

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah pipet ukur 10 mL, labu ukur 10 mL, labu ukur 100 mL, labu ukur 50 mL, gelas ukur 100 mL, pipet ukur 1 mL, gelas beker 500 mL, gelas beker 50 mL, erlenmeyer 100 mL, tabung reaksi 10 mL, tabung reaksi 50 mL, labu alas bulat, kondensor, adaptor, claisen, erlenmeyer hisap, corong *buchner*, pipet tetes, kaca arloji, botol sampel, botol semprot, rak tabung, jarum ose, *heating metal*, sumbat, batu didih, panci penangas, propipet, spatula, sendok sungu, pengaduk kaca, pisau dapur, baskom, ayakan tepung, talenan, toples kaca, oven, loyang, blender, microwave, kompor listrik, panci penangas, neraca analitik, statif, inkubator, *Laminar Air Flow (LAF)*, *autoclave*, *shaker*, pH meter, Spektrofotometer UV-Vis merek Hitachi UH5300.

4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah labu kuning (*Cucurbita moschata*), bakteri *Lactobacillus casei* FNCC 0090 yang tumbuh pada media Agar, aquadest, serbuk Nutrient Broth, Alkohol 70 %, Barium Klorida (BaCl_2), Asam Sulfat (H_2SO_4) Pekat p.a Merck, n-heksane, buffer pH 4, 7, dan 10, Asam Borat (H_3BO_3) p.a Merck, Metil Merah, Metil Biru, Natrium Hidroksida (NaOH), Asam Klorida (HCl), Selenium mix Merck, D-Glukosa, Vaseline, kertas saring biasa, Kertas saring Whatman 42, Nelson A (natrium karbonat anhidrat, Natrium Kalium, Tartrat, natrium bikarbonat, natrium sulfat anhidrat, aquadest), Nelson B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, aquadest, asam sulfat pekat), Arsenomolibdat (ammonium molibdat, natrium arsenat, aquadest dalam asam sulfat (H_2SO_4) pekat), Etanol 96%, β -karoten Sigma Aldrich, Kloroform p.a Merck, Serbuk DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*), Tissue, Plastik wrap, dan Aluminium Foil.

4.3 Cara Kerja

4.3.1 Pembuatan dan Perhitungan Jumlah Koloni *Lactobacillus casei*

a. Pembuatan Starter *Lactobacillus casei*

Koloni *Lactobacillus casei* yang tumbuh pada medium NA (Nutrient Agar) diambil satu jarum ose, diinokulasikan pada 9 mL media NB (Nutrient Broth) yang telah disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 2 jam. Pemiakan bakteri dilakukan di dalam *Laminar Air Flow (LAF)*. Biakan ini diinkubasi pada suhu 35 °C. Setelah 24 jam dipanen dan dihitung jumlah koloni.

b. Perhitungan Jumlah Koloni *Lactobacillus casei*

Langkah pertama adalah membuat larutan Mc Farland yang terdiri dari Barium Klorida (BaCl_2) 1,175 % dan Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%. Disiapkan juga larutan blanko (Medium). Kemudian menyalakan alat *Spectrofotometer UV-Vis*. Lalu mengukur absorbansi dari masing-masing larutan Mc Farland pada panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya membuat kurva regresi dimana $Y =$ Kepadatan Bakteri (sel/mL) dan $X =$ Absorbansi. Setelah itu mengukur suspensi bakteri pada panjang gelombang 600 nm. Terakhir masukkan hasil absorbansi suspense bakteri kedalam rumus regresi. Hasilnya adalah jumlah kepadatan semua sel bakteri dalam suspense dengan satuan sel/mL.

4.3.2 Pembuatan Tepung Labu Kuning

Buah labu kuning (*Cucurbita moschata*) dikupas kulitnya, lalu dibersihkan dari bijinya. Selanjutnya labu dipotong tipis-tipis dengan ketebalan 1-2 mm. Ditimbang irisan labu menggunakan neraca analitik sebanyak 500 gram. Kemudian dicuci labu hingga bersih kemudian tiriskan. Dimasukkan labu kuning yang sudah dicuci kedalam toples kaca. Selanjutnya diambil 1 mL suspense bakteri (*Lactobacillus casei*) kemudian dilarutkan dalam 500 mL aquadest. Selanjutnya ditambahkan larutan suspense bakteri (*Lactobacillus casei*) kedalam masing-masing toples berisi labu kuning, dipastikan labu terendam sempurna oleh larutan bakteri *Lactobacillus casei*, kemudian tutup rapat toples menggunakan plastik wrapp, lalu difermentasi selama 24 jam. Berikutnya

tiriskan labu kuning hasil fermentasi kemudian cuci dengan air bersih, dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50 °C selama 20 jam. Setelah kering, labu dihaluskan dengan blender sampai menjadi tepung, diayak tepung yang masih kasar. Dilakukan hal yang sama untuk variasi waktu 36 jam dan 48 jam. Sebelum dilakukan analisis masing-masing tepung diukur pH nya dengan menggunakan pH meter.

4.3.3 Penentuan Kadar Protein

Sebanyak 0,2 g sampel tepung dimasukkan ke dalam tabung reaksi 50 mL ditambahkan selenium dan 3 mL H₂SO₄ pekat kemudian tabung reaksi bersama isinya digoyangkan sampai semua sampel terbasahi dengan H₂SO₄ pekat. Selanjutnya sampel di detruksi sampai sampel terlihat jernih. Setelah sampel didestruksi sampel didinginkan kemudian dituang dalam labu ukur 50 mL dan dibilas dengan air suling. Berikutnya ditera hingga tanda batas dengan air suling, lalu dikocok hingga semua homogen. Kemudian disiapkan penampung yang terdiri dari 5 mL H₃BO₃ 3% ditambahkan 4 tetes indikator metal merah-metil biru yang sudah dibuat dalam erlenmeyer dan dipipet 10 mL NaOH 30% dan larutan sampel destruksi yang sudah diencerkan, kemudian disuling hingga volume penampung menjadi ± 50 mL. Dibilas ujung penyuling, penampung dan isinya dititrasi dengan HCl 0,1 N. Perhitungan % Protein dihitung menggunakan rumus : (AOAC)

$$\% N = \frac{(VA-VB) \text{ HCl} \times N \text{ HCL} \times \text{Ar N}}{W} \times 100 \%$$

$$W \times 1000$$

$$\% \text{ Protein} = \% N \times \text{Faktor Konversi}$$

Keterangan:

VA = mL HCl untuk titrasi sampel

VB = mL HCl untuk titrasi blanko

N HCL = 0,1

Ar N = 14,007

Mg contoh = Berat sampel dalam gram

Faktor Konversi = 6,25

4.3.4 Penentuan Kadar Karbohidrat

Uji karbohidrat dilakukan dengan metode Somogyi-Nelson. Mula-mula tabung reaksi dibilas dengan aquades. Disiapkan gula standar untuk kurva kalibrasi dengan konsentrasi 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, 5000 ppm, dan 6000 ppm, lalu larutan standar yang telah diencerkan tadi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Berikutnya ditimbang sebanyak 2 gram sampel yang akan dianalisis, dimasukkan dalam botol sampel 100 mL, kemudian ditambah dengan 10 mL aquadest, dan dishaker selama 1 jam dengan kecepatan 500 rpm. Setelah proses sheaker selesai, larutan disaring, dan didapatkan filtrat. Filtrat yang didapat dimasukkan sebanyak 1 mL kemudian diencerkan dengan aquadest hingga 10 mL.

Kemudian pada semua tabung baik yang berisi standar ataupun sampel ditambahkan 1 ml reagen tembaga berbasis rendah (Reagen Nelson). Dipanaskan tabung uji dalam air mendidih selama 10 menit. Lalu ditambahkan 1 ml reagen arsenomolibdat ke dalam tabung reaksi (warna harus terbentuk setelah penambahan reagen arsenomolibdat). Selanjutnya diambil masing-masing larutan standar maupun sampel sebanyak 1 mL dan ditambahkan aquadest hingga volume 10 mL. Dipindahkan larutan dari tabung uji ke kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm, apabila absorbansinya lebih dari 0,8, maka dilakukan pengenceran sampel dengan aquades, sebaliknya jika absorbansinya terlalu kecil maka jumlah sampel yang diambil ditingkatkan. Terakhir, dihitung konsentrasi karbohidrat dalam sampel melalui kurva baku yang dihasilkan.

4.3.5 Penentuan Kadar Serat

Ditimbang sejumlah sampel dibebaskan lemaknya dengan cara mengendapkan sampel dalam n-heksan sebanyak 3 kali lalu dikeringkan sampel dan ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian ditambah dengan 50 mL larutan H_2SO_4 1,25% kemudian dididihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak (Refluks). Sebanyak 50 mL NaOH 3,25% ditambahkan kemudian dididihkan lagi selama 30 menit. Dalam keadaan panas disaring dengan corong Bucher yang berisi

kertas saring Whatman 42 yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya. Endapan yang terdapat pada kertas saring dicuci berturut-turut dengan H₂SO₄ 1,25% panas, aquades panas, dan etanol 96%. Kertas saring diangkat dan dikeringkan dengan oven pada suhu 105 °C, kemudian ditimbang sampai bobot tetap (SNI 01-2891-1992).

$$\text{Serat Kasar (\%)} = \frac{\text{Berat Residu (gram)}}{\text{Berat sampel (gram)}} \times 100\%$$

4.3.6 Penentuan Kadar β -karoten

Tepung labu kuning dengan berbagai waktu fermentasi ditimbang masing-masing sebanyak 2 gram lalu dimaserasi dengan 10 mL kloroform selama 72 jam, kemudian disaring dengan kertas saring sehingga didapatkan filtratnya. Filtrat yang didapat dari masing-masing variasi waktu fermentasi diambil sebanyak 1 mL kemudian dilarutkan dengan kloroform menggunakan labu takar 10 mL. Dibuat standar β -karoten untuk kurva kalibrasi dengan 0 ppm (kloroform), 30.000 ppm, 60.000 ppm, 90.000 ppm, 120.000 ppm, dan 150.000 ppm. Larutan sampel dan larutan standar yang telah disiapkan, dipipet dan dimasukkan pada kuvet kemudian diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 451 nm. Konsentrasi sampel dapat ditentukan dengan cara dimasukkan hasil absorbansi sampel kedalam rumus regresi.

4.3.7 Uji Aktivitas Antioksidan

Langkah pertama adalah pembuatan larutan DPPH 25 ppm, dengan cara ditimbang dengan teliti 2,5 mg DPPH, kemudian dilarutkan dengan kloroform dalam labu ukur 100 mL, kemudian dihomogenkan dan dihasilkan larutan DPPH 25 ppm. Dibuat juga larutan kontrol, dengan cara diambil 2 mL kloroform, ditambah dengan 1 mL larutan DPPH 25 ppm, kemudian diukur absorbansi control pada Panjang gelombang 517 nm, dan didapatkan absorbansi control

Langkah selanjutnya disiapkan ekstrak sampel dan dibuat variasi konsentrasi pada masing-masing sampel dengan variasi 1%, 3%, dan 5%. Kemudian masing-masing diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH 25 ppm. Langkah selanjutnya adalah diinkubasi pada suhu 27° C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan

penentuan nilai IC₅₀ analisis pengujian antioksidan metode DPPH dilakukan dengan melihat perubahan warna masing-masing sampel setelah di inkubasi bersama akan terjadi perubahan warna sampel dimulai dari ungu tua hingga kuning terang. Kemudian sampel diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Kemudian dihitung % inhibisi dengan cara:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$

Dari data % inhibisi, kemudian dihitung nilai Ic₅₀ melalui persamaan garis yang didapatkan dari kurva konsentrasi vs inhibisi

