

III. METODOLOGI

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian UMY untuk tahap pembuatan tepung mocaf dan Laboratorium Biokimia Farmasi UMY untuk uji karakteristik tepung mocaf meliputi Analisis Kadar Protein, Analisis Kadar HCN, Analisis Kadar Abu, Analisis Kadar Air, Analisis Kadar Karbohidrat, Analisis Kadar Lemak, Analisis Kadar Serat dan Uji Organoleptik meliputi aroma, tekstur, dan warna pada bulan Januari sampai dengan April 2017.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa autoklaf, inkubator, mikropipet, cawan petri, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, labu erlenmeyer, *beaker glass*, bunsen burner, gelas ukur, jarum inokulum / oson, pH meter universal, *colony counter*, shaker, kertas saring, neraca analitik, labu *Kjeidahl*, erlenmeyer, *muffle furnace*, desikator, oven, water bath, botol jam, blender, dan toples plastik.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah singkong, kulit nanas, inokulum *Lactobacillus plantarum* dari LIPI Cibinong Jawa Barat, medium MRS *broth*, MRS agar, aquades, HCl 1 N, NaOH 30%, H₂SO₄, alkohol 10%, alkohol 70%, NaOH 45%, NaOH 2,5%, NH₄OH, KI, AgNO₃ 0,02 N, dan *Acetone*.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode penelitian eksperimen dengan rancangan percobaan 2 faktor, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor pertama yaitu konsentrasi ekstrak kulit nanas N0 (tanpa ekstrak

kulit nanas), N1 (ekstrak kulit nanas 15%), N2 (ekstrak kulit nanas 20%), dan N3 (ekstrak kulit nanas 25%). Faktor kedua yaitu lama fermentasi A1 (72 jam), A2 (120 jam), dan A3 (168 jam). Metode penelitian dapat disusun sebagai berikut:

1. N0A1: Kontrol (tanpa ekstrak kulit nanas) dan fermentasi 72 jam.
2. N1A1: Ekstrak kulit nanas 15% dan fermentasi 72 jam.
3. N2A1: Ekstrak kulit nanas 20% dan fermentasi 72 jam.
4. N3A1: Ekstrak kulit nanas 25% dan fermentasi 72 jam.
5. N0A2: Kontrol (tanpa ekstrak kulit nanas) dan fermentasi 120 jam.
6. N1A2: Ekstrak kulit nanas 15% dan fermentasi 120 jam.
7. N2A2: Ekstrak kulit nanas 20% dan fermentasi 120 jam.
8. N3A2: Ekstrak kulit nanas 25% dan fermentasi 120 jam.
9. N0A3: Kontrol (tanpa ekstrak kulit nanas) dan fermentasi 168 jam.
10. N1A3: Ekstrak kulit nanas 15% dan fermentasi 168 jam.
11. N2A3: Ekstrak kulit nanas 20% dan fermentasi 168 jam.
12. N3M3: Ekstrak kulit nanas 25% dan fermentasi 168 jam.

Masing-masing perlakuan diberikan 3 ulangan sehingga diperoleh 36 unit percobaan. Perlakuan fermentasi diberikan pada 72, 120, dan 168 jam. Kemudian dilakukan uji karakteristik tepung mocaf meliputi Analisis Kadar Protein, Analisis Kadar HCN, Analisis Kadar Abu, Analisis Kadar Air, Analisis Kadar Lemak, Analisis Pati, Analisis Kadar Serat dan Uji Organoleptik meliputi aroma, tekstur, dan warna.

D. Cara Penelitian

1. Tahap 1. Pembuatan Tepung Mocaf

a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan harus bersih dan steril agar tidak terjadi kontaminasi. Peralatan dari bahan gelas dicuci, kemudian dikeringkan, selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C bertekanan 1 atm selama 30 menit. Sebelum disterilisasi, tabung reaksi ditutup kapas atau alumunium foil. Meja kerja yang akan digunakan disemprot dengan alkohol 70%.

b. Perbanyak Isolat *Lactobacillus plantarum*

Perbanyak isolat *Lactobacillus plantarum* didapat dari pembiakan murni isolat *Lactobacillus plantarum* yang berasal dari kultur koleksi LIPI Cibinong. Perbanyak dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan murni isolat kemudian diinokulasikan ke MRS *broth* 10 ml dalam tabung reaksi. Setelah 48 jam ambil 1 ml di inokulasi ke erlenmeyer berisi 100 ml medium MRS *broth* untuk tiap isolat, kemudian diinkubasi dengan suhu ruang 27⁰C selama 48 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm.

Selama proses perbanyak isolat *L. plantarum* hal yang perlu diperhatikan yaitu perubahan tingkat keasaman (pH) dan tingkat viabilitas bakteri *L. plantarum*. Tingkat keasaman di ukur menggunakan kertas pH Universal sedangkan viabilitas *L. plantarum* dinyatakan dengan jumlah pertumbuhan *L. plantarum* selama masa inkubasi. Penghitungan populasi bakteri ini dengan metode *Total Plate Count* (TPC) kemudian dihitung dalam rumus:

$$JB = JK \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan

JB = jumlah bakteri (CFU/ml)

JK = jumlah bakteri tunggal

c. Pembuatan Ekstrak Kulit Nanas

1. Kulit nanas dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Kulit nanas dipotong diambil dagingnya yang masih tersisa kemudian diblender sampai hancur.
2. Kulit nanas yang telah halus lalu disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak kulit nanas
3. Kulit nanas yang sudah disaring kemudian masuk ke proses pasteurisasi. Pasteurisasi merupakan proses pemanasan dengan suhu relatif rendah yaitu 70°C selama 15 menit dengan tujuan untuk membunuh patogen. Setelah dipanaskan, ekstrak kulit nanas kemudian didinginkan.

d. Fermentasi Pembuatan Tepung Mocaf

Persiapan sampel uji dilakukan dengan memilih sampel uji singkong dengan varietas, ukuran, umur yang sama. Selanjutnya sampel uji terlebih dahulu dibersihkan dari kotoran yang menempel, lalu singkong dikupas dan dicuci dengan air bersuhu 60°C hingga bersih, selanjutnya diiris dengan ketebalan 2-3 ml. Setelah itu sampel uji ditimbang seberat 500 g lalu di campur dengan akuades (1:1) di toples plastik dan ditambahkan inokulum *Lactobacillus plantarum* 1 %. Setelah itu difermentasi sesuai dengan variabel yang telah ditentukan. selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan sampel uji dengan air fermentasi, lalu dikeringkan hingga kadar airnya mencapai 12%-14%, menggiling singkong

hingga halus lalu dilakukan pengujian mutu tepung MOCAF sesuai dengan parameter pengamatan yaitu Analisis Kadar Protein, Analisis Kadar HCN, Analisis Kadar Abu, Analisis Kadar Air, Analisis Pati, Analisis Kadar Lemak, Analisis Kadar Serat dan Uji Organoleptik meliputi aroma, tekstur, dan warna.

2. Tahap 2. Uji Karakteristik Tepung Mocaf

a. Analisis Kadar Protein

Kandungan protein ditentukan dengan analisis kandungan Nitrogen AOAC dalam Sudarmaji dkk (2007). Uji kandungan protein dilakukan dengan cara menguji kadar Nitrogen dalam sampel (tepung MOCAF). Kemudian hasilnya dikonversi dengan mengalikan kadar Nitrogen yang didapat dengan 6,25. Faktor konversi 6,25 merupakan faktor konversi dari Nitrogen ke Protein berdasarkan sumber proteinnya. Hasil konversi yang didapat itu merupakan kandungan protein dalam sampel. Untuk menguji kadar Nitrogen, sampel sebanyak 2 g dimasukkan dalam labu Kjeidahl. Ditambahkan katalis N (CuSO_4 dan K_2SO_4) 0,7 g dan ditambah H_2SO_4 pekat 3 ml lalu didestruksi pada suhu 370-410°C dalam lemari asam sampai jernih kurang lebih selama 1 jam. Pada tahapan ini asam sulfat pekat mendestruksi sampel menjadi unsur-unsurnya. Elemen Karbon, Hidrogen teroksidasi menjadi CO, CO_2 , dan H_2O . Sedangkan Nitrogen-nya (N) akan berubah menjadi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Selanjutnya sampel masuk pada tahap destilasi, pada tahap ini Ammonium Sulfat dipecah menjadi ammonia (NH_3) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dan dipanaskan. Setelah melalui tahap destruksi sampel didinginkan lalu ditambahkan 15 ml H_2O , lalu dimasukkan kedalam labu destilasi dan

ditambahkan 15 ml NaOH 40%. Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml larutan HCl 40% yang diberi indikator PP 2-3 tetes. Destilasi diakhiri bila semua ammonia terdistilasi sempurna dengan ditandai destilat tidak bereaksi basis.

Hasil destilasi selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N. akhir titrasi ditandai dengan warna merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Selisih jumlah titrasi blangko dan sampel merupakan jumlah equivalen Nitrogen. Persen protein dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blangko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N. \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

b. Analisis Pati

Timbang 2-5 gram contoh yang berupa bahan padat yang telah dihaluskan, tambahkan 50 ml aquadest dan aduk selama 1 jam. Suspensi disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan aquadest sampai volume filtrat 250 ml. Pati yang terdapat sebagai residu pada kertas saring dicuci 5 kali dengan 10 ml eter biarkan eter menguap dari residu, kemudian cuci lagi dengan 150 ml alkohol 10%. Residu dipindahkan secara kuantitatif dari kertas saring kedalam erlenmeyer dengan pencucian 200 ml aquadest dan tambahkan 20 ml HCl \pm 25% (berat jenis 1,125), tutup erlenmeyer dan panaskan dengan *water bath* selama 2,5 jam. Setelah dingin netralkan dengan NaOH 45% dan encerkan sampai volume 450 ml kemudian saring. Tentukan kadar gula yang dinyatakan sebagai glukosa dari filtrat yang diperoleh.

$$\text{Kadar Pati} = \text{Kadar gula reduksi} \times \frac{BM \text{ pati}}{m \times BM \text{ gula reduksi}}$$

Keterangan: $\frac{BM \text{ pati}}{m \times BM \text{ gula reduksi}} = \frac{162 \text{ m}}{180 \text{ m}} = 0,9$

c. Analisis Kadar Lemak

Kadar lemak pada tepung mocaf ditentukan berdasarkan dengan metode AOAC (2003). Tepung mocaf sebanyak 2 gram dibungkus dengan kertas saring diletakkan di dalam ekstraktor dan diektrak dengan *solvent n-hexane* teknis pada suhu 75°C selama 4 jam. Dengan 4 jam ekstraksi ini, lipida dalam *mangrove* sudah benar-benar terekstrak semua sehingga prosesnya dapat dihentikan. Selanjutnya, hasil yang diperoleh berupa campuran *lipid* dan *n-hexane* didistilasi untuk memisahkan keduanya. Ekstrak berupa lipida dimasukkan botol yang sebelumnya telah ditimbang. Dipanaskan lagi pada suhu 80°C untuk mendapatkan hasil yang murni. Kemudian ditimbang hasilnya. Kadar lemak dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Kadar Lemak} = \frac{B - C}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A : berat contoh

B : berat botol + lemak

C : berat botol kosong

d. Analisis Kadar Abu

Kandungan abu dalam tepung MOCAF ditentukan berdasarkan dengan metode AOAC (2003) dalam Setyo dkk. (2012). Untuk penentuan abu, cawan kosong dan bersih dipanaskan pada suhu 600°C selama 1 jam dalam *muffle furnace*. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang (W_1). 1 gram sampel tepung MOCAF ditaruh dalam cawan. Kemudian cawan tersebut diletakkan dalam *muffle furnace* pada suhu 400°C selama 6 jam. Kemudian cawan

didinginkan dalam desikator dan ditimbang (W_2). Persen abu dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{W_2 - W_1}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

e. Analisis Kadar Serat

Sampel ditimbang sebanyak 1-2 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml, kemudian ditambahkan 50 ml H_2SO_4 1,25% panaskan dan direflux selama 30 menit, setelah itu ditambahkan 50 ml NaOH 3,25% dan direflux selama 30 menit. Sampel yang telah dipanaskan, kemudian disaring panas-panas dengan kertas saring Whatman 42 yang telah diketahui bobotnya. Setelah disaring, lalu sampel dicuci dengan 50 ml H_2SO_4 1,25% dan 50 ml alkohol 36%, kemudian endapan dikeringkan dalam oven pada suhu $105^\circ C$ dan timbang sampai bobot konstan. Serat kasar dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ serat kasar} = [(a-b)/c] \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat kertas saring ditambah sampel yang telah dikeringkan (g)

b = berat kertas saring (g)

c = berat sampel (g)

f. Analisis Kadar Air

Kadar air ditentukan berdasarkan dengan metode AOAC (2013) dalam Setyo dkk. (2012) dengan mengeringkan sampel tepung MOCAF (W_1) ke dalam oven pada suhu $80^\circ C$ kemudian didinginkan di dalam desikator dan ditimbang. Pengeringan dilakukan berulang ulang hingga beratnya konstan (W_2). Persen *moisture content* dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Moisture} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

g. Analisis Kadar HCN

Analisis kadar HCN ditentukan berdasarkan dengan metode AOAC (2003) dalam Setyo dkk. (2012). Timbang sampel sebanyak 15 g lalu tambahkan dengan 100 ml aquades dan diletakkan pada labu Kjeldahl, kemudian dilakukan perendaman selama 2 jam. Setelah itu, ditambahkan lagi 100 ml aquades, kemudian didistilasi dengan uap (steam). Tampung distilat dalam erlenmeyer berisi 20 ml NaOH 2.5%. Setelah distilat mencapai 150 ml, tambahkan 8 ml NH_4OH , 5 ml KI 5% dan dititrasi dengan 0.02 N AgNO_3 sampai terjadi kekeruhan (letakkan kertas karbon hitam dibawah labu titrasi).

$$\text{Bobot HCN} = \frac{\text{ml AgNO}_3 (\text{blangko} - \text{sampel})}{\text{ml blangko}} \times \frac{20 \cdot \text{AgNO}_3}{\text{kg sampel}} \times 0,54 \text{ g}$$

h. Uji Organoleptik

Dilakukan pada pengamatan hari terakhir setelah didapatkan tepung MOCAF. Pengujian organoleptik bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil tangkapan dengan menggunakan indera sensori. Pengujian organoleptik dilakukan dengan menggunakan alat berupa *score sheet* organoleptik aroma/bau, tekstur/kekasaran tepung MOCAF. Pada *score sheet* digunakan angka 1 sebagai nilai tertinggi dan angka 4 untuk nilai terendah. Pengujian organoleptik dilakukan oleh 10 panelis dengan kriteria sebagai berikut.

a. Aroma/bau

Skala	Keterangan
1	Tidak berbau
2	Sedikit berbau
3	Apek
4	Sangat apek

Selanjutnya nilai aroma tepung MOCAF dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ aroma} = \frac{\text{jumlah nilai mutu panelis}}{\text{jumlah panelis}} \times 100\%$$

b. Tekstur

Skala	Keterangan
1	Sangat halus
2	Halus
3	Sedikit kasar
4	Kasar

Selanjutnya tekstur tepung MOCAF dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ tekstur} = \frac{\text{jumlah nilai mutu panelis}}{\text{jumlah panelis}} \times 100\%$$

c. Warna

Pengujian warna dilakukan untuk mengetahui tingkat kecerahan pada tepung mocaf. Pengujian warna dilakukan dengan menggunakan *chromameter* dan dihitung dengan rumus:

$$E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$$

Keterangan:

E = intensitas warna

L = kecerahan sampel (warna kromatis, 0=hitam sampai 100=putih)

a = warna kromatik merah (+) hingga hijau (-)

b = warna kromatik biru (-) hingga kuning (+)

E. Analisis Data

Analisis data kadar abu, serat, protein, air, karbohidrat, pati, HCN, organoleptik aroma, tekstur dan derajat keputihan tepung dilakukan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang dicobakan, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan $\alpha = 5\%$.