

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) yang berasal dari Sumatera Utara. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Agustus 2018 di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati, Laboratorium Kimia Instrumen, Laboratorium Kimia Dasar Analisis Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), dan Balai Besar Industri Agro (BBIA), Bogor. Proses determinasi tanaman *Zanthoxylum acanthopodium* DC. dilakukan di Herbarium Bogoriense CSC Cibinong, LIPI Cibinong.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahap uji kadar air, kadar abu total, kadar abu tak larut asam, cemaran logam dan mikroba adalah alat-alat gelas, oven, neraca analitik, cawan krus bertutup, pembakar bunsen, furnace, *hotplate*, desikator, gelas-gelas steril, *stomacher*, mikropipet, cawan petri, inkubator, penghitung koloni, *loopful*, dan spektrofotometer AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi adalah alat-alat gelas, penguap putar bervakum (*vacum rotatory evaporator*), corong *buchner*, dan *freeze dryer*. Peralatan yang digunakan pada tahap analisis metabolit sekunder adalah alat-alat gelas, *hotplate*, vortex, set peralatan KLT, dan spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) Shimadzu 8400 untuk analisis gugus fungsi. Peralatan yang digunakan pada tahap uji aktivitas antioksidan adalah alat-alat gelas, mikropipet, dan spektrofotometer UV-Vis.

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah andaliman yang telah dipreparasi menjadi serbuk simplisia. Bahan kimia yang digunakan pada tahap uji kadar air, kadar abu total, kadar abu tak larut asam, cemaran logam, mikroba, dan ekstraksi adalah metanol teknis yang telah didestilasi; aquades; kertas saring tak berabu (Whatman No. 40); larutan BPW; PCA miring; media LST; agar DRBC; kaldu EC; agar L-EMB; kaldu RVS; kaldu MKTTn; agar XLD; agar PAB; agar BP. Bahan kimia yang digunakan pada tahap analisis metabolit sekunder adalah aquades; n-heksan; etil asetat; pereaksi Mayer; pereaksi Wagner; kloroform (CHCl_3); amoniak (NH_3); asam sulfat (H_2SO_4); etanol; serbuk Mg; asam klorida (HCl); asam asetat (CH_3COOH); dan FeCl_3 . Bahan kimia yang digunakan pada tahap uji aktivitas antioksidan adalah DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl); metanol p.a.; dan asam askorbat.

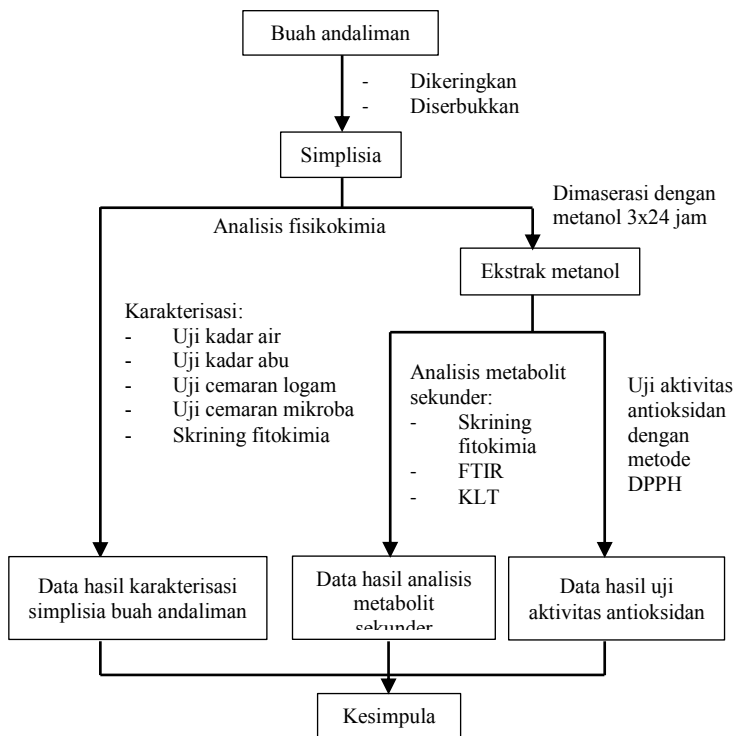
Dwi Susanti, 2018

ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA

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

3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini secara umum disajikan dalam bagan alir pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Analisis Fisikokimia Simplisia Buah Andaliman

Analisis fisikokimia yang dilakukan terhadap simplisia buah andaliman meliputi beberapa parameter uji, seperti penentuan kadar air, abu total, abu tak larut dalam asam, cemaran logam, cemaran mikroba, dan analisis metabolit sekunder.

3.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Dwi Susanti, 2018

ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA UTARA

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

Penentuan kadar air dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman, dengan metode oven. Simplisia buah andaliman ditimbang 1-2 g pada botol timbang bertutup yang sudah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 105°C selama 3 jam, lalu didinginkan dalam desikator. Setelah itu ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot yang tetap.

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

W = bobot cuplikan sebelum dikeringkan (g)
W₁ = kehilangan bobot setelah dikeringkan (g)

3.3.1.2 Penentuan Kadar Abu Total

Penentuan kadar abu total dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Simplisia buah andaliman ditimbang sebanyak 2-3 g dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diarsir diatas nyala pembakar, lalu diabukan dalam furnace pada suhu 550°C sampai pengabuan sempurna. Setelah itu didinginkan dalam desikator, ditimbang dan diulangi hingga diperoleh bobot tetap.

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

W = bobot contoh sebelum diabukan (g)
W₁ = bobot contoh + cawan sesudah diabukan (g)
W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.3.1.3 Penentuan Kadar Abu Tak Larut Dalam Asam

Penentuan kadar abu tak larut dalam asam dilakukan mengacu pada prosedur SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Abu bekas penentuan kadar abu total dilarutkan dalam 25 ml HCl 10%. Kemudian dididihkan selama 5 menit, lalu disaring dengan kertas saring tak berabu dan dicuci dengan air suling sampai bebas klorida. Setelah itu letakkan kertas saring dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobotnya dan dikeringkan dalam oven sampai menjadi abu. Dinginkan

Dwi Susanti, 2018

ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA

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

cawan dalam desikator hingga suhu kamar, lalu timbang dan diulangi hingga diperoleh bobot tetap.

$$\% \text{Kadar Abu Tak Larut dalam Asam} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

W = bobot cuplikan (g)

W₁ = bobot cawan + abu (g)

W₂ = bobot cawan kosong (g)

3.3.1.4 Penentuan Cemaran Logam Berat

Penentuan cemaran logam yang dilakukan terhadap simplisia meliputi penentuan cemaran Timbal (Pb), Kadmium (Cd), Arsen (As) dan Raksa (Hg). Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) mengacu pada prosedur AOAC 999.11-2005 *Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*. Arsen (As) mengacu pada prosedur SNI.01-4866-1998 tentang Cara Uji Cemaran Arsen dalam Makanan. Raksa (Hg) mengacu pada prosedur SNI 19-2896-1998 tentang Cara Uji Cemaran Logam dalam Makanan.

3.3.1.4.1 Penentuan Cemaran Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd)

Pada prinsipnya, penentuan cemaran timbal dan kadmium dilakukan dengan mengeringkan dan mengabukan sampel pada suhu 450°C dengan peningkatan suhu secara bertahap ($\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$). Ditambahkan HCl 6M (1+1) dan larutan diuapkan hingga kering. Residu dilarutkan dalam HNO₃ 0,1M dan analit ditentukan dengan prosedur menggunakan *flame* dan grafit furnace.

Penentuan cemaran timbal dilakukan dengan cara ditimbang 10-20 g sampel dalam cawan. Dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C. Kemudian dilanjutkan sesuai dengan tipe tungku yang digunakan. Pada tahap pengabuan, cawan ditempatkan dalam furnace pada suhu awal $\leq 100^\circ\text{C}$, lalu suhu dinaikkan secara bertahap $\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$ hingga mencapai 450°C dan dibiarkan selama 8 jam atau semalaman. Dibuat larutan standar Pb dengan melarutkan 1,000 g Pb dalam 7 ml HNO₃ 65% dalam labu takar 1 L dan ditandabatkan dengan aquades. Dibuat larutan standar Cd dengan melarutkan 1,000 g Cd dalam 14 ml aquades + 7 ml HNO₃ 65% dalam labu takar 1 L dan ditandabatkan dengan aquades.

Dwi Susanti, 2018

ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA

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

Pra-pengabuan dilakukan pada sampel dengan menempatkan cawan berisi sampel dengan penutup kaca pada piring keramik dan dibiarkan udara bersih keluar melalui tabung kaca menyapu sampel. Simpan lampu IR pada penutup. Sampel pra-pengabuan meningkat suhunya secara perlahan dengan lampu IR secara bertahap meningkatkan suhu pada *hot plate* hingga maksimum. Suhu akhir pada piring keramik berada pada sekitar 300°C. Waktu yang diperlukan untuk pra-pengabuan bervariasi tergantung sampel. Simpan cawan dalam furnace pada suhu 200-250°C dan secara perlahan suhunya ditingkatkan hingga 450°C dengan laju $\leq 50^\circ\text{C}/\text{jam}$. Biarkan cawan dalam furnace selama 8 jam atau semalaman. Lalu, keluarkan cawan dari furnace dan biarkan dingin. Basahi abu dengan 1-3 ml air dan pekatkan menggunakan *hot plate*. Simpan kembali cawan dalam furnace pada suhu $\leq 200^\circ\text{C}$ dan naikan suhu ($50\text{-}100^\circ\text{C}/\text{jam}$) hingga 450°C. Dilanjutkan dengan pengabuan pada suhu 450°C selama 1-2 jam. Ulangi prosedur hingga sampel benar-benar menjadi abu (abu berwarna putih/abu atau hingga sedikit berwarna). Jumlah pengulangan bervariasi bergantung pada jenis sampel. Tambahkan 5 ml HCl 6M, untuk memastikan bahwa semua abu bersentuhan dengan asam. Pekatkan asam menggunakan *hot plate*. Larutkan residu dalam 10,0-30,0 ml HNO₃ 0,1M. Aduk dengan hati-hati hingga semua abu bersentuhan dengan asam. Tutup dengan kaca arloji dan biarkan selama 1-2 jam. Kemudian aduk larutan dalam wadah dengan batang pengaduk, kemudian pindahkan ke dalam botol plastik. Perlakukan blanko dengan cara yang sama seperti sampel, menggunakan dua blanko dengan masing-masing *batch* analitis. Digunakan grafit furnace AAS untuk penentuan Pb dan Cd. Pada Pb digunakan panjang gelombang 283,3 nm dan untuk Cd digunakan panjang gelombang 228,8 nm.

3.3.1.4.2 Penentuan Cemaran Arsen (As)

Penentuan cemaran arsen dilakukan dengan cara pengabuan kering. Ditimbang 10 g sampel dalam cawan, lalu ditambahkan 2,5 g Mg(NO₃)₂·2H₂O dan 25 ml HNO₃ p.a. diaduk dengan sempurna dan diuapkan diatas penangas air hingga kering. Kemudian diarangkan dalam furnace pada suhu 500°C selama 2 jam. Dibasahkan dengan HNO₃ p.a. Diuapkan lagi dan diabukan lagi selama 1 jam pada suhu 500°C. Setelah itu, dilarutkan dengan larutan HCl 1:3 dan tandabatkan dengan aquades hingga 50 ml.

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan metode AAS. Disiapkan larutan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan alat. Dipipet 25 ml larutan destruksi yang telah dibuat dan ditambahkan 2 ml HCl 8M dan 0,1 ml KI 20%, kemudian dibiarkan selama minimal 2 menit. Diukur absorbansi larutan sampel, larutan deret standar, dan larutan blanko dengan spektroskopi serapan atom.

3.3.1.4.3 Penentuan Cemaran Raksa (Hg)

Pada prinsipnya, penentuan cemaran raksa dilakukan dengan mereaksikan senyawa raksa dengan larutan pereduksi (NaBH_4 atau SnCl_2) dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorbansi menggunakan AAS tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

Penentuan cemaran raksa dilakukan dengan cara pengabuan basah. Ditimbang 5 g sampel ke dalam labu destruksi, ditambahkan 25 ml H_2SO_4 18N, 20 ml HNO_3 7N, 1 ml larutan natrium molibdat 2%, dan 5-6 butir batu didih. Dihubungkan labu destruksi dengan pendingin dan dipanaskan selama 1 jam, kemudian didinginkan selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 ml $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin. Dihentikan aliran air pada pendingin dan dipanaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih, lalu dilanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian didinginkan. Setelah itu, ditambahkan 10 ml air melalui pendingin sambil labu digoyang-goyang dan dididihkan lagi selama 10 menit. Kemudian pemanasan dihentikan dan pendingin dicuci dengan 15 ml aquades sebanyak 3 kali, didinginkan sampai suhu kamar.

Larutan destruksi sampel dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas. Selain itu, dibuat blanko dengan cara mencampurkan seluruh pereaksi yang ditambahkan pada sampel dan larutan deret standar raksa. Setelah itu, ditambahkan 20 ml larutan pereduksi ke dalam larutan deret standar, larutan destruksi dan larutan blanko. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan AAS tanpa nyala pada $\lambda = 253,7$ nm.

3.3.1.5 Penentuan Cemaran Mikroba

Penentuan cemaran mikroba yang dilakukan terhadap simplisia meliputi penentuan angka lempeng total, kapang/ khamir, *Escherchia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*. Prosedur uji yang dilakukan mengacu kepada ISO 4833:2003,

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

ISO 7218:2012, ISO 6579:2002, BAM 2001 Chapter 4, BAM 2001 Chapter 12, BAM 2001 Chapter 18, dan prosedur konvensional teknik cawan tuang dengan perbenihan *Pseudomonas Agar Base* (PAB) oleh BBIA, Bogor.

3.3.1.5.1 Penentuan Angka Lempeng Total (ALT)

Penentuan angka lempeng total dilakukan mengacu pada prosedur ISO 4833:2003 (E) dan ISO 7218:2012 yang berbayar, sehingga tidak dapat dilampirkan.

3.3.1.5.2 Penentuan Cemar Kapang/ Khamir

Penentuan cemaran kapang/ khamir dilakukan dengan cara ditimbang 25-50 g sampel. Kemudian ditambahkan 225-450 ml BPW 0,1%, dihomogenkan dalam *stomacher* selama 2 menit untuk membuat pengenceran 10^{-1} . Lalu dibuat pengenceran 1:10 (1+9) dalam BPW 0,1% hingga pengenceran 10^{-6} . Setelah itu, digunakan metode cawan agar sebar atau cawan agar tuang untuk pengujian kapang/ khamir.

Secara aseptis, dipipet 0,1 ml setiap pengenceran ke dalam cawan agar DRBC yang sudah dipadatkan dan disebar dengan inokulum dengan batang gelas bengkok yang steril. Dilakukan rangkap tiga dan ≤ 20 menit. Kemudian diinkubasi cawan dalam kondisi gelap pada suhu 25°C selama 5 hari, lalu dilakukan penghitungan cawan. Inkubasi kembali selama 48 jam, jika tidak ada pertumbuhan. Dihitung cawan yang berisi 10-150 koloni.

3.3.1.5.3 Penentuan Cemaran *Escherchia coli*

Penentuan cemaran *E. coli* dilakukan dengan uji APM (jumlah yang paling mungkin), yang berupa tes dugaan, konfirmasi tes, dan kelengkapan tes.

Ditimbang 50 g sampel ke dalam tabung blender steril berkecepatan tinggi. Kemudian ditambahkan 450 ml larutan BPW dan campuran selama 2 menit untuk membuat pengenceran 10^{-1} . Lalu dibuat pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} . Setelah itu, dikocok semua suspensi dengan vortex selama 7 detik. Inokulasi 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung berisi media LST. Dilakukan selama < 15 menit, dari waktu sampel dicampur hingga setiap pengenceran diinkubasi dalam media. Diinkubasi pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ selama 24 ± 2 jam dan amati produksi gas. Inkubasi kembali tabung yang tidak bergas selama 24 jam,

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

amati dan catat lagi reaksi selama 48 ± 3 jam. Kemudian dilakukan konfirmasi tes untuk semua tabung bergas.

Diinokulasi setiap suspensi dari tabung berisi media LST bergas ke dalam tabung kaldu EC. Inkubasi tabung EC selama 24 ± 2 jam pada suhu $44,5^\circ\text{C}$ dan amati produksi gas. Inkubasi kembali tabung yang tidak bergas selama 48 ± 2 jam dan amati.

Digoyangkan setiap tabung EC bergas. Goreskan *loopful* pada cawan agar L-EMB dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu $35^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Amati cawan yang dicurigai sebagai *E. coli*, yaitu gelap berpusat dan datar, dengan atau tanpa kilau logam, berdiameter 2-3 mm. Kemudian, dipindahkan 5 koloni yang dicurigai *E. coli* dari setiap cawan L-EMB ke PCA miring dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu $35^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Lakukan pengujian lebih lanjut dengan uji IMViC (Uji produksi indole, uji VP, uji MR, uji *citrate*).

3.3.1.5.4 Penentuan Cemaran *Salmonella spp.*

Penentuan cemaran *Salmonella spp.* dilakukan dengan cara ditimbang 25 g sampel. Kemudian ditambahkan 225 ml BPW 0,1% untuk membuat pengenceran 10^{-1} , homogenkan dengan *stomacher* selama 1-2 menit. Dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya dengan memipet 0,1 ml dalam 10 ml kaldu RVS dan 1 ml dalam 10 ml kaldu MKTTn. Inkubasi suspensi awal pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 18 ± 2 jam. Pindahkan 0,1 ml kultur hasil inkubasi ke dalam tabung yang berisi 10 ml kaldu RVS dan 1 ml ke dalam tabung yang berisi 10 ml kaldu MKTTn. Inkubasi inokulat kaldu RVS pada suhu $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 24 ± 3 jam dan inokulat kaldu MKTTn pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 24 ± 3 jam. Diinokulasi kultur dalam kaldu RVS menggunakan loop ke cawan yang berisi agar XLD sebagai media selektif pertama, kemudian dibuat media selektif kedua. Diinokulasi kultur dalam kaldu MKTTn dengan cara seperti pada agar XLD. Inkubasi dengan posisi cawan terbalik pada suhu 37°C selama 24 ± 3 jam dan amati koloni *Salmonella* dengan menandai dibagian bawan cawan. *Salmonella* yang tumbuh pada media XLD memiliki pusat hitam dan zona warna kemerahan transparan terang karena perubahan warna indikator. Kemudian dilakukan uji biokimia terhadap koloni yang dicurigai *Salmonella*.

3.3.1.5.5 Penentuan Cemaran *Pseudomonas aeruginosa*

Dwi Susanti, 2018

ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA

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

Penentuan cemaran *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan secara konvensional menggunakan teknik cawan tuang dengan perbenihan *Pseudomonas Agar Base* (PAB) oleh BBIA, Bogor. Sampel ditimbang sebanyak 25 g. Kemudian ditambahkan 225 ml larutan BPW 0,1%, dihomogenkan dalam *stomacher* selama 2 menit untuk membuat pengenceran 10^{-1} . Lalu dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya sesuai kebutuhan. Digunakan metode cawan tuang dengan memipet 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam cawan. Dilakukan rangkap tiga untuk setiap pengenceran. Kemudian ditambahkan 20-25 ml media agar PAB yang sudah didinginkan hingga mencapai suhu $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 1-2 menit dalam setiap cawan berisi suspensi. Lakukan pemutaran cawan ke depan, ke belakang, ke kiri, dan ke kanan agar tercampur. Dibiarkan hingga memadat. Diinkubasi dalam posisi tidak terbalik pada suhu 25°C selama 5 hari. Dibuat kontrol tanpa contoh dengan mencampurkan larutan pengencer dengan media agar PAB. Dilakukan ≤ 20 menit, dari penyiapan pengenceran pertama sampai menuang agar. Diinkubasi selama 72 jam. Lalu amati koloni, dengan ciri diameter 0,8-2,2 mm, penampakan rata, terdapat bintik coklat sampai hijau hitam.

3.3.1.5.6 Penentuan Cemaran *Staphylococcus aureus*

Penentuan cemaran *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara ditimbang 25 g sampel. Kemudian ditambahkan 225 ml BPW 0,1% untuk membuat pengenceran 10^{-1} , homogenkan dengan *stomacher* selama 1-2 menit. Dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya.

Secara aseptis, pindahkan 1 ml sampel suspensi dari setiap pengenceran ke dalam 3 cawan agar Baird-Parker (BP) (masing-masing 0,3 ml, 0,3 ml dan 0,4 ml). Disebarkan di atas permukaan agar menggunakan batang kaca steril. Didiamkan selama 10 menit supaya terserap dalam agar. Inkubasi selama 45-48 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ dengan posisi cawan terbalik. Hitung cawan yang berisi 20-200 koloni dengan penampilan khas *S. aureus*, yaitu berbentuk lingkaran, halus, cembung, lembab, berdiameter 2-3 mm, abu-abu sampai hitam pekat, sering kali berwarna terang (*off-white*) pada bagian pinggir, dikelilingi oleh zona buram dan sering kali dengan zona bening dibagian luar.

3.3.2 Analisis Metabolit Sekunder

Analisis metabolit sekunder dilakukan terhadap simplisia buah andaliman dan analisis lanjutan dilakukan pada ekstrak metanol buah

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

andaliman. Proses ekstraksi dilakukan pada sampel buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) yang sudah dikeringkan dan diserbukkan sebanyak 100 g, diekstraksi dengan pelarut metanol sebanyak 1,5 L. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol selama 3x24 jam pada suhu ruang dan pelarut diganti setiap 24 jam. Ekstrak hasil maserasi disaring menggunakan corong *buchner* dan filtratnya dipekatkan menggunakan *vacuum rotatory evaporator* dan dilanjutkan dengan *freeze dry* untuk menguapkan pelarutnya.

3.3.2.1 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan pada simplisia dan ekstrak metanol buah andaliman dengan uji sederhana yang dilihat dari perubahan warna yang terjadi menggunakan berbagai macam pereaksi untuk mengetahui golongan-golongan metabolit sekunder yang terkandung didalamnya.

3.3.2.1.1 Alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan metode Harborne (1987). Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan dengan 2 ml kloroform dan 2 ml amoniak kemudian dipanaskan, dikocok dan disaring. Ditambahkan 5 tetes asam sulfat 2N pada filtrat, kocok dan diamkan hingga terbentuk dua lapisan. Diambil bagian atas filtrat dan diuji dengan pereaksi Meyer, Wagner, dan Dragendorf. Terbentuknya endapan putih, coklat, dan jingga, masing-masing menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan pereaksi Meyer yaitu 1 gram KI dilarutkan dalam 20 ml aquades, kemudian ditambahkan 0,271 g HgCl₂.

3.3.2.1.2 Flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan metode Harborne (1987). Sebanyak 1 g ekstrak dicampur dengan 5 ml etanol, dikocok, dipanaskan, dan dikocok lagi kemudian disaring. Ditambahkan 0,2 g serbuk Mg dan 3 tetes HCl pada filtrat. Terbentuknya warna merah pada lapisan etanol menunjukkan adanya flavonoid.

3.3.2.1.3 Steroid/ Triterpenoid

Identifikasi steroid/triterpenoid dilakukan dengan metode Harborne (1987). Sebanyak 1 g ekstrak ditambah 2 ml asam sulfat pekat dan 2 ml asam asetat anhidrat. Perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau menunjukkan adanya steroid. Sebanyak 1 g ekstrak dicampur dengan 2

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

ml kloroform dan 3 ml asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah kecoklatan pada antar permukaan menunjukkan adanya triterpenoid.

3.3.2.1.4 Saponin

Identifikasi saponin dilakukan dengan metode Sangi dkk. (2008). Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan aquades hingga terendam, dididihkan selama 2-3 menit dan didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Terbentuknya buih yang stabil menunjukkan adanya saponin.

3.3.2.1.5 Tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan metode Edeoga dkk. (2005). Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquades, dididihkan, lalu disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin.

3.3.2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis komponen senyawa pada ekstrak metanol buah andaliman dilakukan dengan KLT menggunakan eluen n-heksan dan etil asetat. Ekstrak dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan pada plat KLT berukuran 5 cm x 2 cm menggunakan pipa kapiler yang sudah diberi tanda batas bawah dan batas atas. Lalu dimasukkan dalam *chamber* tertutup yang sudah diberi campuran eluen n-heksan:etil asetat dengan berbagai perbandingan 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, dan 10:0, dengan posisi berdiri, dimana sebelumnya *chamber* telah dijenuhkan dengan cara memasukkan kertas saring hingga kertas saring terelusi seluruhnya oleh eluen. Setelah itu divisualisasi dengan sinar UV 254 nm untuk diamati berapa banyak noda yang terpisah pada plat. Lalu dihitung nilai R_f nya untuk masing-masing noda.

3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol buah andaliman dilakukan menggunakan metode DPPH dengan asam askorbat untuk verifikasi metode, sesuai dengan metode yang digunakan oleh Brand-William dkk. (1995); Djamil dan Anelia (2009) dengan modifikasi.

Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan asam askorbat dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (1, 3, 5, dan 9) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 40 ppm dalam metanol. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang

Dwi Susanti, 2018

**ANALISIS FISIKOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH
ANDALIMAN (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) ASAL SUMATERA
UTARA**

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

selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian ekstrak metanol buah andaliman diperlakukan sama seperti asam askorbat, dengan cara membuat larutan ekstrak dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu (2, 4, 6, dan 10) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 40 ppm dalam metanol. Kontrol yang digunakan yaitu 2 ml DPPH dan 4 ml metanol.

Pengukuran absorbansi pada penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$Q = \left(\frac{A_o - A_c}{A_o} \right) \times 100\%$$

Keterangan: Q = Persen inhibisi aktivitas radikal bebas
 A_o = Absorbansi kontrol (pelarut + DPPH)
 A_c = Absorbansi sampel (sampel + DPPH)

Kemudian untuk menentukan nilai IC₅₀ sampel dilakukan dengan cara memplot persen inhibisi aktivitas radikal bebas terhadap konsentrasi sampel sehingga diperoleh suatu persamaan regresi sebagai berikut:

$$Y = mx + c$$

Keterangan: Y = Persen inhibisi
 m = Slope
 x = Intercept (IC₅₀)
 c = Konsentrasi sampel

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan memasukkan nilai Y = 50 serta nilai m dan c yang diperoleh dari persamaan garis, sehingga nilai x sebagai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$IC_{50} = \frac{50 - c}{m}$$