

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

Penelitian dilaksanakan selama 4 bulan yaitu 20 Agustus - 25 Desember 2016 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan dan UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

#### **1.1. Materi**

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tangkai daun pepaya, etanol 70% merk Onemed, asam sulfat 90% yang terdapat pada Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian, reagen Molisch dari Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Sains dan Matematika, dan *miconazole* produksi PT Kimia Farma Jakarta sebagai sumber dari alkaloid dengan kemurnian 99,9%.

Alat yang digunakan diantaranya oven *dryer* merk Getra dengan range suhu 30°C-130°C, mortar, aluminium foil, gelas beker merk Duran 100 ml, *centrifuge tube* 15 ml (Biologix, Changzou), pipet tetes, pH meter (Hanna, USA), dan *Digital Color Meter* TES-135.

#### **1.2. Rancangan Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan metode pengeringan tangkai daun pepaya dalam oven *dryer* menggunakan variasi suhu yaitu 45°C, 50°C, 55°C, 60°C dan

65°C dan variasi waktu 15 menit, 30 menit dan 45 menit untuk masing-masing suhu.

### **1.3. Prosedur Penelitian**

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri pengeringan tangkai daun pepaya dalam oven *dryer*, ekstraksi tangkai daun pepaya yang sudah dikeringkan, penentuan kadar glikosida dengan reagen Molisch, pembuatan kurva standar, pengukuran nilai pH dan nilai kecerahan warna dari ekstrak tangkai daun pepaya.

#### **1.3.1. Pengeringan Tangkai Daun Pepaya**

Mula-mula tangkai daun pepaya segar dibersihkan dari getahnya dan dicuci dengan air steril, kemudian dipotong dengan panjang sekitar 10 cm. Sebelum proses pengeringan, setiap potongan tangkai daun pepaya ditutup dengan aluminium foil. Proses pengeringan yang diterapkan menggunakan oven *dryer* dengan variasi suhu dari 45 sampai 65°C dan waktu pengeringan dari 15 sampai 45 menit. Metode ini diadopsi dari penelitian sebelumnya oleh Rivai *et al.* (2010).

#### **1.3.2. Ekstraksi Tangkai Daun Pepaya**

Proses ekstraksi bertujuan untuk memisahkan zat organik dari suatu campuran dengan penambahan pelarut tertentu. Sebanyak 7,29 g tangkai daun pepaya yang sudah dikeringkan, dihaluskan dengan mortar. Tangkai daun pepaya yang sudah halus, direndam dalam gelas beker 100 ml dengan ditambahkan 5 ml

etanol 70% selama 30 menit (Katja dan Suryanto, 2009). Hasil rendaman disaring menggunakan kain saring, kemudian diperoleh 2 ml larutan ekstrak tangkai daun pepaya dan ditempatkan ke dalam *centrifuge tube* untuk dilanjutkan pengujian kadar glikosida.

### **1.3.3. Penentuan Kadar Glikosida**

Penentuan kadar glikosida pada ekstrak tangkai daun pepaya ditentukan dengan reagen Molisch dan asam sulfat menggunakan prosedur penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Nugraha *et al.* (2015). Ekstrak sampel sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam *centrifuge tube*, kemudian ditambahkan 5 tetes reagen Molisch dan 10 tetes asam sulfat 90% melalui dinding *centrifuge tube* supaya tidak terjadi letupan. Cincin ungu yang terbentuk pada bagian atas larutan yang menunjukkan adanya glikosida (Ditjen POM, 1995). Volume cincin ungu yang terbentuk dalam *centrifuge tube* diukur dan hasil pengukuran volume tersebut dikonversikan dalam satuan ppm dengan bantuan kurva standar *Miconazole* vs volume cincin ungu.

#### **1.3.3.1. Pembuatan Kurva Standar**

Pembuatan kurva standar dilakukan berdasarkan penelitian Andayani *et al.* (2008). Kurva standar dibuat sebagai acuan dalam penentuan konsentrasi pada sampel yang digunakan. Pembuatan kurva standar menggunakan standar dari *miconazole* yang merupakan turunan imidazole termasuk golongan alkaloid dengan tingkat kemurnian 99,9%. Proses pembuatan kurva standar dimulai dari

*miconaloz*e 1 g dilarutkan ke dalam etanol 70% sampai volume 100 ml (yang sebanding dengan 20.000 ppm). Dilarutkan kembali sampai konsentrasi 18.000 ppm, 15.000 ppm, 12.000 ppm, 10.000 ppm, 5.000 ppm, 2.500 ppm, dan 1.000 ppm. Larutan diaduk sampai terlarut sempurna. Larutan sebanyak 2 ml dimasukkan dalam *centrifuge tube*, kemudian ditambahkan 5 tetes reagen Molisch dan 10 tetes asam sulfat 90%. Apabila terbentuk cincin ungu pada bagian atas larutan berarti menunjukkan adanya glikosida. Cincin ungu yang terbentuk dalam *centrifuge tube* diukur volumenya dalam satuan mililiter dan dibuat kurva standar antara volume cincin ungu (dalam satuan mililiter) dan konsentrasi alkaloid (dalam satuan ppm). Kurva standar volume cincin ungu vs *miconazole* dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### **1.3.4. Pengukuran Nilai pH**

Pengukuran nilai pH dilakukan dengan menggunakan pH meter merk Hanna. Alat pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan buffer pH 4 dan pH 7. Sebelum pengukuran, elektroda atau sensor pH meter dicuci dengan air suling lalu dikeringkan dengan tisu. Elektroda atau sensor pH meter yang sudah bersih dicelupkan ke dalam gelas beker yang berisi sampel ekstrak tangkai daun pepaya sebanyak 3 ml sampai menunjukkan pH posisi konstan (Lukman *et al.*, 2012). Hasil pengukuran pH akan terbaca pada layar pH meter dengan jumlah angka yaitu satu angka dibelakang koma.

### 1.3.5. Pengukuran Nilai Kecerahan Warna

Nilai kecerahan warna ekstrak tangkai daun pepaya dapat diukur dengan *Digital Color Meter* TES-135 (Fathinatullabibah *et al.*, 2014). Pengukuran dilakukan dengan cara meletakkan sampel di bawah kamera *digital color meter* TES-135 yang telah terhubung dengan komputer. Kursor diarahkan pada sampel yang diuji, maka akan muncul hasil pengukuran nilai L\*, a\*, b\* pada layar komputer. Data yang diambil yaitu nilai kecerahan (*lightness*).

## 1.4. Analisis Data Penelitian

Data hasil penelitian kadar glikosida, nilai pH dan nilai kecerahan warna ekstrak tangkai daun pepaya terhadap waktu dan suhu pengeringan dianalisis dengan analisis regresi linier dalam bentuk grafik. Antara kadar glikosida dengan nilai pH dan kecerahan warna ekstrak tangkai daun pepaya dianalisis korelasi untuk mengetahui hubungan masing-masing parameter. Apabila nilai r mendekati angka 1 maka terdapat korelasi linier positif yang kuat antara kadar glikosida dengan nilai pH dan kecerahan warna, sebaliknya jika nilai r mendekati angka 0 maka korelasi linier yang terjadi sangat lemah atau tidak ada sama sekali. Untuk memperkuat signifikan atau tidaknya korelasi antar parameter dianalisis menggunakan analisis signifikansi dengan aplikasi *GraphPad Prism* Version 6.0 yang apabila nilai  $p < 0,0001$  yaitu korelasi dengan signifikan yang tinggi, dan  $p < 0,05$  yaitu korelasi yang signifikan.