BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai bulan Juli 2019 di Laboratorium Riset Kimia Makanan dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

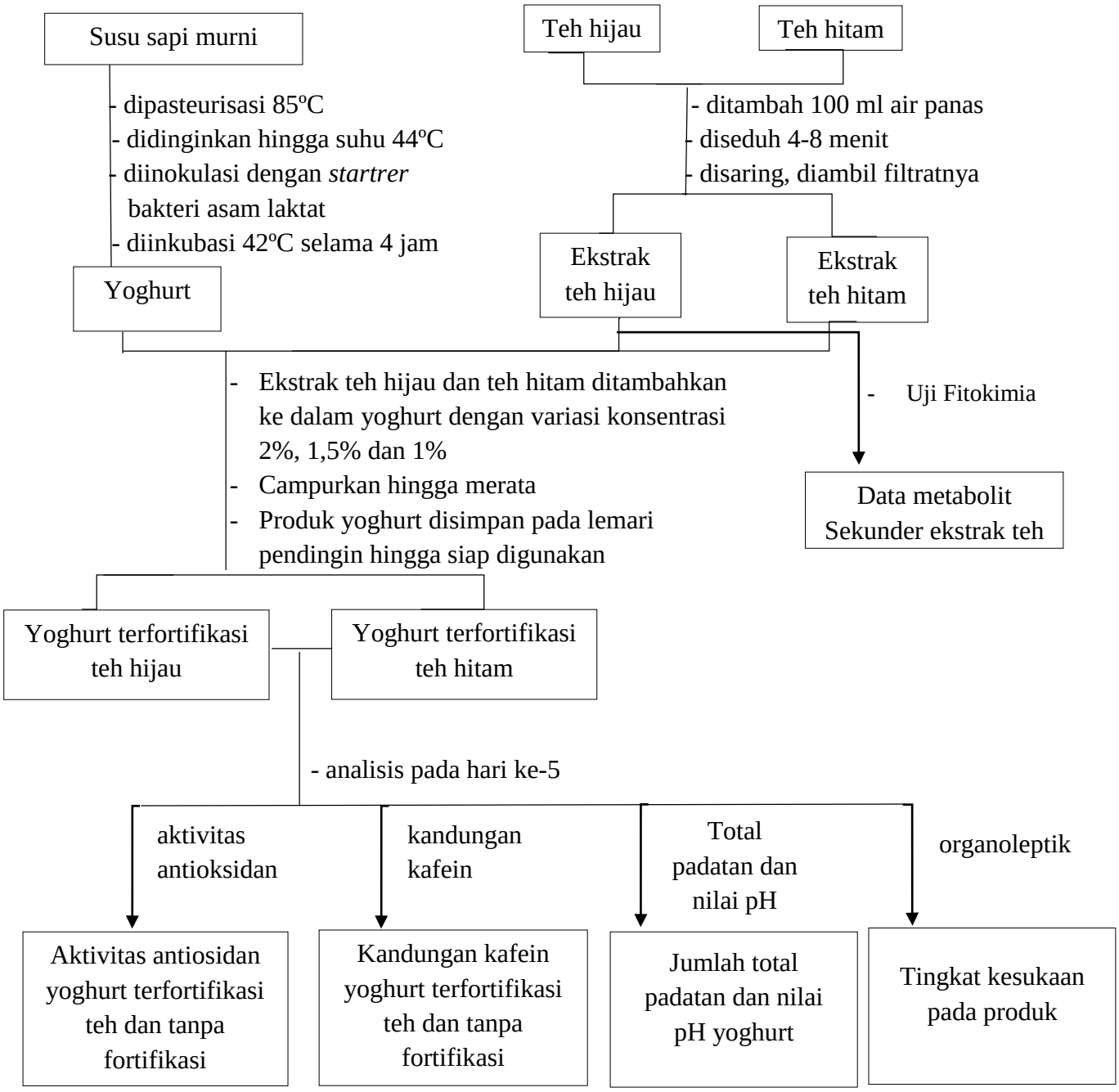
3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi; timbangan analitik, bermacam alat gelas, botol vial, set alat filtrasi, termometer, toples steril, refrigerator/ ruang penyimpanan, hotplate/ kompor, pisau, set alat inkubasi, pH meter, berbagai macam labu, saringan teh, oven, desikator, tabung reaksi, berbagai macam pipet, corong pisah, cawan penguap, dan set alat spekrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi; teh hijau dari PT Agro Lestari Padaawas Pangalengan, teh hitam dari PTPN VIII Kebun Kertamanah, susu sapi murni dari KPBS Pangalengan, air, aquades, bakteri asam laktat, sebuk Mg, HCl pekat merk K GaA, metanol merk K GaA, kloroform, pereasksi Mayer, asam asetat glasial merk K GaA, $FeCl_3$, asam sulfat pekat merk K GaA, $CaCO_3$ dan reagen DPPH *(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) Aldrich.

3.3 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 Bagai Alir Penelitian

3.4. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan ekstrak teh hijau dan teh hitam
2. Uji Fitokimia
3. Pembuatan Yoghurt
4. Fortifikasi Yoghurt
5. Uji aktivitas antioksidan
6. Isolasi kafein
7. Uji kadar kafein
8. Analisis total padatan dan nilai pH
9. Uji organoleptik yoghurt terfortifikasi teh hijau dan teh hitam

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Teh

Teh ditimbang sebanyak 1 gram; 1,5 gram dan 2 gram, lalu di seduh sekitar 4-8 menit, dengan air suhu 85ºC sebanyak 100 mL. Kemudian diaduk dan disaring dengan menggunakan saringan teh atau set alat filtrasi lainnya hingga diperoleh ekstrak teh.

3.5.2 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan pada ekstrak teh hijau dan teh hitam. Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dari sampel teh hijau dan teh hitam. Uji fitokimia meliputi uji keberadaan senyawa flavonoid dengan penambahan serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat, uji alkaloid dengan penambahan kloroform dan pereaksi Mayer, uji penentuan senyawa betasianin dengan penambahan NaOH, uji terpenoid dan steroid dengan penambahan asam asetat glasial dan asam sulfat pekat, serta uji tanin dengan penambahan $FeCl_3$.

3.5.3 Pembuatan Yoghurt

Susu sapi murni 150 ml dipasteurisasi pada suhu 85ºC, lalu ditambahkan bakteri asam laktat (starter) diinokulasi, lalu diinkubasi 45ºC hingga diperoleh

yoghurt steril. Kemudian diinokulasi kembali pada suhu 42ºC hingga pH 4,5 dan didapatkan produk yoghurt. Simpan di ruang penyimpanan bersuhu 4ºC sebelum ditambahkan ke dalam ekstrak teh.

3.5.4 Fortifikasi Yoghurt

Ekstrak teh hijau dan teh hitam masing-masing ditambahkan pada yoghurt dengan variasi konsentrasi, yaitu 1%; 1,5% dan 2%. Campuran kemudian diaduk hingga merata dan disimpan dalam lemari es hingga siap untuk digunakan.

3.5.5 Uji Aktivitas Antioksidan Yoghurt Terfortifikasi Teh

Penentuan presentase aktivitas antioksidan (%AA) dilakukan dengan metode DPPH berdasarkan prosedur (Almas, 2017) dengan sedikit modifikasi. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH ini dilakukan melalui beberapa tahapan. Tahapan pertama yaitu pembuatan larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 0,5 mM. DPPH ditimbang sebanyak 4,9 mg kemudian dilarutkan dengan pelarut metanol hingga volume akhirnya 25 mL. Tahapan kedua yaitu pembuatan larutan sampel dan larutan kontrol. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan cara menambahkan larutan sampel, DPPH, dan metanol. Pembuatan larutan kontrol mirip dengan pembuatan larutan sampel, dengan larutan sampel diganti dengan aquades. Tahapan ketiga larutan sampel dan larutan kontrol diukur pada panjang gelombang 517 nm. Nilai persentase hambatan terhadap DPPH dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Abs kontrol}) - (\text{Abs sampel})}{(\text{Abs kontrol})} \times 100\%$$

3.5.6 Isolasi Kafein

Teh hijau dan teh hitam 1 gram; 1,5 gram dan 2 gram dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian ditambahkan 100 mL air panas kedalamnya, selanjutnya diseduh selama 4-8 menit sambil diaduk. Larutan teh panas disaring melalui corong dengan kertas saring ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 1 gram $CaCO_3$ dan larutan teh tadi dimasukkan ke dalam corong

pisah lalu diekstraksi sebanyak 4 kali, masing-masing dengan penambahan 10 mL kloroform. Lapisan bawahnya diambil, kemudian ekstrak (fase kloroform) ini diuapkan dengan rotarievaporator hingga kloroform menguap seluruhnya. Ekstrak kafein bebas pelarut dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, diencerkan dengan akuades hingga garis tanda dan dihomogenkan, kemudian ditentukan kadarnya dengan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 273 nm.

3.5.7 Uji Kadar Kafein

3.5.7.1 Larutan Standar Kafein 100mL

Kafein setelah diisolasi dari teh, dimurnikan dengan cara di sublimasi lalu ditimbang 1 gram; 1,5 gram dan 2 gram, dimasukan ke dalam gelas kimia 100 mL, dilarukan dengan aquades secukupnya. Masukkan ke dalam labu takar 100 mL dan encerkan dengan aquades hingga tanda batas dan homogenkan, besarnya absorbansi dari masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Visible dengan panjang gelombang 273 nm (Aryanu dkk, 2016).

3.5.7.2 Pembuatan deret standar 5ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm dan 25 ppm

Kafein konsentrasi 100 ppm masing-masing dipipet berturut-turut sebanyak 5 mL,10 mL, 15 mL, 20 mL dan 25 mL. Lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL diencerkan hingga tanda batas, dan homogenkan. Masing-masing deret diberi perlakuan seperti sampel.

3.5.8 Analisis Total Padatan

Penentuan total padatan dilakukan dengan metode pengeringan (gravimetri). Prinsipnya yaitu menguapkan air yang ada pada bahan pangan dengan cara dipanaskan pada suhu 105ºC. Cawan kosong dikeringkan dengan cara dipanaskan dalam oven selama ± 6 jam, didinginkan dalam desikator sekitar 15 menit, kemudian ditimbang sampai diperoleh berat cawan yang tetap. Ditimbang sampel sebanyak 5 gr. Cawan berisi sampel kemudian dikeringkan

dalam oven selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator sekitar 30 menit dan ditimbang kembali hingga diperoleh berat konstan (AOAC, 1995).

3.5.9 Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter dengan cara dinyalakan dan distabilkan terlebih dahulu selama 15-30 menit. Kemudian distandarisai dahulu dengan larutan buffer pH 4 dan pH 7. Elektroda dibilas dan dikeringkan lalu dicelupkan pada sampel hingga diperoleh angka stabil (AOAC, 1995).

3.5.10 Uji Organoleptik Yoghurt Terfortifikasi Teh Hijau dan Teh Hitam

Uji organoleptik dilakukan dengan menggunakan 20 orang panelis tidak terlatih. Yoghurt terfortifikasi ekstrak teh hijau dan teh hitam masing-masing disiapkan dengan penambahan 1%, 1,5%, dan 2%, dengan kontrol yoghurt polos (Y0) disajikan dalam wadah berkode. Panelis menilai dengan memberikan skor pada skala organoleptik 1-3 terhadap aroma, tekstur, warna, dan rasa dari yoghurt, dengan kriteria 1= sangat tidak suka, 2= cukup suka, dan 3= suka. Data hasil uji organoleptik selanjutnya diuji statistik dengan bantuan aplikasi *IBM SPSS 24*. (SNI, 2009)