

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1. Sampel dan Lokasi Penelitian**

Sampel atau bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang karabenguk (*Mucuna pruriens* var. *utilis* (L.) DC) yang berasal dari Bantul, Yogyakarta.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset (LKR), Laboratorium Kimia Organik dan Bahan Alam (LKOB), Laboratorium Kimia Instrumen (LKI) Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) dan Balai Besar Industri Agro, Bogor.

#### **3.2. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1. Alat**

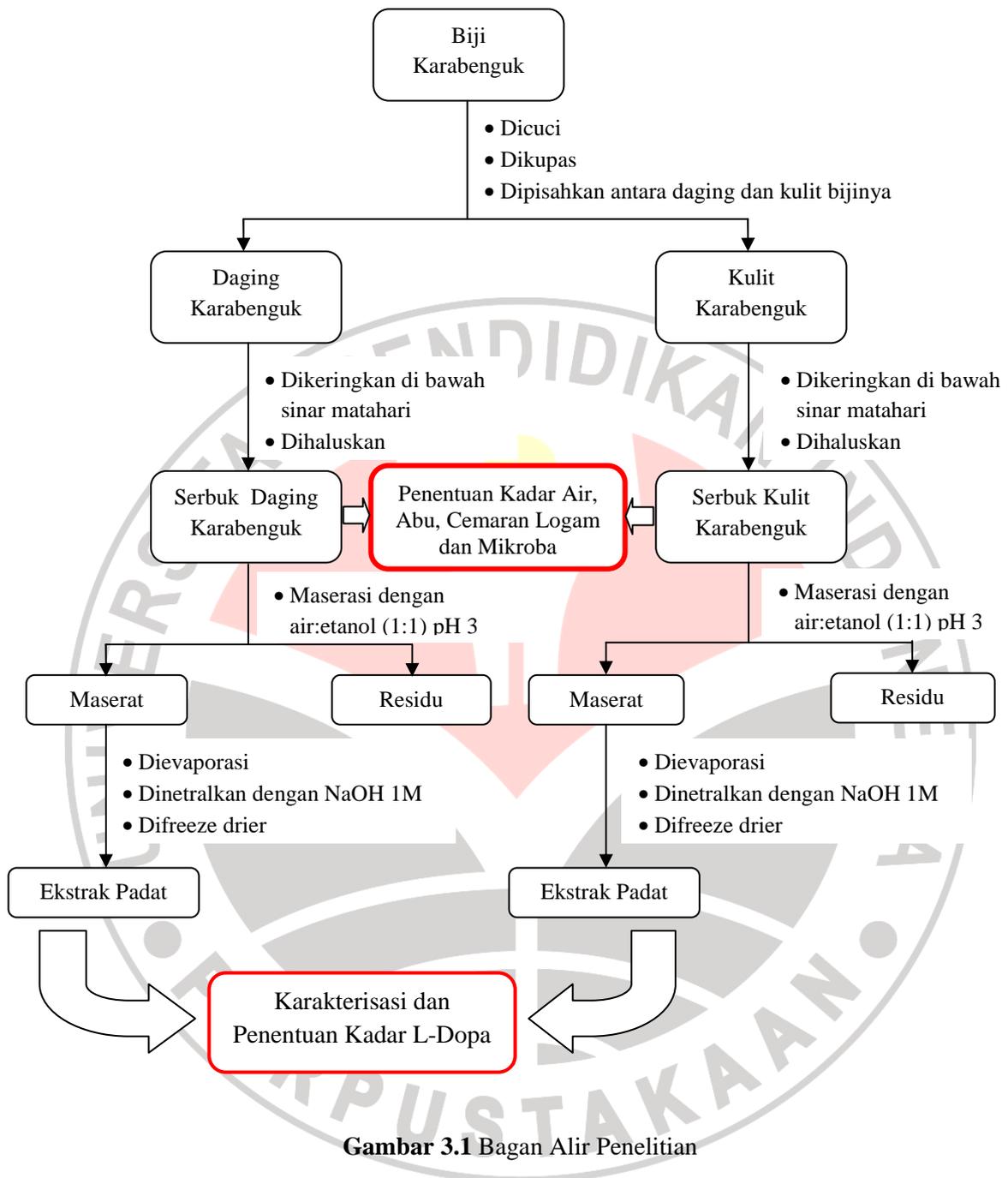
Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, maserator, penguap berputar vakum (*vacuum rotary evaporator*), pompa vakum, corong *Buchner*, *ultrasonic vibrator* dan *Freeze drier*. Sedangkan alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi adalah HPLC Shimadzu, Spektrofotometer Shimadzu UV-mini serta spektrometer FTIR Shimadzu 8400.

### 3.2.2. Bahan

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah kacang karabenguk yang telah dibersihkan, dipisahkan kulit dan dagingnya, dikeringkan dan digrinding. Sedangkan bahan kimia yang digunakan meliputi etanol teknis 98%, asam sitrat teknis, aquabides,  $H_3PO_4$  p.a, Metanol p.a., KI,  $HgCl_2$  p.a, HCl pekat, serbuk Mg p.a,  $CH_3COOH$  glasial,  $H_2SO_4$  pekat,  $FeCl_3$  p.a, aquades, kertas saring, NaOH teknis dan L-Dopa standar (*3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine*) SIGMA.

### 3.3. Metodologi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu penyiapan sampel, uji proksimat, uji cemaran logam dan mikroba, proses ekstraksi, skrining fitokimia, penentuan kadar L-Dopa dan karakterisasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak kacang. Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

### 3.3.1 Penyiapan Sampel

Tahap awal penelitian dimulai dari pengambilan sampel kacang karabenguk dari daerah Yogyakarta. Kacang karabenguk yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel. Kemudian kacang

karabenguk dikupas dan pisahkan antara kulit kacang dan kacangnya. Setelah itu, masing-masing sampel dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai berbentuk serbuk. Kemudian serbuk kulit kacang dan kacang karabenguk yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat dalam kondisi yang telah dikeringkan.

### 3.3.2 Uji Proksimat

Uji proksimat dilakukan untuk mengetahui parameter simplisia. Adapun uji simplisia meliputi penentuan kadar air dan abu. Uji proksimat dilakukan di Balai Besar Industri Agro, *Agro based industry calibration and analytical laboratories* (ABICAL) Bogor, yang mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

#### 1. Penentuan Kadar Abu Total

Penentuan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang 3 gram serbuk kacang ke dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diarsangkan di atas nyala pembakar dan diabukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum  $550^{\circ}\text{C}$  sampai pengabuan sempurna. Setelah itu didinginkan dalam eksikator, lalu ditimbang sampai bobot tetap.

## 2. Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 1-2 gram serbuk kacang pada botol timbang bertutup yang telah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan pada oven suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam, lalu didinginkan dalam eksikator. Setelah itu ditimbang sampai diperoleh bobot tetap.

### 3.3.3 Penentuan Cemaran Logam

Penentuan cemaran logam dilakukan untuk mengetahui cemaran yang terkandung dalam daging dan kulit kacang karabenguk. Adapun parameter logam yang diuji yaitu logam timbal (Pb), Kadmium (Cd), Timah (Sn), Raksa (Hg) dan Arsen(As). Penentuan cemaran logam dan mikroba dilakukan di Balai Besar Industri Agro, *Agro based insdustry calibration and analytical laboratories* (ABICAL) Bogor, yang mengacu pada SNI 01-2896-1998 tentang Cara Uji Cemaran Logam dalam Makanan dan SNI 01-4866-1998 tentang Cara Uji Cemaran Arsen dalam Makanan. Beberapa prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut:

#### 1. Penentuan Cemaran Logam Timbal (Pb) dan Timah (Sn)

Penentuan cemaran logam timbal (Pb) dan timah (Sn) dilakukan dengan cara ditimbang 5 gram serbuk kacang dan dimasukkan ke dalam cawan porselen. 10 mL larutan magnesium nitrat dalam etanol ditambahkan ke dalam sampel dan diaduk. Setelah itu, campuran diuapkan etanolnya dengan cara memanaskan di atas penangas sambil diaduk sekali-sekali. Kemudian campuran dimasukkan ke dalam tanur dengan suhu  $200^{\circ}\text{C}$  dan secara bertahap dinaikkan suhunya sampai

500°C selama 2 jam serta diabukan sepanjang malam pada suhu 450-500°C lalu didinginkan. Apabila masih terdapat sisa karbon, ditambahkan 1 mL air dan 2 mL HNO<sub>3</sub> p.a. lalu dipanaskan pada suhu 500°C selama 1 jam (hal dilakukan sampai abu berwarna putih).

Setelah didapat abu putih, ditambahkan 5 mL larutan campuran HCl dan HNO<sub>3</sub> ke dalam abu sambil dipanaskan sampai abu larut seluruhnya. Kemudian larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100mL dan ditanda bataskan lalu disaring dengan kertas saring Whatman 540. Larutan sampel yang telah dibuat diukur dengan spektroskopi serapan atom dan dibandingkan dengan kurva standar untuk masing-masing logam.

## 2. Penentuan Cemaran Logam Raksa (Hg)

Penentuan cemaran logam raksa (Hg) dilakukan dengan cara ditimbang 5 gram sampel serbuk kacang dalam labu destruksi lalu ditambahkan 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18N, 20 mL HNO<sub>3</sub> 7N, 1 mL larutan natrium molibdat 2% dan 5 butir batu didih. Kemudian diset dengan pendingin dan dipanaskan selama 1 jam lalu didinginkan selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 mL HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> (1:1) melalui pendingin. Aliran air pada pendingin dihentikan lalu dipanaskan dengan suhu tinggi hingga timbal uap putih dan dilanjutkan pemanasan selama 10 menit lalu didinginkan. Setelah itu ditambahkan 10 mL air melalui dinding sambil digoyang-goyang lalu dididihkan selama 10 menit. Kemudian pemanasan dihentikan dan pendingin dicuci dengan air 3 kali dengan air.

Larutan destruksi sampel dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan dincirkan sampai tanda batas. Selain itu dibuat blanko dengan

cara mencampurkan seluruh pereaksi yang ditambahkan pada sampel dan larutan deret standar raksa. Setelah itu ke dalam deret standar, larutan dekstruksi sampel dan blanko ditambahkan 20 mL larutan pereduksi lalu diukur absorbansi pada  $\lambda=253,7$  nm.

### 3. Penentuan Cemaran Arsen (As)

Penentuan cemaran arsen dilakukan dengan cara menimbang 10 gram sampel serbuk kacang lalu ditambah 2,5 gram  $Mg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$  dan 25 mL  $HNO_3$  p.a. dan diaduk dengan sempurna. Kemudian campuran diuapkan diatas penangas air sampai kering. Setelah itu, sampel diarangkan dalam tanur  $500^\circ C$  selama 2 jam. Kemudian ditambahkan  $HNO_3$  p.a. beberapa tetes lalu diuapkan dan diabukan kembali selama 1 jam pada  $500^\circ C$ . Abu yang diperoleh dilarutkan dengan larutan HCl 1:3 dan ditanda bataskan hingga 50 mL dengan air. Kemudian dipipet 25 mL larutan yang telah dibuat dan ditambahkan 2 mL HCl 8M dan 0,1mL KI 20% lalu didiamkan selama >2menit. Setelah itu dibuat deret standar dan blanko sesuai ketentuan. Kemudian larutan sampel, deret standar dan blanko diukur denga absorbansi serapan atom.

#### 3.3.4 Penentuan Cemaran Mikroba

Penentuan cemaran logam dan mikroba dilakukan untuk mengetahui cemaran yang terkandung dalam daging dan kulit kacang karabenguk. Cemaran mikroba meliputi mikroba Koliform, *E. coli*, Salmonela, Kapang, Khamir, *C. perfringens* dan *Bacillus cereus*. Penentuan cemaran logam dan mikroba dilakukan di Balai Besar Industri Agro, *Agro based insdustry calibration and*

*analytical laboratories* (ABICAL) Bogor, yang mengacu pada SNI 2897-2008.

Beberapa prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut:

#### 1. Pengujian *Coliform*

Pengujian mikroba *coliform* dilakukan dengan cara menimbang serbuk kacang sebanyak 25 gram secara aseptik dan dimasukkan ke dalam wadah steril. Kemudian dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  lalu dipindahkan 1mL dengan pipet steril ke dalam larutan 9 mL *BPW* 0,1% untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$  serta dengan cara yang sama dibuat pengenceran  $10^{-3}$ . Setelah itu, dipipet masing-masing 1mL dari setiap pengenceran ke dalam 3 tabung *LSTB* yang berisi tabung durham dan diinkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Terbentuknya gas menandakan sampel positif mengandung *Coliform*. Kuantitas *Coliform* yang ada dibandingkan dengan tabel *Most Probable Number* (MPN).

#### 2. Pengujian *Escherichia coli*

Pengujian mikroba *E. coli* dilakukan dengan cara menimbang serbuk kacang sebanyak 25 gram secara aseptik dan dimasukkan ke dalam wadah steril. Kemudian dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  lalu dipindahkan 1mL dengan pipet steril ke dalam larutan 9 mL *BPW* 0,1% untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$  serta dengan cara yang sama dibuat pengenceran  $10^{-3}$ . Setelah itu, dipipet masing-masing 1mL dari setiap pengenceran ke dalam 3 tabung *LSTB* yang berisi tabung durham dan diinkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam.

Dilakukan isolasi dengan cara menginokulasikan ke dalam media *VRBA* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Koloni yang diduga *E. coli*

berdiameter 2-3 mm, berwarna hitam pada bagian pusat koloni diambil dan dipindahkan ke *PCA* miring lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C. Kemudian dilakukan reaksi biokimia yaitu uji pembentukan *indole* dan uji *methyl red* (MR).

### 3. Pengujian *Salmonella* spp

Pengujian mikroba *Salmonella* dilakukan dengan cara menimbang serbuk kacang sebanyak 25 gram secara aseptik dan dimasukkan ke dalam wadah steril. Kemudian dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 35°C. Setelah itu, sampel yang diencerkan diambil 1mL ke dalam media 10 mL *TTB* dan 0,1 mL ke dalam 10 mL *RV* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 42°C untuk media *RV* dan 43°C untuk media *TTB*.

Dilakukan isolasi masing-masing sampel dengan cara menginokulasikan ke dalam media *HE*, *XLD* dan *BSA* dan diinkubasi selama ±24 jam. Koloni *Salmonella* akan terlihat berwarna hijau kebiruan pada media *HE*, merah muda tanpa titik mengkilat pada media *XLD* dan abu-abu kehitaman pada media *BSA*. Kemudian dilakukan identifikasi dengan menginokulasikan koloni ke media *TSIA* dan *LIA* dengan cara menusukkan ke dasar media agar dan menggores pada media agar miring lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Terbentuknya warna merah pada *slant* pada agar miring dan warna kuning pada bagian bawah media *TSIA* serta ungu pada *slant* pada agar miring dan warna ungu pada bagian bawah media *LIA* menunjukkan sampel positif *Salmonella*.

### 3.3.5 Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui karakterisasi dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak daging dan kulit kacang karabenguk maka dilakukan uji fitokimia. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Ekstrak yang diperoleh diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna. Senyawa yang diperiksa adalah senyawa golongan alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, steroid, dan flavanoid. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

#### 1. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram ekstrak 1 mL kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu 1 gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut. Lalu ke dalam larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram  $\text{HgCl}_2$  sampai larut.

#### 2. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan dalam 2 mL air, kemudian ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

#### 3. Pemeriksaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 3 mL air, kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Timbulnya buih atau busa menunjukkan adanya saponin.

#### 4. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 1 mL air, kemudian ditambahkan 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

#### 5. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 3 mL air kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

### 3.3.6 Proses Ekstraksi

Serbuk kulit kacang dan kacang karabenguk (*Mucuna pruriens*) diekstraksi menggunakan pelarut etanol dan air dengan perbandingan 1:1 dan penambahan asam sitrat sampai pH larutan menjadi 3. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut selama 3 x 24 jam.

### 3.3.7 Penentuan Kadar L-Dopa dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Untuk mengetahui kadar L-Dopa yang terkandung dalam sampel dilakukan analisis menggunakan metode KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) atau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

#### 1. Pembuatan Fasa Gerak

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5 sebanyak 0,5 mL dimasukkan kedalam gelas kimia yang berisi 490 mL aqua bides. Kemudian ditambah 10 mL Metanol dan dihomogenkan dengan bantuan *ultrasonic vibrator* selama 5 menit.

#### 2. Pembuatan Deret Larutan Standar

Larutan induk dibuat terlebih dahulu dengan cara ditimbang sebanyak 10 mg L-Dopa standar lalu dilarutkan dalam 10 mL fasa gerak dan didapat larutan induk 1000 ppm. Dari larutan induk 1000 ppm, dibuat larutan deret standar dengan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm dan 150 ppm. Untuk larutan standar 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm, dan 50 ppm dipipet masing-masing 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; 1,00 mL; 1,25 mL; dan 1,50 mL larutan induk 1000 ppm. Selanjutnya ditandabatkan dalam labu ukur 10 mL menggunakan fasa gerak sampai tanda batas.

#### 3. Pembuatan Larutan Sampel

Sampel ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 3 mL fasa gerak. Kemudian dihomogenkan dengan bantuan ultrasonik selama 10 menit. Kemudian dimasukan ke dalam labu 10 mL dan ditandabatkan dengan fasa gerak.

#### 4. Pengukuran Standar dan Sampel

Pengukuran deret standar dan sampel dilakukan dengan alat HPLC Shimadzu dengan parameter pengujian yaitu  $\lambda = 280$  nm, laju alir 1 mL/menit dan perbandingan pelarut H<sub>2</sub>O:Metanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> yaitu 97:20:1.

### 3.3.8 Karakterisasi Senyawa

Karakterisasi senyawa yang terkandung di dalam ekstrak dilakukan dengan spektroskopi FTIR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa ekstrak daging dan kulit kacang Karabenguk. Penentuan gugus-gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400. Selain itu digunakan juga spektroskopi ultraviolet-tampak untuk mendapatkan informasi mengenai adanya senyawa yang mengandung gugus kromofor atau ikatan rangkap yang terkonjugasi dengan menggunakan Spektrofotometer Shimadzu UV-mini.

