

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pisang Kepok

Pisang adalah tanaman atau tumbuhan terna yang memiliki ukuran relatif besar atau raksasa yang berdaun besar dengan suku Musaceae. Tanaman pisang juga merupakan salah satu jenis tanaman yang dapat dibudidayakan dengan baik pada iklim tropis maupun subtropis (Hibar et al., 2022). Secara umum pisang dapat tumbuh di seluruh kawasan Indonesia, dengan kondisi tanah yang baik. Tanaman pisang dapat tumbuh di tanah yang kering tetapi memiliki kapasitas air yang baik rata rata pH tanah berkisar antara 4,5 dan 7,5 (Oktavia, 2023).

Pisang kepok merupakan buah yang memiliki kandungan antioksidan, vitamin, dan mineral yang penting bagi tubuh, serta kandungan serat yang dibutuhkan oleh tubuh. Karena kandungan karbohidrat pada pisang kompleks dan simpleks maka dari itu pisang dapat digunakan sebagai sumber energi untuk meningkatkan daya tahan tubuh (Ruhdiana & Sandi, 2023). Pisang kepok merupakan salah satu varietas pisang yang tumbuh di Indonesia. Pisang kepok mempunyai bentuk buah gepeng dan ukuran buah yang kecil. Pisang kepok terdiri dari 2 jenis yaitu pisang kepok putih dan pisang kepok kuning. Pisang kepok putih memiliki daging buah berwarna putih lebih pucat, tekstur yang lebih keras dan lebih masam, sedangkan pisang kepok kuning memiliki daging buah berwarna kekuningan dan rasa lebih manis. Kulit pisang kepok yang sudah matang berwarna kuning kehijauan dan sedikit noda coklat (Saraswati, 2015).



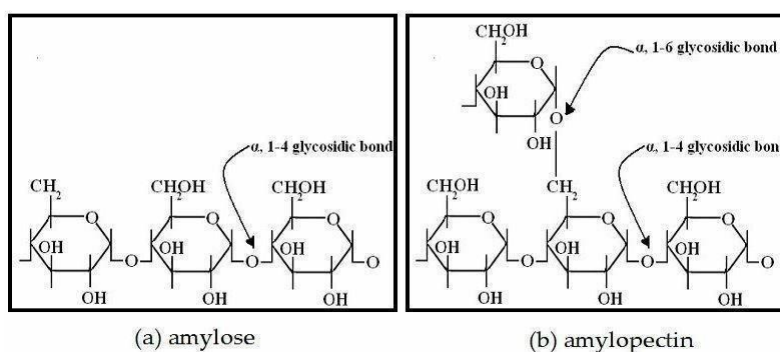
Gambar 2. 1 Gambar Pisang Kepok,
Sumber: (Staf redaksi alamtani,2017)

Klasifikasi tanaman pisang kepok adalah sebagai berikut (Kusmartono et al., 2021):

Regnum : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Classis : Monocotyledoneae
Ordo : Musales
Familia : Musaceae
Genus : Musa
Spesies : Musa paradisiaca L.

2.2 Pati

Pati adalah karbohidrat yang berbentuk polisakarida dengan rumus umum $(C_6H_{10}O_5)_n$, dimana harga n bervariasi (Mastuti, 2012). Pati tersusun oleh rangkaian amilosa dan amilopektin dengan perbandingan 1:4. Amilosa merupakan polimer rantai lurus yang terdiri dari rantai panjang glukosa yang terikat pada ikatan 1,4- α -glucoside, sedangkan amilopektin merupakan rantai cabang yang terdiri dari rantai normal glukosa yang terikat pada 1,4- α -glukosida dan ikatan lainnya pada 1,6- α -glucoside (Mastuti, 2013). Dalam suatu molekul pati, ikatan α -(1 \rightarrow 6) unit glukosa ini jumlahnya sangat sedikit, berkisar antara 4–5%. Namun, jumlah molekul dengan rantai yang bercabang, yaitu amilopektin, sangat banyak (Herawati, 2012). Pati dibedakan menjadi 2 yaitu pati resisten dan pati non-resisten.



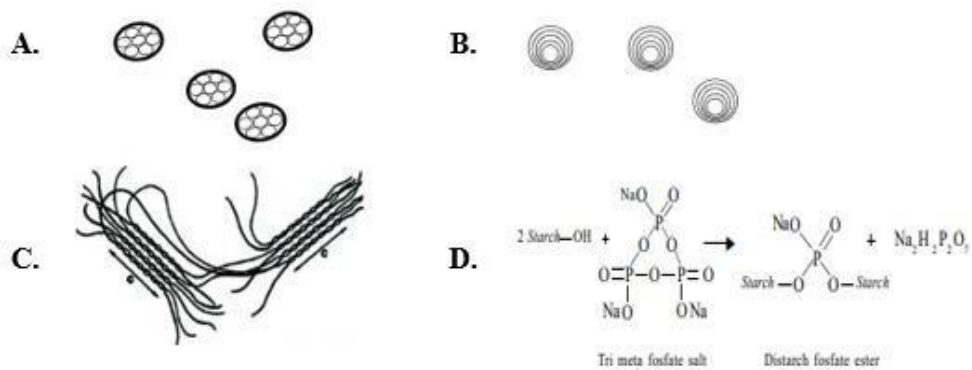
Gambar 2.2 Struktur (a)amilosa (b)amilopektin

Sumber: (Thofanda Muharam dkk, 2022)

2.2.1 Pati Resisten

Pati resisten (RS) merupakan karbohidrat tidak tercerna dalam sistem pencernaan manusia sehingga berpengaruh positif bagi kesehatan tubuh (Wulan & Widyaningsih, 2007). Adapun produk alam yang banyak mengandung pati resisten

seperti umbi singkong memiliki kadar pati 73,7-84,9% (Zidan,2023), talas memiliki kadar pati 80%(Aryanti et al,2017), jagung memiliki kadar pati 80,05%(Suarni et al), pisang kepok memiliki kandungan pati sebesar 61-73%. Pati resisten atau RS dapat diklasifikasikan menjadi empat tipe, yaitu RS1, RS2, RS3, dan RS4. Pati resisten 1 atau RS1 dapat diperoleh secara langsung, seperti pada biji-bijian atau leguminosa dan biji yang tidakdiproses (Gambar A). Pati resisten 2 atau RS2 secara alami terdapat di dalam struktur granula, seperti kentang yang belum dimasak, juga pada tepung pisang dan tepung jagung yang mengandung banyak amilosa (Gambar B). Pati resisten 3 atau RS3 terbentuk karena proses pengolahan dan pendinginan, seperti pada roti, emping jagung dan kentang yang dimasak atau didinginkan, atau retrogradasi amilosa jagung (Gambar C). Pati resisten 4 atau RS4 merupakan pati hasil modifikasi secara kimia melalui asetilasi dan hidroksipropilasi maupun pati ikatansilang sehingga tahan dicerna (Gambar D).



Gambar 2. 3 Gambar Jenis-jenis Pati Resisten (A=RS1, B=RS2, C=RS3, D=RS4)

Pati resisten 1 mempunyai karakteristik stabil terhadap proses pemanasan pada saat pengolahan, serta banyak digunakan sebagai bahan tambahan untuk makanan tradisional. Pati resisten 2 merupakan pati yang memiliki bentuk granula dan tahan terhadap enzim pencernaan. Secara kimiawi, glukosa yang dihasilkan oleh enzim pencernaan pada sampel pati yang dimasak secara homogen dan sampel yang tidak dimasak dapat diukur untuk menentukan kandungan pati resisten 2. Pati resisten 3 adalah pati resisten yang paling banyak dijumpai, merupakan fraksi pati yang umumnya sebagai retrogradasi amilosa selama proses pendinginan pada gelatinisasi pati. Secara kimiawi, fraksi pati yang tahan terhadap pemanasan maupun enzim pencernaan. Pati resisten 4 adalah pati resisten yang terbentuk dari ikatan selain -(1-4) atau -(1-6) (Herawati, 2012).

2.2.2 Pati Non-resisten

Pati non-resisten merupakan karbohidrat yang dapat dicerna oleh sistem pencernaan manusia. Pada pati non-resisten dapat dibagi menjadi 2 yaitu *Rapidly Digestible Starch* (RDS) dan *Slowly Digestible Starch* (SDS). *Rapidly Digestible Starch* (RDS) adalah fraksi pati yang dapat dicerna oleh sistem pencernaan manusia dengan waktu relatif cepat, waktu yang diperlukan yaitu 20 menit. Sedangkan *Slowly Digestible Starch* (SDS) adalah fraksi pati yang dapat dicerna oleh sistem pencernaan manusia dengan lambat, waktu yang diperlukan yaitu 20-120 menit (Wijaya, 2018).

2.3 Metode Pemisahan

Metode pemisahan merupakan suatu cara yang digunakan untuk memisahkan atau memurnikan suatu senyawa atau kelompok senyawa yang mempunyai susunan kimia yang berkaitan dari suatu bahan, baik dalam skala laboratorium maupun skala industri (Cahyani, 2021). Metode pemisahan bertujuan untuk mendapatkan zat murni atau beberapa zat murni dari suatu campuran, sering disebut sebagai pemurnian dan juga untuk mengetahui keberadaan suatu zat dalam suatu sampel. Berdasarkan tahap proses pemisahan, metode pemisahan dapat dibedakan menjadi dua yaitu metode pemisahan sederhana dan metode pemisahan kompleks (Prabawani, 2023) :

- A. Metode Pemisahan Sederhana adalah metode yang digunakan dengan cara satu tahap. Pada proses pemisahan ini terbatas dan hanya untuk memisahkan campuran atau larutan yang relatif sederhana.
- B. Metode Pemisahan Kompleks adalah metode yang memerlukan beberapa tahapan kerja, diantaranya penambahan bahan tertentu, pengaturan proses mekanik alat dan reaksi-reaksi kimia yang diperlukan. Metode ini biasanya dilakukan dengan menggabungkan dua atau lebih metode sederhana.

Metode pemisahan adalah suatu cara yang digunakan untuk memisahkan atau memurnikan suatu senyawa atau kelompok senyawa yang mempunyai susunan kimia yang berkaitan dari suatu bahan. Metode pemisahan bertujuan untuk mendapatkan zat murni dari suatu campuran yang disebut sebagai pemurnian dan untuk mengetahui keberadaan zat dalam suatu sampel.

2.3.1 Filtrasi

Filtrasi adalah suatu proses penyaringan yang bertujuan untuk menghilangkan zat padat tersuspensi dari air melalui media berpori. Filtrasi dapat juga digunakan sebagai proses pemisahan liquid-liquid dengan cara melewatkan liquid melalui media berpori atau bahan-bahan berpori untuk menyisihkan atau menghilangkan sebanyak-banyaknya butiran-butiran halus zat padat tersuspensi dari liquid (Pratiwi, 2023).

Filtrasi merupakan suatu operasi pemisahan campuran antara padatan dan cairan dengan melewatkan umpan (padatan + cairan) melalui medium penyaring. Pada dasarnya pemisahan dengan metode ini didasarkan pada ukuran partikel yang ada di dalam campuran. Proses filtrasi campuran mengalir ke bawah disebabkan adanya tenaga dorong berupa beda tekanan, sebagai contoh adalah akibat gravitasi atau tenaga putar. Secara umum filtrasi dilakukan bila jumlah padatan dalam suspensi relatif lebih kecil dibandingkan zat cairnya (Meylisyah, 2022).

Pada proses filtrasi didapatkan filtrat dan residu. Filtrat merupakan cairan dan padatan yang dapat lolos melewati alat berpori atau saringan. Filtrat juga dapat diartikan sebagai cairan yang didapatkan dari hasil pemisahan secara filtrasi atau penyaringan (Almeyda & Widayanti, 2020). Sedangkan residu merupakan padatan yang tidak dapat lolos melewati atau tertahan oleh alat berpori. Residu juga dapat diartikan materi pengotor atau sisa dari suatu proses filtrasi atau penyaringan (Nurfadilla., 2022).

2.3.2 Dekantasi

Dekantasi adalah proses pemisahan zat padat yang tidak ikut terlarut dalam pelarutnya dengan cara menuangkan cairan dengan hati-hati sehingga cairan akan terpisah meninggalkan padatan yang tidak terlarut (Argandi.,2009). Dekantasi juga dapat didefinisikan sebagai pemisahan campuran dengan didasarkan pada perbedaan densitasnya. Semakin besar densitas suatu senyawa maka akan semakin mudah proses dekantasi dilakukan. Prinsip kerja dekantasi yaitu melakukan pemisahan karena adanya perbedaan partikel, massa dan wujudnya yang cukup besar. Dengan dekantasi pemisahan campuran dapat lebih cepat.

Pada proses dekantasi didapatkan endapan dan pelarut. Endapan adalah proses pemisahan larutan suspensi menjadi fluida jernih supernatan dan slurry yang mengandung konsentrasi padatan lebih tinggi. Endapan juga dapat diartikan zat

padat yang tidak terlarut pada larutan.

Sedangkan pelarut merupakan bahan yang berfungsi untuk melarutkan suatu zat.

2.3.3 Destilasi

Destilasi adalah suatu metode pemisahan campuran yang didasarkan pada perbedaan tingkat volalitas (kemudahan suatu zat untuk menguap) pada suhu dan tekanan tertentu. Destilasi merupakan proses fisika dan tidak terjadi adanya reaksi kimia selama proses berlangsung. Dasar utama pemisahan dengan cara destilasi adalah perbedaan titik didih cairan pada tekanan tertentu. Proses destilasi biasanya melibatkan suatu penguapan campuran dan diikuti dengan proses pendinginan dan pengembunan (Permana, 2020).

2.3.4 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu nama yang diberikan untuk teknik pemisahan tertentu. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam (stationary) dan fase gerak (mobile), pemisahan tergantung pada gerakan relatif dari dua fase tersebut. Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Seluruh bentuk kromatografi berkerja berdasarkan prinsip ini. Semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda (Murti, 2022)

2.3.5 Sentrifugasi

Pemisahan sentrifugal menggunakan prinsip dimana objek diputar secara horizontal pada jarak tertentu. Apabila objek berotasi di dalam tabung atau silinder yang berisi campuran cairan dan partikel, maka campuran tersebut dapat bergerak menuju pusat rotasi, namun hal tersebut tidak terjadi karena adanya gaya yang berlawanan yang menuju kearah dinding luar silinder atau tabung sesuai berat jenis masing-masing partikel, gaya tersebut adalah gaya sentrifugasi. Gaya inilah yang menyebabkan partikel-partikel menuju dinding tabung dan terakumulasi membentuk endapan. Dengan adanya teknik ini, proses pengendapan suatu bahan akan lebih cepat dan optimum dibandingkan dengan teknik biasa (Lestari, 2017).

2.3.6 Sublimasi

Sublimasi adalah perubahan wujud zat dari padat ke gas atau dari gas ke padat. Bila partikel penyusun suatu zat padat diberikan kenaikan suhu, maka

pertikel tersebut diturunkan akan menyublim menjadi gas. Sebaliknya, bila suhu gas tersebut diturunkan, maka gas akan segera berubah wujudnya menjadi padat. Cara yang dapat kita lakukan adalah memisahkan partikel yang mudah menyublim tersebut menjadi gas. Gas yang dihasilkan ditampung, lalu didinginkan kembali. Syarat pemisahan campuran dengan menggunakan sublimasi adalah partikel yang bercampur harus memiliki perbedaan titik didih yang besar, sehingga kita dapat menghasilkan uap dengan tingkat kemurnian yang tinggi (Ulya, 2022).

2.3.7 Kristalisasi

Kristalisasi adalah suatu pembentukan partikel padatan didalam sebuah fasa homogen dan merupakan salah satu proses pemurnian dengan hasil produk berupa padatan. Kristalisasi dilakukan didasarkan pada prinsip kelarutannya , yakni suatu senyawa akan cenderung lebih cepat larut didalam cairan dingin. Ketika senyawa berada pada kondisi panas serta keadaanya jenuh kemudian dibiarkan mendingin, maka zat terlarut tidak akan larut dalam pelarut dan akan membentuk kristal dengan senyawa murni (Setiosari, 2018)

2.3.8 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyari tertentu. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian, hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Angelina, 2019)

2.4 Spektrofotometri Uv-Vis

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk menganalisis suatu senyawa baik secara kuantitatif maupun kualitatif, dengan cara mengukur transmittan ataupun absorbansi suatu sampel sebagai fungsi dari konsentrasi (Nurmahribi, 2021). Spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada sinar yang datang akan diteruskan dan diserap, sinar yang diserap intensitasnya akan berbanding lurus dengan besarnya konsentrasi zat yang menyerap sinar (Wahyuni et al., 2022). Spektrofotometri merupakan metode analisis yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor fototube. Senyawa-senyawa yang dapat diukur dengan metoda ini harus memenuhi hukum Lambert-Beer yaitu :

1. Bila suatu sinar monokromatis dilewatkan pada medium pengabsorpsi, maka berkurangnya intensitas cahaya per unit tebal medium sebanding dengan intensitas cahaya tersebut
2. Berkurangnya intensitas cahaya per unit konsentrasi akan berbanding lurus dengan intensitas cahaya (Soedarto & Kumoro, 2013).

Spektrofotometri Sinar Tampak (UV-Vis) adalah metode pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Chandra, 2011). Pada alat spektrofotometri Uv-Vis, cahaya yang digunakan memiliki kisaran panjang gelombang (200 – 400) nm untuk sinar ultraviolet dan (400 – 800) nm untuk sinar tampak (visible) (Hammado & Illing, 2013).

Prinsip kerja alat ini yaitu spektrum elektromagnetik dibagi dalam beberapa daerah cahaya. Suatu daerah akan diabsorpsi oleh atom atau molekul dan panjang gelombang cahaya yang diabsorpsi dapat menunjukkan struktur senyawa yang diukur serapannya (Putri, 2017). Keuntungan utama metode spektrofotometri adalah bahwa metode ini sangat cocok untuk mengukur kuantitas zat yang sangat kecil. Selain itu, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh detector dan grafik yang sudah diregresikan (Putri, 2017).

Pada Spektrofotometri UV-Vis digunakan hukum Lambert-Beer dimana metode analisa kuantitatif didasarkan pada absorpsi radiasi oleh suatu unsur yang mengabsorpsi dan melibatkan pengukuran intensitas cahaya atau kekuatan radiasi. Faktor yang mempengaruhi kekuatan radiasi dari cahaya yang dipancarkan melalui media absorpsi. Seberkas cahaya dari radiasi monokromatik (yaitu panjang gelombang yang tunggal) dari kekuatan radiant I_0 dalam larutan, dan suatu berkas cahaya yang muncul dari kekuatan radiasi I dipancarkan oleh larutan. Hukum Lambert-Beer menyatakan: “Jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan”(Hamka, 2013).

2.5 Prinsip Metode Uji

Pada pengukuran pati resisten dapat dilakukan dengan berbagai metode, pada jurnal Pengukuran Pati Resisten Tipe 5 secara In Vitro pada Nasi Uduk yang dilakukan oleh (Pangastuti, permana., 2021). Dijelaskan bahwa pati resisten dan daya cerna pati dilakukan dengan in vitro, dimana analisis digunakan dengan menggunakan Spektroskopi FTIR dengan menggunakan reagen-reagen berikut: Maltosa (Merck, USA), enzim α -amilase (Merck, USA), 3,5-dinitrosalysilic acid

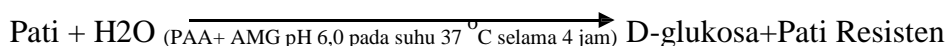
(Merck, USA) and amiloglukosidase (Merck, USA). Pada laporan praktik kerja lapangan Penentuan Kadar Pati Resisten Starch (RS) Pati *Tacca* (*Tacca leontopetaloides*) Hasil Modifikasi fisik di BPTBA LIPI Yogyakarta yang dilakukan oleh (Siti.,2016). Dijelaskan bahwa penentuan pati resisten dilakukan dengan menggunakan metode in-vitro, dimana analisis digunakan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan reagen-reagen berikut: α -amilase (*Porcine pancreas*) (Merck DiaSys), Amyloglucosidase (*Aspergillus niger*) (Merck DiaSys), Reagen Glukosa oksidase- peroksidase (GOD-PAP) (Merck DiaSys). Pada skripsi Pengukuran Glukosa dan Pati Resisten pada Padi Kultivar Local Thailand secara In Vitro yang dilakukan oleh (Widiyah.,2020). Dijelaskan pengukuran pati resisten dilakukan dengan menggunakan metode in vitro, pada analisis tersebut menggunakan Spektrofotometri UV Vis dengan menggunakan reagen berikut: D-Glucose Assay Kit (GOPOD, *Megazyme*). Adapun jurnal Penentuan Pati Resisten dan Kadar Gizi Mie Gandum Utuh (*Triticum aestivum L.*) varietas Dewata yang dilakukan oleh (Febrin et al.,2014). Pengukuran tersebut dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, pada analisis ini digunakan reagen berikut: enzim amylase, glukosa murni (E-Merck grade pro analysis, Jerman) enzim amiloglukosidase (SIGMA A-9913, Jerman) Dari beberapa referensi yang telah di dapat dapat di ketahui bahwa pengukuran pati resisten masih sangat terbatas.

Pada tahun 1982 hidrolisis enzimatik terhadap fraksi pati yang resisten pertama kali diketahui oleh Englyst dkk, dimana pada saat itu mereka mengenal sebagai pengukuran polisakaridan non-pati. Penelitian tersebut kemudian dikembangkan oleh Berry dengan mengembangkan prosedur pati resisten dengan menggabungkan α -amilase/pullunase, tetapi menghilangkan perlakuan pemanasan awal suhu 100°C agar lebih menyerupai kondisi fisiologis, pada kondisi tersebut hasil kandungan pati resisten yang didapat lebih tinggi. Kemudian penemuan tersebut dikonfirmasi kembali dengan Englyst melalui penelitian dengan subjek ileostomy yang sehat. Pada awal tahun 1990 pengukuran pati resisten secara signifikan fisiologis telah terwujud sepenuhnya. Beberapa metode baru atau modifikasi telah dikembangkan melalui program penelitian Eropa EURESTA yang dilakukan oleh Champ, Muir dan O'Dea, Faisant dkk, Goni dkk dan Akerberg dkk.

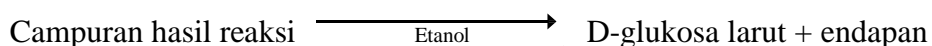
Pada tahun 2002 Mccleary dkk. Mengembangkan metode yang kuat dan handal untuk pengukuran pati resisten. Pada pengembangannya dilakukan

pengukuran dengan mencerminkan kondisi *in vivo*, sehingga mendapatkan nilai yang signifikan secara fisiologis. Metode pengembangan tersebut dapat digunakan untuk mengukur pati resisten, pati non resisten dan kandungan total pati sampel. Metode tersebut telah mampu mengevaluasi antar laboratorium dan menjadi metode AOAC 2002.02 dan metode AACC 32-40.01.

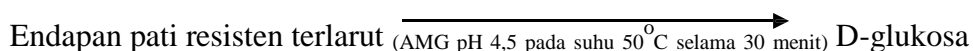
Metode pengukuran pati resisten secara enzimatik, pada pengukuran tersebut enzim dapat memecah pati resisten menjadi glukosa. Glukosa yang diperoleh selanjutnya diukur dengan reagen glukosa oksidase/peroksidase (GOPOD) yang dapat menentukan kandungan pati resisten dalam sampel. Berikut merupakan tahapan lengkap dari proses analisis pati resisten dari sampel pati. Sampel pati diinkubasi dalam shaking water bath dalam gerakan linear dengan tingkat kejenuhan PAA dan AMG murni selama 4 jam pada suhu 37°C. Selama waktu ini, pati non-resisten (pati yang dapat dicerna) dapat larut dan terhidrolisis menjadi D-glukosa yang diakibatkan oleh reaksi gabungan antara kedua enzim tersebut. Berikut reaksi yang terjadi:



Pada reaksi tersebut nantinya diakhiri dengan penambahan etanol dengan volume tertentu yang nantinya pati resisten akan diperoleh kembali sebagai endapan dengan proses saat sentrifugasi dan dihasilkan campuran hasil reaksi (Etanol) D-glukosa larut yang disebut supernatan. Berikut reaksi yang terjadi:



Endapan pati resisten yang telah didapat ini kemudian dicuci dua kali dengan menggunakan etanol 50%, selanjutnya diikuti dengan sentrifugasi yang menghasilkan endapan dan cairan. Cairan bebas atau supernatan dipindahkan dengan dekantasi. Setelah proses pencucian, endapan pati resisten dilarutkan dalam NaOH 1,7 M dan diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer. Kemudian larutan ini dinetralkan dengan buffer asam asetat dan pati telah terhidrolisis secara kuantitatif menjadi D-glukosa dengan AMG. Berikut reaksi yang terjadi:



D-glukosa diukur dengan reagen glukosa oksidase/peroksidase (GOPOD) yang dapat menentukan kandungan pati resisten dalam sampel. 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.