

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret hingga Agustus dengan tempat kegiatan berada di Gedung B Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan tahapan germinasi, fermentasi, pengeringan sampel kacang dan tempe, penyerbukan sampel kacang dan tempe. Sedangkan pengukuran asam fitat dan asam sianida dengan spektrofometri UV-Vis dilakukan di Gedung B Laboratorium Riset Kimia Makanan FPMIPA UPI dan sebagian dilakukan di Gedung A Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI.

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

##### **3.2.1 Alat**

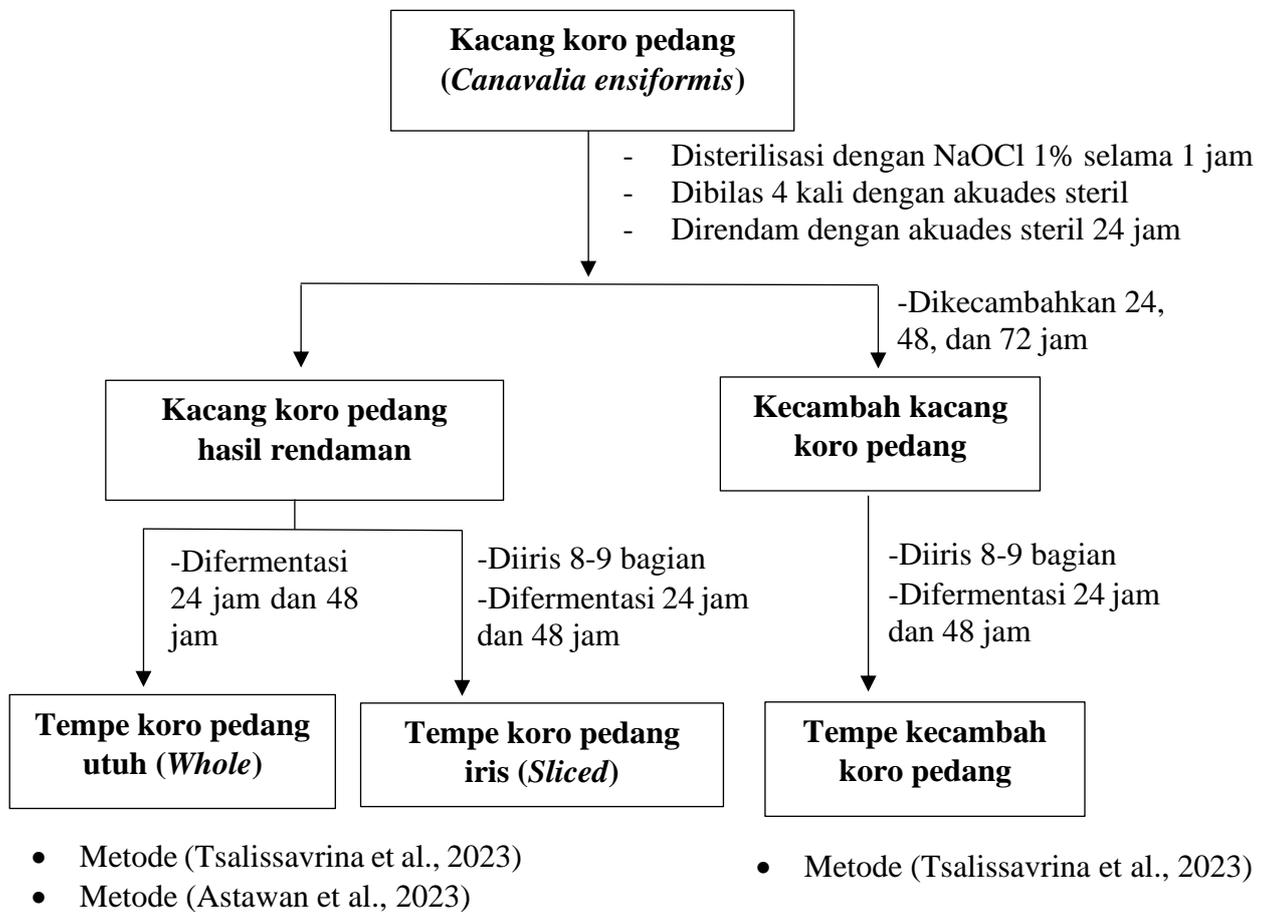
Pada penelitian ini dalam proses germinasi digunakan alat yang disebut germinator, spesifikasi alat meliputi power supply 24V/3A, *mist maker* DC 12V, mini fan 3V, *probe*, *temperature control DC*, *timer*, toples, dan *tray* plastik. Sedangkan untuk proses sterilisasi digunakan alat autoklaf (B-One). Alat yang digunakan dalam proses pembuatan tempe yaitu serangkaian alat memasak dengan panci listrik (GM Bear) berkapasitas 1,2 L dan daya 225-450 W, kantong plastik berukuran 16x5 cm (Cap LABA-LABA), serta lilin. Tahap inkubasi digunakan inkubator dengan sistem suhu otomatis. Tahap pengeringan sampel digunakan *aluminium foil tray* dan oven (B-One). Tahap pembubukan sampel digunakan *chopper* (Health Power Mix DA-282) dan saringan berukuran 80 mesh. Tahap ekstraksi sampel serta pengukuran kadar asam fitat menggunakan alat vorteks (Vortex Mixer VM-2500), *shaker* (EYELA Multi Shaker MMS), pipet volumetrik 1 mL dan 5 mL, alat sentrifus (KOKUSAN), tabung sentrifus 15 dan 50 mL (NEST), pipet ukur 25 mL, kertas saring, batang pengaduk, spektrofotometer UV-

Vis Shimadzu (tipe UV mini 1240), kuvet, dan tissue. Pada tahap ekstraksi sampel serta pengukuran kadar asam sianida digunakan labu Erlenmeyer 50 mL, *plastic wrap*, kertas Whatman nomor nomor 1, dan inkubator air (EYELA Water Incubator). Alat lain yang digunakan secara umum yaitu neraca analitik (Mettler Toledo ME204), spatula, kertas saring, batang pengaduk, gelas ukur 50 mL, pipet tetes, tabung reaksi, labu ukur 10 mL, 100 mL, dan 250 mL, *chiller* (GEA *chiller* dari Kin-Cool) pada 7°C dan *freezer* (GEA *freezer* dari Kin-Cool) pada -13°C, inkubator (Digisystem Lab. Incubator), gelas kimia berukuran 50 mL, 100 mL, serta 250 mL.

### 3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan adalah kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) yang didapatkan secara komersil melalui *e-commerce*. Sampel berasal dari Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah. Bahan lainnya yaitu akuades, biang kapang dengan jamur jenis *Rhizopus oligosporus* merek Raprima yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi Indonesia (AFI), natrium hipoklorit 1% dan 0,07% (Bayclin), akuades (LKFA FPMIPA UPI), kain saring keju (*cheesecloth*), alkohol 70% (*grade* teknis), asam klorida 2,4% (*grade* PA), asam klorida 1 N (Merck *grade* PA), NaCl (*grade* teknis), natrium fitat (Biosynth *grade* PA), FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (*grade* PA), asam sulfosalisilat (Sigma-Aldrich *grade* PA), asam pikrat (Merck *grade* PA), natrium karbonat (Merck *grade* PA), dan KCN (Merck *grade* PA).

### 3.3 Tahap Optimasi Metode



Gambar 3. 1 Bagan alir tahap optimasi metode

### 3.4 Prosedur Optimasi

Optimasi dilakukan dengan percobaan pada dua metode yaitu metode oleh (Tsalissavrina et al., 2023) dan metode oleh (Astawan et al., 2023). Adapun penjelasan lebih lanjut adalah sebagai berikut.

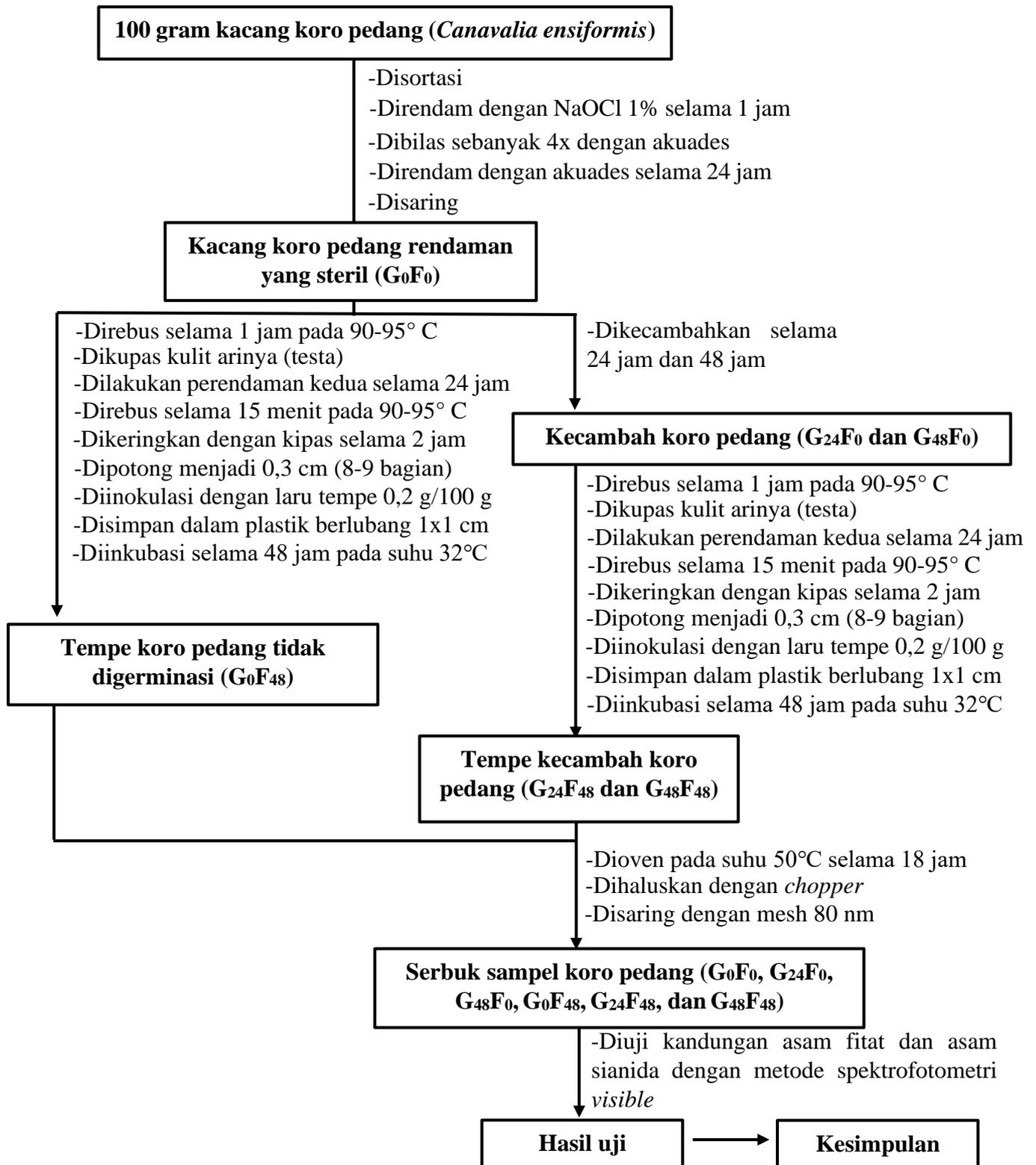
#### a. Optimasi Metode oleh (Tsalissavrina et al., 2023)

Langkah pertama yaitu kacang dan kecambah kacang (24 jam, 48 jam, dan 72 jam perkecambahan) yang sudah dipanen (100 g) dikupas secara manual dari kulit biji kotiledonnya. Setelah itu, kacang dan kecambah kacang dicuci bersih dengan air mengalir. Langkah selanjutnya adalah merebus kacang dan kecambah kacang sudah dicuci bersih selama 30 menit pada suhu 100°C lalu ditiriskan. Selanjutnya kacang diberi perlakuan yaitu digunakan kacang yang utuh dan diiris. Sedangkan pada kecambah diiris menjadi 8-9 bagian, dan diinokulasi dengan 0,05 g ragi untuk setiap 100 g kacang dan kecambah kacang yang masak. Kacang dan kecambah kacang ini kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik PP yang diberi lubang dengan jarak 2 x 2 cm. Setelah itu, kacang dan kecambah kacang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

#### b. Optimasi Metode oleh (Astawan et al., 2023)

Kacang direbus pada suhu 90-95 °C selama 1 jam dengan perbandingan (b/v) kacang:air 1:10, lalu tiriskan. Kacang kemudian dikupas kulit luarnya (testa). Perendaman kedua dilakukan pada kacang yang sudah tanpa kulit, dengan perbandingan (b/v) 1:5 selama 24 jam. Setelah perendaman kedua, kacang direbus selama 15 menit, ditiriskan, dan didinginkan pada suhu kamar. Lalu kacang diberi perlakuan utuh dan diiris. Proses inokulasi dilakukan dengan menginokulasikan *starter* Raprima® pada kacang dengan takaran *starter* 0,2 g per 100 g kacang kemudian dicampurkan dengan *starter* secara merata. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik polipropilen berlubang 1x1 cm. Proses ini dilakukan dengan waktu fermentasi yaitu 24 jam dan 48 jam.

### 3.5 Tahap Penelitian



Gambar 3. 2 Bagan alir penelitian

### **3.6 Prosedur Penelitian**

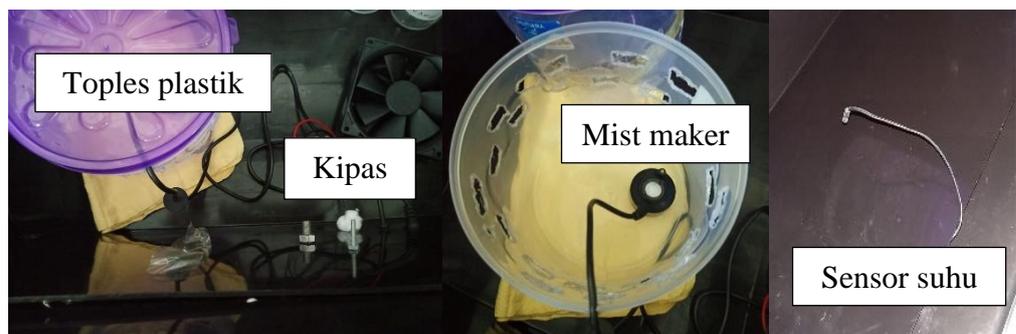
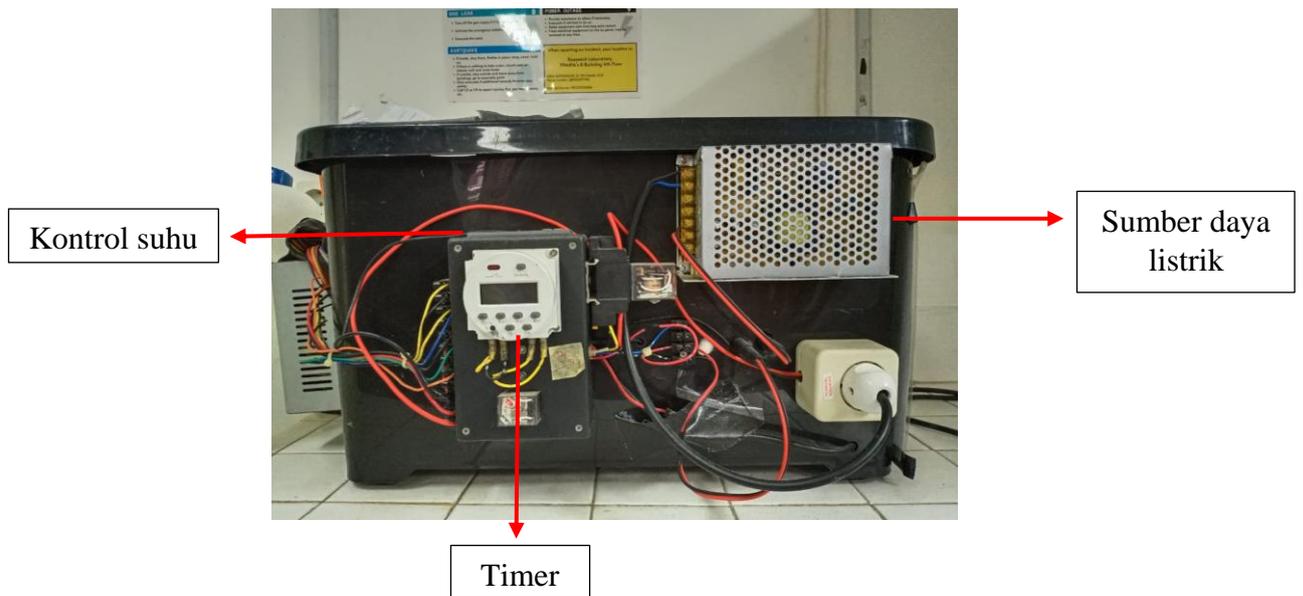
#### **3.6.1 Tahap Sortir Sampel**

Sampel kacang koro pedang ini dilakukan sortasi dengan memperhatikan keadaan kacang. Biji kacang koro pedang yang baik diharapkan bentuk bijinya tampak besar, secara vertikal tampak panjang, dan pipih seperti pedang. Warna permukaan bijinya putih dengan sedikit kekuningan serta aroma alaminya sedikit langu. Pada permukaan biji juga diharapkan tidak ada lubang atau tanda-tanda biji busuk. Sampel kacang koro pedang yang telah dilakukan sortasi tersebut lalu disimpan di dalam wadah rapat dan disimpan di tempat yang kering.

#### **3.6.2 Tahap Germinasi**

Proses germinasi dibantu dengan alat yang disebut *seed germinator*. Sebelum digunakan *seed germinator* (Gambar 3.3) ini perlu disterilkan terlebih dahulu dengan cara menyemprotkan NaOCl 0,07% dikeringkan dengan tissue, lalu disemprot dengan alkohol 70% pada sela-sela bagian dalam alat dan dibiarkan hingga kering, selanjutnya disinari cahaya UV selama 15 menit dalam keadaan rapat (Aisyah et al., 2013). Pada tahap germinasi ini juga mengadopsi metode dari (Aisyah et al., 2013). *Seed germinator* ini berguna untuk membantu proses perkecambahan berbagai jenis benih di laboratorium. Mesin ini dirancang khusus sebagai ruang pertumbuhan yang menciptakan lingkungan buatan menggunakan suhu dan kelembapan mendukung perkecambahan benih. Proses germinasi lebih optimal apabila dilakukan dalam keadaan yang gelap dibandingkan dengan terang dan kelembapan yang ideal yang dibutuhkan sebesar 99% (Delouche & Bass, 1954; Ti et al., 2014). Untuk menjaga kelembapan maka digunakan mikrotimer untuk mengatur *mist maker* yang merupakan bagian alat untuk membuat embun dan juga kipas kecil pada *seed germinator*. Pada alat ini kelembapan udara dikendalikan oleh *mist maker* dan ventilator yang menyuplai kelembapan (Lachman et al., 2014). *Mist maker* diatur untuk aktif setiap 2 jam sekali selama 2 menit. Cara kerja *mist maker* ini yaitu dengan mengubah air menjadi uap air yang terlihat seperti kabut. Uap tersebut yang memberi kelembapan pada ruang *seed germinator*. Selain *mist maker* bagian pendukung kelembapan lainnya adalah kipas kecil, alat ini berguna untuk

menyebarkan kabut ke setiap sudut *germinator* sehingga perkecambahan dapat maksimal. Sedangkan untuk kontrol suhu terdapat bagian alat yang bernama *temperature control*, bagian tersebut menyambung pada sensor suhu yang berfungsi untuk menjaga suhu dalam *seed germinator* konsisten pada 25-27°C. Alat *seed germinator* dirancang di dalam kotak plastik berwarna gelap sehingga cahaya dari luar dapat dibatasi dan sampel dapat secara efektif dikecambahkan dalam keadaan relatif gelap.



Gambar 3. 3 *Seed germinator*

Untuk memulai percobaan germinasi maka sebelumnya perlu dilakukan sterilisasi kacang, metode yang diadopsi adalah metode sebelumnya yang telah diterapkan oleh (Aisyah et al., 2013) dengan modifikasi. Sampel yang digunakan

adalah kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*), kacang direndam selama 1 jam dengan larutan NaOCl 1% sebanyak 5L/kg dengan tujuan untuk mensterilisasi kacang. Larutan natrium hipoklorit (NaOCl) digunakan untuk menginduksi perkecambahan biji (MIYOSHI & MII, 1995). NaOCl 1%, merupakan bahan pensteril yang sering digunakan untuk meningkatkan perkecambahan benih tanaman terrestrial (Bae et al., 2013), larutan natrium hipoklorit ini umum digunakan untuk sterilisasi benih, memiliki efek stimulasi terhadap perkecambahan benih, menghentikan dormansi benih, pertumbuhan bibit, pengurangan salinitas, pertumbuhan bibit in vitro dan regenerasi tunas, serta pengendalian pada patogen (Akbari et al., 2012). Lalu sampel kacang koro pedang dibilas sebanyak empat kali dengan akuades yang telah disterilisasi dengan autoklaf (pada 120°C selama 1 jam). Setelah itu dilakukan proses perendaman (*soaking*) dengan akuades sebanyak 5L/kg. Proses ini merupakan salah satu upaya detoksifikasi. Oleh karena itu, proses perendaman *C. ensiformis* mempunyai potensi yang besar untuk mengurangi kandungan senyawa antinutrisi.

Pada penelitian ini sampel kacang koro pedang diberikan perlakuan yang berbeda, terdapat perlakuan kacang koro pedang yang hanya disterilisasi dan direndam (G<sub>0</sub>F<sub>0</sub>), kacang koro pedang steril yang direndam dan digerminasi 24 jam (G<sub>24</sub>F<sub>0</sub>), kacang koro pedang steril yang direndam dan digerminasi 48 jam (G<sub>48</sub>F<sub>0</sub>), kacang koro pedang steril yang direndam dan difermentasi 48 jam (G<sub>0</sub>F<sub>48</sub>), kacang koro pedang steril yang direndam, digerminasi 24 jam, dan difermentasi selama 48 jam (G<sub>24</sub>F<sub>48</sub>), kacang koro pedang steril yang direndam, digerminasi 48 jam, dan difermentasi 48 jam (G<sub>48</sub>F<sub>48</sub>). Sampel G<sub>24</sub>F<sub>0</sub>, G<sub>48</sub>F<sub>0</sub>, serta sebagian sampel G<sub>0</sub>F<sub>0</sub> akan ditempatkan di dalam tabung sentrifus, sampel diberi label dan disimpan di dalam lemari bersuhu -13°C. Lalu sisa dari sampel G<sub>24</sub>F<sub>0</sub>, G<sub>24</sub>F<sub>0</sub>, dan G<sub>0</sub>F<sub>0</sub> akan berlanjut ke tahap fermentasi selama 48 jam (Tabel 3.1).

Tabel 3. 1 Perlakuan pada percobaan sampel kacang koro pedang

Kode Sampel	Tahapan			
	Sterilisasi	Perendaman	Germinasi	Fermentasi
G <sub>0</sub> F <sub>0</sub> dengan kulit	✓	-	-	-
G <sub>0</sub> F <sub>0</sub> tanpa kulit (kontrol)	✓	✓	-	-
G <sub>24</sub> F <sub>0</sub>	✓	✓	✓	-
G <sub>48</sub> F <sub>0</sub>	✓	✓	✓	-
G <sub>0</sub> F <sub>48</sub>	✓	✓	-	✓
G <sub>24</sub> F <sub>48</sub>	✓	✓	✓	✓
G <sub>48</sub> F <sub>48</sub>	✓	✓	✓	✓

Keterangan:

Tanda – adalah perlakuan yang tidak dilakukan.

Tanda ✓ adalah perlakuan yang dilakukan.

### 3.6.3 Tahap Fermentasi

Tahap fermentasi ini mengadopsi metode dari (Astawan et al., 2023) dengan modifikasi. Kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) yang digerminasi lalu difermentasi dengan cara direbus selama 60 menit, tujuannya yaitu untuk melunakkan kacang, meningkatkan proses fermentasi, meningkatkan rasa, serta mengurangi bau langu dari kacang koro pedang dengan mematikan enzim. Kacang yang sudah direbus lalu ditiriskan dan dilakukan perendaman untuk kedua kalinya akan tetapi sebelum direndam kacang perlu dikupas bagian lapisan luar kulit yang tipis dan avaskuler (kulit ari/testa), hal tersebut dilakukan agar kacang menyerap air lebih efektif selama perendaman dan mengurangi risiko kontaminasi dari patogen atau kotoran yang mungkin menempel pada kulit luar kacang, serta mempermudah distribusi ragi dengan baik sehingga mendapat akses untuk dapat tumbuh pada permukaan kacang koro pedang. Dilakukan perendaman kedua selama 24 jam berguna dalam membantu menghilangkan sisa-sisa senyawa antinutrisi atau bahan-bahan lain yang mungkin masih menempel pada kacang

setelah perebusan dan pengupasan kulit. Lalu dilanjutkan dengan perebusan kembali selama 15 menit, tujuannya yaitu untuk mematikan enzim penyebab bau langu dan rasa getir pada kacang, perebusan kembali juga membuat kacang menjadi lebih lunak. Tahap selanjutnya adalah penirisan. Tahap ini sangat penting, dipastikan agar kacang koro pedang ini dalam keadaan yang kering karena kadar air pada kacang akan memengaruhi proses fermentasi, apabila terlalu basah maka produk akan mudah untuk busuk, hal tersebut disebabkan karena tingginya kadar air yang juga menyebabkan aktivitas air yang tinggi. Apabila aktivitas air tinggi maka akan memicu mikroorganisme yang tak diinginkan untuk dapat tumbuh dan merusak tempe. Kemudian kacang yang sudah tiris dipotong menjadi 8-9 bagian (0,3 cm) (Tsalissavrina et al., 2023) dan ditaburi biang kapang tempe sebanyak 0,2 gram setiap 100 gram kacang. Keduanya dicampur hingga merata agar proses fermentasi dapat berjalan dengan baik. Setelah tercampur dengan baik maka kacang dimasukkan ke dalam pencetak, digunakan plastik berperforasi (berlubang), jarak lubang antara lain 1x1 cm agar asupan oksigen untuk kapang tetap terpenuhi (Kusumawati et al., 2020; Yanti, 2018). Lubang kecil juga memungkinkan untuk pertumbuhan kapang yang lebih baik karena sirkulasi yang terjaga (Kusumawati et al., 2020). Kacang yang sudah tercetak di dalam kemasan plastik tersebut lalu diinkubasi dengan inkubator laboratorium bersistem otomatis selama 48 jam dengan parameter suhu 32°C. Sampel tempe yang dihasilkan akan diperkecil ukurannya dengan dipotong menjadi 1x1 cm berbentuk dadu dan selanjutnya dihaluskan.

#### **3.6.4 Tahap Pengeringan dan Penyerbukan Sampel**

Sampel G<sub>0</sub>F<sub>0</sub>, G<sub>24</sub>F<sub>0</sub>, G<sub>48</sub>F<sub>0</sub>, G<sub>0</sub>F<sub>48</sub>, G<sub>24</sub>F<sub>48</sub>, dan G<sub>48</sub>F<sub>48</sub> yang telah siap lalu dipotong dadu menjadi 1x1 cm dan ditempatkan di *aluminium foil tray* secara merata serta diberi jarak agar dapat kering dengan sempurna. Pengeringan dengan oven dilakukan pada suhu 50°C selama 18 jam. Setelah sampel kering dengan merata lalu sampel dihaluskan dengan menggunakan *chopper* tipe Health Power Mix DA-282. Kemudian disaring dengan mesh 80 nm, didapatkan sampel kering

berupa serbuk. Sampel serbuk tersebut lalu disegel rapat dan disimpan di dalam *chiller* 7°C untuk dapat digunakan pada pengujian mendatang.

### **3.6.5 Tahap Ekstraksi untuk Pengukuran Asam Fitat**

Pada proses ekstraksi ini dibutuhkan sampel halus yang telah disaring dan berupa serbuk, lalu ditimbang sebanyak 0,5 gram. Disiapkan 10 mL HCl 2,4% lalu dilarutkan sampel ke dalam HCl tersebut. Dihomogenkan dengan cara divorteks. Kemudian dilakukan pengocokan larutan sampel dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam menggunakan *shaker*. Berdasarkan metode oleh (Dwivedi et al., 2015a) dilakukan sentrifugasi yaitu sampel dipipet lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 15 mL, sentrifugasi berjalan selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang terbentuk lalu dipisahkan dari residunya, setelahnya supernatan difiltrasi dengan kertas saring. Sebanyak 7 mL filtrat hasil penyaringan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 15 mL. Untuk meningkatkan kelarutan dan memfasilitasi pemisahan fasa maka ditambahkan 1 gram NaCl ke dalam tabung sentrifus dan divorteks hingga homogen. Setelahnya selama 20 menit larutan sampel dikocok pada kecepatan 200 rpm menggunakan *shaker*. Kemudian sampel disimpan di dalam pendingin (*chiller*) bersuhu 4°C selama 1 jam. Kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 3000 rpm sel selama 20 menit dan didapatkan hasil berupa supernatan selanjutnya supernatan dipipet 1 mL lalu diencerkan sebanyak 25 kali dalam labu ukur 25 mL dengan akuades sebanyak 24 mL lalu dihomogenkan. Kemudian untuk proses analisis selanjutnya maka ekstrak sampel yang telah encer tersebut disimpan di dalam lemari es bersuhu  $\pm -13^{\circ}\text{C}$  (Gao et al., 2013).

### **3.6.6 Tahap Pengukuran Asam Fitat**

Pada tahap pengukuran asam fitat dengan metode spektrofotometer *visible* ini terbagi menjadi empat langkah yaitu preparasi reagen Wade, ekstraksi sampel, pembuatan kurva kalibrasi dengan lima titik konsentrasi, dan pengukuran sampel. Spektrofotometri yang digunakan merupakan tipe UV-mini 1240 merek Shimadzu, tipe ini mudah digunakan dan kontrol intuitifnya baik.

Metode yang digunakan dalam penentuan asam fitat ini adalah metode Wade (Dwivedi et al., 2015b). Lalu reagen Wade dipreparasi dengan cara mencampurkan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  bubuk sebanyak 0,0300 gram dan asam sulfosalisilat sebanyak 0,3000 gram, keduanya dilarutkan di dalam 100 mL akuades (larutan 0,03%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  yang mengandung 0,3% asam sulfosalisilat dalam air) (Dwivedi et al., 2015b).

Pada tahap ekstraksi sampel ini langkah pertamanya yaitu ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram lalu dilarutkan pada HCl 2,4% sebanyak 10 mL. Selanjutnya divorteks dan dikocok dengan *shaker* pada 2000 rpm selama 60 menit. Setelah itu disentrifugasi selama 20 menit pada 3000 rpm dan dihasilkan dua lapisan yaitu supernatan dan residu. Supernatan dipisahkan dari residu dengan cara difiltrasi menggunakan kertas saring dan hasilnya dipipet sebanyak 7 mL lalu ditambahkan NaCl 1 gram. Kemudian divorteks dan dikocok dengan *shaker* selama 20 menit pada 2000 rpm. Lalu didiamkan pada suhu 4°C dan diencerkan 25 kali dengan akuades.

Pada tahap pembuatan kurva kalibrasi maka dilakukan pembuatan larutan stok natrium fitat sebesar 500 ppm. Di dalam labu ukur 25 mL dibuat larutan stok 300 ppm dan di dalam labu ukur 50 mL dibuat larutan stok natrium fitat 100 ppm, keduanya hasil dari pengenceran larutan stok dengan konsentrasi 500 ppm tersebut. Lalu dipipet larutan stok natrium fitat 100 ppm dengan jumlah sesuai dengan perhitungan untuk dibuat standar 20 dan 80 ppm.

Untuk tahap pengukuran dengan metode spektrofotometri *visible* dipipet 3 mL dari masing-masing larutan standar asam fitat dengan konsentrasi 20, 80, 100, 300, dan 500 ppm serta ekstrak sampel  $G_0F_0$ ,  $G_{24}F_0$ ,  $G_{48}F_0$ ,  $G_0F_{48}$ ,  $G_{24}F_{48}$ ,  $G_{48}F_{48}$  yang akan diuji. Lalu larutan standar dan sampel yang sudah dipipet tersebut dimasukkan masing-masing ke tabung sentrifus 15 mL. Setelahnya dicampurkan larutan standar asam fitat dan sampel tersebut dengan reagen Wade sebanyak 1 mL. Untuk blanko dipipet akuades sebanyak 3 mL yang ditambah dengan 1 mL reagen

Wade, tabung sentrifus dilengkapi dengan label agar tidak menimbulkan kekeliruan dalam identifikasi sampel. Untuk perhitungan larutan standar tersebut tercantum pada **Lampiran 1**. Selanjutnya setelah siap maka semua larutan standar, sampel, dan blanko tersebut divorteks selama 5 detik agar homogen dan disentrifigasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Lalu dilakukan pengukuran dengan spektrofotometri Shimadzu UV-mini 1240 dengan  $\lambda = 500$  nm. Data absorbansi yang didapatkan lalu diolah menjadi kurva kalibrasi dan didapatkan persamaan garis linear dengan formulasi  $y = bx + a$ . Pengukuran asam fitat ini dilakukan secara duplo. Konsentrasi asam fitat dihitung berdasarkan perbedaan nilai serapan pada 500 nm sampel ekstrak dan kontrol (Dwivedi et al., 2015b), hasil absorbansi dari ekstrak sampel ini dimasukkan pada nilai  $y$  rumus  $y = bx + a$ , dimana  $y$  merupakan variabel untuk absorbansi,  $a$  adalah intersep,  $b$  adalah gradien, serta  $x$  adalah konsentrasi (Ilahi et al., 2021). Hasil perhitungan ini dinyatakan sebagai asam fitat dalam satuan ppm. Adapun rumus untuk perhitungan tersebut adalah berikut.

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

Konsentrasi dalam satuan ppm (*part per million*) tersebut lalu diubah menjadi mg/100 g, lalu didapatkan kadar dalam satuan mg/100 g dan dihitung pula persentase penurunan asam fitat dari setiap kode sampel terhadap kontrol. Adapun rumus perhitungan untuk % penurunan asam fitat adalah sebagai berikut.

$$\% \text{ Penurunan asam fitat} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$

### 3.6.7 Tahap Pengukuran Asam Sianida

Pada tahap pengukuran asam sianida dengan metode spektrofotometri *visible* ini terbagi menjadi empat langkah yaitu preparasi reagen alkali pikrat, ekstraksi sampel, pembuatan kurva kalibrasi dengan enam titik konsentrasi, dan pengukuran sampel.

Analisis kandungan asam sianida pada kacang koro pedang ini menggunakan metode alkali pikrat (Onwuka, 2005). Langkah pertama yaitu

mempersiapkan reagen alkali pikrat dengan mencampurkan larutan asam pikrat 1% dalam 250 mL dan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% dalam 250 mL (1 : 5). Selanjutnya dilakukan ekstraksi sampel, sebanyak 5 gram sampel yang ditumbuk halus dilarutkan dalam 50 mL akuades dalam labu berbentuk kerucut yang tertutup rapat dan dibiarkan semalaman untuk ekstraksi sianida yang tepat. Ekstrak disaring melalui kertas saring Whatman nomor 1. Ke dalam 1 ml ekstrak ditambahkan 4 mL larutan alkali pikrat dan diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 15 menit untuk pengembangan warna. Absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Mini 1240) pada 490 nm terhadap blanko reagen yang mengandung 1 mL akuades dan 4 mL larutan alkali pikrat yang disiapkan pada waktu yang sama. Konsentrasi sianida dari sampel diekstrapolasi dari kurva standar.

Untuk pembuatan kurva standar digunakan kalium sianida murni (KCN) sebagai standar dalam penentuan ini. Disediakan larutan standar dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 150, dan 200 ppm dan ke setiap konsentrasi ditambahkan 25 ml HCl 1 N dalam labu Erlenmeyer 500 mL. Tepat 1 mL dari masing-masing larutan standar dan 1 mL akuades (blanko) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan selanjutnya ditambahkan 4 mL larutan alkali pikrat. Campuran diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 15 menit untuk mengembangkan warna dan serapan standar dengan blanko yang dibaca pada  $\lambda = 490$  nm (S. Akande et al., 2017).

Hasil yang diperoleh diplot ke dalam grafik sebagai kurva standar. Pada kurva kalibrasi standar kalium sianida (KCN) terdapat garis tebal berwarna biru yang melambangkan serapan (Abs) sedangkan garis biru putus-putus merupakan plot linier. Persamaan grafiknya diwakilkan oleh  $y = bx + a$ , terdapat pula R<sup>2</sup> yang merupakan garis regresi (S. Akande et al., 2017).

### **3.6.8 Pengolahan dan Analisis Data secara Statistik**

Hasil dari pengukuran asam fitat dengan menggunakan metode spektrofotometri *visible* menghasilkan data absorbansi yang lalu diolah dengan program Excel dari Microsoft dan juga aplikasi pendukung statistik seperti SPSS.

Data yang diolah dengan aplikasi tersebut lalu dilaporkan sebagai rata-rata dan standar deviasi atau penyimpangan. Digunakan program SPSS IBM versi 29 dengan metode *one-way* ANOVA untuk mengevaluasi perbedaan variabel. Dilakukan pula *Duncan's Multiple Range Test* untuk memisahkan perbedaan rata-rata dengan perbedaan tingkat signifikansi pada 5% atau ( $P < 0,05$ ).