

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan November 2011 sampai Mei 2012 di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Peralatan dan Bahan Penelitian

3.2.1 Peralatan yang digunakan :

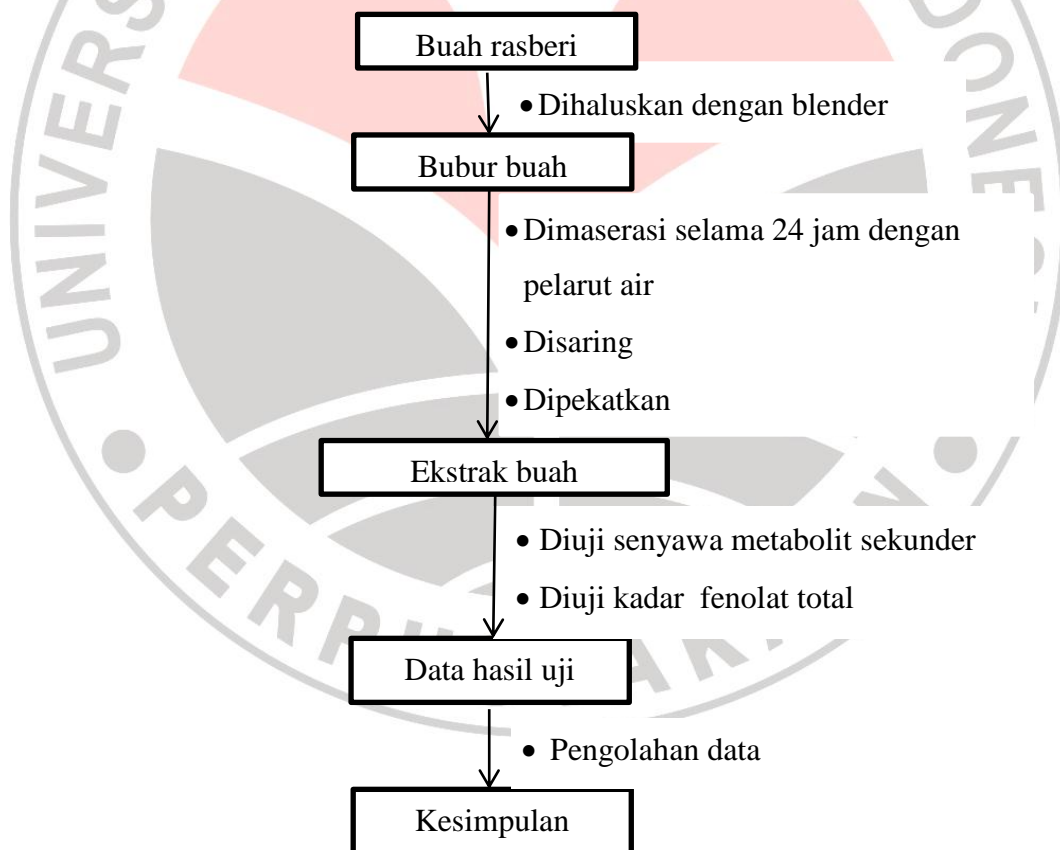
Peralatan gelas, neraca analitik *AND HR-200*, spatula, UV Vis Mini *Shimadzu 1240*, corong buchner, blender, pemanas *Daihan Scientific MSH-20D*, *waterbath Eyla SB-24*.

3.2.2 Bahan yang digunakan:

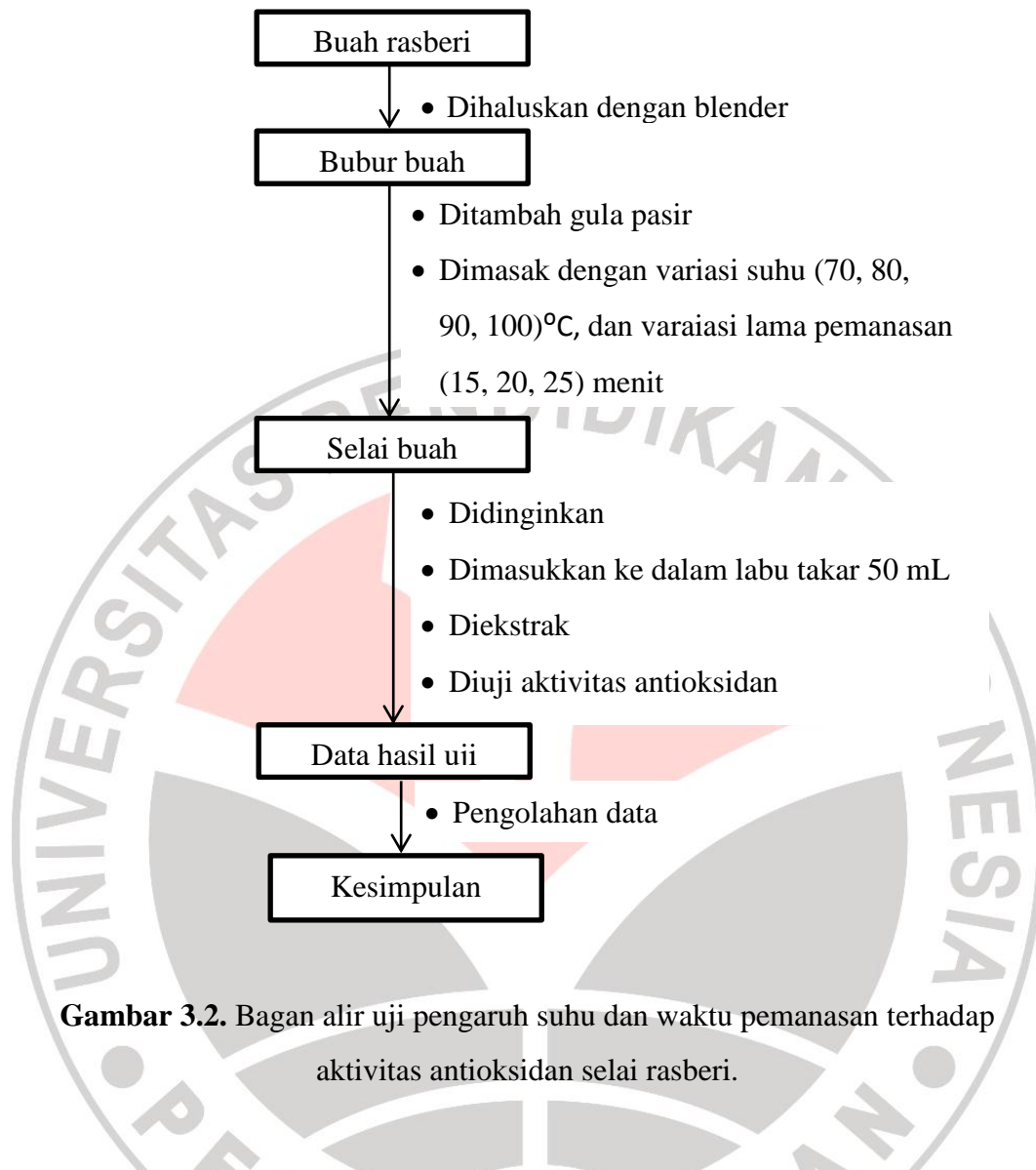
Buah rasberi dari *Vin's Berry Park* Cisarua-Kabupaten Bandung Barat dengan usia panen 3 bulan, gula pasir, aquades, aquabides, DPPH p.a (*Aldrich*), metanol, KI p.a (*Phillip harris reagent*), HgCl_2 p.a (*Merck*), serbuk Mg, HCl p.a (*Merck*), CH_3COOH glasial p.a (*Merck*), H_2SO_4 pekat p.a (*Phillip harris reagent*), FeCl_3 p.a, NaOH p.a, reagent *Folin-Ciocalteu* p.a, Na_2CO_3 p.a, asam galat p.a (*May&Beaker*), etanol 96%, kertas saring *whatman*.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap, yaitu 1) Uji pendahuluan ekstrak buah meliputi skrining fitokimia dengan metode uji warna atau endapan dan uji kadar fenolat total dengan metode *Folin Ciocalteu*,; 2) Uji pengaruh variasi suhu dan lama pemanasan terhadap aktivitas antioksidan selai rasberi dengan metode radikal DPPH. Bagan alir uji pendahuluan dan uji pengaruh suhu dan lama pemanasan terhadap aktivitas antioksidan selai rasberi terdapat pada gambar 3.1 dan 3.2.



Gambar 3.1. Bagan Alir Uji Pendahuluan Ekstrak Rasaberi



Gambar 3.2. Bagan alir uji pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap aktivitas antioksidan selai rasberi.

3.3.1 Pengumpulan Sampel dan Uji Determinasi Rasberi

Sampel buah rasberi didapatkan dari *Vin's Berry Park* berlokasi di Cisarua, Kabupaten Bandung Barat. Buah rasberi dipetik pada usia panen sekitar 3 bulan hingga diperoleh kulit buah berwarna merah. Uji determinasi sampel dilakukan di laboratorium Herbarium Sekolah Tinggi Ilmu dan Teknologi Hayati (STIH) – Institut Teknologi Bandung (ITB). Determinasi dilakukan berdasarkan pengamatan ciri fisiologis tumbuhan.

3.3.2 Pembuatan Bubur Buah Rasberi

Bubur buah dibuat dengan menghaluskan sampel. Ditimbang 20 gram buah rasberi segar dan dihaluskan dengan blender sekitar lima menit.

3.3.3 Pembuatan Selai Rasberi

Prosedur pembuatan selai rasberi didasarkan pada panduan *Membuat Aneka Selai* (Suryani, 2007). Perbandingan jumlah buah dan gula adalah 3:4, suhu yang dianjurkan untuk proses pemasakan berkisar 80°-90°C dengan waktu pemasakan selama 10-30 menit. Lama waktu pemasakan selai tergantung pada jenis buah yang digunakan hingga diperoleh kekentalan selai yang diinginkan.

Buah rasberi ditimbang sebanyak 20 gram, dihaluskan menjadi bubur buah, ditambahkan gula pasir sebanyak 15 gram, dan dimasak di atas pemanas. Agar diperoleh metode pemasakan yang tepat yang dapat mempertahankan aktivitas antioksidan, maka dibuat variasi suhu pemasakan di bawah dan di atas suhu yang dianjurkan suryani (2007), yaitu (70, 80, 90, 100)°C. Lama waktu pemasakan diatur pada selama (15, 20, 25) menit, karena pada waktu pemasakan selama 10 menit selai kurang kental sedangkan pada waktu pemasakan selama 30 menit selai menjadi keras. Selama proses pemasakan, bubur buah diaduk secara perlahan dan merata. Selai yang diperoleh didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL.

3.3.4 Ekstraksi Buah Rasberi

Ekstraksi sampel dilakukan dengan metode maserasi. Bubur buah ditimbang sebanyak 20 gram, dipindahkan ke dalam gelas kimia, dan ditambah pelarut air sebanyak 60 mL (perbandingan jumlah sampel dan pelarut adalah 1:3). Sampel dimaserasi selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan, disaring dengan corong buchner, dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak yang diperoleh ditimbang dan disimpan untuk uji pendahuluan.

3.3.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak rasberi dengan metode uji warna atau endapan. Golongan senyawa yang diperiksa meliputi alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, tanin, kuinon, dan antosianin.

Cara kerja penapisan fitokimia dilakukan sebagai berikut:

1. Identifikasi Alkaloid

Tiap 1 mL ekstrak dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.

Pembuatan pereaksi Mayer:

Larutan KI dibuat dengan melarutkan satu gram KI ke dalam 20 mL aquades, kemudian ditambahkan 0,271 gram HgCl_2 sampai larut.

2. Identifikasi Flavonoid

Tiap 2 mL ekstrak dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 2 mL HCl 2N. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3. Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Tiap 1 mL ekstrak dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan timbulnya warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

4. Identifikasi Tanin

Tiap 1 mL ekstrak dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin.

5. Identifikasi Kuinon

Tiap 1 mL ekstrak dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa kuinon.

6. Identifikasi Antosianin

Tiap 1 mL ekstrak dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa antosianin.

3.3.6 Uji Kadar Fenolat Total Rasberi

Kadar fenolat total ditentukan dengan metode *Folin ciocalteu* dengan asam galat sebagai pembanding.

1. Pembuatan Larutan Na_2CO_3 20% (Waterhouse A, 1999)

Ditimbang 5 gram Na_2CO_3 , dan ditambahkan 20 mL aquabides. Dididihkan, kemudian didiamkan selama 24 jam, disaring, dan diencerkan dengan aquabides sampai volume larutan 25 mL.

2. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat (Waterhouse A, 1999)

Ditimbang 0,25 gram asam galat, ditambahkan 5 mL etanol 96%, dan ditambah aquabides sampai volume 50 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan asam galat 5 mg/mL.

3. Pembuatan Kurva kalibrasi Asam Galat

Larutan induk asam galat dipipet 6, 8, 10, 12, 14 mL, dan diencerkan dengan aquabides sampai volume 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan 300, 400, 500, 600, 700 mg/L asam galat. Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet sebanyak 1,2 mL, ditambah 15,8 mL aquabides, 1 mL reagen *Folin ciocalteu*, dan dikocok sampai homogen. Didiamkan selama 8 menit, ditambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 , dikocok sampai homogen. Didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapan larutan pada panjang gelombang maksimum $\lambda = 751,5$ nm, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorbansi.

4. Pengukuran Kadar Fenolat Total Sampel

Ditimbang 0,3 gram ekstrak, dilarutkan dengan metanol:air (1:1) sampai volume larutan 10 mL. Dipipet 0,2 mL larutan ekstrak, ditambahkan 15,8 mL aquabides, 1 mL reagen *Folin ciocalteu*, dan dikocok hingga homogen. Larutan didiamkan selama 8 menit kemudian ditambah 3 mL Na_2CO_3 20%. Larutan didiamkan kembali selama 2 jam pada suhu kamar sehingga didapatkan larutan berwarna biru. Diukur serapan larutan dengan spektrometri vis pada panjang gelombang maksimum $\lambda = 751,5$ nm.

3.3.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Radikal DPPH

1. Pembuatan Kurva Kalibrasi DPPH

Sebanyak 5 mg DPPH dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL (konsentrasi larutan 40 ppm). Larutan DPPH diencerkan dalam labu ukur 10 mL untuk mendapatkan larutan deret standar DPPH dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Selanjutnya tiap larutan diukur serapannya dengan spektrometri Uv-vis pada panjang gelombang maksimum $\lambda=515$ nm.

2. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan pelarut aquades hingga tanda batas. Pembuatan larutan DPPH sebagai pereaksi sampel dibuat dengan melarutkan 1 mg DPPH dengan metanol ke dalam labu ukur 50 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan DPPH 20 ppm.

Dipipet 2 mL larutan DPPH dan dicampur dengan 4 mL larutan sampel dalam botol vial. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, larutan dimasukkan ke dalam kuvet spektrometri vis dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum $\lambda=515$ nm. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan secara triplo.

Aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs DPPH}_{\text{kontrol}} - \text{Abs DPPH}_{\text{sisa}}}{\text{Abs DPPH}_{\text{kontrol}}}$$

Keterangan:

Abs DPPH kontrol = absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel.

Abs sisa DPPH = absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel.

