

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknobiologi-Pangan Fakultas Teknobiologi Universitas Atmajaya Yogyakarta. Penelitian dilakukan pada bulan Februari – Agustus 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pisau, ayakan tepung ukuran 60 mesh, baskom, loyang, chopper, tabung reaksi, rak tabung, blender, oven, nampan, kompor gas, panci, timbangan analitik, blender, penyaring, talenan, tabung gelap, spektrofotometri, stopwatch, gelas, pipet tetes, masker, vortex Maxi Mix II, *moisture balancing*, *aluminium foil*, sendok pengaduk, kertas sampul coklat, pipet ukur, pro pipet, kertas label, karet, tabung Durham, erlenmeyer Iwaki Pyrex, gelas ukur, gelas beker Iwaki Pyrex, inkubator, vortex, penjepit, eksikator, autoklaf, lampu bunsen, labu ukur Iwaki Pyrex, *color reader*, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu Corp 07371, tanur, tisu, kurs porselin, *handcounter*, *waterbath*, sarung tangan plastik, labu destilasi, buret, mikropipet, tips, petridish, *laminair air flow*, plastik, trigalski, ose, corong, labu takar, *stopwatch*, *colony counter*, dan kapas.

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata*) dari daerah Bogor, maltodeskrin *Dextrose*

Equivalent (DE) 12, sorbitol, sukralosa, aquadest, reagen Folin Ciocalteu, Na_2CO_3 7 %, asam galat, methanol, etanol, alkohol 70%, maltodekstrin, sorbitol dan sukralosa aquadest, *silika gel*, HCl, alkohol 95%, NaOH, larutan DPPH 500 μM , Medium *Plate Count Agar* (PCA), Medium *Brilliant Green Lactosa Bile* (BGLB).

C. Rancangan percobaan

Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) dengan dua variabel yaitu konsentrasi maltodekstrin (10%, 15%, dan 20%) dan suhu pemanasan (60°C , 70°C , dan 80°C), masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Rancangan percobaan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan Percobaan dengan Variasi kombinasi konsentrasi maltodekstrin (%) dan suhu pemanasan.

Suhu pemanasan	Ulangan	Konsentrasi maltodekstrin (/100 g)		
		10 % (X)	15 % (Y)	20 % (Z)
60°C (A)	1	A ₁ X ₁	A ₁ Y ₁	A ₁ Z ₁
	2	A ₂ X ₂	A ₂ Y ₂	A ₂ Z ₂
	3	A ₃ X ₃	A ₃ Y ₃	A ₃ Z ₃
70°C (B)	1	B ₁ X ₁	B ₁ Y ₁	B ₁ Z ₁
	2	B ₂ X ₂	B ₂ Y ₂	B ₂ Z ₂
	3	B ₃ X ₃	B ₃ Y ₃	B ₃ Z ₃
80°C (C)	1	C ₁ X ₁	C ₁ Y ₁	C ₁ Z ₁
	2	C ₂ X ₂	C ₂ Y ₂	C ₂ Z ₂
	3	C ₃ X ₃	C ₃ Y ₃	C ₃ Z ₃

Keterangan : A,B,C = perlakuan suhu pemanasan
X,Y,Z = perlakuan konsentrasi maltodekstrin

D. Cara kerja

1. Penyortiran daun sirsak (Sudewo, 2004)

Penyortiran bertujuan untuk memilih daun sirsak yang bagus, segar, dan tidak busuk untuk memperoleh daun sirsak yang berkualitas tinggi. Daun sirsak dipilih yang berukuran seragam, berwarna hijau muda, umur daun tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Daun sirsak yang telah dipilih kemudian dicuci terlebih dahulu hingga bersih. Daun sirsak yang telah dicuci kemudian ditiriskan hingga bebas air lalu dikeringkan.

1. Ekstraksi daun sirsak

Daun sirsak sebanyak 200 g dihancurkan menggunakan blender dengan penambahan air sebanyak 1000 ml air mendidih selama 5 menit. Perbandingan jumlah daun sirsak dan air yang digunakan sebesar (1:5). Selama proses ekstraksi dilakukan pengadukan secara manual $\pm$ 35 kali putaran per menit. Setelah itu dilakukan proses penyaringan sehingga didapatkan filtrat berupa ekstrak daun sirsak sebanyak 100 ml untuk setiap kali perlakuan (Permana, 2008 dengan modifikasi).

2. Persiapan maltodekstrin (Thamrin dkk., 2009)

Maltodekstrin diletakkan di cawan porselin. Cawan porselin yang telah berisi maltodekstrin ditimbang sebanyak 10, 15, dan 20 % sesuai dengan volume daun sirsak yang akan dikeringkan menjadi minuman serbuk.

3. Pembuatan minuman serbuk (Srihari dkk., 2010)

Ekstrak daun sirsak sebanyak 100 ml ditambahkan maltodekstrin dengan variasi konsentrasi 10g, 15g, dan 20g. Setiap perlakuan kemudian dikeringkan dengan proses pengeringan menggunakan oven (Permana, 2008). Pengeringan menggunakan oven suhu 100⁰C selama 15 menit dan dilanjutkan dengan pengeringan bersuhu 60⁰ C, 70⁰ C, dan 80⁰ C selama 12 jam. Lempeng yang terbentuk kemudian diblender dan disaring dengan menggunakan saringan berukuran 60 mesh. Serbuk ekstrak ditambah dengan sorbitol sebanyak 20g/kg produk. Serbuk dan gula dicampur hingga rata dengan diaduk manual. Minuman serbuk daun sirsak (*Annona muricata*.) dikemas dalam plastik.

5. Uji kimiawi minuman serbuk daun sirsak

a. Penentuan kadar air (Sembiring, 2009)

Alat *Moisture Balance* dihidupkan dan angka yang tertera dinolkan terlebih dahulu. Sebanyak 10 gram sampel serbuk daun sirsak ditempatkan dalam cawan aluminium. Alat *Moisture Balance* ditutup dan ditunggu sampai memberikan tanda. Angka yang tercatat pada alat *Moisture Balance* dibaca dan dicatat kadar airnya.

b. Penentuan kadar abu (Sudarmadji dkk., 1997)

Minuman sebuk daun sirsak ditimbang sebanyak 3 gram kedalam cawan porselin yang kering dan telah diketahui beratnya, lalu dipijarkan

dalam *tanur* pada suhu 550 °C sampai diperoleh abu berwarna keputih-putihan. Kadar abu dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{[(\text{berat cawan} + \text{abu}) - \text{berat cawan}]}{\text{Berat sampel mula} - \text{mula (g)}} \times 100\%$$

c. Uji Kandungan Total Fenolik

Pembuatan Kurva Standar Asam Galat (Lee dkk., 2003 dengan modifikasi) Asam galat ditimbang sebanyak 0,025 g secara analitis dalam kertas timbang lalu dimasukkan dalam *bekker glass*. Etanol PA sebanyak 0,2 ml ditambahkan ke *bekker glass*. Aquades ditambahkan ke dalam *bekker glass* hingga volumenya mencapai 100 ml (didapatkan larutan asam galat 250 ppm). Larutan dikocok atau dihomogenisasi menggunakan vortex. Larutan Standar Asam Galat dengan berbagai konsentrasi 20; 40; 60; 80; 100 ppm dibuat dengan mengambil masing-masing Larutan Induk Asam Galat sebanyak 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 ; 4 ml ke dalam gelas ukur. Aquades ditambahkan ke gelas ukur hingga volumenya mencapai 10 ml. Larutan asam galat masing-masing konsentrasi sebanyak 0,4 ml dimasukkan ke dalam labu ukur. Reagen Folin Ciocalteu sebanyak 0,4 ml ditambahkan ke larutan. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah 5 menit, 4 ml Na₂CO₃ 7 % (b/v) ditambahkan ke larutan. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex. Larutan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Masing-masing konsentrasi diukur absorbansinya pada spektrofotometer 750 nm untuk menentukan kurva standar asam galat.

Pengukuran Kandungan Total Fenolik (Dungir dkk., 2012;; Lee dkk., 2003 dengan modifikasi) Sampel minuman serbuk daun sirsak sebanyak 0,4 gr

dilarutkan dengan metanol p.a sebanyak 10 ml kemudian sebanyak 0.4 ml dimasukkan dalam labu ukur lalu ditambah 0,4 ml reagen Folin Ciocalteu. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 menit. Na_2CO_3 7% sebanyak 4 ml ditambahkan ke dalam larutan. Aquades ditambahkan hingga volumenya mencapai 10 ml. Larutan disimpan dalam ruangan gelap selama 60 menit pada suhu ruang. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 750 nm dengan spektrofotometer UV-VIS. Larutan blanko yang digunakan adalah etanol. Hasil yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar asam galat yang telah dipersiapkan menggunakan asam galat. Kandungan total fenol dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat/gram ekstrak. Kandungan total fenolik dihitung menggunakan rumus: $Y = a + bx$

Keterangan : Y: Variabel terikat
 X : Variabel bebas
 a : intersep
 b : koefisien regresi

d. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kuantitatif dengan Metode

DPPH ((Sasaki dkk., 2007)

Larutan DPPH 0.2 mM Serbuk DPPH (BM = 394,32) dilarutkan dalam 100 ml metanol kemudian disimpang dalam ruang gelap selama 30 menit. Larutan Blanko Larutan DPPH 0,2 Mm diambil sebanyak 0,1 ml lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 0,4 ml Metanol. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 2 jam dan serapa diukur pada panjang gelombang 515 nm, kemudian dilakukan pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Larutan campuran minuman serbuk daun sirsak sebanyak 0,5 gram dilarutkan ke dalam 5 ml metanol. Selanjutnya larutan campuran diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak 4 ml kemudian dikocok dengan vortex hingga homogen, lalu diinkubasi dalam ruang gelap selama 2 jam. Serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm. Kemudian dihitung % aktivitas antioksidan ekstrak daun sirsak dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{serapan kontrol} - \text{serapan larutan uji})}{\text{serapan larutan uji}} \times 100\%$$

6. Uji Fisik minuman serbuk daun sirsak

a. Analisis warna secara kromameter (deMan, 1997)

Sampel minuman serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 5 gram. Sampel serbuk daun sirsak diletakkan di bawah instrument *color reader* dan instrument diatur hingga benar - benar mengenai permukaan sampel. Parameter yang muncul dari alat ini adalah L yang mewakili kecerahan dari hitam ke putih, a yang mewakili warna merah ke hijau, dan b yang mewakili warna biru ke kuning. Angka yang diperoleh dari L, a, dan b diubah menjadi nilai x dan y yang kemudian digunakan untuk menentukan warna minuman serbuk sesuai dengan diagram kromatisitas CIE (*Commisision International de l'Enclairage*). Nilai X dan Y dapat dihitung dengan rumus:

$$y = \frac{1,7796L}{5,645L + a - 3,012b}$$

$$x = \frac{a + 1,75L}{5,645L + a - 3,012b}$$

b. Uji Waktu Larut (Olivia, 2012)

Minuman serbuk daun sirsak sebanyak 8 gram dilarutkan dalam 200 ml air. Kemudian, dicatat berapa lama waktu yang dibutuhkan sampai serbuk benar-benar terlarut penuh dalam air.

7. Uji mikrobiologis minuman serbuk daun sirsak

a. Perhitungan angka lempeng total dengan metode *pour plate* (Maturin dan Peeler, 2001)

Sampel serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Aquadest yang telah disterilisasi sebanyak 9 ml dituang secara aseptis ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi serbuk daun sirsak. Larutan dikocok dengan vorteks hingga serbuk larut dengan sempurna kemudian diberi label pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-2} . Pengenceran 10^{-2} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-3} .

Pengenceran 10^{-3} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-4} . Pengenceran 10^{-4} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-5} . Setiap pengenceran dihomogenkan kembali dengan vorteks. Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 ml kemudian dimasukkan ke dalam

cawan petri yang telah berisi PCA (*Plate Count Agar*). Metode *plating* yang digunakan adalah *Pour Plate*.

Plating yang telah selesai kemudian diberi label dan dibungkus dengan rapi dengan menggunakan kertas sampul coklat. Cawan petri yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam inkubator selama 48 jam dengan suhu 37°C. Koloni yang terbentuk diamati kemudian dihitung dengan menggunakan rumus:

- a. Apabila jumlah koloni 30-300

$$N = \frac{\Sigma C}{(1 \times n_1)n + n(0,1 \times n_2) \times d}$$

- b. Apabila jumlah koloni < 30

$$N = \frac{30}{d}$$

- c. Apabila jumlah koloni lebih dari 300 → TNTC (*Too Numerous To Count*)

Keterangan :

- N = Jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per g
 ΣC = Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung
 n1 = Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung
 n2 = Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung
 d = Pengenceran pertama yang dihitung

b. Perhitungan jumlah *coliform* dengan metode MPN (Fardiaz, 1989)

Sampel serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Aquades yang telah disterilisasi sebanyak 9 ml dituang secara aseptis ke dalam Erlenmeyer berisi serbuk daun sirsak. Larutan dikocok dengan menggunakan vorteks hingga serbuk

daun sirsak larut dengan sempurna kemudian diberi label pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-2} . Pengenceran 10^{-2} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-3} .

Setiap pengenceran dihomogenkan kembali dengan kemudian masing-masing diinokulasikan ke dalam 1 buah tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham (tabung kecil yang letaknya terbalik, digunakan untuk menangkap gas yang terjadi akibat fermentasi laktosa menjadi asam dan gas) dan medium BGLB (*Brilliant Green Lactose Bile*). Warna awal medium BGLB ini adalah hijau jernih. Setiap pengenceran diberi label, dibungkus rapi kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C . Apabila setelah diinkubasi sampel yang terdapat di dalam tabung reaksi tersebut mengalami perubahan warna menjadi hijau keruh dan terdapat gelembung pada tabung Durham, maka dikatakan positif mengandung *coliform*. Hasil pengujian dicocokkan dengan tabel untuk menentukan nilai MPN seri sembilan tabung. Jumlah *coliform* dihitung dengan rumus :

$$\Sigma \text{ coliform} = \text{nilai MPN} = \frac{1}{\text{Pengenceran tabunga yang ditengah}}$$

8. Pengujian Organoleptik (Wiryawan, 2011)

Pengujian organoleptik untuk minuman serbuk daun sirsak (*Annona muricata*.) dilakukan responden 25 orang panelis terdiri dari 11 orang panelis pria dan 14 orang panelis wanita. Pengujian organoleptik yang

dilakukan meliputi rasa, aroma, warna, dan kenampakan. Tingkat kesukaan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- 1 = Kurang suka
- 2 = Agak suka
- 3 = Suka
- 4 = Sangat suka

9. Analisis data hasil penelitian (Gasperz, 1989)

Data hasil penelitian yang diperoleh akan dianalisis menggunakan ANAVA dan untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan akan dilakukan uji *Duncan's Multiple Range test* (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95%. Data diproses dengan SPSS 19.