

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat kuantitatif, menggunakan desain *Exsperimental* dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai dan menggambarkan konsentrasi total fenol yang dihasilkan dari suhu penyeduhan minuman herbal kombinasi daun kelor (*Moringa oleifera*) dan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) berdasarkan variasi formulasi yang telah ditentukan.

Tabel 3.1 Teknik Pembuatan Sampel

Variasi Formulasi	Gramasi Bahan Tiap Variasi	Variasi Suhu Penyeduhan	Lama Waktu Penyeduhan	Air (ml)	Label
100% daun kelor	2 g daun kelor kering	1) Suhu 70°	5 menit	100 ml	1) F170
		2) Suhu 80°			2) F180
		3) Suhu 90°			3) F190
75% Daun Kelor + 25% Buah Belimbing Wuluh	1,5 g daun kelor kering + 0,5 g buah belimbing wuluh kering	1) Suhu 70°	5 menit	100 ml	1) F270
		2) Suhu 80°			2) F280
		3) Suhu 90°			3) F290
50% daun kelor + 50% buah belimbing wuluh	1 g daun kelor kering + 1 g buah belimbing wuluh kering	1) Suhu 70°	5 menit	100 ml	1) F370
		2) Suhu 80°			2) F380
		3) Suhu 90°			3) F390
25% Daun Kelor +	0,5 g daun kelor kering +	1) Suhu 70°	5 menit	100 ml	1) F470
		2) Suhu 80°			2) F480

75% Buah	1,5 g buah	3) Suhu 90°		3) F490
Belimbing	belimbing			
Wuluh	wuluh kering			
100% buah		1) Suhu 70°		1) F570
belimbing	2g belimbing	2) Suhu 80°	5 menit	2) F580
wuluh	wuluh kering	3) Suhu 90°	100 ml	3) F590

Untuk menentukan jumlah pengulangan agar mendapatkan hasil yang valid, peneliti menggunakan rumus Federer untuk menetapkan subjek pengulangan pada setiap variasi formulasi :

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$(15 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$14(n - 1) \geq 15$$

$$14n - 14 \geq 15$$

$$14n \geq 29$$

$$n \geq 2,07$$

Jadi, jumlah subjek pengulangan yang diperlukan setiap sampel yaitu 2 kali pengulangan.

3.2 Lokasi dan Waktu Kegiatan

Penelitian ini dilakukan di 3 Laboratorium yang berbeda. Diantaranya Laboratorium Gizi Terpadu untuk melakukan proses pengeringan bahan yang akan digunakan sebagai sampel, kemudian Laboratorium Kimia Terpadu untuk melakukan proses penimbangan sampel yang dibutuhkan. Kedua Laboratorium tersebut bertempat di Kampus 2 Fakultas Kesehatan Universitas Muhammadiyah Gresik. Untuk melakukan pengujian kadar total fenol, dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Adapun alat yang digunakan pada saat proses penelitian yaitu *food dehydrator* (kitidea), timbangan analitik (ohaus), gelas ukur 100 ml/ *Measuring Cylinder* 100 ml (Pyrex), spektrofotometer (HIROKA 721), alat pengukur suhu ruang (merk *taffware*), thermometer suhu air (*digital thermometer pocket* seri TP-3001), *stopwatch* (Hayylife *digital timer*), vortex, pipet volume 10ml/ *Measuring pipette* 10 ml (Herma), dan labu ukur 100 ml (pyrex).

3.3.2 Bahan

Berikut bahan-bahan yang dibutuhkan pada saat proses penelitian antara lain, daun kelor, buah belimbing wuluh, pereaksi folin ciocalteu, larutan asam galat, larutan natrium karbonat, methanol, aquades, dan air.

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Persiapan Bahan Baku

Bahan baku utama yang digunakan adalah daun kelor dan buah belimbing wuluh. Pada tahap persiapan sampel, daun kelor dan belimbing wuluh dikumpulkan dalam wadah yang berbeda, kemudian cuci bersih. Setelah itu, sampel dikeringkan menggunakan *food dehydrator* pada suhu 40°C untuk pengeringan daun kelor dan 60°C untuk pengeringan buah belimbing wuluh. Masing-masing sampel yang sudah kering kemudian di tumbuk kasar dan dimasukkan ke dalam pouch the kosong yang telah disediakan. Kemudian siapkan beberapa pouch yang dibutuhkan untuk setiap sampel dan dilakukan tahapan berikut :

1. Pada pouch formulasi F1, berisi 2 g daun kelor. Sediakan 3 pouch dengan formulasi yang sama dan berikan label berbeda (F170 ; F180 ; F190) pada setiap pouch nya.
2. Pada pouch formulasi F2, berisi 1,5 g daun kelor dan 0,5 g buah belimbing wuluh. Sediakan 3 pouch dengan formulasi yang sama dan berikan label berbeda (F270 ; F280 ; F290) pada setiap pouch nya.

3. Pada pouch formulasi F3, berisi 1 g daun kelor dan 1 g buah belimbing wuluh. Sediakan 3 pouch dengan formulasi yang sama dan berikan label berbeda (F370 ; F380 ; F390) pada setiap pouch nya.
4. Pada pouch formulasi F4, berisi 0,5 g daun kelor dan 1,5 g buah belimbing wuluh. Sediakan 3 pouch dengan formulasi yang sama dan berikan label berbeda (F470 ; F480 ; F490) pada setiap pouch nya.
5. Pada pouch formulasi F5, berisi 2 g buah belimbing wuluh. Sediakan 3 pouch dengan formulasi yang sama dan berikan label berbeda (F570 ; F580 ; F590) pada setiap pouch nya.

Masing-masing sampel diseduh dengan 100 ml air pada suhu yang sudah ditentukan selama lima menit secara bergantian. Setelah itu, dapat dilakukan uji kadar total fenol.

3.4.2 Tahapan Uji Kadar Total Fenol

Penentuan kadar senyawa fenol dalam minuman herbal kombinasi daun kelor dan buah belimbing wuluh dilakukan dengan metode spektrofotometri, menggunakan follin-ciocalteu sebagai reagen, dan asam galat sebagai pembanding (Hapsari, *et al.* 2018). Prinsip operasional dari spektrofotometer UV-Vis (Ultra Violet-Visible) berfokus pada penyerapan cahaya serta interaksi atom dan molekul dengan cahaya. Ketika prinsip diterapkan pada cahaya ultraviolet dan cahaya tampak digabungkan, alat tersebut dikenal sebagai spektrofotometer ultraviolet-tampak (UV-Vis). Perangkat ini memanfaatkan dua jenis sumber cahaya yang berbeda yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya tampak. Spektrofotometri UV-Vis mengacu pada hukum Beer-Lambert, yang menyatakan bahwa ketika cahaya monokromatik melewati suatu zat, ada bagian dari cahaya yang diserap, dipantulkan, dan dipancarkan (Ahriani *et al.*, 2021).

A. Pembuatan larutan asam galat

Berikut adalah prosedur pembuatan larutan asam galat menurut Hapsari, *et al.* (2018) :

1. Pada pembuatan larutan asam galat
 - a) Siapkan larutan asam galat dengan konsentrasi 500 ppm.
 - b) Campurkan 5 mg asam galat ke dalam 10 ml methanol pro analisis.

2. Penentuan *operating time*

- a) Siapkan larutan asam galat dengan konsentrasi 500 ppm.
- b) Ambil 0,1 ml larutan dan masukkan ke dalam tabung reaksi.
- c) Tambahkan 7,9 ml akuades dan 0,5 ml larutan Folin-Ciocalteu. Lalu kocok selama satu menit.
- d) Pindahkan larutan ke labu ukur 10 ml dan tambahkan larutan Natrium Karbonat 20 %.
- e) Ukur nilai absorbansi larutan pada panjang gelombang 765 nm setiap menit.
- f) Perhatikan saat larutan mulai menunjukkan nilai absorbansi yang konsiste, yang akan digunakan sebagai *operating time*.

3. Penentuan panjang gelombang maksimum Asam Galat

- a) Siapkan larutan asam galat dengan konsentrasi 500 ppm.
- b) Ambil 0,1 ml larutan dan masukkan kedalam tabung reaksi.
- c) Tambahkan 7,9 ml akuades dan 0,5 ml larutan Folin-Ciocalteu. Lalu kocok selama satu menit.
- d) Pindahkan larutan ke labu ukur 10 ml dan tambahkan larutan Natrium Karbonat 20 %.
- e) Larutan diinkubasi selama waktu *operating time*.
- f) Lakukan pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer visibel pada rentang 750 – 770 nm.

4. Pembuatan kurva kalibrasi Asam Galat

- a) Dibuat larutan asam galat dengan konsentrasi 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 dan 500 ppm.
- b) Masing-masing larutan diambil sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- c) Tambahkan 7,9 ml akuades dan 0,5 ml larutan Folin-Ciocalteu. Lalu kocok selama satu menit.
- d) Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 ml dan tambahkan larutan Natrium Karbonat 20 %.
- e) Larutan diinkubasi selama waktu *operating time*.

- f) Lakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang menghasilkan kurva kalibrasi asam galat serta persamaan garis linear ($y = ax + b$).

B. Penetapan kadar total fenol

Berikut analisis total fenol dilakukan dengan prosedur Septiani, *et al.* (2018)

- Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diekstrak dengan 5 mL metanol 85%, divortex hingga homogen dan disentrifus 3000 rpm selama 15 menit kemudian supernatannya disaring.
- Kemudian filtrat diencerkan hingga mencapai volume 5 mL.
- Selanjutnya sebanyak 0,4 mL filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Clocaften, divortex hingga homogen dan dibiarkan selama 6 menit.
- Tambahkan 4,2 mL larutan sodium karbonat 5% (Na_2CO_3), divortex dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu ruang.

Pengukuran absorbansi dari larutan dilakukan pada panjang gelombang maksimum 760 nm. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer dalam rentang panjang gelombang maksimum dua kali untuk setiap pengukuran, kemudian dihitung rata-ratanya. Proses ini dilakukan dengan dua kali pengulangan. Setelah memperoleh absorbansi dari sampel, dibuat kurva standar dengan melarutkan asam galat dalam methanol 85% pada berbagai konsentrasi antara 0 sampai 100 mg/L (Hapsari, *et al.*, 2018).

Kadar total fenol pada sampel dihitung dengan cara menggunakan substitusi nilai-nilai absorbansi rata-rata sampel ke dalam persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva kalibrasi untuk menentukan konsentrasinya. Konsentrasi sampel yang telah didapat kemudian disubstitusikan lagi kedalam rumus rumus perhitungan kadar total fenol berikut :

$$\text{Kadar total fenol (mg GAE/g)} = \frac{x.V.FP}{BS}$$

Keterangan :

- x = Konsentrasi (ppm)
V = Volume larutan sampel (ekstrak) (ml)
FP = Faktor pengenceran larutan sampel
BS = Berat sampel (g)

3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

a. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini memiliki dua jenis variable, yaitu variabel bebas (*independen*) dan variabel terikat (*dependen*). Pada variabel bebas terdiri dari dua faktor yaitu variasi formulasi dan suhu penyeduhan, dan pada variabel terikat menggunakan satu faktor yaitu kadar total fenol pada minuman herbal kombinasi daun kelor dan buah belimbing wuluh.

b. Definisi Operasional

Tabel 3.2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
Variabel Independent 1				
Variasi Formulasi	Udin S Winaprata dalam buku karya Pupuh Fathurrohman dan M. Sobry mengartikan "Variasi" sebagai keaneka yang membuat sesuatu tidak monoton. Dimana dalam penelitian ini peneliti membuat beberapa variasi formulasi agar dapat melihat perbedaan hasil pengaruh suhu penyeduhan terhadap kadar total fenol pada minuman herbal.	Timbangan Analitik	1. 2g daun kelor 2. 1,5g daun kelor + 0,5g buah belimbing wuluh 3. 1g daun kelor + 1g buah belimbing wuluh 4. 0,5g daun kelor + 1,5g buah belimbing wuluh 5. 2g buah belimbing wuluh	Rasio

Variabel Independent 2

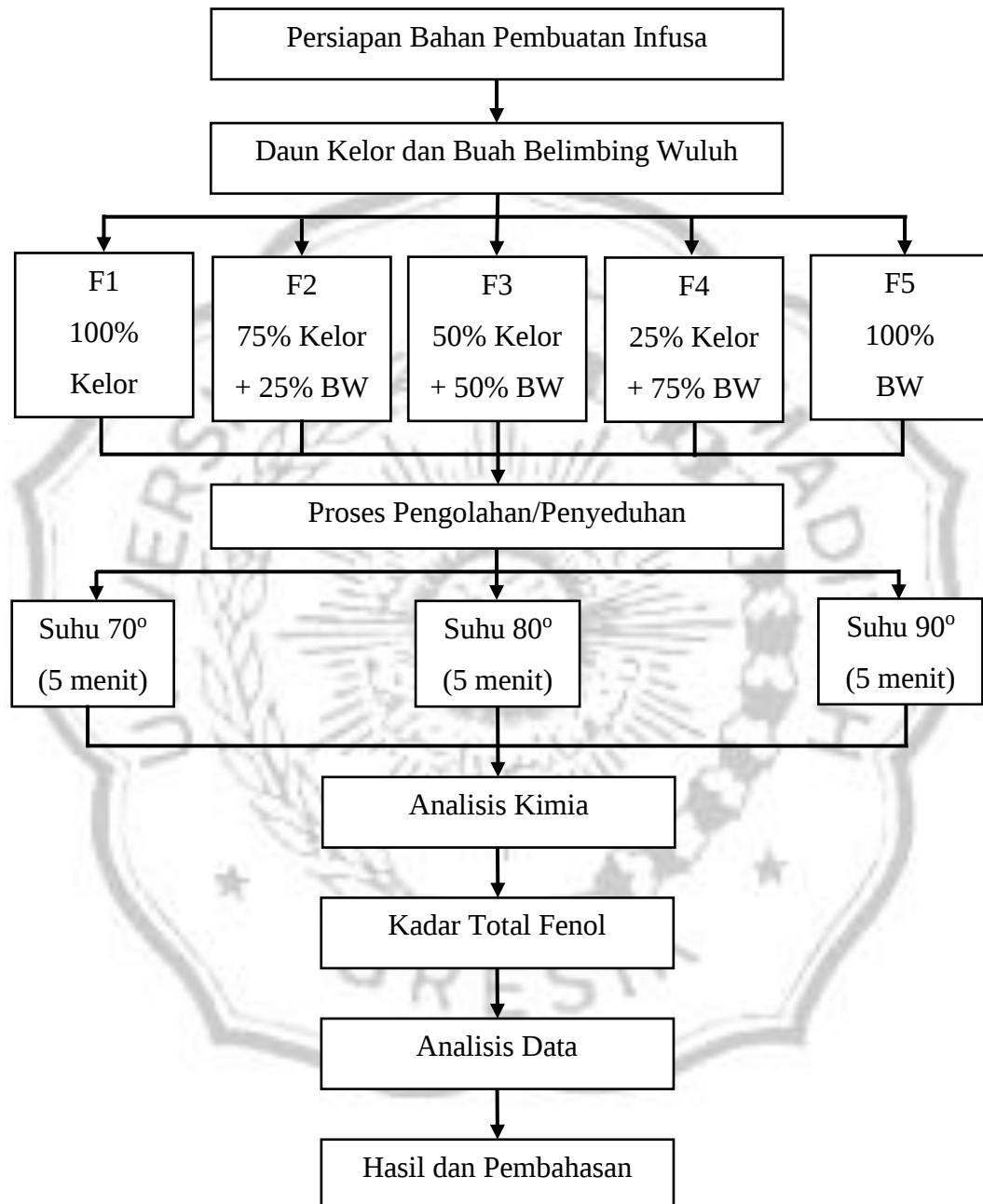
Suhu	Suhu penyeduhan	Thermometer	1. Suhu 70°C	Ordinal
Penyeduhan	yang berbeda	suhu air	2. Suhu 80°C	
	diduga akan		3. Suhu 90°C	
	berpengaruh			
	terhadap			
	kenaikan dan			
	penurunan			
	senyawa fenolik			
	minuman herbal			
	kombinasi daun			
	kelor dengan			
	belimbing wuluh.			

Variabel Dependent

Kadar Total	Fenol merupakan	Spektrofoto	... mg GAE/g	Ordinal
Fenol	senyawa yang	meter		
	mudah menguap,			
	memiliki tingkat			
	kelarutan yang			
	tinggi dalam air,			
	dan tergolong			
	senyawa yang			
	mudah terbakar.			

3.6 Kerangka Operasional

Kerangka operasional dalam penelitian ini menggunakan perbedaan konsentrasi/variasi formulasi dalam pengolahan infusa daun kelor dan buah belimbing wuluh.



Gambar 3.1 Kerangka Operasional

3.7 Analisis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini merupakan data kuantitatif. Proses pengujian suhu untuk penyeduhan dilakukan dalam waktu masing-masing 5 menit untuk setiap variasi formulas. Metode analisis data yang diterapkan adalah uji ANOVA. Apabila terdapat perbedaan antara perlakuan, maka akan dilanjutkan dengan uji lanjutan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada tingkat signifikan 5% ($p \leq 0,05$). Analisis data ini menggunakan perangkat lunak *software SPSS version 22.0*, dan pengujian data menggunakan tingkat uji alpha (α) 5%. Jika nilai ($p \leq 0,05$), maka H_1 diterima dan H_0 ditolak.

