

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus 2015 hingga Agustus 2016 di Laboratorium Bahan Pangan Bidang Proses Radiasi Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional (PAIR-BATAN) Jl. Lebak Bulus Raya No.49 Pasar Jumat Jakarta Selatan, Laboratorium Riset Kimia Makanan Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berbagai macam alat gelas, neraca analitik, lumpang dan alu, *Vacum Sealer*, kotak *styrofoam*, Iradiator Karet Alam (IRKA-⁶⁰Co), dosimeter *Fricke*, kertas saring, *rotary vaccum evaporator*, pompa vakum, spektrofotometer UV-Vis Mini Shimadzu 1240, instrumen GC-MS model Shimadzu QP5050-A.

3.2.2. Bahan

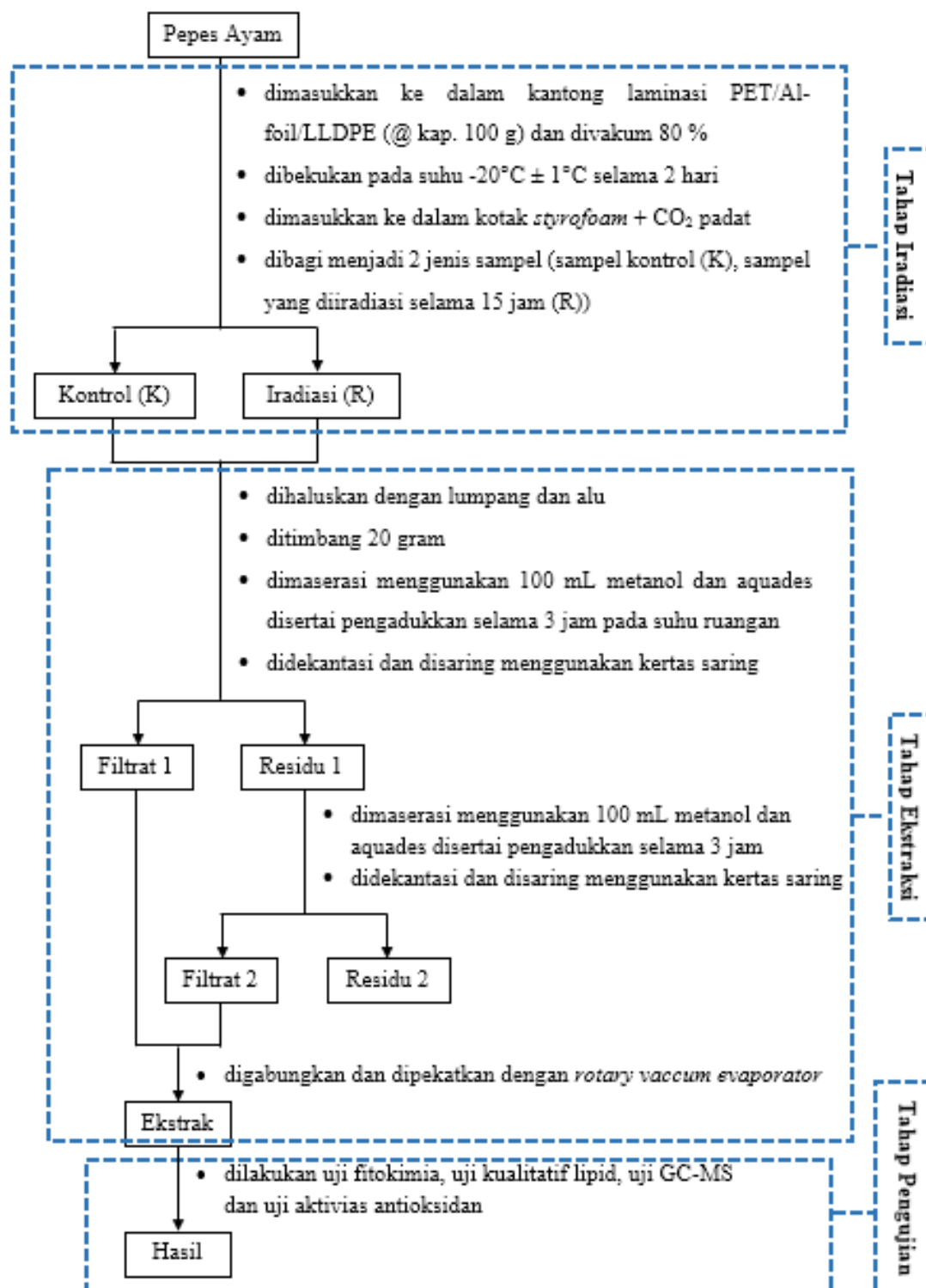
Bahan yang digunakan pada penelitian yang dilakukan yaitu CO₂ padat, padatan DPPH, metanol, CH₃COOH glasial, HCl pekat, H₂SO₄ pekat, serbuk Mg, CHCl₃, etanol, HgCl₂, iodin, aquades, BF₃ 20% dalam metanol.

3.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan yaitu:

1. Tahap Iradiasi
2. Tahap Ekstraksi
3. Tahap Pengujian: Uji Fitokimia, Uji Kualitatif Lipid, Uji GC-MS, dan Uji Aktivitas Antioksidan

3.4. Bagan Alir Penelitian



Gambar 3. Bagan Alir Penelitian

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Tahap Iradiasi

Sampel terdiri dari dua jenis yaitu sampel kontrol (K) dan sampel yang akan diiradiasi (R). Sampel yang telah dikemas menggunakan kantong laminasi PET/Al-foil/LLDPE (@ kap. 100 g) dan divakum 80 % dibekukan pada suhu $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 2 hari dan dimasukkan ke dalam kotak *styrofoam* + CO₂ padat. Setelah itu sampel R diiradiasi dengan sinar gamma dosis 45 kGy selama 15 jam sementara sampel K dibiarkan dalam kotak *styrofoam* + CO₂ padat pada suhu kamar. Sampel K dan R dibiarkan hingga seluruh CO₂ padat habis (*thawing*).

3.5.2. Tahap Ekstraksi

Ekstraksi yang dilakukan didasarkan pada pengembangan metode ekstraksi yang dilakukan oleh Irawati (2011) pada rendang steril iradiasi dan metode Soraya (2014) pada kulit manggis. Pepes ayam terlebih dahulu dipotong kecil-kecil lalu dilakukan penghalusan menggunakan lumpang dan alu. Kemudian pepes ayam masing-masing ditimbang sebanyak 20 gram baik pepes ayam kontrol maupun iradiasi. Selanjutnya masing-masing pepes ayam ditambahkan 100 mL metanol dan dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi selama 3 jam disertai pengadukkan menggunakan magnetik stirer dengan kecepatan 400 rpm. Kemudian dilakukan dekantasi selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring biasa dan corong kaca. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dinamakan filtrat I, sedangkan residu yang diperoleh di ekstraksi kembali menggunakan 100 mL metanol dengan cara maserasi selama 3 jam disertai pengadukkan menggunakan magnetik stirer dengan kecepatan 400 rpm. Kemudian dilakukan dekantasi kembali selama 30 menit dan disaring menggunakan kertas saring biasa dan corong kaca. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dinamakan filtrat II. Filtrat II digabungkan dengan filtrat I kemudian diuapkan menggunakan *rotary vaccum evaporator* pada suhu 75°C hingga warna ekstrak pekat.

3.5.3. Tahap Uji Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan meliputi,

1. Uji Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan cara sebanyak 2 mL masing-masing ekstrak ditambahkan pereaksi Liebermann-Burcharda (1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat). Timbulnya cincin coklat atau merah menunjukkan adanya senyawa terpenoid (Harborne, 1984).

2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara 2 mL ekstrak ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat, timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 1984).

3. Uji Salkowski

Uji salkowski dilakukan dengan cara sebanyak 2 mL masing-masing ekstrak ditambahkan 2 mL CHCl_3 dan beberapa tetes H_2SO_4 pekat. Terbentuknya cincin berwarna kuning keemasan atau coklat kemerahan menunjukkan adanya senyawa fitosterol (Tiwari *et al*, 2011).

3.5.4. Tahap Uji Kualitatif Lipid

Uji kualitatif lipid yang dilakukan yaitu:

1. Uji Ketidakjenuhan Lemak

Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan pembuatan pereaksi Iod-Hubl dengan cara mencampurkan larutan iodin (0,5 g dalam 10 mL etanol) dan larutan HgCl_2 (0,6 g HgCl dalam 10 mL etanol).

Uji ketidakjenuhan lemak dilakukan dengan cara sebanyak 2 mL masing-masing ekstrak ditambahkan 2 mL CHCl_3 dan tetes demi tetes pereaksi Iod-Hubl disertai pengocokkan hingga warna campuran tidak berubah lagi.

3.5.5. Tahap Uji Asam Lemak dengan GC-MS

Uji asam lemak dilakukan dengan menggunakan metode menurut Peres *et al* (2006) dengan sedikit perbedaan. Ekstrak pepes ayam diuapkan pelarutnya, kemudian diderivatisasi menggunakan BF_3 20% dalam metanol. Setelah itu

dianalisis menggunakan instrumen GC-MS Shimadzu model QP5050-A dengan kondisi:

1. Rasio split = 1:20 pada 280 °C
2. Antarmuka = 300 °C
3. Kolom = OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
4. Fasa diam = fenil-metil-silikon
5. Suhu Oven = mulai 150 °C, dipanaskan hingga 210 °C pada 5 °C/menit dan dipanaskan hingga 300 °C pada 10 °C/menit, suhu dipertahankan pada 300 °C selama 8 menit.

3.5.6. Tahap Uji Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode menurut (Gracia, 2012) yang dilakukan melalui beberapa tahapan. Pertama yaitu pembuatan larutan DPPH dengan cara melarutkan 1,96 mg DPPH dalam 10 mL metanol. Selanjutnya ekstrak pepes ayam diuji aktivitas antioksidannya dengan cara pembuatan larutan sampel, blanko, dan kontrol. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan memipet ekstrak sampel sebanyak 0,5 mL ditambahkan 3 mL metanol dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Sebagai blanko dicampurkan 3,3 mL metanol dengan 0,5 mL sampel. Sedangkan untuk kontrol dibuat dengan mencampurkan 3,5 mL metanol dengan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Pembuatan larutan sampel dan kontrol ditempatkan pada botol vial yang telah dilapisi aluminium foil. Setelah pemipetan selesai masing-masing larutan dikocok dan diinkubasi selama 100 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas Antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut,

$$\text{Aktivitas Antioksidan (\%)} = 100\% - \left(\frac{A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\% \right)$$