

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juli 2025 dengan tempat dan serangkaian kegiatan sebagai berikut:

- a. Laboratorium riset kimia makanan Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan perkecambahan kacang koro benguk, pembuatan tempe, preparasi sampel, ekstraksi lemak menggunakan metode soxhletasi dan penentuan kadar *free fatty acid* (FFA) menggunakan metode titrasi asam basa.
- b. Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (LKI FPMIPA UPI) untuk melakukan analisis jenis asam lemak menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).
- c. Laboratorium PT Saraswanti Indo Genetech untuk melakukan analisis kadar lemak total dalam sampel tempe kacang koro benguk.

3.2. Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

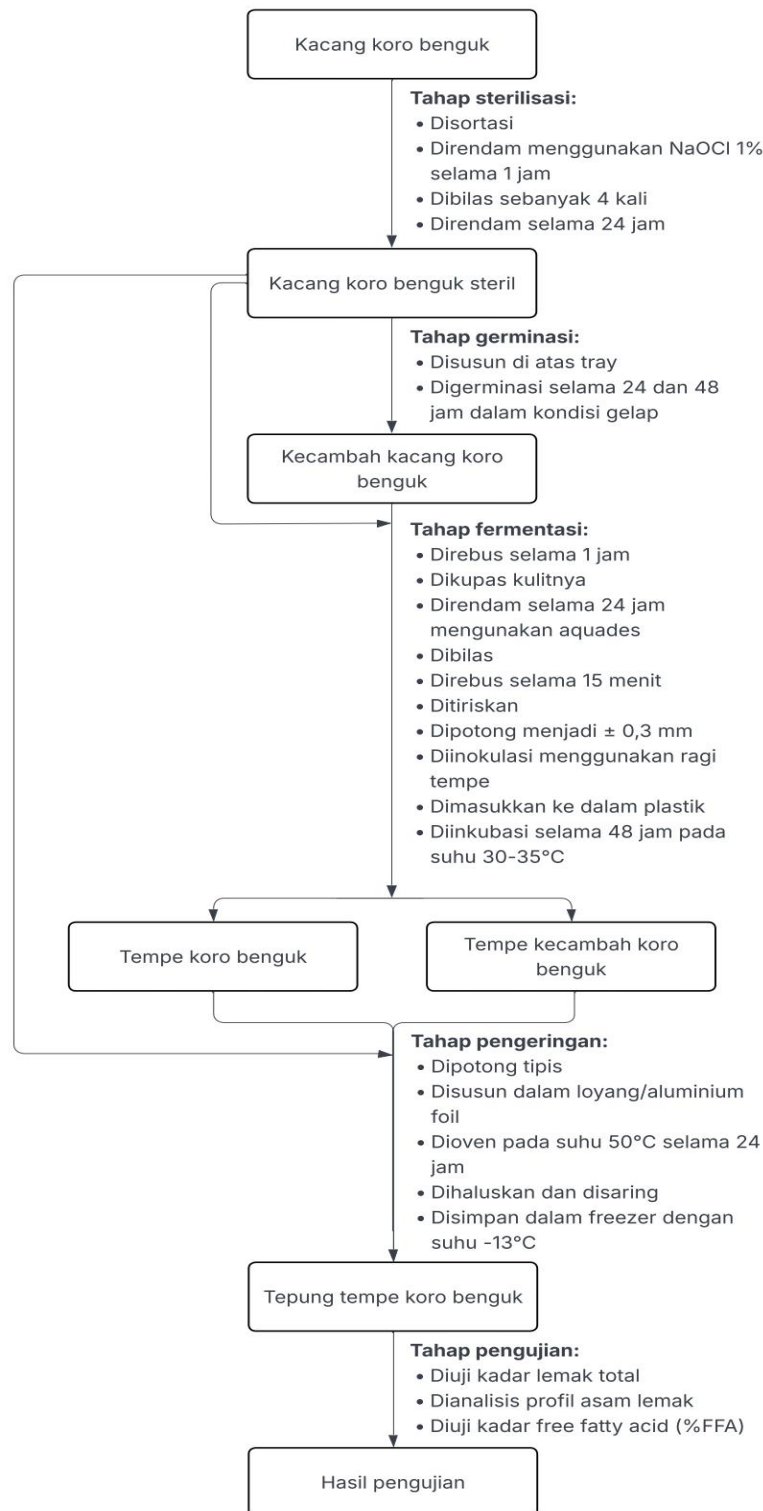
Pada penelitian ini, alat yang digunakan pada proses perkecambahan kacang koro benguk adalah alat *germinator* yang dilengkapi dengan power supply 24V/3A, timer, *temperature control* DC, *mist maker* DC 12V, *mini fan* 3V, *probe*, toples, dan tray plastik. Tahap fermentasi dan pembuatan tepung tempe kacang koro benguk menggunakan kompor *portable*, panci, wadah plastik (*thinwall*), lilin, kantong plastik 14x25 cm (AA), pisau, tusuk gigi,

spatulla, kaca arloji, neraca analitik *Mettler Torado*, loyang berukuran 28x28x2 cm, *freezer* (GEA *freezer* dari Kin-Cool), inkubator *Lab. Incubator Digisystem Inst.Lab*, oven *memmert* (110 volt), *chopper* (Health Power Mix DA-282), saringan dengan ukuran 80 mesh, ziplock berukuran 10x15 cm. Tahap ekstraksi lemak sampel tempe kacang koro benguk alat soxhlet yang terdiri dari *hotplate*, penangas air, labu alas datar, batu didih, *soxhlet extractor*, kondensor, selang, pompa air, statif, klem, botol vial dan pipet mikro. Tahap pengujian jenis asam lemak menggunakan tabung reaksi ulir berukuran 10 mL, *ultrasonic bath* dan instrumen GC-MS (Shimadzu QP2010). Tahap pengujian kandungan asam lemak bebas menggunakan erlenmeyer 250 mL, pipet volume 10 dan 25 mL, pipet tetes, buret 50 mL dan *ball* pipet.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kacang koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) yang diperoleh secara daring dari Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah. Ragi tempe yang mengandung jamur *Rhizopus oligosporus* yang diproduksi oleh PT Aneka Fermentasi Indonesia, aquades (LKFA FPMIPA UPI), n-heksana grade PA (Merck, Jerman), alkohol 70% (teknis), Natrium hipoklorit (NaOCl 5,25%) dari bayclin, etanol grade PA (Merck, Jerman), NaOH grade PA (Merck, Jerman), HCl grade PA (Merck, Jerman), asam oksalat dihidrat ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) grade PA (Merck, Jerman), larutan fenoltalein 1%, larutan BF_3 dalam metanol (20%) (Merck, Jerman), kertas saring, benang kasur, kapas dan *cheese cloth*.

3.3. Bagan Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian

Ida Farida, 2025

PENGARUH GERMINASI DAN FERMENTASI TERHADAP KADAR LEMAK TOTAL, JENIS ASAM LEMAK DAN KADAR ASAM LEMAK BEBAS DALAM KACANG KORO BENGUK (*Mucuna pruriens*)

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

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Sortasi Sampel

Kacang koro benguk disortasi berdasarkan bentuk fisiknya dengan kacang koro benguk yang berkulit putih gading dengan corak coklat kehitaman, berbentuk bulat pipih, tidak berlubang dan bertekstur halus.

3.4.2 Tahap Proses Germinasi

Proses germinasi atau perkecambahan pada penelitian ini menggunakan alat yang disebut dengan *germinator*. Proses germinasi kacang koro benguk dilakukan berdasarkan penelitian Ti et al., (2014) yaitu germinasi pada suasana gelap. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Aisyah et al., (2015) *germinator* yang digunakan dioptimasi dengan beberapa modifikasi pada faktor kontrol yang meliputi kelembaban, suhu dan intensitas cahaya. Kelembaban dalam *germinator* dijaga menggunakan mikrotimer dengan mengatur waktu nyala *mist maker* dan kipas setiap 2 jam sekali selama 2 menit. *Mist maker* diletakkan di dalam wadah berisi air akan mengkonversi air menjadi kabut air, sedangkan kipas dalam *germinator* akan menyala untuk menyebarkan kabut air ke seluruh area *germinator*. Suhu *germinator* dibuat konstan pada suhu 25 °C. Kotak *germinator* dibuat dari box plastik berwarna hitam untuk menjaga sampel dari cahaya luar yang masuk. Alat *germinator* yang akan digunakan perlu disterilisasi terlebih dahulu dengan cara menyemprotkan bagian dalam box menggunakan larutan NaOCl 0,07% dan alkohol 70%, kemudian box disinari lampu UV selama 15 menit. Alat *germinator* yang digunakan dapat dilihat pada gambar 3.2.



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 500 mL/100 g kacang selama 1 jam. Selanjutnya, sampel dibilas menggunakan aquades sebanyak empat kali dan direndam menggunakan aquades selama 24 jam sebanyak 500 mL/100 g 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 °C - 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 (G0F0) sebagai kontrol, kacang koro benguk yang tidak dikecambahkan dan difermentasi 48 jam (G0F48), kacang koro benguk yang dikecambahkan 24 jam (G24F48) dan 48 jam (G48F48) 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
G0F0	√	-	-
G0F48	√	-	√
G24F48	√	√	√
G48F48	√	√	√

3.4.3 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 ditiriskan dan 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 pada suhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$.

3.4.4. Tahap Uji Kadar 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°C - 105°C . Selanjutnya, ekstraksi lemak dilakukan menggunakan pelarut heksana selama 2-3 jam pada suhu 80°C . Ekstrak lemak kemudian dikeringkan pada suhu 100°C - 105°C dan didinginkan dalam desikator yang selanjutnya sampel ditimbang. Proses pengeringan diulangi hingga massa sampel tetap.

Perhitungan:

$$\text{Kadar lemak} = \frac{(w1-w2)}{w} \times 100\%$$

Keterangan:

W = bobot sampel (gram)

W1 = bobot labu lemak setelah ekstraksi (gram)

W2 = bobot labu lemak sebelum ekstraksi (gram)

3.4.5 Tahap Ekstraksi Lemak

Berdasarkan SNI 01-2891-1992 Cara Uji Makanan dan Minuman, ekstraksi lemak dilakukan menggunakan metode ekstraksi langsung dengan alat soxhlet. Sampel tepung tempe ditimbang sebanyak 25-30 gram, masukkan ke dalam selongsong kertas saring yang telah dialasi dengan kapas. Selongsong tersebut dimasukkan ke dalam alat soxhlet dan diekstraksi menggunakan n-

heksana selama ± 6 jam. Sulingkan n-heksana sampai menguap seluruhnya. Ekstrak lemak dimasukkan dalam botol vial tertutup yang sudah diberi label dan disimpan dalam lemari es dengan suhu $\pm -13^{\circ}\text{C}$. Ekstrak lemak ini digunakan untuk analisis uji profil asam lemak menggunakan GC-MS dan uji kadar asam lemak bebas (*free fatty acid*) menggunakan metode titrasi asam basa.

3.4.6 Tahap Analisis Profil Asam Lemak

Pengujian profil asam lemak dilakukan berdasarkan metode penelitian (Wang et al., 2022) dengan beberapa modifikasi. Sampel lemak yang telah diekstraksi dari tepung tempe diesterifikasi terlebih dahulu untuk mengubah lipid menjadi senyawa metil ester asam lemak (FAMEs). Proses esterifikasi dilakukan dengan menambahkan larutan boron trifluoride (BF_3) dalam metanol dengan perbandingan sampel dan BF_3 1:3 (v/v). Campuran tersebut disonikasi menggunakan *ultrasonic bath* pada suhu ruang selama satu jam sampai terbentuk dua fasa. Fasa yang mengandung FAME (fasa atas) diinjeksikan ke dalam instrumen GC-MS sebanyak 0,2 μL . Hasil analisis profil asam lemak disajikan dalam bentuk kromatogram GC-MS.

3.4.7 Tahap Uji Kadar Asam Lemak Bebas (*Free Fatty Acid*)

Menurut (Zou et al., 2018) pengujian kadar asam lemak bebas (*free fatty acid*) dilakukan menggunakan metode titrasi asam basa. Sampel lemak yang akan dianalisis ditimbang sebanyak 0,25 gram menggunakan neraca analitik. Larutkan sampel dengan etanol sebanyak 50 mL. Tambahkan indikator fenolftalein 1% dan titrasi menggunakan NaOH 0,1 N yang telah distandardisasi menggunakan asam oksalat 0,1N. Titrasi dilakukan sampai terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda yang menunjukkan titik akhir titrasi.

Perhitungan:

$$\%FFA = \frac{N \text{ NaOH} \times V \text{ NaOH} \times BM}{1000 \times \text{massa sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

N NaOH = Normalitas NaOH

V NaOH = Volume NaOH

BM = Berat molekul asam lemak dominan

3.5. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran diolah menggunakan Microsoft Excel 2019 dan IBM SPSS Statistics 27. 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 ($P < 0,05$).