

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Maret sampai dengan bulan April 2013 di Laboratorium Kimia Instrumen dan Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Material Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan yaitu panci, *blender*, termometer 100⁰C, saringan, kain bersih, gelas kimia, gelas ukur, pemanas listrik, oven, neraca analitik, buret, labu Erlenmayer, statif, klemp, labu ukur, pipet ukur, *ball* pipet, botol vial, aluminium foil, Spektrofotometer UV-Vis, set alat *rotary evaporator*, dan GCMS.

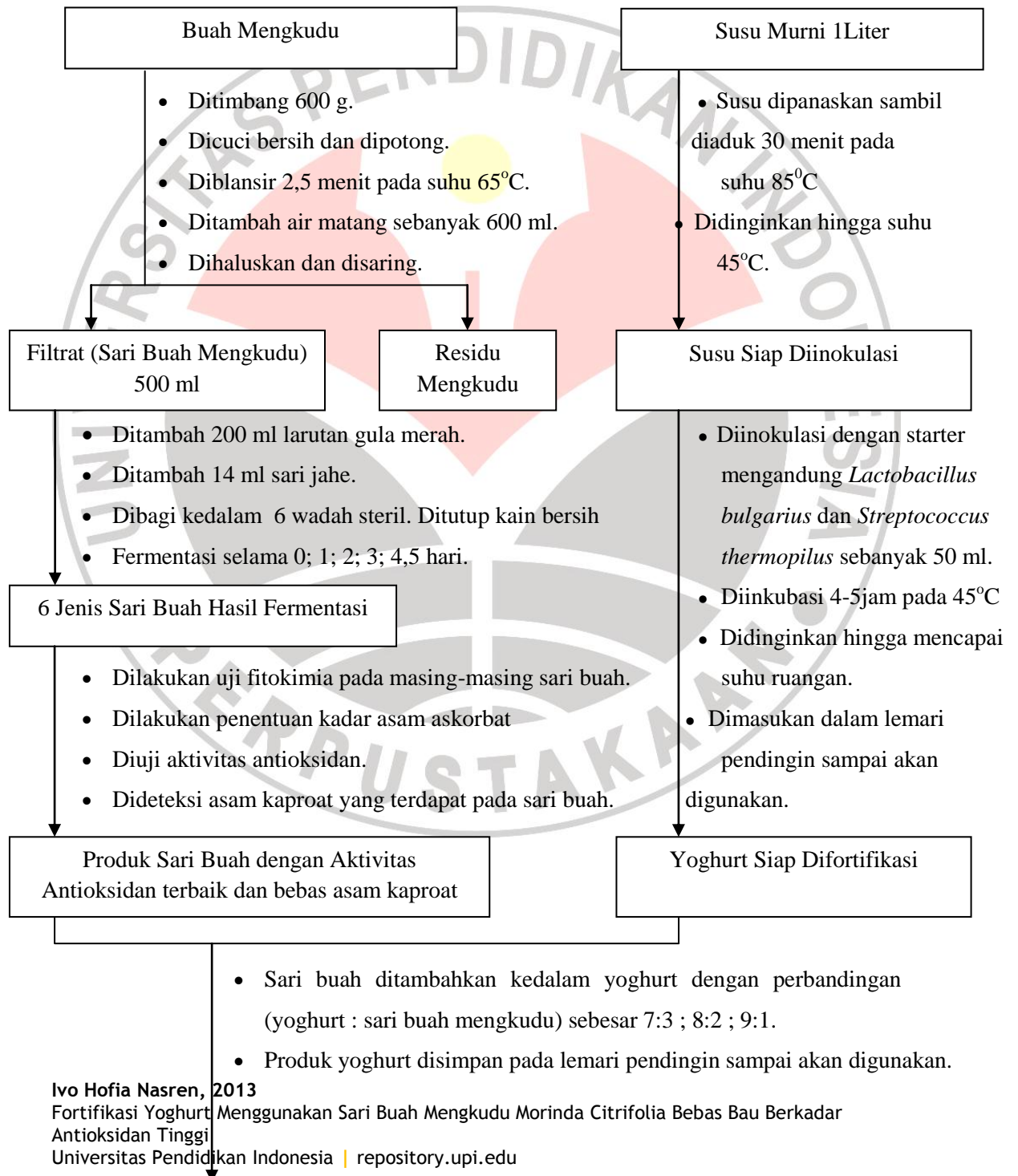
3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu buah mengkudu setengah matang (daging buah berwarna putih dan agak keras); air matang; gula merah; pereaksi iodium; padatan KI; HgCl₂; amoniak; kloroform; asam sulfat; HCl pekat; bubuk Mg; KMnO₄; amilum; KIO₃; Na₂S₂O₃•5H₂O; aquades; H₂SO₄; asam asetat glasial; metanol; DPPH; susu murni; starter yoghurt mengandung bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus bulgaricus*.

3.3. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu tahap determinasi tanaman, preparasi sampel sari buah mengkudu dengan cara fermentasi non alkoholik, pembuatan yoghurt, tahap pengujian sari buah mengkudu yang meliputi uji fitokimia, uji DPPH (uji aktivitas antioksidan) menggunakan instrumen spektrofotometer Visible, dan deteksi asam kaproat menggunakan instrumen GCMS, dan tahap penelitian terakhir adalah uji hedonik pada sampel sari buah mengkudu terbaik yang difortifikasi ke dalam yoghurt.





- Diuji tingkat kesukaan masyarakat terhadap produk menggunakan uji hedonik pada 25 panelis tidak terlatih.

Produk Yoghurt Terfortifikasi Sari Buah mengkudu Berkualitas

Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Determinasi Tumbuhan

Tumbuhan mengkudu yang akan diteliti, dideterminasi di Sekolah Tinggi Ilmu Hayati (SITH) ITB untuk mengetahui spesies dan famili tumbuhan yang diteliti.

3.4.2. Persiapan Bahan dalam Pembuatan Sari Buah Mengkudu

3.4.2.1. Pembuatan Larutan Gula Merah

Gula merah yang telah ditimbang ditambah air matang (1:1) kemudian dipanaskan hingga gula merah larut seluruhnya. Selanjutnya larutan tersebut disaring dan didinginkan hingga mencapai suhu ruang.

3.4.2.2. Pembuatan Sari Jahe

Jahe dikupas dan dicuci hingga bersih kemudian ditimbang. Jahe yang telah ditimbang ditambah air matang (1:1) dan dihaluskan menggunakan *blender*. Jahe yang sudah halus disaring dan diambil filtratnya.

3.4.2.3. Persiapan Buah Mengkudu

Buah mengkudu setengah matang dipilih yang kondisinya baik (tanpa cacat) kemudian ditimbang 600 g lalu dicuci. Setelah

dicuci bersih, buah kemudian dipotong dan direbus (diblansir) pada suhu 65°C selama 2,5 menit.

3.4.3 Pembuatan Sari Buah Mengkudu Bebas Bau

Buah yang telah diblansir, ditambah air matang 600 ml. Selanjutnya buah dihaluskan menggunakan *blender* kemudian disaring dan diambil ekstraknya (cairannya) sebanyak 500 ml. Ekstrak yang diperoleh ditambah 200 ml larutan gula merah merah dan 14 ml sari jahe. Campuran selanjutnya dimasukkan dalam wadah steril dan mulut wadah ditutup dengan menggunakan kain bersih agar tidak ada pengotor yang masuk selama proses fermentasi. Pembuatan sari buah mengkudu dilakukan selama 6 hari berturut-turut. Sari buah yang dibuat pada hari pertama difermentasi selama 5 hari (H-5), selanjutnya dengan cara yang sama dilakukan pembuatan sari buah mengkudu secara berturut-turut sebagai berikut: hari kedua selama 4 hari (H-4); hari ketiga selama 3 hari (H-3); hari keempat selama 2 hari (H-2); hari kelima selama 1 hari (H-1). Sedangkan kontrol dibuat pada hari keenam tanpa fermentasi (H-0) (Suriawirya, 2001 dan Salfiana 2012). Selanjutnya dilakukan karakterisasi sari buah mengkudu yang meliputi: uji asam kaproat, uji fitokimia, penentuan kadar asam askorbat dan pengujian aktivitas antioksidan.

3.4.4. Uji Asam Kaproat

3.4.4.1. Ekstraksi Asam Lemak

Sebanyak 100 ml sampel sari buah mengkudu dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah 50 ml kloroform. Campuran dikocok dengan kuat kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan kloroform (lapisan bawah) dipindahkan ke dalam gelas kimia kemudian ditutup dengan rapat. Langkah-langkah tersebut dilakukan sebanyak tiga kali.

Ivo Hofia Nasren, 2013

Fortifikasi Yoghurt Menggunakan Sari Buah Mengkudu *Morinda Citrifolia* Bebas Bau Berkadar Antioksidan Tinggi

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

Lapisan kloroform yang didapat selanjutnya dievaporasi pada suhu 62°C untuk memisahkan asam lemak dari pelarut kloroform. Asam lemak yang didapat kemudian dapat dianalisis menggunakan instrumen GCMS.

3.4.4.2. Analisis Asam Kaproat Menggunakan GCMS

Sebelum diinjeksi ke dalam instrumen GCMS, asam lemak diderivatisasi terlebih dahulu dengan cara mencampurkan asam lemak dan larutan BF_3 dalam etanol dengan perbandingan 1:3. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan dalam wadah tertutup sambil diaduk menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Setelah itu campuran yang mengandung derivat asam lemak diinjeksikan pada GCMS.

3.4.5. Uji Fitokimia

Dilakukan uji fitokimia pada semua produk sari buah yang dihasilkan. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoida, saponin, steroid/terpenoid dan asam askorbat.

3.4.5.1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid yang dilakukan menggunakan pereaksi Mayer yang dibuat dengan cara mencampurkan larutan HgCl_2 (1,36 g HgCl_2 dalam 60 ml akuades) dengan larutan KI (5 g KI dalam 10 ml akuades) kemudian campuran tersebut diencerkan dengan akuades hingga 100 ml. Pereaksi selanjutnya disimpan didalam botol kaca berwarna cokelat.

Sebanyak 5 tetes kloroform dimasukan kedalam tabung reaksi berisi 1ml sampel sari buah mengkudu. Selanjutnya campuran ditambah beberapa tetes pereksi Mayer. Hasil positif terhadap

alkaloid jika terbentuk endapan putih kekuningan pada campuran (Sangi, 2008).

3.4.5.2. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 ml sampel sari buah mengkudu ditambah 0,2 g bubuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Campuran didiamkan dan diamati. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua/magenta pada menit ketiga (Sangi, 2008).

3.4.5.3. Uji Saponin

Sebanyak 1 ml sampel sari buah mengkudu ditambah 3 ml akuades dan didihkan selama 2-3 menit. Selanjutnya campuran didinginkan dan dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih stabil (Sangi, 2008).

3.4.5.4. Uji Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 1 ml larutan sampel sari buah mengkudu ditambah 2 ml kloroform dan 1 ml asam sulfat pekat. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan timbulnya warna biru sedangkan hasil positif terpenoid adalah warna cokelat kemerahan (Ayoola, 2008).

3.4.5.5. Uji Asam Askorbat

Sebanyak 1 ml sampel sari buah mengkudu ditambah 5 ml akuades dan 10 ml KMnO_4 0,1%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi cokelat (Autorhoff, 2008).

3.4.6 Penentuan Kadar Asam Askorbat

3.4.6.1 Pembuatan Larutan Iodium 0,01N

Sebanyak 1 g KI dan 0,6345 g I₂ dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan dalam labu ukur 500 ml. Selanjutnya campuran ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap dan didiamkan semalaman agar iodium larut secara sempurna.

3.4.6.2 Penentuan Kadar Asam Askorbat

Sebanyak 1 ml sampel sari buah mengkudu diencerkan menggunakan akuades hingga 25 ml. Sampel tersebut kemudian dipindahkan sebanyak 10 ml ke dalam labu Erlenmeyer kering dan ditambah amilum 1%. Campuran selanjutnya dititrasikan dengan larutan iodium (normalitas iodium telah ditentukan sebelumnya) hingga terbentuk larutan berwarna biru yang relatif stabil. Setiap 1 ml larutan iodium 0,01 N yang terpakai akan setara dengan 0,88 mg asam askorbat (Apriyantono, 1989). Kadar asam askorbat dalam sampel dapat dihitung melalui persamaan:

$$\text{Asam Askorbat} = \frac{\text{vol titer (ml)} \times 0,88\text{mg} \times fp}{\text{vol sampel (ml)}}$$

Vol Titer = volume iodium yang terpakai (ml).

Vol sampel = volume sampel (ml).

Fp = faktor pengenceran

3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Sebanyak 1 mg DPPH dilarutkan dengan metanol kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL dan ditandabatkan sehingga

konsentrasinya sebesar 20 ppm. Selanjutnya dicari panjang gelombang serapan maksimumnya.

Untuk uji aktivitas antioksidan sari buah mengkudu, sebanyak 1 ml sampel sari buah mengkudu dimasukkan dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan metanol sampai tanda batas. Sebanyak 4 ml sampel tersebut kemudian dipindahkan ke dalam botol vial berwarna gelap. Ke dalam botol vial tersebut ditambahkan juga 2 ml larutan DPPH 20 ppm kemudian botol tersebut ditutup rapat dan campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit.

Campuran yang telah diinkubasi selanjutnya dimasukkan kedalam kuvet untuk pengujian nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (Okawa, 2001). Pengukuran absorbansi tiap sampel dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) pada hari yang sama (kecuali sampel sari buah mengkudu tanpa fermentasi).

Berikut persamaan yang dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Abs DPPH Kontrol} - \text{Abs DPPH sisa}}{\text{Abs DPPH Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

Abs DPPH Kontrol = Absorbansi DPPH tanpa penambahan sampel

Abs DPPH sisa = Absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel.

3.4.8. Pembuatan Yoghurt

Sebanyak 1 L susu murni dipanaskan pada suhu 85⁰C selama 30 menit sambil diaduk perlahan. Susu selanjutnya didinginkan hingga suhu 45⁰C kemudian ditambah 50 ml starter yoghurt yang mengandung bakteri *Lactobacillus* dan *Sterptococcus thermophilus*. Susu tersebut kemudian diinkubasi selama 4-5 jam dengan suhu 45⁰C pada wadah tertutup.

Ivo Hofia Nasren, 2013

Fortifikasi Yoghurt Menggunakan Sari Buah Mengkudu *Morinda Citrifolia* Bebas Bau Berkadar Antioksidan Tinggi

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

Selanjutnya susu didinginkan hingga suhu ruang dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin sampai akan digunakan.

3.4.9. Fortifikasi Sari Buah Mengkudu ke dalam Yoghurt

Sari buah mengkudu bebas bau dengan aktivitas antioksidan terbaik difortifikasi ke dalam yoghurt dengan perbandingan antara yoghurt dan sari buah mengkudu sebesar 7:3 (P1) ; 8:2 (P2) ; 9:1 (P3). Campuran selanjutnya diaduk hingga merata dan disimpan dalam lemari es sampai akan digunakan.

3.4.10. Uji Hedonik Yoghurt Terfortifikasi Sari Buah Mengkudu

Ketiga sampel yoghurt yang telah difortifikasi sari buah mengkudu disajikan dalam wadah yang diberi kode P1 (7:3), P2 (8:2) dan P3 (9:1). Selanjutnya ketiga sampel tersebut dianalisis sifat sensoriknya oleh 25 panelis tidak terlatih. Sifat sensorik yang dianalisis adalah aroma sampel yoghurt terfortifikasi sari buah mengkudu.