

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat studi eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*. Kelompok kontrol adalah daging sapi yang tidak diberi perlakuan apapun. Kelompok perlakuan adalah daging sapi yang diberi larutan ekstrak daun jati dengan berbagai konsentrasi. Penetapan konsentrasi berdasarkan hasil penelitian pendahuluan.

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan membuat kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tanpa adanya replikasi. Konsentrasi yang diujikan pada penelitian pendahuluan adalah 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Masing-masing kelompok kontrol dan kelompok perlakuan akan diuji kadar total proteinnya menggunakan metode Kjeldahl untuk mengetahui perubahan kadar total protein akibat perendaman daging sapi dalam ekstrak daun jati (*Tectona grandis* Linn. F.). Berdasarkan grafik hasil penelitian pendahuluan, disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun jati yang digunakan maka dapat mempertahankan kadar total protein secara maksimal pula (Lampiran 1).

4.2 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Bahan sampel yang digunakan adalah daun jati (*Tectona grandis* Linn. F.). sampel atau objek penelitian adalah daging sapi bagian has dalam. Kriteria inklusi dan eksklusi sampel adalah sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Inklusi Daun Jati

- Daun yang masih muda berwarna hijau
- Diambil mulai dari 3 daun teratas

4.2.2 Kriteria Eksklusi Daun Jati

- Daun jati yang sudah tua berwarna hijau tua keabu-abuan
- Daun jati yang kering dipohon atau berguguran

4.2.3 Kriteria Inklusi Daging Sapi

- Daging sapi bagian has dalam
- Daging berwarna merah cerah dan mengkilap
- Elastis, sedikit kaku dan tidak lembek
- Jika dipegang masih terasa basah dan tidak lengket di tangan
- Berbau khas daging segar

4.2.4 Kriteria Eksklusi Daging Sapi

- Daging berwarna kusam (coklat kehijauan atau kuning)
- Berlendir dan terasa lengket di tangan
- Berbau masam/busuk

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent Variabel*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun jati (*Tectona grandis* Linn. F.).

4.3.2 Variabel Terikat (*Dependent Variabel*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar total protein pada daging sapi (bagian has dalam).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstraksi daun jati metode *Microwave Assisted Extraction* dan perendaman daging ini dilaksanakan di Laboratorium Gizi Fakultas Kedokteran Brawijaya, sedangkan pengujian kadar total protein daging dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang pada bulan Februari 2013.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Ekstrak Daun Jati

Adalah sediaan daun jati mas (*Tectona grandis* Linn. F.) yang masih muda berwarna hijau dan diambil mulai dari 3 daun teratas berasal dari KPH Blitar yang kemudian diekstrak menggunakan metode *Microwave Assisted Extraction* dan dibuat sebagai larutan dengan berbagai konsentrasi yaitu 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

4.5.2 Metode *Microwave Assisted Extraction*

Adalah metode ekstraksi daun jati (*Tectona grandis* Linn. F.) yang menggunakan energi radiasi *microwave* bermerk Samsung tipe M-475 dengan daya 80 Watt selama 1 menit dan pelarut air aquades steril.

4.5.3 Kadar Total Protein

Adalah jumlah protein dalam daging sapi has dalam yang diukur dengan metode Semi Micro Kjeldahl di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

4.5.4 Daging Sapi Has dalam

Adalah sediaan daging sapi bagian has dalam yang berwarna merah cerah, mengkilap, elastis, sedikit kaku dan tidak lembek, jika dipegang masih terasa basah dan tidak lengket di tangan, berbau khas daging segar yang dibeli dari Pasar Besar Malang dan telah mengalami perendaman dalam larutan ekstrak daun jati.

4.6 Estimasi Pengulangan

Estimasi jumlah pengulangan dihitung dengan rumus Federer, yaitu:

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

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan: t = perlakuan
n = ulangan/ replikasi

Jadi replikasi minimal yang dibutuhkan untuk tiap perlakuan adalah 4, dimana masing-masing replikasi diuji secara duplo (pengambilan 2 sampel dari 1 daging yang sama). Sehingga jumlah sampel yang diuji kadar proteinnya adalah 48 sampel.

4.7 Instrument Penelitian

4.7.1 Ekstrak Daun Jati

4.7.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun jati metode

Microwave Assisted Extraction adalah sebagai berikut:

1. Daun jati muda
2. Aquades steril

4.7.1.2 Alat

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun jati metode

Microwave Assisted Extraction adalah sebagai berikut:

1. Wadah plastik
2. Neraca analitik
3. Labu ukur 100 ml
4. Stopwatch
5. Pisau
6. Talenan
7. Penggaris
8. *Blender*
9. Oven gelombang mikro (Samsung M-475)
10. Wadah tahan panas (pirex)
11. Kain saring
12. Gelas *beaker* 250 ml
13. Kertas saring kasar
14. Corong kaca

15. Stopwatch

4.7.1.3 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Jati

Berikut adalah langkah-langkah pembuatan ekstrak daun jati metode

Microwave Assisted Extraction:

1. Sortasi

Sortasi dilakukan untuk menghilangkan bagian daun jati yang tidak segar, misalnya bagian yang sudah kering ataupun busuk.

2. Pencucian

Pencucian dengan air mengalir dilakukan untuk menghilangkan debu, kotoran, maupun kapang pada permukaan daun jati.

3. Pengirisan

Pengirisan dengan pisau dilakukan untuk memperkecil ukuran daun jati.

4. Penimbangan daun jati segar

Penimbangan daun jati segar dilakukan untuk menentukan berat daun jati segar yang akan dihancurkan dan sebagai dasar penambahan air aquades steril.

5. Perendaman (*Pretreatment*)

Perendaman dilakukan sebelum proses penghancuran selama 10 menit. Lama perendaman didapatkan dari hasil perlakuan terbaik dalam penelitian Effendi (2012). Pada sampel yang direndam selama 10 menit menghasilkan rendemen tertinggi diantara sampel lain. Perendaman dilakukan untuk mempermudah proses ekstraksi.

6. Penghancuran

Penghancuran menggunakan *blender* hingga didapatkan jus daun jati.

Penghancuran dilakukan untuk memperkecil ukuran partikel daun jati serta memperluas area kontak partikel daun jati terhadap pelarut (air aquades steril) dan radiasi gelombang mikro.

7. Penimbangan jus daun jati

Penimbangan jus daun jati dilakukan untuk menentukan berat jus daun jati yang akan diradiasi.

8. Peradiasian

Peradiasian menggunakan *microwave* selama 1 menit dengan daya 80 Watt. Daya *microwave* didapatkan dari hasil perlakuan terbaik dalam penelitian Effendi (2012). Pada sampel yang direndam selama 10 menit dan diradiasi dengan daya 80 Watt menghasilkan total fenol, aktifitas antibakteri (diameter zona bening) terhadap *Escherichia coli* dan terhadap *Staphylococcus aureus* yang tertinggi diantara sampel lain. Peradiasian dilakukan untuk menaikkan tingkat kerusakan dinding sel partikel daun jati.

9. Pemerasan

Pemerasan menggunakan kain saring dilakukan untuk memisahkan pelarut (air aquades steril) dan ekstrak kasar daun jati yang terlarut terhadap ampas daun jati.

10. Penyaringan

Penyaringan menggunakan kertas saring dan corong. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan pelarut (air aquades steril) dan ekstrak kasar daun jati terhadap ampas padatan daun jati yang memiliki ukuran partikel kecil.

4.7.2 Perendaman Daging Sapi Has Dalam

4.7.2.1 Bahan

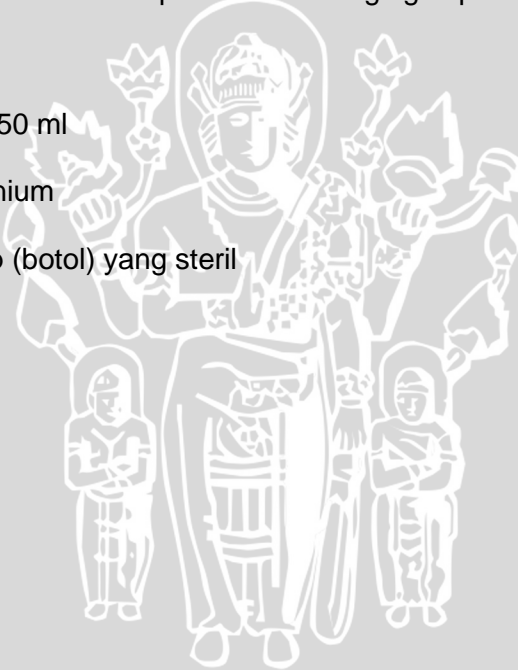
Bahan yang digunakan dalam perendaman daging sapi has dalam adalah sebagai berikut:

1. Ekstraksi daun jati metode *Microwave Assisted Extraction*
2. Daging sapi bagian has dalam

4.7.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam perendaman daging sapi has dalam adalah sebagai berikut:

1. Gelas *beaker* 250 ml
2. Penjepit alumunium
3. Tabung tertutup (botol) yang steril
4. Stopwatch
5. Pisau
6. Talenan
7. Wadah plastik
8. Neraca analitik



4.7.2.3 Prosedur Perendaman Daging Sapi Has Dalam

Berikut adalah langkah-langkah perendaman daging sapi dalam ekstrak daun jati metode *Microwave Assisted Extraction*:

1. Daging sapi dipotong-potong menjadi bentuk dadu dengan ukuran 2 cm x 2 cm x 2 cm agar semua permukaan daging sapi dapat tercelup dalam

ekstrak daun jati. Daging sapi yang telah dipotong-potong sementara diletakkan dalam wadah plastik yang telah dicuci bersih.

2. Hasil ekstraksi daun jati dilarutkan dengan aquades sesuai dengan masing-masing konsentrasi dan diletakkan dalam gelas beaker 250 ml. Jadi, ada 6 gelas beaker dengan berbagai konsentrasi ekstraksi daun jati yaitu 0%, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
3. Daging yang telah dipotong-potong tadi dimasukkan dalam gelas beaker yang berisi ekstraksi daun jati dengan berbagai konsentrasi. Dalam tiap gelas beaker berisi ekstraksi daun jati dengan volume 100 ml sehingga cukup untuk merendam daging sebanyak 4 potong.
4. Perendaman daging dilakukan selama 15 menit. Gunakan stopwatch untuk menandai bahwa perendaman dilakukan tepat sesuai waktu yang dibutuhkan.

4.7.3 Uji Kadar Total Protein

4.7.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam uji kadar protein total metode Kjeldahl adalah sebagai berikut:

1. H_2SO_4
2. NaOH
3. MM
4. HCl
5. H_3BO_3
6. Aquades
7. Campuran Na_2SO_4 dan HgO dengan perbandingan 20:1

4.7.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam uji kadar protein total metode Semi Micro Kjeldahl adalah sebagai berikut:

1. Destruksi
2. Labu kjeldahl
3. Perangkat destilasi
4. Erlenmeyer
5. Buret
6. Pipet ukur
7. Gelas ukur
8. Labu takar
9. Statif
10. Klem
11. Karet hisap

4.7.3.3 Uji Kadar Total Protein

Berikut adalah langkah-langkah uji kadar total protein metode Semi Micro Kjeldahl:

1. Haluskan daging sapi has dalam yang telah direndam dalam ekstrak daun jati.
2. Timbang bahan sebanyak 0,5 gram.
3. Masukkan bahan ke dalam tabung kjeldahl, lalu tambahkan 2 ml H_2SO_4 dan tambahkan 2 gram campuran Na_2SO_4 dengan HgO (20:1) untuk katalisator.

4. Didihkan sampai jernih (kurang lebih 4 jam) dan lanjutkan pendidihan 30 menit lagi.
5. Setelah dingin tambahkan 35 ml aquades dan tambahkan 8,5 ml NaOH 45% dan lakukan destilasi, destilat ditampung dalam 6,5 ml H₃BO₃ 4% yang telah diberi tetesan indikator MM atau MB dan tampung sebanyak 25 ml.
6. Titrasi destilat yang diperoleh dengan HCl 0.02 N
7. Perhitungan kadar protein dilakukan dengan rumus :

$$N \text{ Total (\%)} = \frac{\text{ml titrasi} \times N \text{ HCl} \times 14,008 \times 100\%}{\text{g bahan} \times 1000}$$

$$\text{Protein} = N \text{ Total (\%)} \times 6,25$$

4.8 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) menggunakan software SPSS for Windows release 16. Uji statistik yang digunakan adalah uji normalitas data *Shapiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data. Setelah hasil diketahui maka uji yang digunakan adalah uji statistik non parametrik yaitu *Kruskal Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan kadar total protein daging sapi pada setiap konsentrasi ekstrak daun jati (*Tectona grandis* Linn. F.). Uji dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara signifikan. Selain itu juga dilakukan Uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan dan besarnya hubungan konsentrasi ekstrak daun jati (*Tectona grandis* Linn. F.) dengan kadar total protein daging sapi.