

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 5 bulan pada bulan Maret sampai dengan Juli 2024 dengan tempat dan serangkaian kegiatan sebagai berikut ini.

- a. Laboratorium Riset Kimia Makanan dan Material Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan sterilisasi sampel, perkecambahan sampel, pembuatan tempe, preparasi sampel, pengujian pH dan titratable acidity (TA), dan pengujian aktivitas antioksidan.
- b. Laboratorium PT. Saraswanti Indo Genetech untuk melakukan analisis proksimat (kandungan nutrisi) pada sampel.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

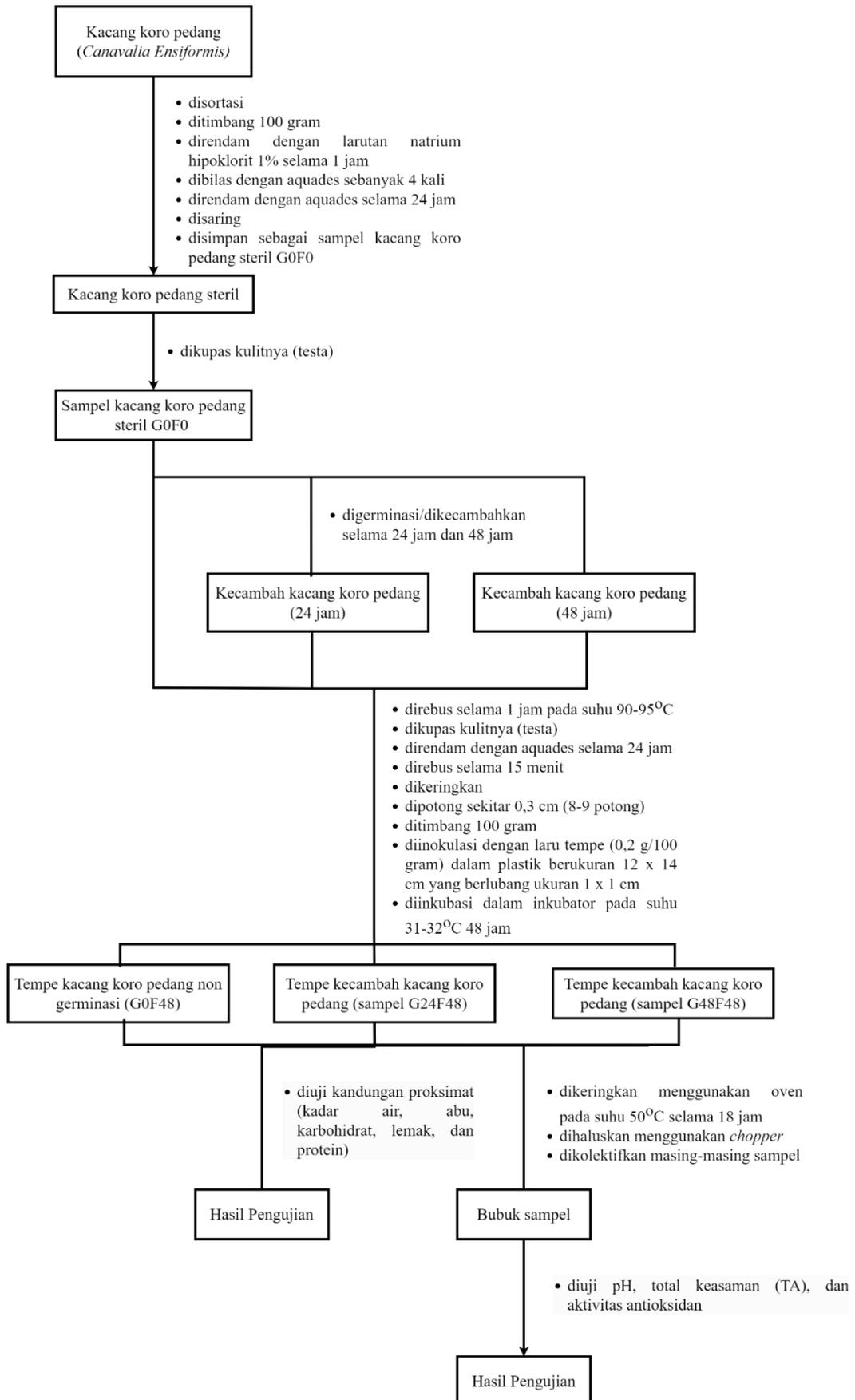
Pada tahap germinasi kacang koro pedang digunakan alat germinator yang telah dilengkapi dengan power supply 24V/3A, timer, temperature control DC, heating mat 12 V, incubator, mist maker DC 12V, mini fan 3V, probe, toples, tray plastik. Untuk keperluan sterilisasi digunakan autoklaft. Tahap pembuatan tempe digunakan panci listrik dengan merek Arashi, wadah plastik, kantong plastik ukuran 12x25 (AA), pisau, tusuk gigi, batang pengaduk, spatula, neraca, dan lilin. Tahap inkubasi digunakan inkubator yang dilengkapi dengan heating mat AC 220V, thermo digital sensor TPM-10. Selanjutnya untuk pengeringan dan penggilingan sampel digunakan oven (*B-One*), eksikator, aluminium foil, penggiling bumbu kering dan ayakan ukuran 80 mesh, inkubator (*Lab. Incubator Digisystem Insta Lab*). Kemudian untuk persiapan sampel maupun analisis digunakan beberapa alat yaitu *chopper* (DA-282) 3D Motion (HEME3D), wadah aluminium foil, labu ukur 50 dan 100 mL, botol coklat 120 mL, botol coklat 12 mL, dan set alat spektrofotometer UV-Vis, pH meter (Mettler Toledo), buret, botol coklat, *shaker* (EYELA LABORATORY MULTISHAKER MODEL: MMS-3000, TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD). Alat lain seperti neraca analitik, freezer, gelas kimia berukuran 300-400 mL, batang pengaduk,

spatula, labu ukur 250 mL, gelas ukur 50 dan 100 mL, pipet tetes dan pinset, cawan porselen.

3.2.2 Bahan

Kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) yang berasal dari Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah, akuades, laru tempe raprima yang mengandung jamur *Rhizopus Oligosporus* yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi Indonesia, cheese cloth, larutan HCl 25%, larutan hipoklorit (NaOCl) 1 % (v/v) (bayclin), metanol 99,8% (*pro-analysis*), padatan NaOH (*pro-analysis*), larutan fenoftalein, dan DPPH (TCI Japan).

3.3 Tahapan Penelitian



3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap sortir sampel

Kacang koro pedang yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini berasal dari Kabupaten Kulon Progo, Yogyakarta. Kacang koro pedang disortasi berdasarkan bentuk fisiknya dengan memilih kacang koro pedang yang bulat pipih, putih, dan tidak berlubang.

3.4.2 Tahap Proses Germinasi

Germinasi dilakukan dalam alat germinator skala laboratorium yang dibuat dan dioptimasi mengikuti penelitian yang dilakukan oleh (Aisyah et al., 2015) dengan modifikasi. Faktor yang dikontrol dalam mesin perkecambahan ini adalah kelembaban, suhu, dan intensitas cahaya. Kontrol kelembaban diatur dengan mengatur waktu nyala humidifier dan kipas pada alat germinasi dengan mikrotimer setiap 2 jam dengan durasi 2 menit. Hal tersebut dikarenakan kacang koro pedang memiliki kulit ari yang cukup tebal sehingga dibutuhkan kelembapan yang cukup untuk mendorong pertumbuhan kecambah. Humidifier yang terdapat di dalam wadah air akan mengubah air menjadi kabut air. Selama humidifier menyala, sebuah kipas yang ada di dalam alat bekerja mendistribusikan kabut air ke seluruh area alat germinasi. Suhu dalam alat (25-30°C) dijaga oleh heat mat (Hyindoor 12 V) disertai termostat yang diletakkan di bawah alat. Sensor termometer dipasangkan di dalam alat germinasi untuk mengetahui suhu dan kelembaban selama waktu perkecambahan. Untuk menjaga sampel dari cahaya digunakan box germinator berwarna hitam agar tidak ada cahaya yang masuk dari luar. Sebelum digunakan, alat germinasi disterilisasi dengan larutan hipoklorit (NaOCl) 1 % (v/v) dan alkohol 70% melalui penyemprotan ke seluruh bagian alat lalu didiamkan selama 15 menit (Ghoribatulloh, 2018), bilas dengan aquades kemudian alat disinari menggunakan lampu UV selama 15 menit. Berikut di bawah ini merupakan gambar set alat germinator.



Gambar 3.1. Set Alat Germinator

Langkah awal yang dilakukan pada proses perkecambahan adalah sterilisasi kacang, metode sterilisasi yang digunakan merujuk pada penelitian sebelumnya oleh Aisyah et al., 2013 dengan sedikit modifikasi. Sampel kacang koro pedang disterilisasi dengan merendam sampel di dalam larutan natrium hipoklorit 1% sebanyak 5 L/kg kacang koro pedang selama 1 jam. Tujuan digunakannya natrium hipoklorit adalah untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan dan merangsang pertumbuhan kecambah (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 koro selama 24 jam pada ruang tanpa cahaya. Kacang yang telah direndam kemudian akan disusun di atas tray yang telah dilapisi *cheese cloth*.

Pada penelitian ini, sampel kacang koro pedang yang telah disterilisasi dilakukan germinasi selama 24 dan 48 jam sebelum proses fermentasi menggunakan laru tempe *Rhizopus Oligosporus* menjadi produk tempe yaitu pada sampel G24F48 dan 48F48.. Sampel kacang koro yang tidak dilakukan germinasi terlebih dahulu akan langsung diproses fermentasi menggunakan laru tempe pada pembuatan tempe kacang koro pedang tanpa melalui germinasi (sampel G0F48). Proses fermentasi kacang koro dan kecambah kacang koro dilakukan selama 48 jam.

Tabel 3 1. Kode dan Perlakuan Sampel

KODE SAMPEL	PERLAKUAN			
	Sterilisasi	Perendaman	Germinasi	Fermentasi
G0F0	✓	✓	-	-
G0F48	✓	✓	-	✓
G24F48	✓	✓	✓	✓
G48F48	✓	✓	✓	✓

3.4.3 Tahap Fermentasi Tempe

Pada tahap fermentasi ini, metode dan langkah kerja yang digunakan bersumber dari penelitian yang dilakukan oleh Astawan et al., 2023 dengan beberapa modifikasi dari metode Tsallisavrina et al., 2023. Pada tahap pertama, sampel yang sudah disterilisasi, direndam, dan dikecambahkan dilakukan perebusan selama 1 jam pada suhu 90-95°C dengan perbandingan (b/v) kacang dengan air 1:10 dan dilakukan penyaringan. Setelah dilakukan perebusan, kacang diepaskan kulitnya (testa) sampai benar-benar bersih dengan tujuan untuk memisahkan kulit dengan biji kacangnya. Selanjutnya dilakukan perendaman kembali selama 24 jam pada biji kacang tanpa kulit dengan rasio (b/v) kacang dengan air 1:5 pada suhu ruang. Perendaman selama 24 jam pada kacang tanpa kulit, termasuk pada tahap fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat dengan tujuan untuk mengurangi pH pada kacang koro pedang agar mencapai 4,5-5,0 yang diindikasikan sebagai pH optimum pada pertumbuhan starter tempe (ragi tempe) (Astawan et al., 2023).

Pada tahap selanjutnya, dilakukan perebusan Kembali selama 15 menit dan dilakukan penyaringan. Kacang yang telah direbus dan disaring, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Kacang telah didinginkan kemudian dipotong-potong terlebih dahulu menjadi 8-9 (0,3 cm) seperti metode yang dilakukan oleh Tsallisavrina et al., 2023 dan Permadi et al.,

2023. Selanjutnya, pada tahap inokulasi kacang yang telah dipotong-potong dicampurkan menggunakan laru tempe Raprima dengan perbandingan 0,2g/100gram kacang. Pencampuran dilakukan dengan cara disebar dan dicampurkan secara merata. Kemudian, kacang yang telah diinokulasi menggunakan laru tempe dikemas di dalam plastik dan dilubangi dengan jarak antar lubang 1x1 cm. Selanjutnya, dilakukan tahap inkubasi menggunakan inkubator pada rentang suhu 31-32°C selama 48 jam. Sampel tempe yang telah diperoleh diberi label dan disimpan dalam lemari es dengan suhu \pm -13°C sampai proses pengujian akan dilakukan.

3.4.4 Tahap Analisis Proksimat

Pada tahap analisis proksimat ini, dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar nutrisi yang terkandung dalam sampel seperti karbohidrat, protein, lemak, abu, dan air. Analisis proksimat ini dilakukan di Laboratorium PT. Saraswanti Genetech Indo.

3.4.4.1 Kadar Air

Pada pengujian kadar air terhadap sampel tempe berdasarkan ketentuan Badan Standardisasi Nasional tahun 1992, sampel tempe ditimbang sebanyak 1-2 gram pada botol timbang bertutup yang sudah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Setelahnya didinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Langkah pengeringan diulangi hingga diperoleh bobot tetap yang kemudian dihitung dengan rumus matematis sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{w}{w_1} \times 100\%$$

keterangan:

w = bobot sampel sebelum dikeringkan (gram)

w₁ = bobot sampel setelah dikeringkan (gram)

3.4.4.2 Kadar Abu

Penentuan kadar abu pada penelitian ini menggunakan metode berdasarkan Badan Standardisasi Nasional tahun 1992. Sampel ditimbang dengan seksama 2-3 gr dalam sebuah cawan porselen (atau platina) yang telah diketahui bobotnya. Sampel kemudian diarangkan di atas nyala pembakar

dan diabukan dalam tanur listrik pada suhu 550°C sampai pengabuan sempurna (sekali-kali pintu tanur listrik dibuka sedikit, agar oksigen bisa masuk). Didinginkan dalam eksikator, lalu timbang sampai bobot tetap.

Rencana perhitungan:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{w} \times 100\%$$

keterangan:

w = bobot sampel sebelum diabukan (gram)

w₁ = bobot sampel + cawan setelah diabukan (gram)

w₂ = bobot cawan kosong (gram)

3.4.4.3 Lemak Total

Pengujian lemak total dilakukan menurut (Genetech, 2013) menggunakan metode hidrolisis weibull. Sebanyak 1-2 gram sampel ditimbang dan dimasukkan kedalam piala gelas yang telah ditambah air sebanyak 20 ml dan 30 ml HCl 25%, kemudian dipanaskan selama 15 menit. Selanjutnya, larutan disaring dalam keadaan panas dan dicuci hingga tidak bereaksi dengan asam lagi. Kertas saring berserta endapan dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105°C. Ekstraksi lemak menggunakan pelarut heksana selama 2-3 jam pada suhu 80°C, dikeringkan ekstrak lemak pada suhu 100-105°C. Kemudian ekstrak didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Diulangi pengeringan hingga memperoleh bobot tetap.

Rencana perhitungan:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \times 100\%$$

keterangan:

w = bobot sampel sebelum dikeringkan (gram)

w₁ = bobot labu lemak setelah ekstraksi (gram)

w₂ = bobot labu lemak sebelum ekstraksi (gram)

3.4.4.4 Protein

Pengujian protein dilakukan menurut (Genetech, 2013) menggunakan metode kjedahl dengan alat Kjeltex Buchi K-466 dan K-355. Sampel ditimbang 1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung Kjeltex Buchi yang telah ditambahkan 1 gram campuran selenium serta 12 ml H₂SO₄ pekat. Selanjutnya, campuran didestruksi pada suhu 420°C selama 2 jam lalu

didinginkan. Larutan hasil destruksi didestilasi 50 ml NaOH 40% selama 1 jam dan destilat ditampung dalam asam borat. Destilat dititiasi menggunakan HCl 0,2 N. Sebelumnya larutan ditambahkan indikator PP 1% sebanyak 3 tetes. Rencana perhitungan:

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(v_s - v_b) \times N \times 1,4007 \times f_k}{m}$$

keterangan:

v_s = volume sampel

v_b = volume blanko

N = normalitas peniter

m = massa sampel (gram)

f_k = faktor konversi (6,25)

3.4.4.5 Karbohidrat

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

Rencana perhitungan:

Kadar karbohidrat (%) = 100% - (% Abu + % Air + % Protein + % Lemak)

Energi (kkal) = (% lemak x 9 kkal) + (% protein x 4kkal) + (% karbohidrat x 4 kkal)

3.4.5 Tahap Analisis pH

Pada tahap analisis dan pengukuran pH sampel kacang dan tempe koro pedang menggunakan metode berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Angulo-Bejarano et al., (2008). Pengujian nilai pH sampel diukur menggunakan pH meter (Mettler Toledo FiveEasy Benchtop F20 pH/mV Meter). Sampel bubuk kacang dan tempe (2 gram) disuspensikan dengan 20 mL akuades mendidih. Setelah pendinginan, suspensi dilakukan pengocokan menggunakan orbital shaker (EYELA LABORATORY MULTISHAKER MODEL: MMS-3000, TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD) dengan kecepatan 200 rpm selama 3 jam 45 menit. Setelah dilakukan pengocokan, diukur suspensi dengan pH meter dengan mencelupkan batang elektroda ke dalam suspensi.

3.4.6 Tahap Analisis Titratable Acidity (TA)

Analisis dan pengukuran titratable acidity (TA) dilakukan untuk menentukan total keasaman atau kadar asam laktat yang terkandung dalam sampel tempe kecambah. Pengukuran kadar asam ini dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Hassanein et al., 2015 Campuran sampel bubuk kacang dan tempe koro pedang (2,5 gram) yang dilarutkan dalam 50 mL aquades disaring dan diambil filtratnya sebanyak 10 mL. Kemudian filtrat tersebut ditambahkan 10 tetes indikator fenolftalein dan dititrasi dengan larutan standar NaOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Total keasaman dari hasil titrasi diperoleh sebagai massa ekuivalen asam laktat (g)/100 g menggunakan persamaan berikut.

Massa ekuivalen asam laktat (g)/100g

$$= \frac{V \text{ NaOH (mL)} \times N \text{ NaOH (mol/L)} \times \text{MW asam laktat (g/mol)} \times 100}{\text{massa sampel (g)} \times \text{valensi asam laktat} \times 1000 \text{ (mL/L)}}$$

3.4.7 Analisis Aktivitas Antioksidan

Pada pengujian aktivitas antioksidan sampel, dilakukan berdasarkan modifikasi metode dari Astawan et al., 2023 dan Tsalissavrina et al., 2022. Langkah pertama diawali dengan pembuatan ekstrak sampel dengan melarutkan sampel bubuk tempe sebanyak 1 gram dengan metanol 95%. Kemudian larutan sampel divorteks selama 2 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4oC selama 30 menit. Setelah itu, disaring untuk diambil ekstraknya. Ekstrak sampel kemudian diambil sebanyak 0,1 mL dan dicampurkan dengan 5 mL larutan DPPH 40 ppm. Campuran ekstrak sampel dengan DPPH divorteks hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap. Campuran sampel diukur absorbansi nya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Untuk pengukuran blanko dilakukan dengan mengganti larutan sampel dengan metanol. Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dalam %Aktivitas antioksidan dengan persamaan berikut.

$$\%AA = \frac{Abs \text{ kontrol} - Abs \text{ sampel}}{Abs \text{ kontrol}} \times 100\%$$

3.4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil dua kali pengulangan pada pengukuran kadar proksimat, pH, total keasaman, dan aktivitas antioksidan sampel dianalisis secara statistik dengan metode ANOVA satu jalur dan dinyatakan sebagai rata-rata dan standar deviasi. Perbedaan antara rata-rata dipisahkan dengan uji Duncan menggunakan program IBM SPSS Statistics Versi 26 dengan perbedaan signifikansi dinyatakan pada 5%.