

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Maret sampai dengan bulan Juni 2013 di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Material serta di Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, neraca analitik, blender, panci aluminium, botol vial, pemanas listrik, *rotary vacuum evaporator*, HPLC dan UV-Vis Mini Shimadzu 1240.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah wortel yang diambil dari *Little Farmer*, Cisarua, Lembang dengan umur 110 hari. Bahan lainnya yang digunakan pada proses pembuatan minuman sari wortel adalah gula pasir, air, dan asam sitrat. Bahan yang digunakan untuk pengujian adalah H_2SO_4 pekat, CH_3COOH , kloroform, serbuk Mg, HCl pekat, $FeCl_3$ 1%, etanol 96%, n-heksana, metanol, dan DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

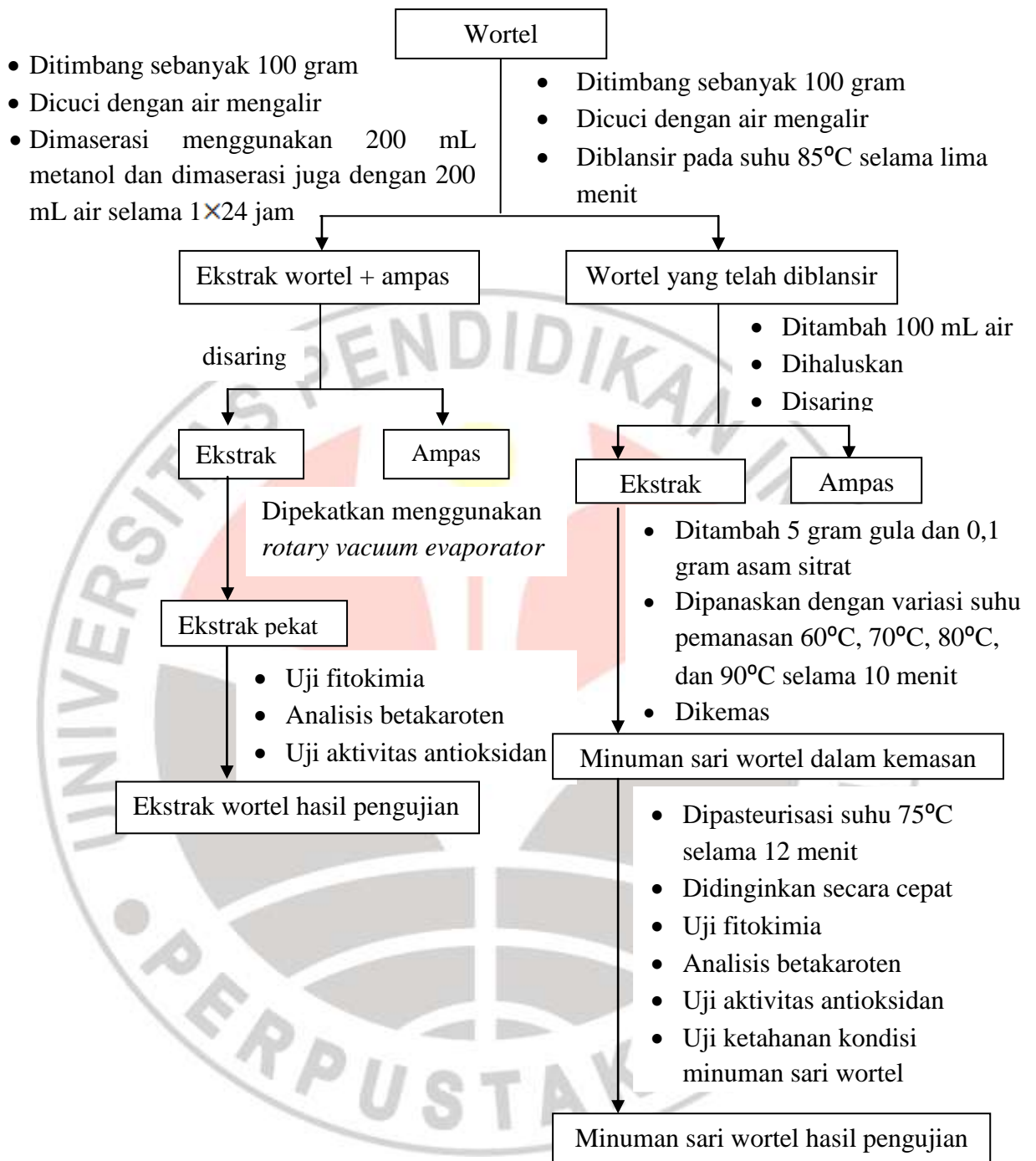
3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu:

1. Tahap determinasi tumbuhan wortel
2. Tahap penyiapan sampel wortel
3. Tahap ekstraksi wortel
4. Tahap pembuatan minuman sari wortel
5. Tahap uji pendahuluan berupa uji fitokimia
6. Tahap uji aktivitas antioksidan minuman sari wortel
7. Tahap uji kadar betakaroten
8. Tahap uji ketahanan minuman sari wortel

3.4 Bagan Alir Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi delapan tahapan, yaitu determinasi tumbuhan, penyiapan sampel, ekstraksi sampel, pembuatan minuman sari wortel, uji fitokimia, uji aktivitas antioksidan, uji kadar betakaroten, dan uji ketahanan minuman sari wortel. Bagan alir penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Determinasi Tumbuhan

Tumbuhan yang diteliti dideterminasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB untuk mengetahui spesies dan famili tanaman yang diteliti.

3.5.2 Penyiapan Sampel Wortel

Wortel disortasi untuk memilih wortel dengan kualitas yang baik kemudian dibuang bagian yang tidak akan diolah. Wortel dicuci dan diblansir pada suhu 85°C selama lima menit.

3.5.3 Ekstraksi Wortel

Seratus gram wortel yang telah dihaluskan dimaserasi dengan 200 mL pelarut metanol selama 1×24 jam dan dimaserasi juga dengan 200 mL pelarut air selama 1×24 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

3.5.4 Pembuatan Minuman Sari Wortel

Prosedur pembuatan minuman sari wortel ini adalah modifikasi dari prosedur pembuatan minuman sari wortel nanas yang dilakukan oleh Ahza (2009). Modifikasi dilakukan pada penetapan berbagai variasi suhu pemanasan dan bahan utama yang digunakan hanya wortel. Prosedur ini merupakan prosedur pembuatan minuman sari buah untuk skala industri rumahan.

Seratus gram wortel yang telah dihaluskan ditambah seratus mL air, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah gula sebanyak 5 gram dan asam sitrat sebanyak 0,1 gram. Menurut Ahza (2009), suhu pemanasan sari buah adalah 85°C, sehingga pada penelitian ini dilakukan pemanasan dengan variasi

suhu 60°C, 70°C, 80°C, dan 90°C selama 10 menit. Waktu pemanasan 10 menit didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Ahza (2009) dan dengan waktu 10 menit dihasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Minuman sari wortel yang telah diperoleh dikemas dan dipasteurisasi pada suhu 75°C selama 12 menit, kemudian minuman sari wortel didinginkan secara cepat.

3.5.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan menggunakan metode menurut Sangi (2008). Tiap sampel diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam masing-masing sampel. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi

1. Pemeriksaan terpenoid dan steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara sebanyak 1 mL ekstrak dan masing-masing sampel minuman sari wortel ditambah dengan 1 mL CH₃COOH glasial dan 1 mL H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

2. Pemeriksaan alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak dan masing-masing sampel minuman sari wortel ditambah dengan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

3. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak dan masing-masing sampel minuman sari wortel ditambah 1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat, timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

4. Pemeriksaan tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara 1 mL ekstrak dari masing-masing sampel minuman sari wortel ditambah beberapa tetes FeCl₃ 1%. Timbulnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa tanin.

5. Pemeriksaan Kuinon

Pemeriksaan kuinon dilakukan dengan cara menambahkan 1 mL sampel dengan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N. Timbulnya larutan berwarna merah tua menunjukkan adanya senyawa kuinon.

3.5.6 Analisis Betakaroten

Analisis betakaroten dilakukan menggunakan instrumentasi HPLC menurut Biranti dkk. (2009). Sebelum dilakukan analisis betakaroten, sampel diekstraksi terlebih dahulu. Sebanyak tiga puluh mL sampel dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah lima belas mL n-heksana. Sampel dikocok perlahan-lahan kemudian didiamkan sampai terbentuk dua fasa. Setelah terbentuk dua fasa, diambil fasa organiknya yang terdapat pada lapisan atas. Sampel diekstraksi kembali sampai tidak terbentuk fasa organik yang berupa larutan berwarna kuning. Fasa organik kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

Ekstrak yang diperoleh diuji dengan menggunakan instrumen HPLC. Kolom yang digunakan adalah kolom Princeton Omni C₁₈. Detektor yang digunakan adalah detektor UV dengan fasa gerak metanol dan asetonitril dengan perbandingan 3:1 pada laju alir 1 mL/menit. Luas area pada kromatogram sampel dibandingkan dengan luas area pada kromatogram standar betakaroten, sehingga diperoleh konsentrasi betakaroten di dalam sampel.

Kadar betakaroten dihitung dengan menggunakan rumus berikut.

$$\text{Kadar betakaroten} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan Minuman Sari Wortel

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode menurut Biranti dkk. (2009) dan Parwata (2010). Penentuan aktivitas antioksidan ini dilakukan melalui beberapa tahapan. Pertama, larutan DPPH 100 ppm dibuat dengan melarutkan 5 mg DPPH dalam metanol pada labu ukur 50 mL. Larutan DPPH 100 ppm tersebut kemudian diencerkan kembali dan dibuat dalam lima seri konsentrasi, yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Sebelum dilakukan pengukuran absorbansi deret, terlebih dahulu dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum, sehingga diketahui bahwa panjang gelombang maksimum untuk larutan standar DPPH adalah 515,5 nm. Selanjutnya dibuat larutan DPPH dalam metanol dengan konsentrasi 20 ppm. Larutan DPPH 20 ppm tersebut akan digunakan sebagai kontrol dalam penentuan aktivitas antioksidan sampel minuman sari wortel. Kemudian sebanyak 1 mL sampel minuman sari wortel diencerkan dengan metanol pada labu ukur 25 mL. Larutan sampel diambil sebanyak 4 mL dan ditambah 2 mL larutan DPPH 20 ppm dalam metanol. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansinya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515,5 nm.

Aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus berikut.

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

Keterangan :

Abs DPPH kontrol : absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel

Abs sisa DPPH : absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel

3.5.8 Pengujian Ketahanan Minuman Sari Wortel

Minuman sari wortel yang diperoleh diuji ketahanannya melalui pengukuran pH dan pengamatan kondisi fisik. Pengujian dilakukan terhadap minuman sari wortel yang dibuat pada suhu pemanasan 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, dan dilakukan juga terhadap sari wortel segar sebagai pembanding.

Sebanyak 10 mL sampel masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disimpan pada suhu kamar. Sampel diukur pH dan diamati perubahan kondisi fisiknya setiap hari sampai terjadi perubahan pH dan kondisi fisik pada sampel.

