

### III. TATA CARA PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pasca Panen, Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Gajah Mada dan Chem-Mix Pratama laboratorium. Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Agustus 2017 hingga November 2017.

#### B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini: 5 varietas ubi kayu, yaitu Gatotkaca, Kirek, Gambyong, Bamban, dan Jawa yang dipanen pada umur panen 9, 10, dan 11 bulan yang diperoleh dari petani ubi kayu di Desa Bedoyo, Kecamatan Ponjong, Kabupaten Gunung Kidul. Bahan yang digunakan antara lain aquadest, bakteri *Lactobacillus plantarum*, medium perbanyakan MRS (*Medium de man, Rogosa and Sharpe*), kalium sulfat, natrium hidroksida 50%, asam sulfat pekat, asam klorida 0,1 N, larutan asam tartrat, HCl 25 %, indikator merah metil 0,1%, NaOH 45 %, 0,02 N AgNO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub>, dan AgNO<sub>3</sub>.

Alat yang digunakan dalam proses pembuatan MOCAF antara lain pisau, ember, alat perajang, oven, timbangan, mesin penggiling tepung, dan ayakan tepung. Sedangkan alat untuk analisis data antara lain, labu takar, tabung reaksi, *erlenmeyer*, alat penggiling tepung, blander, ayakan 80 mesh, plastic, *glassware*, neraca analitik, cawan petri, pipet volum, pipet mikro, Bunsen, desikator, kertas saring, labu destilasi,

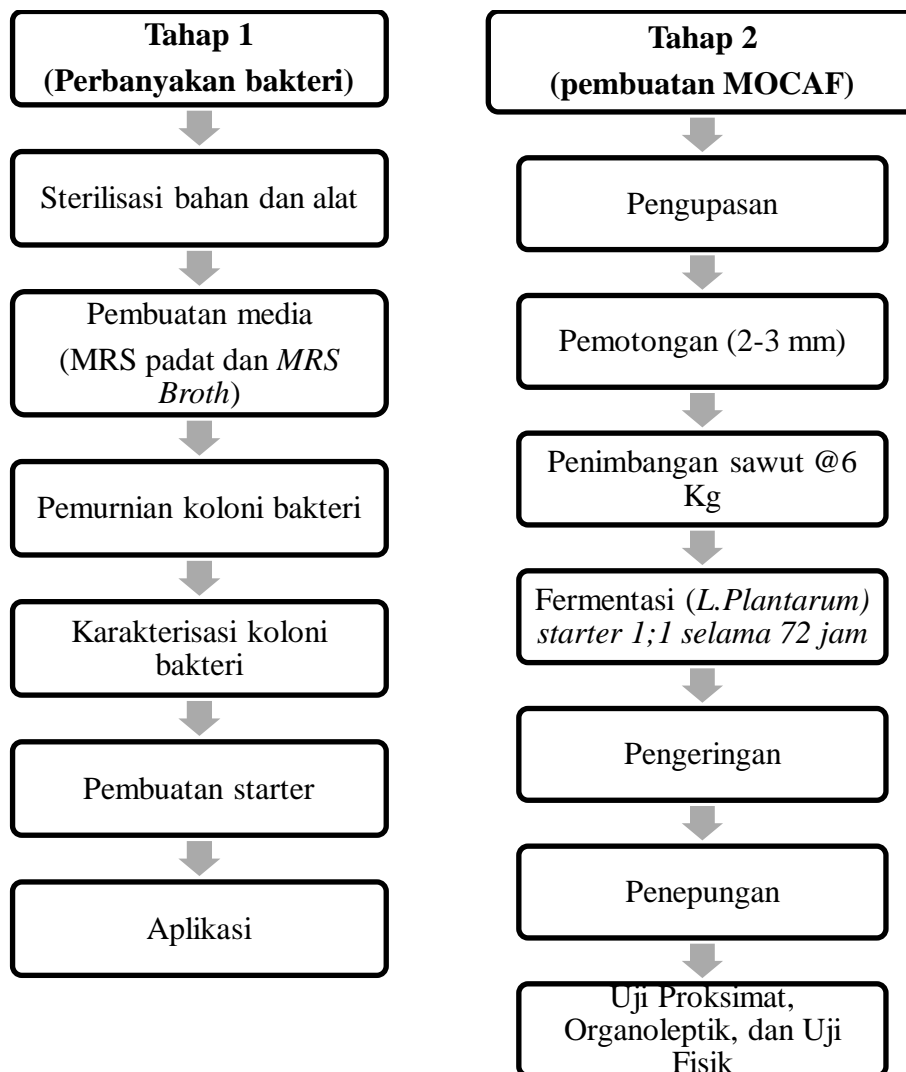
beaker glass 250 ml, gelas ukur, spatula kaca, sendok, kompor, penangas air, refluks, tepung terigu, dan RVA (*Rapid Visco Analyzer*).

### **C. Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan metode penelitian eksperimen dengan rancangan percobaan dua faktor yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor pertama yaitu varietas Gambyong, Gatotkaca, Baban, Kirek, dan Jawa. Faktor kedua yaitu umur panen ubi kayu 9 bulan, 10 bulan, dan 11 bulan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 45 unit percobaan.

### **D. Tata Cara Penelitian**

Cara penelitian dimulai dari isolasi bakteri *Lactobacillus plantarum* yang akan digunakan saat fermentasi. Bakteri *L.plantarum* juga dilakukan karakterisasi untuk memastikan bahwa koloni bakteri yang tumbuh adalah *L.plantarum*. Selanjutnya tahap pembuatan tepung MOCAF dari proses ubi kayu, fermentasi hingga pengeringan dan penggilingan. Tata cara penelitian dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Bagan Rancangan Penelitian

### Tahap 1: Perbanyak *Lactobacillus plantarum*

Formulasi bakteri *L. plantarum* pertama dilakukan dengan sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup> C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Selanjutnya pembuatan media MRS ( media *de man*, *Rogosa* dan *Sharpe*) agar dan MRS *Broth*. Bakteri *L. plantarum* diperoleh dari kultur koleksi LIPI Cibinong.

Selanjutnya diambil 1 ose dan dipindahkan kedalam *petridish* dan diinokulasi selama 48 jam (lampiran 1 1a), selanjutnya dilakukan karakterisasi dan cat gram untuk memastikan *L. plantarum*. Selanjutnya dilakukan perbanyakan inokulum *L. plantarum* dengan mengambil 1 ose biakan murni isolate dan diinokulasi ke media *MRS Broth* 10 ml dalam tabung reaksi. Setelah diinokulasi selama 48 jam, diambil 1 ose untuk diinokulasi ke Erlenmeyer yang telah berisi media *MRS Broth* dengan perhitungan 10% kebutuhan aplikasi, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Inokulum *L. plantarum* siap diaplikasikan untuk fermentasi.

## **Tahap 2: Pembuatan Tepung MOCAF**

### a. Pengupasan

Ubi kayu yang telah dipanen (Lampiran II 2a) dilakukan penyortiran yang bertujuan untuk memilih ubi kayu rusak, busuk dan ubi kayu normal (Lampiran II 2b). Selanjutnya di kupas menggunakan pisau (Lampiran II 2c) tujuan pengupasan untuk menghilangkan kulit luar. Selanjutnya ubi kayu dicuci bersih menggunakan air yang mengalir (Lampiran II 2d).

### b. Pemotongan

Selanjutnya dilakukan pengirisan, proses ini merupakan proses pengecilan ukuran ubi kayu hal ini bertujuan untuk memudahkan saat proses fermentasi dan saat pengeringan. Ubi kayu dipotong dengan ketebalan 2-3 mm seperti pada (Lampiran II 2e). Kemudian ubi kayu yang telah dipotong-potong (sawut) ditimbang, hal ini bertujuan untuk memudahkan banyaknya air yang digunakan

untuk proses fermentasi dan starter *L. plantarum* yang akan digunakan, sawut ditimbang seberat 6 kg pada masing masing sampel perlakuan.

c. Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan merendam ubi kayu dengan air dan ditambahkan inokulum *L. plantarum*. Sawut singkong yang telah ditimbang selanjutnya ditambahkan air dengan perbandingan 1:1 dengan banyaknya bahan yang difermentasi. Sehingga air yang ditambahkan sebanyak 6 liter. Kemudian ditambahkan starter *L. plantarum* sebanyak 1% dari banyaknya bahan yang difermentasi yaitu sebanyak 60 ml starter *L. plantarum* (Lampiran II 2f). Selanjutnya di aduk dan ditutup. Proses fermentasi dilakukan selama 72 jam (Lampiran II 2g) setelah proses fermentasi selesai (Lampiran II 2h), selanjutnya dibilas menggunakan air mengalir dan dilakukan penyaringan atau penirisan (Lampiran II 2i) untuk membuang air fermentasi.

d. Pengeringan

Proses selanjutnya yaitu pengeringan, pengeringan sawut hasil fermentasi dengan cara menggunakan sinar matahari (Lampiran II 2j). Namun saat proses penjemuran cuaca mendung maka pengeringan menggunakan alat pengering oven dengan suhu 110<sup>0</sup>C. Pengeringan sawut hingga *chips* mudah dipatahkan. Saat proses pengeringan menggunakan sinar matahari maupun menggunakan oven, chip dibolak balik agar *chip* kering secara merata.

e. Penepungan

*Chip* yang telah kering (Lampiran II 2k) dilakukan penggilingan sesuai dengan varietas masing masing (Lampiran II 2l). Selanjutnya tepung diayak menggunakan ayakan tepung, hal ini bertujuan untuk membersihkan tepung MOCAF dari kotoran (serat ubi kayu, kotoran lain). Hasil tepung yang telah diayak selanjutnya dikemas menggunakan plastik dan ditutup rapat.

**E. Parameter yang Diamati**

1. Analisis Proksimat

Dilakukan pengujian kandungan nutrisi pada ubi kayu antara lain kadar air, kadar protein, kadar pati, kadar serat pangan, kadar HCN (HCN) dan derajat putih.

a. Kadar Air

Pengujian kadar air menggunakan metode pengeringan menggunakan oven (AOAC, 2005). Penentuan kadar air diawali dengan penimbangan cawan timbang tanpa isi (a), kemudian ditambahkan bahan sebanyak  $\frac{3}{4}$  cawan timbang dan dilakukan penimbangan (b). Selanjutnya cawan timbang yang telah berisi bahan dimasukkan dalam oven dengan suhu 100-105 °C selama 3 jam. Kemudian cawan timbang didinginkan dalam desikator selama 15 menit, setelah cawan dingin selanjutnya dilakukan penimbangan hingga konstan (c). Berat akhir yang telah konstan yaitu air yang terkandung dalam bahan telah mengalami penguapan dan tersisa padatan dan air yang terikat kuat dalam bahan. Selanjutnya dilakukan

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{(b - a)(c - a)}{(b - a_)} \times 100 \%$$

perhitungan untuk mengetahui presentase kadar air pada bahan. Rumus untuk menentukan kadar air yaitu:

Keterangan :

a = Berat cawan kosong

b = berat cawan yang telah berisi bahan

c = berat akhir (konstan)

b. Kadar Protein

Kandungan protein ditentukan dengan cara menganalisis kandungan nitrogen dalam sampel, dan hasilnya dikonversikan dengan mengalikan kadar nitrogen yang diperoleh dengan faktor koreksi sebesar 6,25. Hasil konversi tersebut merupakan kandungan protein dalam sampel. Pengujian kadar protein menggunakan metode Kjeldahl dengan cara menimbang sampel sebanyak 0,2 gram dan dimasukkan dalam labu Kjeldahl. Selanjutnya ditambahkan 0,7 gram katalis N (250 gram  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 5 gram  $\text{CuSO}_4$  + 0,7 gram Selenium/ $\text{TiO}_2$ ), selanjutnya ditambahkan 4 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Selanjutnya didestruksi dalam almari asam hingga warna berubah menjadi hijau jernih. Selanjutnya dilakukan pendinginan dan ditambahkan 10 ml aquadest. Setelah itu, didestilasi dan menambahkan  $\text{NaOH} - \text{Tio}$  ( $\text{NaOH}$  40 % +  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  5 %) sebanyak 20 ml selanjutnya destilat ditampung menggunakan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 % yang telah ditambahkan indikator Mr-BCG. Selanjutnya destilasi dijalankan hingga volume destilat mencapai 60 ml (warna merah bata berubah menjadi biru). Setelah volume mencapai 60 ml, destilasi dihentikan. Selanjutnya destilat di titrasi menggunakan larutan standar  $\text{HCl}$  0,02 N hingga warna berubah dari biru menjadi merah muda. Volume titrasi yang diperoleh dicatat dan dihitung kadar protein menggunakan rumus :

$$\% \text{ Kadar Nitrogen} = \frac{\text{Vol titrasi} \times \text{Normalitas HCl (0,02 N)} \times \text{Berat atom (14,008)}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar protein (\%)} = \text{Kadar nitrogen} \times 6,25 \text{ (faktor konversi)}$$

Rumus Kadar protein *Dry Basis* (db)

$$\% \text{ Kadar protein (db)} = \frac{\% \text{ kadar Nitrogen}}{(100 - \text{kadar air})\%} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar protein} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\% \text{ kadar protein (db)}}{100} \times 1000 \text{ gram}$$

### c. Kadar Pati

Uji kadar pati dilakukan menggunakan metode Hidrolisis Asam. Cara kerja yang dilakukan yaitu dengan memasukkan 1 gram sampel ke dalam gelas piala 250 ml dan ditambahkan 50 ml air suling lalu diaduk. Suspense tersebut disaring menggunakan kertas saring dan kemudian dicuci menggunakan air hingga volume filtrat mencapai 250 ml. Residu dalam kertas saring dibersihkan dengan cara mencucinya menggunakan 200 ml air yang dimasukkan kedalam Erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan 20 ml HCL 25 %. Kemudian ditutup menggunakan pendingin balik dan dipanaskan diatas penangas air hingga mendidih selama 2,5 jam. setelah terhidrolisis, sampel didinginkan dan dinetralkan menggunakan larutan NaOH 1 N. selanjutnya diencerkan hingga volume 500 ml dan disaring kembali menggunakan kertas saring. Selanjutnya



menentukan kadar gula yang dinyatakan sebagai glukosa dari filtrate yang diperoleh dengan penetapan gula pereduksi. Berat glukosa yang didapat dikalikan dengan faktor konversi 0,9 yang merupakan kadar pati.

Penentuan kadar gula reduksi menggunakan metode Spektrofotometri Metode Nelson-Somogyi (Sudarmadji, 1997). Penentuan tersebut menggunakan kurva standar dengan cara membuat larutan glukosa standar sebanyak 10 mg glukosa anhidrat/100 ml. selanjutnya dari larutan tersebut diencerkan sebanyak 6 pengenceran sehingga didapat larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6 dan 10 mg/100 ml. selanjutnya menyiapkan 7 tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan 1 ml sebagai blanko. Selanjutnya ditambahkan reagensi Nelson ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 1 ml, dan tabung reaksi selanjutnya dipanaskan pada penagas air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya tabung didinginkan, setelah dingin ditambahkan dengan reagen Arsenomolybdat sebanyak 1 ml dan selanjutnya digojok hingga endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut kembali. Setelah semua endapan larut, ditambahkan 7 ml air suling dan digojok kembali hingga homogen. Kemudian larutan ditera nilai *optical density* (OD) dengan panjang gelombang 540 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan OD. Menentukan gula reduksi pada contoh, dengan cara menyiapkan larutan contoh yang memiliki kadar gula reduksi 2-8 mg/100 ml. selanjutnya mengambil larutan contoh yang jernih menggunakan pipet sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml reagensi Nelson dan selanjutnya dilakukan penyiapan kurva standar. Jumlah gula

reduksi ditentukan berdasarkan OD larutan contoh dan kurva standar larutan glukosa. Selanjutnya hasil presentase pati dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Pati} = \% \text{ gula reduksi} \times \text{Faktor konversi } 0,90$$

Rumus Perhitungan kadar pati Dry Basis (db)

$$\% \text{ Kadar pati (db)} = \frac{\% \text{ kadar pati}}{(100 - \text{kadar air})} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar pati} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\% \text{ kadar pati (db)}}{100} \times 1000 \text{ gram}$$

d. Uji Total kandungan HCN

Tujuan dari pengujian kadar HCN yaitu untuk mengetahui kandungan HCN dalam tepung MOCAF akibat dari proses fermentasi. Pengujian kadar HCN menggunakan metode Pikrat Basa Spectrofotometry. Langkah yang dilakukan yaitu dengan menimbang sebanyak 2 gram sampel, dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan 25 ml akuades. Selanjutnya filtrate disaring atau centrifuge, selanjutnya diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Selanjutnya tambahkan 5 ml pikrat basa 0,25 % (pH 11). Selanjutnya dipanaskan dalam media hidrolisis pada suhu 100 °C selama 30 menit. Apabila sampel mengandung HCN rendah, pikrat akan berwarna orange. Langkah selanjutnya dengan mendinginkan sampel dan menambahkan 4 ml akuades kedalam tabung reaksi. Larutan di *vortex* hingga homogeny,

selanjutnya membaca absoransi menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 480 nm. Data yang diperoleh dicatat dan dihitung menggunakan kurva stand dengan rumus:

$$Kadar\ HCN\ (ppm) = \frac{od\ sampel - 0,302}{13,39} \times \frac{25 \times 0,41' \times 1000}{Berat\ sampel}$$

e. Serat Pangan

Metode yang digunakan untuk analisis kadar serat pangan yaitu metode AOAC Pengujian serat pangan dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer. Selanjutnya menambahkan 0,1 ml enzim alpha amylase. Fungsi enzim tersebut untuk memotong ikatan O rantai amilosa atau amilopektin. Selanjutnya filtrate dipanaskan menggunakan penangas air pada suhu 100 °C selama 15 menit. Filtrat didinginkan dan ditambahkan 20 ml air destilasi dan menambahkan 5 ml HCL 1 N. Selanjutnya menambahkan pepsin 1 % sebanyak 1 ml kedalam Erlenmeyer yang berisi sampel, fungsi enzim ini sebagai pemotong protein. Selanjutnya dipanaskan kembali menggunakan penangas air selama 1 jam. lalu, Erlenmeyer diangkat dan menambahkan 5 ml NaOH 1 N dan menambahkan enzim beta amylase sebanyak 0,1 ml kedalam Erlenmeyer. Selanjutnya menutup Erlenmeyer dan dilakukan inkubasi dalam penangas air selama 1 jam. Selanjutnya sampel disaring menggunakan kertas saring konstan yang sebelumnya diketahui beratnya. Selanjutnya sampel dicuci menggunakan *ethanol* dan *aceton* sebanyak 2 kali dengan masing-masing sebanyak 10 ml.

Sampel yang telah dicuci selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 105 °C selama 1 malam, kemudian dilakukan pendinginan dalam desikator dan selanjutnya dilakukan penimbangan. Hasil penimbangan berat akhir menjadi serat pangan tak larut. Selanjutnya filtrat diatur volumenya menjadi 100 ml dan menambahkan 400 ml *ethanol* 95 % hangat. Filtrate diendapkan selama 1 jam, lalu disaring menggunakan kertas saring bebas abu, selanjutnya dilakukan pencucian kembali dengan *ethanol* dan *aceton* sebanyak dua kali. Filtrat yang telah dicuci dilakukan pengeringan menggunakan oven semalam dengan suhu 105 °C. Selanjutnya dilakukan pendinginan dalam desikator dan ditimbang berat akhir sebagai serat pangan terlarut. Kadar serat pangan dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Serat pangan total} = \text{Serat pangan terlarut} + \text{serat pangan tak terlarut}$$

Rumus kadar serat pangan (db)

$$\% \text{ Kadar serat pangan (db)} = \frac{\% \text{ kadar serat pangan}}{(100 - \text{kadar air})\%} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar serat pangan} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\% \text{ kadar serat pangan (db)}}{100} \times 1000 \text{ gram}$$

f. Derajat Putih

Pengujian derajat putih menggunakan metode Kromameter, prinsip kerja alat tersebut yaitu dengan pemantulan cahaya oleh sampel. Crp=omameter

memiliki lampu getar yang ditangkap oleh fotosel dan filter yang berguna untuk mencocokkan dengan standar *Commision Internazionale d'Eclairage* (CIE) dalam mengukur sinar yang dipantulkan oleh sampel. System output yang digunakan berupa *Judd-Hunter L a b* CIELAB. Sebelum alat digunakan terlebih dahulu dilakukan kalibrasi dengan standar derajat putih, yaitu BaSO<sub>4</sub> yang memiliki derajat putih 100 %. Setelah dilakukan kalibrasi, sampel dimasukan ke dalam wadah sampel yang tersedia hingga memadat, selanjutnya wadah ditutup. Wadah yang berisi sampel dimasukan kedalam tempat pengukuran, nilai derajat putih akan keluar pada layar (A) . Persentase derajat putih diukur menggunakan rumus :

$$\% DP = \frac{A}{\text{Nilai standar BaSO}_4 (110,8)} \times 100 \%$$

## 1. Uji Organoleptik

Pengujian sensoris dilakukan untuk menguji kesukaan warna dan aroma yang dilakukan dengan membandingkan tepung MOCAF. Pengujian ini dilakukan oleh penulis sebanyak 12 penulis.

### a. Warna

Pengamatan warna dilakukan dengan cara mengamati tepung MOCAF secara visual menggunakan panca indera penglihatan (mata). Pengujian warna pada tepung MOCAF bertujuan untuk mengetahui tingkat kesukaan warna pada tepun MOCAF dari berbagai varietas dan umur panen ubi kayu. Pengujian warna

menggunakan *score sheet* warna tepung MOCAF. Kriteria penilaian organoleptic

warna tepung MOCAF sebagai berikut :

- Skor 1 = Sangat putih
- Skor 2 = Putih
- Skor 3 = Sedikit kuning
- Skor 4 = Kuning
- Skor 5 = Sangat kuning

Selanjutnya hasil skor uji warna tepung MOCAF dapat dihitung menggunakan

rumus :

$$\text{Rata - rata skor} = \frac{\sum \text{skor mutu penelis} \times \text{mutu penelis}}{\text{Jumlah penelis}}$$

b. Aroma

Pengamatan aroma tepung MOCAF dilakukan dengan menggunakan panca indera penciuman (hidung). Tujuan dari pengujian ini yaitu untuk mengetahui kualitas hasil tepung MOCAF dari berbagai varietas dan umur panen ubi kayu. pengujian aroma dilakukan menggunakan skor nilai aroma tepung MOCAF. *Score sheet* menggunakan angka 1 sampai 5. Pengujian organoleptik aroma dilakukan oleh 12 penelis. berikut ini merupakan skor organoleptik aroma yang digunakan :

- Skor 1 = Tidak beraroma
- Skor 2 = Sedikit beraroma singkong
- Skor 3 = Beraroma singkong
- Skor 4 = Sangat beraroma singkong

Selanjutnya hasil skor uji aroma tepung MOCAF dihitung menggunakan

rumus :

$$\text{Rata - rata skor} = \frac{\sum \text{skor mutu penelis} \times \text{mutu penelis}}{\text{Jumlah penelis}}$$

## 2. Penentuan Sifat Fisik ubi kayu

Pengujian fisik tepung MOCAF menggunakan alat *Rapid Visco Analyser* (RVA). Alat RVA cara kerja menggunakan metode pemanasan dan pendinginan dan mengukur resistensi sampel pada penanganan dan pengadukan terkontrol. Pengujian sifat fisik menggunakan alat RVA ini menghasilkan antara lain viskositas puncak (*Peak viscosity*),  *Holding*,  *Breakdown*,  *Final Viscosity*,  *Setback*, waktu puncak gelatinisasi dan suhu gelatinisasi (*Pasting temp*).

### **B. Analisis Data**

Hasil penelitian dari berbagai perlakuan disajikan dalam bentuk grafik dan histogram. Data hasil pengamatan dianalisis dengan Sidik Ragam *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf kesalahan 5 %. Apabila terdapat beda nyata perlakuan maka dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* pada taraf 5%.