

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah eksperimental dan *Posstets-Only with Control Group Design*. Kelompok yang dilakukan perlakuan pada uji ini adalah VCO menggunakan metode fermentasi dan peningkatan kualitasnya dengan penambahan rempah kunyit (*Curcuma longa L.*). Parameter yang dilihat ada dua, yaitu fisika dan kimia. Parameter fisika organoleptik meliputi warna dan bau. Sedangkan parameter kimia meliputi bilangan asam, bilangan peroksida dan GC-MS. Jumlah pengulangan pada setiap kelompok uji yaitu 9 kali yang didapatkan dari hasil perhitungan dengan rumus Federer.

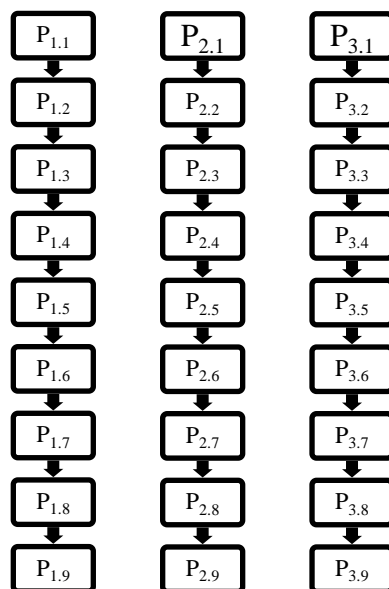
$$\begin{aligned}(t-1)(n-1) &\geq 15 \\(3-1)(n-1) &\geq 15 \\2n-2 &\geq 15 \\2n &\geq 15 + 2 \\2n &\geq 17 \\n &\geq 8,5 \sim 9\end{aligned}$$

Keterangan:

t = Banyak perlakuan yang dilakukan

n = Banyak pengulangan

Berdasarkan hasil dari perhitungan rumus federer tersebut, maka dapat diketahui jumlah pengulangan yang dilakukan yaitu sebanyak 9 kali.



Gambar 5. Skema Pengulangan

Keterangan:

P1 = Perlakuan 1 yaitu VCO murni yang dibuat menggunakan metode fermentasi dengan tanpa penambahan rempah kunyit.

P2 = Perlakuan 2 yaitu VCO murni yang dibuat menggunakan metode fermentasi dengan penambahan rempah kunyit.

P3 = Perlakuan 3 yaitu perbandingan kualitas VCO murni, VCO dengan penambahan rempah kunyit dan VCO komersil terhadap parameter fisika dan parameter kimia.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari bulan Januari hingga bulan mei 2024.

Tempat yang digunakan untuk penelitian ini adalah :

- a. Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat untuk melakukan determinasi tanaman rempah Kunyit (*Curcuma longa L.*).

- b. Laboratorium Bahan Alam Universitas Borneo Lestari untuk melakukan pembuatan simplisia dari rempah Kunyit (*Curcuma longa L.*)
- c. Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Borneo Lestari (UNBL) untuk melakukan uji kualitas dari *Virgin Coconut Oil* (VCO) dengan penambahan rempah kunyit (*Curcuma longa L.*) yang dilihat dari parameter fisik organoleptis (bau dan warna) dan parameter kimia (bilangan asam, bilangan peroksida).
- d. Laboratorium Universitas Lambung Mangkurat Terpadu untuk melakukan uji *Gas Chromato-graphy Mass Spectrometry* (GC-MS).

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu metode pembuatan VCO, penambahan rempah pada VCO dan perbandingannya dengan VCO komersil.

3.3.2 Variabel Terikat

Kualitas VCO dengan metode fermentasi yang dilihat dari parameter fisik organoleptik meliputi bau dan warna dan parameter kimia meliputi bilangan asam, bilangan peroksida dan GC-MS.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi pohon kelapa (*Cocos nucifera L.*) diperoleh dari Guntung Manggis, Landasan Ulin. Sedangkan populasi tanaman rempah

kunyit diperoleh dari Komplek Halim Permai Jalan Maret RT. 5 RW. 5, Guntung Paikat, Kecamatan Banjarbaru Selatan.

3.4.2 Sampel

Sampel daging buah kelapa diperoleh dari Guntung Manggis, Landasan Ulin. Sampel yang digunakan berupa daging buah kelapa yang sudah tua. Sedangkan sampel rimpang kunyit diperoleh dari Komplek Halim Permai Jalan Maret RT. 5 RW. 5, Guntung Paikat, Kecamatan Banjarbaru Selatan. Sampel yang digunakan berupa rimpang yang segar.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan antara lain baskom, saringan, toples untuk tempat santan, kain lap, aluminium foil, botol kaca 100 ml, hot plate (*Kenko*[®]), stirrer, blender, ayakan mesh 40 (*Standard Sieves*[®]), Erlenmeyer 250 ml (*Pyrex*[®]), kuvet (*Quartz Cuvette*[®]), labu ukur 100 ml (*Pyrex*[®]), neraca analitik (*OHAUS*[®]), oven (*Heratherm*[®]), pipet tetes, pipet volume 25 ml (*Pyrex*[®]), labu ukur 100 ml dan 1.000 ml (*Pyrex*[®]), gelas ukur 25 ml (*Pyrex*[®]), pipet mikro (*DRAGON LAB*[®]), statif dan klem, Spektrofotometer UV-Vis (*PG instrument T60*[®]), termometer (*Onemed*[®]) dan *waterbath* (*Mammert*[®]).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah kelapa tua segar (*Cocos nucifera L.*), simplisia rempah kunyit (*Curcuma aquadest* (air suling), ammonium tiosionat (NH_4SCN), asam klorida

(HCl), feroklorida (FeCl_2) (Merck[®]), etanol 96% (Merck[®]), hydrogen peroksida (H_2O_2) (Merck[®]), indikator phenoptalein (PP) (Smart-lab[®]), kloroform (CHCl_3) (Merck[®]), metanol (CH_3OH) (Merck[®]), natrium hidroksida (NaOH) (Merck[®]), asam sulfat (H_2SO_4) (Merck[®]) dan n-heksana ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) (Merck[®]).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengambilan Rimpang Kunyit (*Curcuma longa L.*)

Panen rimpang kunyit diambil dari Komplek Halim Permai Jalan Maret RT. 5 RW. 5, Guntung Paikat, Kecamatan Banjarbaru Selatan. Masa saat panen ditandai dengan menguningnya daun, mulai berguguran, dan disusul dengan menguningnya batang sebagai tanda tanaman penuaan tanaman. Pemanenan harus dilakukan dengan hati-hati agar rimpang tidak terpotong, patah atau rusak. Rumpun dibongkar dan rimpang diungkit dengan garpu atau cangkul sehingga seluruh rimpang dapat dikeluarkan. Sisa daun dipotong, akar dan rimpang dibersihkan dari tanah kemudian akarnya dipotong (Evizal, 2013 : 40-41).

3.6.2 Pengolahan Simplisia Rimpang Kunyit (*Curcuma longa L.*)

Rimpang diambil yang berukuran besar, segar dan tidak busuk. Kemudian dilakukan sortasi basah atau memisahkan produk yang sudah bersih. Tahap selanjutnya adalah dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran dan mengurangi mikroba yang menempel pada rimpang kunyit. Pencucian dilakukan beberapa kali (Kusumaningrum *et al.*, 2015).

Setelah itu, perajangan dilakukan secara membujur atau melintang. Perajangan dilakukan untuk memperoleh ketebalan yang memudahkan proses pengeringan dan merata. Pemotongan yang terlalu tebal membuat bahan tidak mudah kering dan lebih cepat terkontaminasi mikroba sehingga dapat menurunkan kualitas. Jika terlalu tipis akan mudah patah dan mengurangi kandungan bahan aktif (Kusumaningrum *et al.*, 2015). Tahap pemanasan dan pengeringan dilakukan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 5 jam (Maharani, 2023). Rempah kunyit kering selanjutnya disortasi kering dilakukan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih tertinggal pada simplisia kering. Kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, kunyit yang telah dihaluskan kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 40. Setelah itu serbuk disimpan di wadah tertutup rapat pada suhu ruang (Pramitha *et al.*, 2023).

3.6.3 Pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO) Menggunakan Metode

Fermentasi

Tahapan pertama pada penelitian ini yaitu dipilih kelapa yang sudah tua karena memiliki kadar minyak atau lemak yang tinggi. Dipisahkan daging buah kelapa dari batok kelapa. Diparut daging buah kelapa dan ditambahkan air aquadest menggunakan perbandingan 1:2 kemudian dilakukan perendaman selama 10-15 menit agar kelapa parut tercampur dengan air akuades secara merata. Diperas dan disaring

rendaman kelapa menggunakan kertas saring. Dimasukkan perasan kelapa ke dalam toples dan didiamkan 2-3 jam hingga terbentuk dua lapisan yaitu krim dan skim (Dewi *et al.*, 2019).

Krim yang telah terbentuk diambil sebanyak 100 mL, sebelum ditambahkan ragi roti terlebih dahulu melakukan proses aktivasi ragi dengan cara melarutkan 0,5 g ragi ke dalam 100 mL air kelapa hangat dan diamkan selama 2 jam. Setelah itu masukkan ragi roti ke dalam krim lalu diaduk hingga merata dan kemudian diamkan selama 24 jam hingga terbentuk 3 lapisan yaitu VCO, blondo, dan air (Sembodo & Lusiani, 2023). Ambil dan saring VCO menggunakan kertas saring, kemudian masukkan ke dalam wadah tertutup rapat. Dilakukan perhitungan rendemen VCO:

$$\%rendemen\ VCO = \frac{\text{bobot minyak yang diperoleh}}{\text{bobot kelapa parut}} \times 100\%$$

3.6.4 Penambahan Simplisia Rimpang Kunyit (*Curcuma longa L.*)

Terhadap *Virgin Coconut Oil* (VCO)

Metode yang digunakan yaitu dari Pramitha *et al.*, (2023) yang telah dimodifikasi. Serbuk rempah kunyit ditimbang dengan perbandingan bahan dan pelarut (VCO) adalah 1:10 (1 gram dalam 10 ml). Masukkan rempah kunyit dan pelarut (VCO) ke dalam wadah tertutup rapat, kemudian sampel dimaserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah 24 jam hasil dari produk VCO dengan penambahan

rempah kunyit kemudian disaring menggunakan kertas saring dan siap diuji.

3.7 Teknik Pengumpulan Data

3.7.1 Pengujian Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan lima orang panelis mengamati kualitas VCO metode fermentasi meliputi warna dan bau dengan alat indra. Pengujian secara subjektif dari hasil masing-masing panelis (Anwar & Salima, 2016). Sebelum panelis melakukan pengamatan, peneliti memberikan penjelasan dan cara mengisi formulir penilaian sampel (Sari *et al.*, 2014).

3.7.2 Penentuan Bilangan Asam Lemak Bebas

Sampel VCO digunakan sebanyak 2,5 g, dimasukkan dalam erlenmeyer berukuran 250 mL, ditambahkan etanol 95% sebanyak 25 mL. Ditambahkan indikator phenoftalein 0,5% sebanyak 3-5 tetes. dilakukan titrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N hingga berubah warna atau warna merah jambu dan tidak hilang dalam waktu 15 detik (Dewi *et al.*, 2019). Kemudian dilakukan perhitungan pada jumlah NaOH untuk melakukan titrasi, catat untuk dihitung hasil dari kadar asam lemak bebas. Diperoleh asam lemak bebas selanjutnya dilakukan perhitungan menggunakan rumus (Bouta *et al.*, 2020) :

$$\text{Asam lemak bebas} = \frac{M \times A \times N}{1000 \times G} \times 100\%$$

Keterangan:

M = Bobot molekul asam lemak (minyak kelapa = 200)

A = Volume NaOH untuk titrasi (mL)

N = Normalitas larutan NaOH G = Berat sampel (gram)

3.7.3 Penentuan Bilangan Peroksida

a. Pembuatan Larutan Induk Fe (IDF, 1991)

Larutan stok Fe dibuat dengan cara melarutkan serbuk besi sebanyak 0,05 g ke dalam 5 mL HCl 10 M, kemudian ditambahkan hidrogen peroksida 30% sebanyak 0,5 mL. Panaskan larutan selama 5 menit lalu dinginkan hingga suhu kamar kemudian ditepatkan dengan aquadest dalam labu ukur 50 mL (Muqasyifah *et al.*, 2020).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum dilakukan analisis bilangan peroksida, terlebih dahulu menentukan panjang gelombang menggunakan Spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan agar dapat memberikan kepekaan sampel dengan maksimal. Menurut (Morti *et al.*, 2018). Senyawa-senyawa yang berwarna dalam analisis UV- Vis berada pada rentang 400-700 nm. Pengukuran bilangan peroksida menggunakan besi klorida (FeCl_2) dan amonium tiosianat (NH_4SCN).

c. Penentuan Kurva Baku Standar

Sebelum dilakukan pengukuran dengan Spektrofotometer UV-Vis, terlebih dahulu membuat larutan Fe dengan konsentrasi 100 ppm, dibuat dengan cara mengencerkan 5 mL larutan yang telah dibuat sebelumnya (Larutan induk 1.000 ppm) lalu ditambahkan larutan kloroform dan metanol 7:3 ke dalam labu ukur 50 mL.

Kemudian membuat serial larutan standar dengan memasukkan 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,6 ppm, 0,8 ppm, dan 1 ppm larutan stok Fe 100 mg/mL ke dalam 5 buah labu ukur 10 mL, menambahkan larutan NH₄SCN dan 0,05 mL larutan FeCl₂, kemudian mengencerkan dan menepatkan menggunakan larutan campuran kloroform dan metanol (Muqasyifah *et al.*, 2020).

d. Analisis Bilangan Peroksida (IDF, 1991)

Sampel VCO murni dan VCO yang sudah ditambahkan rempah kunyit masing-masing ditimbang sebanyak 0,3 g, masukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 0,05 mL NH₄SCN. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan panjang gelombang yang telah ditetapkan (E_0). Setelah itu, ditambahkan larutan FeCl₂ sebanyak 0,05 mL, lalu dikocok larutan dan didiamkannya selama 5 menit. Kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang yang telah ditetapkan didapatkan (E_2). Tambahkan 10 mL campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 7:3 ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 0,05 mL NH₄SCN dan 0,05 mL FeCl₂. Lalu diamkan selama 5 menit kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 500 nm (E_1) (Muqasyifah *et al.*, 2020). (Muqasyifah *et al.*, 2020). Menggunakan rumus:

$$y = E_2 - (E_1 + E_0) \quad (1)$$

Keterangan:

y = $bx + a$ (nilai persamaan regresi linier)

E_2 = Hasil pengukuran absorbansi FeCl₂

E_1 = Hasil pengukuran absorbansi Blanko Fe

E_0 = Hasil pengukuran absorbansi NH_4SCN

Perbedaan dari absorbansi sampel akan digunakan untuk menentukan konsentrasi Fe pada sampel dengan berdasarkan kurva standar. Nilai perbedaan absorbansi dimasukkan dalam persamaan kurva standar ($y = a+bx$) dari larutan standar yang telah didapatkan untuk mengetahui konsentrasi Fe yang terbaca pada sampel. Konsentrasi sampel kurva standar (x) disebut dengan m. Bilangan peroksida sampel (miligramekuivalen oksigen perkilogram) ditentukan dengan rumus:

$$\text{Bilangan peroksida} = \frac{M \times 1000}{55,84 \times m_0} \times 0,0101$$

Keterangan:

M = Konsentrasi Fe pada sampel (mg/L)
 Mo = Massa sampel (g) 30
 55,84 = Massa relatif Fe (g/mol)
 1000 = Faktor konversi (1000 g/kg)
 0,0101 = Volume akhir larutan dalam kuvet (L)

3.7.4 Pengujian Gas Chromato-graphy Mass Spectrometry (GC-MS)

Sebelum menginjeksikan sampel ke dalam instrumen GC-MS, sampel minyak disiapkan dengan mengatur 50 g sampel VCO dan menambahkan 400 μL NaOH Metanol. Campuran ini diaduk dan dipanaskan pada suhu 50° C selama 10 menit. Setelah dingin, tambahkan masing-masing 1 mL CH_3COOH , 1 mL aquadest dan 1 mL n-heksana. Kemudian di vortex dan didinginkan selama beberapa menit di mana dua lapisan terbentuk sebagai hasilnya. Pada lapisan atas diambil sekitar 1 μL

sebagai sampel yang akan diinjeksikan dan dianalisis dalam GC-MS, Shimadzu QP2010 dilengkapi dengan kolom kapiler 30 m × 0,25 mm ID; 0,25 µm dengan menginjeksikan sampel ke dalam kolom kapiler. Gas pembawanya adalah helium, di mana suhu injektor dan detektor diatur pada 280° C. Injeksi dilakukan menerapkan mode split (1:30). Suhu kolom diprogram untuk berubah dari 50° C ke 280° C dengan kecepatan 5° C per menit. Etil ester asam lemak dipisahkan dengan tekanan konstan (100 kPa), dan diidentifikasi puncaknya melalui perbandingan spektra massa dengan spektra massa sebagai dasar data (standar internal). Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan spektrum massa spektrum massa dengan NIST Mass Spectral Library 2008 (Suryani *et al.*, 2020).

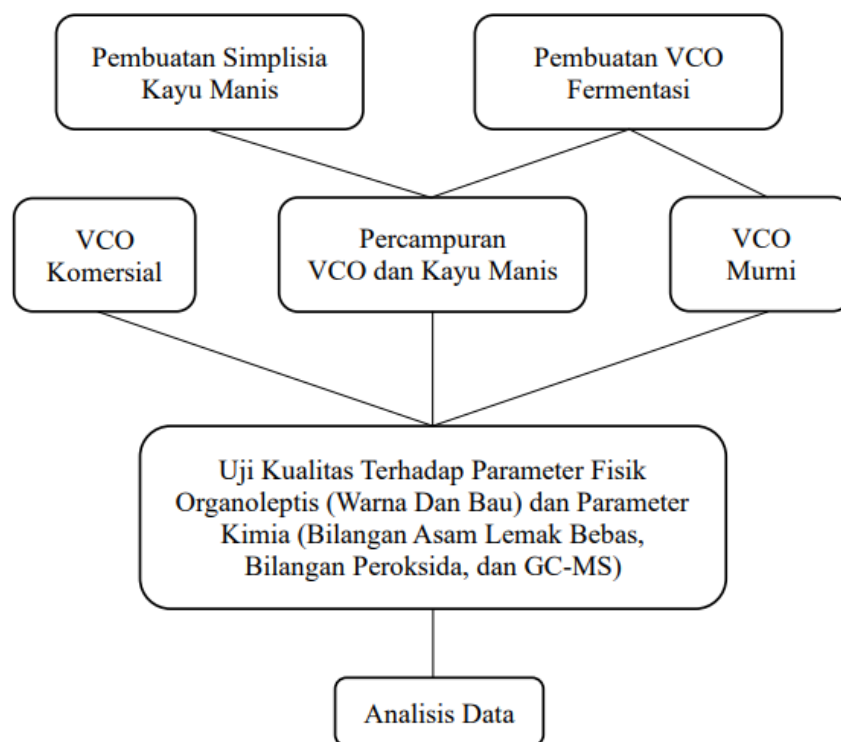
3.8 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan yaitu uji organoleptik, bilangan asam bebas, bilangan peroksida dan GC-MS. Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan lima orang panelis. Sedangkan hasil uji dari bilangan asam lemak bebas, bilangan peroksida dan GC-MS diolah dengan SPSS untuk mendapatkan hasil rata-rata. Kemudian melakukan uji normalitas, uji homogenitas dan uji parametrik.

Pengujian uji normalitas dilakukan dengan uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* karena jumlah sampel yang digunakan < 50 (Sintia *et al.*, 2022). Uji normalitas digunakan untuk memperlihatkan bahwa sampel berasal dari populasi yang terdistribusi normal. Data dapat dikatakan normal

apabila Signifikansi $> 0,05$. Jika Signifikansi $< 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal (Noor, 2014). Uji homogenitas dilakukan untuk melihat data terdistribusi secara normal dan homogen dengan ditunjukkannya Signifikansi $> 0,05$. Jika data dinyatakan terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan uji parametrik *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% ($p = 0,05$). Uji *One Way Anova* digunakan untuk menganalisis ada atau tidak adanya perbedaan pada variabel bebas dan variabel terikat dengan adanya dua sampel atau lebih. Apabila data yang didapatkan tidak terdistribusi normal dan homogen atau hanya salah satu yang terdistribusi normal maupun homogen maka akan dilakukan uji non parametrik (Rahmatullah *et al.*, 2021).

3.9 Skema Penelitian



Gambar 6. Skema Penelitian