

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah Cabe Jawa (*Piper Retrofractum V.*) yang berasal dari kebun percobaan manoko. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia dan Balai Besar Industri Agro (BBIA) Bogor.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

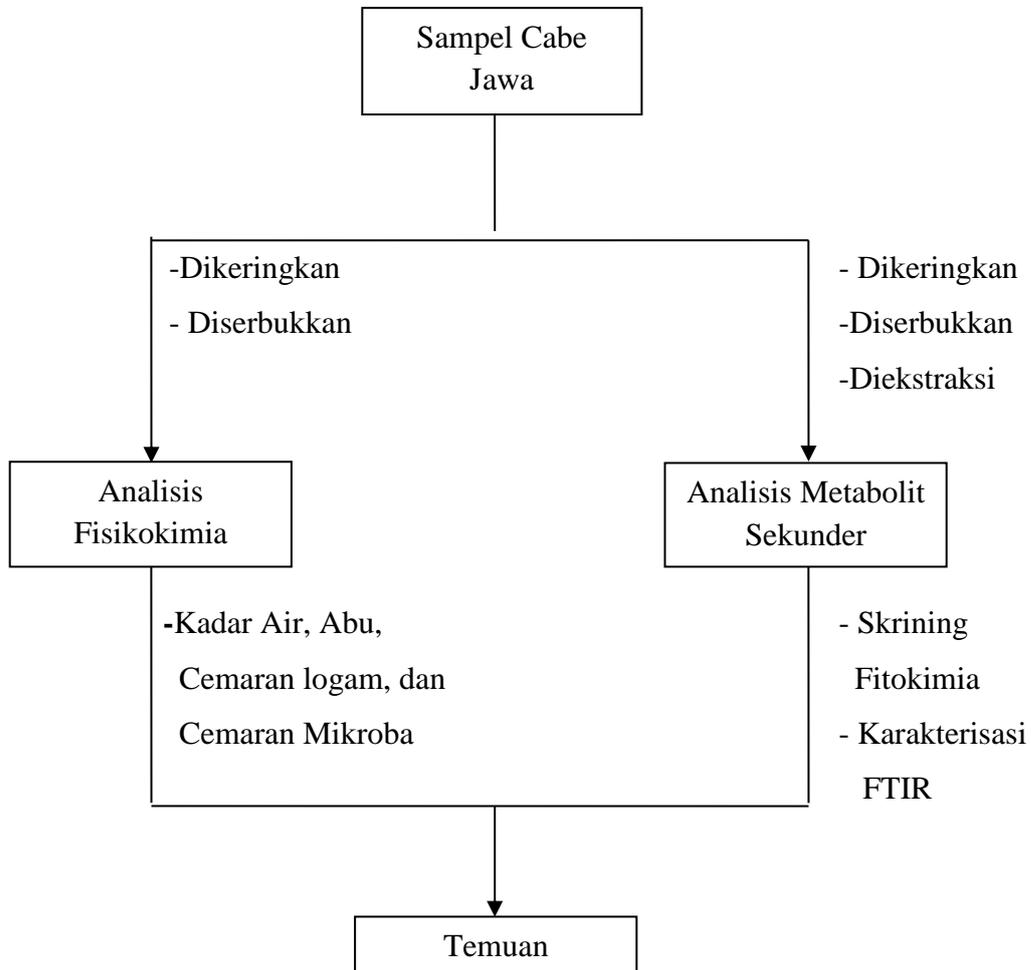
Peralatan yang digunakan pada tahap pengujian kadar air, abu total, abu tak larut asam, cemaran logam, dan cemaran mikroba yaitu alat-alat gelas, *stomacher*, wadah steril, oven, tanur, tabung durham, cawan. Pada tahap ekstraksi peralatan yang digunakan yaitu alat-alat gelas, maserator, penguap putar bervakum (*vacuum rotatory evaporator*), pompa vakum, corong *Buchner*, dan *freeze dryer*. Alat yang digunakan untuk pengujian skrining fitokimia yaitu tabung reaksi, pipet, gelas ukur dan batang pengaduk. Alat instrumen yang digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yaitu FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah Cabe Jawa yang telah dipreparasi menjadi simplisia. Bahan kimia yang digunakan meliputi metanol teknis yang telah didestilasi. Pada pengujian kadar air, abu total, abu tak larut asam, cemaran logam, dan cemaran mikroba bahan yang digunakan yaitu *peptone water*, Media VRBA, TTB, RV, HE, BSA, TSIA, $Mg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$, HNO_3 , HCl, $HClO_4$. Pada pengujian skrining fitokimia bahan yang digunakan meliputi *aquades*, Pereaksi Mayer, Pereaksi Wagner, $FeCl_3$, Asam Asetat (CH_3COOH), asam asetat (H_2SO_4), asam klorida(HCl), Kloroform ($CHCl_3$), amonia(NH_3).

3.3 Metodologi Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada bagan alir penelitian (Gambar 3.1)



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Uji Proksimat

Uji proksimat dilakukan untuk mengetahui parameter simplisia. Adapun uji simplisia meliputi penentuan kadar air, abu total, dan abu tak larut asam. Uji proksimat mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang cara uji makanan dan minuman. Prosedur kerja yang digunakan adalah sebagai berikut:

3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 1-2 gram serbuk cabe jawa pada botol timbang yang bertutup yang telah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan pada oven suhu 105°C selama 3 jam, lalu didinginkan dalam desikator. Setelah itu ditimbang hingga diperoleh bobot yang tetap.

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{W}{W_1} \times 100\%$$

W = bobot cuplikan sebelum dikeringkan

W₁ = kehilangan bobot setelah dikeringkan

3.3.1.2 Penentuan Kadar Abu Total

Penentuan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang 3 gram serbuk cabe jawa ke dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diarakkan di atas nyala pembakar dan diabukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 550°C sampai pengabuan sempurna. Setelah itu didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang hingga diperoleh bobot tetap.

$$\% \text{ Kadar Abu Total} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

W = bobot contoh sebelum diabukan

W₁ = bobot contoh + cawan sesudah diabukan

W₂ = bobot cawan kosong

3.3.1.3 Penentuan Kadar Abu tak Larut dalam Asam

Penentuan kadar abu tak larut dalam asam dengan cara melarutkan abu bekas penetapan kadar abu dengan penambahan 25 mL HCl 10%. Kemudian dididihkan selama 5 menit, selanjutnya saring larutan dengan kertas saring tak berabu dan cuci dengan air suling sampai bebas klorida. Keringkan kertas saring dalam oven, masukkan ke dalam cawan porselen (platina) yang telah diketahui bobotnya lalu abukan. Dinginkan cawan di dalam desikator hingga suhu kamar, lalu timbang. Penimbangan diulangi hingga bobot tetap.

3.4 Penentuan Cemar Logam

Penentuan cemaran logam dilakukan untuk mengetahui cemaran yang terkandung dalam buah cabe jawa. Adapun parameter yang diuji yaitu logam Arsen (As), Kadmium (Cd), Timbal (Pb), dan Raksa (Hg). Parameter pengujian logam mengacu pada SNI 4866-1998 tentang Cara Uji Cemaran Arsen dalam Makanan dan SNI 01-2896-1998 tentang Cara Uji Cemaran Logam dalam Makanan. Beberapa prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut:

3.4.1 Penentuan Cemaran Arsen dalam Makanan

Penentuan cemaran arsen dilakukan dengan cara menimbang 10 gram sampel buah cabe jawa lalu ditambah 2,5 gram $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 25 mL HNO_3 p.a. dan diaduk dengan sempurna. Kemudian campuran diuapkan diatas penangas air sampai kering. Stelah itu, sampel diarangkan dalam tanur selama 2 jam dengan suhu 500°C , kemudian ditambahkan HNO_3 p.a beberapa tetes lalu diuapkan dan diabukan kembali selama 1 jam. Abu yang diperoleh dilarutkan dengan larutan HCl 1:3 dan tandabataskan dengan air suling hingga 50 mL. Kemudian dipipet 25 mL larutan yang telah dibuat dan ditambahkan 2 mL HCl 8M dan 0,1mL KI 20% lalu didiamkan selama > 2 menit. Kemudian larutan sampel, deret standar dan blanko diukur dengan spektroskopi serapan atom.

3.4.2 Penentuan Cemaran Timbal, Timah dalam Makanan

Penentuan cemaran timbal dan timah dalam makanan dilakukan dengan cara menimbang 5 gram sampel buah cabe jawa dan masukkan ke dalam cawan porselen. Ditambahkan 10 mL larutan magnesium nitrat dalam etanol ke dalam sampel dan diaduk. Setelah itu, campuran diuapkan menggunakan etanol 95% dengan cara pemanasan di atas penangas air, kemudian pindahkan piala gelas ke dalam tanur dengan suhu 500°C selama 2 jam lalu didinginkan. Apabila masih terdapat sisa karbon, ditambahkan 1 mL air dan 2 mL HNO_3 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_3 ke dalam abu sambil dipanaskan sampai abu larut seluruhnya. Kemudian larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan ditandabataskan lalu disaring dengan kertas whatman 540. Larutan sampel yang telah dibuat diukur dengan spektroskopi serapan atom dan dibandingkan dengan kurva standar untuk masing-masing logam.

3.4.3 Penentuan Cemaran Raksa dalam Makanan

Penentuan cemaran raksa dalam makanan dilakukan dengan cara menimbang 5 gram sampel buah jawa ke dalam labu destruksi, ditambahkan 25 mL H_2SO_4 18N, 20 mL HNO_3 , 1 mL larutan natrium molibdat, dan 5 butir batu didih lalu didestruksi selama 1 jam dan dinginkan selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 mL $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin dan dilakukan pemanasan selama 10 menit hingga timbul 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.

Larutan destruksi sampel dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan 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 didestruksi sampel dan blanko ditambahkan 20 mL larutan pereduksi lalu diukur absorbansi pada $\lambda = 253,7$ nm.

3.5 Penentuan Cemaran Mikroba

Penentuan cemaran mikroba dilakukan untuk mengetahui cemaran yang terkandung dalam buah cabe jawa. Cemaran mikroba meliputi kapang/khamir, *E.coli*, *Salmonella sp*, *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

3.5.1 Penentuan Kapang/Khamir

Pada preparasi contoh, contoh diambil sebanyak 100 gram lalu timbang sampel secara aseptik sebanyak 25 gram wadah (a), 50 gram (b), dan (c) yaitu sampel. Ditambahkan 0,1% *peptone water* sebanyak 225 mL untuk (a), 450 mL (b) dan homogenkan selama 2 menit untuk pengenceran 10^{-1} . Diambil 1 ml homogenat diatas steril dan masukkan ke dalam 9 mL larutan 0,1% *peptone water* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} hingga seterusnya. Kemudian koloni dihitung berdasarkan metode cawan agar tuang/ cawan agar sebar.

3.5.2 Penentuan *Escherichia coli*

Pengujian mikroba *E.coli* dilakukan dengan cara menimbang sampel sebanyak 25 gram dan masukkan ke dalam wadah steril kemudian dilakukan uji pendugaan dengan melakukan pengenceran 10^{-1} hingga pengenceran 10^{-3} menggunakan larutan BPW 0,1% menggunakan *stomacher*. Setelah itu, dipipet masing-masing 1 mL dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung LSBT yang berisi tabung durham dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 2 hari.

Dilakukan isolasi dengan cara menginokulasikan ke dalam media VRBA dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C . Koloni yang diduga *E.coli* berdiameter 2-3mm, 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)*.

3.5.3 Penentuan *Salmonella spp*

Pengujian mikroba *Salmonella* dilakukan dengan cara menimbang serbuk buah cabe jawa 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 1 mL 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* agar miring dan warna ungu pada bagian bawah media LIA menunjukkan sampel positif *Salmonella*.

3.5.4 Penentuan *Staphylococcus aureus*

Pengujian mikroba *S.aureus* dilakukan dengan menggunakan kontrol positif, kemudian masukkan media BPA 15-20 mL hingga cawan memadat. Lalu dipipet 1 mL suspensi dari setiap pengenceran, dan inokulasikan. Diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 48 jam. Kemudian dilakukan perhitungan koloni dari pengenceran terendah ke tertinggi. Koloni *S.aureus* memiliki ciri khas bundar, licin dan halus.

3.5.5 Penentuan *Pseudomonas aeruginosa*

Pengujian mikroba *P.aeruginosa* dilakukan menggunakan penyaring membran yang terdiri dari corong, membran penyaring dan penampung yang telah disterilkan. Kemudian masukkan sampel dan gunakan vakum untuk menyaring cuplikan. membilas vakum dengan air suling lalu buka penyaring dan letakkan membran penyaring. Diinkubasikan selama 72 jam. Lalu amati koloni, dengan ciri 0,8-2,2 mm, penampakan rata, terdapat bintik coklat sampai hijau hitam.

3.6 Uji Fitokimia

Uji fitokimia terhadap kandungan senyawa kimia metabolit sekunder merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian mengenai tumbuhan obat atau dalam hal pencarian senyawa aktif baru yang berasal dari bahan alam yang dapat menjadi precursor bagi sintesis obat-obat baru atau menjadi prototype senyawa aktif tertentu. Oleh karenanya, metode uji fitokimia harus merupakan uji sederhana tetapi terandalkan. Metode uji fitokimia yang banyak digunakan adalah metode reaksi warna dan pengendapan yang dapat dilakukan di lapangan atau di laboratorium (Iskandar et al, 2012).

Ekstrak buah cabe jawa yang telah dikeringkan kemudian di uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa-senyawa yang terkandung pada ekstrak. Beberapa uji fitokimia yang dilakukan diantaranya uji kandungan senyawa alkaloid, tanin, saponin, steroid, dan flavonoid. Prosedur kerja uji fitokimia yaitu sebagai berikut :

3.6.1 Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer dari 0,5 g ekstrak buah cabe jawa dalam 1 ml kloroform. Pembentukan endapan putih menunjukkan Kehadiran alkaloid. Pembuatan pereaksi Mayer yaitu 1 gram KI dilarutkan dalam 20 ml *aquades* kemudian ditambahkan 0,271 g HgCl₂ pada larutan KI.

3.6.2 Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan melarutkan 0,1 g ekstrak buah cabe jawa di 3ml air dan kemudian ditambahkan 0,1 g Mg serbuk dan 1 ml HCl pekat. Warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3.6.3 Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan 0,1 g ekstrak buah cabe jawa di 3 ml air, kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Munculnya gelembung busa menunjukkan hasil positif saponin.

3.6.4 Steroid

Uji Steroid dilakukan dengan melarutkan 0,1 g ekstrak buah cabe jawa dalam 1 ml air, kemudian ditambahkan 1 ml CH₃COOH dan 1 ml H₂SO₄. Munculnya warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

3.6.5 Tanin

Uji Tanin dilakukan dengan menimbang 0,1g ekstrak buah cabe jawa dilarutkan dalam 2 ml air kemudian ditambahkan beberapa tetes 1% FeCl₃. Uji positif dari pengujian tanin yaitu larutan berwarna warna hijau/biru gelap (Ramdhani,*et al*, 2012).