

III. BAHAN DAN METODE

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian dan Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian dan Biomassa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2012 sampai bulan Maret 2013.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun cincau dari tanaman cincau pohon (*Premna oblongifolia* Merr) yang dipetik mulai dari daun ke 5 ke arah pangkal, daun cincau diperoleh dari Daerah Way Halim, Bandar Lampung. Buah nanas (*Ananas comosus*) jenis *queen* dan jambu biji (*Psidium guajava* L) dengan tingkat kematangan mature yang diperoleh dari Chandra Super Store. Mencit (*Mus musculus* L.) usia 2 bulan sampai 3 bulan yang diperoleh dari Balai Penyidik dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Inokulum kultur murni *Lactobacillus casei* FNCC 0900 yang diperoleh dalam bentuk murni dari Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Susu skim, sukrosa dan asam sitrat diperoleh dari Chandra Super Store. Glukosa yang diperoleh dari CV. Animo Bandar Lampung. Ransum mencit berupa pelet diperoleh dari CV. Sanusi Taufik Bandar Lampung.

Bahan analisis yang digunakan adalah De Mann Ragosa Sharp (MRS) Broth, MRS Agar sebagai media tumbuh dan analisis Bakteri Asam Laktat, aquadest, larutan NaCl, alkohol 70%, larutan NaOH 0,1N, indikator phenolphthalein, DPPH 0,08 mM, etanol, PBS Tablet, KCl, Buffer phosphat, potassium chloride, sodium chloride, TBA, BHT, HCl, TCA dan bahan analisis lainnya.

Alat-alat yang digunakan antara lain timbangan analitik dua digit (Mettler PJ 3000), laminary flow (merk Esco), oven (Heraeus dan Philips Harris Ltd), blender (Sharp), inkubator (Mettler), spektrofotometri UV (HACH), pH meter (Hanna Instruments 8424), autoclave (Wise Calve, Daihan Scientific), colony counter (Stuart Scientific), mikropipet (Thermo Scientific), erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, dan alat-alat gelas lainnya untuk analisis kimia dan mikrobiologi. Sedangkan alat-alat yang digunakan untuk uji *in vivo* adalah spuit volume 1 ml yang telah ditumpulkan sebagai alat pemberian sampel secara oral, seperangkat kandang percobaan, tempat air minum mencit, tempat makan mencit, timbangan mencit, gunting untuk membedah mencit, sarung tangan, cool box, vortex.

C. Metode Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan dua tahap penelitian, yaitu penelitian tahap I (Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Penambahan Sari Buah) dan penelitian tahap II (Uji In Vivo)

1. Tahap I (Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Penambahan Sari Buah)

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian tahap pertama adalah Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan 2 faktor dan 3 ulangan.

Faktor Pertama adalah jenis sari buah yang terdiri dari dua taraf yaitu sari buah jambu biji merah (G) dan sari buah nanas (N). Faktor kedua adalah konsentrasi sari buah yang terdiri dari lima taraf yaitu konsentrasi 0% (1), 5% (2), 10% (3), 15% (4), dan 20% (5). Data yang diperoleh diuji kesamaan ragamnya dengan uji Bartlett dan uji kemenambahan data dengan uji Tuckey, kemudian data dianalisis sidik ragam untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data dianalisis lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%. Masing-masing produk minuman sinbiotik dianalisis untuk mendapatkan produk yang terbaik berdasarkan parameter total bakteri asam laktat, total asam laktat, pH, uji organoleptik dengan parameter berupa warna, rasa, aroma, dan penerimaan keseluruhan, dan aktivitas antioksidan.

2. Tahap II (Uji *In Vivo*)

Penelitian tahap kedua (uji *In Vivo*) adalah pengujian pada hewan percobaan dengan menggunakan mencit untuk dievaluasi status antioksidan hati. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi pengaruh pemberian minuman sinbiotik sari buah terbaik terhadap kadar peroksida lipid mencit. Perlakuan dosis ditetapkan berdasarkan dosis anjuran untuk susu fermentasi bagi manusia dengan berat badan 70 kg yaitu sekitar 100-200 ml/hari (Riyanto, 2011), serta berdasarkan anjuran konsumsi minuman probiotik komersial yaitu 100 ml per orang per hari. Konversi berat badan mencit 20 g dengan berat badan manusia 70 kg adalah 0,0026 (Amalina, 2009) seperti disajikan pada Tabel 1.

Uji status antioksidan hati mencit dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok I kontrol (Aquades), kelompok II minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau, dan

kelompok 3 minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau yang dikombinasikan sari buah dengan aktivitas antioksidan tertinggi. Perlakuan dilakukan selama 30 hari. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor mencit sehingga jumlah mencit untuk uji tersebut ada 27 ekor. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian tahap kedua adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh diuji kesamaan ragamnya dengan uji Bartlett dan uji kemenambahan data dengan uji Tuckey, kemudian data dianalisis sidik ragam untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data dianalisis lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

Tabel 1. Konversi perhitungan dosis (g)

	Mencit (20 g)	Tikus (200 g)	Marmot (400 g)	Kelinci (1,5 kg)	Kucing (2 kg)	Kera (4 kg)	Anjing (12 kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1	7	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus (200 g)	0,14	1	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56
Marmot (400 g)	0,08	0,57	1	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1		2,4	4,5	14,2
Kucing (2 kg)	0,03	0,23	0,41	0,92	1	2,2	4,1	13
Kera (4 kg)	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1	1,9	6,1
Anjing (12 kg)	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1	3,1
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1

Sumber : Laurence dan Bacharach, 1964 (dalam Amalina, 2009)

D. Pelaksanaan Penelitian

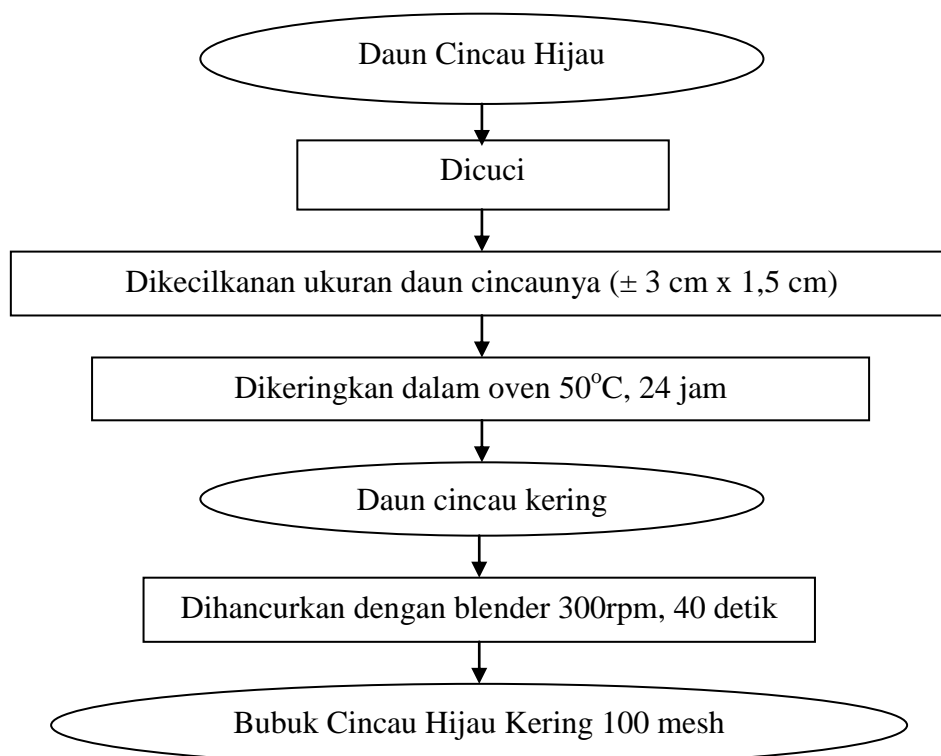
1. Penelitian Tahap I

Penelitian tahap I bertujuan untuk mendapatkan minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau dengan karakteristik terbaik yang digunakan sebagai bahan baku utama

untuk perlakuan dengan pemberian oral pada uji in vivo mencit. Pembuatan minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau terdiri dari beberapa tahapan, yaitu :

1.1. Pembuatan Bubuk Daun Cincau Hijau Kering

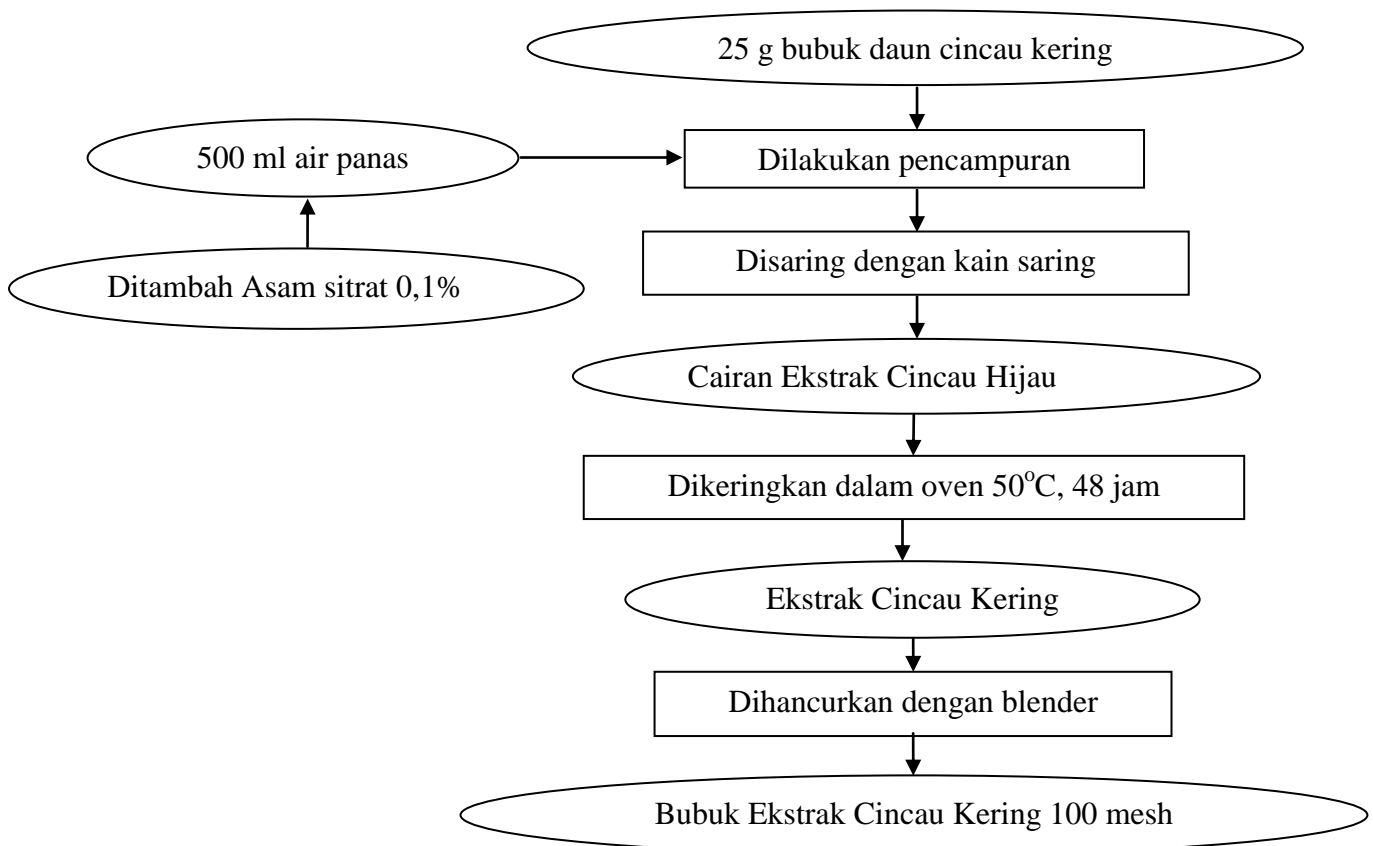
Pembuatan bubuk daun cincau dilakukan dengan menggunakan metode Nurdin dkk. (2004). Daun cincau dicuci dengan air hingga bersih dan tangkainya dibuang. Daun cincau yang telah dibersihkan dipotong 3 cm x 1,5 cm, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C selama kurang lebih 24 jam. Daun dianggap kering bila daun terasa renyah bila diremas. Daun cincau yang telah kering kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender hingga menjadi bubuk. Diagram alir pembuatan bubuk daun cincau hijau dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir pembuatan bubuk daun cincau hijau kering
Sumber : Nurdin, dkk. (2004)

1.2. Proses Ekstraksi Bubuk Daun Cincau Hijau

Sebanyak 25 g bubuk daun cincau hijau dicampurkan dengan air panas (suhu \pm 100°C) sebanyak 500 ml. Air yang akan digunakan sebelumnya ditambahkan asam sitrat 0,1% (b/v). Kemudian dilakukan pencampuran menggunakan stirrer dengan kecepatan penuh selama 15 menit untuk membantu proses ekstraksi. Campuran tersebut disaring dengan menggunakan kain saring sambil dilakukan peremasan hingga diperoleh cairan kental ekstrak daun cincau. Cairan ekstrak daun cincau tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 48 jam. Hasil pengeringan tersebut kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender hingga tingkat kehalusan tertentu. Diagram alir proses ekstraksi bubuk daun cincau hijau dapat dilihat pada Gambar 2.

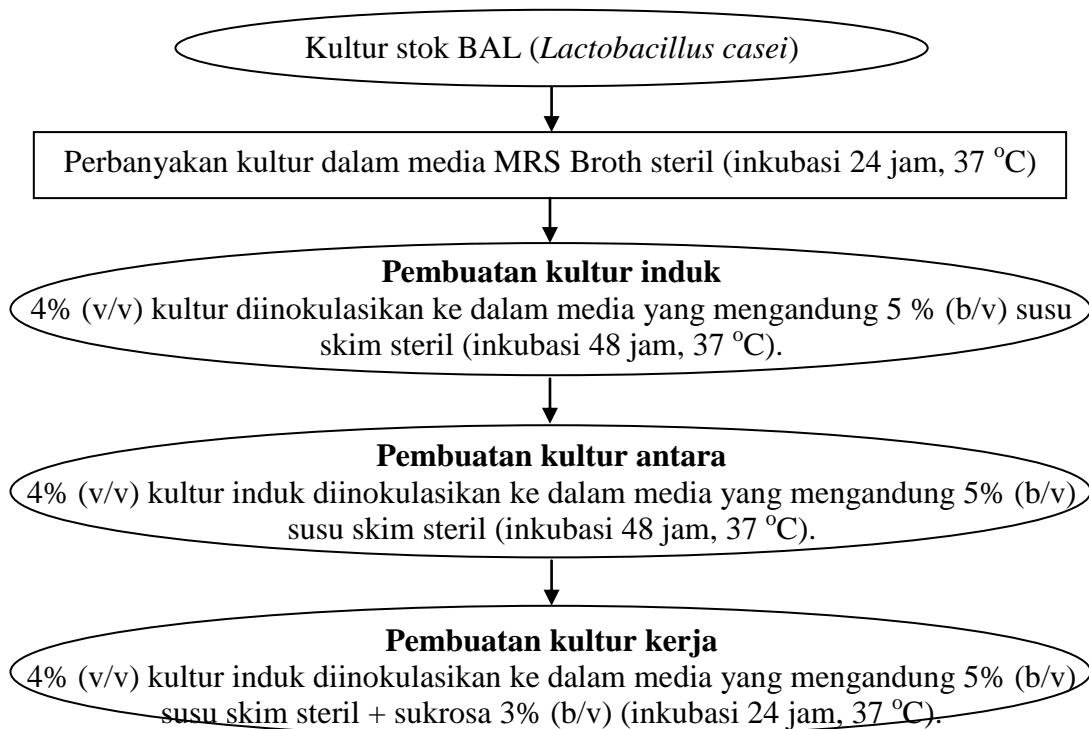


Gambar 2. Diagram alir pembuatan bubuk ekstrak daun cincau
 Sumber : Nurdin, dkk. (2004)

1.3. Persiapan Starter

Persiapan starter dilakukan dengan memodifikasi metode Rizal dkk. (2006). Kultur bakteri yang akan digunakan (*Lactobacillus casei*) dipindahkan dari kultur stok ke dalam tabung reaksi berisi media MRS Broth steril. Dari MRS Broth Steril, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian sebanyak sebanyak 4% (v/v) kultur ditumbuhkan ke dalam media yang mengandung 5% (b/v) susu skim yang telah disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kultur yang dihasilkan disebut kultur induk.

Selanjutnya dari kultur induk diinokulasikan ke media yang sama yaitu sebanyak 4% (v/v) kultur ditumbuhkan ke dalam media yang mengandung 5% (b/v) susu skim yang telah disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C sehingga dihasilkan kultur antara. Kemudian kultur antara diinokulasikan sebanyak 4% (v/v) ke dalam media yang mengandung 5% (b/v) susu skim steril dengan penambahan sukrosa 3% (b/v), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan kultur kerja. Pada proses pembuatan minuman sinbiotik ekstrak daun cincau hijau dan minuman sinbiotik ekstrak daun cincau hijau yang diformulasi sari buah, kultur kerja sebanyak 4% (v/v) akan digunakan sebagai starter atau inokulum. Diagram alir pembuatan starter dapat dilihat pada Gambar 3.

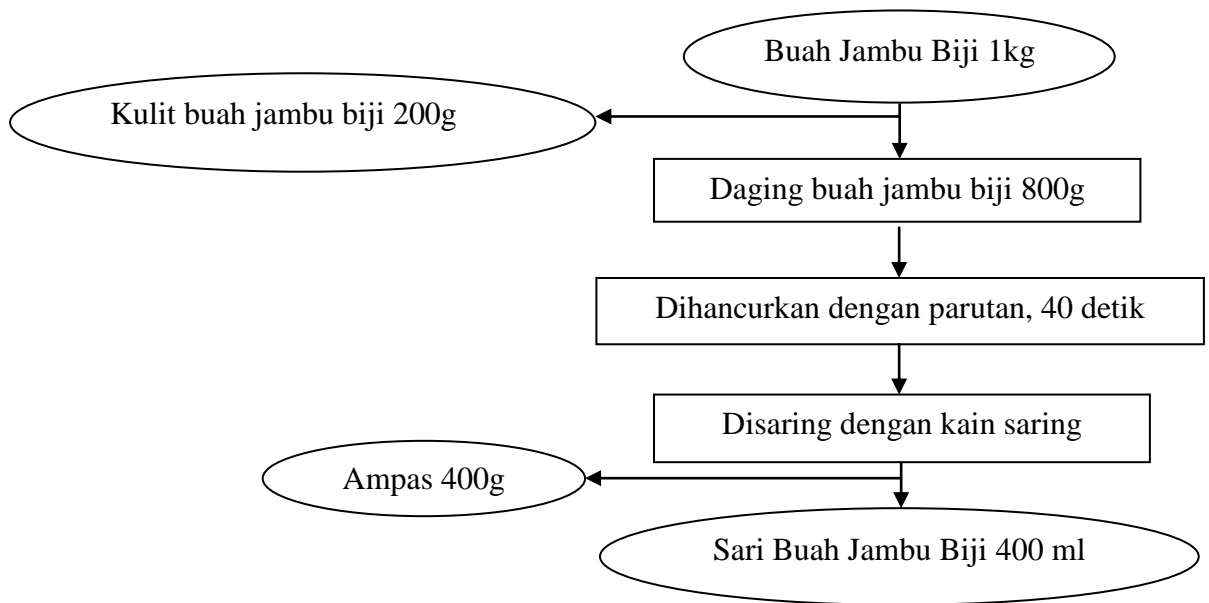


Gambar 3. Diagram alir pembuatan starter

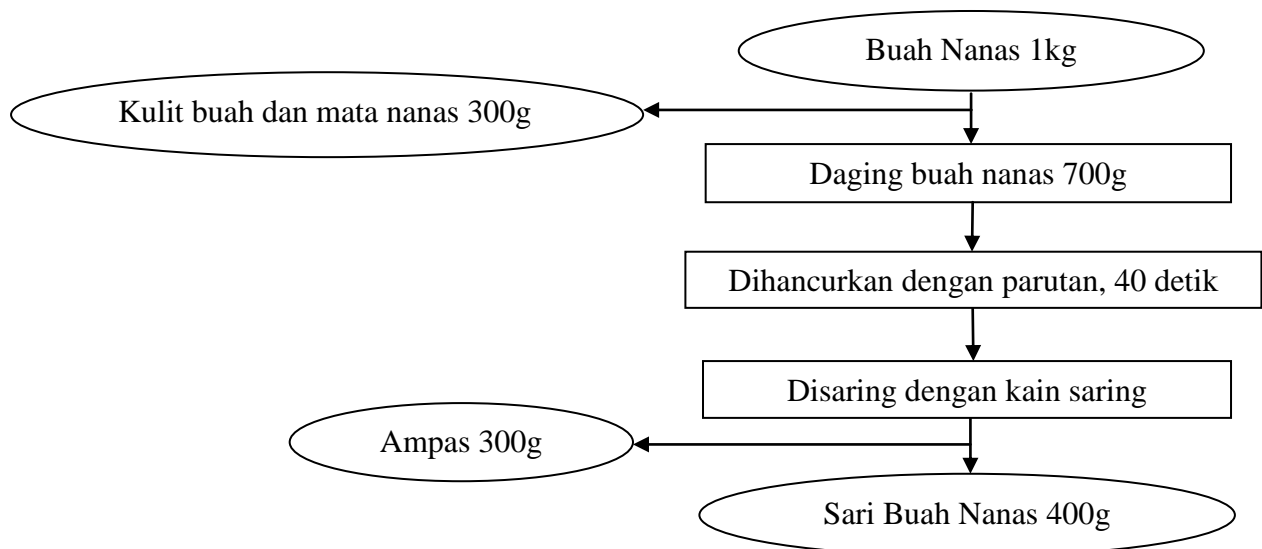
Sumber : Rizal, dkk. (2006), yang telah dimodifikasi

1.4. Pembuatan Sari Buah Jambu Biji dan Nanas

Buah jambu biji mula-mula dikupas kulitnya lalu dicuci. Dilakukan penghancuran dengan diparut selama 40 detik, kemudian dilakukan penyaringan sehingga diperoleh sari buah jambu biji. Prosedur pembuatan sari buah jambu biji dapat dilihat pada Gambar 4. Buah nanas mula-mula dikupas kulitnya dan dibersihkan mata nanasnya lalu dicuci. Dilakukan penghancuran dengan diparut selama 40 detik, kemudian dilakukan penyaringan sehingga diperoleh sari buah nanas. Prosedur pembuatan sari buah nanas dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4. Pembuatan sari buah jambu biji
Sumber : Rizal, dkk. (2006), yang telah dimodifikasi



Gambar 5. Pembuatan sari buah nanas
Sumber : Rizal, dkk. (2006), yang telah dimodifikasi

1.5. Pembuatan minuman sinbiotik ekstrak daun cincau hijau dengan kombinasi sari buah jambu biji dan sari buah nanas

Proses pembuatan minuman sinbiotik dari ekstrak cincau hijau dengan menggunakan metode yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Nuridin,

dkk, 2007). Diagram alir pembuatan minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau dengan kombinasi sari buah jambu biji dan sari buah nanas dapat dilihat pada Gambar 6. Sebanyak 2% (b/v) susu skim ditambah ekstrak cincau hijau sebanyak 0,5% (b/v), dilakukan penambahan sari buah jambu biji dan sari buah nanas ke dalam masing-masing fermentor dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15, 20% (b/v), selanjutnya dilakukan penambahan aquades hingga volumenya menjadi 120 ml kemudian campuran ini diaduk hingga rata menggunakan spatula kaca selama 30 detik, kemudian dipasteurisasi 76 °C selama 15 menit, selanjutnya didinginkan hingga suhu 37 °C. Kultur kerja *Lactobacillus casei* diinokulasi sebanyak 4% (v/v) dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 48 jam.

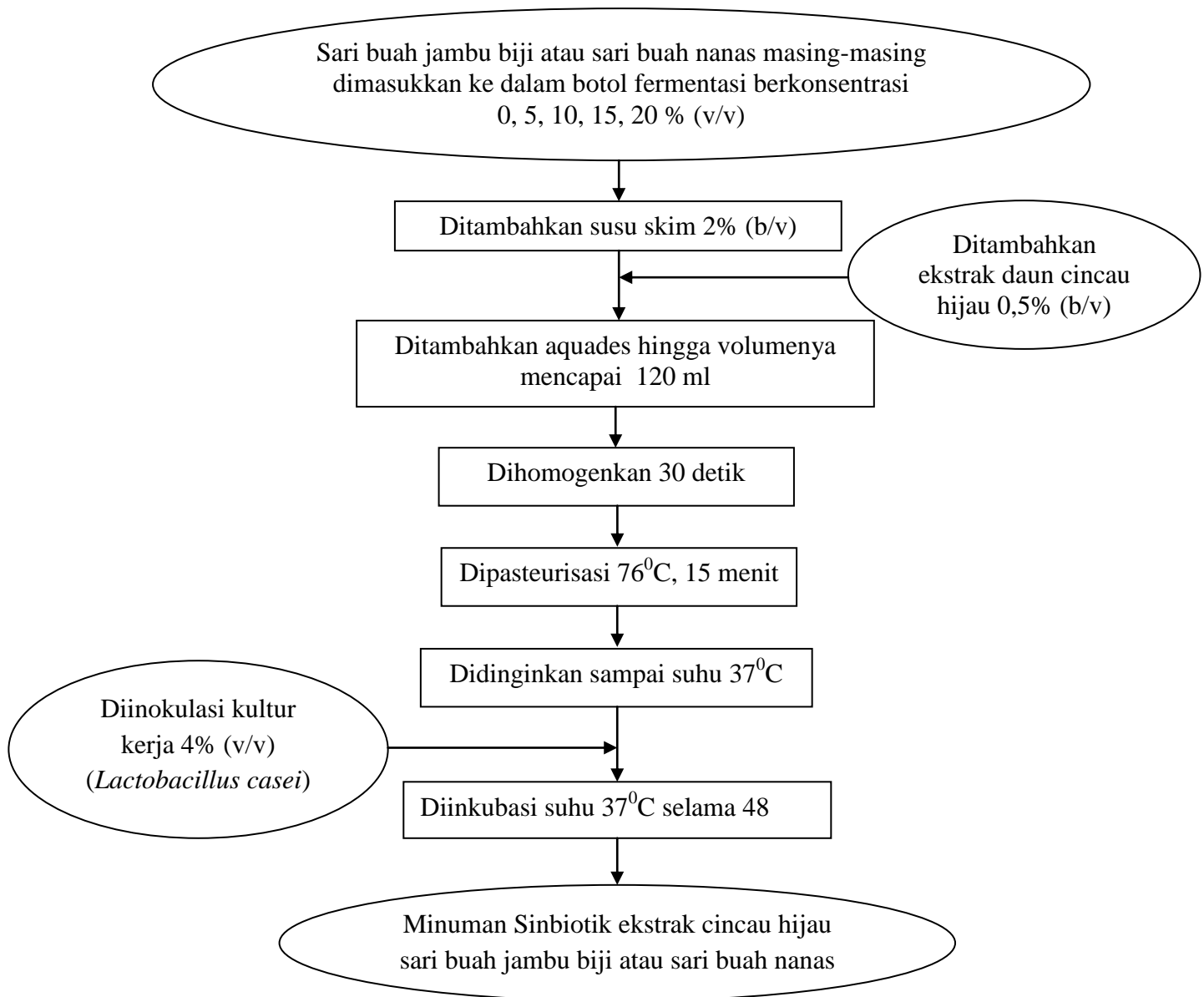
2. Penelitian Tahap II

Pengujian *in vivo* menggunakan mencit (*Mus musculus* L.) jantan umur 2 sampai 3 bulan dengan berat rata-rata 20 g sampai 30 g. Mencit yang digunakan untuk uji *in vivo* diperoleh dari Balai Penyidik dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung. Pakan mencit berupa pellet ayam diperoleh dari CV. Sanusi Taufik Bandar Lampung. Sedangkan air minum yang diberikan adalah air mineral (merk Aqua). Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasi selama 7 hari pada kandang percobaan dengan diberi pakan pellet ayam dan air minum secara *ad libitum* agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Setelah 7 hari adaptasi, dilakukan penimbangan berat badan mencit, selanjutnya mencit dibagi dalam 3 kelompok yaitu kelompok 1 kontrol (Aquades), kelompok II minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau, dan kelompok 3 minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau yang dikombinasikan sari buah dengan aktivitas antioksidan tertinggi.

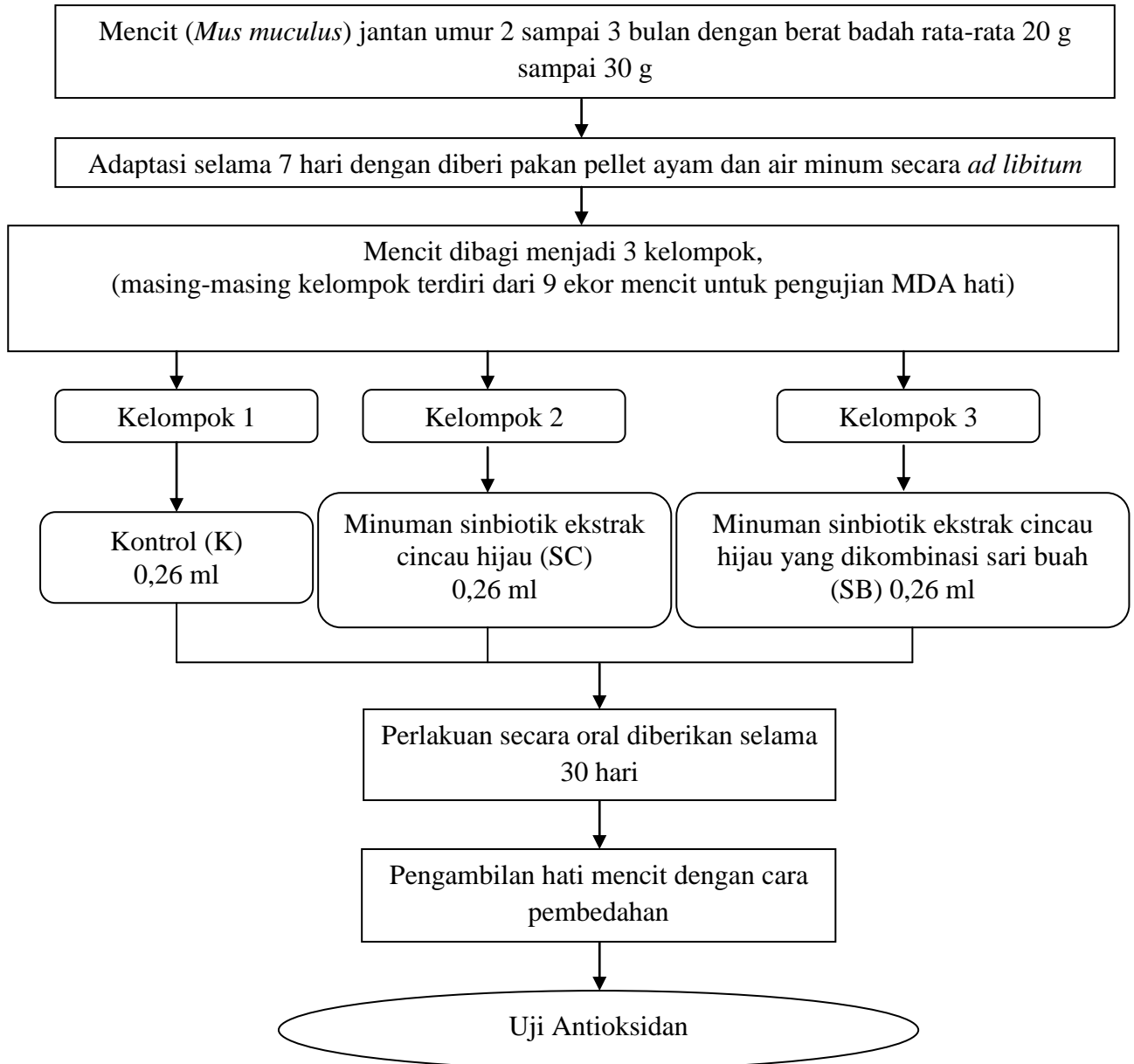
Dosis anjuran untuk susu fermentasi bagi manusia dengan berat badan 70 kg yaitu sekitar 100-200 ml/hari (Riyanto, 2011), serta berdasarkan anjuran konsumsi minuman probiotik komersial yaitu 100 ml per orang per hari. Konversi berat badan mencit 20 g dengan berat badan manusia 70 kg adalah 0,0026 (Amalina, 2009) seperti disajikan pada Tabel 5. Berdasarkan tabel konversi, contoh perhitungan untuk penentuan dosis minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau pada mencit, dosis anjuran untuk susu fermentasi bagi manusia dengan berat badan 70 kg yaitu sekitar 100-200 ml/hari, bila dikonversi ke mencit dengan berat badan 20 gram adalah sebagai berikut : $0,0026 \times 100 \text{ ml aquades} = 0,26 \text{ ml aquades}$, $0,0026 \times 100 \text{ ml minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau} = 0,26 \text{ ml minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau}$. $0,0026 \times 100 \text{ ml minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau dengan penambahan sari buah} = 0,26 \text{ ml minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau dengan penambahan sari buah}$. Dosis perlakuan yang diberikan pada mencit dikonversi sesuai berat badan mencit setiap harinya.

Uji status antioksidan hati menggunakan 27 ekor mencit, masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor mencit. Aquades, minuman sinbiotik ekstrak daun cincau hijau, dan minuman sinbiotik ekstrak cincau hijau yang dikombinasikan sari buah dengan aktivitas tertinggi yang telah didapat berdasarkan tahap I, diberikan secara oral dengan menggunakan spuit volume 1 ml yang ditumpulkan sebagai alat perlakuan secara oral pada mencit sesuai dengan dosis perlakuan selama 30 hari. Selama 30 hari perlakuan, mencit tetap diberi pakan pellet ayam dan air minum secara *ad libitum*. Proses pengambilan hati mencit melalui cara pembedahan. Sebelum proses pembedahan, diberi perlakuan anestesi menggunakan *diethyl eter*. Bagian perut mencit dibedah, kemudian diambil bagian

hati. Selanjutnya, hati di letakkan pada alumunium foil dan dibungkus hingga rapat. Alumunium foil yang berisi hati dimasukkan ke dalam *box ice* yang telah berisi es dengan tujuan agar hati tidak mengalami kerusakan sebelum dilakukan pengujian MDA. Secara keseluruhan, diagram alir proses pengujian tahap kedua secara keseluruhan disajikan pada Gambar 7.



Gambar 6. Diagram alir pembuatan minuman sinbiotik ekstrak daun cincau hijau dengan kombinasi sari buah jambu biji dan sari buah nanas
Sumber : Nurdin, dkk. (2007) yang telah dimodifikasi



Gambar 7. Diagram alir proses pengujian tahap kedua secara keseluruhan

E. Pengamatan

A. Penelitian Tahap I

1. Total Bakteri Asam Laktat (BAL)

Sebanyak 1 ml sampel ditambah dengan 9 ml larutan garam fisiologis steril. Dari campuran tersebut didapat larutan pengenceran 10^{-1} . Campuran kemudian dihomogenkan dan diambil 1 ml larutan dari tabung pertama dan dimasukkan ke

dalam tabung reaksi kedua yang juga berisi 9 ml larutan garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan seterusnya sampai diperoleh pengenceran yang diinginkan. Dari pengenceran yang dikehendaki diambil dengan pipet 1ml sampel lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan kira-kira 10-15 media MRS Agar steril. Cawan yang telah berisi media dan sampel ini diratakan dengan cara menggerakkan secara vertikal membentuk angka 8 dan biarkan sampai membeku, kemudian cawan diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam dan dihitung koloni yang tumbuh dengan menggunakan alat penghitung koloni (*colony counter*). Total koloni yang terhitung harus memenuhi standar “*International Commision Microbiology Food*” (ICMF) yaitu antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri (Fardiaz, 1989).

$$\text{Total BAL (cfu/ml)} = \text{Jumlah koloni terhitung} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

2. Total Asam Laktat

Pengujian total asam laktat ditentukan dengan metode AOAC (2000). Sebanyak 1 ml sampel ditambahkan 9 ml air destilat. Campurkan tersebut kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N. Untuk mengamati perubahan warna menjadi merah muda digunakan phenolphtalein sebagai indikator titik akhir titrasi.

Total asam tertitrasi ditentukan sebagai asam laktat dengan persamaan :

$$\text{Total asam laktat (\% b/v)} = \frac{\text{ml NaoH} \times \text{N NaOH} \times 90 \times 0,1}{\text{Volume sampel (ml)}}$$

3. Derajat Keasaman (pH)

Menurut Fardiaz, dkk. (1989), nilai pH ditentukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter harus dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan buffer 4,0 dan 7,0. Selanjutnya dilakukan

pengukuran terhadap larutan sampel dengan mencelupkan elektrodanya ke dalam larutan sampel dan dibiarkan beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil.

4. Aktivitas Antioksidan

Absorbansi control, Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,08 mM dalam etanol 96% v/v diambil 10 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi sampel, masing-masing sampel dicentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Setelah terpisah sampel cair dengan padatan diambil sampel cair sebanyak 7,5 ml dan ditambahkan larutan DPPH 0,08 mM dalam etanol 96% v/v sebanyak 2,5 ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Nilai % Aktivitas Antioksidan diperoleh dengan rumus (Molyneux, 2003).

$$\text{Persen Aktivitas Antioksidan} = \frac{(\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel})}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

5. Uji Organoleptik

Penilaian organoleptik minuman sinbiotik cincau hijau dilakukan dengan uji skoring terhadap warna, aroma, rasa, dan penerimaan keseluruhan (Soekarto, 1985). Sebelum dilakukan uji organoleptik, pada masing-masing minuman sinbiotik terlebih dahulu ditambahkan larutan sukrosa 65 % dengan perbandingan 1:1. Hal ini dilakukan untuk mengurangi rasa asam yang ditimbulkan oleh minuman sinbiotik cincau hijau. Pengujian dilakukan oleh 20 mahasiswa sebagai

panelis. Pada kuisisioner dibuat deskripsi untuk masing-masing parameter, kemudian deskripsi akan dihitung persentasenya. Contoh kuisisioner yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Contoh kuisisioner yang digunakan dalam uji organoleptik.

Nama panelis : Tanggal : Ulangan :											
Dihadapan saudara disajikan sampel minuman sinbiotik cincau hijau yang diberi kode acak. Anda diminta untuk menilai kesukaan terhadap warna, rasa, dan aroma serta penerimaan keseluruhan, dengan skor dari 1 sampai 7. Jangan lupa untuk berkumur-kumur dengan air minum yang telah disajikan setelah saudara mencicipi satu sampel sebelum beralih ke sampel berikutnya.											
Parameter	008	111	253	753	157	329	510	455	300	991	Desk
Warna											
Rasa											
Aroma											
Penerimaan keseluruhan											
Keterangan : 1 = sangat tidak suka; 2 = tidak suka; 3 = agak suka; 4 = suka; 5 = sangat suka											

Penelitian Tahap II

Analisis Malonaldehida (MDA) Hati Mencit

Analisis Malonaldehida (MDA) menggunakan metode Singh, *et.al.*, 2002 (dalam Muchtadi, dkk., 2006). Sebanyak 1,25 gram sampel hati tikus dicacah dalam kondisi dingin, dengan ditambah 2,5 ml tablet PBS yang mengandung 11,5 g/L KCl dalam kondisi dingin pH 7,4 (disimpan pada suhu 5⁰C). Larutkan 1 PBS tablet dalam 200 ml aquades yang mengandung 0,01 M buffer fosfat, 0,0027 M potassium chloride, dan 0,137 M sodium chloride (pH 7,4 pada suhu 25⁰C) simpan pada suhu 2-5⁰C. Homogenat yang dihasilkan kemudian di sentrifus 4000rpm, 10 menit sebanyak 2 kali hingga diperoleh supernatan jernih. Sebanyak

1 ml supernatan hati ditambah 4 ml campuran larutan dingin (HCl dingin 0,25 N (2,23 ml HCl pekat/100ml) yang mengandung 15% TCA, 0,38% TBA 0,5 % BHT). Campuran dipanaskan 80°C selama 1 jam. Setelah dingin, campuran disentrifius 3500rpm selama 10 menit. Absorbansi supernatant diukur pada 532 nm, sebagai larutan standar digunakan TEP.