

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu bulan 20 Agustus-25 Desember 2016 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro.

#### **3.1. Materi**

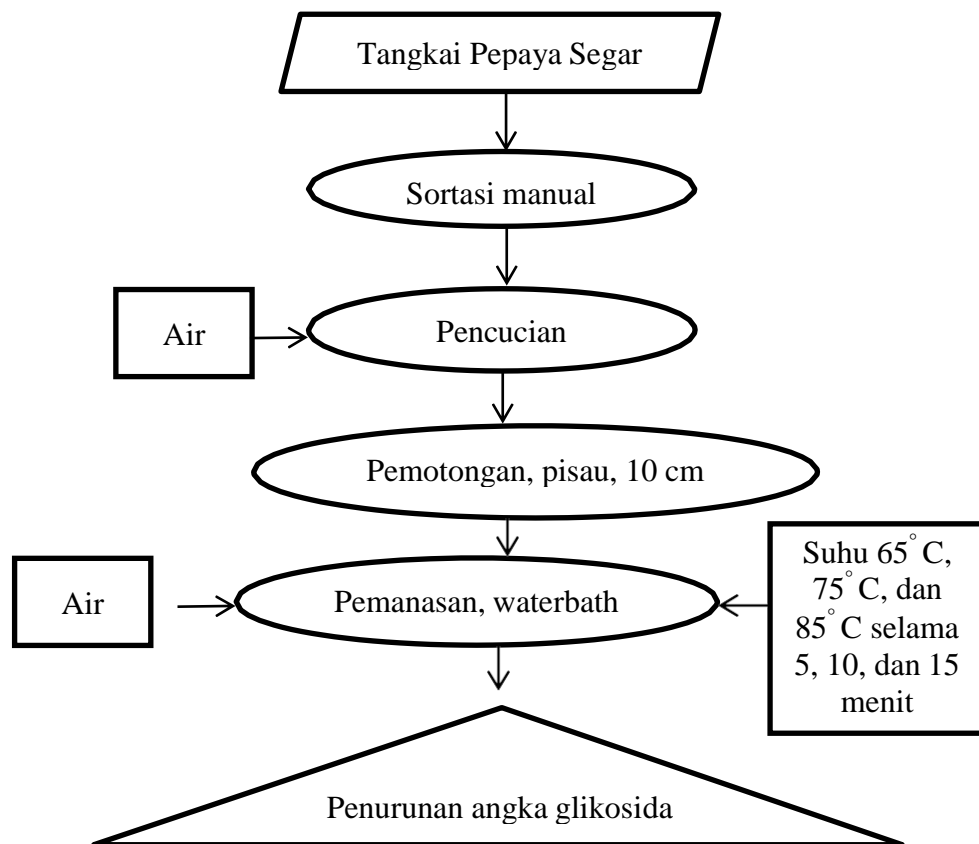
Bahan yang digunakan untuk penelitian meliputi tangkai daun pepaya, air, etanol 70% merk Onemed, asam sulfat 90% yang terdapat pada Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Miconazole produksi PT. Kimia Farma sebagai sumber dari alkaloid (kemurnian alkaloid adalah 99,9%) dan pereaksi Molisch yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Sains dan Matematika. Alat yang digunakan yaitu *waterbath* dengan kapasitas 4 L dan *range* suhu antara 0-100° C, gelas beker merk Duran dengan kapasitas 100 ml, *centrifuge tube* merk Biologic dengan kapasitas 15 ml, pipet tetes, pH meter merk Hanna, *digital color meter* TES-135, dan mortar.

#### **3.2. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menerapkan perlakuan pemanasan dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda. Suhu yang diterapkan pada penelitian ini adalah 50° C, 55° C, 60° C, 65° C, 70° C, 75° C, 80° C, dan 85° C. Waktu yang diterapkan adalah 5 menit, 10 menit, dan 15 menit setiap suhunya.

### 3.3. Metode

Tangkai daun pepaya segar dibersihkan dari getah dan dicuci dengan air kemudian dipotong dengan panjang 10 cm dengan berat sekitar 7,2 g. Tangkai daun yang sudah bersih dimasukkan ke dalam plastik bening. Plastik yang sudah berisi tangkai daun pepaya dimasukkan ke dalam air yang telah dipanaskan hingga mencapai suhu 50-85°C selama 5-15 menit (Madalena *et al.*, 2007). Setelah melalui perlakuan, tangkai daun pepaya dimaserasi sampai halus dengan mortar. Tangkai daun pepaya halus direndam dalam etanol 70% sebanyak 5 ml dalam gelas beker selama 30 menit. Hasil rendaman disaring dengan kain saring dan diambil ekstraknya untuk dimasukkan dalam *centrifuge tube* 15 ml.



**Ilustrasi 5.** Diagram Alir Pemanasan Tangkai Daun Pepaya

Metode penelitian ditampilkan pada diagram alir (Ilustrasi 5) dan dilakukan sesuai dengan prosedur peneliti sebelumnya (Rengga dan Handayani, 2010).

### **3.3.1. Deteksi Glikosida dengan Uji Molisch**

Ekstrak sampel sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam *centrifuge tube*, lalu ditambahkan 5 tetes Molisch dan 10 tetes asam sulfat 90% melalui dinding tabung agar tidak terjadi letupan, terbentuknya cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya gula, dengan demikian menunjukkan adanya glikosida. Kemudian diukur volume cincin ungu yang terbentuk dalam *centrifuge tube*. Volume cincin ungu yang dihasilkan dikonversikan dalam satuan ppm dengan bantuan kurva standar yang telah dibuat (Al-kayyis dan Susanti, 2016).

#### **3.3.1.1. Pembuatan Kurva Standar**

Kurva standar dibuat sebagai acuan dalam penentuan konsentrasi pada sampel yang digunakan. Pembuatan kurva standar menggunakan miconazole. Miconazole merupakan turunan dari imidazole yang merupakan golongan dari alkaloid dengan tingkat kemurnian 99% sehingga dapat digunakan sebagai standar dalam menentukan kadar glikosida ekstrak tangkai daun pepaya. Miconazole 1 gram dilarutkan dalam etanol 70% sampai volume 100 ml (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. Setiap larutan diambil 2 ml dimasukkan ke dalam

*centrifuge tube* dan ditambahkan 5 tetes Molisch dan 10 tetes asam sulfat 90%. Apabila terbentuknya cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida. Volume cincin ungu yang terbentuk dalam *centrifuge tube* diukur dalam satuan mililiter dan dibuat kurva standar antara volume cincin ungu (dalam satuan mililiter) dan konsentrasi alkaloid (dalam satuan ppm) (Andayani *et al.*, 2008). Kurva standar volume cincin ungu vs miconazole dapat dilihat pada Lampiran 1.

### **3.3.2. Pengukuran nilai pH**

Pengukuran nilai pH dilakukan dengan menggunakan pH meter digital. pH meter terlebih dahulu dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan pH 7. Elektroda atau sensor pH meter dicuci dengan air suling dan dikeringkan dengan kertas tisu. Pengukuran pH dilakukan dengan mencelupkan elektroda atau sensor pH meter ke dalam sampel sampai menunjukkan pH posisi konstan. Hasil pembacaan pH akan terbaca pada layar pH meter dengan jumlah angka yaitu satu angka dibelakang koma (Lukman *et al.*, 2012).

### **3.3.3. Uji Nilai Kecerahan Warna**

Nilai kecerahan warna dapat diukur dengan menggunakan *digital color meter* TES-135 (Fatma *et al.*, 2015). Pengukuran dilakukan dengan meletakkan sampel dibawah kamera *digital color meter* TES-135 yang telah terhubung dengan komputer. Cursor diarahkan pada sampel yang diuji, maka akan muncul

hasil pengukuran nilai  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  pada layar komputer. Data yang diambil yaitu tingkat kecerahannya (*lightness*).

### **3.4. Analisis Data**

Penelitian ini menggunakan analisis regresi linier pada hasil pengukuran kadar glikosida, nilai pH, dan kecerahan terhadap waktu dan suhu pemanasan. Jika nilai  $r$  mendekati 1 maka dapat dikatakan bahwa adanya hubungan positif antara konsentrasi glikosida dengan pH dan kecerahan. Hubungan antar parameter dianalisis menggunakan *GraphPad Prism* dengan memperhatikan signifikansi yang didapat. Analisis signifikansi menggunakan aplikasi *GraphPad Prism*, apabila  $p < 0,0001$  maka dapat dikatakan memiliki korelasi yang tinggi.