

## III METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei – September 2019 di Laboratorium Kimia Pangan Universitas Katolik Soegijapranata untuk melakukan tahap preparasi sampel, ekstraksi, dan analisa komposisi kimia (kadar air, protein, abu), kadar glukomannan, kadar kalsium oksalat, warna serta proses pengeringan menggunakan *Solar Tunnel Drying* (STD).

### 3.2 Materi

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam proses pemurnian tepung glukomannan meliputi *glassware*, timbangan analitik (Mettler AE 160), blender kaca merk Philips, spatula baja, penyaring kain, loyang, pipet volume, dan bola hisap, serta alat pengering *Solar Tunnel Drying* (STD).

Alat yang digunakan untuk analisa meliputi *glassware*, termometer, plat pemanas (Labinco), spektrofotometer UV1800 (Shimadzu corp.), *color reader* (Minolta CR-400), Brookfield Viscometer Model DV – I Prime, labu kjedahl, lemari asam, *waterbath soxhlet* (Memmert), labu soxhlet, tanur pengabuan (thermolyne), cawan porselen, pipet tetes, pipet volume, bola hisap (Merienfiel), oven listrik (Memmert), *sentrifuse* (Hettich), *waterbath* (Memmert).

#### 3.2.2 Bahan

Umbi porang yang akan digunakan untuk penelitian diperoleh dari Desa Lajawajo, Kecamatan Mauponggo, Kabupaten Nagekeo, Nusa Tenggara Timur. Umbi yang digunakan adalah umbi siap panen dengan berat rata – rata  $\pm 2 - 3$  kg yang berdiameter  $\pm 14 - 15$  cm. Berdasarkan berat dan diameter umbi dapat dipastikan bahwa umbi porang berumur  $\pm 2$  tahun atau lebih. Jumlah umbi yang dianalisis sebanyak lima buah.

Bahan kimia yang digunakan untuk proses pemurnian tepung glukomannan antara lain: bahan kimia dengan kemurnian teknis yakni isopropanol atau isopropil alkohol (IPA) 98% yang diperoleh dari toko kimia Indrasari, *arak* yang mengandung alkohol 44 % (minuman hasil penyulingan *tuak* atau nira aren), natrium klorida, natrium metabisulfit, aquades dari Laboratorium Kimia Pangan Unika Soegijapranata dan kertas saring dari Medilab. Bahan kimia yang digunakan untuk analisa antara lain: bahan kimia dengan kemurnian pro analisis (p.a) seperti Natrium hidroksida, asam format, asam klorida pekat (37%), asam sulfat pekat (95%), kalium natrium tartat, kalium permanganate, natrium bikarbonat, kalium iodide, iodium, dan asam dinitrosalisilat (DNS) yang diperoleh dari Toko Ilmu Kimia, Jogjakarta. Bahan analisa dengan kemurnian teknis adalah aquades dan kertas saring.

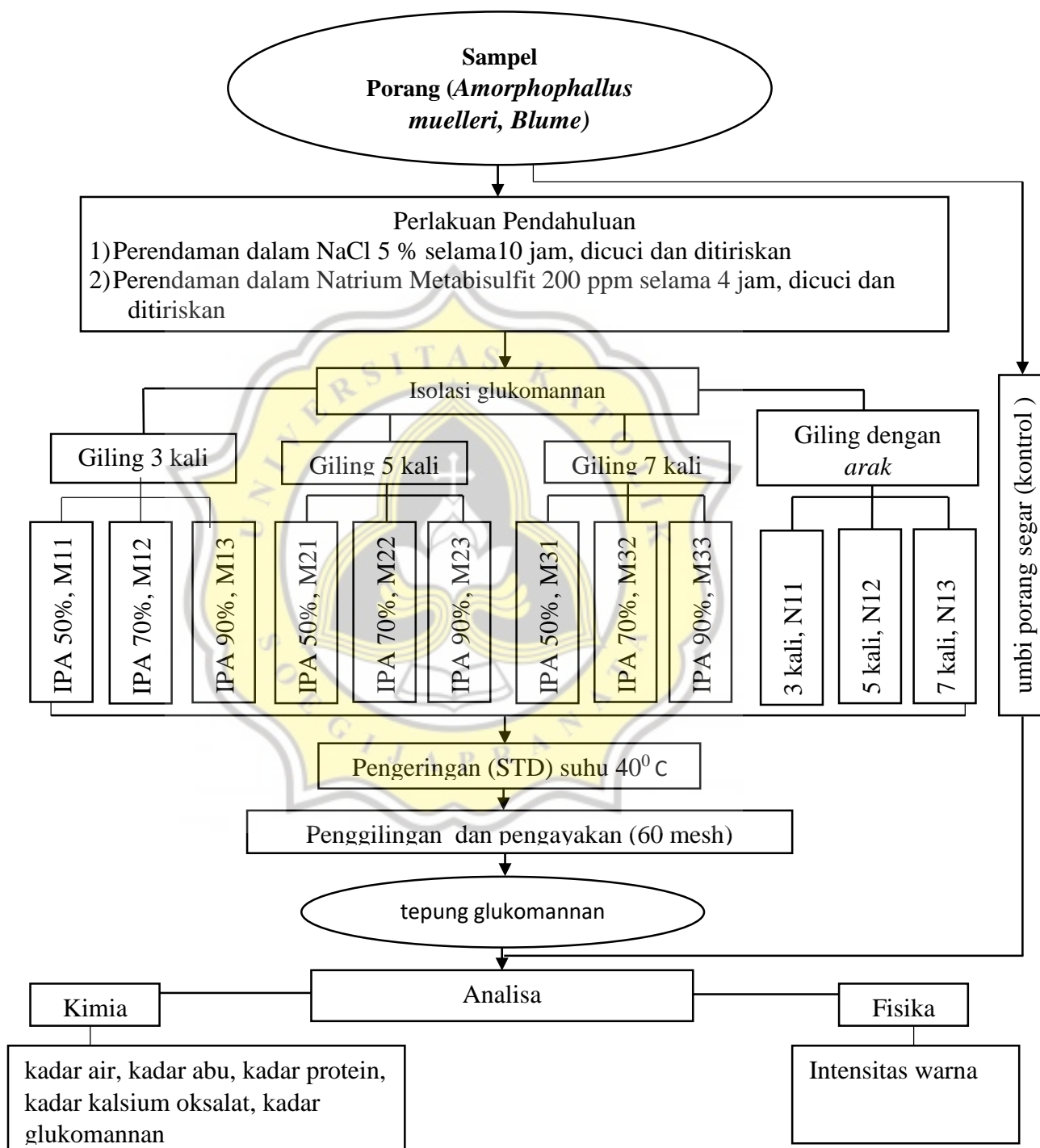
### 3.3 Desain Penelitian

Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Completely Randomized Design* (CRD) digunakan dalam penelitian ini dengan dua faktor yakni konsentrasi alkohol (pelarut) dan jumlah penggilingan. Setiap perlakuan diulang tiga kali ulangan sehingga diperoleh 36 kali satuan percobaan dan hasil rata – ratanya dilaporkan. Analisis statistik diterapkan melalui analisis varians (ANOVA) dan uji Duncan dengan penerapan SSPS versi 16.0. Hasil dianggap signifikan untuk  $p < 0,05$ .

Perlakuan pendahuluan pada porang segar dilakukan sebelum proses isolasi glukomannan yakni dengan merendam porang dalam larutan NaCl 5 % selama 10 jam, kemudian dicuci dengan air dan ditiriskan. Selanjutnya direndam dalam Natrium Metabisulfit 1 % selama 4 jam, kemudian dicuci dengan air dan tiriskan. Porang tanpa perlakuan pendahuluan dan tepung glukomannan komersil (*Purified Konjac Glukomanan*) digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini.

Tingkat penggilingan pada penelitian ini dilakukan pada kondisi yang berbeda, yaitu perbedaan jumlah penggilingan dan konsentrasi pelarut (isopropanol dan

arak yang mengandung alkohol 44 %) yang digunakan dalam ekstraksi glukomannan. Semua proses isolasi dijelaskan dalam desain penelitian berikut:



Gambar 5. Desain penelitian

### 3.4 Prosedur isolasi dan pengeringan tepung

Ditimbang sebanyak 200 g Sampel (porang) dan dimasukkan dalam blender, kemudian 250 ml isopropanol (IPA) 50 % ditambahkan ke dalamnya, digiling (kecepatan 3) selama 5 menit kemudian larutan disaring menggunakan penyaring kain. Residu dipisahkan dari filtratnya.

Residu yang diperoleh digiling lagi (kecepatan 3) dalam 250 ml IPA 50 % selama 5 menit menggunakan blender yang sama, Residu dipisahkan dari filtratnya kemudian larutan di saring lagi. Residu dipisahkan dari filtratnya. Prosedur yang sama diulang satu kali lagi sehingga memperoleh 3 kali penggilingan. Endapan dan filtrat dipisahkan (perlakuan M11 berhenti sampai disini dan sampel bubuk porang dikeringkan dengan alat pengering menggunakan *Solar Tunnel Dryer* sampai mendapatkan berat konstan).

Prosedur yang sama di atas diulang lagi untuk perlakuan lainnya dengan menggunakan pelarut masing – masing IPA 70 % (M12), IPA 90 % (M13), dan arak 44 % alkohol (N11). Kemudian sampel bubuk porang dari setiap perlakuan dikeringkan dengan menggunakan STD sampai mendapatkan berat konstan.

Dengan menggunakan prosedur yang sama diatas, sampel porang digiling dalam pelarut dengan konsentrasi yang sama yakni IPA 50 % (M21), IPA 70 % ( M22), IPA 90 % (M23), arak 44% (N12) dengan jumlah penggilingan 5 kali dan 7 kali penggilingan untuk perlakuan M31, M32, M33, N13. Kemudian sampel bubuk porang dari setiap perlakuan dikeringkan dengan menggunakan STD sampai mendapatkan berat konstan.

Secara umum, proses isolasi dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 6.

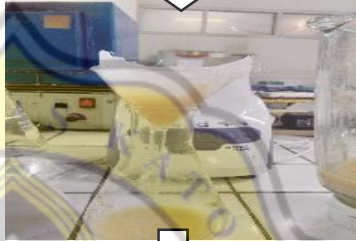
a. Irisan porang segar



b. Proses penggilingan porang dalam alkohol (pencucian)



c. Proses penyaringan



d. Bubur porang



e. Proses pengeringan dengan STD



f. Tepung glukomanan



Gambar 6. Proses pembuatan tepung glukomannan

### 3.5 Analisis terhadap Porang dan Tepung Glukomannan

#### 3.5.1 Analisa kimia

Analisis kimia terhadap porang segar dan tepung glukomannan dilakukan dengan analisis proksimat yang meliputi kadar air, kadar abu, dan kadar protein dengan menggunakan metode AOAC (A.O.A.C. 2005, Tatirat & Charoenrein, 2011), kadar glukomannan (Peiying *et al.*, 2002; Chua *et al.*, 2012), dan kadar kalsium oksalat. Tepung glukomannan juga dihitung rendemennya serta analisis fisiknya terhadap intensitas warna tepung.

##### a. Kadar Air

Analisis kadar air dilakukan dengan menggunakan metode AOAC (Tatirat & Charoenrein, 2011). Prinsipnya dengan menguapkan molekul air bebas yang ada dalam sampel. Sampel ditimbang sampai didapat bobot konstan dengan asumsi semua air yang terkandung dalam sampel sudah diuapkan. Banyaknya air yang diuapkan merupakan selisih bobot sebelum dan sesudah pengeringan. Cawan alumunium dipanaskan pada suhu  $135 \pm 2$  °C, kemudian didinginkan di dalam eksikator dan ditimbang beratnya. Cuplikan umbi porang segar ditimbang dengan tepat kurang lebih 2 gram. Contoh di dalam cawan dimasukkan secepat mungkin ke dalam oven pada suhu  $135 \pm 2$  °C selama 2 jam. Kemudian cawan dipindahkan secara cepat ke dalam eksikator dan ditimbang secepatnya setelah mencapai suhu ruang. Residu sebagai total padatan sedangkan berat yang hilang sebagai air. Kadar air dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat setelah dioven}}{\text{berat cuplikan umbi}} \times 100 \%$$

b. Kadar Abu

Dua gram cuplikan umbi porang ditempatkan dalam pinggan abu yang telah diketahui beratnya, kemudian dimasukkan ke dalam tanur yang bersuhu 600 °C. Pengabuan dilakukan sampai cuplikan umbi berwarna kelabu atau sampai berat tetap. Pinggan dipindahkan ke dalam eksikator hingga mencapai suhu ruang dan ditimbang dengan tepat. Kadar abu dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar abu} = \frac{a - b}{c} \times 100 \%$$

Keterangan:

a = berat pinggan dan abu

b = berat pinggan

c = berat cuplikan umbi

c. Kadar Protein

Kurang lebih 0.5 gram cuplikan umbi porang ditimbang dengan tepat dan dimasukkan ke dalam labu kjeldahl 30 ml. Kemudian ditambahkan  $7 \pm 0.1$  gram  $K_2SO_4$ ,  $35 \pm 10$  mg HgO,  $5 \pm 0.1$  ml  $H_2SO_4$ . Dididihkan selama 1 sampai 3 jam sampai cairan menjadi jernih. Tabung dibiarkan dingin kemudian ditambahkan sejumlah air secara perlahan-lahan. Isi labu dipindahkan ke alat destilasi secara kuantitatif dengan pembilasan berkali-kali dengan air destilat. Di bawah kondensor ditelakkan erlenmeyer yang berisi larutan 5 ml  $H_3BO_3$  dan 2-4 tetes indikator (campuran dua bagian metil merah dalam alkohol dan satu bagian metilen biru dalam alkohol). Selanjutnya ditambahkan 8 sampai 10 ml larutan NaOH- $Na_2S_2O_3$  dan dilakukan destilasi sampai tertampung kira-kira 15 ml destilat dalam erlenmeyer. Tabung kondensor dibilas dengan air dan air bilasannya ditampung bersama destilat. Hasil destilat dititrasi dengan 0.02 N HCl sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu.

d. Analisis kadar glukomannan (Chua *et al.*, 2012)

Kadar glukomannan dalam tepung glukomannan hasil pemurnian dianalisis menggunakan metode 3,5-DNS dimana metode ini telah diuji pada penelitian yang dilakukan Melinda Chua (2012). Analisis kadar glukomannan ini menggunakan reagen 3,5-Dinitro Salisilic Acid. Reagen ini akan memberi warna kuning yang berbeda pada sampel yang dianalisis menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS dengan cara mengukur absorbansi yang kemudian akan menentukan penghitungan besar kadar glukomannan dalam tepung. Reagen 3,5- Dinitro Salisilic Acid dibuat dengan mencampurkan larutan A (0,7 gram fenol, 1,5 ml Natrium Hidroksida (10 %), 5 ml aquadest, 0,7 gram natrium bisulfit) dengan larutan B (22,5 gram Kalium Natrium Tartrat, 30 ml Natrium Hidroksida (10 %), 88 ml 1% Dinitro Asam Salisilat). Selanjutnya membuat ekstrak dan hidrolisat tepung glukomannan yang akan dianalisis. Ekstrak glukomannan dibuat dengan cara melarutkan 0,2 gram tepung glukomannan hasil pemurnian dalam 100 ml larutan buffer (formic acid-sodium hidroksida) dan diaduk selama 4 jam kemudian mensentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit, cairan putih yang dihasilkan merupakan ekstrak glukomannan. Selanjutnya membuat hidrolisat glukomannan dengan mencampurkan 5 ml ekstrak glukomannan dengan 2,5 ml Asam Sulfat 3M panaskan dalam boiling water bath selama 1,5 jam kemudian tambahkan 2,5 ml NaOH 6M dan encerkan sampai 25 ml menggunakan aquadest. Selanjutnya diambil 2 ml ekstrak dan hidrolisat glukomannan, tambahkan 1,5 ml reagen 3,5 DNS, lakukan absorbansi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar glukomannan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Glukomannan} = \frac{\varepsilon (5T - T_0) \times 50}{m} \times 100$$

dengan:

$\varepsilon$  = rasio berat molekul glukosa dan residu mannan di glukomannan dengan berat molekul glukosa dan mannan yang dihasilkan setelah hidrolisis,  $\varepsilon = 0.9$



- T = jumlah (mg) glukosa dalam hidrolisat glukomannan yang diperoleh dari kurva standar  
 T<sub>0</sub> = jumlah (mg) glukosa dalam ekstrak glukomannan yang diperoleh dari kurva standar  
 m = massa sampel konjac (gr)

e. Kandungan kalsium oksalat (Owuamanam, *et al* 2016)

Penentuan kadar kalsium oksalat dilakukan dengan metode titrasi permanganatometri (titrimetric method) yang dijelaskan oleh Onwuka, 2005 (Owuamanam, *et al* 2016). Terdapat 3 (tiga) tahap dalam metode ini yakni pemecahan (*digestion*), pengendapan oksalat (*oxalate precipitation*), titrasi permanganat (*permanganate titration*).

**Pemecahan (*Digestion*):** 2 gram tepung glukomannan ditimbang dan dilarutkan dalam 190 ml aquades pada labu ukur 250 ml. 10 ml HCl 6 N ditambahkan untuk pemecahan campuran (*digestion*) dan dipanaskan pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 1 jam. Larutan didinginkan dan diencerkan hingga 250 ml dengan aquades, kemudian disaring.

**Pengendapan oksalat (*Oxalate precipitation*):** Aliquot filtrate 125 ml dibagi menjadi tiga bagian dalam gelas kimia, empat tetes indikator metil merah ditambahkan ke dalam tiap gelas kimia, kemudian tambahkan larutan NH<sub>4</sub>OH jernih sampai larutan berubah warna dari merah muda (pink) menjadi kuning pudar (pH 4 – 4,5). Setiap campuran dipanaskan hingga 90<sup>0</sup>C, didinginkan dan disaring untuk menghilangkan endapan yang mengandung ion besi. Masing – masing larutan dipanaskan lagi hingga 90<sup>0</sup>C dan tambahkan 10 ml CaCl<sub>2</sub> 5 % dengan pengadukan konstan (merata), dan biarkan semalam dalam *chiller* pada suhu 5<sup>0</sup>C.

**Titrasi permanganat (*Permanganate titration*):** Setelah dibiarkan selama semalaman (12 jam), larutan kemudian disentrifugasi pada 2.500 rpm selama 5 menit. Supernatan didekantasi lagi dan endapan dilarutkan dalam 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 %. Larutan dipanaskan sampai hampir mencapai titik didih, kemudian dititrasi dengan larutan KMnO<sub>4</sub> standar 0,05 N. Proses titrasi dikatakan sudah selesai apabila larutan tersebut berubah warna menjadi merah muda yang tidak akan hilang selama 30 detik.

**Perhitungan:** Kandungan kalsium oksalat dihitung berdasarkan jumlah ekivalen larutan  $\text{KMnO}_4$  yang digunakan untuk titrasi (di mana: 1 ml 0,05 N  $\text{KMnO}_4$  setara dengan 0,00225 g asam oksalat anhidrat). Perhitungan dengan menggunakan rumus:

$$\text{kadar Kalsium oksalat} = \frac{T \times (V_{me})(Df) \times 10^5}{ME \times Mf} \text{ mg/100g}$$

dengan:

- T : Volum Titer  $\text{KMnO}_4$  ( ml)  
 Vme : Volum masa setara ( misalnya 1 ml  $\text{KMnO}_4$  setara dengan 0,00225 gr asam oksalat anhidrat)  
 Df : Faktor pengenceran  $\frac{VT}{A}$  ( 2,4 dimana VT : Volum total dari titran (300 ml) dan A : aliquot yang digunakan ( 125 ml)  
 ME : Ekivalen molar  $\text{KMnO}_4$  dengan oksalat ( redoks  $\text{KMnO}_4$ )  
 Mf : Massa tepung glukomannan yang digunakan

### 3.5.2 Analisa fisika

Analisis secara fisis terhadap tepung glukomannan dilakukan dengan menguji intensitas warna (*lightness*) tepung yang dihasilkan. *Lightness* ( $L^*$ ) dari tepung glukomannan dianalisis menggunakan *Minolta spectrophotometer*. Sampel kering dimasukkan dalam tabung silinder silika kuarsa dan *lightness values* diukur (Tatirat & Charoenrein, 2011)