

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan perbedaan 2 faktor. Faktor pertama yaitu variasi lama fermentasi (7 dan 10 hari) serta variasi konsentrasi sari (50 mL, 100 mL dan 150 mL) yang digunakan pada tiap formulasi. Penelitian ini memanfaatkan bahan alam berupa kulit buah naga merah yang diolah menjadi sediaan cuka. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode sortasi basah. Kemudian sari beserta sediaan cuka kulit buah naga merah diuji aktivitas antioksidan serta kandungan nutrisi yang terkandung dalam sediaan cuka tersebut. Pengujian antioksidan yang dilakukan menggunakan metode FRAP dan pengujian kandungan meliputi pengujian kandungan kadar total asam asetat dengan menggunakan titrasi konvensional dengan metode alkalimetri, pengujian kadar alkohol menggunakan alat alkohol meter, dan pengujian kadar total gula dengan metode anthrone.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini yaitu mencangkup kebun buah naga merah yang berlokasi di Kampung Ciranji, Desa Cirende, Kecamatan Campaka, Kabupaten Purwakarta, Provinsi Jawa Barat. Sedangkan sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit buah naga merah yang diperoleh dari tempat pembudidayaan buah naga merah yang ada di Kabupaten Purwakarta. Kulit buah naga yang digunakan yaitu dari buah naga merah yang sudah matang dan sudah dapat dipanen pada saat buah sudah berumur 50-55 hari.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan Januari 2024.

3.4 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu blender (philips), saringan, botol kaca, pisau, spektrofotometer UV-Vis (Termo Insight), statis dan klem, penangas listrik, timbangan analitik (Aeadam), pH meter (Liuic), alkohol meter, kuvet kuarsa (CU Class A) dan alat-alat gelas yang ada di laboratorium kimia (Pyrex).

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sari kulit buah naga merah, *Saccharomyces cerevisiae* (ragi instan fermipan), *Acetobacter aceti*, gula stevia (Beeru), vitamin c (Merck), pereaksi dragendorff, HCl 2N (Supelco), FeCl₃ 10% (Supelco), pereaksi lieberman bouchard, NaOH 2N (Merck), aquadest (Brataco), indikator pp (Merck), KH₂PO₄ (kalium dihidrogen fosfat) (Supelco), asam trikloroasetat (TCA) 10% (Merck), kalium ferrisianida 1% (Pudak Scientific), pereaksi anthrone (Merck), asam sulfat (Supelco) dan etanol absolut (Supelco).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah-ubah dan dapat mempengaruhi variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu tiga variasi konsentrasi sari kulit buah naga merah, serta variasi waktu fermentasi.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang bisa berubah karena dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu nilai IC₅₀ pada uji aktivitas antioksidan

sari dan sediaan cuka buah naga merah sebagai penghambat radikal bebas.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil. Variabel terkontrol pada penelitian ini antara lain adalah metode pengujian aktivitas antioksidan yaitu metode FRAP.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah definisi operasional yang digunakan pada penelitian ini :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Jenis Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1	Konsentrasi sari kulit buah naga merah	Variasi konsentrasi sari kulit buah naga merah yang ditambahkan pada tiap formulasi sediaan cuka buah naga merah	Gelas kimia	Nominal	Variasi konsentrasi sari kulit buah naga merah yang digunakan yaitu : - 50 ml - 100 ml - 150 ml
2	Waktu	Variasi	Hari	Rasional	Variasi

No	Jenis Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
	fermentasi	waktu yang digunakan untuk fermentasi sediaan cuka kulit buah naga merah			waktu fermentasi yang digunakan : - 7 hari - 10 hari
Variabel Terikat					
1	Nilai IC ₅₀ (<i>Inhibition Concentration</i>)	Nilai IC ₅₀ (<i>Inhibition Concentration</i>) tiap formulasi sampel uji	Spektrofotometer Uv-Vis	Nominal	nm
Variabel Terkendali					
1	Metode pengujian aktivitas antioksidan	Metode pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode	Spektrofotometer Uv-Vis	Nominal	nm

No	Jenis Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
FRAP					

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini yaitu determinasi tanaman dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran spesies tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri pada morfologi yang terdapat pada tanaman buah naga merah sesuai dengan kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Fakultas FMIPA Biologi Universitas Padjajaran, Kecamatan Jatinagor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat.

3.6.2 Pembuatan Sari Kulit Buah Naga Merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt)

Kulit buah naga merah dipisahkan dari dagingnya lalu dicuci bersih dan ditimbang sebanyak 500 gram. Kemudian diblender dengan air dengan perbandingan 1 : 1 sampai mendapatkan konsistensi larutan cair. Setelah itu disaring lalu dipisahkan sari kulit buah naga merah yang diperoleh dengan ampasnya (Masyhura *et al.*, 2018).

3.6.3 Skrining Fitokimia

Pengujian skrining fitokimia yang dilakukan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Agustina *et al.*, (2020), meliputi skrining senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik, steroid dan triterpenoid, kuinon, dan tanin.

a. Alkaloid

Ambil 2 ml larutan sari kulit buah naga merah lalu dicampurkan dengan 2 ml HCl 2N kemudian kocok perlahan lalu dipisahkan menjadi 2 tabung reaksi yang berbeda masing-masing sebanyak 1 ml. Tabung pertama ditambahkan

1 tetes reagen drangondroff, apabila terbentuk endapan merah atau jingga dinyatakan kulit buah naga merah positif alkaloid. Tabung kedua, ditambahkan 1 tetes pereaksi mayer, keberadaan alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya 2 lapisan bawah berwarna hijau dan endapan putih.

b. Flavonoid

Ambil 1 ml sari kulit buah naga merah lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 0,2 gram serbuk Mg lalu masukkan 10 tetes HCl pekat, akan terbentuk endapan putih apabila kulit naga merah positif mengandung flavonoid.

c. Saponin

10 mL larutan sampel dipanaskan lalu dikocok selama 10 detik dan akan menimbulkan busa. Busa akan bertahan selama 10 menit kemudian ditetaskan dengan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang maka dinyatakan kulit buah naga merah positif mengandung saponin.

d. Fenolik

Sari kulit buah naga merah diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 tetes FeCl_3 1% lalu diamati, keberadaan fenolik ditandai dengan adanya perubahan warna hitam pada sampel.

e. Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 2 ml larutan uji ditetaskan diatas plat tetes lalu ditetaskan 5 tetes pereaksi *lieberman bouchard*. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

f. Kuinon

Ambil 1 mL sari kulit buah naga merah masukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan NaOH 5 tetes lalu armati,

keberadaan kuinon ditandai dengan perubahan warna jingga pada sampel.

g. Tanin

Sebanyak 1 mL larutan uji ditambahkan dengan larutan gelatin 1%, jika warnanya menunjukkan hitam kehijauan maka mengandung tannin.

3.6.4 Uji Antioksidan Metode FRAP

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP yang dilakukan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Vijayalakshmi & Ruckmani (2016).

1) Pembuatan Reagen Larutan Dapar Fosfat

Larutan dapar dibuat dengan melarutkan 2 gram NaOH dengan aquades bebas CO₂ pada labu takar 25 mL. Kemudian pada labu ukur 250 mL dilarutkan 6,8 gram KH₂PO₄ dengan aquades bebas CO₂. Sebanyak 16,4 mL NaOH dimasukkan kedalam labu takar dan ditambahkan 50 mL KH₂PO₄, selanjutnya diukur kadar pH 6,6 lalu digenapkan dengan aquades bebas CO₂ hingga tanda batas 200 mL.

2) Pembuatan Larutan Kalium Ferrisianida 1 %

1 gram kalium ferrisianida dilarutkan dan diencerkan kedalam labu takar 100 mL.

3) Pembuatan Larutan FeCl₃ 0,1%

0,1 gram FeCl₃ dilarutkan kedalam aquades dan encerkan hingga tanda batas dalam labu takar 100 mL.

4) Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10%

10 gram TCA ditimbang lalu dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ dan dicukupkan dengan aquadest bebas CO₂.

5) Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Sebanyak 1 ml larutan vitamin C dengan konsentrasi 30 ppm dipipet kemudian ditambahkan 1 mL dapar fosfat dan 1 mL kalium ferisianida kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA, kemudian larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lalu diambil 1 mL lapisan atas kedalam labu takar 5 mL kemudian tambahkan 1 mL aquadest dan 0,4 mL FeCl₃, cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombang dari 400-800 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum.

6) Pembuatan Larutan Blanko

1 mL dapar fosfat dan 1 mL kalium ferisianida kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA, kemudian larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lalu diambil 1 mL lapisan atas kedalam labu takar 5 mL kemudian tambahkan 1 mL aquadest dan 0,4 mL FeCl₃, cukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas kemudian diinkubasi selama 10 menit. Lalu serapan diukur pada panjang gelombang maksimal.

7) Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai Pembanding

Dibuat larutan stok 1000 ppm dengan menimbang vitamin C sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL. Larutan induk asam askorbat dipipet masing-masing 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, dan 0,5 mL pada labu ukur 10 ml hingga diperoleh konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm kemudian dari masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat dan 1 mL larutan K₃Fe(CN)₆

1% kedalam labu ukur 5 mL, kemudian diinkubasi selama 20 menit. Lalu larutan ditambahkan TCA sebanyak 1 mL selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian dipipet 1 mL lapisan atas larutan kedalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL FeCl_3 dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Setelah itu larutan diinkubasi selama 10 menit kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal.

8) Pengujian Antioksidan Sari Kulit Buah Naga Merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt)

Pengujian antioksidan dengan metode FRAP dilakukan dengan konsentrasi larutan standar yaitu 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat dan 1 mL larutan $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% kedalam labu ukur 5 mL, kemudian diinkubasi selama 20 menit. Lalu larutan ditambahkan TCA sebanyak 1 mL selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian dipipet 1 mL lapisan atas larutan kedalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL FeCl_3 dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 720 nm.

9) Pengujian Antioksidan Cuka Kulit Buah Naga Merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt)

Pengujian antioksidan sediaan cuka dengan metode FRAP dilakukan dengan sebanyak 1 mL sampel, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C . Lalu ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge, dipipet 1 mL

lapisan bagian atas kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 ml FeCl_3 0,1% kemudian digenapkan dengan etanol p.a pada labu takar 5 mL. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada 720 nm.

10) Penentuan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Aktivitas antioksidan dari sampel dinyatakan dalam mg ekivalen/gram (mgAAE/g). Parameter tersebut diperoleh dari persamaan regresi linier hubungan antara konsentrasi (x) dengan persen inhibisi (y) dengan persamaan dibawah ini :

$$y = bx + a$$

y : absorbansi

x : kadar

a : konstanta regresi

b : koefisien regresi

Nilai IC_{50} sebagai parameter antioksidan dihitung dari persamaan regresi untuk mencari nilai x dengan memasukkan 50 pada nilai y, sehingga akan diketahui konsentrasi efektifnya (Kartin & Bendra, 2015). Penggolongan suatu senyawa dapat dikatakan memiliki antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} , adalah sebagai berikut :

Tabel 3.2 Penggolongan Nilai IC_{50}

Kategori	Range nilai IC_{50}
Sangat Kuat	< 50 ppm
Kuat	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm
Tidak Aktif	>500 ppm

3.6.5 Pembuatan Sediaan Cuka Kulit Buah Naga Merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt)

Prosedur pembuatan sediaan cuka kulit buah naga merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt) mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Putri *et al.* pada tahun 2016 yang telah dimodifikasi. Yaitu mula-mula sari kulit buah naga merah dilakukan proses fermentasi menggunakan bakteri *S. Cereviceae* dan *Acetobacter aceti* dengan formulasi bahan seperti pada tabel 3.3 dibawah ini:

Tabel 3.3 Formulasi Cuka Kulit Buah Naga Merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt)

Bahan	F1	F2	F3
Sari kulit buah naga merah	50 ml	100 ml	150 ml
Gula stevia	2 tetes	2 tetes	2 tetes
Fermipan*	10%	10%	10%
<i>A. aceti</i> *	15%	15%	15%
Aquadest	Add 300 ml	Add 300 ml	Add 300 ml

Keterangan : *= % terhadap sari buah

Proses fermentasi dimulai dengan memasukkan masing-masing konsentrasi cairan sari kulit buah naga merah ke dalam botol fermentor yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan bakteri *Saccharomyces cerevisiae* (ragi fermifan) dengan konsentrasi 10% (v/v) kemudian dilakukan fermentasi pada suhu ruang kemudian ditambahkan *Acetobacter aceti* sebanyak 15% (v/v). Lalu larutan difermentasi selama 7 dan 10 hari pada suhu ruang dalam kondisi anaerob. Setelah fermentasi selesai, dipanaskan pada suhu 65°C untuk menghentikan proses fermentasi dan disaring (Putri *et al.*, 2016).

3.6.6 Evaluasi Sediaan Cuka Kulit Buah Naga Merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt)

Evaluasi sediaan cuka kulit buah naga merah yang dilakukan yaitu evaluasi organoleptik dan evaluasi pH. Sedangkan uji kandungan sediaan cuka yang dilakukan yaitu pengujian kadar total asam asetat, kadar total gula, dan kadar alkohol (Hardoko *et al.*, 2019).

1) Uji Organoleptik

Uji organoleptis pada sediaan cuka kulit buah naga merah meliputi pengamatan warna, rasa dan bau dengan pengamatan secara visual menggunakan indra manusia (Said R *et al.*, 2021).

2) Uji pH

Uji pH dilakukan pada tiap formula dengan tujuan untuk mengetahui kualitas larutan cuka. Uji pH dilakukan dengan metode potensiometri menggunakan pH meter. Menurut SNI pH untuk sediaan cuka yaitu berkisar antara 2,4-3,4.

3) Uji Kadar Total Asam Asetat

Uji kadar total asam asetat menggunakan metode titrasi konvensional yaitu alkalimetri. Pertama-tama larutan cuka kulit buah naga merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt) sebanyak 5 mL diencerkan dengan aquadest kedalam labu takar 50 mL. Kemudian ditimbang sampel sebanyak 10 mL lalu dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N dengan menggunakan indikator phenolptalin (pp) sebanyak 2-3 tetes hingga berubah warna menjadi merah muda. Setelah itu dihitung jumlah total asam tertitrasi dengan menggunakan rumus berikut (Leasa & Matdoan, 2015) :

$$\%total\ asam = \frac{M\ NaOH \times N\ NaOH \times grek}{Berat\ Bahan\ (g)}$$

Keterangan :

Normalitas (N) NaOH : 0,1 N

GreK (Gram Ekivalen) asam asetat : 60 g/mol

4) Uji Kadar Alkohol

Pengujian kadar alkohol dapat dilakukan dengan cara 15 ml sediaan cuka kulit buah naga merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt) disimpan kedalam gelas kimia lalu diukur menggunakan alat alkoholmeter.

5) Uji Kadar Total Gula

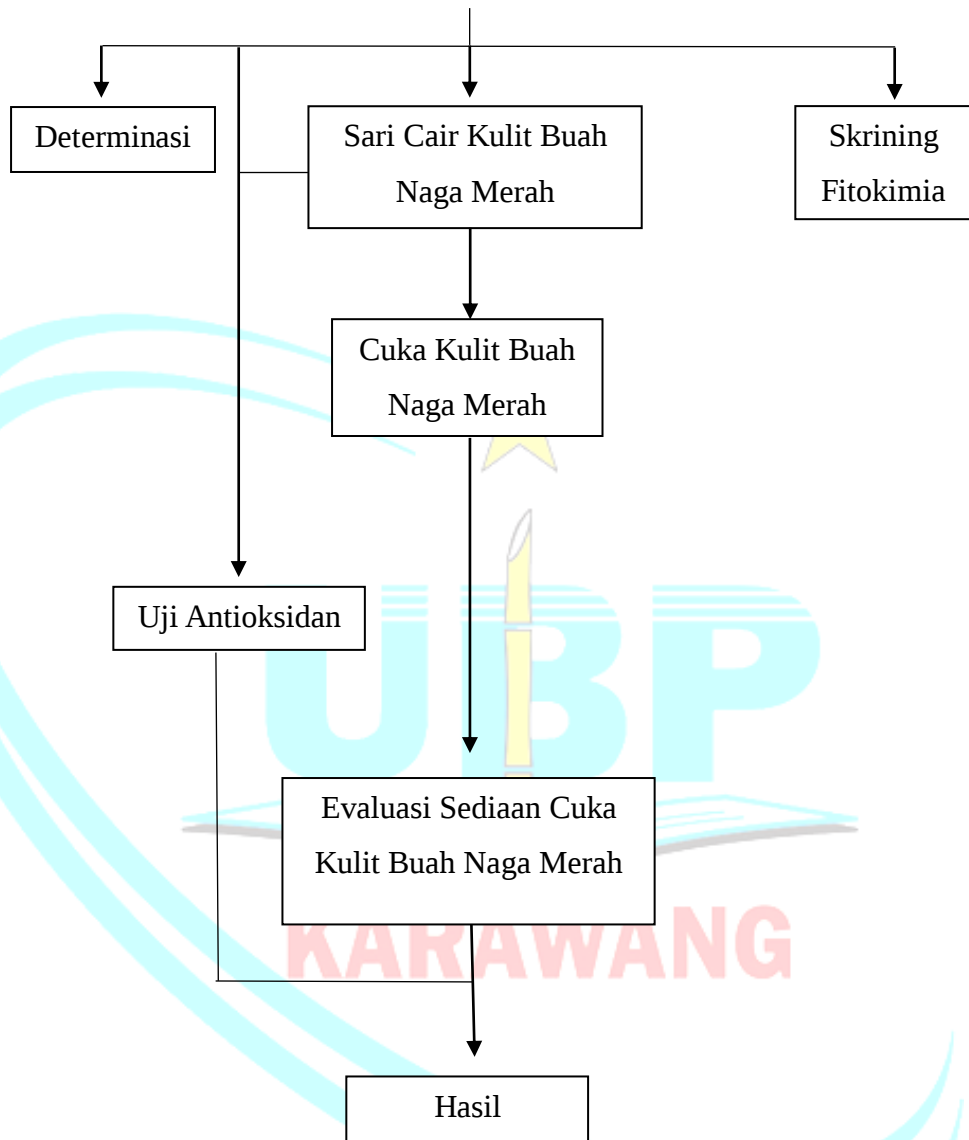
Pengujian kadar total gula pada sediaan cuka kulit buah naga merah (*Selenicereus monacanthus* (Lem.) D.R.Hunt) menggunakan metode antrone sulfat. Prinsip metode ini yaitu gula pereduksi atau non pereduksi akan bereaksi dengan asam sulfat pekat yang akan membentuk furfural atau turunannya, kemudian furfural tadi akan bereaksi membentuk kompleks berwarna kuning kehijauan dengan reagen anthrone (Kiyan Alkayyis & Susanti, 2016).

3.7 Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini yaitu analisis data dengan metode *one way* ANOVA untuk mengevaluasi data pengamatan terkait hasil uji aktivitas antioksidan pada sari dan sediaan cuka kulit buah naga merah. Data yang didapatkan diperoleh dari hasil pengujian aktivitas antioksidan sari kulit buah naga merah dan sediaan cuka kulit buah naga merah menggunakan metode FRAP.

3.8 Diagram Alir Prosedur Penelitian

Kulit Buah Naga
Merah



Gambar 3.1 Diagram Alir Prosedur Penelitian