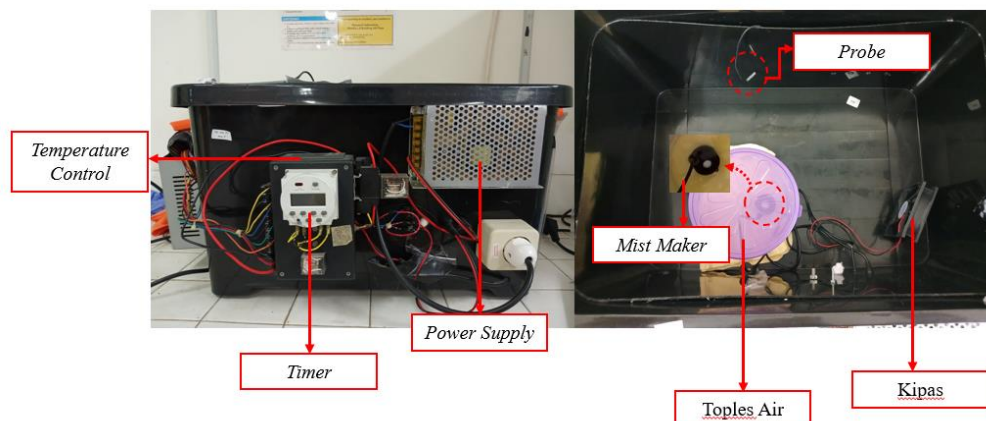
3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Sortir Sampel

Kacang komak yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini berasal dari Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Kacang komak disortasi berdasarkan bentuk fisiknya dengan memilih kacang komak yang bulat, hitam dan tidak berlubang. Sampel kacang komak sortir disimpan di dalam lemari es bersuhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Tahap Proses Perkecambahan

Alat perkecambahan atau yang disebut juga *germinator* digunakan untuk membantu proses perkecambahan kacang komak pada penelitian ini. *Germinator* skala laboratorium dirakit dan dioptimasi berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Aisyah et al., (2015) dengan beberapa modifikasi. Faktor kontrol pada alat *germinator* ini adalah kelembapan, suhu, dan intensitas cahaya. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ti et al., (2014) proses perkecambahan dilakukan pada suasana yang gelap dengan kelembapan yang dibutuhkan adalah 99%. Sehingga diatur waktu nyala *mist maker* dan kipas pada *germinator* menggunakan mikrotimer untuk menjaga kontrol kelembapan. Mikrotimer diatur untuk mengaktifkan *mist maker* setiap 2 jam sekali selama 2 menit. *Mist maker* yang diletakkan didalam wadah berisi air akan mengkonversi air menjadi kabut air. Kipas yang terdapat dalam *germinator* akan menyala untuk menyebarkan kabut air ke seluruh area perkecambahan. *Temperature controler* yang disambungkan dengan sensor suhu dan *heating mat* difungsikan untuk mengatur suhu bagian dalam *germinator* agar tetap pada rentang $25-27^{\circ}\text{C}$. Box plastik berwarna hitam digunakan sebagai kotak *germinator* untuk menjaga sampel dari cahaya luar yang masuk. *Germinator* yang akan digunakan sebelumnya harus disterilisasi dengan cara menyemprotkan bagian dalam box dengan larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 0,07% dan alkohol 70%, kemudian box akan disinari lampu UV selama 15 menit. Gambar 3.2 menunjukkan bentuk *germinator* yang dipakai.



Gambar 3.2 Alat germinator

Langkah awal yang dilakukan pada proses perkecambahan adalah sterilisasi kacang, metode sterilisasi yang digunakan merujuk pada penelitian sebelumnya milik Aisyah et al., (2013) dengan sedikit modifikasi. Sampel kacang komak disterilisasi dengan merendam sampel di dalam larutan natrium hipoklorit 1% sebanyak 5 L/kg kacang komak selama 1 jam. Tujuan digunakannya natrium hipoklorit adalah untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan dan merangsang pertumbuhan kecambah hampir 100% (Ervin & Wetzel, 2002). Setelah disterilisasi sampel akan dibilas sebanyak empat kali menggunakan akuades yang juga telah disterilisasi sebelumnya. Kemudian sampel akan direndam di dalam akuades steril sebanyak 5L/kg kacang komak selama 24 jam pada ruang tanpa cahaya. Kacang yang telah direndam kemudian akan disusun di atas *tray* yang telah dilapisi *cheese cloth*.

Sampel kacang komak pada penelitian ini akan diberikan perlakuan yang berbeda yaitu kacang komak yang hanya disterilisasi (S), kacang komak yang dikecambahkan selama 1 hari (G), kacang komak yang disterilisasi, direndam dan difermentasi (F), kacang komak yang dikecambahkan 24 jam dan difermentasi (G24F), kacang komak yang dikecambahkan 36 jam dan difermentasi (G36F), kacang komak yang dikecambahkan 48 jam dan difermentasi (G48F). Tabel 3.1 menyimpulkan perbedaan perlakuan pada sampel kacang komak.

Tabel 3.1 perlakuan pada kacang komak

Kode Sampel	Tahapan			
	Sterilisasi	Perendaman	Germinasi	Fermentasi
S	✓	-	-	-
G	✓	✓	✓	-
F	✓	✓	-	✓
G24F	✓	✓	✓	✓
G36F	✓	✓	✓	✓
G48F	✓	✓	✓	✓

Sampel kacang komak yang hanya disterilisasi (S) dan yang hanya dikecambahkan (G) akan dimasukkan di dalam falcon tube yang telah diberi label dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$. Kemudian untuk sampel yang lainnya akan langsung dilanjutkan ke proses fermentasi.

3.4.3 Tahap Proses Fermentasi

Sampel kacang komak yang melanjutkan proses fermentasi akan direbus selama 30 menit untuk melunakkan dan mematikan enzim penyebab bau langu. Setelah itu kacang akan ditiriskan dan dikupas kulitnya, alasan dibukanya kulit (testa) pada kacang adalah agar akar dari kapang ragi tempe dapat tumbuh pada permukaan kacang. Selanjutnya dilakukan perebusan kembali selama 15 menit, perebusan yang kedua ini dilakukan untuk mematikan enzim penyebab keasaman dan melunakkan kacang. Setelah 15 menit kacang harus ditiriskan, tahap ini sangat mempengaruhi kandungan air pada tempe karena jika proses penirisan tidak sempurna tempe akan menjadi lebih mudah busuk. Kemudian kacang akan ditaburkan laru tempe sebanyak 0,2 gram/100 gram kacang. Setelah laru tempe dan kacang tercampur merata kacang akan dimasukkan ke dalam plastik yang telah dilubangi, jarak antara lubang untuk aerasi ini sekitar 1-2 cm. (Supriyono, 2003). Kacang yang sudah dikemas kemudian diinkubasi didalam inkubator dengan suhu kontrol pada rentang $33-34^{\circ}\text{C}$ selama 1 hari. Sampel tempe yang didapatkan akan dipotong menjadi bagian yang lebih kecil dan dimasukkan di dalam *specimen*

container yang telah diberi label dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$.

3.4.4 Tahap Ekstraksi

Sampel yang akan digunakan untuk ekstraksi akan dikeringkan di dalam oven bersuhu 50°C selama 18 jam. Sampel yang telah kering kemudian digiling menggunakan *ball miller* dan diayak menggunakan saringan dengan ukuran 80 mesh.

Sampel yang telah menjadi bubuk ditimbang sebanyak 0.5 gram dan dilarutkan ke dalam 10 mL HCL 2,4% dan divorteks hingga homogen. Selanjutnya larutan sampel dishaker pada kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Sampel kemudian dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung falcon ukuran 15 mL dan disentrifugasi selama 30 menit pada 3000 rpm (Dwivedi et al., 2015). Selanjutnya supernatan dipisahkan dari residunya lalu supernatan yang didapatkan difiltrasi menggunakan kertas saring. Filtrat yang didapatkan kemudian dipipet sebanyak 7 mL dan dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL. Dimasukkan 1 gram natrium klorida bubuk ke dalam tabung falcon dan divorteks hingga menjadi larutan yang homogen. Larutan sampel kemudian dishaker pada 200 rpm selama 20 menit. Kemudian sampel didiamkan di dalam *chiller* pada suhu 4°C selama 1 jam. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang didapatkan kemudian dipipet sebanyak 1 mL dan diencerkan sebanyak 25 kali dalam tabung falcon 50 mL dengan campuran 24 mL akuades. Ekstrak sampel yang telah diencerkan kemudian disimpan di dalam lemari es dengan suhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$ untuk proses analisis selanjutnya (Gao et al., 2007).

3.4.5 Tahap Pengukuran dengan Spektrofotometer UV-VIS

Tahap pengukuran terdiri dari pembuatan kurva kalibrasi dan pengukuran sampel. Pada penelitian ini, digunakan instrumen spektrofotometer tipe UV mini 1240 untuk mengukur kadar asam fitat pada sampel kacang komak. Untuk membuat larutan stok natrium fitat 100 ppm, larutan natrium fitat dipipet sebanyak 0,01 mL kemudian dilarutkan didalam akuades hingga 100 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya dipipet larutan natrium fitat sebanyak 0,015 mL dan 0,025 mL kemudian dilarutkan menggunakan akuades hingga 50 mL. Pembuatan standar 5, 15, 25, 35 dan 45 ppm dilakukan dengan mengencerkan larutan stok natrium fitat

100 ppm. Metode yang digunakan untuk pengukuran asam fitat pada penelitian ini adalah metode wade yang merujuk dari penelitian Dwivedi et al., (2015). Reagen wade yang digunakan dibuat dengan mencampurkan 30 mg bubuk $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 300 mg bubuk asam sulfosalisilat yang dilarutkan ke dalam 100 mL akuades.

Berikutnya untuk pembuatan kurva kalibrasi, larutan standar asam fitat diambil sebanyak 3 mL larutan standar konsentrasi 5, 15, 25, 35, 45, 100, 300 dan 500 ppm dan 3 mL akuades sebagai blanko ke dalam tabung falcon 15 mL yang telah diberi identitas menggunakan label. Selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen wade pada masing-masing tabung falcon. Lalu campuran standar dan reagen wade divorteks hingga homogen dan disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Kemudian larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 500 nm. Absorbansi standar yang didapatkan kemudian diolah ke dalam kurva kalibrasi, sehingga didapatkan persamaan garis linear $y = bx + a$.

Ekstrak yang telah diencerkan dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL dan ditambahkan 1 mL reagen wade, campuran divorteks hingga menjadi larutan yang homogen. Masing-masing sampel dilakukan pipet sebanyak dua kali untuk pengukuran duplo. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 500 nm. Absorbansi sampel yang didapatkan kemudian dimasukkan ke nilai y pada persamaan yang didapatkan dari persamaan garis linear standar fitat, sehingga akan didapatkan konsentrasi asam fitat dalam satuan ppm.

3.4.6 Pengolahan dan Analisa Data

Data absorbansi yang didapatkan dari pengukuran kemudian diolah menggunakan Excel dan SPSS. Data dinyatakan sebagai rata-rata dan standar deviasi. Perbedaan untuk variabel dievaluasi menggunakan one-way ANOVA dan uji lanjutan Duncan dapat dilakukan untuk memisahkan perbedaan rata-rata ketika nilai signifikansi ANOVA ($P < 0,05$).