

II. BAHAN DAN METODE

2.1 Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Biomassa, Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan September 2009 sampai Januari 2010.

2.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pati sukun, RS alami, RS tipe III, RS tipe IV, glukosa, NaCl 0,85 %, MRS Agar steril, aquades, buffer fosfat (0,1M) pH 6,5, indikator phenolpftalein, larutan standar NaOH 0,1 N, garam fisiologis, suspensi *mice digesta flora* dari digesta tikus (*Sprague Dawley*), enzim α -amilase, enzim protease, NaOH, HCl, enzim amylglukosidase, etanol, aseton, asetat anhidrat, dan bahan kimia lainnya untuk analisis.

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas piala, agitasi, kertas saring, oven, alat titrasi, inkubator, magnetik stirrer, pH meter, penumbuk/penghalus, cawan, furnace, timbangan, loyang, tabung reaksi, pemanas, blanko, ion kromatografi, blender, dan ayakan 80 mesh, baskom / wadah plastik, alat pamarut, pisau, erlenmeyer, *baker glass*, gelas ukur, timbangan magnetik, pompa vakum, pipet tetes, garam celite kering, kertas lakmus, aluminium foil, sentrifius, *shaker waterbath*, desikator, panci, kompor, *whiteness meter*, autoclave, petri, kapas, dan alat-alat gelas lainnya untuk analisis.

2.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan satu faktor dan tiga ulangan. Faktor terdiri dari lima taraf perlakuan, yaitu kontrol pati alami (S0K), RS tipe III retrogradasi (S3R), RS tipe IV asetilasi (S4A), RS tipe IV fosforilasi (S4F), dan glukosa (S5G). Data yang diperoleh diuji kesamaan ragamnya dengan uji Bartlett dan kemenambahan data dengan uji Tukey, kemudian data dianalisis sidik ragam untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

2.4. Pelaksanaan Penelitian

2.4.1. Ekstraksi Pati Sukun

Metode ekstraksi yang digunakan adalah dengan menggunakan metode isolasi dan karakteristik pati secara umum (Gambar 5). Potongan buah sukun kemudian diparut dengan menggunakan alat pamarut. Hasil parutan buah sukun ini kemudian direndam dalam air. Setelah 15 menit, disaring dengan menggunakan kain saring. Pati hasil penyaringan kemudian diendapkan selama 24 jam, dan endapan dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C. Selanjutnya pati disimpan di dalam kantong plastik.

2.4.2. Pembuatan Beberapa Pati Resisten

2.4.2.1. Pati Resisten Tipe III

Pembuatan pati tipe III mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Purba (2007). Pati disuspensikan dalam air (20% b/v), diautoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C, didinginkan pada suhu ruang dan disimpan pada suhu 10°C selama 24 jam, kemudian dikeringkan dengan oven suhu 50°C selama 24 jam. Selanjutnya pati di haluskan.

2.4.2.2. Pati Resisten Tipe IV Menggunakan Reaksi Fosforilasi

Pembuatan pati dengan metode substitusi dilakukan berdasarkan prosedur yang direkomendasikan oleh Lim *et al.* (1993) dengan sedikit modifikasi. Ditimbang sodium tripolyfosfat masing-masing sebanyak 1,5 gr. Kemudian dilarutkan kedalam aquades 150 mL yang telah mengandung 7,5 gr sodium sulfat. Lalu pH ditetapkan 11 dengan penambahan NaOH 10%. Setelah itu 150 gr pati sukun disuspensikan kedalam larutan. Lalu pH suspensi pati ditetapkan kembali dengan menambahkan NaOH 5%. Setelah itu suspensi diaduk selama 1 jam pada suhu ruang dan dikeringkan didalam oven pada suhu 40°C. Untuk efek fosforilasi, setelah dingin, pati dihaluskan lalu dioven kembali pada suhu 130°C selama 2

jam, kemudian didinginkan kembali pada suhu ruang. Setelah itu pati disuspensikan kedalam aquades sebanyak 475 mL dan pH dicatat. Lalu pH suspensi dinetralkan sampai pH 6,5 dengan penambahan HCL 5%, kemudian suspensi pati disentrifius. Setelah itu suspensi pati dicuci sebanyak 3x (kali) dengan menggunakan aquades, lalu dioven pada suhu 40⁰C hingga kering.

2.4.2.3. Pati Resisten Tipe IV Menggunakan Reaksi Asetilasi

Prosedur pembuatan pati asetilasi berdasarkan metode Bello-Perez *et al.* (2000) Sebanyak 100 gr pati dilarutkan dalam 225 mL air suling dan distirer selama 1 jam pada suhu 25⁰C. Derajat keasaman diatur hingga mencapai pH 8 dengan penambahan NaOH 3%. Secara perlahan-lahan ditambahkan asetat anhidrat

4,5 gr sambil diaduk dan pH tetap dijaga 8-8,4 dengan menambahkan NaOH 3%. Pengadukan dilakukan selama satu jam. Kemudian ditambahkan HCl 0,5 N sampai pH mencapai 6. Selanjutnya disentrifius (2500 rpm). Endapan dicuci dengan air suling sebanyak dua kali dan etanol 95% sekali. Endapan dikeringkan dengan oven 40⁰C, kemudian ditumbuk dan disimpan.

2.4.3. Analisis Kadar RS (*Resistant Starch*)

Analisis ini dilakukan untuk menentukan kadar RS tertinggi dari pati tipe III dan IV termodifikasi (Purba, 2007). Sebanyak 1 g pati (RS alami, RS tipe III retrogradasi, RS tipe IV asetilasi, dan RS tipe IV forforilasi) didispersikan ke dalam 50 mL buffer fosfat (0,008M, pH 6), ditambahkan 0,4 mL heat stable α -amilase. Erlenmeyer ditutup dengan alufo, dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 100⁰C selama 30 menit, diagitasi setiap 10 menit, lalu didinginkan di suhu ruang. Kemudian ditambahkan 5 mL NaOH (0,285) hingga pH menjadi 7,5 dan tambahkan 1 mL protease (16 mg/100 mL larutan protease dalam bufer fosfat). Campuran dimasukkan ke dalam *shaker water bath* dengan suhu 60⁰C selama 30 menit, lalu didinginkan di suhu ruang. Kemudian 5 mL HCl (0,325 N) ditambahkan sehingga pH menjadi 4,5. Selanjutnya ditambahkan 1 mL enzim amiloglukosidase kemudian dimasukkan dalam *shaker water bath* pada suhu 60⁰C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifuse (2500 rpm, 10 menit) dan residu yang tidak larut dicuci dengan aquades, ethanol, aseton, dietyl eter masing-masing sebanyak 2 kali. Residu dikeringkan dalam oven pada suhu 40⁰C.

2.4.4. Pengujian Sifat Prebiotik

Pengujian sifat prebiotik dilakukan terhadap sampel dari beberapa jenis pati resisten yaitu : pati sukun alami, tipe III retrogradasi, tipe IV asetilasi, dan tipe IV forforilasi dengan cara fermentasi sampel.

2.4.4.1. Pembuatan Suspensi Mice Digesta

Tahap pertama dilakukan pembedahan terhadap tikus. Tikus yang akan digunakan jenis *Sprague Dawley* dipilih yang berumur sekitar 2 bulan dengan berat yang seragam. Sebelum dibedah, tikus dipingsankan terlebih dahulu menggunakan kapas yang telah diberi larutan kloroform. Setelah tikus pingsan selanjutnya tikus diletakkan di atas alas dengan posisi terlentang. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil usus besar tikus yaitu sepertiga bagian paling bawah. Usus besar yang telah diambil selanjutnya dicuci menggunakan larutan buffer fosfat 0,1 M pH 6,5 dengan perbandingan 20 g feses : 100 mL larutan buffer fosfat (Kotcharian *et al.*, 2004). Larutan tersebut selanjutnya diaduk-aduk untuk menghomogenkan larutannya. Selanjutnya larutan dipisahkan dari usus dan selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap pH awal dan total BAL awal sebelum digunakan untuk fermentasi sampel.

2.4.4.2. Fermentasi Sampel

Simulasi fermentasi di dalam usus besar dikerjakan menurut Kotcharian *et al.* (2004) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 1 g sampel dari 6 jenis sampel diinkubasi dengan 100 mL suspensi *mice digesta flora* dari digesta tikus percobaan (20g/100 mL 0,1 M buffer fosfat; pH 6,5) dengan digoyang selama 24 jam pada suhu 37°C melalui alat shaker water-bath. Sebagai kontrol fermentasi, sampel diganti dengan 1 g glukosa dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Sebagai kontrol pertumbuhan total bakteri asam laktat, fermentasi dilakukan dengan menggunakan inokulum (suspensi tanpa penambahan sampel). Sampel yang telah difermentasi dilakukan pengukuran terhadap pH (AOAC, 1990) dan total bakteri asam laktat (Fardiaz, 1987). Selanjutnya sampel langsung dibekukan untuk diuji lemak bebas (ALB) dengan metode titrasi dan daya fermentabilitas (Sudarmadji, 1997).