

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah termometer, aluminium foil, toples, batang pengaduk, penyaring, spektrofotometer (UV-VIS Genesys 10s Thermo), pH meter (Mettler Toledo), timbangan analitik (Ohaus), labu Kjeldahl, oven, dan alat – alat gelas.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Bahan uji yang akan digunakan pada penelitian ini adalah susu sapi dan bibit kefir yang diperoleh dari komunitas kefir Indonesia Jl. Cilengkrang kampung Garung Desa Cilengkrang Bandung dan buah naga didapatkan dari PT Trisna Naga Asih Cirangkong, Cijambe Subang.

3.2.2 Bahan Kimia

Akuades, asam oksalat, buffer pH 4, 7 dan 9, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (*Sigma-Aldrich*), H₂SO₄, H₃BO₃, HCl, N-heksan, indikator Brom *cresol Green-Methyl Red*, NaOH, metanol p.a (*Fulltume*), dan bahan lain yang digunakan dalam penapisan fitokimia.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Determinasi Tanaman

Tanaman dideterminasi di Laboratorium Herbarium Taksonomi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran Bandung.

3.3.2 Pemeriksaan Karakterisasi Mutu Simplisia

A. Penetapan kadar abu total

Sebanyak 2 g serbuk yang telah digerus dan ditimbang seksama dimasukkan dalam krus porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang

habis, kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 2000).

B. Penetapan kadar sari yang larut dalam air

Sebanyak 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml air-kloroform (2,5 mL kloroform dalam air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal

berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 2000).

C. Penetapan Kadar Sari yang Larut dalam Etanol

Sebanyak 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara dimaserasi selama 24 jam di dalam 100 ml etanol 95% dalam labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, 20 ml filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara dan dipanaskan pada suhu

105°C sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 2000).

Skrining fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) untuk memeriksa adanya metabolit sekunder. Secara umum pemeriksaan ini meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, triterpenoid, steroid, kuinon, saponin, monoterpen dan seskuiterpen.

A. Alkaloid

Sampel dibasahkan dengan ammonia sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan kloroform dipipet dan digerus kuat. Lapisan kloroform diambil, kemudian ditambahkan asam klorida 2N. Setelah dikocok

kuat kuat dan terbentuk dua lapisan, lapisan asam diambil dan dibagi menjadi tiga bagian.

Bagian 1 ditambahkan pereaksi Mayer. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, berarti sampel kemungkinan mengandung alkaloid. Bagian 2 ditambahkan pereaksi Dragendrof. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning, berarti sampel mengandung alkoid. Bagian 3 digunakan sebagai blanko (Ditjen POM, 2000).

B. Flavonoid

Sampel digerus dalam mortir dengan sedikit air, kemudian dipindahkan dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit logam magnesium dan 5 tetes HCl 2N. Campuran dipanaskan dan disaring, kemudian filtrat ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol (Ditjen POM, 2000).

C. Tanin

Sampel dalam tabung reaksi dipanaskan di atas penangas air dan kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan larutan gelatin 1%, adanya senyawa tanin ditandai dengan adanya endapan berwarna putih, dilakukan pengujian terhadap blanko (Ditjen POM, 2000).

D. Steroid dan Terpenoid

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (MMI V, 1989).

E. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat dimasukan kedalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa mantap dan tidak hilang 10 menit dengan tinggi busa minimal 1cm menunjukkan adanya saponin (MMI V, 1989).

F. Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terjadinya warna-warni menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (MMI V, 1989).

G. Fenol

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan dan disaring, pada filtrat ditambahkan pereaksi FeCl₃. Adanya fenolat ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru hingga hitam (MMI V, 1989).

H. Kuinon

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terjadinya warna kuning (MMI V, 1989).

3.3.4 Ekstraksi Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Kulit buah naga sebanyak 200 gram dipotong kecil – kecil, tambahkan pelarut sampai simplisia terendam. Pelarut yang digunakan adalah akuades. Proses ekstraksi dilakukan 3 x 24 jam (Simanjuntak, dkk., 2014). Filtrat yang didapat dikeringkan menggunakan *freeze dry*.

3.3.5 Proses Pembuatan Kefir Kulit Buah naga (*Hylocereus polyrhizus*) Susu sapi segar sebanyak 2000 mL di panaskan pada suhu 85 - 90° C selama 30 menit kemudian didinginkan sampai mencapai suhu ruang 20 – 25°C, dimasukkan 5% starter kefir dan di aduk merata, inkubasi pada suhu ruang 20 - 25°C selama 48 jam (Suhartanti, 2014). Kefir ditambahkan ekstrak kulit buah naga kering dengan variasi konsentrasi F1 (0,002%), F2 (0,1%) dan F3 (0,2%).

3.3.6 Uji aktivitas Antioksidan

A. Pengukuran % inhibisi

Sampel yang akan diuji aktivitas antioksidan berupa Asam askorbat, ekstrak kulit buah naga, kefir susu sapi dan kefir yang telah ditambahkan ekstrak kulit buah naga. Masing – masing sampel

diambil sebanyak 2 mL ditambahkan 2 mL DPPH 50 ppm diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasi kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 516 nm. Kemudian ditentukan % inhibisi dari masing – masing sampel (Chen, *et al.*, 2013). Besarnya aktifitas antioksidan ditunjukkan oleh persamaan (3.1).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \quad (3.1)$$

B. Penetapan IC₅₀ Peredaman Radikal Bebas DPPH

Sampel uji dibuat 5 variasi konsentrasi, kemudian diambil 2 mL dicampur dengan 2 mL larutan DPPH (1:1). Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 516 nm. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung presentase aktivitas antioksidan sebagai sumbu y dan konsentrasi sampel uji sebagai sumbu x, sehingga diperoleh regresi linier. IC₅₀ dihitung dengan cara memasukan nilai 50 kedalam persamaan linier sebagai y, kemudian dihitung nilai x (Chen, *et al.*, 2013).

3.3.7 Pengujian Kandungan Kimia Kefir Susu Sapi Dengan Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*)

A. Pengukuran pH

Alat pH meter terlebih dahulu diaktifkan dan dibiarkan selama 15 – 30 menit. Elektroda pH meter dikalibrasi dengan menggunakan buffer pH 4, 7 dan 9, kemudian elektroda dibilas dengan akuades setiap mengganti buffer dan dikeringkan dengan tisu. Elektroda dicelupkan dalam larutan sampel, dibiarkan beberapa saat sampai jarum pH meter stabil. Setiap pergantian sampel pH yang didapat dicatat.

B. Penentuan Kadar Asam Laktat

Sampel diambil sebanyak 20 mL kemudian dimasukkan kedalam gelas kimia. Gelas kimia diatas *magnetic stirrer* lalu dimasukkan *magnetic bar* kedalam gelas kimia, diatur kecepatan 200 rpm. Selanjutnya NaOH dimasukkan kedalam buret kemudian ditempatkan ujung buret diatas gelas kimia yang berisi sampel. Elektroda pH dimasukkan ke dalam gelas kimia hingga tercelup sampel. NaOH diteteskan kedalam

sampel tiap 1 mL dicatat tiap perubahan pH, jika terdapat lonjakan pH pada saat pengukuran dilakukan penetesan NaOH per 0,1 mL. Selanjutnya dibuat kurva titrasi antara pH dan volume, lalu diturunkan menjadi turunan kedua. Ditentukan TAT (Titik Akhir Titrasi) berdasarkan potongan grafik 1 dan titik lembah. Kemudian dihitung persentasi kadar asam laktat (Suyanta, 2013). kadar asam laktat ditunjukkan oleh persamaan (3.2).

$$\text{asam laktat} = \frac{A \times B \times 90}{C \times 1000} \times 100 \% \quad (3.2)$$

Keterangan:

A = Volume NaOH terpakai (mL)

B = Konsentrasi NaOH (N)

C = Volume sampel yang dianalisis (mL)

90 BE asam laktat (90 g/ekivalen)

C. Penentuan Kadar Lemak

Sampel kefir susu sapi dan kefir yang telah ditambahkan ekstrak kulit buah naga merah masing masing sebanyak 5 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer, ditambahkan 50 mL N-heksan dan dipindahkan kecorong pisah. Dikocok pelan pelan hingga terjadi dua lapisan. Lapisan N-hexan dipipet dan dimasukkan kedalam erlenmeyer yang sudah diketahui beratnya, sampel yang digunakan diulang dengan menambahkan N-hexan kembali sebanyak dua kali. Lapisan N-hexan seluruhnya diuapkan dan dioven dalam suhu 105°C selama semalam, dinginkan kemudian ditimbang. (AOAC, 2005).

kadar lemak ditunjukkan oleh persamaan (3.3).

$$\text{Kada lemak} (\%) = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan:

W1 = Bobot sampel (g)

W2 = bobot labu lemak kosong (g)

W3 = Bobot labu lemak + lemak hasil ekstraksi (g)

D. Penentuan Kadar Protein

Sampel kefir susu sapi dan kefir yang telah ditambahkan ekstrak kulit buah naga merah masing masing sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, Kemudian ditambahkan 25 mL H₂SO₄ pekat dan selenium 2 gram. Didestruksi selama 2 jam sampai larutan menjadi jernih dan didinginkan. Setelah dingin larutan kemudian dimasukkan

ke dalam labu ukur 100 mL, dipipet 5 mL larutan dan dimasukkan ke dalam alat penyuling ditambahkan 5 mL NaOH 30%. Larutan disuling selama 10 menit, sebagai penampung digunakan 10 mL larutan asam borat 2% yang telah dicampur indikator *Brom cresol Green-Methyl Red*. Larutan hasil suling dititrasi dengan HCl 0,01 N sampai berwarna merah muda (AOAC, 2005).

kadar protein ditunjukkan oleh persamaan (3.4).

$$\text{Kadar protein} = \frac{(V1 - V2) \times N \times 0,014 \times f.k \times f.p}{W} \times 100\% \quad (3.4)$$

Keterangan:

V1 : Volume HCl yang digunakan pada titrasi sampel

V2 : Volume HCl yang digunakan pada titrasi banko

W : Bobot cuplikan N :

Normalitas HCl

f.k : Faktor koreksi (6,38)

f.k : Adalah faktor pengenceran