

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret hingga Juli 2023 di Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan perkecambahan sampel, ekstraksi, dan analisis kadar asam fitat dengan alat spektrofotometer UV-Vis dan Laboratorium Kimia Dasar Analitik FPMIPA UPI untuk melakukan pengeringan sampel.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas (gelas kimia 500 ml, gelas ukur 50 ml, pipet volumetri 25 ml, labu ukur 10 ml, labu ukur 250 ml, corong kaca, dan batang pengaduk), neraca analitik (Metler Toledo tipe ME204), spatula, kertas saring, tabung *centrifuge* 15 dan 50 ml (Onemed), cheese cloth, kertas saring, autoklaf (B-One), saringan, *plastic wrap*, aluminium foil, *tray* plastik, mesin penggiling bumbu kering (Miyako), mikro pipet ukuran 1000-5000 μL (DragonLab), oven (B-One), *freezer* (GEA), *chiller* (GEA), ayakan ukuran 80 mesh, wadah plastik, alat perkecambahan berupa *germinator* yang dilengkapi dengan *heating mat* 12 V (Hyindoor), *humidifier* DC 24 V, *mini fan* DC 12 V, lampu LED warna biru, dan merah (T5 4 watt). Untuk proses ekstraksi dan analisis ekstrak digunakan beberapa alat yaitu *shaker* (Multi Shaker MMS), vortex (Scilogex MX-S), alat sentrifugasi (Kokusan tipe H-103n), dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu tipe UV mini-1240).

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan yaitu kacang komak yang diperoleh secara komersil dari Pasuruan, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan yaitu larutan natrium hipoklorit 1% (Johnson Home Hygiene Products, Indonesia), akuades (Sakura Medical), alkohol 70%, HCl 2,4%, NaCl, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, asam 5-sulfosalisilat dihidrat (Sigma-Aldrich, USA), dan natrium fitat (Sigma-Aldrich, USA).

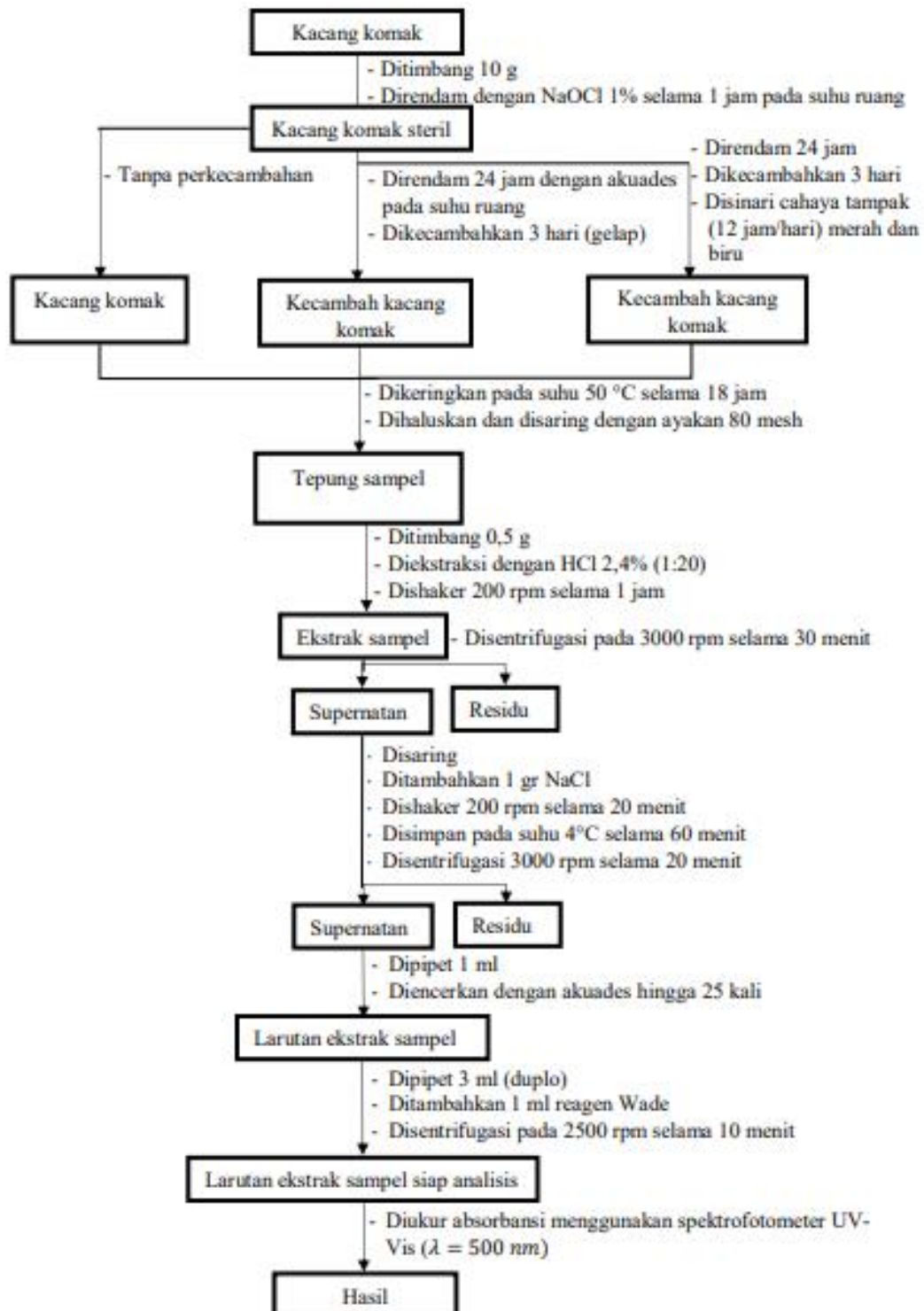
Adzra Zahra Ziva, 2023

PENGARUH PERKECAMBAHAN GELAP DAN TERANG TERHADAP KANDUNGAN ANTI NUTRISI ASAM FITAT KECAMBAH KACANG KOMAK (*Lablab purpureus*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3 Bagan Alir Penelitian

Tahapan prosedur kerja dilakukan pada penelitian ini digambarkan dalam bagan alir seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

3.4 Prosedur Kerja

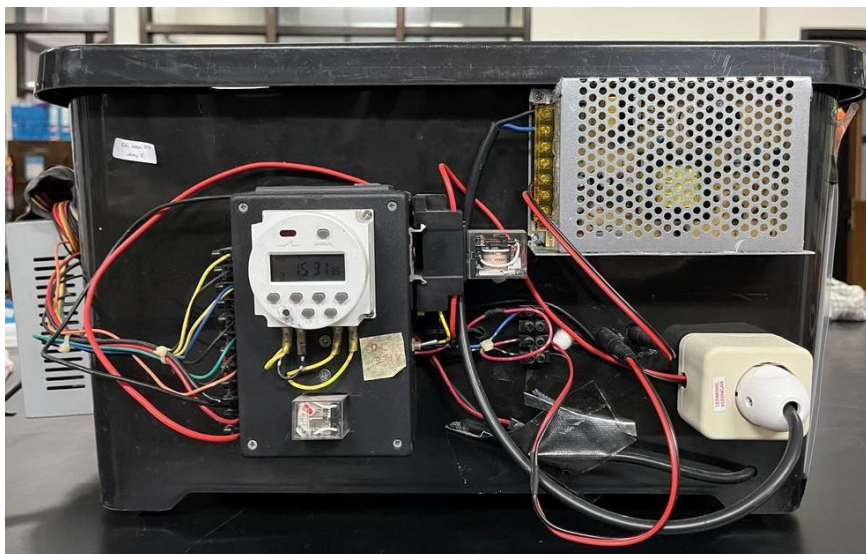
3.4.1 Tahap Penyortiran Sampel

Sampel kacang komak yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Pasuruan (Jawa Timur) yang diperoleh secara komersil. Kacang komak terlebih dahulu disortir dengan cara memilih kacang yang utuh, kulitnya tidak kisut dan tidak terkelupas.

3.4.2 Tahap Perkecambahan

Tahap perkecambahan dimulai dengan pengaturan kondisi alat perkecambahan dan proses perkecambahan. Pada proses perkecambahan, dilakukan tahap sterilisasi, perendaman, dan variasi perlakuan perkecambahan.

Perkecambahan dilakukan dalam alat mesin perkecambahan (germinator) skala laboratorium yang dimodifikasi (Aisyah et al., 2013). **Gambar 3.2** merupakan alat mesin perkecambahan yang digunakan pada penelitian ini. Beberapa aspek yang di kontrol dalam proses perkecambahan ini yaitu suhu, kelembaban, dan intensitas cahaya. Pada penelitian ini, suhu dalam alat dijaga pada 25-28°C oleh *heating mat* disertai termostat yang diletakkan di bawah alat. Sedangkan kontrol kelembaban diatur dengan mengatur waktu nyala *fogger* yang terdapat di dalam wadah air akan menkonversi air menjadi kabut air setiap 2 jam dengan durasi 5 menit, dan kipas pada alat perkecambahan ini bekerja mendistribusikan kabut air secara homogen. Box germinator yang digunakan berwarna hitam dengan tujuan agar tidak ada cahaya yang masuk dari luar. Sebelum digunakan, alat perkecambahan disterilisasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan larutan NaOCl 0,07% (v/v) ke seluruh bagian alat lalu didiamkan selama 15 menit. Kemudian dilanjutkan sterilisasi dengan penyinaran menggunakan lampu UV selama 15 menit.



Gambar 3.2 Alat mesin perkecambahan

Tahap sterilisasi merupakan tahapan pertama sebelum dilakukan proses perkecambahan. Sampel kacang komak yang telah ditimbang sebanyak 10 g terlebih dahulu disterilisasi dengan larutan NaOCl 1% (w/v) sebanyak 5L/kg kacang komak berdasarkan metode yang dijelaskan oleh (Aisyah et al., 2013) dengan sedikit modifikasi. Perendaman sampel dengan larutan NaOCl 1% dilakukan selama 1 jam pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pembilasan dengan akuades sebanyak 4 kali untuk menghilangkan sisa larutan natrium hipoklorit yang ada pada kacang dengan cara dipindahtuangkan. Setelah sampel kacang steril dilakukan perendaman dengan akuades steril (hasil autoklaf selama 1 jam pada suhu 120°C) sebanyak 5L/kg kacang komak selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya kacang hasil perendaman disaring lalu disusun diatas *tray* plastik yang dialasi dengan *cheese cloth* steril dan dimasukkan kedalam germinator untuk proses perkecambahan.

Proses perkecambahan pada penelitian ini dilakukan dengan beberapa perlakuan yaitu (1) kacang komak yang hanya disterilisasi sebagai kontrol (steril, S); (2) kacang komak yang dikecambahkan dengan gelap (Germinasi Gelap, GG); (3) kacang komak yang dikecambahkan dengan terang oleh lampu biru (Germinasi Terang Biru, GTB); dan (4) kacang komak yang dikecambahkan dengan terang oleh lampu merah (Germinasi Terang Merah, GTM). Sampel dikecambahkan selama 1-

3 hari pada suhu 25-28°C dan kelembaban relatif (RH) 100% pada kondisi gelap dan terang dengan pengambilan sampel setiap hari. Untuk membedakan kacang yang dikecambahkan menurut lama waktu perkecambahan maka diberi identitas yang disertai angka sesuai harinya, seperti GG-1: germinasi gelap hari ke-1, GG-2: germinasi gelap hari ke-2, GTB-3: germinasi lampu biru hari ke-3, dan seterusnya. Kacang yang dikecambahkan dibawah sinar lampu LED dilakukan selama 12 jam per hari. Proses perkecambahan ini diadaptasi dari (Khattak et al., 2007) dengan sedikit modifikasi. Berikut variasi perlakuan pada kacang komak (**Tabel 3.1**).

Tabel 3.1 Variasi perlakuan pada kacang komak

| Perlakuan | Kondisi | | | | |
|-----------|-------------|------------|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | Sterilisasi | Perendaman | Perkecambahan Gelap 1-3 Hari | Perkecambahan Terang (Biru) 1-3 Hari | Perkecambahan Terang (Merah) 1-3 Hari |
| S | ✓ | - | - | - | - |
| GG | ✓ | ✓ | ✓ | - | - |
| GTB | ✓ | ✓ | - | ✓ | - |
| GTM | ✓ | ✓ | - | - | ✓ |

3.4.3 Tahap Ekstraksi

Tahapan ekstraksi dimulai dengan pengeringan sampel menggunakan oven. Seluruh sampel kecambah kacang komak dengan perlakuan perkecambahan yang berbeda dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 18 jam (Pal et al., 2016). Sampel komak yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin penghalus bumbu dan disaring dengan ayakan berukuran 80 mesh. Hasil berupa sampel tepung komak selanjutnya disimpan dalam *freezer* dengan suhu -4°C hingga dilakukan proses analisis selanjutnya

Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan metode yang telah dilakukan (Gao et al., 2007) sebelumnya dengan sedikit modifikasi. Sampel kecambah kacang komak yang sudah ditepungkan sebelumnya ditimbang sebanyak 0,5 g dan dicampurkan dengan 10 mL HCl 2,4% didalam labu Erlenmeyer. Adapun data

Adzra Zahra Ziva, 2023

PENGARUH PERKECAMBAHAN GELAP DAN TERANG TERHADAP KANDUNGAN ANTI NUTRISI ASAM FITAT KECAMBAH KACANG KOMAK (*Lablab purpureus*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

penimbangan sampel dapat dilihat pada **Lampiran 1** dan data pembuatan larutan HCl 2,4% pada **Lampiran 2**. Campuran tepung komak dan pelarut kemudian digoyangkan menggunakan alat *shaker* pada 200 rpm selama 1 jam untuk membantu memaksimalkan ekstraksi komponen yang terdapat pada sampel. Setelah diekstraksi, kemudian sampel dipindahkan kedalam tabung sentrifugasi 10 mL dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit. Setelah supernatan dan residu terpisah, kemudian supernatan dipipet dan disaring dengan menggunakan kertas saring.

Hasil filtrasi supernatan selanjutnya dipipet sebanyak 7 mL kedalam tabung sentrifugasi 10 mL dan ditambahkan NaCl sebanyak 1 g. Penambahan NaCl dilakukan dengan tujuan menghilangkan fosfor anorganik dan komponen pengganggu lainnya dengan cara mengendapkan komponen matriks yang dapat mengganggu reaksi kolorimetri. Setelah itu dilakukan homogenisasi dengan menggunakan vortex dan digoyangkan dengan alat *shaker* pada 200 rpm selama 20 menit untuk melarutkan garam. Kemudian campuran disimpan dalam *chiller* pada suhu 4°C selama 60 menit dan dibiarkan mengendap. Campuran ekstrak disentrifugasi kembali pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan hasil ekstraksi kemudian dipipet 1 ml kedalam tabung sentrifugasi 50 mL dan diencerkan hingga 25 kali dengan menambahkan akuades sebanyak 24 mL. Larutan ekstrak sampel disimpan dalam *freezer* dengan suhu -4°C hingga dilakukan proses analisis selanjutnya.

3.4.4 Tahap Analisis Kadar Asam Fitat dengan Instrumen Spektrofotometer UV-Vis

Tahap analisis kadar asam fitat menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis terdiri dari pembuatan kurva standar asam fitat, pengujian kadar asam fitat pada sampel, dan analisis secara statistik dari data yang diperoleh.

Pembuatan kurva standar asam fitat diawali dengan menyiapkan larutan standar natrium fitat dengan beberapa konsentrasi yaitu 5, 15, 25, 35, 45, 100, 200, dan 300 ppm dari pengenceran larutan stok natrium fitat. Selanjutnya disiapkan reagen Wade yang dibuat dari campuran padatan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak $\pm 0,03$ g dan asam sulfosalisilat sebanyak $\pm 0,3$ g. Kemudian dilakukan homogenisasi dan

Adzra Zahra Ziva, 2023

PENGARUH PERKECAMBAHAN GELAP DAN TERANG TERHADAP KANDUNGAN ANTI NUTRISI ASAM FITAT KECAMBAH KACANG KOMAK (*Lablab purpureus*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

ditandabatkan hingga 100 mL menggunakan akuades. Adapun perhitungan pembuatan larutan standar natrium fitat dan reagen Wade dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

Larutan standar natrium fitat kemudian dipipet 3 mL dan ditambahkan 1 mL reagen Wade. Sedangkan blanko hanya terdiri dari 3 mL akuades yang ditambahkan 1 mL reagen Wade. Blanko dan larutan standar yang telah direaksikan dengan reagen Wade divortex selama 5 detik dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm dimulai dari blanko dan larutan standar dari konsentrasi terkecil hingga terbesar. Hasil data absorbansi kemudian dibuat kurva standar menggunakan Microsoft Excel untuk memperoleh persamaan regresi $y = ax + b$ yang dibutuhkan untuk menghitung kadar asam fitat pada sampel. Konsentrasi asam fitat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi asam fitat pada sampel (ppm)} = \frac{\text{Absorbansi} - \text{intersep}}{\text{gradien}}$$

Metode pengukuran kadar asam fitat yang digunakan pada penelitian ini adalah metode reagen Wade yang telah dilakukan peneliti sebelumnya (Latta & Eskin, 1980). Ekstrak sampel dipipet sebanyak 3 mL dan dilakukan 2 kali pengulangan (duplo). Kedalam tabung sentrifugasi yang berisi ekstrak sampel kemudian ditambahkan 1 mL reagen Wade dan disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Kemudian pengukuran absorbansi untuk menentukan kadar asam fitat dilakukan pada panjang gelombang 500 nm.

3.4.5 Analisis Secara Statistik

Data yang diperoleh dalam dua kali pengulangan pada pengukuran kadar asam fitat sampel kemudian dianalisis secara statistik dengan ANOVA satu jalur dan dinyatakan sebagai rata-rata dengan standar deviasi. Perbedaan antara rata-rata dipisahkan oleh Duncan's Multiple Range Test menggunakan Program Statistik SPSS IBM Versi 26. Perbedaan signifikan dinyatakan pada tingkat 5%.