

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada 17-20 Juni 2013 di Laboratorium Uji Mineral 1 Politeknik Kampar.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium, pisau atau alat pemotong, neraca analitik A. E. Adam, blender WARING, shaker Gerhard Laboshake 500, spektrofotometer UV-Vis RS UV 2500, penyaring 100 mesh, rotari evaporator B.U.C.H.I., penangas air Mammert, pH meter Lawotte, hotplate CIMAREC, termometer digital Quartz, dan mikropipet BRAND.

##### **2. Bahan**

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jati muda (*Tectona grandis L. F.*). Bahan kimia yang digunakan adalah akuades, etanol 96%, asam tartarat 1%, HCl pekat, larutan buffer pH 3, pH 5 dan pH 7, KCl, dan CH<sub>3</sub>COONa.

#### **C. Prosedur Penelitian**

##### **1. Preparasi sampel**

Sampel daun jati muda yang akan dianalisis, sebelumnya dilakukan sortasi atau pemilihan. Kriteria daun yang dipilih adalah daun yang utuh, tidak berulat, dan bersih dari tanah atau kotoran lainnya. Selanjutnya, daun

yang telah terpilih dipotong kecil-kecil. Potongan daun siap untuk dianalisis.

## **2. Ekstraksi pigmen antosianin**

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dengan membandingkan total ekstrak antosianin yang didapat dari dua pelarut (akuades dan etanol). Ekstraksi dimulai dengan menimbang sampel, dimana sampel yang dibutuhkan dalam setiap percobaan adalah 50g. Sampel dimasukkan ke dalam blender, kemudian ditambahkan 500ml larutan pengestrak (pelarut + asam tartarat 1%, 4:1 atau 400ml pelarut ditambahkan dengan 100ml asam tartarat 1%), lalu campuran diblender hingga halus. Setelah itu, campuran daun dengan larutan pengestrak disaring dengan penyaring 100 mesh. Filtrat yang diperoleh disimpan ditempat yang gelap, sedangkan supernatannya dimaserasi dengan larutan pengestrak menggunakan *stirer*. Setelah larutan pengestrak pekat, maserasi dihentikan dan supernatannya disaring. Filtrat yang diperoleh dicampurkan dengan filtrat pertama. Maserasi dilakukan 3 kali atau sampai filtrat yang keluar tidak berwarna lagi. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan rotari evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat yang siap dianalisis.

## **3. Preparasi buffer**

Larutan penyangga atau buffer disiapkan untuk penentuan total antosianin dengan metode pH *differensial*. Buffer yang dibutuhkan adalah buffer pH 1 dan 4,5. Untuk membuat larutan buffer pH 1,0 digunakan KCl

sebanyak 1,86 gr dicampur dengan dengan 980 ml akuades dan diatur pH-nya hingga mencapai 1 dengan menggunakan HCL pekat. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 1 L dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Sedangkan untuk larutan buffer pH 4,5 digunakan Na-asetat sebanyak 54,43 gr dicampur dengan 960 ml akuades. Kemudian pH diukur dan diatur dengan HCl pekat hingga diperoleh larutan dengan pH 4,5. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 1 L dan ditambahkan aquades sampai tanda batas.

#### **4. Pengukuran dan perhitungan konsentrasi antosianin total dengan spektrofotometri UV-Vis**

Sebelum pengukuran dan perhitungan antosianin, DF (dillution factor/faktor pengenceran) yang tepat harus ditentukan terlebih dahulu dengan cara melarutkan sampel dengan buffer KCl pH 1 hingga diperoleh absorbansi kurang dari 1,2 pada panjang gelombang antara 500-526 nm, sekaligus menentukan panjang gelombang optimum pada rentang panjang gelombang tersebut.

Selanjutnya, disiapkan dua larutan sampel dari masing-masing ekstrak kental. Sampel pertama digunakan buffer KCl pH 1 dan untuk sampel ke dua digunakan buffer Na-asetat dengan pH 4,5. Masing-masing sampel dilarutkan dengan larutan buffer berdasarkan DF yang sudah ditentukan sebelumnya. Kemudian, absorbansi dari kedua sampel yang telah dilarutkan tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum dan 700 nm (panjang gelombang 700 nm

untuk mengoreksi endapan yang masih terdapat pada sampel, jika sampel benar-benar bersih maka absorbansi pada 700 nm adalah 0). Lalu, hitung selisih absorbansi antosianin dan total konsentrasinya menggunakan rumus pada teknik analisis data.

#### **5. Uji stabilitas ekstrak terhadap suhu**

5 ml ekstrak hasil maserasi total antosianin tertinggi diencerkan dalam akuades dalam labu ukur 250 mL hingga tanda batas. Hasil pengenceran diambil masing-masing 10 mL dan dimasukkan dalam 3 tabung reaksi, lalu ditutup dengan aluminium foil. Proses pemanasan dilakukan dengan waterbath pada suhu 70, 80, dan 100°C dengan waktu pemanasan selama 30 menit dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi antosianin dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimal dan 700 nm dengan cara berikut, diambil masing-masing 1 mL sampel yang telah dipanaskan dan diencerkan menggunakan larutan buffer yaitu, pH 1 dan pH 4,5 sampai volume 10 mL.

#### **6. Uji stabilitas ekstrak terhadap pH**

Proses pelaksanaan uji stabilitas terhadap buffer pH sebagai berikut, mula-mula disiapkan larutan buffer dengan pH yang bervariasi, yaitu pH 3, 5, dan 7. Masing-masing diambil sebanyak 5 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Kemudian masukkan ekstrak pekat antosianin daun jati muda sebanyak 15 µL, dikocok hingga benar-benar homogen dan didiamkan 15 menit. Perubahan nilai absorbansi

akibat perlakuan pH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum pigmen antosianin daun jati muda.

#### D. Teknik Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dalam dua langkah. Langkah pertama, menguji pelarut yang dapat mengekstrak antosianin terbesar dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. konsentrasi antosianin tersebut dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$C(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{\Delta A}{L} \times M \times \text{DF} \times \frac{V}{W} \times 1000 \times 100\%$$

Dimana, A didapat dari:

$$A = (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Keterangan:

C = konsentrasi molar (mg/100g)

DF = faktor pengenceran

A = selisih absorpsi buffer antara pH 1 dan pH 4,5

M = berat molekul (gr/mol)

L = panjang lintasan sel spektrofotometer (cm)

= absorbtivitas molar (L/mol.cm)

V = Volume akhir (L)

W = berat bahan awal (gr)

Pengukuran dilakukan 3 kali dan hasil dari pengukuran tersebut ditampilkan dalam Tabel III.1 sebagai berikut.

**Tabel III.1** Hasil perhitungan konsentrasi ekstrak antosianin

pelarut ekstraksi	ulangan	A	C (%)	rata-rata (%)
akuades	1			
	2			
	3			
etanol	1			
	2			
	3			

Langkah ke dua, menguji pengaruh suhu dan pH lingkungan pada karakteristik stabilitas ekstrak antosianin dengan membandingkan konsentrasi (mg/100 mL) awal dan setelah perlakuan. Pengukuran dilakukan 3 kali dan teknik analisis yang digunakan pada masing-masing pengaruh adalah ANOVA satu arah dengan tahapan analisis sebagai berikut:

1. *Rumusan hipotesis*

Rumusan hipotesis dari analisis penelitian ini adalah:

H<sub>0</sub>: tidak ada perbedaan signifikan antara (suhu/pH) dengan stabilitas antosianin daun jati muda

H<sub>a</sub>: ada perbedaan signifikan antara (suhu/pH) dengan stabilitas antosianin daun jati muda

2. *Perhitungan variabilitas data (JKa, JKd, JKT)*

$$JKa = \sum \frac{T^2}{n} - \frac{G^2}{N}$$

$$JKT = \sum X^2 - \frac{G^2}{N}$$

$$JKd = JKT - JKa$$

3. Mencari derajat kebebasan

$$dk \text{ JK}_a = k - 1$$

$$dk \text{ JKT} = N - K$$

$$dk \text{ JK}_d = N - 1$$

4. Mencari varian antar kelompok dan varian dalam kelompok

$$RK_a = \frac{JK_a}{dk \text{ JK}_a}$$

$$RK_d = \frac{JK_d}{dk \text{ JK}_d}$$

5. Menghitung besar  $F_{hitung}$

$$F_{hitung} = \frac{JK_a}{dk \text{ JK}_a}$$

6. Membandingkan  $F_{hitung}$  dengan  $F_{tabel}$ <sup>37</sup>

7. kesimpulan

Untuk menentukan  $H_0$  atau  $H_a$  diterima, maka ketentuan yang harus diikuti adalah:

- a) Bila sama  $F_{hitung}$  dan atau lebih kecil dari  $F_{tabel}$  maka  $H_0$  diterima dan  $H_a$  ditolak.
- b) Bila sama  $F_{hitung}$  lebih besar dari  $F_{tabel}$  maka  $H_a$  diterima dan  $H_0$  ditolak.<sup>38</sup>

8. Analisis paska anova (HSD)

Analisis ini dilakukan bila maka  $H_a$  diterima dan  $H_0$  ditolak. Rumus

yang digunakan adalah:  $HSD = q \sqrt{\frac{RK_d}{n}}$

---

<sup>37</sup> Hartono, *Statistik Untuk Penelitian*, Pustaka Pelajar, Pekanbaru, 2012, h. 308.

<sup>38</sup> *Ibid*, h. 308.

Ket:  $q = \text{tabel}^{39}$

Rkd = rata-rata kuadrat dalam kelompok

$n = \text{banyaknya sampel dalam kelompok}$

---

<sup>39</sup> *Ibid*, h. 306.