

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental yaitu penelitian dengan pengambilan data menggunakan perlakuan terhadap subyek uji dengan mengontrol variabel yang diteliti dan mengendalikan situasi penelitian dari ancaman yang dapat mempengaruhi hasil.

3.2 Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Maret di Laboratorium Analisis Obat dan Narkotika Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat Dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah neraca analitik *Ohaus*, Toples kaca, pisau, telanan, Oven *Memmert UN30*, grinder *Getra Multi Function Disintegrator IC-06B*, alat gelas *Pyrex*, botol semprot, rak tabung reaksi, botol gelap, bola hisap, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, vial, spektrofotometer UV-Vis, pH meter *Eutech pH 700*, mortar dan alu, cawan petri.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L), akuades(H_2O), Asam Klorida (HCl) *Merck*, Etanol 96% p.a *Merck*, kertas saring *Whatman Nomor 42*, Natrium tetraborate dekahidrat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) p.a *Merck*, kalium klorida_(s) (KCl) *Merck*, Natrium Asetat_(s) (CH_3COONa) *Merck*, Natrium Hidroksida_(s) (NaOH) *Merck*, dan aluminium foil *Klinpack*.

3.4 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas terkait dalam penelitian ini adalah pengaruh komposisi variasi perbandingan pelarut dan pengaruh daya simpan.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah *paper test kit* berbasis ekstrak kulit ubi jalar ungu.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Tabel Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Metode	Alat Ukur	Skala Ukur
Variasi komposisi perbandingan pelarut	Pemastian pengaruh jumlah asam dalam campuran pelarut dan melihat perbandingan pelarut yang optimum untuk ekstraksi antosianin kulit ubi jalar ungu	Pengaruh komposisi perbandingan pelarut dilakukan dengan ekstraksi metode maserasi untuk melihat secara visual ekstrak yang dihasilkan	-	Nominal
Kadar Antosianin	Penggunaan kadar antosianin tertinggi yang didapat dari hasil ekstraksi sebagai zat aktif penyusun <i>paper test kit</i>	Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode pH differensial dengan pengukuran pada $\lambda 520\text{nm}$	Spektrofotometer UV-Vis	Rasio

		dan $\lambda 700\text{nm}$		
Daya simpan <i>paper test kit</i>	Uji daya simpan dilakukan dengan penyimpanan <i>paper test kit</i> dalam rentang waktu yang telah ditentukan	Uji daya simpan dilakukan menyimpan tes kit dalam rentang waktu 0 hari, 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu.	<i>Image j</i>	Rasio
<i>Paper test kit</i>	Suatu metode pengujian kualitatif secara sederhana untuk mengidentifikasi adanya cemaran senyawa.	Uji terhadap larutan pH 1-14	<i>Image j</i>	Nominal

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Optimasi campuran pelarut etanol 96%:HCl 1% pada ekstraksi antosianin kulit ubi jalar ungu

Metode ini merujuk pada penelitian Afandy et al., (2017) dengan modifikasi variasi komposisi perbandingan pelarut dan penambahan tahapan pengeringan kulit ubi jalar ungu. Ubi ungu dicuci bersih dan dikupas untuk memisahkan kulit dari umbinya. Kemudian kulit ubi jalar ungu dikeringkan didalam oven bersuhu 50°C. Hasil simplisia kering dihaluskan menggunakan grinder. Ekstraksi dilakukan dengan menimbang serbuk simplisia sebanyak 15 gram dan dilarutkan dengan variasi komposisi perbandingan pelarut yang digunakan yaitu campuran pelarut etanol 96% dan HCl 1% dengan perbandingan (9:1), (7:3), (5:5) dan (3:7). Maserasi akan dilakukan selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan untuk meratakan pelarut sehingga antosianin akan terekstrak sempurna. Ekstrak yang didapat selanjutnya

disaring dengan kertas saring *Whattman no 42* untuk memisahkan filtrat dan residunya.

3.6.2 Penentuan kadar antosianin (AOAC, 2005)

3.6.2.1 Pembuatan larutan pH 1 dan pH 4,5

Larutan buffer pH 1,0 dibuat dengan menimbang sebanyak 1,86 g KCl yang dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 1000 ml sampai batas. Selanjutnya ditambahkan HCl pekat sampai pH mencapai 1,0 ($\pm 0,05$). Sedangkan Larutan pH 4,5 dibuat dengan menimbang sebanyak 54,43 gram natrium asetat (CH_3COONa) yang dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 1000 ml sampai batas. Selanjutnya ditambahkan larutan HCl sampai pH 4,5 ($\pm 0,05$).

3.6.2.2 Pengukuran dan perhitungan konsentrasi antosianin total

Dilakukan pengenceran dengan mengambil ekstrak sebanyak 10 mL yang ditandabatkan dalam labu ukur 50 mL dengan larutan pH 1. Dilakukan pengenceran kembali dengan 10 ml larutan ekstrak yang kemudian ditandabatkan dengan larutan buffer pH 1. Prosedur yang sama dilakukan untuk preparasi sampel menggunakan buffer pH 4,5. Larutan selanjutnya didiamkan selama 30 menit – 1 jam (operating time). Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm. Panjang gelombang 520 nm adalah panjang gelombang maksimum untuk sianidin-3- glukosida sedangkan panjang gelombang 700 nm untuk mengoreksi endapan yang masih terdapat pada sampel. Jika sampel benar-benar jernih maka absorbansi pada 700 nm adalah 0. Perhitungan absorbansi dari sampel yang telah diuji (A) akan ditentukan dengan rumus yang sesuai dengan acuan untuk mendapatkan kadar total antosinin pada masing masing variasi komposisi perbandingan pelarut yang digunakan.

3.6.3 Pembuatan paper tes kit ekstrak kulit ubi jalar ungu

Metode ini merujuk pada penelitian (Suryadnyani et al., 2021) dengan modifikasi ukuran kertas dan pengeringan. Ekstrak kulit ubi jalar ungu dengan kadar antosianin tertinggi kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri. *Paper test kit* dibuat dengan memotong kertas *Whattman* menjadi

berukuran 1x3,5 cm. Kertas tersebut direndam pada ekstrak selama 40 menit dan dikeringkan dengan oven pengering bersuhu 50°C selama 30 menit.

3.6.4 Pengujian daya simpan paper tes kit uji

Paper test dengan kondisi optimum diuji daya simpannya dengan menyimpan *paper test kit* dalam botol gelap dalam rentang waktu 2 minggu, 4 minggu, dan 6 minggu. Pada masing- masing waktu yang telah ditentukan, dilakukan penentuan nilai intensitas cahaya untuk mengetahui ketahanan *paper test kit* setelah dilakukan penyimpanan. Ditentukan dengan nilai intensitas cahaya komponen warna RGB menggunakan aplikasi *Image j*. Kemudian dari data tersebut diolah untuk penentuan absorbansi menggunakan persamaan Lambert-beer.

3.6.5 Pembuatan komparator warna

Pembuatan komparator warna dilakukan dengan mneyiapkan *paper test kit* ekstrak kulit ubi jalar ungu dengan kadar ekstra antosianin yang tinggi. Selanjutnya dilakukan dengan membuat larutan pH 1-14. Pada masing masing larutan pH, tersebut kemudian dimasukkan *paper test kit* ekstrak kulit ubi jalar ungu untuk melihat perubahan warna yang ada dan membuat komparator warna. Hasil perubahan warna pada *paper test kit* kemudian diolah menggunakan aplikasi *image j* untuk melihat perbedaan absorbansi pada paper tests kit yang di celupkan ke dalam masing masing larutan berpH.

3.7 Pengolahan, Penyajian Dan Analisis Data

Pengolahan, penyajian dan analisis data diperoleh dari masing masing perlakuan pada optimasi variasi komposisi pelarut pada ekstraksi kulit ubi jalar ungu disajikan seperti dibawah ini.

3.7.1 Pengolahan Data

A. Data absorbasi yang diperoleh yakni pada pengukuran kadar antosianin menggunakan spektrofotometer kemudian dihitung untuk mengetahui nilai kadar total antosianin menggunakan rumus:

$$\text{Total antosianin}(\text{mg/L}) = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{(\epsilon \times \ell)}$$

Keterangan:

- A = Absorbansi sampel yang telah diuji
 ϵ = Absortivitas molar Sianidin-3-glukosida = 26.900 L/(mol.cm)
 DF = Faktor Pengenceran
 ℓ = Lebar kuvet = 1 cm
 MW = Berat molekul Sianidin 3-glukosida = 449,2 g/mol
 1000 = Faktor g ke mg

B. Data dari intensitas warna RGB (red, green, blue) yang didapatkan baik dari data uji daya simpan maupun pada pembuatan warna kemudian dikonversikan untuk mendapatkan nilai absorbansi menggunakan persamaan hukum Lambert-Beer dengan rumus:

$$\text{Absorbansi} = \log \frac{I_0}{I}$$

Keterangan:

I= nilai intensitas warna (R/G/B)

I₀= nilai intensitas blanko

Nilai intensitas warna (I) diperoleh dari pemotretan hasil paper test kit yang dicelupkan pada masing masing larutan pH yang kemudian diolah menggunakan aplikasi *Image j*. Sedangkan nilai intensitas blanko (I₀) didapatkan dari *paper test kit* yang tidak dicelupkan kedalam larutan apapun.

3.7.2 Penyajian Data

Data yang diperoleh pada pengukuran kadar antosianin total pada ekstrak kulit ubi jalar ungu disajikan dalam bentuk tabel seperti dibawah ini.

Tabel 3. 2 Uji pengaruh variasi komposisi perbandingan pelarut etanol 96%:HCl 1% terhadap kadar antosianin pada ekstrak kulit ubi jalar ungu

Perbandingan Et : HCl (v/v)	λ 520 nm		λ 700 nm	
	pH 1	pH 4,5	pH 1	pH 4,5
9:1				
7:3				
5:5				
3:7				

Tabel 3. 3 Uji kadar antosianin total

Perbandingan Et : HCl (v/v)	Absorbansi (A)	% Kadar Antosianin
9:1		
7:3		
5:5		
3:7		

Tabel 3. 4 Data uji *paper test kit* terhadap larutan pH 1-14

pH	Perubahan Warna	Nilai Intensitas Warna			Absorbansi
		Red	Green	Blue	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					

Tabel 3. 5 Penyajian data uji daya simpan pada *paper test kit*

Waktu Penyimpanan	Perubahan Warna	Nilai Intensitas Warna			Absorbansi
		Red	Green	Blue	
Hari ke-0					
Minggu ke-2					
Minggu ke-4					
Minggu ke-6					

3.7.3 Analisis Data

Data penelitian yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan metode uji analisis regresi linier menggunakan SPSS untuk melihat pengaruh perbandingan penambahan asam pada campuran pelarut etanol 96%:HCl 1%

terhadap kadar antosianin total pada masing masing ekstrak. Rumus regresi linier dituliskan seperti berikut.

$$y = a + bx$$

Keterangan:

Y= garis regresi

a = konstanta (interseo), perpotongan dengan sumbu vertikal

b = konstanta regresi (slope)

x = variabel bebas

Besarnya konstanta a dan b dapat ditentukan menggunakan persamaan:

$$a = \frac{(\sum Y_i)(\sum X_i^2) - (\sum X_i)(\sum X_i Y_i)}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$b = \frac{n(\sum X_i Y_i) - (\sum X_i)(\sum Y_i)}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2}$$

dengan nilai n = jumlah data.

Pengambilan keputusan dalam uji regresi linier sederhana dapat mengacu pada dua hal, yakni:

Membandingkan nilai signifikansi dengan nilai probabilitas 0,05

- Jika nilai signifikansi <0,05, artinya variabel X berpengaruh terhadap variabel Y
- Jika nilai signifikansi >0,05, artinya variabel X tidak berpengaruh terhadap variabel Y