

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah komparatif, yaitu peneliti membandingkan kadar pati resisten yang terdapat dalam endapan dan ampas pisang kepok dengan melaksanakan prosedur yang dibuat oleh Megazyme serta menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

#### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2024 yang bertempat di laboratorium kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

#### **3.3. Variabel Penelitian**

##### **3.3.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas sering juga disebut dengan variabel independen. Variabel ini merupakan variabel yang menjadi sebab perubahan dari variabel dependen atau terikat (Ulfa, 2021). Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah perlakuan pemisahan pada proses ekstraksi endapan dan ampas pisang kepok.

##### **3.3.2. Variabel Terikat**

Variabel terikat disebut juga variabel dependen. Variabel ini merupakan variabel yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas (Ulfa, 2021). Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar pati resisten.

#### **3.4. Alat dan Bahan**

##### **3.4.1. Alat**

Pisau, loyang, oven Thermo Scientific, chopper, neraca analitik Ohaus, alu mortar, kaca arloji, *beaker glass* Pyrex (250 mL, 400 mL, 1000 mL, 2000 mL), *beaker glass* Approxi 600 mL spatula, batang pengaduk, labu ukur Iwaki 50 mL, labu ukur Pyrex (100 mL, 500 mL, 1000 mL), pH meter Eutech, *stirrer bar*, *hot plate* Thermo Scientific Cimarec, pipet ukur Iwaki 10 mL, gelas ukur Pyrex 50 mL, gelas ukur Iwaki 100 mL, corong gelas, bola pump, pipet tetes, mikropipet

Qlinipete, tabung polipropilen (15 mL dan 50 mL), tabung reaksi, rak tabung reaksi, rangkaian *shaking water bath* (*water bath* Memmert, *shaker* Gerhardt, wadah bak, aerator, selang, map plastik, dan kawat), *ice pack*, sentrifugasi Hettich, vortex Thermolyne, kuvet kuarsa, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu.

### 3.4.2. Bahan

Pisang kepok, aquabidest dari PT. IKAPHARMINDO PUTRAMAS, aquadest, asam maleat merck, natrium hidroksida merck 1.06498.5000, kalsium klorida dihidrat merck, asam asetat glasial merck 1.00063.2500, bubuk PAA/AMG (botol 1), *amyloglucosidase* (botol 2), GOPOD *reagent buffer* (botol 3), GOPOD *reagent enzymes* (botol 4), larutan standar D-glukosa (botol 5), dan *resistant starch control* (botol 6).

### 3.5. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1. Definisi Operasional Variabel

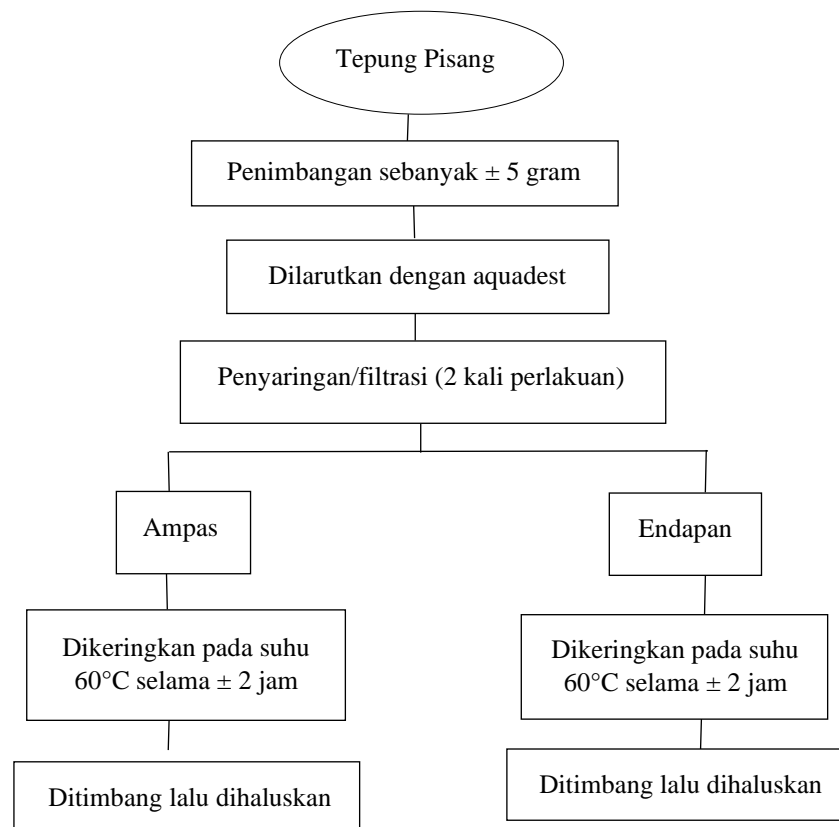
Variabel	Definisi	Satuan dan Alat Pengukuran	Skala Ukur
Perlakuan pemisahan	Pati pisang yang didapat dari perlakuan pemisahan endapan dan ampas ketika ekstraksi	-	Nominal
Kadar pati resisten	Pati resisten yang dihitung sebagai jumlah (gram) glukosa per 100 gram sampel	Hasil dari perhitungan kadar adalah persen (%) dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.	Rasio

### 3.6. Metode Penelitian

#### 3.6.1. Pembuatan Tepung Pisang

Pisang kepok sebanyak  $\pm 3$  kg dikupas dari kulitnya lalu daging buahnya dipotong tipis – tipis. Daging buah yang telah dipotong, disusun di atas loyang alumunium lalu dipanaskan pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  menggunakan oven sampai kering. Setelah kering, dihaluskan menggunakan chopper lalu diayak.

#### 3.6.2. Preparasi Sampel (Ekstraksi Pati Pisang)



Gambar 3. 1. Preparasi Sampel (Ekstraksi Pati Pisang)

Alumunium foil dipotong dengan ukuran  $10 \times 7$  cm, nantinya ini digunakan sebagai wadah atau alas ampas dan endapan saat akan dikeringkan. Ditimbang simplisia serbuk pisang sebanyak  $\pm 5$  gram lalu dilarutkan ke dalam 200 mL aquadest. Setelah larut, larutan simplisia pisang tersebut disaring menggunakan saringan 200 mesh. Ampas yang tertahan di saringan, dilarutkan kembali dengan filtrat dan dilakukan pengulangan penyaringan. Didapatkan ampas yang tertahan di saringan kemudian diratakan di atas alumunium foil. Filtrat yang diperoleh

dibuang untuk mendapatkan endapannya. Perlakuan ini dilakukan secara hati – hati agar endapan tidak ikut terbang. Kemudian endapan yang diperoleh diratakan di atas aluminium foil lalu dikeringkan pada suhu 60°C selama  $\pm$  2 jam. Ditimbang ampas dan endapan yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan alu mortar. Ampas dan endapan yang diperoleh merupakan hasil dari penyaringan sebanyak 2 kali.

### **3.6.3. Pembuatan Reagen**

#### **3.6.3.1. Dapar Natrium Maleat**

Dilartkan 2,9 gram asam maleat ke dalam aquabidest sebanyak  $\pm$  250 mL. Jika sudah larut, sesuaikan pH larutan tersebut hingga menjadi pH 6,0 dengan menambahkan natrium hidroksida 4 M ke dalamnya. Setelah didapatkan pH yang diinginkan, ditambahkan 0,15 gram kalsium klorida dihidrat lalu diaduk hingga homogen. Larutan dituangkan ke dalam labu ukur 500 mL lalu ditambahkan aquabidest hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen. Larutan dapar yang sudah jadi dipindahkan ke dalam botol duran 500 mL dan disimpan dalam suhu 4°C. Larutan dapar ini disebut juga larutan dapar A.

#### **3.6.3.2. Dapar Natrium Asetat pH 3,8**

Diukur asam asetat glasial sebanyak 28,5 mL lalu dicampurkan ke dalam aquabidest sebanyak  $\pm$  250 mL. Sesuaikan pH larutan tersebut sampai menjadi pH 3,8 dengan menambahkan natrium hidroksida 4 M. Setelah diperoleh pH yang diinginkan, ditambahkan pula 0,37 gram kalsium klorida dihidrat lalu diaduk hingga larut. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL lalu ditambahkan aquabidest hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dapar yang sudah jadi dipindahkan ke dalam botol duran 500 mL dan disimpan dalam suhu ruang. Larutan dapar ini disebut juga larutan dapar B.

#### **3.6.3.3. Dapar Natrium Asetat pH 4,5**

Diukur asam asetat glasial sebanyak 2,85 mL lalu dicampurkan ke dalam aquabidest sebanyak  $\pm$  250 mL. Sesuaikan pH larutan tersebut hingga menjadi pH 4,5 dengan menambahkan natrium hidroksida 1 M ke dalamnya. Jika pH sudah sesuai, larutan dimasukkan ke labu ukur 500 mL lalu ditambahkan aquabidest hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dapar yang sudah jadi,

dipindahkan ke dalam botol duran 500 mL dan disimpan dalam suhu 4°C. Larutan dapar ini disebut juga larutan dapar C.

#### **3.6.3.4. Reagen GOPOD**

Pembuatan reagen GOPOD menggunakan botol 3 yang berisi GOPOD *reagent buffer* serta botol 4 yang berisi GOPOD *reagent enzymes*. Langkah pertama adalah mengencerkan isi botol 3 dengan 1000 mL aquabidest dan larutan ini disebut dengan larutan 3. Selanjutnya, dilarutkan isi botol 4 menggunakan larutan 3 secukupnya. Isi botol 4 yang telah larut kemudian dipindahkan ke labu ukur yang berisi larutan 3. Labu ukur yang berisi reagen GOPOD ini dibungkus dengan aluminium foil untuk melindungi reagen dari cahaya.

Setelah reagen GOPOD selesai dibuat, reagen ini dipindahkan ke beberapa tabung polipropilen berukuran 50 mL supaya tidak kesusahan saat mengambil reagen dalam labu ukur 1 liter. Jadi proses pengujian akan berjalan efektif dan efisien. Sesudah dipindahkan, reagen ini disimpan dalam *freezer*. Reagen GOPOD akan stabil selama 3 bulan jika disimpan pada suhu 2-5°C atau bisa lebih dari 12 bulan jika disimpan dalam suhu ~10°C.

#### **3.6.3.5. AMG Encer**

Diambil 1 mL isi dari botol 2 yang berisi *amyloglucosidase* lalu diencerkan dalam 30 mL dapar natrium asetat (pH 4,5) dan diaduk sampai homogen.

#### **3.6.3.6. Larutan PAA/AMG**

Dilarutkan 0,1 gram bubuk PAA/AMG yang ada dalam botol 1 ke dalam 5 mL dapar natrium maleat. Proses pelarutan dilakukan pada magnetic stirrer selama 5 menit. Setelah larut, disimpan di es selama digunakan dan waktu penggunaan hanya bisa digunakan 4 jam setelah dibuat.

#### **3.6.3.7. Etanol 95% dan 50%**

##### **3.6.3.7.1 Etanol 95%**

Diambil 49 mL etanol 96% lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian ditambahkan dengan aquabidest sampai tanda batas dan dihomogenkan.

### **3.6.3.7.2 Etanol 50%**

Diambil 78 mL etanol 96% lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 150 mL. Kemudian ditambahkan dengan aquabidest sampai tanda batas dan dihomogenkan.

### **3.6.3.8. NaOH 4 M; 1 M; dan 1,7 M**

#### **3.6.3.8.1 NaOH 4 M**

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dengan aquabidest secukupnya. Setelah larut, larutan NaOH dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan aquabidest sampai tanda batas dan dihomogenkan.

#### **3.6.3.8.2 NaOH 1 M**

Diambil 25 mL larutan NaOH 4 M lalu dimasukkan ke labu ukur 100 mL. Ditambahkan aquabidest sampai tanda batas dan dihomogenkan.

#### **3.6.3.8.3 NaOH 1,7 M**

Dilarutkan 3,4 gram NaOH dengan aquabidest secukupnya. Setelah larut, larutan NaOH dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan aquabidest sampai tanda batas dan dihomogenkan.

### **3.6.4. Proses Pemisahan Pati Resisten dan Pati Non-Resisten**

Sampel ditimbang secara akurat sebanyak  $100 \pm 5$  mg dan dimasukkan ke tabung polipropilen. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 6 replikasi. Ditambahkan 3,5 mL buffer natrium maleat pH 6,0 ke masing – masing tabung. Semua tabung ditutup lalu dicampur isinya menggunakan vortex selama 5 detik. Letakkan semua tabung ke dalam *waterbath* bersuhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan biarkan isi dalam tabung mencapai suhu seimbang selama 5 menit.

Keenam tutup tabung dibuka lalu ditambahkan dengan 0,5 mL larutan PAA/AMG ke tiap tabung menggunakan mikropipet. Tabung ditutup kembali lalu dipasang pada rangkaian *shaking waterbath* dengan posisi horizontal. Dilakukan proses inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan pengocokan terus menerus selama tepat 4 jam.

Tabung dikeluarkan satu per satu dari penangas air dan dibersihkan sisa air yang ada pada permukaan tabung dengan tisu. Semua tutup tabung dilepaskan lalu

ditambahkan 4 mL etanol 95% ke tiap tabung. Tabung ditutup kembali dan dilakukan pencampuran menggunakan vortex. Setelah tercampur rata, semua tutup tabung dilepas dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Dari proses sentrifugasi ini didapatkan 2 fasa, yaitu fasa cair dan fasa padat. Fasa cair yang disebut dengan larutan supernatan sedangkan fasa padat yang disebut dengan pelet atau endapan. Larutan supernatan dituang ke tabung polipropilen 50 mL dan disimpan sebagai pati non-resisten. Pastikan pelet atau endapannya tidak ikut tertuang.

Pelet atau endapan disuspensikan kembali dalam 2 mL etanol 50% lalu diaduk kuat – kuat menggunakan vortex. Ditambahkan lagi 6 mL etanol 50% lalu tabung ditutup dan isinya dicampur secara menyeluruh dengan cara inversi. Dilepaskan tutup tabung lalu disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Larutan supernatan yang diperoleh, dituangkan ke dalam tabung pati non-resisten yang sudah didapatkan sebelumnya. Dilakukan pengulangan langkah suspensi dan sentrifugasi sekali lagi. Larutan supernatan yang diperoleh digabungkan dengan larutan supernatan sebelumnya untuk nantinya dilakukan pengukuran pati non-resisten sedangkan endapan atau pelet yang didapat digunakan untuk pengukuran pati resisten. Setelah selesai pada langkah ini, pengujian dapat diberhentikan dan dilanjutkan pada hari berikutnya.

### **3.6.5. Pengukuran Kadar Pati Resisten**

Semua tabung yang berisi pelet atau endapan diberi *stirrer bar* dan ditambahkan dengan 2 mL NaOH yang sudah dingin. Endapan yang sudah diperoleh sebelumnya disuspensikan kembali dengan cara diaduk selama  $\pm 20$  menit di dalam sebuah penangas es yang berada di atas *magnetic stirrer*.

Sambil masih diaduk di atas *magnetic stirrer*, dilakukan penambahan 8 mL buffer natrium asetat (pH 3,8) ke setiap tabung. Kemudian segera ditambahkan dengan 0,1 mL AMG (botol 2) lalu diaduk sampai homogen. Setelah itu, semua tabung dimasukkan ke waterbath bersuhu 50°C untuk dilakukan proses inkubasi dengan dilakukan juga pencampuran intermiten, yaitu sesekali divortex.

Setelah inkubasi selesai, dilakukan proses untuk sampel yang mengandung pati resisten >10%. *Stirrer bar* yang ada di dalam tabung propilen dikeluarkan

terlebih dahulu menggunakan *stirrer bar* lain yang ditempelkan di luar permukaan tabung. Nantinya *stirrer bar* yang ada di dalam tabung akan tertarik oleh *stirrer bar* lain dan bisa dikeluarkan karena sejatinya *stirrer bar* adalah magnet. Dipindahkan isi yang berada di tabung polipropilen ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan aquabidest sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diambil alikuot dari larutan tersebut sebanyak 10 mL dan selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.

Sembari menunggu proses sentrifugasi selesai, disiapkan blanko serta standar glukosa untuk pengukuran absorbansi di spektrofotometer. Reagen blanko dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 mL buffer natrium asetat (pH 4,5) dan 3 mL reagen GOPOD. Untuk standar glukosa dibuat dengan mencampurkan 0,1 mL D-glukosa (botol 5) dan 3 mL reagen GOPOD. Larutan standar ini dibuat secara *quadruplicate* atau dibuat sebanyak 4 replikasi. Nantinya, larutan blanko dan standar glukosa akan diinkubasi bersamaan dengan larutan sampel.

Secara duplo, dipindahkan 0,1 mL supernatan hasil sentrifugasi ke tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 3 mL reagen GOPOD. Setelah itu, dilakukan proses inkubasi bersamaan dengan larutan blanko dan standar glukosa pada waterbath bersuhu 50°C selama 20 menit. Selanjutnya diukur serapan atau absorbansi tiap larutan pada panjang gelombang 510 nm terhadap blanko.

### **3.6.6. Pengukuran Kadar Pati non-Resisten**

Gabungan larutan supernatan yang telah diperoleh saat proses pemisahan pati resisten dan non-resisten dipindahkan ke labu ukur 100 mL. Kemudian tiap labu ukur ditambahkan aquabidest hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen. Setelah itu secara duplo, dipindahkan 0,1 mL alikuot dari larutan tersebut ke tabung reaksi. Ditambahkan dengan 0,1 mL AMG encer lalu diinkubasi pada waterbath bersuhu 50°C selama 30 menit.

Sambil menunggu proses inkubasi selesai, dipersiapkan blanko dan standar glukosa. Blanko dibuat dengan mencampurkan 0,2 mL buffer natrium asetat (pH 4,5) dan 3 mL reagen GOPOD. Untuk standar glukosa dibuat secara *quadruplicate* atau dibuat sebanyak 4 replikasi dengan cara mencampurkan 0,1 mL D-glukosa (botol 5); 0,1 mL buffer natrium asetat (pH 4,5); dan 3 mL reagen



GOPOD. Nantinya, larutan blanko dan standar glukosa akan diinkubasi bersamaan dengan larutan sampel.

Setelah selesai proses inkubasi, larutan sampel ditambahkan dengan 3 mL reagen GOPOD dan dilakukan proses inkubasi lagi bersamaan dengan larutan blanko dan standar glukosa pada waterbath bersuhu 50°C selama 20 menit. Selanjutnya diukur serapan atau absorbansi tiap larutan pada panjang gelombang 510 nm terhadap blanko.

### **3.7. Penyajian dan Analisis Data**

#### **3.7.1. Penyajian data**

Dari penelitian pengukuran kadar pati resisten yang dilakukan, diperoleh data absorbansi endapan dan ampas pisang kepok pada panjang gelombang 510 nm.

##### **3.7.1.1. Pengukuran Pati Resisten Sampel Endapan**

Tabel 3. 2. Data Absorbansi dan Kadar Pati Resisten Sampel Endapan

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Standard 1		
Standard 2		
Standard 3		
Standard 4		
Replikasi 1A		
Replikasi 1B		
Replikasi 2A		
Replikasi 2B		
Replikasi 3A		
Replikasi 3B		
Replikasi 4A		
Replikasi 4B		
Replikasi 5A		
Replikasi 5B		

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Replikasi 6A		
Replikasi 6B		

### 3.7.1.2. Pengukuran Pati Non-Resisten Sampel Endapan

Tabel 3. 3. Data Absorbansi dan Kadar Pati Non-Resisten Sampel Endapan

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Standard 1		
Standard 2		
Standard 3		
Standard 4		
Replikasi 1A		
Replikasi 1B		
Replikasi 2A		
Replikasi 2B		
Replikasi 3A		
Replikasi 3B		
Replikasi 4A		
Replikasi 4B		
Replikasi 5A		
Replikasi 5B		
Replikasi 6A		
Replikasi 6B		

### 3.7.1.3. Pengukuran Pati Resisten Sampel Ampas

Tabel 3. 4. Data Absorbansi dan Kadar Pati Resisten Sampel Ampas

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Standard 1		
Standard 2		
Standard 3		
Standard 4		

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Replikasi 1A		
Replikasi 1B		
Replikasi 2A		
Replikasi 2B		
Replikasi 3A		
Replikasi 3B		
Replikasi 4A		
Replikasi 4B		
Replikasi 5A		
Replikasi 5B		
Replikasi 6A		
Replikasi 6B		

#### 3.7.1.4. Pengukuran Pati Non-Resisten Sampel Ampas

Tabel 3. 5. Data Absorbansi dan Kadar Pati Non-Resisten Sampel Ampas

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Standard 1		
Standard 2		
Standard 3		
Standard 4		
Replikasi 1A		
Replikasi 1B		
Replikasi 2A		
Replikasi 2B		
Replikasi 3A		
Replikasi 3B		
Replikasi 4A		
Replikasi 4B		
Replikasi 5A		
Replikasi 5B		

Nama Sampel	Absorbansi	Kadar Pati (%)
Replikasi 6A		
Replikasi 6B		

### 3.7.2. Analisis Data

Data absorbansi dari pengukuran pati resisten dan non resisten sampel ampas dan endapan yang sudah diperoleh kemudian diolah dengan excel dari Megazyme yang disebut dengan Mega-Calc untuk mendapatkan kadarnya. Setelah didapat semua kadarnya dilanjutkan dengan uji statistik. Langkah dalam pengujian statistik diawali dengan mencari normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk lalu dilanjutkan mencari perbedaan kadar pati resisten dalam endapan dan ampas menggunakan uji Kruskal Wallis.

Pengambilan keputusan dari uji normalitas dilakukan menurut probabilitas (*Asymtotic Significant*), yaitu data berdistribusi normal jika probabilitas lebih dari ( $>$ ) 0,05 sedangkan data berdistribusi tidak normal ketika probabilitas kurang dari ( $<$ ) 0,05 (Agustin & Permatasari, 2020). Begitu pula dengan pengambilan keputusan dari uji Kruskal Wallis, yaitu  $H_0$  ditolak jika nilai signifikan lebih kecil dari ( $<$ )  $\alpha$ .  $H_0$  berarti tidak terdapat perbedaan kadar pati terhadap 2 sampel yang berbeda serta besarnya nilai  $\alpha$  adalah 0,05.