

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan, terhitung sejak bulan Februari hingga bulan Agustus 2024 dengan tempat kegiatan berada di Gedung B Laboratorium Riset Kimia Makanan FPMIPA UPI untuk melakukan tahapan sterilisasi, germinasi, preparasi analisis, ekstraksi lemak dan pengujian kandungan asam lemak bebas, dan juga Laboratorium Riset Kimia Material FPMIPA UPI untuk melakukan tahapan fermentasi. Sedangkan pengujian asam lemak dengan menggunakan Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) dilakukan di Gedung A Laboratorium Kimia Instrumen Program Studi Kimia, FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

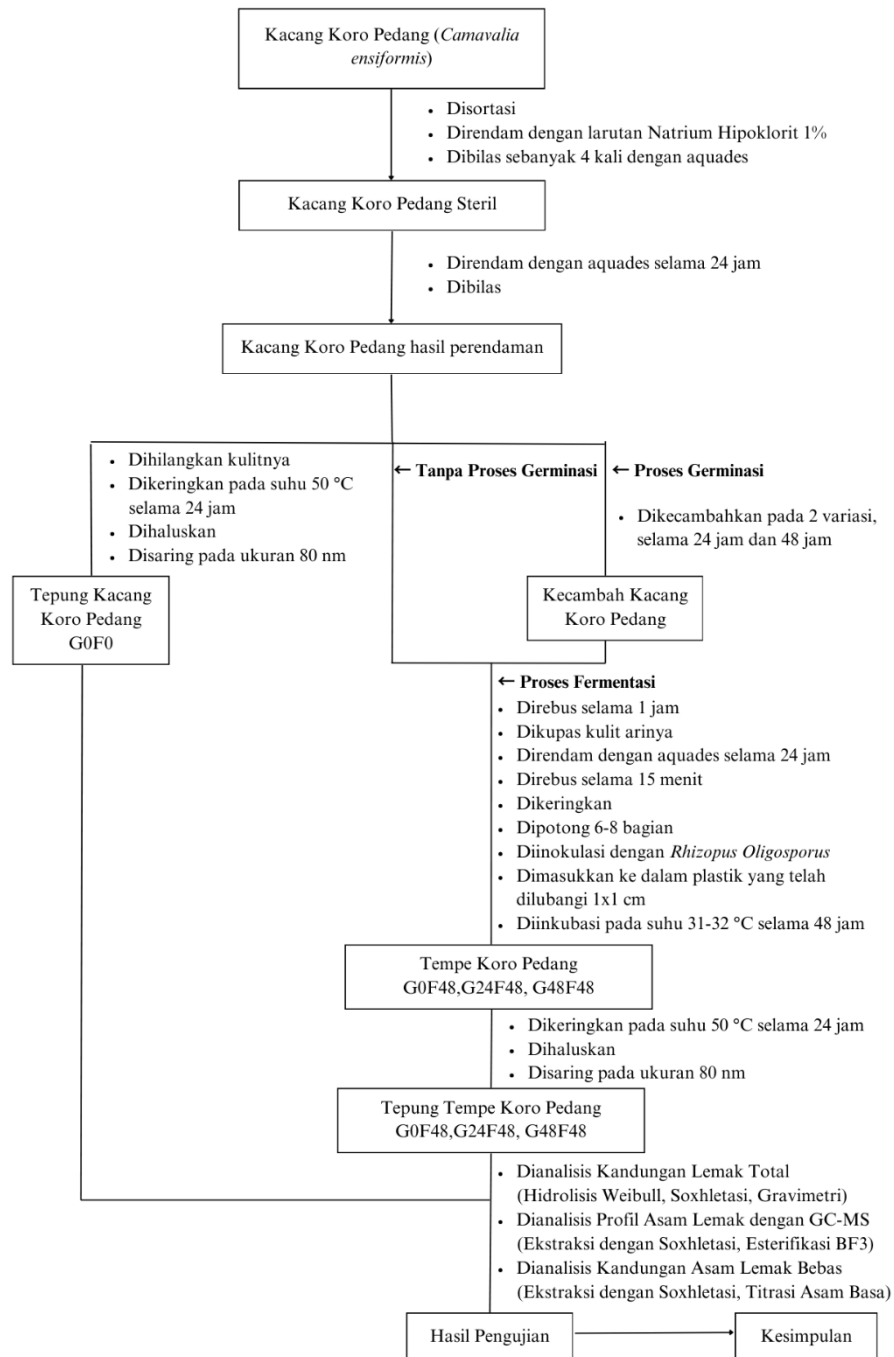
Pada penelitian ini, dalam proses sortasi sampel memerlukan wadah plastik. Untuk keperluan proses sterilisasi digunakan wadah plastik dan lampu UV-C untuk sterilisasi germinator. Pada proses germinasi kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) digunakan alat germinator yang telah dilengkapi dengan *power supply* 24V/3A, *timer*, *incubator*, *mist maker* DC 12V, *mini fan* 3V, toples, *tray* plastik. Tahap pembuatan tempe digunakan kompor gas *portable* (Miyako, Indonesia), panci, wadah plastik, pisau, neraca analitik (Mettler Torado, Swiss), spatula, tusuk gigi, kantong plastik ukuran 15x30 cm (AA), lilin, loyang berukuran 30x25x2 cm, dan *freezer* (GEA *freezer* Kin-Cool, Tiongkok). Tahap inkubasi digunakan inkubator *Lab. Incubator* (Digisystem Inst.Lab, Tiongkok). Selanjutnya tahap preparasi sampel menggunakan oven memmert (110 volt), loyang berukuran 30x25x2 cm, *chopper* (Health Power Mix DA-282, Korea), dan saringan dengan ukuran 80

mesh. Tahap ekstraksi lemak menggunakan kondensor, tabung soxhlet, selang, pompa air, statif, labu dasar bulat, batu didih, penangas air, *hotplate*, botol vial, pipet mikro dan *chiller* (GEA *chiller* Kin-Cool, Tiongkok). Tahap pengujian kadar lemak total menggunakan gelas kimia, corong, desikator, oven (B-One, China), *hot plate* dan *stirrer*. Tahap pengujian kadar lemak menggunakan Tahap pengujian profil asam lemak menggunakan tabung reaksi ulir berukuran 10 mL, *ultrasonic bath* (Julabo USR 1, Jerman), dan instrumen GC-MS (Shimadzu QP2010, Jepang). Dan tahap pengujian kandungan asam lemak bebas menggunakan tabung erlenmeyer 250 mL, pipet volume 10 dan 25 mL, pipet tetes, buret berukuran 50 mL, dan *ball* pipet.

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) yang didapatkan secara komersil melalui *e-commerce*. Sampel kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) berasal dari Kabupaten Ponorogo, Jawa Timur. Bahan lainnya yaitu akuades (LKFA FPMIPA UPI), starter tempe dengan jamur jenis *Rhizopus oligosporus* merek Rapprima yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi Indonesia (AFI), natrium hipoklorit (NaOCl) 1% dan 0,07% (Bayclin, Indonesia), alkohol 70% (*grade* teknis), kain saring keju (*cheesecloth*), *plastic wrap*, *aluminium foil*, kertas saring, n-heksana *grade* PA (Merck, Jerman), larutan boron trifluorida (BF₃) dalam metanol (20%) (Merck, Jerman), larutan NaOH 0,1N (Merck, Jerman), larutan asam oksalat 0,1N (Merck, Jerman), etanol *grade* PA (Merck, Jerman), dan larutan fenolftalein 1% (Merck, Jerman), larutan HCl 25% (Merck, Jerman).

3.3 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Sortir Sampel

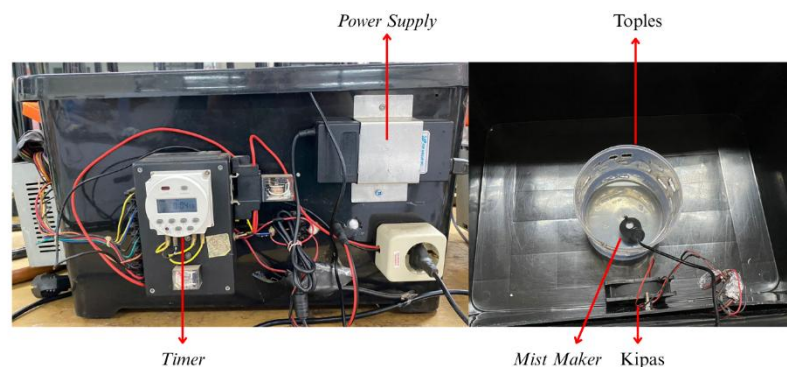
Sampel kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) disortir sesuai dengan kondisi fisiknya. Biji yang dipilih merupakan biji yang berukuran cukup besar, berbentuk panjang secara vertikal dan pipih menyerupai pedang. Permukaan bijinya berwarna putih kekuningan, tidak cekung dan memiliki aroma alami kacang yang sedikit langu. Selain itu, kondisi biji juga harus terbebas dari tanda-tanda kebusukan dan lubang-lubang di pemukaannya. Hasil sortasi disimpan dalam wadah yang tertutup rapat dan di tempat yang kering.

3.4.2 Tahap Sterilisasi Sampel

Sterilisasi dilakukan sebelum melakukan proses germinasi dan fermentasi, tahap sterilisasi ini dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan keberhasilan perkecambahan karena dapat mengurangi risiko kontaminasi mikroorganisme. Metode yang digunakan untuk sterilisasi mengacu pada penelitian (Aisyah et al., 2013) dengan beberapa modifikasi. Sterilisasi diawali dengan merendam sampel kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) dengan larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 1% dengan rasio 5L/Kg sampel selama 1 jam. Tujuan dari penggunaan NaOCl adalah untuk memberikan efek steril dan sekaligus memiliki efek stimulan sehingga dapat menginduksi perkecambahan tanpa merusak benih (Sajedi et al., 2012). Setelah proses perendaman, sampel dibilas sebanyak empat kali menggunakan akuades. Sampel yang telah dibilas selanjutnya direndam dengan akuades steril dengan rasio 5L/Kg selama 24 jam pada kondisi tanpa cahaya. Perendaman ini bertujuan untuk mengurangi kandungan senyawa anti nutrisi dan membuat kulit ari menjadi lebih lunak pada kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) (Kumar Singh et al., 2015; Romulo & Surya, 2021).

3.4.3 Tahap Germinasi

Proses germinasi dan sterilisasi *seed germinator* dilakukan dengan mengadopsi metode dari penelitian (Aisyah et al., 2013). Proses germinasi menggunakan alat *seed germinator* yang dirancang untuk menciptakan lingkungan buatan dengan suhu, intensitas cahaya, dan kelembapan yang optimal sehingga dapat mendukung proses germinasi/proses perkecambahan biji. Proses germinasi terjadi secara optimal pada keadaan gelap dengan kelembapan tinggi (Delouche & Bass, 1954). Karena hal tersebut alat *seed germinator* dirancang dalam kotak plastik berwarna gelap sehingga cahaya dari luar tidak dapat masuk ke dalam dan sampel dapat dikecambahkan dalam keadaan gelap. Sedangkan untuk menjaga kelembapan digunakan *mikrotimer* yang akan mengatur *mist maker* yang merupakan alat untuk membuat embun dengan mengubah air menjadi kabut dan kemudian kabut tersebut akan disebarkan ke seluruh bagian oleh kipas kecil yang ada pada *seed germinator*. *Mist maker* diatur akan aktif selama 2 menit setiap 2 jam sekali.



Gambar 3. 2 Set Alat Germinator

Sebelum melakukan proses germinasi, *seed germinator* perlu di steril terlebih dahulu seperti pada metode (Aisyah et al., 2013). Proses steril dimulai dengan menyemprotkan larutan NaOCl 0,07% dan kemudian alkohol 70% pada seluruh bagian dalam *seed germinator*, selanjutnya disinari dengan cahaya UV selama 15 menit. Kacang yang

telah melalui proses sterilisasi sebelumnya kemudian disusun di atas *tray* yang sudah dilapisi dengan *cheese cloth*. *Tray* plastik kemudian dimasukkan ke dalam alat germinator steril dan *mist maker* diatur supaya menyala selama 2 menit setiap 2 jam sekali. Proses germinasi dilakukan selama 24 jam dan 48 jam sesuai dengan variasi sampel hingga diperoleh kecambah kacang koro pedang.

Pada penelitian ini kacang koro pedang diberikan perlakuan yang berbeda, yaitu kacang koro pedang steril yang tidak dikecambahkan dan tidak digerminasi (G_0F_0), kacang koro pedang yang difermentasi namun tidak dikecambahkan (G_0F_{48}), kacang koro pedang yang dikecambahkan 24 jam dan difermentasi 48 jam ($G_{24}F_{48}$) dan kacang koro pedang yang dikecambahkan 48 jam dan difermentasi 48 jam ($G_{48}F_{48}$). Seperti yang terlihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3. 1 Perbedaan Perlakuan Terhadap Sampel Kacang Koro Pedang

Kode Sampel	Tahapan		
	Sterilisasi	Germinasi	Fermentasi
G0F0	√	-	-
G0F48	√	-	√
G24F48	√	√	√
G48F48	√	√	√

3.4.4 Tahap Fermentasi

Metode dan langkah kerja yang digunakan pada penelitian ini bersumber dari penelitian (Astawan et al., 2023) dengan beberapa modifikasi. Proses fermentasi diawali dengan perebusan kacang yang telah melalui tahap-tahap sebelumnya selama 60 menit pada suhu 90-95°C dengan perbandingan (b/v) kacang dengan air 1:10 dan dilakukan

penyaringan untuk memisahkan air sisa rebusan. Perebusan ini bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme yang tidak diinginkan (Romulo & Surya, 2021). Setelah perebusan, dilakukan pengupasan kulit ari (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).

Setelah perendaman sampel kacang mengalami perebusan kedua selama 15 menit dengan perbandingan (b/v) kacang dengan air 1:10. Perebusan kedua ini bertujuan membunuh mikroorganisme patogen yang tersisa setelah perendaman (Romulo & Surya, 2021). Kemudian dilakukan penyaringan dan penirisan untuk memastikan kacang telah kering yang kemudian didinginkan pada suhu ruang. Kacang harus dipastikan kering karena penirisan yang tidak sempurna akan memicu pertumbuhan bakteri kontaminan sehingga dapat menyebabkan fermentasi gagal (Rahayu et al., 2015). Selanjutnya kacang koro pedang dipotong menjadi 8-9 (0,3 cm) seperti metode yang dilakukan oleh (Tsalissavrina et al., 2023). Pada tahap inokulasi, kacang yang telah dipotong kemudian dicampurkan dengan *starter* tempe Raprima dengan perbandingan 0,2g/100gram kacang. Pencampuran dilakukan dengan cara disebar dan dicampurkan secara merata. Kacang yang telah diinokulasi selanjutnya dikemas di dalam plastik dan dilubangi dengan jarak antar lubang 1x1 cm untuk memastikan sirkulasi udara yang baik selama fermentasi (Kusumawati et al., 2020). 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 *freezer* dengan suhu $\pm -11^{\circ}\text{C}$ sampai proses pengujian akan dilakukan.

3.4.5 Tahap Preparasi Analisis

Preparasi sampel dilakukan berdasarkan metode penelitian (Reyes-Bastidas et al., 2010) sampel G₀F₀, G₀F₄₈, G₂₄F₄₈, dan G₄₈F₄₈ yang telah siap dipotong menjadi bentuk persegi panjang berukuran 2x1 cm, kemudian disusun secara merata pada *tray* dengan antar potongan diberi jarak agar proses pengeringan berlangsung optimal. Proses pengeringan dilakukan menggunakan oven *memmert* pada suhu 50°C selama 24 jam hingga sampel kering secara merata. Setelah sampel kering merata, kemudian dilakukan penggilingan hingga halus. Sampel penggilingan selanjutnya disaring dengan menggunakan saringan *mesh* 80 nm untuk memperoleh partikel dengan ukuran yang lebih seragam. Sampel serbuk yang diperoleh selanjutnya disegel rapat dan disimpan dalam *freezer* bersuhu -11°C hingga siap digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Ukuran partikel sampel merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi. Ekstrak yang diperoleh dari sampel bubuk memiliki hasil lebih banyak dibandingkan dengan sampel utuh karena sampel yang memiliki partikel kecil, luas permukaannya akan semakin luas sehingga memungkinkan terjadi kontak secara cepat dengan pereaksi (Wahyuningsih et al., 2024). Selain ukuran partikel, pengeringan sampel dengan oven pada suhu rendah sangat direkomendasikan karena pelarut non polar seperti n-heksana yang digunakan tidak mudah menembus jaringan yang lembab, oleh karena itu kandungan kelembaban atau air di dalam sampel perlu dikurangi. Pengeringan sampel juga memudahkan penggilingan atau proses menghaluskan sampel, meningkatkan ekstraksi dan dapat memecah emulsi lemak-air sehingga lemak mudah larut dengan pelarut (Shahidi & Wanasundara, 2002).

3.4.6 Tahap Analisis Kandungan Lemak Total

Pengujian lemak total dilakukan berdasarkan metode hidrolisis Weibull, *soxhletasi*, dan gravimetri sebagaimana dijelaskan oleh SNI 01-2891-1992 mengenai cara uji makanan dan minuman (BSN, 1992). Sebelum diekstraksi sampel dihidrolisis dalam suasana asam untuk membebaskan lemak yang terikat secara kovalen dan ionik pada protein dan karbohidrat serta memecah emulsi lemak (Shahidi & Wanasundara, 2002). Sebanyak 1-2 gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan 20 mL air serta 30 mL HCl 25%. Campuran tersebut dipanaskan selama 15 menit yang selanjutnya disaring dengan kertas saring KOLF dalam kondisi panas dan dicuci dengan air panas hingga tidak bereaksi dengan asam lagi. Endapan dan kertas saring kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105°C. Proses ekstraksi lemak dilakukan menggunakan pelarut heksana selama 2-3 jam pada suhu 80°C. Ekstrak lemak yang diperoleh kemudian dipanaskan pada suhu 100-105°C, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang. Pemanasan diulang hingga diperoleh bobot yang stabil/tetap.

Rencana perhitungan:

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

Keterangan:

w = bobot sampel sebelum dipanaskan (gram)

w1 = bobot labu lemak setelah ekstraksi (gram)

w2 = bobot labu lemak sebelum ekstraksi (gram)

3.4.7 Tahap Analisis Profil Asam Lemak

Analisis profil asam lemak dilakukan berdasarkan metode penelitian (Wang et al., 2022) dengan modifikasi. Proses analisis diawali dengan proses ekstraksi lipid dari sampel menggunakan metode *soxhletasi*, dengan mengekstrak 25 gram sampel kering menggunakan pelarut n-

heksana selama 4-5 jam atau ± 30 siklus pada suhu 80°C . Pelarut kemudian diuapkan untuk mendapatkan hasil yang murni. Selanjutnya dilakukan proses esterifikasi menggunakan larutan boron triflorida (BF_3) dalam metanol dengan perbandingan ekstrak dan BF_3 1:3 (v/v) untuk mengubah lipid menjadi senyawa metil ester asam lemak (FAME). Selanjutnya campuran direaksikan di *ultrasonic bath* pada suhu ruang selama 1 jam hingga terbentuk 2 fasa, dan fasa pada bagian atas (yang mengandung FAME) kemudian diinjeksikan ke dalam instrumen GC-MS. Identifikasi senyawa FAME dilakukan berdasarkan waktu retensi yang dibandingkan dengan *library* dari perangkat lunak GC-MS.

3.4.8 Tahap Analisis Kandungan Asam Lemak Bebas

Pengujian kandungan asam lemak bebas dilakukan dengan mengadopsi metode dari (Zou et al., 2019) dengan beberapa modifikasi. Proses analisis diawali dengan proses ekstraksi lipid dari sampel menggunakan metode *soxhletasi*, dengan mengekstrak 25 gram sampel kering menggunakan pelarut n-heksana selama 4-5 jam atau ± 30 siklus pada suhu 80°C . Setelah proses ekstraksi selesai, ekstrak lipid kemudian dihilangkan pelarutnya. Selanjutnya sebanyak 0,25 gram lemak ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL etanol. Campuran ini kemudian ditambahkan 3 tetes larutan indikator fenolftalein 1% dan dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N yang sebelumnya telah distandarisasi dengan larutan asam oksalat. Titrasi dilakukan hingga terjadi perubahan larutan menjadi warna merah muda yang menunjukkan titik akhir titrasi.

Rencana Perhitungan :

$$\% \text{ FFA} = \frac{N \text{ NaOH} \times V \text{ NaOH} \times Mr \text{ Asam Lemak Dominan}}{1000 \times \text{massa sampel}} \times 100\%$$

3.4.9 Pengolahan dan Analisis Data secara Statistik

Data yang diperoleh dari setiap sampel setelah dilakukan dua pengulangan (duplo) pada pengujian kadar lemak total dan kadar asam lemak bebas (FFA) dianalisis secara statistik untuk melihat pengaruh dari setiap perlakuan. Analisis dilakukan dengan uji ANOVA satu arah (*one-way ANOVA*) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antara perlakuan. Kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan *Post-Hoc Tukey HSD*. Seluruh hasil dinyatakan dengan bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi (SD). Analisis statistik dilakukan dengan tingkat signifikansi $P < 0,05$ dan menggunakan perangkat lunak IBM SPSS *Statistics* Versi 27.