

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian dilakukan dalam kurun waktu 7 bulan (April 2018-Oktober 2018) di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Universitas Pendidikan Indonesia.

#### **3.2 Alat**

Alat-alat yang digunakan selama penelitian yaitu gelas kimia, tabung reaksi, batang pengaduk, labu dasar bulat, *rotatory evaporator*, spektrofotometer UV-Vis, mikropipet, labu takar, pH meter, *magnetic stirrer*, botol kaca cokelat.

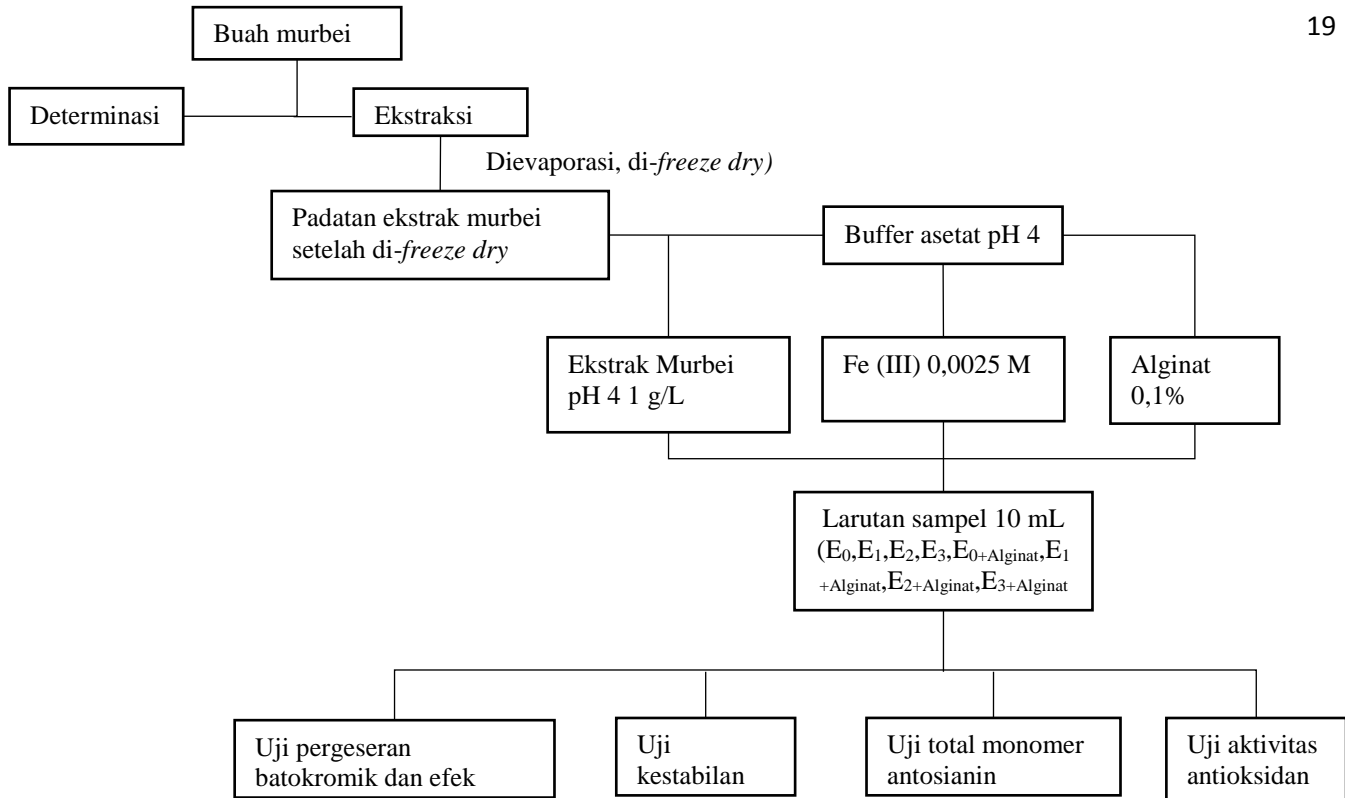
#### **3.3 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan yaitu buah murbei, aquades, etanol, sodium alginat,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , natrium asetat, asam asetat glasial, HCl, KCl, metanol, DPPH, aluminium foil

#### **3.4 Cara Kerja**

##### **3.4.1 Bagan Alir Penelitian**

Bagan alir penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1:



### 3.4.2 Determinasi Tumbuhan

Tumbuhan murbei yang dideterminasi di Laboratorium Struktur Tumbuhan, Departemen Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia untuk mengetahui klasifikasi dari tanaman yang akan digunakan dalam penelitian.

### 3.4.3 Preparasi Sampel

Ekstraksi buah murbei yang dilakukan menggunakan metode Bae & Suh (2007) dengan modifikasi. Buah murbei yang sudah matang diekstraksi menggunakan 100 mL etanol 70% selama satu malam dalam suhu dingin. Ekstrak disaring menggunakan kertas Whatman No. 40 kemudian dibilas dengan 50 mL etanol 70%. Residu yang tersaring diekstraksi dengan kondisi yang sama saat ekstraksi pertama. Kedua filtrat yang diperoleh dicampur lalu dievaporasi dalam keadaan vakum pada suhu 40 °C. Ekstrak pekat buah murbei di-*freeze dry* untuk diperoleh sampel kering.

### 3.4.4 Preparasi Larutan

#### a. Pembuatan Buffer Asetat pH 4

Natrium asetat 0,2 M (1,64 gram dalam 100 mL aquades) dicampurkan dengan Asam asetat glasial 0,2 M (2,86 mL dalam 250 mL aquades) kemudian nilai pH disesuaikan menggunakan pH meter.

#### b. Pembuatan Ekstrak Murbei 1 g/L

Ekstrak murbei kering ditimbang 0,05 gram kemudian dilarutkan dengan larutan buffer asetat pH 4 hingga volume totalnya 50 mL.

#### c. Pembuatan Fe (III) 0,0025 M

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ditimbang sebesar 0,0337 gram kemudian dilarutkan dengan larutan buffer asetat pH 4 hingga volume totalnya 50 mL.

#### d. Pembuatan Alginat 0,1%

Sodium alginat ditimbang 0,05 gram kemudian dilarutkan dengan larutan buffer asetat pH 4 hingga volume totalnya 50 mL.

#### e. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak buah murbei 1g/L 3 mL ditambahkan sejumlah Fe (III) sesuai variasi yang ditentukan. Variasi jumlah Fe (III) yang ditambahkan sesuai pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1  
Rancangan Penelitian

Sampel	Ekstrak 1 g/L (mL)	Fe (III) 0,0025 M (mL)
E <sub>0</sub>	3	-
E <sub>1</sub>	3	0,9
E <sub>2</sub>	3	1,2
E <sub>3</sub>	3	1,5

Variasi tersebut untuk mengetahui pengaruh penambahan Fe (III) terhadap hasil kopigmentasi antosianin dari ekstrak buah murbei. Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh kopigmentasi campuran Fe (III) dan alginat, masing-masing variasi ditambahkan dengan alginat 0,1% sebanyak 1 mL yang kemudian dinyatakan sebagai E<sub>1+Alginat</sub>, E<sub>2+Alginat</sub>, dan E<sub>3+Alginat</sub>. Ekstrak yang hanya ditambahkan alginat (E<sub>0+Alginat</sub>) diuji pula untuk mengetahui pengaruh penambahan alginat terhadap kopigmentasi antosianin dari buah murbei. Larutan sampel yang sudah dibuat ditambahkan dengan larutan buffer asetat pH 4 hingga volume totalnya 10 mL.

### 3.4.5 Uji Pergeseran Batokromik dan Efek Hiperkromik

Larutan-larutan sampel di-*scanning* pada panjang gelombang visibel (450-700 nm) menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui absorbansi maksimal dan panjang gelombangnya. Perhitungan pergeseran batokromik dan efek hiperkromik dirujuk dari Li et al, (2016) dengan rumus:

$$\text{Pergeseran batokromik} = \text{panjang gelombang sampel} \\ - \text{panjang gelombang kontrol}$$

$$\text{Efek hiperkromik} = (A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) / A_{\text{kontrol}}$$

Keterangan : A= Absorbansi, kontrol yang digunakan adalah E<sub>0</sub>.

### 3.4.6 Uji Stabilitas Termal

Uji stabilitas termal menggunakan metode Tachibana et al (2014). Larutan sampel dipanaskan dalam keadaan gelap pada suhu 60 °C dalam selang waktu 0, 5, 10, 20, 40, dan 80 menit. Sampel yang sudah dipanaskan diuji absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis

pada panjang gelombang maksimal sampel. Kontrol yang digunakan adalah ekstrak tanpa penambahan Fe (III) dan alginat.

### 3.4.7 Uji Total Monomer Antosianin

Uji total monomer antosianin menggunakan metode perbedaan pH yang dirujuk dari Wrolstad (1993). Larutan buffer pH 1 dibuat menggunakan 0,2 M KCl dan 0,2 M HCl kemudian larutan buffer pH 4,5 dibuat menggunakan 1 M natrium asetat dan 1 N HCl. Larutan-larutan sampel diambil 1 mL kemudian diencerkan masing-masing dengan buffer pH 1 dan buffer pH 4,5 hingga volume totalnya 10 mL. Larutan sampel yang sudah diencerkan dengan buffer diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang masing-masing 510 nm dan 700 nm. Total monomer antosianin (TMA) diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{TMA (mg/L)} = \frac{(A_{510 \text{ nm}}^{\text{pH } 1} - A_{700 \text{ nm}}^{\text{pH } 1}) - (A_{510 \text{ nm}}^{\text{pH } 4,5} - A_{700 \text{ nm}}^{\text{pH } 4,5})}{\epsilon L} \times 1000 \times \text{Mr} \times \text{FP}$$

Keterangan: A= absorbansi;  $\epsilon$ = absorptivitas molar (sianidin-3-glukosida 26.900 L/mol.cm); L = diameter kuvet; Mr= massa molar antosianin (sianidin-3-glukosida 449,2 gram/mol); FP = faktor pengenceran)

### 3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Metode yang digunakan yaitu metode DPPH berdasarkan prosedur dari (Almas, 2017) dan (Jin, Ha, & Choi, 2015) 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 sebesar 4,9 mg kemudian dilarutkan dengan pelarut metanol hingga volume akhirnya 25 mL. Tahapan kedua 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 yaitu larutan sampel dan larutan control diukur pada panjang gelombang 517 nm. Persen aktivitas antioksidan ditentukan dengan cara:

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