

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan dimulai dari bulan Maret hingga Juli 2024 dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut.

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan perkecambahan (*germinasi*), fermentasi, dan uji sifat keasaman.
- 2) Laboratorium PT. Saraswanti Indo Genetech untuk melakukan pengujian kandungan proksimat sampel.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini untuk proses perkecambahan, antara lain alat *germinator* lengkap dengan *timer*, *power supply* 24V/3A, *heating mat* 12V, *mist maker* DC 12V, *temperature control* DC, *probe*, *tray* plastik, *mini fan* 3V, dan toples. Untuk tahap fermentasi tempe menggunakan alat wadah plastik, lilin, kantong plastik ukuran 14x25 cm (AA), dan panci listrik (Advance). Untuk tahap inkubasi digunakan alat inkubator *Lab. Incubator Digisystem Inst.Lab*. Tahap pengeringan dan penggilingan sampel menggunakan oven (B-One), *chopper* (DA-282), dan ayakan ukuran 80 mesh. Kemudian alat-alat lain, seperti alat gelas (gelas kimia 250 ml dan 500 ml, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 100 ml, pipet, labu ukur 100 ml, corong kaca pendek, kaca arloji, batang pengaduk, labu Erlenmeyer 100 ml, pinset), spatula, aluminium foil, kertas saring, dan neraca analitik *Mettler Toledo*, pH meter *Mettler Toledo*, dan buret.

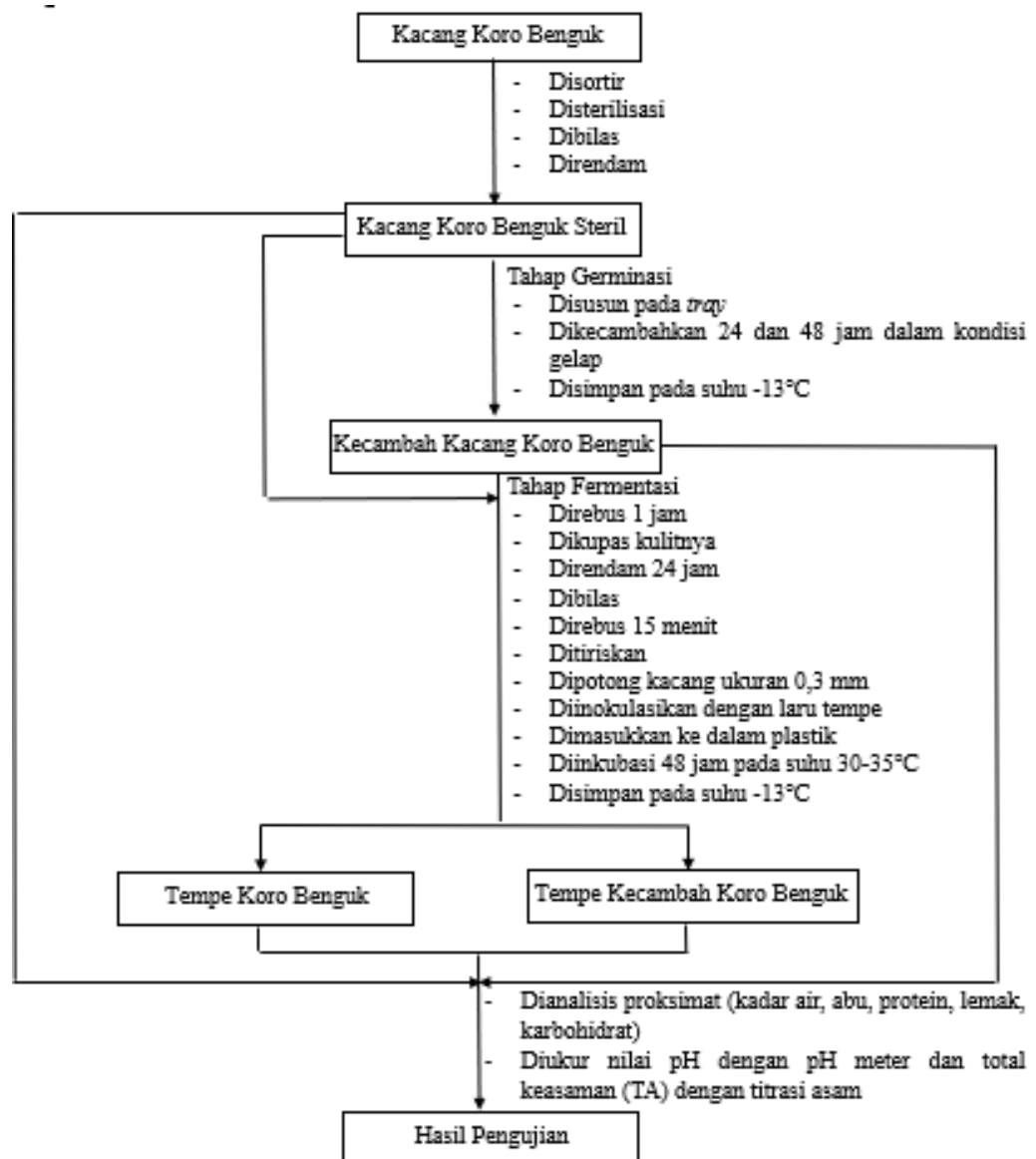
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kacang

korobenguk (*Mucuna pruriens*) yang berasal dari Kabupaten Wonosobo. Bahan lainnya, seperti aquades, padatan NaOH (pro-analysis), larutan natrium hipoklorit 1% (Bayclin), dan ragi tempe berisi jamur *Rhizopus oligosporus* yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi Indonesia.

3.3 Bagan Alir

Pada **Gambar 3.1** memperlihatkan bagan alir penelitian yang terdiri dari tahap sterilisasi, germinasi, fermentasi, dan pengujian proksimat, serta pengukuran nilai pH dan nilai total keasaman (TA)



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Proses Perkecambahan

Proses perkecambahan (germinasi) pada penelitian ini menggunakan alat yang disebut *germinator* skala laboratorium yang dioptimasi dan dimodifikasi (Aisyah et al., 2015). Adapun faktor kontrol pada alat ini berupa kelembapan yang diatur dengan waktu nyala *mist maker* dan kipas dengan menggunakan mikrotimer setiap 2 jam sekali selama 2 menit. Posisi *mist maker* berada di dalam wadah berisi air yang akan mengkonversi air menjadi kabut air, sedangkan kipas berfungsi untuk mendistribusikan kabut air ke seluruh area perkecambahan. Kontrol suhu dijaga oleh *heating mat* pada 25-28°C disertai dengan termostat yang berada di bawah alat. Kontrol intensitas cahaya dilakukan melalui box *germinator* yang digunakan berwarna hitam agar tidak ada cahaya yang masuk dari luar. Alat germinator dapat dilihat pada **Gambar 3.2**. Sebelum menggunakan alat *germinator*, perlu dilakukan sterilisasi dengan cara menyemprotkan larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 0,07% dan alkohol 70% dalam box, kemudian disinari lampu UV selama 15 menit.



Gambar 3.2 Alat Germinator

Langkah awal proses germinasi dilakukan proses sterilisasi kacang koro benguk yang merujuk pada penelitian (Aisyah et al., 2013). Proses sterilisasi dilakukan melalui perendaman sampel menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% sebanyak 500ml/100g kacang selama 1 jam. Selanjutnya, sampel dibilas menggunakan aquades sebanyak empat kali dan direndam menggunakan aquades selama 24 jam sebanyak

500ml/100g kacang dalam keadaan gelap. Kacang yang telah direndam, kemudian dibilas kembali menggunakan aquades dan disusun di atas *tray* plastik yang telah dilapisi *cheese cloth*. *Tray* plastik kemudian dimasukkan ke dalam alat germinator steril dan diatur nyala *mist maker* selama 2 menit setiap 2 jam sekali, serta suhu dijaga pada 25-28°C. Proses germinasi dilakukan selama 24 dan 48 jam hingga diperoleh kecambah koro benguk.

Pada penelitian ini sampel kacang koro benguk diberi perlakuan berbeda, yaitu kacang koro benguk steril atau kacang yang tidak dikecambahkan dan tidak difermentasi (G_0F_0) sebagai kontrol, kacang koro benguk yang dikecambahkan 24 jam ($G_{24}F_0$) dan 48 jam ($G_{48}F_0$), tetapi tidak difermentasi, kacang koro benguk yang tidak dikecambahkan dan difermentasi 48 jam (G_0F_{48}), kacang koro benguk yang dikecambahkan 24 jam ($G_{24}F_{48}$) dan 48 jam ($G_{48}F_{48}$), kemudian difermentasi 48 jam. Perbedaan perlakuan kacang koro benguk tersebut dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Perbedaan Perlakuan Kacang Koro Benguk

Kode Sampel	Tahapan		
	Sterilisasi	Germinasi	Fermentasi
G_0F_0	√	-	-
$G_{24}F_0$	√	√	-
$G_{48}F_0$	√	√	-
G_0F_{48}	√	-	√
$G_{24}F_{48}$	√	√	√
$G_{48}F_{48}$	√	√	√

3.4.2 Tahap Proses Fermentasi

Proses fermentasi pembuatan tempe kacang koro benguk dilakukan pada kacang yang tidak digerminasi maupun yang digerminasi. Proses fermentasi dilakukan berdasarkan penelitian (Astawan et al., 2023) dengan sedikit modifikasi. Sampel kacang koro benguk direbus

selama 1 jam dengan aquades untuk membantu melepaskan kulit (Noviakorniyati et al., 2017). Selanjutnya, kacang ditiriskandan dikupas kulitnya pada bagian testa. Selanjutnya, perendaman dilakukan selama 24 jam dengan aquades. Kemudian, perebusan kembali dilakukan selama 15 menit. Setelah itu, proses penirisan dilakukan. Kacang kemudian dipotong dengan ukuran 0,3 mm dan diinokulasikan dengan laru tempe sebanyak 0,2 gram/100 gram kacang secara merata dan dimasukkan ke dalam plastik berukuran 14x12 cm dengan ujung plastik yang direkatkan menggunakan lilin. Kemudian, plastik dilubangi dengan jarak antar lubang sekitar 1 cm. Selanjutnya, kacang diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator dengan suhu sekitar 30-35°C. Sampel tempe kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang diberi label dan disimpan di lemari es suhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$.

3.4.3 Tahap Uji Analisis Proksimat

3.4.3.1 Kadar Air

Sampel padatan ditimbang 2 gram pada cawan yang telah diketahui beratnya. Sampel kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 95-100°C selama 5 jam. Setelah itu, sampel didinginkan dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang. Prosedur diulangi hingga bobot tetap diperoleh. Metode ini dilakukan berdasarkan (Badan Standardisasi Nasional, 2015). Perhitungan:

$$\text{Kadar air} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = bobot cawan kosong (gram)

W_1 = bobot cawan dan sampel sebelum dikeringkan (gram)

W_2 = bobot cawan dan sampel setelah dikeringkan (gram)

3.4.3.2 Kadar Abu

Sampel ditimbang sekitar 2-3 gram dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya. Kemudian, sampel diarsangkan di atas

pembakar dan diabukan dalam tanur listrik suhu 550°C sampai pengabuan sempurna (± 4 jam). Saat proses pengabuan, pintu tanur listrik sesekali sedikit dibuka agar oksigen dapat masuk. Sampel kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Metode ini dilakukan berdasarkan (Badan Standardisasi Nasional, 1992a).

Perhitungan:

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W = bobot cuplikan sebelum diabukan (gram)

W₁ = bobot cuplikan + cawan setelah diabukan (gram)

W₂ = bobot cawan kosong (gram)

3.4.3.3 Lemak Total

Menurut (Genetech, 2013b) pengujian lemak total dilakukan menggunakan metode hidrolisis Weibull. Sampel ditimbang sebanyak 1-2 gram dan dimasukkan ke dalam gelas piala berisi 20 ml air dan 30 ml HCl 25%. Sampel kemudian dipanaskan 15 menit dan disaring dalam keadaan panas. Selanjutnya, sampel dicuci hingga tidak bereaksi dengan asam. Endapan dan kertas saring dipanaskan dalam oven dengan suhu 100-105°C. Selanjutnya, ekstraksi lemak dilakukan menggunakan pelarut heksana selama 2-3 jam pada suhu 80°C. Ekstrak lemak kemudian dikeringkan pada suhu 100-105°C dan didinginkan dalam desikator yang selanjutnya sampel ditimbang. Proses pengeringan diulangi hingga massa sampel tetap.

Perhitungan:

$$\text{Kadar lemak} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W = bobot sampel (gram)

W₁ = bobot labu lemak setelah ekstraksi (gram)

W₂ = bobot labu lemak sebelum ekstraksi (gram)

3.4.3.4 Protein

Menurut (Genetech, 2013a), pengujian protein dilakukan menggunakan metode Kjeldahl. Sampel ditimbang 1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung Kjeldahl berisi 1 gram campuran selenium dan 12 ml H₂SO₄ pekat. Kemudian, campuran didestruksi pada suhu 420°C selama 2 jam dan didinginkan. Campuran hasil destruksi dilakukan destilasi dengan 50 ml NaOH 40% selama 1 jam yang selanjutnya hasil destilat ditampung dalam asam borat. Selanjutnya, destilat dititrasi dengan HCl 0,2 N yang sebelumnya telah ditambahkan dengan indikator metil merah 1% sebanyak 3 tetes.

Perhitungan:

$$\text{Kadar Protein (\%)} = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 1,4007 \times f_k}{m}$$

Keterangan:

V_s = volume HCl yang digunakan saat titrasi sampel

V_b = volume HCl yang digunakan saat titrasi blanko

N = normalitas HCl

m = massa sampel (gram)

f_k = faktor konversi

2.4.3.5 Karbohidrat

Menurut (Genetech, 2013c), penetapan karbohidrat dilakukan melalui pengurangan total jumlah contoh dengan persentase kadar air, kadar abu, lemak, dan protein.

Perhitungan:

$$\text{Karbohidrat (\%)} = 100\% - (\% \text{ kadar abu} + \% \text{ kadar air} + \% \text{ protein} + \% \text{ lemak})$$

$$\text{Energi (kkal)} = (\% \text{ lemak} \times 9 \text{ kkal}) + (\% \text{ protein} \times 4 \text{ kkal}) + (\% \text{ karbohidrat} \times 4 \text{ kkal})$$

3.4.4 Tahap Pengeringan dan Penghalusan Sampel

Pengeringan dan penghalusan sampel dilakukan berdasarkan metode penelitian (Nabilla, 2023). Sampel dikeringkan terlebih dahulu menggunakan oven (B-One) dengan suhu 50°C selama 18 jam. Sampel

kemudian dihaluskan menggunakan *chopper* (DA-282) dan diayak menggunakan saringan berukuran 80 mesh hingga diperoleh sampel bubuk.

3.4.5 Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan berdasarkan metode penelitian (Angulo-Bejarano et al., 2008) dengan sedikit modifikasi. Sampel bubuk ditimbang sebanyak 2 gram dan dilarutkan dalam 20 ml air mendidih. Setelah dingin, larutan sampel dikocok menggunakan *shaker* (Multi Shaker MMS, EYELA Tokyo Rikakikai, LTD) pada 1500 rpm selama 20 menit. Larutan sampel kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian diukur pH menggunakan pH meter (Mettler Toledo). Sebelum pengukuran pH pada sampel, pH meter terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan larutan buffer 4, 7, dan 10.

3.4.6 Titratable Acidity

Prosedur *titratable acidity* (TA) dilakukan berdasarkan metode penelitian (Hassanein et al., 2015) dengan sedikit modifikasi. Analisis *titratable acidity* dilakukan menggunakan titrasi asam-basa. Sampel bubuk ditimbang sebanyak 2,5 gram dan dilarutkan dengan 50 ml aquades. Larutan sampel kemudian disaring dan diambil bagian filtratnya. Filtrat kemudian diambil 10 ml dan ditambah 10 tetes indikator fenolftalein. Setelah itu, filtrat dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga warna larutan berubah menjadi agak merah jambu.

Nilai TA dituliskan sebagai massa ekuivalen asam laktat/100 g menggunakan persamaan berikut.

$$\text{massa ekuivalen asam laktat/100 g} = \frac{V \text{ NaOH (ml)} \times N \text{ NaOH} \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right) \times Mr \text{ asam laktat} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times 100}{\text{massa sampel (g)} \times 1000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{L}}\right)}$$

3.4.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran diolah menggunakan Microsoft Excel 2016 dan IBM SPSS Statistics 22.0. Data yang disajikan dinyatakan sebagai rata-rata dan standar deviasi. Pengaruh perlakuan

terhadap variabel dievaluasi menggunakan One-way ANOVA dan uji lanjutan Duncan untuk memisahkan perbedaan nilai secara signifikansi ($P < 0,05$).