

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Oktober 2023 di Laboratorium Teknologi Pangan dan Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi 2, yakni alat untuk pembuatan tepung sukun fermentasi dan untuk analisis tepung. Pada Alat pembuatan tepung sukun meliputi cabinet dryer, timbangan digital, chopper, pisau, kompor, panci pengukus, baskom, sendok, talenan, dan ayakan. Sedangkan alat untuk analisa diantaranya gelas beaker, tabung reaksi, gelas ukur, filler, batang pengaduk, pipet ukur, pipet tetes, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, jangka sorong, kertas saring, kurs porselen, oven, desikator, timbangan analitik, tanur, set distilasi, buret, soxhlet, labu lemak, labu kjedhal, lemari asam, waterbath, Centrifuge, Kondensor, hot plate, corong buchner, mesin pompa vacuum, cawan petri, spektrofotometer UV-vis, kuvet, aluminium foil, colour reader.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi 2, yakni bahan untuk tepung sukun fermentasi dan perlakuan analisis. Pada proses pembuatan tepung sukun fermentasi bahan yang digunakan diantaranya adalah buah sukun masak dengan ciri-ciri kulitnya yang mulai mekar, tekstur tidak keras, dan daging berwarna putih kekuningan didapat dari pasar oro-oro dowo Malang serta ragi tempe (Raprima). Bahan yang digunakan selama perlakuan analisis diantaranya yaitu sampel tepung sukun fermentasi, dan terdapat beberapa larutan kimia diperoleh di Laboratorium Teknologi Pangan meliputi larutan aquades, etanol 96%, larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), indikator metil merah-metilen biru, katalisator ($\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{HgO}$), H_2SO_4 , H_3BO_3 (asam borat), HCl, Petroleum Benzena, anti buih, NaOH.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak kelompok (RAK) faktorial dengan 2 faktor perlakuan terdiri

dari faktor I yaitu perbedaan lama waktu fermentasi (A) yaitu 24 jam, 36 jam, dan 48 jam. Sedangkan faktor II yaitu perbedaan konsentrasi ragi tempe (B) yaitu 0,5%, 1%, dan 1,5%. Berat yang digunakan setiap perlakuan yaitu 500 gram buah sukun segar. Proses fermentasi dilakukan pada suhu ruang yaitu 25-30°C. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan analisa kimia meliputi kadar air, kadar abu, kadar gula total, kadar lemak, kadar protein, kadar serat, uji antioksidan dan analisa fisik meliputi rendemen, intensitas warna, uji *swelling*, densitas kamba, serta uji organoleptik untuk mengetahui tepung sukun fermentasi dengan hasil terbaik.

Tabel 4. Rancangan Percobaan

Lama Waktu Fermentasi	Konsentrasi Ragi Tempe (% b/b)		
	0,5% (B1)	1% (B2)	1,5% (B3)
24 jam (A1)	A1B1	A1B2	A1B3
36 jam (A2)	A2B1	A2B2	A2B3
48 jam (A3)	A3B1	A3B2	A3B3

Keterangan :

A0B0 = Tanpa fermentasi (kontrol)

A1B1 = Fermentasi 24 jam : Konsentrasi ragi 0,5%

A1B2 = Fermentasi 24 jam : Konsentrasi ragi 1%

A1B3 = Fermentasi 24 jam : Konsentrasi ragi 1,5%

A2B1 = Fermentasi 36 jam : Konsentrasi ragi 0,5%

A2B2 = Fermentasi 36 jam : Konsentrasi ragi 1%

A2B3 = Fermentasi 36 jam : Konsentrasi ragi 1,5%

A3B1 = Fermentasi 48 jam : Konsentrasi ragi 0,5%

A3B2 = Fermentasi 48 jam : Konsentrasi ragi 1%

A3B3 = Fermentasi 48 jam : Konsentrasi ragi 1,5%

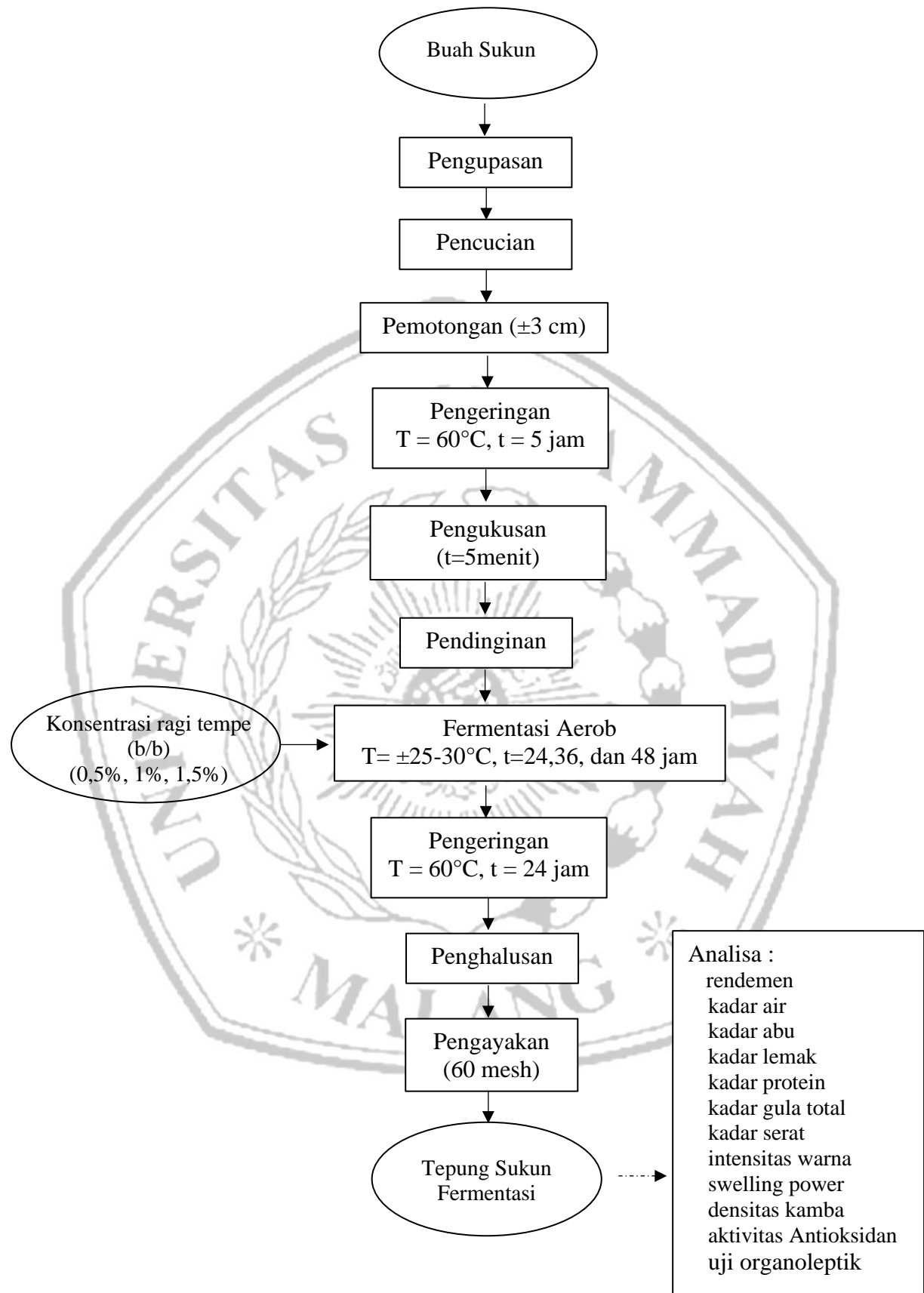
Analisis data pada penelitian ini menggunakan data kuantitatif yang diperoleh dengan perhitungan statistik ANOVA (*Analysis of Varians*) pada tingkat kepercayaan $\alpha = 0,05$. Apabila nilai signifikan memberikan pengaruh yang nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut *posthoc test* dan perhitungan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5% agar diperoleh kesimpulan pengaruh perlakuan secara menyeluruh. Penelitian ini merupakan penelitian empirik dengan teknik pengumpulan data yakni dengan cara mengumpulkan data hasil percobaan di laboratorium selama pelaksanaan penelitian.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Proses Pembuatan Tepung Sukun Fermentasi (Amanto dkk., 2015)

Buah sukun yang digunakan dengan spesifikasi yaitu dipilih yang matang, bebas cacat fisik, kondisi buah masih segar, kulit buah berwarna hijau. Buah sukun dikupas dan dibersihkan, dipotong kotak dadu dengan ukuran kecil (± 3 cm). Selanjutnya buah sukun ditimbang 500 gram dan dilakukan pengeringan pada *cabinet dryer* pada suhu 60°C selama 5 jam. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air pada sukun sehingga pada saat fermentasi sukun tidak cepat busuk. Selanjutnya buah sukun dikukus selama 5 menit dan didiamkan hingga dingin. Buah sukun difermentasi selama 24, 36, dan 48 jam menggunakan ragi tempe dengan masing-masing konsentrasi 0,5%, 1%, dan 1,5% (b/b) dengan kondisi aerob dengan suhu ruang $\pm 25-30^{\circ}\text{C}$. Setelah dilakukan fermentasi, buah sukun tersebut dikeringkan pada *cabinet dryer* pada suhu 60°C selama 24 jam. Setelah kering, sukun kemudian dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh.





Gambar 2. Diagram Alir Pembuatan Tepung Sukun Fermentasi (Amanto dkk., 2015)

3.5 Parameter Penelitian

Pada penelitian ini parameter yang akan diteliti pada tepung sukun fermentasi yang telah dibuat akan di analisis rendemen, kadar air, kadar abu, kadar karbohidrat, kadar lemak, kadar protein, kadar serat, antioksidan, intensitas warna, *swelling power*, densitas kamba, dan uji organoleptik.

3.5.1 Uji Rendemen (Pangestika dkk., 2021)

Proses perhitungan rendemen tepung sukun fermentasi dihitung dengan menggunakan persamaan di bawah ini:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat tepung sukun fermentasi (g)}}{\text{Berat sukun (g)}} \times 100\%$$

3.5.2 Uji Kadar Air (AOAC, 2005)

1. Cawan porselen disiapkan dan dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan dengan suhu 100-105°C selama 24 jam
2. Cawan porselen dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit
3. Timbang cawan porselen kosong
4. Sampel dihaluskan dengan menggunakan mortal martil dan ditimbang sebanyak 2 gram
5. Sampel diletakkan ke dalam cawan porselen yang telah dikeringkan dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100-105°C selama 4 jam
6. Sampel dimasukkan ke dalam desikator untuk didinginkan kurang lebih selama 15 menit
7. Sampel ditimbang kembali untuk diketahui berat akhir sampel
8. Kadar air dihitung hasilnya dengan rumus :

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Berat awal (g)} - \text{Berat akhir (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.5.3 Uji Kadar Abu (AOAC, 2005)

1. Cawan porselen disiapkan dan dimasukkan ke dalam oven untuk dikeringkan dengan suhu 100-105°C selama 24 jam
2. Cawan porselen dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit
3. Timbang cawan porselen kosong
4. Sampel dihaluskan dengan menggunakan mortal martil dan ditimbang sebanyak 2 gram
5. Sampel diletakkan ke dalam cawan porselen yang telah dikeringkan dan

dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 550-560°C selama 6 jam

6. Sampel didiamkan kurang lebih selama 24 jam
7. Sampel dimasukkan ke dalam desikator untuk didinginkan kurang lebih selama 15 menit lalu ditimbang
8. Kadar abu dihitung hasilnya dengan rumus :

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{Berat awal (g)} - \text{Berat akhir (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.5.4 Uji Lemak Metode Soxhlet (AOAC, 2005)

1. Keringkan labu lemak dalam oven bersuhu 100-110°C
2. Dinginkan labu lemak pada desikator selama 15 menit
3. Timbang berat awal (labu lemak kosong)
4. Sampel dalam bentuk serbuk ditimbang sebanyak 2 gram
5. Tambahkan larutan petrolium benzena sebanyak 30 ml
6. Naikkan pada waterbath selama 4 jam
7. Masukkan pada oven hingga sampel mengental
8. Timbang berat akhir labu

$$\text{Kadar lemak} = \frac{\text{Berat akhir (g)} - \text{Berat awal (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.5.5 Uji Protein Metode Kjeldahl (AOAC, 2005)

1. Sampel ditimbang sebanyak 0,02 gram
2. Dimasukkan bahan ke dalam tabung kjedahl, lalu tambahkan 2 ml H₂SO₄ pekat 98% dan tambahkan 1 spatula campuran Na₂SO₄ – HgO untuk katalisator
3. Sampel didekstruksi sampai jernih (pengerjaan harus dilakukan di lemari asam) dan dinginkan
4. Sampel kemudian tambahkan 10 ml larutan NaOH dan 15 ml aquades ke dalam tabung destilasi
5. Sampel didistilasi dan ditampung dalam H₃BO₃ 4% yang ditambahkan 1% indikator metil merah-metilen biru. Sampel didistilasi hingga berubah warna menjadi hijau
6. Sampel kemudian dilakukan titrasi dengan HCl 0,02 N hingga berubah warnanya menjadi ungu. Hitung total N dan persentase protein dengan rumus:

$$\% N = \frac{\text{ml HCl} \times N \text{ HCl} \times 14,008}{\text{Berat bahan (mg)}} \times 100\%$$

Kadar protein = % N × faktor konversi (6,25)

3.5.6 Uji Gula Total Metode Anthron (Sudarmadji dkk., 1997)

a) Preparasi Sampel

1. Sampel ditimbang sebanyak 4 g
2. Ditambahkan alkohol 80% dengan perbandingan 1:1 ke dalam gelas kimia dan disaring menggunakan kertas saring whatman.
3. Filtrat diukur pH-nya, jika asam ditambahkan NaOH 0,1N sampai cukup basa (pH sekitar 9).
4. Larutan dipanaskan pada penangas air suhu 100°C selama 30 menit, larutan disaring kembali.
5. Selanjutnya campuran dipanaskan pada suhu ± 850C hingga larutan bebas alkohol. Jika terdapat endapan, dilakukan penyaringan kembali.
6. Filtrat dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL.
7. Ditambahkan 3 mL timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) secara berhati-hati hingga larutan jernih, ditepatkan volumenya dengan akuades, dikocok hingga homogen dan disaring dengan kertas saring whatman.
8. Filtrat ditambahkan natrium oksalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) sebanyak 1 g kemudian dicampur sampai merata dan endapan yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring whatman sehingga dinyatakan sebagai sampel.

b) Pembuatan Kurva Standar Glukosa

1. larutan glukosa standar 200 ppm dipipet sebanyak 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mL ke dalam tabung reaksi,
2. Dilakukan pengenceran sehingga total volume masing-masing tabung 1 mL. Kemudian ditambahkan 5 mL pereaksi anthrone dengan cepat ke dalam larutan glukosa standar, ditutup dan dikocok hingga merata.
3. Selanjutnya tabung reaksi dipanaskan diatas penangas air 100°C selama 12 menit dan didinginkan.
4. Larutan dipindahkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-vis pada panjang gelombang 630 nm.

c) Penetapan sampel

1. Sampel yang telah dipersiapkan sebelumnya diambil dengan pipet mikro sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi.
2. Kemudian ditambahkan 5 mL pereaksi anthrone dengan cepat ke dalam larutan glukosa standar, ditutup dan dikocok hingga merata.
3. Selanjutnya tabung reaksi dipanaskan di atas penangas air 100°C selama 12 menit dan didinginkan.
4. Larutan dipindahkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 630 nm. Total gula dari persamaan : $Y = AX + B$

$$\text{Kadar Gula Total} = \frac{X \cdot \text{Volume Filtrat} \cdot F_p}{\text{Berat sampel (mg)}} \times 100\%$$

3.5.7 Uji Serat (AOAC, 2005)

1. Sampel yang telah melalui analisis kadar lemak ditimbang sebanyak 2 gram dimasukkan ke erlenmeyer
2. Tambahkan 50 ml larutan H₂SO₄ 1,25% dan 3 tetes antibuih lalu dididihkan selama 30 menit di atas hotplate
3. Tambahkan 50 ml larutan NaOH 3,25% dan dididihkan kembali selama 30 menit
4. Dalam keadaan panas, larutan disaring dengan corong buncher yang berisi kertas saring yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya
5. Endapan yang terdapat pada kertas saring dicuci berturut-turut dengan 25ml larutan H₂SO₄ 1,25% panas, 25 ml aquades panas, dan 25 ml larutan ethanol 96% panas.
6. Kertas saring beserta isinya diangkat, kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang telah diketahui bobotnya
7. Keringkan pada oven dengan suhu 105°C lalu didinginkan dan ditimbang hingga bobot tetap
8. Kadar serat dihitung hasilnya dengan rumus :

$$\text{Kadar serat} = \frac{\text{Berat akhir (g)} - \text{Berat awal (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3.5.8 Uji Antioksidan Metode DPPH (Prasetyo dan Winardi, 2020)

a) Pembuatan Larutan DPPH

1. Serbuk DPPH ditimbang seberat 4 mg
2. Proses pelarutan serbuk DPPH menggunakan etanol 96% sebanyak 100 ml lalu

dihomogenkan

3. Ditutup rapat dan disimpan larutan DPPH dikondisi gelap dan dingin dalam waktu 1 jam, serta digunakan segera mungkin

b) Pembuatan Blanko

1. Larutan DPPH diambil sebanyak 1 mL.
2. 4 mL etanol 96% ditambahkan dan dihomogenkan.
3. Blanko harus tertutup rapat dan disimpan dikondisi gelap dan dingin selama kurang lebih 20 menit.
4. Dilakukan pembacaan absorbansi blanko pada λ 517 nm dengan alat Spektrofotometer Uv-vis

c) Pembuatan Larutan Sampel

1. Sampel ditimbang dengan berat 0,5 g
2. Sampel dilarutkan dengan etanol 10 ml dan diaduk hingga homogen
3. Sampel disaring menggunakan kertas saring dan larutan hasil saring ditempatkan pada erlenmeyer

d) Analisis Aktivitas Antioksidan

1. Sampel dengan volume 4 mL dimasukkan pada tabung reaksi
2. Larutan DPPH dengan jumlah 1 mL ditambahkan dan dihomogenkan
3. Ditutup tabung reaksi dengan rapat menggunakan aluminium foil
4. Disimpan sampel dikondisi gelap dalam waktu 20 menit
5. Dilakukan pembacaan serapan panjang gelombang pada λ 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis
6. % Inhibisi menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

3.5.9 Uji Densitas Kamba (Rohimah dkk., 2021)

1. Timbang berat cawan petri kosong
2. Ukur volume cawan petri menggunakan jangka sorong
3. Bahan dimasukkan kedalam cawan petri dan dipadatkan sampai volumenya penuh kemudian ditimbang beratnya.
4. Densitas kamba bahan dinyatakan dalam g/cm^3

3.5.10 Uji Swelling (Buwono dkk., 2018)

1. Sampel sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml aquadest
2. Sampel dipanaskan menggunakan water bath dengan temperatur 60°C selama 30 menit.
3. Sampel disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit untuk memisahkan supernatant dan pasta yang terbentuk. Swelling power dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Swelling Power} = \frac{\text{Berat pasta (g)}}{\text{Berat sampel kering (g)}}$$

3.5.11 Intensitas Warna Colour Reader (AOAC, 2005)

1. Sampel dimasukkan dalam plastik klip bening
2. Plastik klip berisi sampel diratakan namun tidak terlalu tipis
3. Warna dianalisis menggunakan colour reader

3.5.12 Uji Organoleptik Tepung Sukun Fermentasi

Uji organoleptik merupakan salah satu analisis yang menggunakan indera manusia untuk mengetahui daya terima produk pangan melalui beberapa parameter. Setiap sampel akan diberikan label kode yang berbeda untuk menghindari terjadinya bias antar sampel satu dengan sampel lainnya. Selain itu sebagai perbandingan tingkat kesukaan panelis antar sampel sebagaimana ditampilkan pada form yang terlampir. Parameter uji organoleptik tepung sukun fermentasi meliputi warna, rasa, aroma, tekstur, dan kenampakan.

Pengujian organoleptik menggunakan metode deskriptif dengan 15 panelis terlatih. Panelis dipilih tanpa dilakukan wawancara dan seleksi namun harus memenuhi syarat yaitu sehat jasmani dan rohani, tidak buta warna, dan bebas dari penyakit THT. Panelis dilatih atau di *training* terlebih dahulu sebanyak 3 kali dalam seminggu selama 1 bulan. Merujuk pada metode dari penelitian Hunaefi & Ulfah (2019), Mayasari dkk., (2017) yaitu panelis melakukan uji dasar rasa terlebih dahulu agar mampu membedakan intensitas lima rasa dasar yaitu manis, asam, asin, pahit, umami. Sampel berupa larutan rasa manis yang berasal dari gula, rasa asam dari larutan asam sitrat, rasa asin dari larutan garam (NaCl), rasa pahit dari larutan kafein, rasa umami dari larutan monosodium glutamate (MSG). Selanjutnya panelis kemudian akan dilatih untuk mengenal karakteristik dari sampel uji. Identifikasi karakteristik sensori produk pertama dilakukan dengan berdiskusi sehingga

didapatkan kesepakatan dari para panelis terkait apa saja karakteristik sampel yang mengalami perubahan selama proses fermentasi. Selanjutnya panelis melakukan pelatihan dalam menilai sampel sesuai deskripsi yang telah disepakati. Nilai standar untuk parameter rasa, aroma, dan kenampakan yang dibutuhkan untuk dijadikan acuan oleh panelis untuk penilaian sampel yaitu sampel tepung sukun kontrol/tanpa perlakuan. Sedangkan nilai standar untuk parameter warna dan tekstur menggunakan tepung terigu. Panelis akan diberi nilai skala organoleptik yang diberikan adalah 1-5 pada skala numerik untuk masing-masing parameter dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji Organoleptik Tepung Sukun Fermentasi

Skala	Rasa	Warna	Aroma	Tekstur	Kenampakan
1	Sangat pahit getir	Kuning kecoklatan	Sangat langu/tengik	Sangat kasar	Sangat gelap
2	Pahit getir	Sangat kuning	Langu/tengik	Kasar	Gelap
3	Agak pahit getir	Kuning	Agak langu/tengik	Agak kasar	Agak gelap
4	Khas fermentasi	Putih kekuningan	Khas fermentasi	Halus	Cerah
5	Tidak berasa	Putih	Tidak Berbau	Sangat halus	Sangat cerah