BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan jenis penelitian komperatif atau pebandingan dengan metode eksperimental. Dimana bertujuan untuk mengukur kadar pati resisten yang ada pada pisang tanduk yang diberi perlakuan yang berbeda-beda yaitu rebus, kukus dan rendam dengan natrium metabisulfit ($Na_2S_2O_5$). Penelitian ini menghasilkan kadar pati resisten dengan perbedaan perlakuan terhadap pisang tanduk untuk mengetahui pengaruh dari perbedaan perlakuan tersebut.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 hingga November 2024 yang dimulai dari preparasi sampel hingga pengolahan data. Penelitian dilakukan pada laboratorium Analisis Makanan dan Minuman, Jurusan Analisis Farmasi dan Makanan yang terletak pada Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pisang tanduk atau pisang byar.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisang tanduk dengan tingkat kematangan mentah yang memiliki kulit yang masih berwarna hijau dan tebal dengan daging yang berwarna putih.

3.4 Bahan dan Alat

3.4.1 Alat

Untuk melaksanakan penelitian ini memerlukan beberapa alat yaitu sebagai berikut : labu ukur 1000 ml, labu ukur 50 ml, labu ukur 100 ml, gelass beaker 1000 ml, gelas beaker 600 ml, gelas beaker 400 ml, gelas

beaker 250 ml, gelas beaker 50 ml, gelas ukur 100 ml, tabung propilen 50 ml, tabung propilen 15 ml, pipet ukur 10 ml, pipet tetes, mikropipet, tabung reaksi, gelas arloji, corong gelas, batang pengaduk, spatula, bulp, baki, aerator, waterbath, shaker Gerhardt, tabung reaksi, rak tabung reaksi, selang, neraca analitik, spatula, magnetic stirrer, mortar, alu, loyang, oven, hot plate, sentrifuge, freezer, refrigator, spektrofotometer Uv-Vis, kuvet kuarsa, vortex.

3.4.2 Bahan

Pisang tanduk mentah, natrium metabisulfit ($Na_2S_2O_5$), akuabides, akuadest, Natrium Hidroksida, asam maleat, asam asetat glasial, kalsium klorida, ethanol 96%, GOPOD, Reagen Buffer Megazyme, GOPOD reagent Enzyms Megazyme, Miture of purified PAA dan AMG, Amyloglucosidase, D-glukose standar solution, resistant starch control megazyme, tube pipet, alumunium foil, label, tisu.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen atau variabel terikat (Purwanto, 2019). Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah perbedaaan perlakuan pada pisang tanduk yaitu dikukus, direbus dan direndam dengan natrium metabisulfit.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang nilainya dipengaruhi atau yang menjadi akibat oleh variabel bebas atau variabel independen (Purwanto, 2019). Dalam penelitian variabel terikat yang digunakan adalah kadar pati resisten.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operational

Varibel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Kadar pati resisten buah pisang tanduk	Kadar pati resisten adalah perbandingan jumlah massa setara D-Glukosa dengan massa keseluruhan pati pisang tanduk.	Metode K-RAPRS Megazyme	Persen kadar dalam 0.1 gram sampel	Rasio
Pisang tanduk dengan Perbedaan perlakuan	Sampel diperlakukan rebus, kukus dan rendam dengan natrium metabisulfit: Perebusan adalah bahan yang akan direbus dimasukkan kedalam air yang telah mendidih hingga terendam seluruhnya Proses pengukusan adalah proses pemanasan yang umum digunakan pada pengolahan pangan dengan menggunakan uap air sehingga produk pangan tidak bersentuhan dengan air. Perendaman natrium metabisulfit ini dilakukan dengan merendam sampel dengan larutan natrium metabisulfit.	deskriptif	-	-

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pembuatan Serbuk Buah Pisang Tanduk

Pisang Tanduk *(Musa paradisiaca fa corniculata)* yang digunakan adalah pisang tanduk yang mentah. Pisang tanduk dengan perlakuan rebus dilakukan perebusan selama 20 menit, pisang tanduk dengan perlakuan kukus dilakukan pengukusan selama 20 menit dan pisang

tanduk dengan perlakuan rendam natrium metabisulfit dilakukan perendaman selama 20 menit . Setelah diberi perlakuan tersebut pisang dirajang tipis-tipis dan dikeringkan didalam oven hingga benar-benar kering dan kemudian dihaluskan dengan grinder sampai memiliki tekstur tepung.

3.7.2 Proses Pembuatan Pati

Preparasi sampel dilakukan menggunakan metode pemisahan sederhana yaitu dengan menggunakan metode dekantasi. Adapun caranya adalah dengan menimbang sebanyak 5 g tepung pisang tanduk pada masing-masing kode sampel. Selanjutnya serbuk pisang ditambahkan akuades sebanyak 50 mL pada masing-masing gelas beaker. Kemudian diaduk hingga merata. Larutan didiamkan hingga mengendap. Selanjutnya larutan didekantasi untuk memisahkan endapan dan pelarut dengan menuangkan pelarut pada gelas beaker. Mengulangi langkah penambahan akuades hingga pemisahan sebanyak 3 kali. Endapan yang didapat selanjutnya dipindahkan ke dalam alumunium foil yang telah disiapkan diatas loyang. Kemudian di oven pada suhu 60^{o}C hingga endapan benar-benar kering. Setelah kering endapan tersebut selanjutnya didinginkan didalam desikator dan dihaluskan menggunakan mortar dan alu. Selanjutnya dipindahkan pada plastic klip dan disimpan di desikator (Nurdiansyah, 2024).

3.7.3 Pembuatan Larutan Natrium Hidroksida 4M

Pada pembuatan Natrium Hidroksida 4 M yang harus dilakukan pertama yaitu menghitung kebutuhan Natrium Hidroksida yang harus ditimbang. Setelah itu sebanyak 16 g Natrium Hidroksida ditimbang dan dilarutkan dengan menggunakan akuades sebanyak 50 mL. Setelah Natrium Hidroksida telah larut semua, pindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan tanda bataskan dengan menggunakan akuabides. Larutan dihomogenkan dengan mengocok labu ukur.

3.7.4 Pembuatan Larutan Natrium Hidroksida 1 M

Pada pembuatan Natrium Hidroksida 1 M yang harus dilakukan pertama yaitu menghitung kebutuhan Natrium Hidroksida yang akan diambil dari larutan Natrium Hidroksida 4 M. Kemudian diambil 25 mL larutan Natrium Hidroksida 4 M dan masukkan kedalam labu ukur 100 mL. Akuabides ditambahkan hingga tanda batas. Larutan dihomogenkan dengan mengocok labu ukur.

3.7.5 Pembuatan Larutan Natrium Hidroksida 1,7 M

Pada pembuatan Natrium Hidroksida 1,7 M yang harus dilakukan pertama yaitu menghitung kebutuhan Natrium Hidroksida yang harus ditimbang. Setelah itu natirum hidroksida sebanyak 3,5 g ditimbang dan dilarutkan dengan menggunakan akuabides sebanyak 30 mL. Setelah Natrium Hidroksida telah larut semua, pindahkan kedalam labu ukur 50 mL dan tanda bataskan dengan menggunakan akuabides. Larutan dihomogenkan dengan mengocok labu ukur.

3.7.6 Pembuatan Larutan Reagen A (Buffer Natrium Maleat pH 6,0 + $CaCl_2$)

Asam maleat yang dibutuhkan dihitung terlebih dahulu. Selanjutnya ditimbang asam maleat sebanyak 2,9 gram dan dipindahkan kedalam gelas beaker. Kemudian larutkan asam maleat dengan akuabides sebanyak 300 ml. Selanjutnya larutan disesuaikan pH nya menjadi pH 6,0 dengan menambahkan Natrium Hidroksida 4 M. Alat pH meter sebelumnya telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan buffer pH 4, buffer pH 7, buffer pH 9. Setelah pH mencapai pH 6,0 selanjutnya Kalsium Klorida dihidrat ditambahkan sebanyak 0,15 gram dan pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL. Setelah itu akuabides ditambahkam hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dipindahkan ke dalam botol duran yang telah diberi label dan menyimpan pada suhu 4^oC.

3.7.7 Pembuatan Larutan Reagen B (Buffer Natrium Asetat pH 3,8 + $CaCl_2$)

Asam asetat glasial yang dibutuhkan dihitung terlebih dahulu. Selanjutnya asam asetat glasial dipipet sebanyak 28,5 mL dan dipindahkan kedalam gelas beaker. Kemudian asam asetat glasial diencerkan dengan akuabides sebanyak 300 ml. Larutan disesuaikan pH nya menjadi pH 3,8 dengan menambahkan Natrium Hidroksida 4 M. Alat pH meter sebelumnya telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan buffer pH 4, buffer pH 7, buffer pH 9. Setelah pH mencapai pH 3,8, selanjutnya Kalsium Klorida dihidrat ditambahkan sebanyak 0,37 g dan pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL. Setelah itu akuabides ditambahkan hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dipindahkan ke dalam botol duran yang telah diberi label dan simpan pada suhu ruang.

3.7.8 Pembuatan Larutan Reagen C (Buffer Natrium Asetat pH 4,5)

Asam asetat yang dibutuhkan dihitung terlebih dahulu. Selanjutnya asam asetat glasial dipipet sebanyak 2,85 mL dan dipindahkan kedalam gelas beaker. Kemudian asam asetat glasial diencerkan dengan akuabides sebanyak 300 ml. Larutan disesuaikan pH nya menjadi pH 4,5 dengan menambahkan Natrium Hidroksida 1 M. Alat pH meter sebelumnya telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan buffer pH 4, buffer pH 7, buffer pH 9. Setelah pH mencapai pH 4,5. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL. Setelah itu akuabides ditambahkan hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan dipindahkan ke dalam botol duran yang telah diberi label dan simpan pada suhu 4^oC.

3.7.9 Pembuatan Larutan Buffer Reagen GOPOD

Pembuatan larutan buffer reagen GOPOD dilakukan dengan buffer reagen GOPOD (botol 3) dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L. Selanjutnya akuabides ditambahkan hingga tanda batas dan dihomogenkan dengan mengocok labu ukur.

3.7.10 Pembuatan Larutan Reagen GOPOD

Pembuatan larutan reagen GOPOD dilakukan dengan cara larutan buffer reagen GOPOD yang telah dibuat dimasukkan sebanyak 20 mL ke dalam reagen GOPOD (botol 4). Kemudian dikocok perlahan hingga reagen GOPOD terlarut. Setelah itu reagen yang sudah terlarut dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L yang telah terisi buffer reagen GOPOD. Labu yang telah terisi reagen GOPOD dilapisi dengan alumunium foil dan larutan dihomogenkan. Setelah homogen, larutan reagen GOPOD dipindah ke dalam tabung propilen dan simpan pada suhu -10^{o}C.

3.7.11 Pembuatan Etanol 95%

Pembuatan etanol 95% dengan menghitung kebutuhan etanol 96% yang akan diambil. Sebanyak 49,5 mL etanol 96% dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL.Kemudian akuabides ditambahkan sampai tanda batas dan homogenkan.

3.7.12 Pembuatan Etanol 50%

Pembuatan etanol 50% dilakukan dengan menghitung kebutuhan etanol 96% yang akan diambil. Sebanyak 52 mL etanol 96% dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Kemudian akuabides ditambahkan sampai tanda batas dan larutan dihomogenkan.

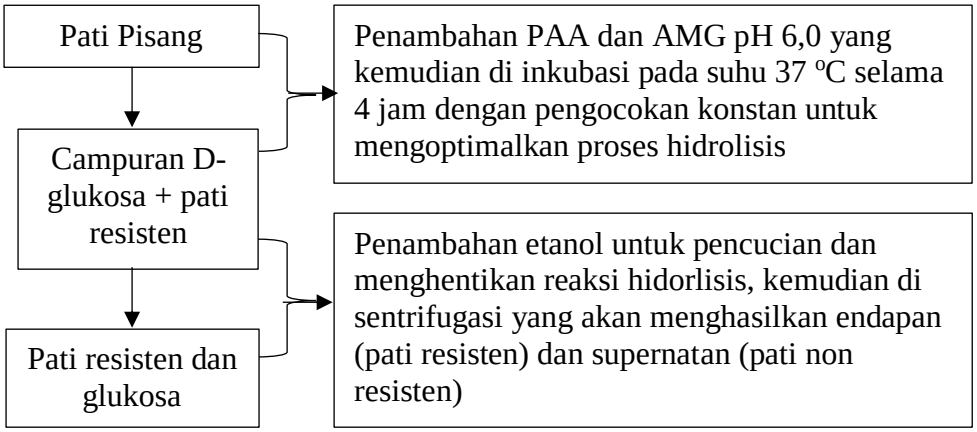
3.7.13 Pembuatan Larutan PAA/AMG

PAA/AMG (botol 1) ditimbang sebanyak 0,1 g dan dipindahkan kedalam gelas beaker 50 mL. Selanjutnya larutan reagen A (Buffer Natrium Maleat pH 6,0 + $CaCl_2$) ditambahkan sebanyak 5 mL dan diaduk menggunakan magnetic stirrer selama 5 menit. Selanjutnya larutan disimpan pada suhu dingin dengan menggunakan ice box yang telah diberi ice gel. Catatan: gunakan dalam waktu 4 jam setelah persiapan

3.7.14 Hidrolisis dan Pelarutan Pati Non-resistence

Sampel yang telah dipisahkan dengan metode dekantasi, kemudian dilakukan hidrolisis dan pelarutan pati non resisten. Pada

masing-masing replikasi dilakukan penimbangan sampel sebanyak 100 mg dan masukkan kedalam tabung propilen. Selanjutnya 3,5 mL buffer natrium maleat pH 6,0 ditambahkan pada masing masing tabung propilen, kemudian ditutup kembali tabung dan divortex selama 5 detik. Inkubasi selama 5 menit pada suhu 37^{o}C. Setelah selesai proses inkubasi, buka tutup tabung dan 0,5 mL larutan PAA/AMG ditambahkan ke setiap tabung propilen. Tutup kembali tabung dan pasang pada shaking waterbath secara horizontal, kemudian inkubasi pada suhu waterbath 37^{o}C dan pengocokan selama 4 jam.



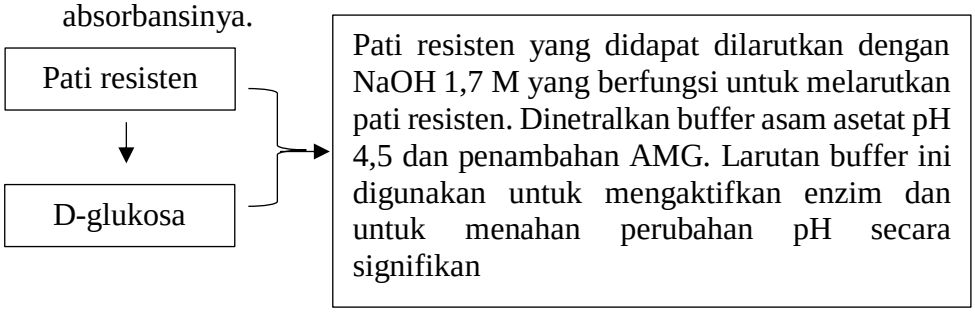
Setelah proses inkubasi selesai, tabung dikeluarkan dari waterbath dan dibersihkan kelebihan air pada dinding tabung. Selanjutnya tutup tabung dibuka, kemudian 4 mL etanol 95% ditambahkan pada tiap tabung propilen dan ditutup kembali tabung. Tabung divortex kembali, kemudian tutup tabung dibuka dan disentrifugasigasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Setelah itu endapan dan supernatan dipisahkan dengan menuangkan larutan supernatan dari masing masing tabung ke tabung propilen 50 mL. Endapan disuspensi kembali dengan 2 mL etanol 50% dan divortex. Etanol 50% sebanyak 6 mL ditambahkan kembali, kemudian larutan dikocok kembali hingga homogen. Setelah itu, tutup tabung dilepaskan dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi selesai, endapan dan supernatan dipisahkan kembali dari masing-masing tabung ke tabung propilen 50 mL yang telah terisi supernatan

sebelumnya. Ulangi sekali lagi perlakuan, endapan disuspensi kembali dengan 2 mL etanol 50% dan divortex. Etanol 50% ditambhakna kembali sebanyak 6 mL, kemudian larutan dikocok kembali hingga homogen. Setelah itu, tutup tabung dilepaskan dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi selesai, endapan dan supernatan dipisahkan kembali dari masing masing tabung ke tabung propilen 50 mL yang telah terisi supernatan sebelumnya. Selanjutnya pati resisten dan pati tidak resisten yang didapat disimpan kedalam pendingin refrigerator.

3.7.15 Pengukuran Pati Resistence

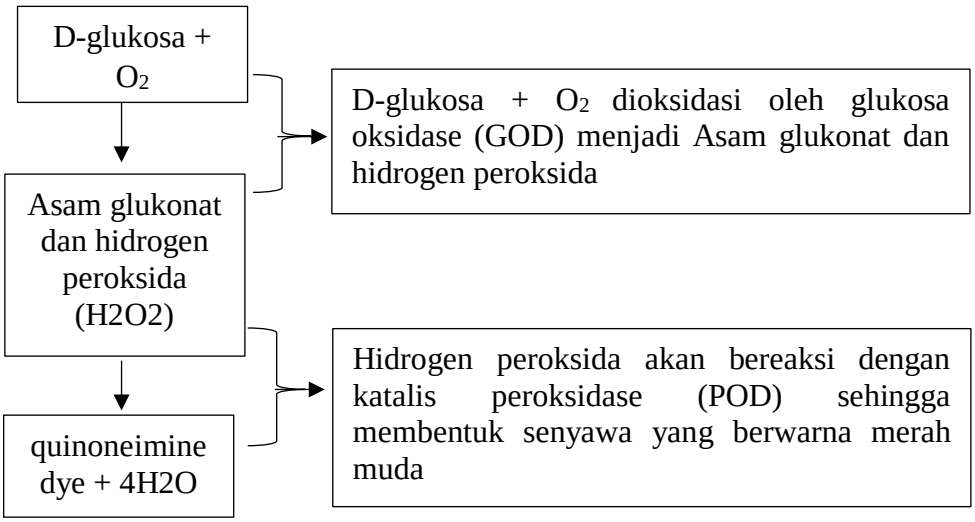
Pati resisten yang telah didapat sebelumnya ditambahkan 2 mL Natrium Hidroksida 1,7 M. Pada tabung propilen masing-masing diberi stirrer bar. Kemudian endapan disuspensikan kembali dengan mengaduk diatas *magnetic stirrer* dalam kondisi dingin selama 20 menit. Setelah itu, Buffer Natrium Asetat pH 3,8 ditambahkan sebanyak 8 mL saat stirrer masih berputar dan AMG ditambahkan segera sebanyak 0,1 mL lalu larutan diaduk hingga homogen. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam waterbath untuk diinkubasi pada suhu 50^{o}C selama 30 menit sambil sesekali di vortex. Setelah inkubasi selesai, isi tabung propilen pindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan akuabides ditambahkan sampai tanda batas. Alikuot diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan kembali ke dalam tabung propilen. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 11 menit.

Setelah proses hidrolisis pada pati selesai maka pati resisten dan pati non-resisten akan didapatkan, selanjutnya akan diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mendapatkan nilai absorbansinya.



Selanjutnya alikuot supernatan sebanyak 0,1 mL dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Reagen GOPOD ditambahkan sebanyak 3 mL pada tabung reaksi berisi alikuot dan diinkubasi kembali pada suhu 50^{o}C selama 20 menit. Selanjutnya tiap larutan diukur absorbansinyanya pada panjang gelombang 510 nm. D-glukosa yang telah didapat dari hasil hidrolisis pati oleh enzim amiluglukosidase kemudian direaksikan dengan reagen glukosa oksidase/peroksidase (GOPOD). Pati tidak resisten dapat diukur kandungannya dengan mengumpulkan supernatan asli dari pencucian endapan pati resisten menggunakan etanol. Dan untuk volumenya dapat disesuaikan hingga volumenya sampai 100 ml.

Pada saat pengukuran kadar D-glukosa tetap menggunakan reagen GOPOD untuk menentukan kandungan pati non-resisten dalam sampel.



Setelah terbentuk senyawa berwarna kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Intensitas warna yang terbentuk memiliki proporsi yang sama dengan konsentrasi glukosa.

a. Pembuatan Blanko

Buffer Natrium Asetat (pH 4,5) di pipet sebanyak 0,1 mL dan di masukkan kedalam tabung reaksi. Reagen GOPOD

ditambahkan sesbanyak 3 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 50^{o}C selam 20 menit. Selanjutnya tiap larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm.

b. Pembuatan Standar Glukosa

Stnadar D-glukosa di pipet sebanyak 0,1 mL di masukkan kedalam tabung reaksi. Reagen GOPOD ditambahkan 3 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 50^{o}C selama 20 menit. Selanjutnya tiap larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm.

3.7.16 Pengukuran Pati Non-resistence

Larutan supernatan di masukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan akuabides ditambahkan sampai tanda batas. Selanjutnya alikuot supernatan dipindahkan 0,1 alikuot supernatan ke dalam tabung reaksi. AMG encer ditambahkan 0,1 mL dan 3 mL reagen GOPOD. Kemudian larutan diinkubasi kembali pada suhu 50^{o}C selam 20 menit. Setelah selesai inkubasi, tiap larutan diukur absorbansinyanya pada panjang gelombang 510 nm.

a. Pembuatan Blanko

Buffer Natrium Asetat (pH 4,5) di pipet sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Reagen GOPOD ditambahkan sebanyak 3 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 50^{o}C selam 20 menit. Selanjutnya tiap larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm.

b. Pembuatan Stnadar Glukosa

Stnadar D-glukosa di pipet sebanyak 0,1 mL dan Buffer Natrium Asetat (pH 4,5) sebanyak 0,1 mL di masukkan kedalam tabung reaksi. Reagen GOPOD ditambahkan sebanyak 3 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 50^{o}C selama 20 menit. Selanjutnya tiap larutan diukur absorbansinyanya pada panjang gelombang 510 nm (Chemist & AACC, 2001) (AOAC, 2002).

3.8 Penyajian dan Pengolahan Data

Dalam penyajian datanya, penulis akan menggunakan metode kuantitatif dengan tabel. Tujuan penyajian data ini adalah untuk memudahkan dalam mengenali absorbansi yang diperoleh dari setiap sampel yang diuji dalam tabel kemudian mencari kadar pati resisten dan non resisten dengan cara mentransformasikan data tersebut. Penyajian datanya dapat dilihat seperti pada tabel di bawah ini :

Tabel 3. 2 Tabel Penyajian Data Pati Resisten

Kode Sampel	**Absorbansi**	**Kadar (g/100g)**	**Sig**
A1			
A2			
A3			
B1			
B2			
B3			
C1			
C2			
C3			

Tabel 3. 3 Penyajian Data Pati Non Resisten

Kode Sampel	**Absorbansi**	**Kadar (g/100g)**	**Sig**
Stnadar			
A1			
A2			
A3			
B1			
B2			
B3			
C1			

C2			
C3			

Keterangan :

Kode sampel A1, A2, A3 = pisang tanduk dengan perlakuan kukus

Kode sampel B1, B2, B3 = pisang tanduk dengan perlakuan rebus

Kode sampel C1,C2, C3 = pisang tanduk dengan perlakuan rendam natrium meta bisulfit

Nilai absorbansi yang diperoleh dihitung kadarnya dengan menggunakan Microsoft excel yaitu dengan memasukkan pengencerannya, penimbangan dan absorbansi semua larutan. Kemudian pengolahan data dilakukan dengan menggunakan SPSS versi 26 dengan data yang telah diperoleh berupa nilai kadar dari pati resisten dan pati non-resisten untuk melihat ada tidaknya perbedaan kadar pati resisten pada pisang tanduk yang diberi perlakuan berbeda yaitu kukus, rebus dan rendam natrium metabisulfit. Kemudian dianalisis dengan metode *Kruskal Wallis* .