

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 kjeldhal, Oven dan alat – alat gelas.

3.2 Bahan

4.3.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah susu kambing yang diperoleh dari peternakan kambing, Jl. Cilengkrang 1 kampung Garung RT 3 RW 9 Desa Cilengkrang Bandung, bibit kefir diperoleh dari komunitas kefir Indonesia kampung garung RT 3 RW 9. Buah naga merah diperoleh dari PT Trisna Naga Asih Cirangkong, Cijambe Kab Subang.

4.3.2 Bahan kimia

Akuades, buffer pH 4, 7, dan 9, DPPH (*2,2-difenil-1-pikrihidrazil*) (*Sigma – Aldrich*), H₂SO₄, H₃BO₃, HCL, N- Heksan, indikator *brom cresol Green – Methyl Red*, NaOH, Metanol p.a (*fulltume*), asam oksalat, 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 Karakterisasi 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 22

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 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).

3.3.3 Skrining Fitokimia

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 dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan klorofom dan digerus kuat kuat. Lapisan klorofom diambil kemudian ditambahkan asam klorida 2N. setelah itu dikocok

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

Bagian 1 ditambahkan pereaksi Dragendrof. Jika ada kekeruhan atau endapan berwarna jingga-kuning, berarti kemungkinan mengandung alkaloid.

Bagian 2 ditambahkan pereaksi mayer. Jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, menunjukkan sampel kemungkinan mengandung alkaloid (Fransworth, 1996).

B. Flavonoid

Sampel dalam tabung reaksi dicampur dengan Mg dan HCl 2N. Campuran dipanaskan dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat-kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Fransworth, 1996).

C. Tanin

Sejumlah kecil serbuk simplisia atau ekstrak ditambahkan air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan gelatin 1%, adanya senyawa tanin ditandai dengan timbul endapan putih (Fransworth, 1996).

D. Fenolat

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan pereaksi FeCl₃, adanya fenolat ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru hitam hingga hitam (Fransworth, 1996).

E. Monoterpen dan Seskuiterpen

Sampel digerus dengan eter, filtranya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap, dan dibiarkan kering. Tambahkan larutan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen (Fransworth, 1996).

F. Steroid dan Triterpenoid

Sampel digerus dengan eter, filtratnya diambil dan ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan kering. Tambahkan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid sedangkan warna hijau biru menunjukkan adanya steroid (Fransworth, 1996).

G. Kuinon

Sampel ditambahkan air dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dan disaring. Pada filtrat ditambahkan KOH 5%. Adanya senyawa kuinon ditandai dengan terjadinya warna kuning (Fransworth, 1996).

H. Saponin

Sampel ditambahkan air, lalu dipanaskan disaring. Filtrat dimasukan dalam tabung reaksi, dikocok kuat-kuat. Terbentuknya busa yang mantap dan tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi busa minimal 1 cm menunjukkan adanya saponin (Fransworth, 1996).

3.3.4 Pembuatan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Kulit buah naga merah sebanyak 200 gram dipotong kecil – kecil, kemudian ditambahkan pelarut berupa akuades hingga simplisia terendam. Dilakukan ekstraksi secara maserasi 3 x 24 jam. Filtrat yang didapat dikeringkan menggunakan *freeze dry* (Simanjuntak, dkk., 2014).

3.3.5 Pembuatan kefir kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) Susu kambing segar sebanyak 2000 mL di panaskan pada suhu 71-

75°C selama kurang lebih 10 menit, kemudian susu didinginkan hingga mencapai suhu ruang yaitu 20 - 25°C. Selanjutnya dimasukkan 5% stater kefir kemudian diaduk hingga merata. Selanjutnya campuran susu kambing segar dan bibit kefir diinkubasi pada suhu ruang 20 - 25°C selama 48 jam. Kefir yang telah jadi kemudian dibagi kedalam 3 bagian masing – masing ditambahkan ekstrak kulit buah naga merah yang telah dikeringkan dengan variasi konsentrasi 0,002%,0,1%, 0,2% (Suhartanti, 2014).

3.3.6 Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ditunjukkan untuk mengukur kadar antioksidan pada ekstrak kulit buah naga merah, kefir susu kambing, dan kombinasi antara ekstrak kulit buah naga dan kefir susu kambing. Masing – masing sampel diambil sebanyak 1 mL lalu ditambahkan 1mL DPPH 50 ppm selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian kadar antioksidan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Selanjutnya dihitung % inhibisi dari masing – masing sampel dan dihitung nilai IC₅₀.

Besarnya aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh persamaan (3.1)

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

3.4 Parameter Pengujian kefir Susu Kambing dengan penambahan ekstrak kulit buah naga merah

3.4.1 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.

3.4.2 Penentuan Kadar Asam Laktat

Sampel diambil sebanyak 10 mL kemudian dimasukkan kedalam gelas kimia. Ditempatkan 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 kedalam gelas kimia hingga tercelup sampel. Diteteskan NaOH kedalam sampel tiap 1 mL dicatat tiap perubahan pH, jika terdapat lonjakan pH pada pengukuran diteteskan NaOH per 0,1 mL. Selanjutnya dibuat kurva titrasi antara pH dan volume, lalu diturunkan menjadi turunan kedua. Ditentukan TE berdasarkan

potongan grafik 1 dan titik lembah. Kemudian dihitung persentasi kadar asam laktat (Suyanta, 2013).

% asam laktat ditunjukkan oleh persamaan (3.2).

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{mL \text{ NaOH} \times M \times 90}{mL \text{ sampel} \times 1000} \times 100\% \quad (3.2)$$

3.4.3 Penentuan kadar Lemak

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

$$\text{Kada lemak (\%)} = \frac{(W3 - W2)}{W1} \times 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan:

W1 = Bobot sampel (g)

W2 = bobot labu lemak kosong (g)

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

3.4.4 Penentuan Kadar Protein

Sampel kefir susu kambing dan kefir susu kambing yang telah ditambahkan ekstrak kulit buah naga merah masing – masing sebanyak 1 gram dimasukan ke dalam labu Kjeldahl, kemudian ditambahkan 25mL H₂SO₄ pekat dan selenium 2 gram. Kemudian didekstruksi selama 2 jam sampai larutan menjadi jernih kemudian didinginkan. Setelah dingin larutan kemudian dimasukan kedalam labu ukur 100 mL, dipipet 5 mL larutan dan masukan kedalam alat penyuling ditambahkan 5mL 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). Kadar

$$\text{protein} = \frac{(v_1 - v_2) \times N \times 0.014 \times f.k \times f.p}{w} \times 100\%$$

Keterangan :

- V1 : Volume HCl yang digunakan pada titrasi sampel
- V2 : Volume HCl yang digunakan pada titrasi blanko
- W : Bobot cuplikan
- N : Normalitas HCl
- f.k : Faktor koreksi (6,38)
- f.p : Faktor pengenceran