

BAB IV

METODE PENELITIAN

5.1 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan sebagai berikut: kubis ungu, ragi tempe, etanol teknis 96%, plastik ukuran 0,25 kg, kertas saring, plastik wrap, aluminium foil, HCl pekat, serbuk Mg, FeCl₃, DPPH (Sigma Aldrich) dan *aquadest*.

Sedangkan alat yang digunakan antara lain, panci, kompor, LPG, saringan, pisau, tusuk gigi, telenan, piring, neraca analitik (FUJITSU, Fs-AR 210), spatula, sendok sungsung, gelas ukur 50 mL (PYREX), corong gelas 60 mm (HERMA), gelas kaca 300 mL, gelas beker 100 mL (HERMA), labu ukur 100 mL (PYREX), pipet tetes, propipet, pipet ukur 5 mL (HBG), pH meter, Spektrofotometer Uv-Vis Double Beam Hitachi UH5300, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) Knauer GmbH-Smart Line Series, Jerman.

5.2 Tahapan Penelitian

5.2.1 Preparasi Sampel

a. Fermentasi Kubis Ungu

Tahap pertama yang dilakukan dalam pembuatan fermentasi kubis ungu adalah dicuci dan dipotong kubis ungu berukuran dadu kecil, kemudian kubis ungu tersebut ditimbang sebanyak 100 gram (untuk fermentasi selama 1, 3 dan 5 hari). Selanjutnya ragi tempe ditimbang sebanyak 2,5 gram untuk masing-masing variasi waktu fermentasi. Kubis ungu yang telah dipotong dadu selanjutnya direbus selama 5 menit setelah air mendidih, kemudian ditiriskan sampai benar-benar dingin dan tidak basah. Langkah berikutnya ditambahkan ragi tempe, lalu diaduk dengan tangan sampai merata. Dimasukkan ke dalam plastik ¼ kg dan ditusuk dengan tusuk gigi. Terakhir kubis ungu yang telah bercampur ragi tempe didiamkan sesuai dengan variasi waktu fermentasi.

b. Kubis Ungu Non Fermentasi

Selain itu disiapkan pula kubis ungu yang telah dipotong dadu kecil sebanyak 100 gram yang juga dilakukan proses perebusan untuk perlakuan tanpa fermentasi sebagai pembanding.

5.2.2 Ekstraksi dan Filtrasi

a. Ekstraksi

Pada tahap ini dilakukan ekstraksi kubis ungu menggunakan metode maserasi. Kubis ungu yang telah selesai difermentasi sesuai hari yang telah ditentukan, selanjutnya dilakukan tahap maserasi. Kubis ungu dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan gelas kaca ukuran 300 mL. Ditambahkan etanol teknis 96% dengan rasio 1:1 (untuk 100 gram bahan maka etanol 96 % yang ditambahkan sebanyak 100 mL). Dutup gelas kaca dengan plastik wrap dan kemudian didiamkan selama 2 hari dalam lemari. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada kubis ungu tanpa fermentasi.

b. Filtrasi

Setelah maserasi selesai, dilakukan filtrasi untuk mendapatkan maserat kubis ungu dengan kertas saring biasa. Ekstrak etanol kubis ungu yang diperoleh diukur nilai pH nya menggunakan pH meter. Maserat kemudian digunakan untuk analisis lebih lanjut.

5.2.3 Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Uji senyawa flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan serbuk Mg dan HCl pekat ke dalam ekstrak kubis ungu. Ekstrak kubis ungu dipipet sedikit dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2-3 tetes HCl pekat dan serbuk Mg. Apabila terbentuk warna orange, merah, atau kuning, berarti ekstrak positif mengandung flavonoid (Marlinda et al., 2012).

b. Uji Fenolik

Uji senyawa fenolik dilakukan dengan cara menambahkan FeCl_3 pada ekstrak kubis ungu. Ekstrak kubis ungu dipipet sedikit dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 . Apabila terbentuk warna menjadi merah, biru, ungu, hijau dan hitam maka hasil positif.

5.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengukuran didasarkan pada senyawa antioksidan yang akan menyumbangkan hidrogen sehingga mengubah radikal bebas DPPH yang berwarna ungu menjadi ungu pudar atau kuning. Absorbansi yang dipakai dalam spektrofotometer UV-Vis yaitu 517 nm. Tahapan pengujian antioksidan adalah sebagai berikut (Jonathan et al., 2016).

1. Pembuatan Larutan Induk DPPH 25 ppm
Sebanyak 2,5 mg DPPH dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 100 mL sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 25 ppm, labu ukur ditutup dengan aluminium foil agar terlindung dari cahaya.
2. Pembuatan Kontrol
Kontrol digunakan sebagai larutan perbandingan, dengan disiapkan masing-masing 2 mL larutan DPPH 25 ppm dan 2 mL etanol teknis 96%.
3. Preparasi Sampel
Ekstrak sampel kubis ungu non fermentasi dan fermentasi 1, 3 dan 5 hari dibuat variasi konsentrasi 1%, 2%, dan 3% dan dilakukan duplo. Ekstrak diencerkan menggunakan etanol teknis 96%.
4. Uji Efektivitas Antioksidan dengan DPPH
Masing-masing larutan sampel (macerat) sebanyak 2 mL ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH dengan konsentrasi 25 ppm. Campuran distirrer selama 30 detik, kemudian larutan uji diinkubasi dalam lemari selama 30 menit. Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Absorbansi larutan uji diukur pada panjang gelombang maksimum 517 nm. Dari data absorbansi kemudian dihitung presentase peredaman ekstrak kubis ungu baik yang belum difermentasi maupun yang sudah difermentasi terhadap radikal bebas DPPH dengan rumus berikut:

$$\text{Persentase Peredaman} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100 \%$$

Keterangan :

A : Absorbansi

Selanjutnya dilakukan perhitungan IC_{50} dengan persamaan garis lurus, dimana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan sumbu y adalah persentase peredaman.

5.2.5 Karakterisasi menggunakan HPLC

Untuk ekstrak kubis ungu non fermentasi dan fermentasi 5 hari sebelum dilakukan pengujian dihidrolisis terlebih dahulu menggunakan asam dengan dipanaskan dalam HCl 2 M selama 40 menit pada 100 °C, didinginkan, kemudian dicuci dengan etil asetat sebanyak 2 kali. Fraksi etil asetat dibuang dan fraksi air dipanaskan pada 80 °C selama 3 menit untuk menghilangkan sisa etil asetat. Fraksi air diekstraksi dengan amil alkohol, kemudian fraksi amil alkohol dipekatkan pada gelas arloji di atas penangas air yang mendidih. Ekstrak antosianidin yang telah kering dilarutkan dalam sejumlah tertentu volume metanol yang mengandung 0,01 % HCl. Kemudian ekstrak diinjeksikan dalam *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan menggunakan kolom Eurosphere RP C-18 (150 × 4,6 mm, 5µm) Knauer with pre column (SN GJ 96).

HPLC dikondisikan mengikuti prosedur dari Harbone (1996). Fase gerak yang digunakan yaitu 1 % asam format (dalam air) : Asetonitril (85:15 v/v). Sistem elusi HPLC dilakukan secara isokratik dengan laju alir 1,0 mL/menit. Sampel diinjeksikan sebanyak 20 µL. Spektrum dibaca dengan detektor UV, dengan panjang gelombang 520 nm.