

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Bahan penelitian adalah Buah duwet (jamblang) yang diperoleh dari perkebunan yang terletak di Desa Bayureja, Kecamatan Sindang, Kabupaten Majalengka. Determinasi tanaman akan dilakukan di Herbarium Fakultas Biologi, Universitas Padjajaran.

4.2 Penyiapan Bahan

4.2.1 Buah Duwet

Simplisia segar yang digunakan dikumpulkan, lakukan sortasi basah dengan cara mencuci buah duwet segar dengan air bersih, hingga tidak terdapat krikil atau zat pengotor yang menempel agar tidak mengganggu pada proses analisis, setelah bersih pisahkan daging buah dari bijinya, dan rajang. Karakterisasi simplisia segar meliputi pengamatan makroskopik berupa pengujian terhadap rasa, bau, bentuk, ukuran, warna.

4.2.2 Pembuatan Larutan Penyangga

Larutkan sebanyak 0,186 gram KCl dengan akuades 98 ml dimasukkan dalam gelas kimia kemudian tambahkan HCl pekat sampai menjadi pH 1, Untuk membuat pH 4,5 sebanyak 5,4439 gram $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dengan akuades dicampurkan

dalam gelas kimia kemudian tambahkan HCl pekat sampai menjadi pH 4,5. Untuk mengukur pH menggunakan pH meter.

4.3 Pembuatan Ekstrak

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi menggunakan metode ekstraksi maserasi, metode ini digunakan karena maserasi mudah dilakukan dan hemat dalam penggunaan pelarut. Tahap awal untuk membuat ekstrak antosianin adalah timbang simplisia segar sebanyak 200 gram bahan (simplisia segar) yang telah dirajang, dimasukkan ke dalam maserator yang direndam menggunakan campuran pelarut metanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 80:16:104, 100:16:84, dan 120:16:64. Selama perendaman maserator disimpan dalam tempat yang gelap selama 24 jam. Ekstraksi dilakukan sampai filtrat yang dihasilkan berwarna bening yang menandakan antosianin sudah terekstrak semua. Kemudian disaring menggunakan penyaring vakum. Setelah itu filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60⁰C hingga mencapai 25 ml ekstrak kental.

4.4 Analisis Antosianin

Analisis antosianin dimulai dengan membuat larutan stok. Ekstrak satu membuat 20 ppm, pembuatan larutan stok untuk ekstrak satu dilakukan dengan cara mengambil ekstrak kental 0,2 ml kemudian diencerkan sampai 10 ml menggunakan pelarut yang digunakan pada saat maserasi. Pengenceran bertingkat dibuat dengan cara mengambil 1 ml ekstrak kental dari larutan stok. Tambahkan 1,8 ml larutan

penyangga pH 1 atau pH 4,5 dan dijadikan 10 ml dengan penambahan pelarut yang digunakan pada saat maserasi. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 400-700 nm. Dilakukan perlakuan yang sama pada ekstrak dua dan tiga.

Dari spektrum antosianin yang diperoleh kemudian dicari panjang gelombang yang merupakan letak dimana nilai puncak absorbansi berada. Nilai panjang gelombang inilah yang disebut λ_{\max} yang kemudian akan digunakan dalam proses analisis jumlah antosianin. Jumlah antosianin yang terkandung dalam cairan ekstrak kemudian dihitung dengan menggunakan persamaan *AOAC Methods*.

4.4.1 Verifikasi Metode Analisis

a. Presisi

Absorbansi dari ekstrak antosianin buah duwet yang telah ditambahkan pH 1 diukur dengan pengulangan sebanyak 6 kali. Standar deviasinya kemudian ditentukan berdasarkan rumus :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$