

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga Juli bertempat di Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan sterilisasi, germinasi, fermentasi, pengeringan sampel kacang dan tempe, penyerbukan sampel kacang dan tempe, penentuan kandungan protein terlarut, dan titrasi. Sedangkan analisis kadar protein total dan kandungan asam amino dilakukan di Laboratorium PT. Saraswanti Indo Genetech, dan analisis SDS-Page dilakukan di Laboratorium BRIN.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Pada penelitian ini, untuk proses perkecambahan menggunakan alat *germinator* yang dilengkapi dengan power supply 24V/3A, timer, temperature control DC, mist maker DC 12V, mini fan 3V, probe, toples, dan nampan plastik. Tahap fermentasi tempe menggunakan panci, wadah plastik, kantong plastik ukuran 14x27, dan lilin. Tahap inkubasi menggunakan inkubator yang dilengkapi dengan *heating mat* AC 220V (Nomoy), *thermo digital* sensor TPM-10. Tahap pengeringan dan penggilingan sampel menggunakan Memmert universal oven (Jerman), tray, *chopper* (Health Power Mix DA-282, Korea), dan ayakan ukuran 80 mesh. Kemudian untuk preparasi sampel maupun analisis digunakan beberapa alat, yaitu gelas kimia 10, 100, dan 250 mL (Pyrex), tabung sentrifus 15 mL, alat sentrifus (Kokusan Seiko Co.Ltd., Jepang), mikro pipet ukuran 1000-5000  $\mu$ L (DragonLab, Cina), *white tip* mikropipet 5000  $\mu$ L, *vortex shaker* (Scigolex MX-S, Cina), pH meter (Mettler Toledo, Swiss), set alat UV-Vis (Shimidzu Mini UV-1240, Jepang). Alat-alat lain yang diperlukan yaitu neraca analitik (Mettler Toledo ME204), *freezer* (GEA

freezer Royal-Kincool, Cina), inkubator (B-ONE *Cooling Incubator*, Cina), batang pengaduk, spatula, labu ukur 250 mL, gelas ukur 10 dan 100 mL, tabung reaksi, dan pipet tetes.

### 3.2.2 Bahan

Kacang koro pedang yang berasal dari Kabupaten Ponorogo, Jawa Timur. Akuades, laru tempe Raprima yang mengandung jamur *Rhizopus Oligosporus*, etanol, natrium hipoklorit (Bayclin, Bogor, Indonesia), akuades, *Bovine Serum Albumin* (BSA), reagen follin ciocalteu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Sodium Potasium tartrat, formaldehid, dan Fenolftalein berasal dari Merck (Jerman).

### 3.3 Tahapan Penelitian

Bagan alir tahapan penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1**

### 3.4 Prosedur penelitian

#### 3.4.1 Tahap Sortir Sampel

Sampel kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) berasal dari Kabupaten Ponorogo, Jawa Timur. Kacang koro pedang ini dilakukan sortasi dengan memperhatikan keadaan fisik kacang. Biji kacang koro pedang yang baik diharapkan yaitu 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.



### Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

#### 3.4.2 Tahap Proses Perkecambahan

Proses germinasi dibantu dengan alat yang disebut *seed germinator*. Sebelum digunakan *seed germinator* ini perlu disterilkan terlebih dahulu dengan cara menyemprotkan NaOCl 0,07% dan alcohol 70% pada sela-sela bagian dalam alat dan selanjutnya disinari cahaya UV selama 15 menit. *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, kelembapan, dan cahaya untuk mendukung perkecambahan benih.

Langkah awal proses perkecambahan dilakukan melalui sterilisasi kacang yang merujuk pada penelitian sebelumnya dengan sedikit modifikasi (Aisyah et al., 2013). Sampel kacang koro pedang direndam di dalam larutan natrium hipoklorit 1% sebanyak 5 L/kg sebanyak 1 jam untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan. Kemudian, sampel dibilas 4 kali menggunakan aquades yang telah disterilisasi dan direndam dalam aquades sebanyak 5 L/kg selama 24 jam tanpa cahaya.

Kacang yang sudah disterilisasi kemudian dimasukkan dalam alat germinator sederhana yang sudah disterilisasi sebelumnya. Kacang kemudian disusun di atas tray plastik yang sudah dilapisi *cheesecloth*. Kelembapan dalam germinator akan dikontrol dengan mengatur waktu nyala humidifier dan kipas setiap 2 jam dengan durasi nyala humidifier selama 2 menit. Humidifier yang diletakkan dalam wadah berisi air akan mengubah air menjadi kabut, kemudian kipas akan membantu menyebarkan kabut ke seluruh area germinasi. Hal ini dilakukan untuk memudahkan proses perkecambahan, karena kacang koro pedang memiliki kulit ari yang tebal. Set alat germinator ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.

Pada penelitian ini, sampel kacang koro pedang diberi perlakuan berbeda, yaitu kacang koro pedang yang hanya disterilisasi (G0F0), kacang koro pedang yang difermentasi selama 48 jam dan tidak dikecambahkan

(G0F48), kacang koro pedang yang dikecambahkan 24 jam dan difermentasi 48 jam (G24F48), serta kacang koro pedang yang dikecambahkan 48 jam dan difermentasi 48 jam (G48F48). Berikut Tabel 3.1 yang menunjukkan perbedaan perlakuan kacang koro pedang.



**Gambar 3. 2** Set Alat Germinator

**Tabel 3. 1** Perlakuan pada percobaan sampel koro pedang

| Sampel        | Sterilisasi | Germinasi | Fermentasi |
|---------------|-------------|-----------|------------|
| <b>G0F0</b>   | ✓           | -         | -          |
| <b>G0F48</b>  | ✓           | -         | ✓          |
| <b>G24F48</b> | ✓           | ✓         | ✓          |
| <b>G48F48</b> | ✓           | ✓         | ✓          |

### 3.4.3 Tahap Proses Fermentasi

Proses fermentasi kacang koro pedang dilakukan pada kacang yang tidak digerminasi maupun yang digerminasi. Sampel kacang direbus selama 1 jam yang bertujuan untuk melunakkan kacang. Selanjutnya, kacang ditiriskan dan dikupas kulitnya untuk media pertumbuhan akar kapang ragi tempe di permukaan kacang. Setelah itu direndam dalam aquades selama 24 jam. Kemudian, perebusan kembali dilakukan selama 15 menit untuk melunakkan kacang. Setelah itu, proses penirisan dilakukan. Proses penirisan ini perlu dilakukan sempurna karena akan mempengaruhi kandungan air pada tempe sehingga mudah busuk. Kacang kemudian diberi ragi tempe sebanyak 0,2 gram/100 gram kacang secara merata dan

dimasukkan ke dalam plastik yang dilubangi. Selanjutnya, kacang diinkubasi selama 2 hari dalam inkubator dengan suhu sekitar 31-33°C. Sampel tempe kemudian dipotong dan dimasukkan ke dalam wadah yang diberi label dan disimpan di lemari es suhu  $\pm -13^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.4 Tahap Pembuatan Tepung Tempe

Sebelum proses ekstraksi, sampel tempe dikeringkan terlebih dahulu di dalam oven memmert bersuhu 50°C selama 24 jam. Setelah kering, sampel digiling menggunakan *chopper* dan diayak menggunakan saringan dengan ukuran 80 mesh. Tepung tempe kemudian dimasukkan dalam ziplock dan disimpan di lemari es suhu  $\pm -13^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.5 Analisis Kadar Protein Terlarut

Analisis kadar protein terlarut dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Sampel dipreparasi terlebih dahulu berdasarkan (Novianti et al., 2022) dengan sedikit modifikasi. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian ditambahkan aquades 9 mL dan diaduk, lalu disimpan dalam *chiller* selama 15 menit. Larutan tersebut kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus 15 mL, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Kemudian diambil supernatannya sebanyak 1 ml dan dimasukkan pada tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 ml reagen lowry B dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 ml lowry A dan didiamkan selama 20 menit. Kemudian dilakukan pembacaan pada panjang gelombang 733,4 nm.

#### 3.4.6 Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis dilakukan dengan menggunakan metode Kjeldahl dan titrasi formol berdasarkan (Sitanggang et al., 2020). Pertama dilakukan dahulu metode kjeldahl. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram lalu didestruksi. Hasil destruksi kemudian dimasukkan dalam tabung kjeldahl 300mL pada alat *distillation unit*. Ditambahkan akuades dan larutan NaOH menggunakan alat *distillation unit*. Kemudian, dipasang Erlenmeyer 250

mL yang berisis larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  sebagai tampungan pada alat *distillation unit*. Destilasi hingga volume destilat mencapai minimal 3x volume penampung awal. Destilat kemudian dititrasi dengan larutan HCl hingga titik akhir tercapai. Kemudian dihitung kadar nitrogen dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Nitrogen (\%)} = \frac{(V_p - V_b) \times N \times 1,4007}{W_{\text{spl}}}$$

Keterangan:

$V_p$  = Volume HCl yang diperlukan untuk titrasi sampel (mL)

$V_b$  = Volume HCl yang diperlukan untuk titrasi blanko (mL)

$N$  = Normalitas larutan HCl (N)

$W_{\text{spl}}$  = Bobot sampel (g)

Setelah proses Kjeldahl, kemudian dilakukan tahap titrasi formol. Sampel berupa tepung tempe dilarutkan dengan aquades dengan perbandingan 1:10, kemudian ditambahkan NaOH 0,5 M hingga pH 8.0 dan diaduk selama 2 jam pada suhu  $50^\circ\text{C}$ . Setelah itu 5 mL larutan sampel dan 5 mL reagen formaldehid dimasukkan dalam labu Erlenmeyer. Kemudian ditambahkan indikator PP dan dilakukan titrasi dengan NaOH 0,01M hingga berwarna pink. Kemudian dihitung volume NaOH yang digunakan dengan rumus sebagai berikut:

1. Penentuan kadar amino-nitrogen

$$N_{\text{am}} = V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times 14 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \times 1000 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \times \text{faktor pengenceran}$$

2. Penentuan derajat hidrolisis

$$\text{DH} = \frac{N_{\text{am}}}{\text{TN}} \times 100\%$$

### 3.4.7 Analisis Perubahan Pola Protein

#### 3.4.7.1 Pembuatan Isolat Protein

Pembuatan isolate protein menggunakan metode ekstraksi alkaline berdasarkan (Viana & English, 2022) dengan sedikit modifikasi. Pertama, tepung tempe dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:10 (w/v). Kemudian ditambahkan larutan NaOH 4N hingga pH mencapai 9.5, lalu

diaduk selama 1 jam. Larutan kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 40 menit. Supernatan dipisahkan dari pellet dan disimpan. Pellet dilarutkan dalam aquades dengan perbandingan 1:5 (w/v) dan disentrifugasi kembali pada 4000 rpm selama 30 menit. Supernatant yang didapat kemudian diambil dan dicampurkan dengan supernatan yang sudah dipisahkan sebelumnya. Kemudian, campuran supernatant tersebut ditambahkan HCl 1M hingga pH mencapai 4.5, lalu disentrifugasi kembali dengan 3000 rpm selama 15 menit. Pellet yang terendap kemudian diambil dan dilarutkan menggunakan buffer fosfat.

#### 3.4.7.2 Pembuatan SDS-Page

Penentuan pola protein dilakukan menggunakan SDS PAGE. SDS-PAGE menggunakan separating gel 12% dan stacking gel 4%. Isolat protein diambil sebanyak 25µL dan ditambahkan buffer 5µ. Buffer sampel terdiri dari Tris HCl 0,5 M pH 6,8; gliserol; SDS 10 % (w/v); 0,5% bromophenol blue (w/v) dan akuabides. Sampel dipanaskan pada suhu 100 °C selama 5 menit. Sampel kemudian didinginkan dan disentrifugasi. Larutan sampel kemudian dipipet ke dalam sumur-sumur gel yang telah disiapkan dan terendam dalam buffer elektroforesis. Gel kemudian dialiri arus listrik 150 volt selama kurang lebih 90 menit. Setelah elektroforesis selesai, gel diwarnai dengan dimasukkan dalam larutan *coomassie blue staining* selama 1 jam. Setelah itu, gel dipindahkan dalam larutan destaining. Perendaman dalam larutan destaining ini dilakukan hingga warna biru pita protein pada gel terlihat jelas.

#### 3.4.8 Penentuan Kandungan Asam Amino

Dalam penentuan kandungan asam amino digunakan instrument *acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) H-Class*. Analisis dilakukan pada panjang gelombang 280 nm dengan menggunakan kolom fasa terbalik C18. Fasa gerak terdiri dari Eluen accq. tag ultra dan akuabides pada suhu 49°C dengan sistem pompa gradien dan detektor PDA.



Pertama sampel ditimbang sebanyak 0,1 gram, lalu dihidrolisis menggunakan larutan HCl. Kemudian hasil hidrolisis dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan akuabides. Larutan kemudian disaring dengan *syringe filter* 0,2  $\mu\text{m}$  dan filtratnya ditampung. Kemudian ditambahkan internal standar dan dilanjutkan ke tahap derivatisasi. Larutan diinjeksikan ke dalam sistem UPLC.

#### **3.4.9 Pengolahan dan Analisis Data**

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