

3. METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian yaitu rumput laut coklat *S. cristaefolium* yang didapatkan dari Talango, Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. CaCO_3 1% (b/v), kain blacu, kertas saring, akuades dan dekstrin 10% (b/v), dan standar kuersetin, indikator pH, kertas saring whatman no. 42, kertas label, larutan Buffer, etanol p.a 95%, AlCl_3 10% (b/v).

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain plastik, timbangan digital, ayakan 60 mesh, microwave, gunting, nampan, panci, kompor, *homogenizer* dan termometer, desikator, nampan, oven, botol timbang, *crushable tank*, sendok bahan dan timbangan analitik, pipet tetes, *beaker glass* dan spektrofotometer *multispect-1601* UV-Vis merk Shidazu, *beaker glass*, spatula, corong *Buchner*, oven, sendok bahan, timbangan analitik, nampan, sedangkan untuk pengujian struktur dan ukuran partikel dianalisis menggunakan alat *Scanning electron microscope* merk QUARUM 150R S dan *EDS analysis system*, *spray dryer* merk Lab *Plant*, timba plastik, blender merk Philips, alat-alat gelas merk *Pyrex iwaki*, *homogenizer* merk *Ultra-turrax T25*, dan *stopwatch*. oven merk Fotile, oven [KQD50F-C2], botol timbang, *crushable tank*, sendok bahan dan timbangan analitik merk *Shinco tipe Gs* dan Vibra, pH meter merk *Cyberscan* pH 300, timbangan analitik merk *Shinco tipe Gs* atau Vibra dan nampan, *Colormeter* merk TES 135.

3.3 Metode Penelitian

Pada penelitian enkapsulat serbuk ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan metode Eksperimen. Metode Eksperimental adalah suatu penelitian yang digunakan untuk hubungan sebab akibat dengan keterlibatan dalam melakukan variasi variable bebas (Nursalam, 2003), pada metode Eksperimental penelitian ini adalah pembuatan sampel enkapsulat serbuk daun *S. cristaefolium* menggunakan dua penelitian yaitu penelitian tahap satu dan penelitian tahap dua. Penelitian tahap satu dilakukan dengan membuat ekstrak dari daun *S. cristaefolium*, dengan perlakuan kering dan basah sehingga didapatkan ekstrak rumput laut yang dilanjutkan ke penelitian tahap dua. Penelitian tahap dua penelitian ini bertujuan mendapatkan pengaruh suhu *inlet Spray dryer* terhadap kualitas enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium*.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dibedakan menjadi dua yaitu variabel bebas (*independent variable*) dan variabel terikat (*dependent variable*). Variabel bebas adalah faktor yang menyebabkan suatu pengaruh dari sebuah hasil dan sengaja dapat dirubah dan dimanipulasi oleh peneliti. Pada penelitian ini terdiri dari variable bebas dan variable terikat. Variabel bebas dari penelitian ini adalah suhu *inlet spray dryer* yaitu suhu 150°C, 170°C dan 190°C perbedaan suhu *inlet Spray dryer* yang digunakan dalam pembuatan enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium*. Sedangkan variabel terikat adalah faktor yang dapat dipengaruhi oleh hasil variabel bebas (Mutiara *et al.*, 2006)., variabel terikatnya yaitu efisiensi dari enkapsulasi flavonoid, kadar air, kelarutan, pH, organoleptik, distribusi partikel, ukuran partikel, derajat warna dan struktur morfologi partikel serta unsur kimia di dalam enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan Edax.

3.5 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini dibagi menjadi dua tahap penelitian. Persiapan sampel sebelum menuju kepenelitian tahap satu. Penelitian tahap satu bertujuan untuk mengetahui diantara sampel daun kering atau sampel daun basah dari *S. cristaefolium* yang mempunyai kandungan flavonoid yang tertinggi. Penelitian tahap dua bertujuan untuk mengetahui kandungan flavonoid setelah mengalami proses enkapsulat menggunakan *spray dryer* dengan suhu yang berbeda melalui beberapa, parameter uji diantaranya kadar air, kelarutan, derajat warna, pH, organoleptik dan untuk mengetahui efisiensi enkapsulasi flavonoid dari penyulut melalui uji struktur morfologi diameter ukuran partikel.

3.5.1 Persiapan Bahan.

Persiapan bahan yaitu menggunakan sampel utama yaitu rumput coklat *S. cristaefolium*. Rumput laut diperoleh dari perairan Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Rumput laut dicuci dengan air mengalir sehingga mengurangi bau amis dan kotoran yang menempel kemudian dilakukan pemisahan antara batang serta daun.

Langkah selanjutnya dilakukan pembuatan larutan kapur sebanyak 1% dengan perbandingan berat volume air (b/v) serta diukur pH 11 karena untuk mengurangi bau amis dari rumput laut, kemudian dilakukan perendaman pada larutan kapur selama 24 jam dan dilanjutkan dengan perendaman dengan air biasa selama 3 hari, dengan mengati air setiap pagi dan sore hal ini sesuai (Sanger, 2010), dengan tujuan untuk mencuci sisa zat kapur dan menghilangkan bau amis pada rumput laut. Langkah selanjutnya daun rumput laut dibagi menjadi 2 daun rumput laut basah dan kering sebanyak 500 g yang dihaluskan dengan blender selama 5 menit. Sampel kering didapatkan melalui penjemuran sinar matahari

kurang lebih 1-2 hari. Pada hal ini sampel kering yang memiliki kandungan flavonoid tertinggi dibandingkan sampel basah. Prosedur untuk mengetahui daun *S. cristaefolium* dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.5.2 Penelitian Tahap satu.

Hasil pada Persiapan sampel yang paling baik dilanjutkan sebagai penelitian tahap satu, dimana hasil dari penelitian tahap satu adalah dari sampel kering. Daun rumput laut yang kering dipotong kecil - kecil kemudian diblender sampai sampel halus kemudian diayak 60 mesh, ukuran 60 mesh menurut Sembiring (2009), bertujuan agar pada saat proses ekstraksi sampel agar mempercepat zat didalamnya mudah keluar dan ditimbang sebanyak 24 g. Serbuk daun *S. cristaefolium* yang telah diayak kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 600 mL dengan perbandingan 1:25 (b/v) pada suhu 90°C menggunakan waterbath selama 5 jam, metode ini menggunakan ekstraksi infudasi yaitu menggunakan aquades pada suhu 90°C yang sesuai (Wisesa dan Widjanarko, 2014), hasil kemudian disaring dengan kain blacu dan kertas saring untuk mendapatkan ekstrak daun *S. cristaefolium*. Ekstrak daun disimpan dalam botol dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil yang bertujuan untuk menjaga kualitas dari ekstrak tersebut. Prosedur ekstrak daun *S. cristaefolium* dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5.3 Penelitian Tahap dua.

Pada penelitian tahap dua yaitu proses untuk mengenkapsulasi yaitu dengan dekstrin. Proses pengkapsulan yaitu hasil dari ekstraksi daun *S. cristaefolium* 600 mL yang kemudian ditambahkan dekstrin sebanyak 10% (b/v) kemudian dihomogenkan menggunakan *homogenizer* dengan kecepatan 8000

rpm selama 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan alat *spray dryer*. Penggunaan alat *spray dryer* yang pertama yaitu diatur suhu *inlet spray dryer* sebesar 150°C, 170°C, dan 190°C yang mengacu pada penelitian (Lahmudin, 2006), sedangkan untuk suhu *outlet spray dryer* sebesar 60-70°C tetapi untuk suhu *outlet* sendiri menyesuaikan dari suhu *inlet* alat. Prosedur enkapsulasi ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan *Spray dryer* dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.6 Analisa Data

Analisis data yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Percobaan. Pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan tiga ulangan dan tiga perlakuan, Kemudian dilanjutkan dengan analisa ragam ANOVA (*Analysis of Variant*). Rancangan percobaan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Model Rancangan Percobaan pada Penelitian Tahap Satu dan Dua.

Suhu <i>Spray dryer</i>	Ulangan			Total	Rata- rata
	1	2	3		
A	A1	A2	A3	T1	R1
B	B1	B2	B3	T2	R2
C	C1	C2	C3	T3	R3

Keterangan:

- A : Enkapsulasi ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan *Spray dryer* dengan suhu *inlet* 150°C.
- B : Enkapsulasi ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan *Spray dryer* dengan suhu *inlet* 170°C.
- C : Enkapsulasi ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan *Spray dryer* dengan suhu *inlet* 190°C.

$$Y_{ij} = \mu + \tau I + \sum_{ij}$$

$$I = 1,2,3,\dots,i$$

$$J = 1,2,3,\dots,j$$

Keterangan:

Y_{ij} = hasil pengamatan (parameter yang diuji)

μ = nilai rata-rata umum

τI = pengaruh perbedaan suhu *Spray dryer* pada taraf ke-I terhadap

- parameter
- Σij = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-l dan ulangan ke-j
- t = perlakuan (perbedaan suhu *Spray dryer*)
- r = ulangan (1, 2, 3)
- Langkah selanjutnya adalah membandingkan antara F hitung dengan F tabel:
- Jika F hitung < F tabel 5%, maka perlakuan tidak berbeda nyata.
 - Jika F hitung > F tabel 1%, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.
 - Jika F table 5% < F hitung < F tabel 1%, maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

Apabila hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata (F hitung > F tabel 5%) maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan hasil yang terbaik. Analisis BNT dinyatakan dengan rumus sebagai berikut:

$$BNT = t\alpha; db \text{ galat } \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

Keterangan:

- KTG : Kuadrat tengah galat
- $t\alpha$: Nilai t tabel pada $\alpha = 5\%$
- db galat : Derajat bebas galat
- r : Banyaknya ulangan

3.7 Parameter Uji.

Parameter uji yang digunakan pada penelitian pembuatan enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* adalah pengujian derajat warna, kandungan total flavonoid, kadar air, pH, daya larut serta struktur evaluasi morfologi partikel (SEM), distribusi ukuran diameter partikel, analisi organoleptik.

3.8 Identifikasi Kandungan Flavonoid (Putranti, 2013) dan Efisiensi Enkapsulasi Flavonoid (Umawiranda dan Cahyaningrum, 2014).

Identifikasi Kandungan total Flavonoid digunakan untuk mengetahui bahwa ekstrak rumput laut basah maupun kering setelah perebusan. Metode yang digunakan untuk identifikasi flavonoid yaitu secara kualitatif dengan cara sebagai berikut, di ambil sebanyak 0,5 g serbuk *S. cristaefolium* dilarutkan menggunakan

etanol 25 mL, kemudian disaring dan diambil filtratnya sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 2 mL AlCl_3 10%, kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 10-15 menit. Absorbansi larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pada panjang gelombang 415 nm. Standar Pada penelitian ini menggunakan standar kuersetin, kuersetin dengan konsentrasi 1-10 ppm. Prosedur pengujian kadar flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat pada Lampiran 4, sedangkan untuk menentukan kandungan senyawa total flavonoid, Untuk menentukan besarnya flavonoid menggunakan rumus dibawah ini:

$$C = C_1 \times \frac{V}{m} \times FP$$

Keterangan:

C = Total flavonoid (mg/mL ekstrak).

C_1 = Konsentrasi kuersetin (mg/mL).

FP = Faktor pengenceran.

m = Berat ekstrak (g).

V = Volume ekstrak (L)

Perhitungan efisiensi enkapsulasi flavonoid mengacu pada metode Umawiranda dan Cahyaningrum (2014), dengan rumus perhitungan:

$$\% \text{ Efisiensi Flavonoid} = \frac{\text{Flavonoid setelah dienkapsulasi}}{\text{Flavonoid sebelum dienkapsulasi}} \times 100\%$$

Keterangan:

EE = Efisiensi enkapsulasi (%).

3.9 Uji Kandungan Air (Sudarmadji *et al.*, 2010)

Pengukuran kadar air enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* menggunakan metode *Thermogravimetri* menurut Sudarmadji *et al.*, (2010) yaitu dengan menguapkan air dalam bahan pangan menggunakan cara pemanasan, yang kemudian ditimbang bahannya sampai berat konstan sehingga air pada bahan pangan tersebut telah hilang atau diuapkan. Botol timbang kosong yang telah diberi kode untuk masing – masing sampel dioven pada suhu 105°C selama

24 jam dengan tutup setengah terbuka, setelah 24 jam botol timbang kosong diambil dan dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit untuk menghilangkan uap air, lalu ditimbang sebagai berat A. Enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* masing – masing sampel ditimbang sebanyak 2 g dan dimasukkan ke dalam botol timbang yang sebelumnya telah ditimbang dan diketahui sebagai berat B. Botol timbang beserta enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* kemudian dimasukkan ke dalam oven yang diatur suhunya pada 105°C selama 3 - 4 jam, kemudian dimasukan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang sebagai berat C, sedangkan untuk mendapatkan persentase kadar air pada masing - masing sampel digunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Wb} = \frac{B - C}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat botol timbang kosong (g)

B = berat botol timbang + sampel awal (g)

C = berat botol timbang + berat sampel kering (g)

Prosedur pengujian kadar air pada enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.10 Uji pH (Rusviani, 2007)

Uji pH diukur dengan menggunakan pH meter. Langkah awal pengukuran pH adalah dengan melakukan standarisasi pada pH meter. Larutan *Buffer* yang digunakan dalam standarisasi pH meter tergantung pH sampel yang akan diukur. Standarisasi dimulai dengan menyalakan pH meter dan biarkan sampai stabil (15-30 menit). Elektroda dibilas dengan akuades lalu dikeringkan dengan tissue. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan sampel kemudian diatur pengukuran pH. Elektroda dibiarkan tercelup beberapa saat sampai diperoleh pembacaan pada

display pH meter yang stabil, lalu disesuaikan pengatur standarisasi pH meter (tombol kalibrasi) sampai diperoleh angka pH yang sesuai dengan pH *buffer*.

Pengukuran pH sampel dimulai dengan melarutkan sejumlah sampel serbuk *S. cristaefolium* ke dalam air dengan perbandingan 1:10 (b/v) lalu dilakukan pengukuran nilai pH. Langkah awal pH meter dibiarkan sampai stabil (15-30 menit). Elektroda dibilas dengan akuades lalu keringkan dengan tissue. Elektroda dicelupkan ke dalam larutan sampel, lalu diatur pengukuran pH. Elektroda dibiarkan tercelup beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil, lalu dicatat pH sampel. Nilai pH dapat dibaca pada display alat pH meter. Prosedur pengujian pH dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.11 Daya Kelarut (Novia, 2009)

Daya larut menurut Novia, (2009) adalah suatu bahan yang dapat larut dalam suatu zat cair atau dapat diserap langsung oleh tubuh. Kelarutan enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dihitung dengan metode gravimetri, yaitu berdasarkan berat residu yang tertinggal pada kertas saring Whatman no. 42. Sampel ditimbang sekitar 0,75 g, kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades dan disaring menggunakan corong *Buchner* dengan sistem vakum. Sebelum digunakan, kertas saring terlebih dahulu dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 30 menit, kemudian ditimbang beratnya. Setelah proses penyaringan vakum, kertas saring beserta residu dikeringkan di dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam, kemudian ditimbang beratnya. Perhitungan persentase kelarutan dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ bk} = 1 - \frac{(C - B)}{\frac{(100 - KA)}{100} \times A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Berat awal sampel

B = Berat kertas saring

C = Berat akhir (kertas saring dan residu)

KA = Kadar air serbuk

Prosedur uji kelarutan enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.12 Pengujian Morfologi Enkapsulat Ekstrak Daun *S. cristaefolium* (Ulfah *et al.*, 2010).

Pengujian SEM bertujuan untuk mengetahui bentuk dan morfologi permukaan enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium*. Sampel enkapsulat diamati dengan menggunakan *scanning electron microscopy*. Enkapsulat ditempelkan pada *holder* dengan menggunakan *dotile* kemudian dimasukkan ke vakum evaporator. Pada tingkat tertentu *holder* dipijar sehingga uap emas akan melapisi bahan yang akan ditempelkan pada *holder*. *Holder* kemudian dimasukkan ke dalam alat SEM. Lalu dilakukan pemeriksaan terhadap morfologi mikrokapsul. Jumlah bahan inti yang terenkapsulasi mengacu pada metode Ulfah *et al.* (2010), tentang perhitungan secara langsung pada jumlah sel yang hidup untuk satu bidang pandang yang dinyatakan dalam persen (%) pada sel. Morfologi mikrokapsul diamati untuk satu bidang pandang dengan perbesaran 1000x. Morfologi enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dibagi dalam 2 jenis yaitu:

- Morfologi bahan inti yang terenkapsulasi terlihat dengan adanya penyalut berupa lapisan putih pada permukaan dinding mikrokapsul dan berbentuk cekung.
- Morfologi bahan inti yang tidak terenkapsulasi terlihat dengan tidak adanya penyalut berupa lapisan putih pada permukaan dinding bahan inti dan berbentuk bulat.

Perhitungan bahan inti yang terenkapsulasi pada satu bidang pandang dapat dihitung dengan menggunakan rumus persen mikrokapsul, yaitu:

$$\% \text{ Mikrokapsul} = \frac{\text{Jumlah bahan inti terenkapsulasi}}{\text{Jumlah serbuk}} \times 100\%$$

Prosedur uji pengujian morfologi enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dapat dilihat pada Lampiran 8. Distribusi ukuran diameter enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* diamati dengan menggunakan alat SEM. Pengamatan ukuran diameter mengacu pada metode Rompas *et al.* (2011), tentang pengamatan struktur sel epidermis dan stomata daun pada beberapa tumbuhan suku *orchidae* dalam satu bidang pandang. Distribusi ukuran diameter enkapsulat diamati untuk satu bidang pandang dengan perbesaran 1000x, 2500x dan 3000x. Distribusi ukuran diameter enkapsulat dibagi menjadi 3 parameter, yaitu:

- Mikrokapsul dengan ukuran < 10 μm .
- Mikrokapsul dengan ukuran 10 μm - 20 μm .
- Mikrokapsul dengan ukuran > 20 μm .

3.13 Pengujian Warna Metode Hunter (Rusviani, 2007).

Pengujian warna enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dilakukan dengan menggunakan alat pengukur warna (*color meter*). Pengujian dilakukan dengan cara menempelkan permukaan alat sensor *color meter* pada enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium*. Dari pengujian tersebut akan diperoleh nilai L, a, dan b yang ditampilkan pada alat. Hasil pengukuran dikonversi ke dalam sistem Hunter dengan L menyatakan parameter kecerahan dari hitam (0) sampai putih (100). Notasi a menyatakan warna kromatik campuran merah – hijau dengan nilai + a (positif) dari 0 sampai +100 untuk warna merah dan nilai – a (negatif) dari 0 sampai - 80 untuk warna hijau. Notasi b menyatakan warna kromatik campuran biru-kuning dengan nilai + b (positif) dari 0 sampai +70 untuk warna kuning dan nilai – b (negatif) dari 0 sampai – 80 untuk warna biru. Sedangkan L menyatakan kecerahan warna. Semakin tinggi kecerahan warna, semakin tinggi nilai L.

Selanjutnya dari nilai a dan b dapat dihitung °Hue dengan rumus:

$$^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} \frac{b}{a}$$

Jika hasil yang diperoleh :

18° – 54°	maka produk berwarna <i>red</i> (R)
54° – 90°	maka produk berwarna <i>yellow red</i> (YR)
90° – 126°	maka produk berwarna <i>yellow</i> (Y)
126° – 162°	maka produk berwarna <i>yellow green</i> (YG)
162° – 198°	maka produk berwarna <i>green</i> (G)
198° – 234°	maka produk berwarna <i>blue green</i> (BG)
234° – 270°	maka produk berwarna <i>blue</i> (B)
270° – 306°	maka produk berwarna <i>blue purple</i> (BP)
306° – 342°	maka produk berwarna <i>purple</i> (P)

Prosedur uji warna enkapsulat ekstrak daun *S. cristaeifolium* dapat dilihat pada Lampiran 9.

3.14 Analisis Organoleptik (Jaya *et al.*, 2006)

Penilaian organoleptik dilakukan dengan uji *multiple comparison*. Uji *multiple comparison* ini dilakukan dengan menggunakan pendekatan skala atau skor yang dihubungkan dengan deskripsi tertentu dari atribut mutu produk. Dalam sistem skoring angka digunakan untuk menilai intensitas produk dengan susunan meningkat atau menurun (Jaya *et al.*, 2006). Panelis yang digunakan minimal sebanyak 20 orang. Penilaian uji *multiple comparison* menggunakan skoring dengan nilai terendah 1 (sangat amis) dan tertinggi 5 (sangat tidak amis). *Questioner* yang digunakan untuk uji organoleptik dapat dilihat pada Lampiran 10.

3.15 Analisa Rendemen serbuk (Sethiyarini, 2008)

Rendemen adalah jumlah produk bahan metah sebelum proses dan bahan jadi setelah proses yang kemudian di kalikan 100%. Pada rendemen ini yaitu bahan pengisi dekstrin sebanyak 10% yang sebelum proses dan hasil jadi dari serbuk yang melalui proses *spray drier* dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Jumlah hasil serbuk}}{\text{Jumlah bahan pengisi}} \times 100\%$$

Prosedur uji warna enkapsulat ekstrak daun *S. cristaefolium* dapat dilihat pada Lampiran 11.

