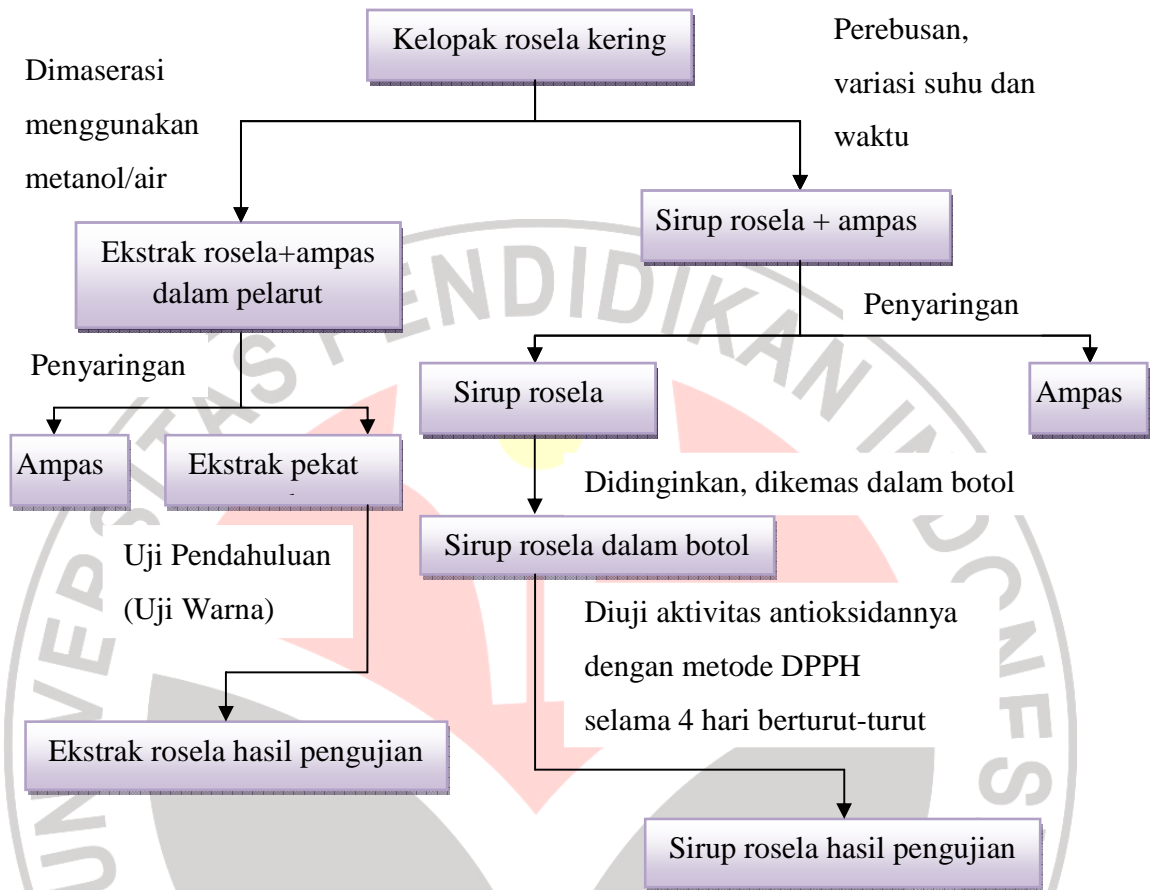


## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tahapan Penelitian**

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap, yaitu tahap uji pendahuluan berupa uji warna untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder apa yang terkandung dalam ekstrak rosela, sterilisasi kemasan (botol sirup) dengan cara sterilisasi kering (menggunakan oven) selama 60 menit pada suhu 170 °C, pembuatan sirup, pengujian kandungan antioksidan menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis mini serta tahap penyimpanan selama empat hari penyimpanan yang setiap harinya dilakukan pengukuran serapan DPPH sisa (yang tidak bereaksi). Bagan alir penelitian ditunjukkan pada gambar 3.1 berikut ini.



**Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian**

## 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas (botol vial, gelas ukur, gelas kimia, corong kaca, batang pengaduk, labu ukur, pipet seukuran), corong plastik, saringan plastik, termometer, pemanas listrik, neraca analitik, *multishaker* MMS 3000 dan botol sirup. Untuk kepentingan analisis digunakan Spektrofotometri UV-Vis Mini Shimadzu 1240.

### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelopak rosela kering yang beredar di pasaran (dengan merk tertentu), gula pasir dengan merk dagang Gulaku, air matang, metanol p.a, DPPH radikal,  $\text{FeCl}_3$  1%,  $\text{HgCl}_2$ , kloroform, serbuk Mg, KI,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, HCl pekat, NaOH 0,1 N dan aquades.

### 3.3 Langkah Kerja

#### 3.3.1 Uji Pendahuluan

Uji Pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak rosela. Preparasi awal terhadap sampel yang diuji adalah dengan cara merendam 1 gram rosela kering yang telah dibuat serbuk dengan dua pelarut berbeda yaitu metanol selama 2x24 jam dan air pada kondisi mendidih ( $95^\circ\text{C}$ ) selama 30 menit, kemudian disaring. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya digunakan dalam uji warna. Uji warna yang dilakukan meliputi:

##### 1) Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak pekat rosela sebanyak 1 mL ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat.

##### 2) Pemeriksaan Antosianin

Ekstrak pekat rosela sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N.

### 3) Pemeriksaan Tanin

Ekstrak pekat rosela sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1%.

### 4) Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Ekstrak pekat rosela sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.

### 5) Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak pekat rosela sebanyak 1 mL ditambahkan lima tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Cara membuat pereaksi Mayer adalah 1 gram KI dilarutkan ke dalam 20 mL aquades sampai semuanya larut lalu selanjutnya dimasukkan 0,271 gram  $\text{HgCl}_2$  sampai larut.

### 6) Pemeriksaan Kuinon

Ekstrak pekat rosela sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes  $\text{HCl}$  0,1 N

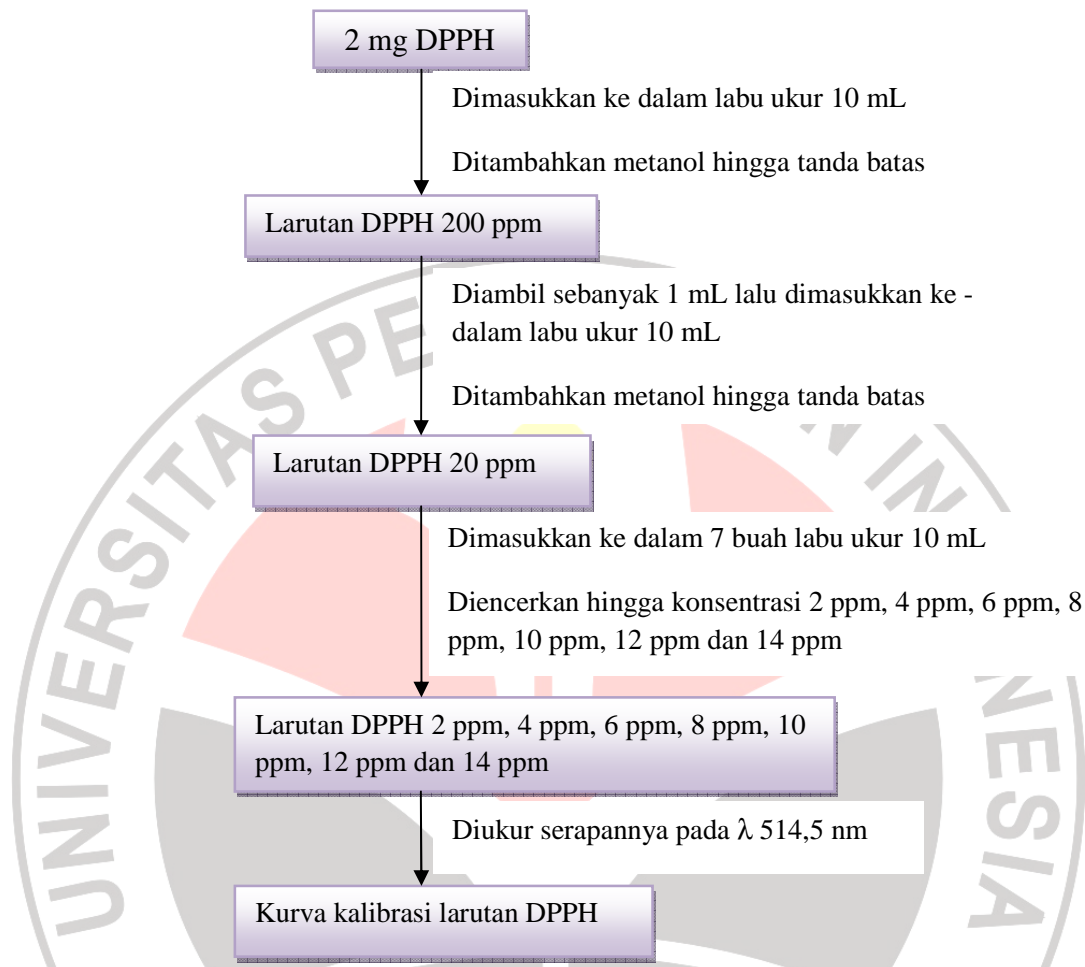
#### 3.3.2 Pembuatan Sirup Rosela

Bahan-bahan untuk membuat sirup seperti gula pasir dan air direbus hingga diperoleh suhu yang diinginkan ( $50^\circ\text{C}$ /suhu mendidih). Setelah suhu yang diharapkan tercapai, kelopak kering rosela dimasukkan dalam air gula tersebut (1 gram kelopak rosela dalam 10 mL air) kemudian waktu perebusan mulai dihitung. Variasi waktu perebusan yang digunakan yaitu 20, 30

dan 40 menit baik pada suhu 50 °C maupun suhu pada saat mendidih. Sirup disaring dan didinginkan kemudian sirup dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan pelarut air hingga tanda batas untuk selanjutnya dikemas ke dalam botol gelap dengan label-label yang berbeda untuk disimpan selama empat hari waktu penyimpanan pada suhu ruang ( $\pm 25$  °C).

### **3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan Sirup Rosela**

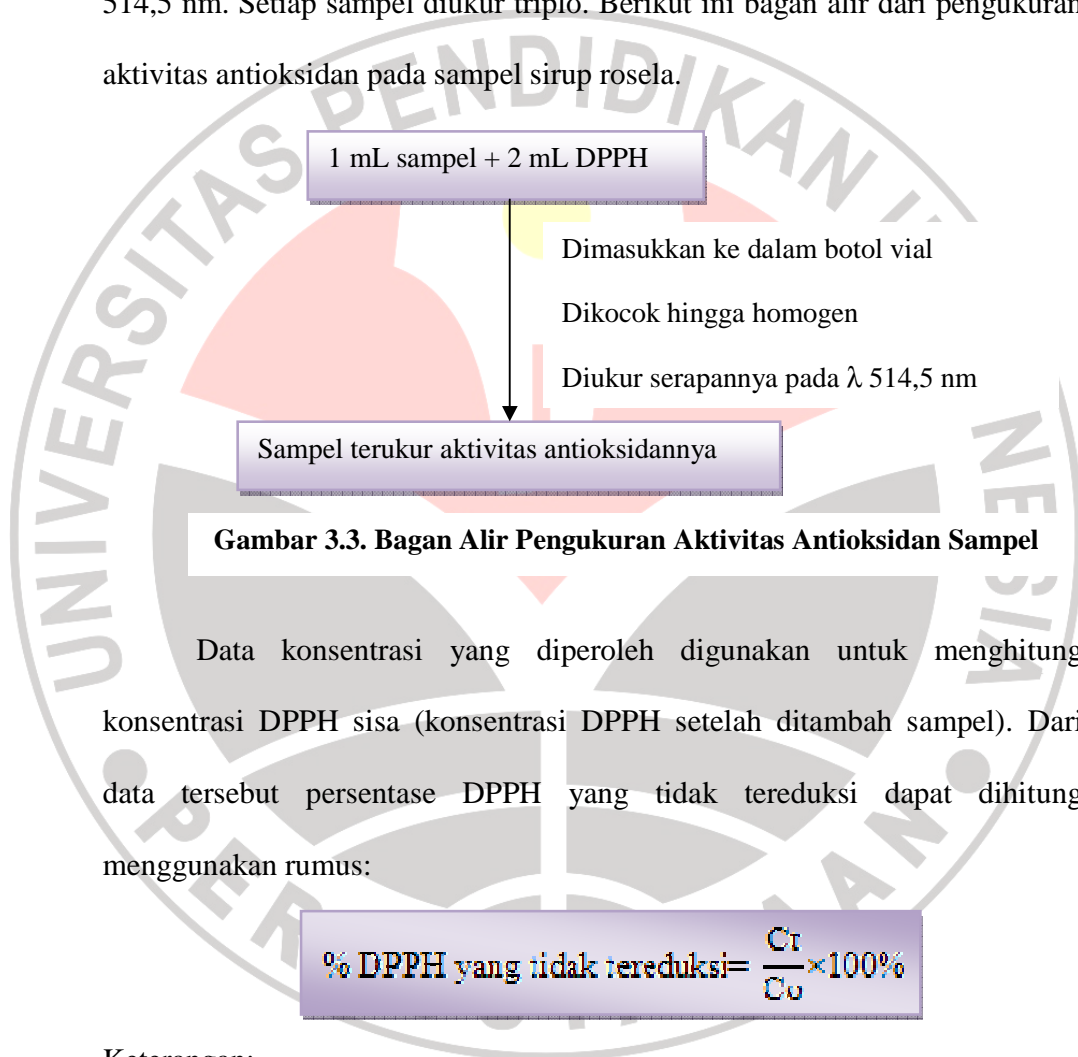
Pada tahap awal pengujian, dibuat terlebih dahulu kurva kalibrasi untuk larutan DPPH. Sebanyak 2 mg DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dalam pelarut metanol. Larutan DPPH yang dibuat memiliki konsentrasi 200 ppm, kemudian dilakukan pengenceran dalam labu ukur 10 mL hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi DPPH 20 ppm, kemudian larutan DPPH 20 ppm diencerkan lagi hingga diperoleh konsentrasi DPPH 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 ppm. Selanjutnya diukur serapannya pada  $\lambda$  514,5 nm. Bagan alir pembuatan kurva kalibrasi dapat dilihat pada gambar 3.2.



**Gambar 3.2. Bagan Alir Kurva Kalibrasi**

Untuk uji aktivitas antioksidan sirup rosela, sebanyak 1 mL sirup dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan pelarut metanol hingga tanda batas. Sedangkan untuk DPPH, sebanyak 2 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan pelarut metanol. Kemudian diambil sebanyak 1 mL DPPH untuk diencerkan ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya, sebanyak 1 mL sirup rosela dan 2 mL DPPH dimasukkan ke

dalam botol vial, dikocok menggunakan *multishaker* MMS 3000 hingga homogen lalu dibiarkan selama  $\pm 15$  menit untuk kemudian diukur serapannya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis mini Shimadzu 1240 pada  $\lambda$  514,5 nm. Setiap sampel diukur triplo. Berikut ini bagan alir dari pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel sirup rosela.



**Gambar 3.3. Bagan Alir Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel**

Data konsentrasi yang diperoleh digunakan untuk menghitung konsentrasi DPPH sisa (konsentrasi DPPH setelah ditambah sampel). Dari data tersebut persentase DPPH yang tidak tereduksi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ DPPH yang tidak tereduksi} = \frac{C_t}{C_o} \times 100\%$$

Keterangan:

$C_t$  : konsentrasi DPPH setelah ditambah sampel (sisa)

$C_o$  : konsentrasi DPPH tanpa penambahan sampel

Sementara itu aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \frac{[\text{DPPH awal}] - [\text{DPPH sisa}]}{[\text{DPPH awal}]} \times 100\%$$

Keterangan:

[DPPH awal] : konsentrasi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel

[DPPH sisa] : konsentrasi DPPH setelah direaksikan dengan sampel

### 3.3.4 Analisis Data Melalui Statistika

Karena dalam penelitian ini terdapat tiga faktor perlakuan, maka untuk mengetahui pengaruh ketiga faktor tersebut dalam pengujian aktivitas antioksidan pada sirup rosela digunakan uji statistik menggunakan metode rancangan kelompok petak terbagi (RKPT) dengan pola trifaktor. Ketiga faktor yang dimaksud adalah suhu (T), waktu pembuatan sirup (t) serta lama penyimpanan (D) sirup pada suhu ruang tertentu ( $\pm 25$  °C). Taraf-тарaf waktu pembuatan dan lama penyimpanan disusun secara acak dalam rancangan kelompok terbagi (RKT), sedangkan taraf faktor suhu ditempatkan secara acak sebagai anak petak dalam RKT tersebut.



Faktor 1: perlakuan waktu pembuatan sirup terdiri dari tiga taraf:

$t_1$  = waktu pembuatan selama 20 menit

$t_2$  = waktu pembuatan selama 30 menit

$t_3$  = waktu pembuatan selama 40 menit

Faktor 2: perlakuan lama penyimpanan terdiri dari lima taraf:

D0 = 0 hari penyimpanan (suhu  $\pm 25^\circ\text{C}$ )

D1 = 1 hari penyimpanan (suhu  $\pm 25^\circ\text{C}$ )

D2 = 2 hari penyimpanan (suhu  $\pm 25^\circ\text{C}$ )

D3 = 3 hari penyimpanan (suhu  $\pm 25^\circ\text{C}$ )

D4 = 4 hari penyimpanan (suhu  $\pm 25^\circ\text{C}$ )

Faktor 3: perlakuan suhu pemanasan terdiri dari dua taraf:

T1 = suhu pemanasan  $50^\circ\text{C}$

T2 = suhu pemanasan  $95^\circ\text{C}$

Dengan demikian, banyaknya perlakuan yang dicobakan sebanyak  $2 \times 3 \times 5$  atau sama dengan 30 perlakuan. Percobaan diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 90 unit percobaan.

Persamaan statistik yang digunakan untuk RKPT dengan pola trifaktor dalam rancangan acak kelompok (RAK) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijkl} = \mu + K_l + A_i + \gamma_{il} + B_j + \delta_{jl} + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijl} + C_k + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \theta_{ijkl}$$

Keterangan:

$Y_{ijkl}$  = nilai pengamatan dari taraf ke- $i$  faktor waktu pembuatan yang berkaitan dengan taraf ke- $j$  dari faktor lama penyimpanan serta taraf ke- $k$  dari faktor suhu pemanasan dalam kelompok ke- $l$ .

$\mu$  = nilai rata-rata yang sesungguhnya.

$K_l$  = pengaruh aditif dari kelompok ke- $l$ .

$A_i$  = pengaruh aditif taraf ke- $i$  dari faktor waktu pembuatan.

$\gamma_{il}$  = pengaruh galat yang timbul dari taraf ke- $i$  faktor waktu pembuatan dalam kelompok ke- $l$ , sering disebut dengan galat (a).

$B_j$  = pengaruh aditif taraf ke- $j$  dari faktor lama penyimpanan.

$\delta_{jl}$  = pengaruh galat yang timbul dari taraf ke- $j$  faktor lama penyimpanan dalam kelompok ke- $l$ , sering disebut dengan galat (b).

$(AB)_{ij}$  = pengaruh interaksi antara taraf ke- $i$  dari faktor waktu pembuatan dan taraf ke- $j$  lama penyimpanan.

$\epsilon_{ijl}$  = pengaruh galat yang timbul dari taraf ke- $i$  faktor waktu pembuatan dan taraf ke- $j$  dari faktor lama penyimpanan dalam kelompok ke- $l$ , sering disebut dengan galat (c).

$C_k$  = pengaruh aditif taraf ke- $k$  dari faktor suhu pemanasan.

$(AC)_{ik}$  = pengaruh interaksi antara taraf ke- $i$  dari faktor waktu pembuatan dan taraf ke- $k$  dari faktor suhu pembuatan.

$(BC)_{jk}$  = pengaruh interaksi antara taraf ke- $j$  dari faktor lama penyimpanan dan taraf ke- $k$  dari faktor suhu pembuatan.

$(ABC)_{ijk}$  = pengaruh interaksi antara taraf ke-i dari faktor waktu pembuatan, taraf ke-j dari faktor lama penyimpanan dan taraf ke-k dari faktor suhu pembuatan.

$\theta_{ijkl}$  = pengaruh galat yang timbul dari taraf ke-i dari faktor waktu pembuatan yang berkaitan dengan taraf ke-j dari faktor lama penyimpanan serta taraf ke-k dari faktor suhu pembuatan dalam kelompok ke-l, sering disebut galat (d).

Pengujian signifikansi pengaruh perlakuan diuji dengan uji F hitung pada taraf 5% (perhitungan lebih lengkap terdapat pada lampiran 8).

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh interaksi faktor waktu pembuatan, lama penyimpanan dan suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.  
 $H_1$  : Ada pengaruh interaksi faktor waktu pembuatan, lama penyimpanan dan suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.
2.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh interaksi faktor waktu pembuatan dan lama penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

$H_1$  : Ada pengaruh interaksi faktor waktu pembuatan dan lama penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

3.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh interaksi faktor waktu pembuatan dan suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

$H_1$  : Ada pengaruh interaksi faktor waktu pembuatan dan suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

4.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh interaksi faktor lama penyimpanan dan suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

$H_1$  : Ada pengaruh interaksi faktor lama penyimpanan dan suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

5.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh faktor waktu pembuatan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

$H_1$  : Ada pengaruh faktor waktu pembuatan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

6.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh faktor lama penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

$H_1$  : Ada pengaruh faktor lama penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

7.  $H_0$  : Tidak ada pengaruh faktor suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

$H_1$  : Ada pengaruh faktor suhu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan sirup rosela dalam mereduksi DPPH.

