

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan model desain eksperimental. Penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan dari suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan berupa berbagai sediaan buah bit, yaitu sari, rebusan dan ekstrak. Selanjutnya dilakukan validasi metode yang akan didapatkan hasil dari uji linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ), data hasil akan dianalisis. Penetapan kadar vitamin C dilakukan dengan menggunakan metode Spektrofotometri UV, kemudian data hasil kadar vitamin C yang didapatkan dilakukan analisis statistika dengan menggunakan SPSS.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan melakukan determinasi tumbuhan. Tumbuhan bit dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian selanjutnya dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah buah bit yang didapatkan dari pertanian buah bit di Desa Kopeng yang berada di lereng Gunung Merbabu, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel penelitian pada penelitian ini adalah perbedaan kondisi perlakuan yang diberikan kepada buah bit yaitu berupa sari, rebusan dan ekstraksi.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
Vitamin C dalam berbagai sediaan buah bit yaitu, sari, rebusan dan ekstrak	Senyawa vitamin C yang terdapat dalam buag bit	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal
Suhu perebusan 80°C	Proses perebusan dengan air, air digunakan sebagai media pengolahan	Thermometer	Nominal
Validasi metode	Penilaian terhadap metode yang digunakan, parameternya meliputi linieritas, LOD dan LOQ, presisi serta akurasi	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai sediaan buah bit yaitu, berupa sari, rebusan dan ekstrak.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar vitamin C dalam berbagai sediaan buah bit dengan Spektrofotometri UV.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah suhu pemanasan yang tidak boleh melebihi 80°C.

F. Pengumpulan Data

a. Alat

Batang pengaduk, cawan porselin, aluminium foil, satu set alat maserasi, mortir dan stamper, gelas beaker 500 mL, gelas beaker 5 mL, gelas erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 25 mL, labu ukur 100 mL, labu ukur 50 mL, labu ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet tetes, kaca arloji, *pushball*, penjepit tabung reaksi, tabung reaksi, kertas saring, kain flanel, eksikator, kuvet, thermometer, *rotary vacuum evaporator* (RE 100-Pro), spatula, spektrofotometer UV (Shimadzu UV-1900i), timbangan analitik (OHAUS & Excellent), tanur (Thermo Scientific), *oven* (Binder dan Memmert), *waterbath* (Mettler) dan *hot plate* (Maspion S-302).

b. Bahan

Bahan yang digunakan adalah buah bit, asam askorbat (Merck), aqua destilata, etanol 96% (Smart-Lab), H₂SO₄ dan asam asetat.

c. Subjek penelitian

Subyek Penelitian adalah sumber data yang diperoleh yang dapat memberikan keterangan kepada peneliti. Subjek yang digunakan pada penelitian ini ada tiga, yaitu perbedaan kondisi perlakuan dari buah bit. Perbedaan perlakuan ini adalah penyarian, perebusan dan ekstraksi.

d. Prosedur Kerja

Preparasi sampel dilakukan pada buah bit yang dimulai dari disortasi, dipilih dengan kriteria kondisi buah yang utuh, tidak luka dan segar. Sampel dibuat dalam tiga perlakuan yang berbeda yaitu sari, rebusan dan ekstrak. Proses validasi metode dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang dilakukan sudah cukup akurat dan tepat dalam menganalisa data. Parameter pada validasi metode ini adalah linieritas, LOD dan LOQ presisi, dan akurasi.

Penetapan kadar vitamin C dilakukan dengan metode spektrofotometri UV dengan proses yaitu pembuatan larutan baku vitamin C dengan asam askorbat, validasi metode, kemudian dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum larutan vitamin C, penentuan operating time dan penentuan kurva kalibrasi. Sampel dianalisa sehingga akan didapatkan kadar vitamin C. Hasil yang diperoleh dari validasi metode yaitu berupa hasil dari parameter-parameter uji linieritas, LOD dan LOQ, presisi, dan

akurasi akan diolah dan selanjutnya untuk hasil penetapan kadar vitamin C dibuat analisa statistika dengan menggunakan SPSS.

G. Prosedur Penelitian

1. Preparasi sampel

a. Pembuatan sari buah bit

Penyarian buah bit dimulai dengan buah bit yang disortasi dan dipilih dengan kriteria kondisi masih utuh, tidak luka dan segar, selanjutnya buah dipisah dari daging dan kulit dengan cara mengupas bagian kulit luar buah, buah dicuci hingga bersih dan ditiriskan. Proses selanjutnya yaitu pengecilan buah dengan menggunakan pisau. Daging buah yang telah dipotong ditimbang sebanyak 100 g, hancurkan dengan menggunakan blender untuk mendapatkan bubur buah, tujuannya untuk mendapatkan sari buah yang maksimal sambil ditambahkan aquadest sebanyak 10 mL secara bertahap. Buah bit yang telah dihancurkan kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan sari buah bit dengan ampasnya.

b. Pembuatan rebusan buah bit

Pembuatan rebusan atau perebusan buah bit dimulai dengan proses sortasi dan dipilih dengan kriteria kondisi masih utuh, tidak luka dan segar, selanjutnya buah dipisah dari daging dan kulit dengan cara mengupas bagian kulit luar buah. Pembuatan rebusan buah bit dilakukan dengan pencucian buah bit hingga bersih dan selanjutnya dikupas. Buah bit yang

sudah dikupas dipotong kecil-kecil, kemudian 100 gram direbus dalam 100 mL air mendidih dengan suhu 80°C selama 10 menit. Hasil rebusan disaring dengan kertas saring agar daging buah bit yang telah direbus terpisah dengan air rebusannya. Daging buah bit yang telah direbus digerus sambil ditambahkan aquadest sebanyak 10 ml secara bertahap, gerus hingga halus. Saring kembali hingga didapatkan filtrat.

c. Pembuatan ekstrak etanol buah Bit

1) Pengolahan sampel

Pengolahan sampel untuk ekstrak etanol buah bit dimulai dengan pemilihan buah bit dengan kondisi yang masih utuh, tidak luka dan buahnya masih segar, selanjutnya buah bit dikupas dari kulitnya, kemudian dicuci bersin dan potong tipis. Daging buah yang sudah dipotong tipis dikeringkan hingga kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia selanjutnya dilakukan pengujian kadar air dan kadar abu, kemudian dilanjutkan dengan proses ekstraksi.

2) Ekstraksi sampel

Proses pembuatan ekstrak etanol buah bit dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk buah bit ditimbang sebanyak 100 gram kemudian direndam dalam toples kaca dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Perbandingan ekstrak dan pelarut adalah 1:5 yaitu sebanyak 500 ml etanol 96% kemudian diaduk secara perlahan. Tutup rapat dan lapiisi tutupnya dengan menggunakan aluminium foil dan

simpan di tempat yang tidak terkena matahari langsung. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari agar zat aktif terekstraksi semuanya yang disimpan di suhu kamar dan diaduk setiap 6 jam sekali. Saring menggunakan kain flannel dan kertas saring, lalu lakukan penguapan hasil filtrasi dalam rotary vacuum evaporator dengan suhu 50°C dan dilanjutkan dengan penguapan di *waterbath* hingga didapat ekstrak kental. Pengujian selanjutnya adalah kadar abu, kadar air dan bebas etanol.

3) Kadar Abu

Kadar abu dari suatu produk menunjukkan kandungan mineral yang terdapat dalam bahan tersebut, kemurnian, serta kebersihan suatu produk yang dihasilkan. Kadar abu dilakukan dengan bahan ditimbang sebanyak 2 gram dipijarkan perlahan-lahan pada suhu 500-600°C hingga berubah menjadi abu berwarna putih. Kadar abu total kemudian dihitung. Parameter standar yang berlaku adalah tidak lebih dari 16,6% (Kemenkes RI, 2017). Rumus dari kadar abu adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu} = \frac{(B - A)}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

- A = Berat cawan kosong (gr)
- B = Berat cawan dan sampel setelah perlakuan (gr)
- C = Berat sampel (gr)

4) Kadar Air

Kadar air ditentukan berdasarkan perbedaan berat sampel sebelum dikeringkan dan sesudah dikeringkan. Analisa kadar air

dilakukan dengan cara menimbang bahan sebanyak 2 gram dalam cawan porselin yang sudah diketahui bobotnya. Bahan kemudian dikeringkan dengan oven dalam suhu 100-105°C selama 3-5 jam. Bahan yang sudah dikeringkan didinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Panaskan lagi dalam oven selama 30 menit, dinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Perlakuan ini diulang hingga tercapai berat yang konstan, selisih penimbangan berturut-turut adalah kurang dari 0,2. Batas kadar air yang ditetapkan adalah $\leq 10\%$ (Utami et al., 2017). Rumus dari penentuan kadar air adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{C - (B - A)}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

- A = Berat cawan kosong (gr)
- B = Berat cawan dan sampel setelah perlakuan (gr)
- C = Berat sampel (gr)

5) Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih terdapat atau tidak etanol yang terkandung di dalam ekstrak (Tivani et al., 2021). Uji bebas etanol dilakukan dengan memasukkan 10 mg ekstrak kental ke dalam tabung reaksi, tambahkan 2 tetes H₂SO₄ dan 2 tetes asam asetat lalu panaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol jika tidak terdapat bau ester yang khas etanol.

2. Validasi Metode

a. Linearitas

Uji linearitas diuji dengan membuat larutan baku standar vitamin C 100 ppm ke dalam seri konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm dengan menyiapkan lima labu ukur 10 mL, selanjutnya mengambil 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL dan 1,2 mL larutan standar vitamin C 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur. Aquadest ditambahkan hingga tanda batas. Pengujian dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis. Uji linearitas dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

b. LOD dan LOQ

LOD dan LOQ didapatkan dengan absorbansi larutan baku hasil pengukuran dimasukkan ke dalam persamaan garis linier yang diperoleh. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dihitung melalui persamaan garis linier dari kurva kalibrasi. Data hasil perhitungan yang didapatkan seluruhnya dianalisis.

c. Presisi

Uji presisi dilakukan dengan cara metode pengulangan (*repeability*) yang dilakukan pada larutan konsentrasi 6 ppm. Konsentrasi 6 ppm dibuat dengan cara larutan baku standar vitamin C 100 ppm dipipet 0,6 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Aquadest ditambahkan hingga tanda batas. Uji presisi dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan.

d. Akurasi

Akurasi pada penelitian ini dilakukan dengan metode *standart addition method* (penambahan baku). Uji akurasi dilakukan dengan menyiapkan 3 labu ukur 10 mL. Perbandingan antara ekstrak dan standar adalah 7:3. Sampel bit dipipet sebanyak 7 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur. Tambahkan larutan baku masing-masing sebanyak 3 mL dengan konsentrasi konsentrasi 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Uji akurasi dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

3. Penetapan Kadar Vitamin C

a. Pembuatan larutan standar vitamin C

Larutan standar vitamin C 1000 ppm dibuat dengan menimbang sebanyak 100 mg asam askorbat, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml yang telah dibungkus dengan aluminium foil. Aquadest ditambahkan sampai tanda batas.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan vitamin C

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan vitamin C dibuat dengan memipet larutan standar vitamin C 100 ppm sebanyak 0,6 mL, masukkan dalam labu ukur 10 ml ditambahkan aquadest hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan konsentrasi 6 ppm. Larutan konsentrasi 6 ppm dimasukkan ke dalam kuvet. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 200-400 nm dengan aquadest sebagai blanko.

c. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan menyiapkan labu ukur 10 mL dan vitamin C 100 ppm sebanyak 0,6 mL ini dimasukkan lalu ditambahkan aquadest hingga tanda batas. Hihomogenkan hingga didapatkan larutan konsentrasi 6 ppm. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimal yang telah diperoleh dengan interval waktu 1 menit dan dilakukan pembacaan absorbansi selama 30 menit.

d. Penentuan kurva kalibrasi

Penentuan kurva kalibrasi dilakukan dengan memipet larutan vitamin C 100 ppm ke dalam labu ukur 10 mL masing-masing 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL dan 1,2 mL. Aquadest ditambahkan hingga tanda batas. Homogenkan hingga didapat konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm.

e. Penetapan kadar vitamin C pada tiga perlakuan buah bit

Sampel penelitian ini menggunakan tiga sampel buah bit yang telah mendapat tiga bentuk sediaan yang berbeda, yaitu sari, rebusan dan ekstrak. Penetapan kadar dilakukan dengan menyiapkan tiga labu ukur 10 mL. Sampel sari dan rebusan diambil sebanyak 0,1 mL, lalu dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur dan ditambahkan aquades sampai dengan tanda batas. Sampel ekstrak mengambil sebanyak 1 mg, lalu dilarutkan dengan etanol sebanyak 5 mL di dalam *beaker glass*, kemudian masukkan ke dalam labu ukur dan tambahkan etanol hingga tanda batas. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

4. Analisis Data

Data yang didapatkan merupakan data primer yang didapat dari absorbansi sampel yang dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Linearitas ditentukan dengan melakukan pengukuran absorbansi. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian akan dianalisa dengan membuat persamaan garis (*regresi linear*) dan menentukan koefisien relasinya dengan rumus:

$$y = bx + a.$$

Keterangan:

- y : Absorbansi sampel
- a : Slope
- x : Konsentrasi sampel
- b : Intersep

Pengukuran batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ) dapat dihitung dari persamaan regresi linear dari nilai a (slope) dan simpangan baku (SD). Rumus dari LOD dan LOQ adalah sebagai berikut:

$$\text{Limit of Detection (LOD)} = \frac{3 \times \text{SD}}{\text{Slope}}$$

$$\text{Limit of Quantitation (LOQ)} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{Slope}}$$

Keterangan:

- SD : Standar deviasi (Simpangan baku) respon analitika dari blanko
- Slope : Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap analisis blanko (a pada persamaan garis $y = bx+a$)

Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku dan rasio hasil dinyatakan dengan persentase *%recovery*. Hasil persentase *%recovery* untuk kebutuhan analisis dianggap memenuhi

persyaratan jika menunjukkan persentase antara 80-110%. %*Recovery* bisa dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Recovery (\%) = \frac{CF - CA}{C * A}$$

Keterangan:

- CA : Konsentrasi sampel sebenarnya
- CF : Konsentrasi total sampel hasil pengukuran
- C*A : Konsentrasi analit yang ditambahkan

Uji presisi yang dilakukan adalah kategori pengulangan (*repeatability*) dengan 6 kali pengulangan. Presisi ditentukan sebagai simpangan baku (SD) dan %RSD. Ketelitian untuk keperluan analisis dikatakan cukup baik jika nilai %RSD sebesar 2% atau kurang. Rumus perhitungan SD dan %RSD adalah sebagai berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - x)^2}{n - 2}}$$

Keterangan:

- SD : Standar Deviasi
- Xi : Konsentrasi sampel
- X : Rata-rata absorbansi sampel
- N : Jumlah sampel

Rumus perhitungan %RSD adalah sebagai berikut:

$$\%RSD = \frac{\text{standar deviasi (SD)}}{\text{harga rata - rata (x)}} \times 100\%$$

Keterangan:

- X : Kadar rata-rata sampel
- SD : Standar Deviasi
- RSD : *Relative Standard Deviation Linearitas*

Penetapan kadar vitamin C dilakukan dengan pengujian kadar dengan memasukkan ke dalam persamaan regresi linear baku $y = bx + a$ yang dihasilkan oleh seri konsentrasi standar (x) berbanding dengan nilai absorbansi (y). Hasil kadar vitamin C berupa persen (%) dan mg/g. Rumus untuk penentuan kadar vitamin C dalam bentuk persen (%) adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar Vit. C} = \frac{\text{Kadar (ppm)} \times \text{volume pembuatan} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{mg penimbangan}} \times 100\%$$

Rumus untuk penentuan kadar vitamin C dalam bentuk mg/g adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar Vit. C} = \frac{\text{Kadar (ppm)} \times \text{volume pembuatan} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{gram penimbangan}}$$

5. Analisis Statistika

Hasil dari penetapan kadar vitamin C dalam berbagai sediaan buah bit, yaitu sari, rebusan dan ekstrak dibuat dalam analisis statistika. Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan metode analisis varians (anova) satu arah ($\alpha=0,05$) dengan bantuan program SPSS. Jika F hasil perhitungan lebih besar dari pada F tabel dengan $\alpha=0,05$ maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan signifikan pada kadar vitamin C.