

LAMPIRAN A PROSEDUR ANALISIS

A.1. Pengujian Daya Serap Air (*Water Absorption Index*) (Ganjyal *et al.*, 2006; Shimelis *et al.*, 2006)

Pengujian daya serap air (*Water Absorption Index*) dilakukan untuk bahan awal (tepung ganyong) dan tepung ganyong yang mengalami pre-gelatinisasi dan dikeringkan. Pengujian dilakukan dengan cara:

1. Sampel tepung ganyong sebanyak 0,5 gram (BSA) disuspensikan dalam 5 ml akuades.
2. Suspensi dicampur menggunakan vorteks selama 30 detik, kemudian didiamkan selama 30 menit.
3. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
4. Cairan supernatan dipisahkan, endapan yang terbentuk ditimbang (BSAk).
5. Daya serap air ditentukan dengan:

$$\text{Daya serap air (\%)} = \frac{(\text{BSAk} - \text{BSA})}{\text{berat sampel (basis kering)}} \times 100\%$$

A.2. Persen Rendemen

1. Tepung ganyong yang telah mengalami pregelatinisasi diletakkan dalam loyang dan dikeringkan di dalam *cabinet dryer* pada suhu 60°C hingga kadar air 8-10%.
2. Lapisan yang terbentuk dihancurkan dengan *miller* kemudian diayak hingga lolos ayakan 80 mesh.
3. Hasil yang lolos ayakan 80 mesh ditimbang.
4. Rendemen dihitung dengan rumus:

$$\% \text{rendemen} = \frac{(\text{berat tepung yang lolos ayakan 80 mesh})}{(\text{berat larutan tepung})} \times 100\%$$

A.3 Pengujian Viskositas (menggunakan viskosimeter)

Sampel yang digunakan adalah tepung ganyong dan tepung ganyong pregelatinisasi.

1. 1 gram sampel dilarutkan dalam 100 ml akuades.
2. Larutan dipanaskan hingga suhu 95°C selama 15 menit, kemudian pasta yang terbentuk didinginkan hingga suhu 50°C.
3. Spindel no. 3 dipasang pada viskosimeter, kemudian pasta sebanyak 15 ml dimasukkan dalam tabung reaksi dan diletakkan di bawah alat viskosimeter.
4. Spindel diturunkan hingga terendam dalam pasta sampai pada garis batas spindel. Kepala spindel harus berada pada posisi tengah dari pasta.
5. Diukur viskositas larutan tersebut. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada tiap sampel.

A.4. Pengujian Kadar Air dengan Metode Thermogravimetri (AOAC, 1970 dan Rangana, 1979 yang disitasi oleh Sudarmadji dkk. (1997)

Sampel yang digunakan adalah tepung ganyong.

1. Sampel yang telah berupa serbuk atau bahan yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1-2 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya.
2. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3-5 jam.
3. Kemudian di dinginkan dalam eksikator dan timbang.

4. Dipanaskan lagi dalam oven 30 menit, dinginkan dalam eksikator dan ditimbang. NB: Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg)
5. Pengurangan berat merupakan banyaknya air dalam bahan.

A.5. Pengujian Kadar Pati (*Direct Acid Hydrolysis Method*; AOAC, 1970 disitasi oleh Sudarmadji dkk. (1997))

1. Sampel ditimbang sebanyak 2-5 g yang berupa bahan padat dan telah dihaluskan.
2. Ditambahkan 50 ml akuades dan aduk selama 1 jam.
3. Suspensi disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan akuades sampai volume filtrat 250 ml. (Filtrat ini mengandung karbohidrat yang larut dan dibuang)
4. Untuk bahan yang mengandung lemak, maka pati yang terdapat sebagai residu pada kertas saring dicuci 5 kali dengan 10ml ether, dibiarkan ether menguap dari residu.
5. Kemudian dicuci lagi dengan 150 ml alkohol 10% untuk membebaskan karbohidrat yang terlarut.
6. Residu dipindahkan secara kuantitatif dari kertas saring ke dalam erlenmeyer dengan pencucian 200 ml aquades dan ditambahkan 20 ml HCl \pm 25% ($\rho = 1,125$).
7. Ditutup dengan pendingin balik dan panaskan di atas penangas air mendidih selama 2,5 jam.
8. Setelah dingin dinetralkan dengan larutan NaOH 45% dan encerkan sampai volume 500 ml, kemudian saring.
9. Kadar gula ditentukan yang dinyatakan sebagai glukosa dari filtrat yang diperoleh.
10. Penentuan glukosa seperti pada penentuan gula reduksi. Berat glukosa dikalikan 0,9 merupakan berat pati.

A.6. Pengujian Mikroskopis (Pengamatan Granula Pati)

Sampel yang digunakan adalah tepung ganyong dan tepung ganyong pregelatinisasi. Masing-masing sampel dibuat dengan konsentrasi 1% dalam 100 ml aquades, kemudian larutan sampel dipanaskan suhu 85°C selama 15 menit. Sediaan preparat dibuat dengan cara meneteskan larutan sampel dan ditambahkan dengan larutan iodin kemudian ditutup dengan *cover glass*.

Pengamatan granula pati dilakukan menggunakan mikroskop cahaya seri BX41 yang terhubung dengan *microscope digital camera* seri DP 20 yang juga dihubungkan dengan komputer. Pengambilan sampel untuk preparat dilakukan sebanyak satu kali untuk tiap perlakuan dalam tiap ulangan. Sedangkan untuk pengambilan foto granula pati dilakukan sebanyak tiga kali pada bidang pandang yang berbeda untuk setiap preparat. Prosedur pengamatan adalah sebagai berikut:

a) Bentuk Granula Pati Tergelatinisasi (Olympus, 2008)

Sediaan preparat diletakkan di atas meja mikroskop kemudian dilakukan pengaturan cahaya dan fokus sehingga diperoleh intensitas cahaya dan kontras yang jelas. Setelah itu dicari bidang pandang yang jelas, kemudian dilakukan pengamatan terhadap bentuk granula pati dan *hillus*nya dengan perbesaran 40 kali.

b) Ukuran Granula Pati Tergelatinisasi (Olympus, 2008)

Preparat yang sama yang digunakan pada pengamatan bentuk granula pati tergelatinisasi kemudian dilakukan pengukuran luas granulanya. Satuan ukuran yang digunakan adalah mikrometer (μm^2). Ukuran rata-rata granula pati ditentukan berdasarkan rata-rata dari lima granula yang teramati di foto dan dipilih secara acak. Oleh karena itu, ada 30 ukuran granula pati (3 ulangan x 1 preparat/ulangan x 2 foto/preparat x 5 granula/foto) yang akan dirata-rata dan dihitung standar deviasinya pada suhu tertentu. Pemilihan granula dilakukan secara acak.

A.7. Pengujian Nilai Cerna Pati secara *in vitro*
(Kon *et al.*, 1971 yang disitasi oleh Muchtadi dan Palupi, 1992)

Sampel yang digunakan berupa tepung ganyong dan tepung ganyong yang telah menagalami pregelatinisasi.

1. Suspensi tepung (1%) dipanaskan dalam penangas air selama 30 menit sampai mencapai suhu 90°C, kemudian didinginkan
2. 2 ml larutan tepung dalam tabung reaksi ditambah 3 ml air destilat dan 5 ml larutan *buffer* Na-fosfat 0,1 M, pH 7,0, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 15 menit
3. Ditambahkan 5 ml larutan α -amilase dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 30 menit
4. 1 ml campuran reaksi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain kemudian ditambahkan 2 ml pereaksi dinitrosalisilat. Selanjutnya dipanaskan dalam penangas air 100°C selama 10 menit
5. Setelah didinginkan campuran reaksi diencerkan dengan menambahkan 10 ml air destilat
6. Warna oranye merah dari campuran diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm
7. Kadar maltosa diukur dengan menggunakan kurva standar maltosa murni yang diperoleh dengan cara mereaksikan larutan maltosa standar dengan pereaksi dinitrosalisilat menggunakan cara yang sama seperti sebelumnya
8. Daya cerna pati sampel dihitung sebagai persentase relatif terhadap pati murni sebagai berikut:

$$\text{Daya cerna (\%)} = \frac{\text{kadar maltosa sampel setelah reaksi enzimatik}}{\text{kadar maltosa pati murni setelah reaksi enzimatik}} \times 100\%$$

A.8. Pengujian Kadar Serat Larut dan Tidak Larut (Asp *et al.*, 1983)

1. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram (dengan akurasi $\pm 0,1$ mg) dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Berat sampel dinyatakan sebagai *W*.
2. 25 ml buffer natrium fosfat (pH 6,9) ditambahkan ke sampel dan campuran disuspensikan. Kemudian, ditambahkan 10 mg α amilase dan erlenmeyer ditutup dengan aluminium *foil*. Selanjutnya, dilakukan inkubasi di *waterbath* dengan suhu 53°C dengan pengadukan selama 60 menit.
3. Erlenmeyer didinginkan, ditambahkan 20 ml akuades dan pH larutan dikondisikan sampai 1,5 dengan menambahkan HC 4N dan 1N. Elektroda pH-meter dibilas dengan beberapa ml akuades agar tidak ada padatan yang tertinggal di elektroda tersebut.
4. 100 mg pepsin ditambahkan, tabung ditutup, dan diinkubasi di *water bath* dengan suhu 40°C dengan pengadukan selama 60 menit.
5. 20 ml akuades dan beberapa ml NaOH 4N dan 1N ditambahkan sampai pH larutan mencapai 6,8. Elektroda dibilas dengan ± 5 ml akuades.
6. 100 mg pankreatin ditambahkan, tabung ditutup, dan diinkubasi dalam *water bath* suhu 40°C dengan pengadukan selama 60 menit.
7. pH larutan dikondisikan sampai 4,5 dengan menambahkan beberapa ml HCl 4N dan 1N.
8. Larutan disaring dengan *crucible* berpori yang telah diberi *celite* 0,5 g dan berat konstannya telah diketahui dan dicuci dengan 2 kali 10 ml akuades.

Residu (serat tak larut)

9. Residu dicuci dengan 2 x 10 ml ethanol 95% dan 2 x 10 ml aseton.

10. Residu tersebut kemudian dikeringkan pada suhu 105°C hingga diperoleh berat konstan. Penimbangan dilakukan setelah sampel didinginkan di eksikator selama 10 menit (D_1).
11. Sampel diabukan dalam *muffle furnace* dengan suhu 550°C minimal selama 5 jam hingga diperoleh berat konstan. Penimbangan dilakukan setelah sampel didinginkan dalam eksikator selama 10 menit (I_1). Dilakukan pengujian kadar protein yang telah diperoleh berat konstannya (P_1)

Filtrat (serat larut)

12. Akuades ditambahkan ke dalam filtrat hingga volume campuran menjadi 100 ml.
13. 400 ml etanol 95% hangat (suhu 60°C) ditambahkan dan campuran didekantasi selama 1 jam.
14. Campuran tersebut kemudian disaring dengan *crucible* berpori yang telah diberi *celite* 0,5 g.
15. Residu dicuci dengan 2 x 10 ml etanol 78%, 2 x 10 ml etanol 95%, dan 2 x 10 ml aseton.
16. Residu dikeringkan pada suhu 105°C sampai diperoleh berat konstan. Penimbangan dilakukan setelah sampel didinginkan dalam eksikator (D_2).
17. Sampel diabukan dalam *muffle furnace* dengan suhu 550°C minimal selama 5 jam hingga diperoleh berat konstan. Penimbangan dilakukan setelah sampel didinginkan dalam eksikator (I_2). Dilakukan pengujian kadar protein yang telah diperoleh berat konstannya (P_2)

Blanko untuk serat larut dan tidak larut dilakukan dengan prosedur yang sama tetapi tanpa sampel (B_1 dan B_2). Blanko harus selalu dibuat setiap penggunaan *batch* enzim yang berbeda.

Perhitungan:

$$\text{Kadar serat tidak larut (\%)} = \frac{D_1 - I_1 - P_1 - B_1}{W} \times 100$$

$$\text{Kadar serat larut (\%)} = \frac{D_2 - I_2 - P_2 - B_2}{W} \times 100$$