



PROSEDUR UJI BAKU

BERLAKU DI

**LABORATORIUM PASCA PANEN DAN
PENGEMASAN HASIL PERTANIAN**

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS MULAWARMAN

2017

Daftar Isi

Kadar ALB CPO	3
Derajat Keasaman (pH).....	3
Pengukuran Total Karotenoid Metode Spektrofotometri.....	3
Pengukuran Tokoferol Metode Spektrofotometri UV	4
Pengukuran Tokoferol MetodeSpektrofotometri Fluoresensi	4
Viskositas.....	4
Vitamin C	5
Aktivitas Antioksidan DPPH	5
Total fenolik.....	6
Total Tanin.....	6
Total Flavonoid	6
Uji penerimaan dan preferensi panelis.....	7
Uji Aktivitas Antimikroba.....	7
Uji Bioavailabilitas Tokoferol	8
Uji Bioavailabilitas Retinol.....	8
Prinsip	8
Prosedur kerja (semi mikro)	9
Standar untuk Faktor Koreksi	9
Uji Toksisitas	10
Persiapan Analisis Metode HPLC.....	12
Ekstraksi dengan pelarut	12
Kandungan Beta-Karoten Metode HPLC	13
Kandungan alfa-tokoferol Metode HPLC	14
Pembuatan larutan induk dan kurva standar α -tokoferol	14
Analisa α -tokoferol metode HPLC	14
Spiking Sampel untuk Konfirmasi Metode HPLC	14
Kandungan Asam Organik Volatil Metode GC.....	15
Kandungan Asam Organik Metode HPLC	15
Daftar Pustaka	16

Teknik Analisis Senyawa dalam Pangan Fungsional dan Obat-obatan Herbal

Bohari Yusuf, Nur Aini Hayati, dan Anton Rahmadi

Kadar ALB CPO

Kadar Asam Lemak Bebas (ALB) diukur dengan menggunakan metode Sudarmadji *et al* (2007). Sebanyak 20 g sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL etanol panas. Selanjutnya, sampel disaring dan diambil filtratnya. Ke dalam filtrat, ditambahkan 2 tetes indikator Phenolphthalein (PP) dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N yang telah distandardisasi sampai warna merah jambu tidak hilang selama 30 detik. Persen asam lemak bebas dinyatakan sebagai molekul lemak yang dicari.

$$FFA (\%) = \frac{ml NaOH \times N NaOH \times BM_L}{W_i \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan : N = Normalitas NaOH; BM_L = Berat molekul asam lemak (g/mol); Asam Palmitat = 256 g/mol; W_i = Berat sampel

Derajat Keasaman (pH)

Uji pH diukur dengan menggunakan metode Sudarmadji *et al* (2007). Diambil contoh produk emulsi sebanyak ± 50 mL ke dalam sebuah gelas piala dan kemudian diukur pH-nya sebanyak dua kali (duplo) untuk setiap produk. Sebelum digunakan, pH meter harus dikalibrasikan dengan cara mengukur pada dua pH buffer yang telah diketahui nilainya.

Pengukuran Total Karotenoid Metode Spektrofotometri

Total Karotenoid diukur dengan menggunakan metode PORIM (1995). Produk emulsi ditimbang sebanyak 0,1 gram dan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, kemudian sampel dilarutkan dengan hexan sampai tanda tera, dengan cara dikocok hingga benar-benar homogen. Sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 446 nm dengan menggunakan alat Spektrofotometri. Selanjutnya nilai karotenoid total dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$T = \frac{25 \times A \times 383}{100 \times W}$$

Keterangan : T = Karotenoid total; A = Absorbansi pada panjang gelombang 446 nm; W = Bobot sampel (gram)

Pengukuran Tokoferol Metode Spektrofotometri UV

Kadar tokoferol dalam produk diukur dengan metode Larasati (2007). Sampel sebanyak 100 mg dilarutkan dalam etanol proanalisis 10 ml. Larutan tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 286 nm. Sebagai blanko adalah sampel tanpa mengandung zat aktif α -tokoferol yang diperlakukan sama dengan sampel. Penentuan kuantitatif perolehan kembali kadar α -tokoferol dalam sampel diperoleh dari kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi standar α -tokoferol dibuat dalam etanol dengan rentang konsentrasi 50-200 $\mu\text{g/ml}$ dalam 10 ml etanol absolut.

Pengukuran Tokoferol Metode Spektrofotometri Fluoresensi

Kadar tokoferol dalam produk diukur dengan metode Wang *et al* (1991) secara fluorometri. Sebanyak 100 μl produk ditambah 500 μl aquabidest dan 500 μl etanol 95%, dicampur dengan menggunakan vortex. Setelah itu ditambah 2,5 ml heksana, kocok kuat-kuat, lalu sentrifuge pada 3000x g selama ± 7 menit. Supernatan dibaca dengan spektrofluorometer fluoresensi pada eksitasi 295 nm dan emisi 320 nm. Kurva standar tokoferol disiapkan pada konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 $\mu\text{g/ml}$ dalam 2,5 ml heksana.

Viskositas

Uji kekentalan secara obyektif dilakukan dengan menggunakan alat pengukur kekentalan yaitu viskometer Ostwald. Cara pengukuran kekentalan yaitu produk emulsi dimasukkan ke dalam viskometer sampai penuh kemudian produk emulsi tersebut akan mengalir, pada viskometer terdapat 2 tanda batas yaitu tanda batas atas dan tanda batas bawah. Ketika produk emulsi sampai pada tanda batas atas stopwatch “on”, ketika produk emulsi sampai tanda batas bawah stopwatch dihentikan. Waktu yang diperlukan produk emulsi tersebut mengalir dari tanda batas atas sampai tanda batas bawah dicatat.

$$n_2 \text{ (Viskositas produk emulsi)} = n_1 \times \frac{d_2 \times t_2}{d_1 \times t_1}$$

Keterangan :

- n_1 = Viskositas cairan pembanding (Aquadest)
- n_2 = Viskositas produk emulsi
- d_1 = Densitas cairan pembanding (Aquadest)
- d_2 = Densitas produk emulsi
- t_1 = Waktu aliran cairan pembanding (Aquadest)
- t_2 = Waktu aliran produk emulsi

Vitamin C

Analisa kadar vitamin C dilakukan dengan metode titrasi iodin (Sudarmadji *et al*, 2007). Sebanyak 10 g bahan dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan ditambah aquades sampai tanda tera. Filtrat dipisahkan dengan cara disaring atau disentrifugasi. 5-25 mL filtrate diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 125 mL dan ditambah 2 mL larutan amilum 1% (*soluble starch*). Kemudian dititrasi dengan standar yodium 0,01 N. Titik akhir titrasi ditandai dengan adanya warna biru dari iod-amilum. Perhitungan kadar vitamin C dengan standarisasi larutan iodin yaitu 1 mL 0,01 N iodin = 0,88 mg asam askorbat.

$$\text{Vit C} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g sampel}} \right) = \frac{\text{mL iodin } 0,01 \text{ N} \times 0,88 \text{ mg} \times \text{FP} \times 100}{\text{berat sampel (g)}}$$

Aktivitas Antioksidan DPPH

Total antioksidan dilakukan dengan metode spektrofotometri dengan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Farhan *et al*, 2012). Sebanyak 1 mL ekstrak yang telah diencerkan dalam etanol (Kimia Farma, Indonesia) ditambahkan ke 1 mL DPPH (0,15 mM dalam etanol) (Sigma Aldrich, USA) dan pada saat yang sama, kontrol yang terdiri atas DPPH 1 mL dengan 1 mL etanol disiapkan. Campuran reaksi dicampur dengan baik dengan tangan lalu diinkubasi dalam keadaan gelap pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur pada 519 ± 2 nm. Vitamin C (Sigma Aldrich, USA) digunakan sebagai kontrol positif dan etanol digunakan sebagai blanko. Kemampuan DPPH ekstrak dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Total antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Absorbansi kontrol adalah absorbansi DPPH + etanol

Absorbansi sampel adalah absorbansi DPPH radikal + sampel.

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai IC_{50} . (*Inhibitory Concentration*). IC_{50} merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan linier persen penghambatan radikal DPPH terhadap beberapa konsentrasi ekstrak sampel. Persamaan regresi linier yaitu $y = ax + b$.

Total fenolik

Analisis fenol ini dilakukan secara spektrofotometri dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu (Mu'Nisa *et al*, 2012; Nurhayati *et al*, 2012) dan sebagai pembanding digunakan asam galat (Sigma-Aldrich, USA). Kandungan total fenolat dalam ekstrak dinyatakan dalam *gallic acid equivalent* (GAE).

Sampel ditimbang sebanyak 5 mg dilarutkan dalam tabung dalam 2 mL etanol 95%. Selanjutnya, ditambahkan 5 mL aquades dan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA) 50% (v/v). Sampel didiamkan selama 5 menit dan ditambahkan larutan Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, USA) 5% (b/v) sampai volume total mencapai 10 mL. kemudian larutan tersebut dihomogenkan dalam ruang gelap selama 1 jam. Setelah homogen, larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 752 nm.

Total Tanin

Total tannin diuji dengan metode Malangngi *et al* (2012). Sebanyak 0,5 g produk diekstraksi dengan 10 mL dietil eter (Merck, USA) selama 20 jam, kemudian disaring dan residu yang diperoleh dididihkan dengan 100 mL aquades (Lab. Ilmu Tanah, Faperta, Universitas Mulawarman, Indonesia) selama 2 jam, kemudian didinginkan dan disaring. Ekstrak yang diperoleh ditambahkan dengan aquades hingga volume ekstrak mencapai 100 mL. Sebanyak 0,1 mL ekstrak ditambahkan dengan 0,1 mL reagen Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich, USA) dan divorteks, ditambahkan dengan 2 mL Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, USA) dan divorteks lagi. Absorbansi dibaca pada λ 760 nm (Genysis 20, Thermo Fischer, USA) setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Hasil yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar asam tanat (Sigma Aldrich, USA) yang dipersiapkan dengan cara yang sama. Kandungan total tanin dinyatakan dalam mg asam tanat/kg ekstrak.

Total Flavonoid

Total Flavonoid diukur dengan metode Zou *et al* (2004). Ditimbang 1 mg ekstrak kemudian larutkan sampai 10 mL dengan etanol 95% (Kimia Farma, Indonesia). Ekstrak yang telah dilarutkan dalam etanol ditambahkan aquades sebanyak 0,7 mL. Kemudian ditambahkan 0,1 mL NaNO_2 5% (Sigma Aldrich, USA) ke dalam campuran tersebut. Setelah 5 menit, ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% (Sigma Aldrich, USA). Setelah 6 menit, ditambahkan 0.5 mL NaOH 1 M (Merck, USA). Semua bahan dicampurkan merata lalu diinkubasi selama 10 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 510 nm dengan blanko berupa 1 mL sampel diganti dengan 1 mL pelarut etanol 95%. Hasil yang diperoleh diplotkan terhadap kurva standar katekin (Sigma Aldrich, USA)

yang dipersiapkan dengan cara yang sama. Total flavonoid dinyatakan sebagai mg ekuivalen katekin per g berat kering

Uji penerimaan dan preferensi panelis

Uji penerimaan dan preferensi menggunakan metode Montenegro *et al* (2015). Uji penerimaan dan preferensi digunakan untuk mengetahui penerimaan panelis terhadap semua formulasi. Pada uji penerimaan, sebanyak 60 panelis tidak terlatih dengan rentang usia 17 s.d. 21 tahun diminta penilaiannya terhadap parameter penerimaan rasa, aroma, *mouth feel*, dan warna. Angka yang diperoleh kemudian ditransformasikan dalam skala yaitu: satu (1) untuk sangat tidak disukai, dua (2) untuk tidak disukai, tiga (3) untuk netral, empat (4) untuk disukai, dan lima (5) untuk sangat disukai. Uji preferensi dilakukan dengan 60 orang panelis, dilakukan terhadap parameter kekuatan rasa dan aroma dari masing-masing komponen penyusun aroma. Angka yang diperoleh kemudian ditransformasikan dalam skala yaitu: satu (1) untuk sangat tidak terasa, dua (2) untuk tidak terasa, tiga (3) untuk agak terasa, empat (4) untuk terasa, dan lima (5) untuk sangat terasa. Data yang diperoleh dianalisis dengan GraphPad Prism 6. Jika terdapat pengaruh yang berbeda nyata pada taraf α 5% pada sidik ragam, maka dilakukan uji lanjut dengan Dunnett *multiple comparisons test*.

Uji Aktivitas Antimikroba

Sebanyak 200 g sampel bubuk atau produk pada kombinasi suhu dan waktu pengeringan terpilih diekstraksi dengan metode maserasi dalam 500 mL pelarut yang berbeda yaitu etanol 95 % (Kimia Farma, Indonesia), n-heksana (Merck, USA), dan akuades (Lab. Ilmu Tanah, Faperta, Universitas Mulawarman, Indonesia) selama 48 jam pada suhu ruang (30 ± 2 °C) sambil dilakukan beberapa kali pengadukan. Filtrat dipekatkan dengan oven pada suhu 60°C hingga didapatkan ekstrak pekat (± 6 jam).

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode sumur difusi seperti yang dikerjakan oleh Rahmadi *et al* (2013). Bakteri Gram (+) dan bakteri Gram (-) yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Kultur Koleksi Jurusan THP, Universitas Mulawarman, Indonesia). Sebanyak 1 ml suspensi (1×10^4 CFU/ml) *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diinokulasikan ke dalam masing-masing cawan petri yang di dalamnya terdapat 5 buah pencadangan steril. Kemudian, medium *nutrient agar* (NA) (Accumedia, USA) bersuhu hangat (± 50 °C) dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak ± 25 mL. Kemudian agar dihomogenkan dan dibiarkan sampai mengeras. Setelah media mengeras, pencadangan tersebut dicabut dengan menggunakan pinset steril, sehingga terbentuk lubang sumur pada media. Setiap cawan petri yang memiliki lima lubang sumur yang masing-masing ditambahkan 50 μ L akuades steril (kontrol negatif), antibakteri tetrasiklin (Kimia Farma) (kontrol positif) 0,5 mg/50 μ L, dan

ekstrak dari setiap jenis pelarut dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu: 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg. Cawan petri diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter areal bening yang terbentuk di sekeliling sumur sebanyak dua kali untuk diambil rata-ratanya. Pengamatan dilakukan secara duplo dengan dua kali ulangan.

Uji Bioavailabilitas Tokoferol

Sampel darah diambil dari seluruh subyek penelitian, yaitu tikus putih galur Wistar sebelum diberi perlakuan dari medial canthus sinus orbitalis \pm 2 ml. Darah disentrifuse untuk mendapatkan plasma dan dilakukan pengukuran kadar tokoferol pada plasma dengan metode Wang *et al* (1991) secara fluorometri. Kemudian masing-masing kelompok perlakuan diberikan sediaan uji dengan dosis 0,15 ml/kgBB per hari; 0,3 ml/kgBB per hari; dan 0,6 ml/kgBB per hari, selama 10 hari. Pada hari ke-10, tikus dibuat stres oksidatif dengan diberi beban aktivitas fisik maksimal yaitu dibuat berenang sampai terjadi tanda-tanda kelelahan berupa hampir tenggelam. Setelah itu sampel darah segera diambil, kemudian dilakukan kembali pengukuran kadar tokoferol pada plasma sesuai metode fluorometri.

Uji Bioavailabilitas Retinol

Bioavailabilitas diukur dengan menggunakan metode Spektrofotometri (Supariasa *et al*, 2012). Pengujian diawali dengan melakukan pengambilan darah sebanyak 3 mL kepada subjek penelitian (orang atau hewan) di hari pertama sebagai data kontrol. Selanjutnya di hari kedua dan seterusnya hingga hari ke-22, peneliti memberikan asupan harian produk sebanyak 3 sendok makan (15 mL) untuk dikonsumsi pada pagi hari, dan setiap 7 hari sekali dilakukan pengambilan darah sebanyak 3 mL untuk mengukur konsentrasi serum retinol subjek penelitian sebagai parameter untuk pengukuran status vitamin A setelah mengkonsumsi produk. Penentuan serum retinol dapat dilakukan dengan cara kolorimetri menggunakan pereaksi asam trifluoroasetat (TFA).

Prinsip

Setelah protein didenaturasi dengan alkohol, vitamin A diestraksi dengan pelarut organik. Ekstrak dipisahkan dan vitamin A ditentukan dengan direaksikan dengan tri-flouro-acetic acid (TFA) (Sigma Aldrich, USA), dan warna biru yang terbentuk diukur serapannya pada panjang 620 nm (Genesys 20, Thermo Fischer, USA). Karena karoten juga memberikan reaksi dengan TFA, meskipun jauh lebih lemah, perlu ada faktor koreksi karena ada pengaruh dari karoten ini.

Prosedur kerja (semi mikro)

1. 500 μL serum dalam tabung reaksi ditambah dengan 500 μL etanol (atau dapat pula 1N KOH dalam 90% etanol).
2. Dikocok dengan tangan sampai rata. Ditambahkan 1000 μL (=1mL) petroleum eter (Merck, USA) (40-60°C) lalu dikocok dengan voltrex selama 1 menit.
3. Sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5-10 menit akan memisahkan ekstrak vitamin A dibagian atas serta campuran serum alkohol di bagian bawah.
4. Ekstrak dipipet sebanyak 750 μL lalu diukur serapannya pada panjang gelombang 450 nm untuk penentuan karoten.
5. Ekstrak tersebut kemudian diuapkan sampai kering dengan gas nitrogen. Ditambahkan dengan 1500 μL pereaksi TFA (campuran 1 bagian TFA dan 2 bagian kloroform [Sigma Aldrich, USA] yang disiapkan segar).
6. Warna biru yang terbentuk harus sudah diukur serapannya dalam waktu 30 detik pada panjang gelombang 620 nm.

Standar untuk Faktor Koreksi

Standar vitamin A atau karoten (Sigma Aldrich, USA) yang dilarutkan dalam khloroform berisi 2 mg/mL, 4 mg/mL, dan 8 mg/mL disiapkan. Dipipet 25 mL dari masing-masing konsentrasi tersebut dan diukur serapannya setelah ditambah 1500 μL pereaksi. Standar tersebut setara dengan konsentrasi vitamin A dalam serum 10 $\mu\text{g/dL}$, 20 $\mu\text{g/dL}$, 30 $\mu\text{g/dL}$, dan 40 $\mu\text{g/dL}$.

Faktor koreksi karena pengaruh reaksi antara pereaksi dengan karoten dibuat sebagai berikut :

1. Disiapkan standar karoten (Sigma Aldrich, USA) yang berisi 10 $\mu\text{g/dL}$, 20 $\mu\text{g/dL}$, 40 $\mu\text{g/dL}$, dan 80 $\mu\text{g/dL}$.
2. Dipipet masing-masing sebanyak 750 μL lalu diuapkan sampai kering dengan nitrogen.
3. Reaksikan dengan 155 μL pereaksi dan serapannya diukur pada panjang gelombang 620 nm. Dengan demikian dapat dihitung faktor koreksi karena pengaruh karoten.

Adapun buku catatan penentuan vitamin A dengan 10 kolom seperti pada tabel 1. Dari standar vitamin A dapat dihitung faktor perhitungan vitamin A dan dari standar karoten dapat dihitung faktor perhitungan karoten dengan prinsip :

$$\frac{\text{serapan sampel}}{\text{serapan standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

Tabel 1. Tabel penentuan vitamin A

1 No	2 Nama	3 Kode	4 Serapan 450	5 Serapan 450- Blanko	6 Kadar Karoten	7 Serapan 620	8 Serapan 620- Blanko	9 Serapan 620-15% Serapan	10 Kadar Vit. A
1	Blanko								
2	Standar Serum I								
3	Standar Serum II								
4	Individu I	7/SS							
5	Individu II	10/SS							
6	Individu III	9/SS							
7	Individu IV	30/SS							
8	Individu V	28/SS							
9	Blanko								

Uji Toksisitas

Metode yang digunakan pada pengujian toksisitas ialah *Brine Shrimp Test* (BST) (Hendrawati, 2009). Uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva *A. salina* Leach. karena pengaruh ekstrak atau senyawa yang menjadi sampel pengujian. Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BST ini jika memiliki LC_{50} kurang dari $1000 \mu\text{g/mL}$. Nilai LC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian jumlah hewan uji setelah perlakuan 24 jam.

Langkah pertama pengujian dilakukan dengan pembuatan larutan induk konsentrasi 5% atau $50.000 \mu\text{g/mL}$ dengan cara mencampur 5 g produk ditambah air laut sampai 100 mL dengan labu takar. Kemudian dilakukan uji trial atau orientasi dahulu untuk menentukan konsentrasi yang efektif digunakan membunuh larva *Artemia salina* Leach. dengan uji coba menggunakan konsentrasi desimal, yaitu 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, dan 0,05%. Setelah dilakukan trial atau uji orientasi, akan didapatkan konsentrasi terkecil yang dapat menyebabkan kematian pada hampir semua larva. Berdasarkan hasil uji orientasi tersebut, dapat ditetapkan konsentrasi tertinggi yang akan digunakan pada perlakuan (*definitive test*) dan replikasinya. Konsentrasi selanjutnya dipetakan dalam P1, P2, P3, P4, dan K (Kontrol).

Penyiapan larva *Artemia salina* dilakukan dengan menetasakan telur *Artemia salina* 48 jam sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air laut di dalam wadah yang diberi suplai oksigen dari aerator dan diberi penerangan dengan lampu.

Pelaksanaan uji dilakukan dengan memasukkan larva *Artemia salina* yang telah berumur 48 jam ke dalam lima kelompok perlakuan yang berisi larutan P1, P2, P3, dan P4 dari ekstrak produk emulsi, serta larutan kontrol. Masing-masing tabung uji berisi 10 ekor larva *Artemia salina*. Pada saat yang bersamaan dilakukan juga replikasi dari setiap kelompok perlakuan sebanyak lima kali. Dalam penelitian ini didapatkan volume akhir setiap tabung uji sebesar 5 mL. Tabung uji kemudian diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva *Artemia salina* yang mati.

Adapun alur uji toksisitas ini dapat dilihat pada gambar 1. Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari uji toksisitas tersebut akan dianalisis dengan Graph Pad Prism 6 untuk mengetahui harga LC₅₀. Adapun tampilan tabel yang akan digunakan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Data uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach

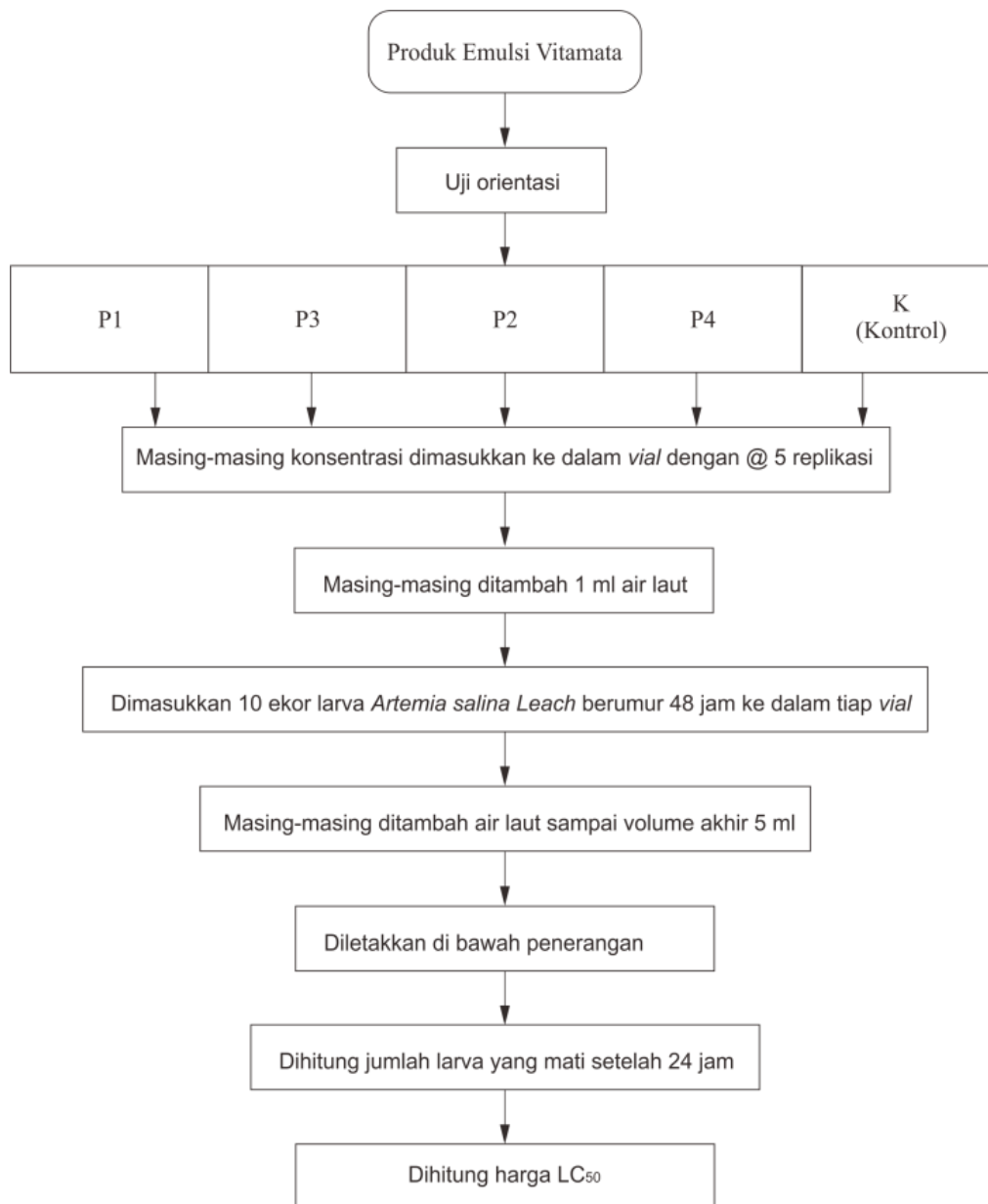
Kelompok Perlakuan	Konsentrasi Produk		Volume Akhir Air Laut	Jumlah kematian larva <i>Artemia salina</i> pada setiap replikasi (ekor)					Jumlah Total Kematian	Rata-rata kematian	Persentase Kematian	
	%	g/5 mL		μg/mL	R1	R2	R3	R4				R5
	P1				5 mL							
P2			5 mL									
P3			5 mL									
P4			5 mL									
K			5 mL									

Keterangan :

P1, 2, 3, 4: Kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4;

K: Kelompok kontrol; R1, 2, 3, 4:

Replikasi ke 1, 2, 3, 4



Gambar 1. Alur pengujian toksisitas

Persiapan Analisis Metode HPLC

Ekstraksi dengan pelarut

Ekstraksi pelarut dilakukan sesuai dengan yang dikerjakan Fithriyah (2013). Sampel kering ditimbang sebanyak 500 g kemudian digiling dan disaring (≥ 80 mesh). Sampel dibagi menjadi tiga untuk pengerjaan secara triplo, masing-masing 130 g sampel dimaserasi dengan pelarut n-heksana sebanyak 170 mL untuk menarik kandungan minyak dari dalam sampel, maserasi

dilakukan berulang (kontinyu) sampai n-heksana rendaman yang dipisahkan dari sampel jernih/tidak berwarna (kandungan minyak dalam sampel sudah habis atau hampir habis). Selanjutnya, ditambahkan Na₂SO₄ anhidrat untuk menghilangkan sisa air yang ikut tersari dari dalam sampel. Ekstrak n-heksana hasil maserasi kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* suhu ≤ 40 °C, hingga didapatkan minyak kental dan aroma n-heksana tidak tercium. Selanjutnya, rendemen minyak dihitung. Kandungan α -tokoferol selanjutnya dikuantifikasi dengan metode kromatografi.

Kandungan Beta-Karoten Metode HPLC

Sampel emulsi dipersiapkan segar dan kemudian disimpan pada suhu 4°C tidak lebih dari tujuh hari sebelum analisis. Total karotenoid diuji menggunakan instrumen HPLC (Shimadzu LC20AD, Japan) dengan kolom C-18, dan detektor UV-Vis (Shimadzu, Japan) pada panjang gelombang 450 nm.

Preparasi dilakukan dengan mengambil sebanyak 3 gram sampel untuk ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan kloroform (Merck) : metanol (Merck) (2:1) sebanyak 20 mL. Selanjutnya, larutan diaduk dengan bantuan *stirrer* selama 1 jam dan disaring. Larutan kemudian ditambahkan 4 mL 0,88% NaCl (Merck) dan kemudian dikocok. Setelah terbentuk dua lapisan, lapisan atas dibuang dan lapisan bawah disaring menggunakan kertas saring. Larutan kemudian dievaporasi dan dihembus gas N₂. Ekstrak minyak ditempatkan di dalam botol gelap dan disimpan di dalam refrigerator sampai dibutuhkan untuk dianalisis. Apabila ekstrak minyak akan dianalisis, maka terlebih dahulu minyak dipindahkan dari tempat penyimpanan, didiamkan pada suhu ruang sampai semuanya meleleh.

Kadar β -karoten dalam sampel ditentukan dengan metode AOAC Official Method 2001.13 (AOAC, 2005). Sampel sebanyak 0,1-0,25 g disaponifikasi menggunakan 10 mL etanol absolut (Merck) dan 2,5 mL KOH (Merck) 50% dalam aquades (b/v), kemudian dipanaskan dalam penangas air bersuhu 80°C selama 1 jam. Campuran didinginkan dan ditambah 2,5 mL asam asetat glasial (Merck). Campuran dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL dan volume ditepatkan dengan etanol: tetrahidrofur (Merck) 1:1 (v/v). Kemudian sampel disaring dengan filter *syringe polyvinylidene fluoride* (PVDF) berukuran pori 0,45 μ m (Milipore). Kadar β -karoten ditentukan dengan HPLC (Shimadzu, Jepang) secara isokratik menggunakan kolom C18 atau ODS (15 cm x 4,6 cm, i.d. 5 μ m) dan detektor UV Vis pada 450 nm. Elusi dilakukan dengan laju alir 1,0 mL/menit pada suhu ruang, menggunakan fase gerak metil diklorida/metanol/asetonitril (Merck) (2:1:3) yang telah disonikasi selama 45 menit. Puncak β -karoten dalam sampel diidentifikasi dengan mencocokkan waktu retensi peak β -karoten dalam sampel dengan waktu retensi standar β -karoten.

Kandungan alfa-tokoferol Metode HPLC

Pembuatan larutan induk dan kurva standar α -tokoferol

Alfa-tokoferol ditimbang seksama 25 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur dan dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Diperoleh konsentrasi larutan induk standar α -tokoferol (larutan A) sebesar 0,5 mg/mL ($500 \mu\text{g/mL} = 500 \text{ ppm}$). Kemudian dilakukan pengenceran larutan induk menjadi 10 $\mu\text{g/mL}$ (larutan B) dengan mengambil 0,5 mL larutan standar 500 $\mu\text{g/mL}$ lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dilarutkan dengan etanol:tetrahidrofuran (1:1) sampai tanda batas. Dari larutan standar 10 ppm (larutan B) dilakukan pengenceran (pembuatan deret standar) dengan konsentrasi 0,5; 1; 2; 5 dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

Analisa α -tokoferol metode HPLC

Sampel ditimbang seksama sebanyak 25 g dan dilarutkan dengan etanol 10 mL, lalu dicukupkan volumenya hingga 25 mL menggunakan etanol:tetrahidrofuran (1:1). Sampel dimasukkan ke dalam vial kemudian injeksikan sebanyak 20,0 μL ke HPLC dan dicatat luas puncaknya. Percobaan diulang sebanyak dua kali. Berikut ini spesifikasi dan pengkondisian HPLC: detektor UV/vis pada panjang gelombang 280 nm, secara isokratik menggunakan kolom C18 (Phenomenex, panjang 28 cm, diameter 5 μm), fase gerak metanol, suhu kolom 25 $^{\circ}\text{C}$, kecepatan aliran 1,0 $\mu\text{L/min}$.

Kadar α -tokoferol dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang telah diperoleh:

$$Y = a + bx$$

Y = Luas puncak

x = konsentrasi α -tokoferol $\mu\text{g/mL}$

Konsentrasi α -tokoferol dalam sampel minyak menjadi:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

Kadar α -tokoferol dihitung dengan rumus:

$$x (\mu\text{g/mL}) * (\Sigma \text{ mL pelarut} / \text{sampel yang ditimbang})$$

Spiking Sampel untuk Konfirmasi Metode HPLC

Untuk mengkonfirmasi hasil, satu sampel perlu ditambahkan dengan standar beta-karoten atau alfa-tokoferol untuk memastikan bahwa *peak* yang diukur adalah untuk standar yang digunakan.

Kandungan Asam Organik Volatil Metode GC

Kandungan asam organik volatil dilakukan dengan metode Sukla *et al* (2010). Untuk standar, disiapkan larutan stok asam malat 2%, asam laktat 1 %, asam asetat 1 %, asam sitrat 0,1 %, asam piroglutamat 0,1 %, asam fumarat 0,1 %, dan asam askorbat 0,4 % (Sigma-Aldrich, USA), masing-masing dalam 10 mL *triple distilled pure water* (Sigma-Aldrich, USA).

Untuk ekstraksi asam organik yang mudah menguap, 10 g masing-masing sampel dihomogenisasi dengan 20 ml *triple distilled pure water* (Merck-Milipore, USA) dan kemudian disaring dengan kertas Whatman No 2, diikuti dengan sentrifugasi pada 10.000 G selama 30 menit. Selanjutnya, 0,37 µl dari 2% H₂SO₄ (Merck-Milipore, USA) ditambahkan ke dalam 0,7 ml filtrat, untuk membuat konsentrasi akhir 0,1% H₂SO₄ dan disaring melalui 0,22 µm filter membran (Acrodisc Syringe, 25 mm, 0,2 µm). Akhirnya, 2 µl dari masing-masing sampel dan standar yang disuntikkan ke GC secara terpisah.

Kondisi analisis GC untuk penentuan asam organik yang mudah menguap adalah: instrumen: Hewlett–Packard gas kromatografi dengan detector *flame ionization*, kolom: 10% PEG6000 di *glass column* (1,2 mm x 1,5 m), suhu oven: 170 °C, suhu injector: 200 °C, suhu detektor: 200 °C dan gas pembawa: He (0,9 ml/menit).

Kandungan Asam Organik Metode HPLC

Disiapkan larutan stok asam malat 2%, asam laktat 1 %, asam asetat 1 %, asam sitrat 0,1 %, asam piroglutamat 0,1 %, asam fumarat 0,1 %, dan asam askorbat 0,4 % (Sigma-Aldrich, USA), masing-masing dalam 100 mL buffer fosfat (Sigma-Aldrich, USA). Untuk masing-masing standar disiapkan 4 botol vial, masing-masing diisi dengan asam stok sebanyak 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL dan 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan larutan fosfat hingga 5 mL dan disimpan pada suhu ± 4 C selama proses penelitian. Dari konsentrasi asam organik standar, dibuat kurva standar (Luas area vs konsentrasi) (Sitorus *et al*, 2015).

Standar asam organik produk yang akan digunakan dalam penelitian ini dianalisis dengan kromatografi fasa terbalik (*reverse phase*) (HPLC Simadzu LC20AD, Japan) menggunakan kolom C-18 5µm (panjang kolom 15 cm dan diameter 4,6 mm), dan dibaca pada λ=210 nm (UV detector Simadzu, Japan) (Nour *et al*, 2010). Sebelum diinjeksi ke dalam HPLC, standar asam organik dan sampel disaring terlebih dahulu dengan kertas whatman 0,2 µm. Analisis dilakukan pada kondisi isokratik pada suhu 40 °C dengan menggunakan larutan fosfat 50 mM sebagai fasa gerak (dibuat dengan melarutkan 6,8 g kalium dihidrogen fosfat dalam 900 mL air, nilai pH diatur dengan menambahkan asam fosfat sampai 2,8 menggunakan pH meter, lalu ditambahkan dengan air hingga 1000 mL), selanjutnya disaring dengan kertas Whatman 0,45 µm. laju alir fasa gerak diatur 0,7 mL/menit. Sebelum dilakukan injeksi, alat harus distabilkan terlebih dahulu.

Daftar Pustaka

- Farhan, H., Rammal, H., Hijazi, A., Hamad, H., Daher, A., Reda, M., dan Badran. B. 2012. *In vitro* Antioxidant Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts from Crude *Malva parviflora* L. Grown in Lebanon. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol 5(3): 234-238.
- Fithriyah, N. 2013. Analisis alfa-tokoferol (Vitamin E) pada Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Hendrawati, A. R. E. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Thesis. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Larasati, L.A. 2007. Formulasi Mikroemulsi dl-alfa-tokoferol asetat dengan Basis Minyak Kelapa Sawit dan Uji Aktivitas Antioksidan. Skripsi. PS Sains dan Teknologi Farmasi, Institut Teknologi Bandung.
- Malangngi, L. P., Sangi, M. S., dan Paedong, J. J. E. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Mipa Unsrat Online*. Vol.1(1): 5-10.
- Montenegro L, Rapisarda L, Ministero C, Pugilisi C. 2015. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E *Cosmetics* 2: 35-47. DOI: 10.3390/cosmetics 2010035.
- Mu'nisa, A., Wresdiyati, T., Kusumorini, N., dan Manalu. W. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cengkeh. *Jurnal Veteriner*. Vol 13(3): 272-277.
- Nour, V., I. Trandafir, and M. E. Ionica. 2010. HPLC Organic Acid Analysis In Different Citrus Juice Under Reversed Phase Condition. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj Napoca* 11:42-48
- Nurhayati, Siadi, K., and Harjono. 2012. Pengaruh Konsentrasi Natrium Benzoat dan Lama Penyimpanan pada Kadar Fenolat Total Pasta Tomat. *Indonesian Journal of Chemistry Science*. 1(2): 158-163.
- PORIM. 1995. PORIM Test Methods. Palm Oil Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur.
- Rahmadi, A., Abdiah, I., Sukarno, M. D., and Purnaningsih, T. 2013. Karakterisasi Fisikokimia dan Antibakteri *Virgin Coconut Oil* Hasil Fermentasi Bakteri Asam Laktat. *Jurnal Teknolologi dan Industri Pangan*. 24(2): 178-183.
- Shekhar, T. C., dan Anju, G. 2014. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*. 1(4): 244-249.
- Sitorus, L., Pontoh, J., Kamu, V. 2015. Analisis Beberapa Asam Organik dengan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Grace Smart Rp 18 5µ. *Jurnal MIPA Unsrat Online* 4(2): 148-152.
- Soekarto, S.T., 1985. Penilaian organoleptik. Pusat Pengembangan Teknologi Pangan. IPB. Bogor.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, Suhardi. 2007. *Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Sukla, S., Choi, T.B., Park, H., Kim, M., Lee, I.K., Kim, J. 2010. Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang) .*Food and Chemical Toxicology* 48: 2005–2010. doi:10.1016/j.fct.2010.04.034
- Supariasa, I D. N., B. Bakri, dan I. Fajar. 2012. Penilaian Status Gizi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

- Wang, Y., Walsh, C.W., Guo, J., and Zhang, J. 1991. Maternal Levels of Prostacyclin, Thromboxane, Vitamin E, and Lipid Peroxides Through Normal Pregnancy. *AM J Obstet Gynecol.* 165: 1690-1694
- Zou, Y., Lu, Y., and Wei, D. 2004. Antioxidant Activity of Flavonoid Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro. *Journal Agriculture and Food Chemistry.* 52(16): 5032-5039.