

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan dari Bulan Maret sampai Bulan Juni 2013. Pengujian aktivitas antioksidan, kadar vitamin C, dan kadar betakaroten buah pepaya dan manisan pepaya dilakukan di Laboratorium Riset dan Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.

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

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

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik, alat-alat gelas, buret, blender, pisau, labu ukur, panci aluminium, saringan, pengaduk, toples dan spektrofotometer UV-Vis MINI Shimadzu 1240 dan instrument HPLC.

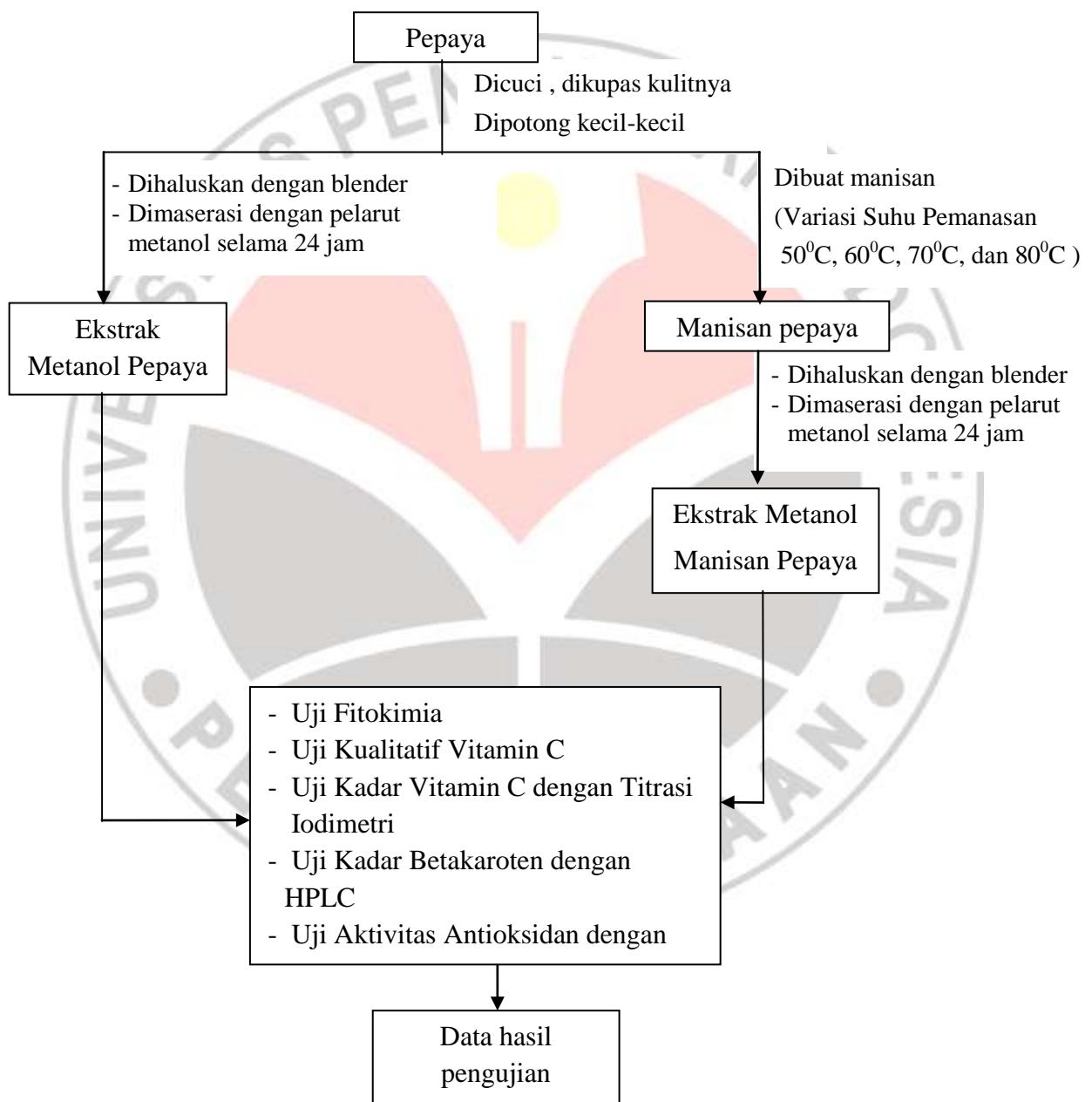
##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah pepaya mengkal, aquades, metanol, peraksi DPPH, kloroform, pereaksi Mayer, serbuk Mg, asam asetat glasial, HCl 0,1 N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, NaOH 0,1 N, n-heksana, I<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O, KIO<sub>3</sub>, KI, HCl, KMnO<sub>4</sub> 0,1 %, amilum, gula pasir, garam dapur, natrium benzoat.

### 3.3 Cara Kerja

#### 3.3. 1 Bagan Alir Penelitian

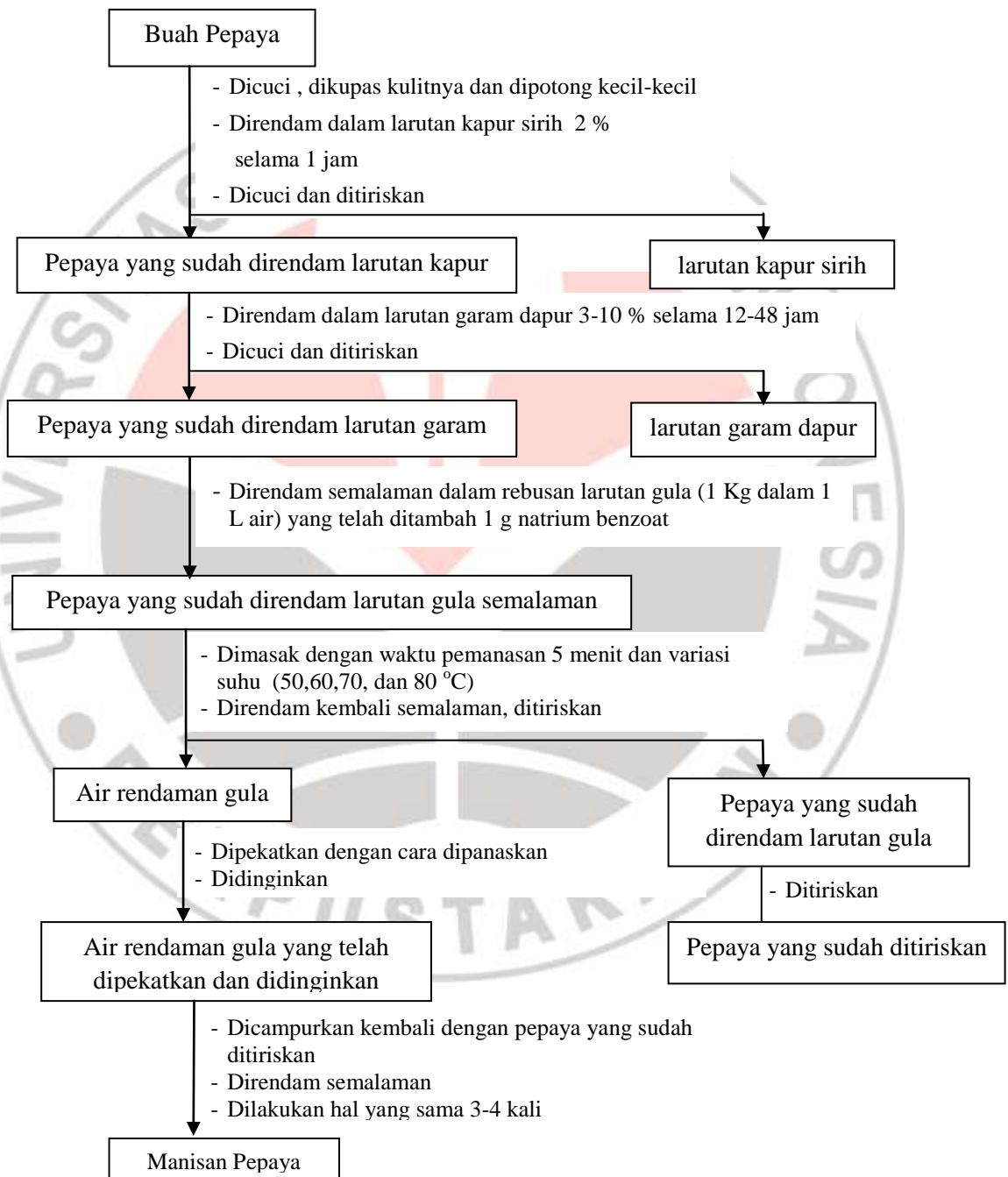
Bagan Alir penelitian ditunjukan pada gambar 3.1 berikut ini :



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

### 3.3.2 Bagan Alir Pembuatan Manisan Pepaya

Bagan alir pembuatan manisan pepaya dapat dilihat pada gambar 3.2 berikut ini :



Gambar 3.2. Bagan Alir Pembuatan Manisan Pepaya

Fitria Apriliani Ramdani, 2013

Penentuan Aktivitas Antioksidan Buah Pepaya (Carica Papaya L.) Dan Produk Olahannya Berupa Manisan Pepaya

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### **3.3.3 Persiapan Sampel**

Disiapkan buah pepaya yang mengkal, kemudian dicuci bersih dan kulitnya dikupas. Setelah itu, buah pepaya dipotong kecil-kecil, sebagian dihaluskan dengan blender, sebagian lagi dibuat manisan.

### **3.3.4 Pembuatan Manisan Pepaya**

Prosedur pembuatan manisan pepaya dalam penelitian ini merupakan modifikasi dari prosedur Saptoningsih dan Jatnika (2010). Modifikasi yang dilakukan yaitu lama pemanasan buah selama 5 menit. Proses pembuatan manisan pepaya dalam industri rumahan yaitu pertama pepaya dipotong sesuai ukuran, kemudian direndam dalam larutan kapur sirih 2 % (20 gram kapur sirih dalam 1 L air) selama 1 jam, setelah itu pepaya dicuci dan ditiriskan. Selanjutnya pepaya direndam dalam larutan garam dapur konsentrasi 3-10 % selama 12-48 jam, lalu cuci bersih berkali-kali hingga sisa larutan garam dan kapur sirih hilang. Rendam pepaya selama semalam dalam rebusan air gula (1 Kg dalam 1 L air) yang telah didinginkan dan telah ditambah 1 g natrium benzoat. Selanjutnya pepaya dipanaskan selama 5 menit dengan variasi suhu pemanasan 50° C, 60° C, 70° C, dan 80 °C. Menurut Saptoningsih dan Jatnika (2010) proses pemanasan manisan dilakukan pada suhu 60°C. Oleh karena itu, dalam penelitian ini pembuatan manisan pepaya dilakukan pada variasi suhu pemanasan 50° C, 60° C, 70° C, dan 80 °C. Pemilihan lama pemanasan selama 5 menit berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rahayu dan Pribadi (2012) yang menyatakan bahwa waktu perebusan 5 menit memberikan penurunan kandungan vitamin C paling kecil dalam manisan pepaya. Setelah dipanaskan, pepaya direndam kembali semalam. Keesokan harinya pepaya ditiriskan dan larutan gula dipekatkan, selanjutnya rendam kembali pepaya yang sudah ditiriskan ke dalam larutan gula yang telah didinginkan. Lakukan hal demikian 3-4 kali.

### **3.3.5 Persiapan Ekstrak Pepaya dan Ekstrak Manisan Pepaya**

Pepaya dan manisan pepaya yang telah halus diekstraksi dengan pelarut metanol sebanyak 75 mL selama 24 jam. Setelah itu ekstrak disaring sehingga

didapatkan filtrat. Filtrat kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapat ekstrak yang kental.

### 3.3.6 Uji Fitokimia

#### 3.3.6.1 Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih, maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

#### 3.3.6.2 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 1 g serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid

#### 3.3.6.3 Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL  $H_2SO_4$  pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid. Sedangkan timbulnya perubahan warna violet menjadi biru atau hijau menunjukkan adanya steroid.

#### 3.3.6.4 Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah beberapa tetes  $FeCl_3$  1 %. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya tanin.

#### 3.3.6.5 Pemeriksaan Kuinon

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah beberapa tetes NaOH 0,1 N. Timbulnya warna merah tua menunjukkan adanya kuinon.

### 3.3.7 Uji Kualitatif Vitamin C

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 5 mL akuades dan 10 mL  $KMnO_4$  0,1 %, timbulnya perubahan menjadi warna coklat menunjukkan adanya vitamin C.

### **3.3.8 Penentuan Kandungan Vitamin C Ekstrak Metanol Pepaya dan Ekstrak Metanol Manisan Pepaya**

Penentuan vitamin C dilakukan dengan menggunakan metode titrasi iodimetri. Sebelum melakukan titrasi iodimetri, dilakukan pembuatan larutan baku. Setelah itu dilakukan standarisasi  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan  $\text{KIO}_3$  dan standarisasi iodium dengan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

#### **3.3.8.1 Pembuatan Larutan $\text{KIO}_3$ 0,01 N**

Sebanyak 0,0356 g padatan  $\text{KIO}_3$  dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditandabataskan dan dihomogenkan dengan akuades.

#### **3.3.8.2 Pembuatan Larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 N**

Sebanyak 0,2482 g padatan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditandabataskan dan dihomogenkan dengan akuades. Kemudian dilakukan standarisasi menggunakan  $\text{KIO}_3$  0,01 N.

#### **3.3.8.3 Pembuatan Larutan Iodium 0,01 N**

Sebanyak 0,6345 g serbuk  $\text{I}_2$  dan 1 g KI dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL ditandabataskan dan dihomogenkan dengan akuades, kemudian didiamkan semalam. Kemudian dilakukan standarisasi menggunakan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

#### **3.3.8.4 Pembuatan Larutan Amilum 1 %**

Sebanyak 0,25 g serbuk amilum dimasukkan ke dalam gelas kimia, lalu dilarutkan dengan akuades kemudian dipanaskan hingga larutan menjadi jernih.

#### **3.3.8.5 Standarisasi $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan $\text{KIO}_3$ 0,01 N**

Larutan  $\text{KIO}_3$  0,01 N dimasukkan ke dalam labu Erlenmayer, ditambah 4 mL KI dan 1 mL HCl 4 N kemudian dititrasi dengan larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01 N hingga berubah warna menjadi kuning pucat. Setelah itu, ditambah beberapa tetes indikator amilum, dititrasi kembali hingga larutan berubah warna dari kuning

pekat menjadi bening. Diamati volume  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  yang terpakai dalam buret dan dihitung normalitasnya.

### **3.3.8.6 Standarisasi $\text{I}_2$ dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} 0,01 \text{ N}$**

Larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} 0,01 \text{ N}$  dimasukkan ke dalam labu ErlenMayer, 2 tetes indikator amilum kemudian dititrasi dengan larutan  $\text{I}_2$  dari buret hingga terjadi perubahan warna dari bening menjadi biru. Diamati volume  $\text{I}_2$  yang terpakai dalam buret dan dihitung normalitasnya.

### **3.3.8.7 Penentuan Kadar Vitamin C Ekstrak Metanol Pepaya dan Ekstrak Metanol Manisan Pepaya**

Sebanyak 2 mL sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, kemudian dihomogenkan dan ditandabataskan dengan akuades. Setelah itu, sebanyak 10 mL dari sampel tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, ditambah beberapa tetes indikator amilum, kemudian larutan sampel dititrasi dengan larutan  $\text{I}_2$  hingga terbentuk larutan dengan warna biru yang stabil. Diamati volume  $\text{I}_2$  yang terpakai dalam buret, dan ditentukan kandungan vitamin C dalam sampel dengan menggunakan rumus berikut ini :

$$\text{Kadar Asam Askorbat} = \frac{\text{vol iodium (ml)} \times \text{mg asam askorbat (mg/ml)} \times \text{Fp}}{\text{massa sampel (g)}}$$

Keterangan :

- Volume iodium = volume iodium dari buret yang terpakai selama titrasi
- Mg asam askorbat didapat dari :

1 ml larutan iodium 0,01 N ekivalen dengan 0,88 mg asam askorbat

- Fp = faktor pengenceran
- Massa sampel = massa sam
- pel yang digunakan pada saat titrasi.

### **3.3.9 Penentuan Kandungan Betakaroten Ekstrak Metanol Pepaya dan Ekstrak Metanol Manisan pepaya dengan HPLC**

Sebelum dilakukan analisis terhadap sampel dengan menggunakan HPLC, sampel dipreparasi terlebih dahulu. Sebanyak 15 mL sampel di ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-heksana. Fasa atas ditampung dalam botol vial, fasa bawah diekstraksi kembali. Proses ekstraksi dilakukan sampai tidak terbentuk lagi warna oranye.

Fasa atas kemudian dianalisis kandungan betakaroten dengan HPLC. Parameter dalam pengujian HPLC yaitu

Standar : Betakaroten

Fasa gerak : Metanol :Asetonitril 3:1

Laju alir : 0,75 mL/menit

Detektor : UV

$\lambda$  detektor : 198,5 nm

Untuk menghitung kadar betakaroten pada sampel digunakan rumus berikut ini:

$$\text{Kadar betakaroten (ppm)} = \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \times \text{Konsentrasi Standar}$$

### **3.3.10 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH**

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menurut Biranti (2009) dan Okawa (2001). Sampel adalah ekstrak metanol pepaya atau ekstrak metanol manisan pepaya. Sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan pada sampel, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi DPPH. Sebanyak 5 mg DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan metanol. Larutan DPPH yang dibuat memiliki konsentrasi 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran di dalam labu ukur 10 mL sehingga didapat konsentrasi 5,10,15,20

dan 25 ppm. Selanjutnya dilakukan scanning panjang gelombang absorbansi maksimum. Setelah didapat panjang gelombang absorbansi maksimum, kemudian sampel diukur absorbansi dengan menggunakan spektrometer UV-Vis pada panjang gelombang sesuai hasil scanning panjang gelombang absorbansi maksimum.

Untuk pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara sebanyak 5 mL sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambah pelarut metanol hingga tanda batas kemudian dikocok. Selanjutnya dari ekstrak tersebut dipipet 4 mL lalu disimpan dalam botol vial yang telah dilapisi aluminium foil. Selanjutnya ditambah DPPH 20 ppm sebanyak 2 mL lalu ditutup dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu, dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 516 nm. Aktivitas antioksidan dapat diukur dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

Abs DPPH kontrol : absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan ekstrak metanol pepaya atau manisan pepaya

Abs DPPH sisa : absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan ekstrak metanol pepaya atau manisan pepaya