BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2020 di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

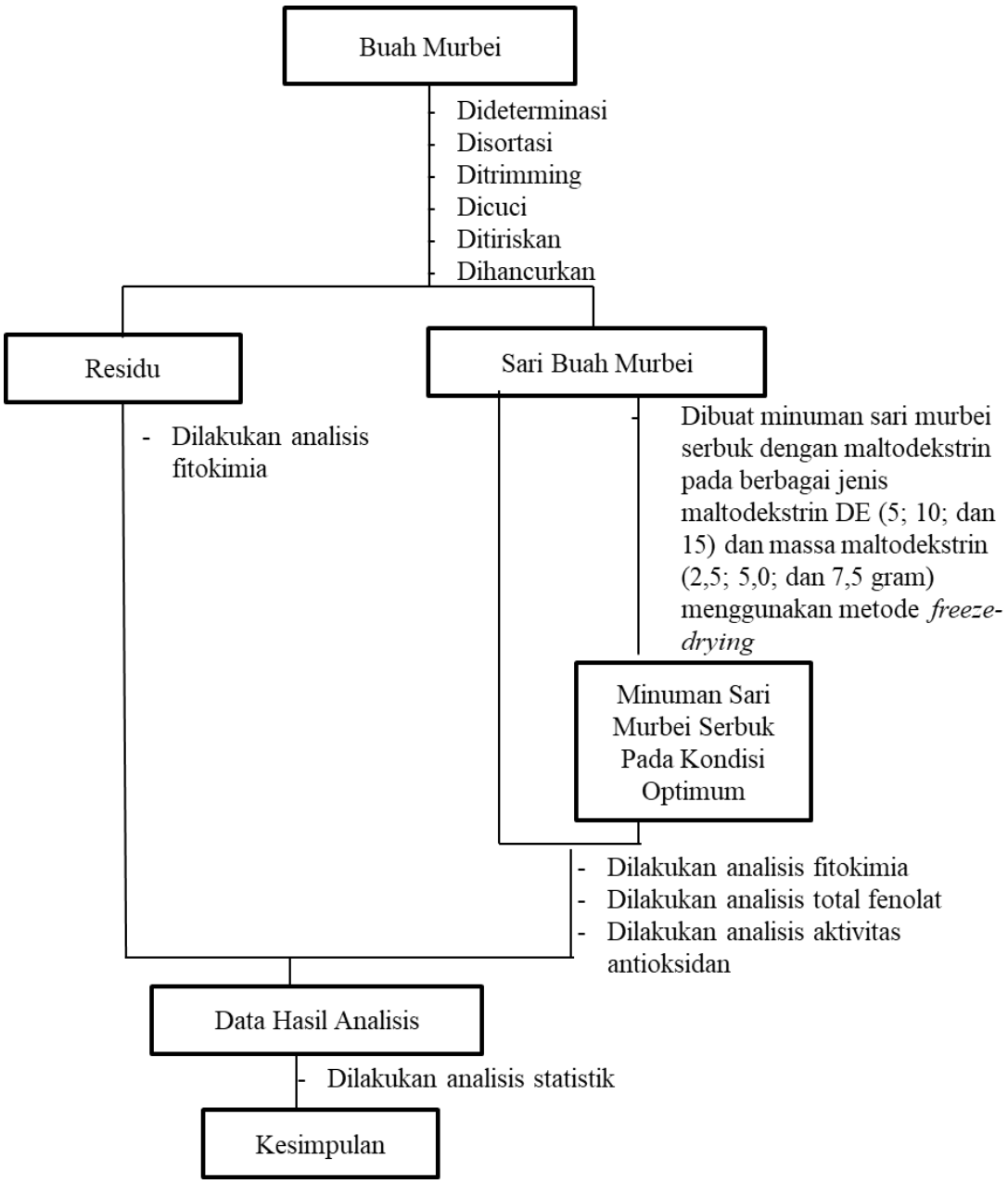
Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, *slow juicer*, neraca analitik, *spectronic* 20^+, *hotplate*, *freeze dryer*, dan *magnetic stirrer*.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah buah murbei yang diambil dari Kebun Murbei Alamendah Ciwidey. Bahan lainnya yang digunakan adalah akuades, *alumunium foil*, maltodekstrin DE-5, maltodekstrin DE-10, maltodekstrin DE-15, H_2SO_4 pekat, CH_3COOH glasial, kloroform, serbuk Mg, HCl, $FeCl_3$, etanol 96%, metanol,Na_2CO_3, reagen Follin ciocalteu, asam galat, asam askorbat dan DPPH.

3.3 Bagan Alir Penelitian

Bagan alir penelitian yang dilaksanakan ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Determinasi Tumbuhan

Determinasi buah murbei dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk mengetahui klasifikasi dari tumbuhan yang digunakan dalam penelitian.

3.4.2 Pembuatan Sari Buah Murbei **(Modifikasi Ristifari 2018)**

Berikut merupakan tahapan pada pembuatan sari buah murbei

a. Persiapan bahan

Bahan yang digunakan adalah buah murbei yang sudah masak yaitu yang berwarna kehitaman.

b. Sortasi

Buah murbei kemudian dilakukan proses sortasi yang bertujuan untuk memisahkan buah afkir dari buah yang akan digunakan untuk analisis.

c. *Trimming*

Buah yang lolos sortasi selanjutnya dilakukan proses *trimming* untuk memisahkan bagian buah yang tidak diinginkan seperti tangkai buah.

d. Pencucian

Buah murbei kemudian dicuci untuk membersihkan kotoran-kotoran yang menempel pada buah.

e. Penirisan

Buah murbei yang telah dicuci kemudian dilakukan proses penirisan yang bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa air dari proses pencucian agar kadar air pada buah diusahakan tidak bertambah.

f. Penghancuran

Buah murbei kemudian dilakukan proses penghancuran dengan menggunakan *slow juicer* tanpa penambahan air. *Slow juicer* digunakan untuk mempermudah memisahkan antara ampas dan sari buah murbei.

3.4.3 Pembuatan Minuman Sari Murbei Serbuk

Sari buah murbei yang diperoleh dilakukan optimasi dengan penambahan jenis maltodekstrin yaitu maltodekstrin DE-5, DE-10 dan DE-15

sebanyak 5gram dan optimasi massa maltodekstrin 2,5; 5 dan 7,5gram. Pada penambahan maltodekstrin dilakukan sedikit demi sedikit sambil dihomogenkan selama 10 menit dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada kondisi wadah sampel tertutup *alumunium foil* dan dibekukan semalam menggunakan *freezer*. Suspensi yang dihasilkan kemudian dilakukan pengeringan menggunakan *freeze-dryer* selama 24 jam pada suhu ruang dan suhu alat $0^{o}C$ dan tekanan dibawah 7 Pascal.

3.4.4 Analisis Fitokimia **(Modifikasi Sangi, 2008 dan Tiwari dkk, 2011)**

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel. Uji Fitokimia yang dilakukan meliputi:

1. Alkaloid

   Sebanyak 1 ml atau 0,5 gram sampel ditambahkan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan adanya senyawa alkaloid.

2. Flavonoid

   Sebanyak 1 ml atau 0,5 gram sampel ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 10 ml HCl. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

3. Terpenoid dan Steroid

   Sebanyak 1 ml atau 0,5 gram sampel ditambahkan 1 ml CH_3COOH glasial dan 1 ml H_2SO_4 pekat. Terbentuknya warna merah mengindikasikan adanya senyawa terpenoid sedangkan terbentuknya warna biru atau ungu mengindikasikan adanya steroid.

4. Saponin

   Sebanyak 1 ml atau 0,5 gram sampel ditambahkan air sampai sampel terendam, kemudian dididihkan selama 2-3 menit, didinginkan, dan dikocok. Terbentuknya busa yang stabil mengindikasikan adanya senyawa saponin.

5. Fenolik

Sebanyak 1 ml atau 0,5 gram sampel ditambahkan 3 tetes larutan $FeCl_3$. Terbentuknya warna hitam kebiruan/ hijau mengindikasikan adanya senyawa fenolik.

3.4.5 Analisis Kuantitatif Total Fenolat (Modifikasi Slinkard & Singleton, 1977 dan Waterhouse, 1999)

Berikut merupakan tahapan dalam analisis kuantitatif total fenol:

1. Pembuatan Larutan Na_2CO_3 20%

   Ditimbang 10 gram Na_2CO_3, ditambah 40 ml akuades, dididihkan, kemudian didiamkan selama 24 jam, disaring, dan diencerkan dengan akuades hingga volume larutan 50 ml.

2. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

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

3. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

   Larutan induk asam galat dipipet 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; dan 1,4 ml, masing-masing diencerkan dengan akuades sampai volume 10 ml sehingga didapat konsentrasi larutan 300, 400, 500, 600, dan 700 mg/L asam galat. Dari masing-masing larutan asam galat dipipet sebanyak 0,2 ml, ditambahkan 15,8 ml akuades, 1 ml reagen *Follin ciocalteu* dan dikocok sampai homogen. Didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapan larutan pada panjang gelombang maksimum λ = 765 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorbansi.

4. Pengukuan Kadar Total Fenolat Sampel

   Ditimbang 0,1 gram sampel, dilarutkan dengan metanol sampai volume larutan 10 ml, dipipet 0,2 ml larutan sampel, ditambah 15,8 ml aquades, 1 ml reagen *Follin ciocalteu*, dan dikocok hingga homogen. Larutan didiamkan selama 3 menit kemudian ditambah 3 ml Na_2CO_3 20%. Didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar hingga didapat larutan

berwarna biru. Diukur serapan larutan dengan spektrofotometri visibel pada panjang gelombang maksimum λ = 765 nm.

3.4.6 Analisis Aktivitas Antioksidan

3.4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,15 mM

Serbuk DPPH (BM 394,32) 2,95mg dilarutkan dengan metanol pro analisa kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, volumenya dicukupkan dengan metanol pro analisa sampai tanda batas.

3.4.6.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,15 mM sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan larutan metanol pro analisa 2 mL dan di vortex hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet sebanyak 3 ml dan diukur padapanjang gelombang 400-600 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

3.4.6.3 Penentuan Aktivitas Antioksidan Sampel

Larutan sampel dibuat dengan cara menambahkan sampel dengan 2 mL DPPH 0,15 mM dan 2 mL metanol pro analisa. Larutan kontrol dibuat dengan cara menambahkan 2 mL akuades, 2 mL DPPH 0,15mM dan 2 mL metanol pro analisa. Larutan blanko yang digunakan adalah metanol pro analisa. Absorbansi dibaca dengan spektrometer pada panjang gelombang maksimum. Aktivitas penangkap radikal bebas dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Aktivitas\ antioksidan = \frac{A\ kontrol - A\ sampel}{A\ kontrol}\ x\ 100\%$$

3.4.6.4 Pembuatan Larutan Pembanding

Asam askorbat digunakan sebagai larutan pembanding. Pertama, larutan asam askorbat 100 ppm dibuat dengan melarutkan 2,5 mg asam askorbat dalam metanol pro analisa hingga volume 25 ml. Larutan induk asam askorbat kemudian diencerkan dan dibuat lima seri konsentrasi, yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Kemudian

diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang yang optimal dengan cara sebanyak2 mL larutan uji pembanding dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan larutan DPPH 0,15 mM sebanyak 2 mL dan di vortex hingga homogen, di inkubasi selama 30 menit..

3.4.6.5 Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\%Inhibisi\ Radikal\ DPPH = \frac{A\ kontrol - A\ sampel}{A\ kontrol}\ x\ 100\%$$

3.4.6.6 Penentuan Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel dinyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50}.

3.4.6.7 Penentuan Nilai AAI (*Antioxidant Acitivity Index*)

Nilai AAI ditentukan dengan cara konsentrasi DPPH yang digunakan dalam uji (ppm) dibagi dengan nilai IC_{50} yang diperoleh (ppm). Nilai AAI <0,5 menandakan aktivitas antioksidan lemah, nilai AAI 0.5-1 menandakan aktivitas antioksidan sedang, nilai AAI 1-2 menandakan aktivitas antioksidan kuat, dan AAI>2 menandakan aktivitas antioksidan sangat kuat (Faustino dkk, 2010).

3.4.6.8 Analisis Data Statistik

Hasil penelitian pengaruh jenis maltodekstrin, massa maltodekstrin serta pengaruh waktu penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan minuman sari murbei serbuk dianalisis secara kuantitatif menggunakan Microsoft Excel 2010. Data diuji menggunakan uji ANOVA dengan $\alpha < 0,05$ dipilih sebagai tingkat minimal signifikansi dan apabila data yang diuji berbeda atau berpengaruh secara signifikan akan dilanjutkan dengan uji BNT.

1. Pengujian Hipotesis dan Pengambilan Keputusan
   a. Hipotesis

      H_o : perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan

      H_i : perlakuan berpengaruh secara signifikan

   b. Pengambilan Keputusan

      Dasar pengambilan keputusan dilakukan dengan membandingkan hasil statistik

      1) Bila $F_{hitung} < F_{tabel}$, H_o diterima, maka perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan
      2) Bila $F_{hitung} > F_{tabel}$, H_o ditolak, maka perlakuan berpengaruh secara siginifikan
      3) Bila p value < nilai signifikan level (α), H_o ditolak, maka perlakuan berpengaruh secara signifikan
      4) Bila p value > nilai signifikan level (α), H_o diterima, maka perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan