

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 4 perlakuan yaitu Perendaman 12 jam, Perendaman 24 jam, Blanching Uap Air, Blanching Air. Desain penelitian mencakup perbedaan perlakuan pendahuluan kacang merah yang disajikan pada Tabel 4. Masing-masing taraf perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan sehingga jumlah unit percobaan 12 unit.

Tabel 4. Desain Penelitian Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan	Pengulangan		
	1	2	3
P ₁ (Perendaman 12 jam)	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃
P ₂ (Perendaman 24 jam)	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃
P ₃ (Blanching Uap Air)	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃
P ₄ (Blanching Air)	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃

Keterangan :

X₁₁ : Unit percobaan taraf perlakuan P1 replikasi 1

-

-

X₄₃ : Unit percobaan taraf perlakuan P4 replikasi 3

Setiap unit penelitian memiliki peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan, maka dilakukan randomisasi atau pengacakan dengan langkah-langkah yang tersaji pada Lampiran 1. Selanjutnya *lay-out* penelitian disajikan dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 replikasi yang diajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Layout Penelitian Desain Rancangan Acak Lengkap

1 X_{33}	2 X_{21}	3 X_{23}
4 X_{41}	5 X_{12}	6 X_{13}
7 X_{32}	8 X_{22}	9 X_{42}
10 X_{43}	11 X_{31}	12 X_{11}

Keterangan :

1-12 : Nomor urut (Penempatan Unit)

X_{11} - X_{43} : Unit Penelitian

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2023, bertempat di :

1. Laboratorium Ilmu Bahan Makanan Poltekkes Kemenkes Malang untuk melakukan perlakuan pendahuluan kacang merah
2. Laboratorium Gizi Departemen Gizi Kesehatan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga untuk analisis kandungan gizi (kadar air, kadar abu, protein, karbohidrat, lemak, serat, dan antioksidan)

C. Alat dan Bahan

1. Alat

a. Perlakuan Pendahuluan Kacang Merah

Alat yang digunakan yaitu baskom untuk mencuci dan merendam, panci untuk blanching air, steamer untuk blanching uap air, thermometer untuk mengukur suhu air, dan thermometer gun untuk mengukur suhu uap air.

b. Analisis Kandungan Gizi dan Serat

Alat yang digunakan untuk analisis kandungan gizi diantaranya adalah labu Kjeldahl 100 ml, alat penyulingan dan kelengkapannya, pemanas listrik/pembakar, neraca analitik, kertas saring, kertas lakmus, kertas saring pembungkus, labu lemak, soxhlet, pendingin, corong buncher, dan pompa vakum.

c. Analisis Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan kacang merah dalam penelitian ini menggunakan metode IC50, sebagaimana pernyataan Rhozman, Abdul dan Sugeng R (2005) bahwa aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan metode IC50 atau 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Alat yang digunakan dalam proses analisis antioksidan adalah pipet ukur, pipet volume, karet penghisap, sentrifugal, spektrofotometri, tabung reaksi, dan refrigerator.

2. Bahan

a. Perlakuan Pendahuluan Kacang Merah

Bahan yang digunakan yaitu kacang merah dengan merk Finna Kacang Merah Brene Bone yang diproduksi oleh PT. Bumifood Agro Industri - Pasuruan.

b. Analisis kandungan Gizi, Serat, dan Aktivitas Antioksidan

Bahan yang digunakan untuk analisis kandungan gizi adalah kacang merah, serbuk SeO_2 , K_2SO_4 , CuSO_4 , H_2O , larutan bromocresol green, larutan merah metal, larutan asam borat 2%, larutan asam klorida 0,01 N, larutan natrium hidroksida 30%, larutan asam klorida 25%, n-heksana, H_2SO_4 1,25%, NaOH 3,25%, dan etanol 96%.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Pengaruh perlakuan pendahuluan Kacang Merah (perendaman 12 jam, perendaman 24 jam, blanching uap air, blanching air)

2. Variabel Terikat

a. Kandungan gizi (kadar air, kadar abu, energi, protein, lemak, karbohidrat)

b. Serat dan aktivitas antioksidan

E. Definisi Operasional Variabel

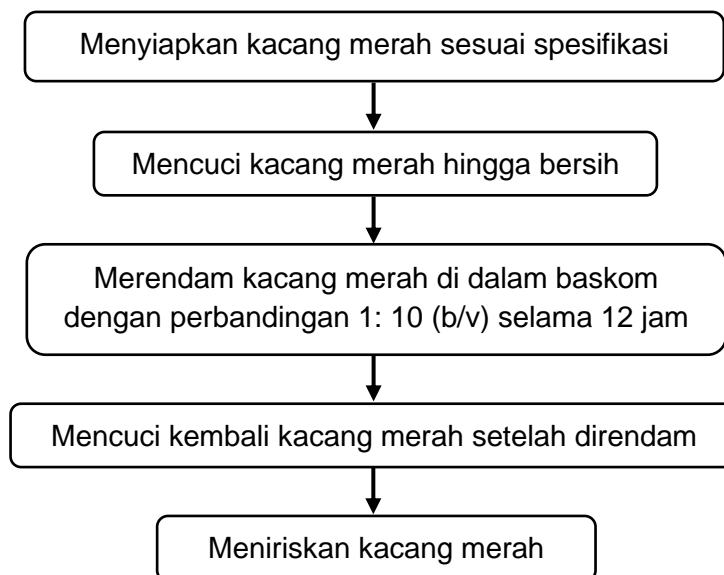
No.	Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Perlakuan pendahuluan kacang merah	Perbedaan perlakuan pendahuluan kacang merah (perendaman 12 jam, perendaman 24 jam, blanching uap air, blanching air)	P1 (perendaman 12 jam) P2 (perendaman 24 jam) P3 (blanching uap air) P4 (blanching air)	Rasio
2.	Kandungan Gizi			
	a.Nilai Energi	Besarnya energi yang tersedia dalam kacang merah yang dapat ditetapkan melalui perhitungan empiris	Dinyatakan dalam Kkal	Rasio
	b.Kadar air	Jumlah air dalam kacang merah. Pengukuran menggunakan metode AOAC (2005)	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio
	c.Kadar abu	Jumlah abu dalam kacang merah. Pengukuran menggunakan metode AOAC (2005)	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio
	d.Kadar protein	Jumlah protein dalam kacang merah. Pengukuran menggunakan metode AOAC (2001)	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio
	e. Kadar lemak	Jumlah lemak dalam kacang merah. Pengukuran menggunakan metode AOAC (2005)	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio

	f.Kadar karbohidrat	Jumlah karbohidrat dalam kacang merah. Pengukuran menggunakan metode AOAC (2005)	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio
3.	Mutu Fungsional			
	a.Kadar serat	Jumlah serat dalam kacang merah. Pengukuran menggunakan IC50.	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio
	b.Kadar antioksidan	Tingkat aktivitas antioksidan. Penetapan serat menggunakan refluks.	Dinyatakan dalam persen (%)	Rasio

F. Metode Penelitian

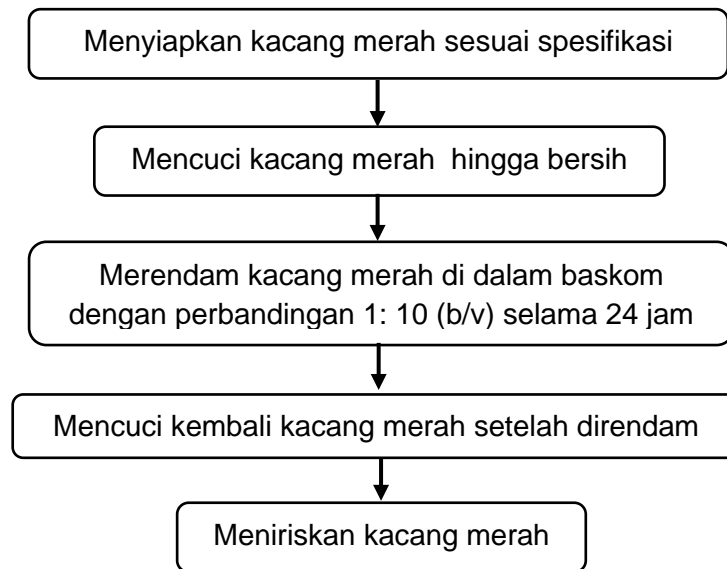
a. Proses Perlakuan Pendahuluan

1. Perendaman 12 jam



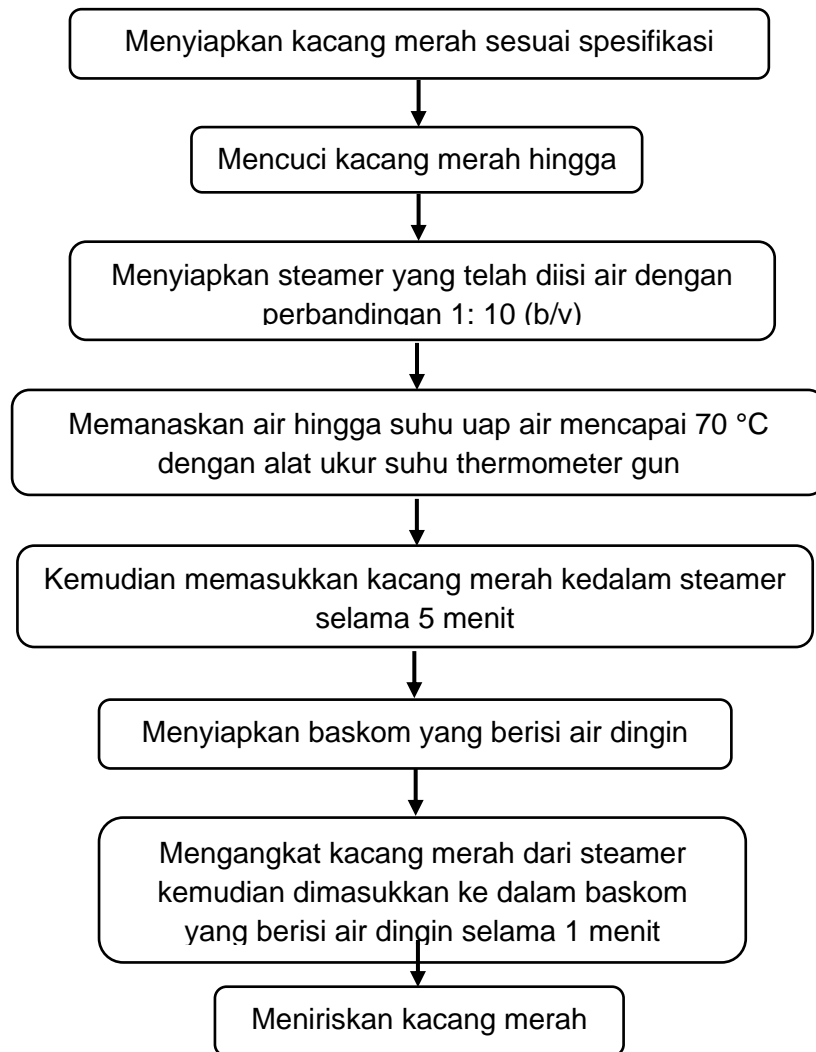
Gambar 1. Diagram alir perendaman kacang merah selama 12 jam (Huda dan Palupi)

2. Perendaman 24 jam



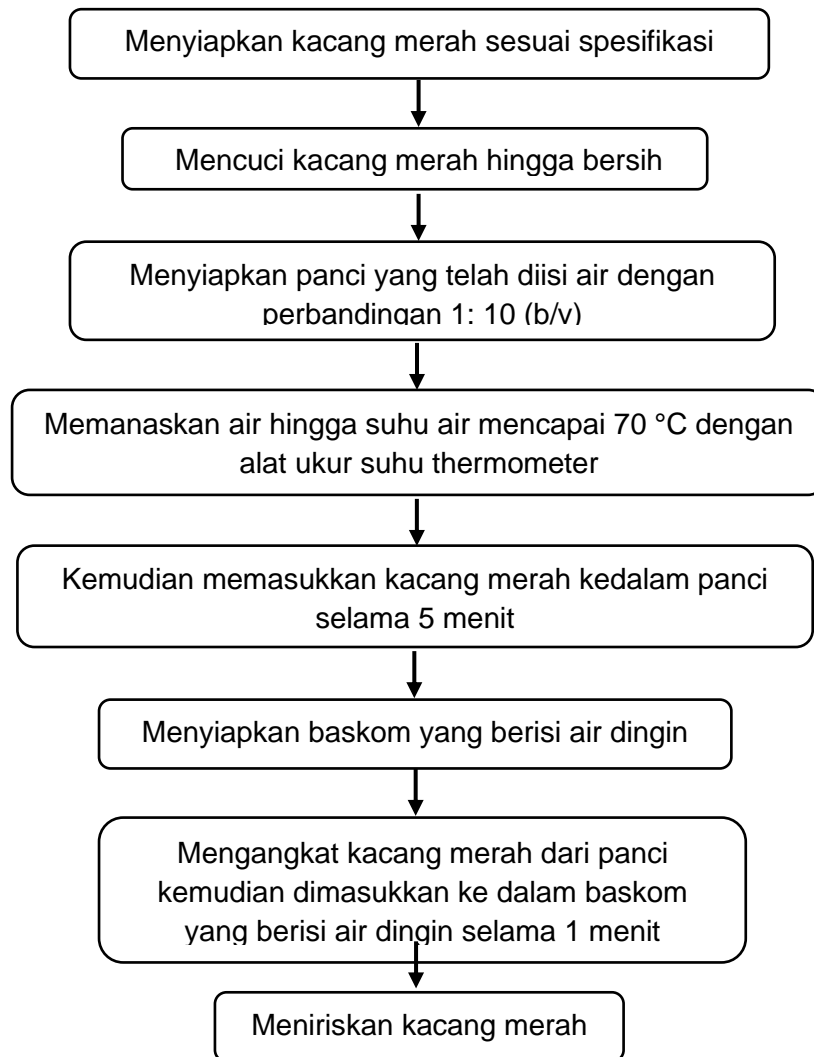
Gambar 1. Diagram Alir Perendaman Kacang Merah Selama 24 Jam (Huda dan Palupi)

3. Blanching Uap Air



Gambar 3. Diagram Alir Blanching Uap Air Kacang Merah (Putri dkk., 2022)

4. Blanching Air



Gambar 4. Diagram Alir Blanching Air Kacang Merah (Putri dkk., 2022)

G. Metode Analisis

1. Analisis Kandungan Gizi

a. Kadar Air (AOAC, 2005)

Berikut ini merupakan langkah-langkah dalam melakukan analisis kadar air :

1. Mengeringkan cawan porselen dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam
2. Memasukkan cawan ke dalam desikator selama 20 menit lalu ditimbang di neraca analitik

3. Memasukkan sampel sebanyak 2 gram ke dalam cawan porselen yang sudah ditimbang
4. Memasukkan cawan yang sudah diisi ke dalam oven dengan suhu 102 – 105 °C selama 5 - 6 jam
5. Memindahkan sampel ke dalam desikator selama 20 - 30 menit
6. Kemudian menimbang hasil akhir

Kadar air dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

Ket : A = Berat cawan kosong (g)

B = Berat cawan yang diisi dengan sampel (g)

C = Berat cawan dengan sampel yang sudah dikeringkan (g)

b. Kadar Abu (AOAC, 2005)

Berikut ini merupakan langkah-langkah dalam menganalisis kadar abu :

1. Cawan dikeringkan pada suhu 105 °C selama 1 jam di dalam oven
2. Kemudian didinginkan selama 30 menit dalam desikator dan ditimbang
3. Memasukkan sampel ke dalam cawan sebanyak 5 gram
4. Membakar cawan di atas kompor listrik sampai tidak berasap
5. Memasukkan ke dalam tanur pengabuan dengan suhu 600 °C selama 7 jam
6. Memasukkan cawan di dalam desikator lalu dibiarkan sampai dingin kemudian ditimbang

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{C-A}{B-A} \times 100\%$$

Ket : A = Berat cawan kosong (g)

B = Berat cawan yang diisi dengan sampel (g)

C = Berat cawan dengan sampel yang sudah dikeringkan
(g)

c. Analisis Kadar Protein (AOAC, 2001)

Berikut ini merupakan langkah-langkah dalam melakukan analisis kadar protein :

1. Tahap Destruksi
 - a. Menimbang sampel sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu kjeldahl
 - b. Memasukkan satu butir selenium ke dalam tabung tersebut dan menambahkan 3 ml H₂SO₄
 - c. Memasukkan tabung yang berisi larutan ke dalam alat pemanas dengan suhu 410 °C dengan ditambah 10 ml air
 - d. Proses destruksi dilakukan sampai jernih
2. Tahap Destilasi
 - a. Mendinginkan larutan yang sudah jernih dan ditambahkan akuades sebanyak 50 ml dan NaOH 40% sebanyak 20 ml kemudian didestilasi
 - b. Menampung hasil destilasi ke dalam Erlenmeyer 125 ml yang berisi 25 ml asam borat (H₃BO₃) 2% yang mengandung brocresol green 0,1% dan methyl red 0,1% dengan perbandingan 2 : 1 dan hasil destilat berwarna hijau kebiruan
3. Tahap Titrasi
 - a. Melakukan titrasi dengan menggunakan HCl sampai warna larutan pada Erlenmeyer berubah warna menjadi merah muda
 - b. Membaca dan mencatat volume titrasi

Kadar protein dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$(\%)N = \frac{ml\ HCL\ (sampel-blanko)}{berat\ sampel\ (g) \times 100} \times N\ HCL \times 14,008 \times 100\%$$

%Protein kasar = %N x faktor konversi protein

d. Analisis Kadar Lemak (AOAC, 2005)

Berikut ini merupakan langkah-langkah dalam melakukan analisis kadar lemak :

1. Mengeringkan labu lemak pada suhu 105 °C selama 1 jam
2. Mendinginkan labu lemak dalam desikator selama 15 menit
3. Mengisi sampel sebanyak 5 gram
4. Menghaluskan sampel
5. Menimbang sampel (W1)
6. Menimbang labu lemak kosong
7. Membungkus sampel dalam selongsong
8. Merangkai alat ekstraksi soxhlet 29
9. Memasukkan sampel ke dalam soxhlet
10. Memasukkan heksan ke dalam soxhlet (1 ½ siklus)
11. Mengekstraksi selama 6 jam
12. Memisahkan heksan dan hasil ekstraksi (rpm 50 dengan suhu 69 °C)
13. Pemanasan ke dalam oven dengan suhu 105 °C selama 1 jam
14. Mendinginkan labu lemak dalam desikator selama 15 menit
15. Menimbang hasil ekstraksi (W3)

Kadar lemak dapat dihitung dengan rumus berikut:

Ket : W1 = Bobot sampel (g)

W2 = Bobot labu lemak kosong (g)

W3 = Bobot labu lemak + lemak hasil ekstraksi (g)

e. Analisis Karbohidrat (AOAC, 2005)

Berikut merupakan langkah-langkah dalam melakukan analisis karbohidrat Hasil pengurangan dari 100% dengan kadar air, kadar protein, dan kadar lemak sehingga karbohidrat bergantung pada faktor pengurangan.

Kadar karbohidrat dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{Karbohidrat} = 100\% - (\% \text{abu} + \% \text{air} + \% \text{lemak} + \% \text{protein})$$

f. Nilai Energi

Nilai energi dianalisis menggunakan metode Atwater. Nilai energy dihitung dengan rumus = $4 \times \% \text{karbohidrat (g)} + 4 \times \% \text{protein (g)} + 9 \times \% \text{lemak (g)}$

g. Analisis Serat

Analisis serat makanan antara lain adalah dengan analisis serat kasar (AOAC), yaitu menimbang berat residu dari hasil ekstraksi bahan makanan setelah diperlakukan dengan asam dan alkali mendidih. Menurut sudarmadji (2007), analisis serat dilakukan dengan menggunakan metode Penetapan Serat Kasar sebagai berikut:

1. Menghaluskan sampel sehingga dapat melalui saringan diameter 1mm dan mengaduknya hingga merata.
2. Menimbang 2 g sampel, mengekstraksi lemak sampel dengan metode soxhlet Memindahkan sampel ke dalam Erlenmayer 600 ml.
3. Menambahkan 200 ml larutan H₂SO₄ 0,255 N mendidih. Kemudian menutupnya dengan pendingin balik. Proses mendidihkan selama 30 menit sambil menggoyangkan Erlenmayer Menyaring suspensi melalui kertas saring
4. Mencuci residu yang tertinggal di Erlenmayer dengan air mendidih.
5. Mencuci residu dalam kertas saring sampai air cucian tidak bersifat asam (Pengujian menggunakan kertas lakmus).
6. Memindahkan secara kuantitatif residu dari kertas saring ke dalam Erlenmayer kembali dengan spatula
7. Mencuci kembali sisanya dengan larutan NaOH 0,313 N mendidih sampai semua residu masuk ke dalam Erlenmayer
8. Memindahkan dengan pendingin balik sambil terkadang menggoyangkannya selama 30 menit
9. Menyaring kembali menggunakan kertas saring yang diketahui beratnya, sambil mencucinya dengan larutan K₂SO₄ 10

10. Mencuci residu kembali dengan air mendidih, kemudian dengan alkohol 95% sekitar 15 m
11. Mengeringkan kertas saring dengan isinya pada suhu 110 C° sampai berat konstan (2 jam), dinginkan dalam desikator dan menimba

$$\text{Rumus : Kadar Serat (\%)} = \frac{\text{berat akhir} - \text{berat awal (g)}}{\text{Wberat sampel (g)}} \times 100\%$$

2. Analisis Aktivitas Antioksidan

Berikut ini langkah-langkah analisis antioksidan (Umami, 2015) :

1. Kacang merah 2,5 g + 10 ml etanol
2. Maserasi selama 1 jam
3. Sentrifugasi dalam 2500 rpm selama 10 menit
4. Mengambil supernata sampel sebanyak 1,5 ml
5. Menambah larutan IC50 (0,02 mH, 3 ml)
6. Menginkubasi selama 4 menit dalam suhu ruang
7. Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 516 nm

Selanjutnya dilakukan perhitungan untuk memperoleh nilai aktivitas antioksidan menggunakan rumus (Molyneux, 2003)

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Kandungan Gizi, Serat, dan Aktivitas Antioksidan

Pengolahan data kandungan gizi (kadar air, kadar abu, energi, protein, lemak, dan karbohidrat), nilai energi, kadar serat dan aktivitas antoksidan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan pendahuluan kacang merah terhadap kadar air, kadar abu, protein, lemak, karbohidrat, dan serat), nilai energi, dan aktivitas antoksidan. Data nilai gizi masing-masing variabel diolah dengan software SPSS dan dianalisis statistik dengan One Way Anova pada tingkat kepercayaan 95%.

Penarikan kesimpulan :

- a. H_0 ditolak apabila $Sig \leq 0,05$ berarti ada pengaruh perlakuan pendahuluan terhadap kandungan gizi kacang merah.
- b. H_0 diterima apabila $Sig > 0,05$ berarti tidak ada pengaruh perlakuan pendahuluan terhadap kandungan gizi kacang merah.

Jika H_0 ditolak, maka dilanjutkan uji statistik lanjutan *Duncan Multiple Range Test* untuk menentukan pasangan perlakuan mana yang berbeda signifikan.

2. Taraf Perlakuan Terbaik

Penentuan taraf perlakuan terbaik dilakukan dengan metode indeks efektivitas. Berikut ini adalah prosedur pengolahan untuk menentukan taraf perlakuan terbaik:

- a. Hasil penentuan taraf perlakuan terbaik yang telah ditentukan oleh masing-masing panelis akan direkap untuk memperoleh jumlah nilai masing-masing variabel dan rata-ratanya.
- b. Nilai rata-rata masing-masing variabel digunakan untuk menentukan rangking variabel. Rata-rata paling besar akan diberi rangking ke-1 dan sebaliknya.
- c. Menentukan bobot masing-masing variabel dengan rumus

$$\text{Bobot Variabel} = \frac{\text{rata} - \text{rata variabel}}{\text{rata} - \text{rata tertinggi}}$$

- d. Menentukan bobot normal masing-masing variabel dengan rumus

$$\text{Bobot Normal} = \frac{\text{bobot variabel}}{\text{bobot total}}$$

- e. Menghitung nilai efektifitas masing-masing variabel dengan rumus

$$\text{Nilai efektifitas} = \frac{\text{nilai perlakuan} - \text{nilai terjelek}}{\text{nilai terbaik} - \text{nilai terjelek}}$$

- f. Menentukan taraf perlakuan terbaik dengan menghitung nilai hasil yang rumusnya sebagai berikut

$$\text{Nilai hasil} = \text{bobot normal} \times \text{nilai efektifitas}$$

- g. Hasil penentuan taraf perlakuan terbaik diperoleh dari taraf perlakuan yang memiliki nilai hasil (Nh) tertinggi.

I. Instrumen Analisis Data

Instrumen yang digunakan untuk analisis data pada penelitian ini adalah alat tulis, serta komputer dengan program Microsoft Word, Microsoft Excel, dan SPSS 25.0.