

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2015 - Januari 2016 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian, dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

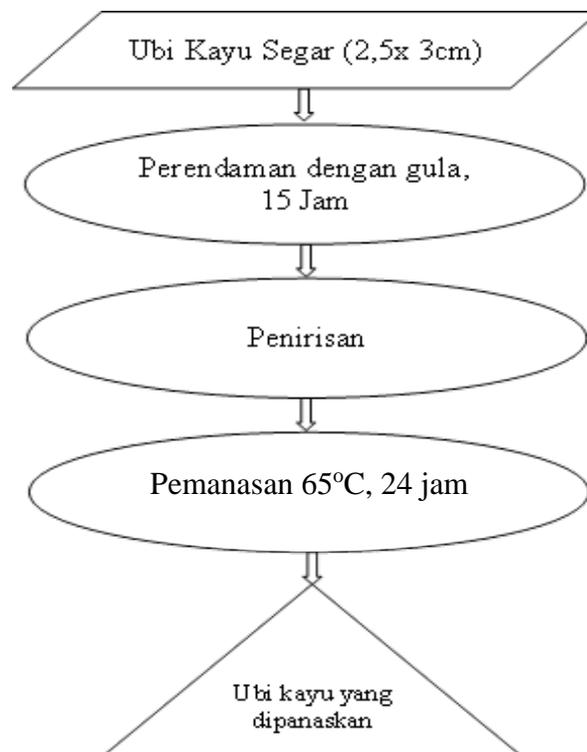
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ubi kayu segar yang diperoleh di Pasar Jati Kelurahan Banyumanik-Semarang, D-sorbosa dan D-glukosa (Kagawa University Research Center, Japan), akuades, *1,1Diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) (Tokyo, chemical Industry Co., LTD., Japan), dan larutan *Folin-Ciocalteu* (Merck, Germany), asam galat (Sigma Aldrich, USA). Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi oven, mortar, gelas ukur, tabung reaksi, timbangan analitik, sentrifugal, seperangkat alat SDS-PAGE spektrofotometer dan *Digitalcolormeter* pada *Macintsosh*.

3.2. Metode

3.2.1. Prosedur Perlakuan Penelitian

Gula yang digunakan adalah D-glukosa dan D-sorbosa, masing-masing ditimbang sebanyak 1 g dan 2 g, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume

menjadi 100 ml dan diaduk hingga larut sehingga menghasilkan konsentrasi 1% dan 2% (b/v). Kemudian ubi kayu yang telah dikupas kulit luarnya dipotong dengan ukuran 2,5x3 cm dan masing-masing direndam pada larutan D-sorbosa dan D-glukosa selama ± 15 jam dengan berbagai konsentrasi, yaitu 0%, 1% dan 2%. Selanjutnya ubi kayu dipanaskan menggunakan *hot display* pada suhu 65°C selama 24 jam. Perlakuan penambahan gula D-glukosa dan D-sorbosa pada ubi kayu dapat dilihat pada Ilustrasi 3.



Ilustrasi 3. Perlakuan penambahan gula D-lukosa dan D-sorbosa

3.2.2. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan pola tersarang dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga

kali. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tertera pada Tabel 1. Kombinasi perlakuan adalah $(TC) = 3 \times 2 = 6$, ulangan didapatkan dari rumus $(t - 1) (r - 1) \geq 12$, sehingga diperoleh hasil sebesar 3. Model matematika rancangan percobaan yang digunakan adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j(i) + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ijk} : Pengamatan faktor A taraf ke-i, Faktor B taraf ke-j dan ulangan ke-k

μ : Rataan umum

A_i : Pengaruh faktor A pada tara

$B_j(i)$: Pengaruh faktor B pada taraf ke-j pada A_i

ϵ_{ij} : Pengaruh galat pada Faktor A taraf ke-i , Faktor B taraf ke-j dan Ulangan ke-k

Tabel 1. *Layout* perlakuan penelitian

Konsentrasi	D-glukosa	D-sorbosa
0%	G1P1	G2P1
1%	G1P2	G2P2
2%	G1P3	G2P3

Keterangan :

G1P1: Perendaman gula D-glukosa 0%

G1P2: Perendaman gula D-glukosa 1%

G1P3: Perendaman gula D-glukosa 2%

G2P1: Perendaman gula D-sorbosa 0%

G2P2: Perendaman gula D-sorbosa 1%

G2P3: Perendaman gula D-sorbosa 2%

3.2.3. Hipotesis Empiris

H_0 = Tidak ada perlakuan yang memberikan pengaruh nyata terhadap nilai *scavenging activity*, nilai total fenol dan intensitas warna pada ubi kayu yang dipanaskan.

H_1 = Paling tidak ada satu perlakuan yang memberikan pengaruh nyata nilai *scavenging activity*, nilai total fenol dan intensitas warna pada ubi kayu yang dipanaskan.

$H_0 : \mu = \mu_0$

$H_1 : \mu \neq \mu_0$

P value $\geq 0,05$ = H_0 diterima dan H_1 ditolak

P value $< 0,05$ = H_0 ditolak dan H_1 diterima

3.2.4. Analisis Scavenging Activity

Analisis *scavenging activity* pada penelitian ini menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl). Sampel ubi kayu dihaluskan dan ditimbang sebanyak 0,1 g ke dalam 10 ml akuades kemudian di vortex dan di sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 6000 rpm untuk diambil supernatan sebanyak 0,5 ml setelah itu ditambahkan 2 ml larutan 0,125 mM DPPH metanol. Larutan kemudian dicampur dan dibiarkan pada suhu ruang dengan keadaan gelap selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer dengan kuvet 1 ml pada panjang gelombang

517 nm. Kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama dengan akuades sebagai pengganti sampel (Sun *et al.*, 2006^a).

Presentase *radical scavenging activity* dihitung dengan rumus yaitu absorbansi blangko dikurangi dengan absorbansi sampel lalu dibagi dengan absorbansi blangko kemudian dikalikan 100%

3.2.5. Analisis Nilai Total Fenol

Analisis total fenol diukur menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Preparasi sampel yaitu menambahkan 1 mL methanol kedalam 0.02 g sampel yang diletakkan ke dalam tube berukuran 15 mL. Kemudian dishaker dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Untuk mengukur nilai total fenol dilakukan dengan menambahkan 300 μ L sampel kedalam tube, tambahkan 1,5 ml folin yang telah diencerkan 10 kali, setelah itu ditambahkan larutan Na_2CO_3 (7,5% b/v) sebanyak 1,2 ml. Kemudian larutan tersebut didiamkan dalam kondisi gelap selama 30 menit sebelum mengukur absorbansi dengan panjang gelombang 765 nm. Pengujian nilai total fenol menggunakan asam galat sebagai kurva standar pada konsentrasi 0,002%, 0,004%, 0,006%, 0,008% dan 0,01% sehingga diperoleh nilai $y = 10,311x - 2,1602$ ($R^2 = 0,9914$) (Ironi *et al.*, 2012).

3.2.6. Analisis Intensitas Warna

Intensitas warna diukur dengan metode CIELAB menggunakan *digitalcolormeter* pada *Macintosh*. Sampel ubi kayu diletakkan dibawah kamera pada kondisi gelap dan diberi sumber cahaya yang terkontrol, kemudian menggunakan

digitalcolormeter untuk mengetahui nilai L^* , a^* dan b^* dengan cara kursor diletakkan pada tiga titik yang sejajar. CIELAB terdiri dari tiga komponen yaitu, komponen L^* (luminance atau tingkat kecerahan) dengan nilai 0 untuk warna gelap dan 100 untuk warna cerah, komponen warna a^* (hijau sampai merah) dengan nilai -120 untuk warna kehijauan dan 120 untuk warna kemerahan, serta komponen warna b^* (biru sampai kuning) dengan nilai -120 untuk warna kebiruan dan 120 untuk warna kekuningan (Amien *et al.*, 2010).

3.2.7. Analisis Profil Protein

Profil protein dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poli Acrilamide Gel Electrophoresis*) yang dilakukan dengan menggunakan metode standar (Hames, 1998). Sampel ubi kayu dihaluskan dan ditimbang sebanyak 0,2 g kemudian dilarutkan kedalam *Pb sample buffer* pH 7 10 mM, setelah itu sampel di vortex dan di sentrifugasi selama 20menit dengan kecepatan 6000 rpm. Selanjutnya diambil supernatan sebanyak 500 μ L lalu diangin-anginkan selama 1 minggu di dalam *refrigerator*. Selanjutnya diencerkan kembali menggunakan akuades sebanyak 50 μ L. 15 μ L sampel protein didenaturasi dengan 15 μ L *sample buffer* (Tris, SDS, HCl 1M, gliserol, *Bromophenol Blue* 0,02%) dan 3 μ L *mercaptoetanol* (BioChemica, Inggris) setelah itu dididihkan selama 2 menit. Kemudian sampel diinjeksikan pada sumuran gel sebanyak 15 μ L pada setiap sumur, kemudian elektroforesis dilakukan pada tegangan 60 volt 14 A selama 6 jam. Gel dilepas dan diwarnai dengan *Coomasie Brilliant Blue* 5% (b/v) selama satu jam. Setelah itu dicuci menggunakan *staining* asam

asetat (Merck, Germany) dan alkohol (MKR Chemicals, Indonesia) selama semalam untuk mendapatkan garis *bend* pada gel.

3.2.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan aplikasi SPSS dengan uji *Analysis of Varians*. Apabila hasil signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.