

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan eksperimen dengan rancangan acak lengkap menggunakan variasi konsentrasi ekstrak daun kelor dan ekstrak daun belimbing wuluh dengan pembacaan serapan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Pada tahap preparasi bahan uji, maserasi, pengamatan secara kualitatif dan kuantitatif dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang. Sedangkan, tahapan pemekatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Machung. Waktu penelitian dimulai pada bulan Mei 2021 dengan menyesuaikan jadwal akademik kampus.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat**

Pada penelitian ini alat yang digunakan ialah, pisau (Dony) atau gunting, talenan, tampah atau loyang, grinder (Getra 1C-06 B), oven (Memmert UN110), seperangkat alat *vacuum rotary evaporator* (IKA RV 210 basic), waterbath (Memmert), desikator (Duran), neraca analitik (Ohaus PA224), neraca ohaus, stoples, wadah plastik, gelas ukur (Iwaki), batang pengaduk, spatula, kaca arloji, corong gelas (Herma), botol gelap, botol vial, cawan porselin (Sentana), tabung reaksi (Pyrex), gelas kimia 250 ml (Pyrex), pipet tetes, pipet ukur 10 ml (Pyrex), pipet volume 1 ml (HBG), bola hisap, labu ukur (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml,) (Pyrex), mortar dan alu, *centrifuge* (Hettich D-78532), botol semprot, kuas, spatula, statif dan klem, *cooler box* (Maspion), rak tabung reaksi, hot plate (Nescolab Ms-H280), bunsen, penjepit kayu, gelas kima 400 ml (Pyrex), erlenmeyer 500 ml (Duran), erlenmeyer 100 ml (Iwaki), lemari

pendingin (GEA), dan seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (Biobase BK-DS90).

### 3.3.2 Bahan

Pada penelitian ini bahan yang digunakan ialah, ekstrak dari hasil proses ekstraksi (daun kelor segar dan daun belimbing wuluh segar), ikan tongkol dari satu hasil tangkapan yang dibeli di produsen ikan dan disimpan dalam *cooler box*, akuades, etanol 96% dan 50% (teknis), air dingin, es batu, kain mori, HCl pekat (MERCK *analytical grade*), HCl 4%, pita logam Mg, n-heksana (MERCK *analytical grade*), butanol (MERCK *analytical grade*), baku quersetin (Sigma *analytical grade*),  $AlCl_3$  (MERCK *analytical grade*), asam sulfanilat (MERCK *analytical grade*),  $NaNO_2$  (Emsure *analytical grade*), histamin dihidroklorida (TCI *analytical grade*).

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Variabel independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun kelor dan ekstrak daun belimbing wuluh pada perendaman ikan tongkol.

### 3.4.2 Variabel dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah penurunan kadar histamin pada ikan tongkol

## 3.5 Definisi Operasional Variabel

No.	Nama Variabel	Definisi	Metode dan Alat Pengukuran	Skala Pengukuran
1.	Ekstrak daun kelor	Cairan kental yang didapatkan dari proses ekstraksi daun kelor	Maserasi, <i>vacuum rotary evaporator</i>	Nominal

2.	Ekstrak daun belimbing wuluh	Cairan kental yang didapatkan dari proses ekstraksi daun belimbing wuluh	Maserasi, <i>vacuum rotary evaporator</i>	Nominal
3.	Ikan tongkol	Salah satu jenis ikan yang mengandung histamin	Destruksi, mortar dan alu	Nominal
4.	Kadar flavonoid	Banyaknya kandungan zat aktif flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh	Pembacaan serapan, spektrofotometer UV-Vis	Rasio
5.	Konsentrasi ekstrak daun kelor dan ekstrak daun belimbing wuluh	Macam-macam konsentrasi ekstrak yang diaplikasikan pada proses perendaman sampel ikan tongkol	Pengenceran, labu ukur	Rasio

6.	Kadar histamin	Konsentrasi histamin yang terkandung dalam ikan tongkol	Pembacaan serapan, spektrofotometer UV-Vis	Rasio
----	----------------	---	--	-------

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh

Proses ekstraksi daun kelor dan daun belimbing wuluh dilakukan dengan cara menimbang daun kelor dan daun belimbing wuluh segar masing-masing sebanyak 2 kg menggunakan neraca ohaus, kemudian daun dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan dari kotoran. Setelah itu, dikeringkan daun dengan diangin-anginkan dan dilakukan perajangan. Kemudian, dikeringkan hasil rajangan dibawah sinar matahari dan dilanjutkan pengeringan dalam oven dengan suhu 60°C hingga kering. Setelah itu, dihaluskan simplisia menggunakan grinder.

Langkah selanjutnya, melakukan maserasi dengan perbandingan serbuk simplisia dan pelarut etanol 96% 1:20 (b/v). Kemudian, ditimbang serbuk simplisia daun kelor dan daun belimbing wuluh masing-masing sebanyak 100 gram, dimasukkan dalam stoples berdinding gelap secara duplo, ditambahkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1750 ml. Maserasi dilakukan selama 4 hari dalam suhu kamar dengan pengadukan berulang. Kemudian, disaring larutan menggunakan kain mori. Lalu, filtrat ditampung dalam botol gelap. Selanjutnya, sebanyak 250 ml etanol 96% ditambahkan ke dalam stoples dan diekstraksi kembali dengan endapan hasil penyaringan selama 48 jam. Selanjutnya, ekstrak digabungkan dengan estrak yang berada dalam botol gelap. Kemudian, ekstrak diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan tekanan 45-55 Kpa, temperatur 60°C, dan kecepatan putar 90-120 rpm. Kemudian, ekstrak hasil pemekatan menggunakan *vacuum rotary evaporator* diuapkan diatas waterbath hingga diperoleh bobot konstan (Susanty, dkk., 2019).

### **3.6.2 Skrining fitokimia uji golongan flavonoid dalam ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh**

Pada proses uji golongan flavonoid, dilakukan preparasi sampel dengan menimbang  $\pm 0,3$  gram masing-masing ekstrak, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 ml pelarut n-heksana pada masing-masing tabung reaksi hingga terbentuk endapan ekstrak. Selanjutnya, residu dilarutkan dalam  $\pm 10$  ml etanol 50% dan dibagi menjadi 7 bagian (larutan 1 sebagai blanko, larutan 2 untuk uji Bate Smith Metcalf dengan tiga kali replikasi, dan larutan 3 untuk uji Wilstater dengan tiga kali replikasi) pada masing-masing jenis larutan sampel.

Selanjutnya, pada uji Bate Smith Metcalf dalam larutan 2 ditambah HCl pekat sebanyak 0,5 ml pada masing-masing replikasi, dan diamati perubahan warna yang terjadi. Kemudian, dipanaskan tabung reaksi diatas penangas air selama 30 menit dan diamati perubahan yang terjadi. Terbentuk warna merah menandakan positif flavonoid. Pada uji Wilstater, ditambahkan 0,5 ml HCl pekat dan 4 potong pita logam magnesium pada setiap replikasi larutan 3. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Adanya perubahan warna jingga kemerahan, menandakan positif flavonoid.

### **3.6.3 Penentuan kadar flavonoid dalam ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh menggunakan metode $AlCl_3$**

Penentuan kadar flavonoid dalam ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh dilakukan dengan membuat larutan  $AlCl_3$  10% dengan pelarut akuades. Setelah itu, dibuat baku quersetin sebanyak 25 mg dalam 25 ml etanol 50% (1000 ppm). Kemudian, dibuat larutan kerja 0, 10, 20, 40, 60, 80 ppm dalam 10 ml etanol 50%. Selanjutnya, masing-masing larutan baku kerja dipipet sebanyak 4 ml dan dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial sesuai dengan label. Kemudian, ditambahkan 4 ml larutan  $AlCl_3$  10% ke dalam setiap botol vial.

Selanjutnya untuk larutan uji, dibuat larutan uji dengan menimbang 0,1 gram ekstrak kental dalam 5 ml etanol 50% dengan tiga replikasi. Kemudian, dilakukan pengenceran pada masing-masing replikasi larutan sampel ekstrak

daun kelor dan larutan sampel ekstrak daun belimbing wuluh dengan volume masing-masing sebanyak 1 ml dalam 10 ml etanol 50%. Setelah itu, setiap replikasi pada masing-masing jenis larutan ekstrak dipipet sebanyak 4 ml dan dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial sesuai dengan label. Kemudian, ditambahkan 4 ml larutan  $\text{AlCl}_3$  10% ke dalam masing-masing botol vial.

Selanjutnya, pada pembuatan larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 4 ml etanol 50% dengan 4 ml  $\text{AlCl}_3$ .10% Kemudian, larutan blanko, larutan standar, dan larutan uji diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 415 nm (Valent, dkk., 2017).

#### **3.6.4 Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh**

Pada tahap ini dibuat variasi konsentrasi ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh masing-masing sebanyak 0%, 4%, 8%, dan 12% dalam 50 ml akuades dengan 2 kali replikasi pada setiap konsentrasi.

#### **3.6.5 Pembuatan pereaksi p-fenildiazonium sulfonat**

Pada tahap ini dicampurkan 1,5 ml asam sulfanilat 0,9% (b/v) dalam HCl 4% dan 1,5 ml  $\text{NaNO}_2$  5% (b/v) dalam air es selama 5 menit. Kemudian, ditambahkan larutan  $\text{NaNO}_2$  5% sebanyak 6 ml dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu ditandabatkan dalam labu ukur 50 ml dengan akuades dingin (Hattu.,dkk, 2014).

#### **3.6.6 Degradasi sampel ikan tongkol dalam variasi konsentrasi ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh (0%, 4%, 8%, dan 12%)**

Proses degradasi dilakukan dengan mengambil bagian daging ikan tongkol dengan ditimbang sebanyak 2,5 gram menggunakan neraca analitik. Kemudian, daging ikan direndam dalam masing-masing larutan ekstrak daun kelor dan ekstrak daun belimbing wuluh selama 60 menit di dalam lemari pendingin. Setelah itu ditiriskan dan dihaluskan daging ikan menggunakan mortar dan alu. Kemudian sampel dilarutkan dengan etanol 50% sebanyak 10

ml, dan disentrifugasi pada kecepatan 3100 rpm selama 10 menit (Hattu.,dkk, 2014). Selanjutnya, diambil supernatan dan diuapkan diatas penangas bunsen hingga tersisa residu. Kemudian, residu dilarutkan dengan 1 ml akuades.

### 3.6.7 Pengukuran kadar histamin dalam sampel ikan tongkol

Pada proses ini, dilakukan preparasi larutan uji pada tiap hasil ekstrak sampel dalam berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh dengan mencampurkan 5 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,1%, 2 ml pereaksi p-fenildiazonium sulfonat, dan 1 ml larutan residu sampel dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dibuat larutan standar histamin dihidroklorida 1000 ppm dalam 10 ml akuades, kemudian dibuat larutan baku antara 100 ppm dalam 10 ml akuades. Setelah itu, dibuat larutan baku kerja 0, 10, 20, 40, 60, dan 80 ppm dalam 10 ml akuades. Kemudian, dipipet setiap konsentrasi larutan baku kerja masing-masing sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial sesuai dengan label. Setelah itu ditambahkan 5 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,1% dan 2 ml pereaksi p-fenildiazonium sulfonat pada masing-masing botol vial. Kemudian, dilakukan pembuatan larutan blanko dengan mencampurkan 1 ml akuades dengan 5 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,1% dan 2 ml pereaksi p-fenildiazonium sulfonat. Selanjutnya, diukur serapan larutan blanko, larutan standar, dan larutan uji dalam spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 497,8 nm (Hattu.,dkk, 2014).

## 3.7 Metode Analisis

Analisis data dalam penelitian ini terdapat dalam perhitungan kadar flavonoid untuk menentukan besar kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh. Rumus yang digunakan, sebagai berikut (Azizah, dkk., 2014) :

$$F = \frac{c \times V \times fp \times 100\%}{m}$$

Keterangan :

F = jumlah flavonoid metode AlCl<sub>3</sub> (mg/g)

c = kesetaran kuersetin (mg/l)

- m = berat sampel (g)
- V = volume total ekstrak (l)
- fp = faktor pengenceran

dengan rumus perhitungan yang digunakan, didapatkan data kadar flavonoid pada ekstrak daun kelor dan daun belimbing wuluh berupa (mg/g) rata-rata dari 3 kali replikasi pembacaan serapan.

Selanjutnya, dalam menganalisis data kadar histamin dalam sampel digunakan rumus penetapan kadar, sebagai berikut (Astuti dan Ningsi, 2018) :

$$\text{Kadar Histamin (ppm)} = \frac{\left(\frac{\text{absorbansi sampel} - A}{B}\right) \times \text{fp}}{\text{bobot sampel (g)}}$$

Keterangan :

- A = *intersep* baku
- B = *slope* baku
- fp = faktor pengenceran

### 3.8 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian secara kuantitatif berupa hasil uji skrining fitokimia golongan flavonoid, absorbansi larutan standar quercetin, kurva kalibrasi untuk menentukan nilai kadar flavonoid dalam ekstrak daun kelor dan ekstrak daun belimbing wuluh. Berdasarkan data tersebut, penyajian data berupa tabel dan gambar seperti dibawah ini:

**Tabel 3.1 Hasil Uji Bate Smith Metcalf Senyawa Flavonoid**

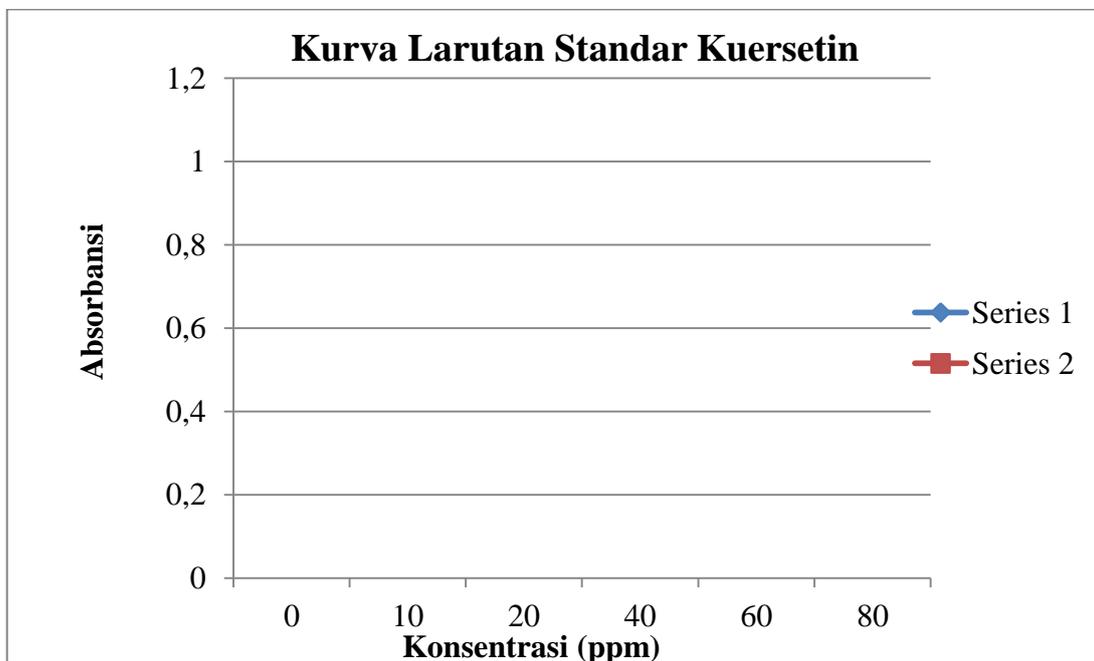
Uji Bate Smith Metcalf			
Nama Larutan	Replikasi	Hasil	Keterangan
Larutan Ekstrak Daun Kelor	1		
	2		
	3		
Larutan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	1		
	2		
	3		

**Tabel 3.2 Hasil Uji Wilstater Senyawa Flavonoid**

Uji Wilstater			
Nama Larutan	Replikasi	Hasil	Keterangan
Larutan Ekstrak Daun Kelor	1		
	2		
	3		
Larutan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	1		
	2		
	3		

**Tabel 3.3 Nilai Absorbansi Larutan Baku Kerja Kuersetin**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	
10	
20	
30	
40	
60	
80	



**Gambar 3.1 Kurva Baku Larutan Standar Kuersetin**

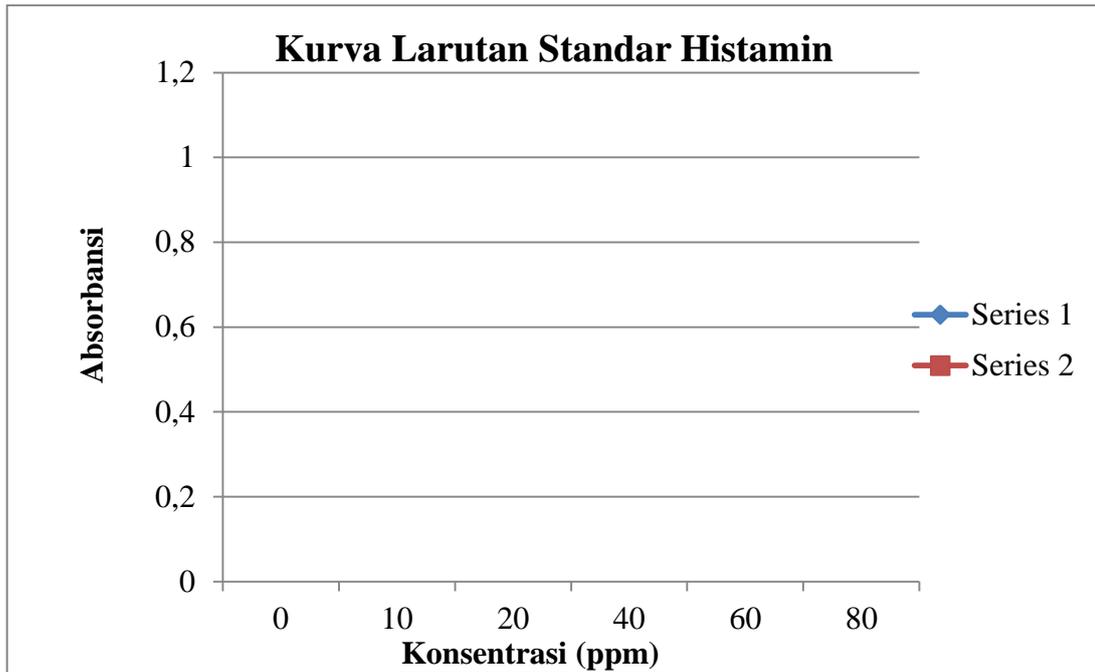
**Tabel 3.4 Kadar Flavonoid Total dalam Larutan Sampel**

Nama Ekstrak	Replikasi	Absorbansi	Kadar Terbaca (ppm)	Kadar Flavonoid (mg/g)	Rata-rata (mg/g)
Ekstrak Daun Kelor	1				
	2				
	3				
Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	1				
	2				
	3				

Selain itu, data yang diperoleh dalam pengukuran kadar histamin dalam sampel berupa absorbansi larutan standar histamin, kurva kalibrasi untuk menentukan kadar histamin dalam sampel, dan kadar histamin dalam variasi konsentrasi. Berdasarkan data yang diperoleh, disajikan data dalam tabel dan gambar seperti berikut :

**Tabel 3.5 Nilai Absorbansi Larutan Baku Kerja Histamin**

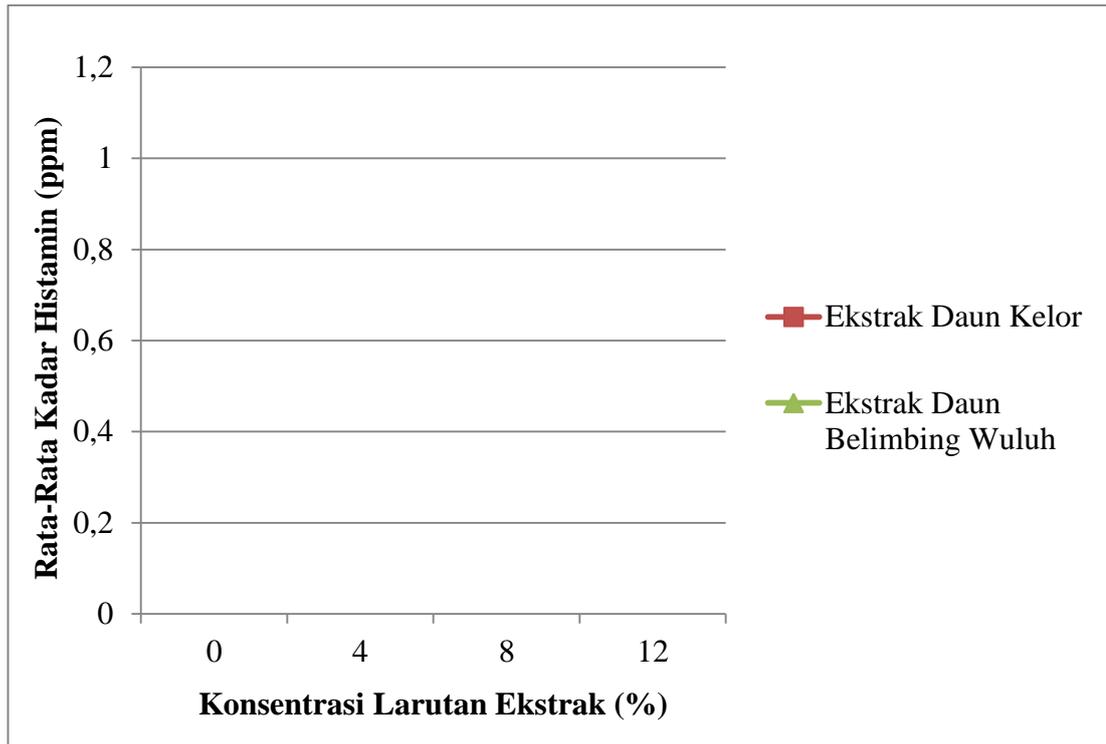
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	
10	
20	
30	
40	
60	
80	



**Gambar 3.2 Kurva Baku Larutan Standar Histamin**

**Tabel 3.6 Kadar Histamin Sampel Ikan Tongkol dalam Variasi Konsentrasi Ekstrak**

Nama Larutan Ekstrak	Konsentrasi (%)	Absorbansi		Kadar Histamin (ppm)		Rata-rata Kadar (ppm)
		1	2	1	2	
Daun Kelor	0					
	4					
	8					
	12					
Daun Belimbing Wuluh	0					
	4					
	8					
	12					



**Gambar 3.3 Grafik Penurunan Kadar Histamin dalam Variasi Konsentrasi**

Data kadar histamin yang didapatkan diolah menggunakan aplikasi SPSS, dengan mengecek normalitas data yang bertujuan untuk mengetahui distribusi data normal atau tidak. Interpretasi data jika  $sig > 0,05$ , maka data berdistribusi normal. Sehingga, dilanjutkan dengan uji homogenitas dan analisis data parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA*. Sedangkan jika  $sig < 0,05$ , maka data tidak berdistribusi normal. Sehingga dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.