

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dan rancangan *Posttest-Only with Control Group Design*. Kelompok perlakuan yang diujikan adalah minyak VCO dengan metode enzimatis dan penambahan antioksidan ekstrak metanol daun Binjai pada beberapa konsentrasi yaitu 0%, 2%, 4%, dan 6%. Parameter fisik yang diamati adalah organoleptis (bau dan warna) dan kadar air serta parameter kimia yang diamati adalah asam lemak bebas dan bilangan peroksida. Jumlah pengulangan untuk setiap kelompok adalah 6 kali diperoleh dari hasil perhitungan menggunakan rumus Federer.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

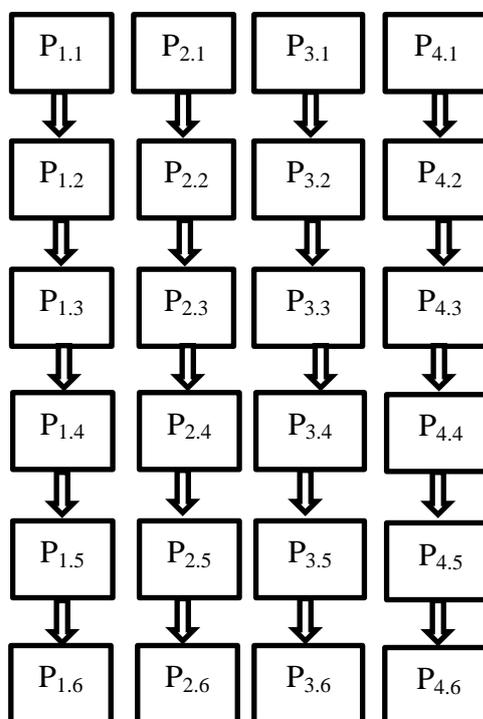
$$n \geq 6$$

keterangan:

t = banyak perlakuan yang dilakukan

n = banyak pengulangan

berdasarkan perhitungan rumus Federar tersebut maka diketahui jumlah perlakuannya sebanyak 6 kali pengulangan.



Gambar 6. Skema Pengulangan

Keterangan:

P₁ = Perlakuan 1 dengan minyak VCO metode enzimatis dengan penambahan antioksidan ekstrak metanol daun Binjai pada konsentrasi 0%.

P₂ = Perlakuan 2 dengan minyak VCO metode enzimatis dengan penambahan antioksidan ekstrak metanol daun Binjai pada konsentrasi 2%.

P₃ = Perlakuan 3 dengan minyak VCO metode enzimatis dengan penambahan antioksidan ekstrak metanol daun Binjai pada

konsentrasi 4%.

P₄ = Perlakuan 4 dengan minyak VCO metode enzimatis dengan penambahan antioksidan ekstrak metanol daun Binjai pada konsentrasi 6%.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian ini dimulai dari bulan Januari sampai bulan Mei 2022. Tempat yang digunakan untuk penelitian ini adalah:

- a. Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari untuk melakukan proses ekstraksi daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. ex. Wall) dan pembuatan VCO (*Virgin Coconut Oil*) dengan metode enzimatis.
- b. Laboratorium Kimia Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Borneo Lestari untuk melakukan uji kualitas dari VCO (*Virgin Coconut Oil*) dengan penambahan variasi konsentrasi antioksidan dari ekstrak metanol daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. ex. Wall) yang dilihat dari parameter fisik organoleptis (warna dan aroma) dan parameter kimia (kadar air, bilangan asam lemak bebas, dan bilangan peroksida).

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variasi kadar ekstrak metanol daun binjai (*Mangifera caesia* Jack. ex. Wall) terhadap pengaruh kualitas VCO.

3.3.2. Variabel Terikat

Hasil evaluasi fisik organoleptis dan parameter kadar air, asam lemak bebas, bilangan peroksida sesuai SNI 7381:2008.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat soklet (*Pyrex*[®]), aluminium foil, ayakan mesh 40 (*Standard Sieves*[®]), blender, buret (*Pyrex*[®]), gelas beker (*Pyrex*[®]), cawan porselin, corong kaca (*Pyrex*[®]), desikator (*NORMAX*[®]), erlenmeyer (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), hot plate (*Kenko*[®]), kaca arloji, kuvet (*Quartz Cuvette*[®]), labu ukur (*Pyrex*[®]), neraca analitik (*OHAUS*[®]), oven (*Heraterm*[®]), pipet tetes, pipet ukur (*Pyrex*[®]), pipet mikro (*DRAGON LAB*[®]), rotary evaporator (*IKFR10*[®]), statif dan klem, spektrofotometer UV-Vis (*PG instrument*[®]), thermometer (*Onemed*[®]) dan waterbath (*Mammert*[®]).

3.4.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ammonium tiosianat (NH_4SCN) (*Merck*[®]), asam klorida (HCl) (*Merck*[®]), aquadest, daging buah kelapa, daging buah nanas, daun Binjai yang

diperoleh dari Kota Banjarbaru (Kalimantan Selatan), feroklorida (FeCl_2) (*Merck*[®]), etanol 70% (*Onemed*[®]), etanol 96% (*Onemed*[®]), hidrogen peroksida (H_2O_2) (*Onemed*[®]), indikator phenolptalein (PP) (*Smart LAB*[®]), Kloroform (CHCl_3) (*Merck*[®]), metanol p.a (CH_3OH) (*Merck*[®]), metanol teknis (CH_3OH), Natrium hidroksida (NaOH) (*Merck*[®]), serbuk besi (Fe) (*Merck*[®]).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall)

Daun Binjai berasal dari kelurahan Guntung Manggis, Kecamatan Landasan Ulin, Kota Banjarbaru, Provinsi Kalimantan Selatan. Dilakukan pengambilan daun Binjai secara teliti. Diambil daun Binjai yang telah matang, daun tersebut berada pada susunan daun keempat dari pucuk sampai daun ke-lima dari pangkal (Dwidhanti dkk., 2018).

3.5.2. Pengolahan Simplisia Daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall)

Dilakukan sortasi basah pada daun Binjai, kemudian dicuci dan dirajang daun Binjai menjadi potongan-potongan yang lebih kecil. Kemudian dikeringkan daun Binjai pada ruangan yang terhindar dari cahaya matahari secara langsung, dilakukan pengeringan selama empat hari hingga daun Binjai menjadi kering. Kemudian dilakukan penyerbukan daun Binjai yang telah kering lalu dihaluskannya menggunakan alat *blender*. Setelah itu

dilakukan pengayakan dengan ayakan ukuran 40 mesh pada serbuk simplisia tersebut agar didapatkan serbuk yang halus (Khairiah dkk, 2018).

3.5.3. Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. ex. Wall) dengan Metode Sokletasi

Dibungkus serbuk simplisia daun Binjai sebanyak 25 g dengan kertas saring, kemudian diikat bungkus dengan benang pada kedua ujungnya dan dimasukkan ke dalam alat soklet. Dimasukkan pelarut metanol ke dalam labu soklet sebanyak 125 mL. Perbandingan antara serbuk dan pelarut adalah 1:5. Kemudian dilakukan proses sokletasi pada suhu pemanasan antara 60°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Dilakukan pemekatan ekstrak cair yang diperoleh dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Diuapkan pelarut yang tersisa dengan penangas air pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian ditimbang ekstrak tersebut (Shinde & Chavan, 2014; Rosita dkk., 2017; Wahyuningrum dkk., 2018; Riniati, 2019). dilakukan perhitungan rendemen dari ekstrak metanol daun Binjai menggunakan rumus:

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot total ekstrak}}{\text{bobot total serbuk}} \times 100\%$$

3.5.4. Pembuatan Santan

Dipilih buah kelapa tua yang ditandai dengan kulit luar berwarna merah kehitaman atau kecokelat-cokelatan. Dikupas buah kelapa kemudian dihaluskan daging kelapa dengan mesin pamarut.

dicampurkan daging buah kelapa hasil parutan dengan air suhu 40°C, dengan perbandingan air dan hasil parutan kelapa 1:2 yaitu untuk 1000 g kelapa halus membutuhkan 500 mL air dengan suhu 40°C. kemudian dicampur, diperas dan disaring untuk memperoleh santan, dimasukkan santan ke dalam wadah tansparan tertutup (Ismanto dkk, 2018).

3.5.5. Pembuatan Sari Buah Nanas

Dikupas buah nanas segar, lalu dicuci daging buah nanas dengan air mengalir. Kemudian diparut daging buah nanas atau *diblender*, lalu disaring dan diperas kemudian ditampung dalam wadah bersih. Sari buah nanas siap digunakan (Ismanto dkk, 2018).

3.5.6. Pembuatan VCO (*Virgin Coconut Oil*) dengan Metode Enzimatis

Setelah ditampung santan didalam wadah transparan tertutup, kemudian didiamkan selama 6 jam sampai terbentuk lapisan krim dan air. Setelah terpisah diambil bagian krim dan air, kemudian dibuang. Kran bagian bawah dibuka agar dibuang bagian airnya. Selanjutnya dimasukkan krim ke dalam *counter* atau wadah, lalu ditambahkan 5% sari buah nanas ke dalam *counter* atau wadah yang berisi krim. Setelah itu dihomogenkan krim dan sari buah nanas dengan cara diaduk dengan sendok pengaduk, lalu didiamkan selama 24 jam. Setelah itu akan terbentuk 3 lapisan yaitu *blondo*, minyak dan air. Lapisan minyak berada pada lapisan tengah. Dipisahkan minyak dari *blondo* (krim santan) menggunakan sendok,

kemudian disaring dengan kertas saring hingga didapatkan VCO (Harimurti dkk., 2020). Dilakukan perhitungan rendemen dari bobot VCO yang diperoleh dibandingkan dengan bobot kelapa parut yang digunakan menggunakan rumus:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot minyak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot kelapa parut (g)}} \times 100\%$$

3.5.7. Penambahan Ekstrak Metanol Daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. ex. Wall) Terhadap VCO (*Virgin Coconut Oil*)

Ditambahkan ekstrak metanol daun Binjai pada hasil pembuatan VCO dengan metode enzimatik dengan variasi konsentrasi (0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 6 ppm). Kemudian dilakukan pengujian antara lain organoleptis, kadar air, asam lemak bebas dan bilangan peroksida, pada masing-masing perlakuan (Dewi dkk, 2019).

3.5.8. Pengujian Organoleptis

Dilakukan pengujian organoleptis dengan lima orang panelis tidak terlatih. Dilakukan pengamatan pada setiap panelis meliputi warna dan aroma dari VCO murni dan VCO yang sudah ditambahkan ekstrak. Diberi label pada sampel berupa kode yang tidak dapat ditebak. Sebelum diamati panelis, diberikan penjelasan dan intruksi oleh peneliti terlebih dahulu terkait cara pengamatan tiap sampel dan pengisian formulir penilaian sampel (Kartika, 2014). Format formulir penilaian uji organoleptis dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5.9. Penentuan Kadar Air

Dikeringkan cawan kosong dalam oven selama 15 menit lalu didinginkan ke dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang hingga berat konstan. Setelah itu, ditimbang sampel VCO murni dan VCO yang sudah ditambahkan ekstrak masing-masing sebanyak 3 g, lalu dimasukkan ke dalam cawan. Kemudian cawan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian dipindahkan cawan ke dalam desikator selama 15 menit. Setelah dingin timbang kembali kemudian dikeringkan kembali selama 30 menit dan diulangi kembali sampai didapat berat yang konstan (Effendi dkk, 2012). Kemudian dilakukan perhitungan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{\text{Berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

3.5.10. Penentuan Asam Lemak Bebas

Ditimbang sampel VCO murni dan VCO yang sudah ditambahkan ekstrak masing-masing sebanyak 2,5 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL, kemudian ditambahkan 25 mL etanol 95% serta indikator fenolftalein (PP) 0,5% sebanyak 3-5 tetes. Lalu dititrasi dengan larutan standar NaOH 0,1 N hingga timbul warna merah muda dan tidak hilang dalam 15 detik (Dewi dkk, 2019). Setelah itu dihitung jumlah

NaOH yang digunakan untuk titrasi dicatat untuk dihitung kadar asam lemak bebas, dengan menggunakan rumus:

$$\%FFA = \frac{M \times A \times N}{1000 \times G} \times 100\%$$

Keterangan:

M = bobot molekul asam lemak

A = volume NaOH untuk titrasi (mL)

N = normalitas larutan NaOH

G = berat sampel (g)

3.5.11. Penentuan Bilangan Peroksida

a. Pembuatan Larutan Induk Fe 1000 ppm

Ditimbang serbuk besi sebanyak 0,05 g ke dalam 5 mL HCl 10 M, kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan hidrogen peroksida 30%. Dipanaskan larutan selama 5 menit lalu dinginkan hingga suhu kamar, kemudian ditepatkan dengan aquades dalam labu ukur 50 mL. (Muqasyifah dkk., 2020).

b. Pembuatan Kurva Baku

Sebelum dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis, terlebih dahulu membuat larutan Fe dengan konsentrasi 100 ppm, dibuat dengan cara diencerkan 5 mL larutan yang telah dibuat sebelumnya (larutan induk Fe 1000 ppm) kemudian ditambahkan larutan kloroform dan metanol dengan perbandingan 7 : 3 ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian dibuat variasi konsentrasi 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,6

ppm, 0,8 ppm dan 1 ppm dalam labu ukur 10 mL, dibuatnya dengan cara diencerkan larutan Fe yang telah dibuat sebelumnya (larutan Fe 100 ppm). Kemudian ditambahkan larutan NH_4SCN 0,05 mL dan 0,05 mL Larutan FeCl_2 . Lalu diencerkan dengan larutan kloroform dan metanol pada perbandingan 7 : 3. Kemudian didiamkan selama 5 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 500 nm (Muqasyifah dkk., 2020).

c. Analisis Bilangan Peroksida

Ditimbang sampel VCO murni dan VCO yang sudah ditambahkan ekstrak masing-masing sebanyak 0,3 g, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 10 mL campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 7 : 3. Lalu dimasukkan 0,05 mL NH_4SCN . Kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 500 nm (E_0). Setelah itu, ditambahkan larutan FeCl_2 sebanyak 0,05 mL, lalu dikocok larutan dan didiamkannya selama 5 menit. Kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 500 nm (E_2) (Muqasyifah dkk., 2020).

d. Pembuatan Larutan Blanko

Ditambahkan 10 mL campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 7 : 3 ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan 0,05 mL NH_4SCN dan 0,05 mL FeCl_2 . Lalu

didiamkan selama 5 menit kemudian diukur absorpsi pada panjang gelombang 500 nm (E_1) (Muqasyifah dkk., 2020). Ditentukan perbedaan nilai absorpsi (y) dengan menggunakan rumus:

$$y = E_2 - (E_1 + E_0)$$

Perbedaan dari absorpsi sampel akan berguna untuk menentukan konsentrasi Fe pada sampel dengan berdasarkan kurva standar. Dimasukkan nilai perbedaan absorpsinya dalam persamaan kurva standar ($y = a + bx$) dari larutan standar untuk mengetahui konsentrasi Fe yang terbaca pada sampel. Konsentrasi sampel kurva standar (x) disebut dengan m (Muqasyifah dkk., 2020). Dihitung bilangan peroksida, dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

M = Konsentrasi Fe pada sampel (mg/L)

M_0 = Massa sampel (g)

55,84 = Massa relatif Fe (g/mol)

1000 = Faktor konversi (1000 g/kg)

0,0101 = Volume akhir larutan dalam kuvet (L)

3.6. Analisa Hasil

Tahapan analisa data adalah organoleptis, kadar air, asam lemak bebas dan bilangan peroksida. Uji organoleptis, dilakukan pengamatan secara deskripsi pada lima orang panelis. Sedangkan data yang diolah adalah nilai hasil uji kadar air, asam lemak bebas dan bilangan peroksida pada VCO murni dan VCO yang dibuat dengan penambahan antioksidan ekstrak metanol daun Binjai. Diolah dengan SPSS Statistisk sehingga mendapatkan hasil rata-rata. Kemudian melakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji noormalitas menggunakan uji *Saphiro-wilk* karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50 (Rahmatullah dkk., 2021).

Uji homogenitasnya menggunakan uji *Levene test*. Apabila hasil uji normalitas dan uji homogenitas data $p \text{ value} > 0.05$ menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen, maka dapat melanjutkan menggunakan stastistik uji parametrik *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% ($p=0,05$). *One Way Anova* adalah uji yang digunakan untuk menganalisa ada atau tidaknya perbedaan beberapa variabel bebas dengan sebuah variabel terikatnya dengan dua sampel atau lebih. Apabila data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen atau hanya salah satu saja, maka melanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal-wallis* (Rahmatullah dkk., 2021).