

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 WAKTU DAN TEMPAT

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei 2010 sampai dengan bulan Februari 2011. Tempat penelitian ialah Laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB; Laboratorium Biorin, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB; Laboratorium Terpadu IPB; dan Laboratorium Balai Besar Pasca Panen Pertanian, Kementerian Pertanian Republik Indonesia.

3.2 BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan dalam penelitian ialah jamur pelawan (*Boletus* sp.) kering yang diperoleh dari Dinas Perkebunan dan Kehutanan Kabupaten Bangka Tengah, Provinsi Kepulauan Bangka Belitung. Bahan yang digunakan dalam analisis kimia ialah K_2SO_4 , HgO , H_2SO_4 , 60% $NaOH$ - 5% $Na_2S_2O_3$, akuades, H_3BO_3 , HCl , asam asetat 2%, indikator metilen merah-metilen biru, kertas saring Whatman, kapas bebas lemak, dietil eter, buffer fosfat 0.08 M pH 6.0, buffer fosfat 10 mM pH 3.5, klara-diasase, termamyl, enzim pepsin, pankreatin, etanol 95%, etanol 78%, aseton, metanol, pikolotiosianat, trietilamin, natrium asetat, asetonitril 60%, asam lemak margarar/C17:0, $NaOH$ metanolik 0.5 N, N_2 , BF_3 (boron trifluorida) metanol (14% b/v), larutan $NaCl$ jenuh, Na_2SO_4 anhidrous, heksana, KCl 0.025 M pH 1, natrium asetat 0.4 M pH 0.45, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 1 mM, reagen Folin Ciocalteu 50%, Na_2CO_3 5%, asam metafosforat 5% w/v, 2,6 dichloroindophenol (DCP) 0.2% w/v, dan Dinitrophenilhidrazine (DPNH) 2% w/v.

Alat yang digunakan dalam penelitian ialah oven, desikator, neraca analitik, tanur, penangas listrik, labu Kjeldahl, batu didih, buret, tabung ekstraksi Soxhlet, mikro pipet, Buchner, vortex, *Atomic Absorption Flame Emission Spectrophotometer* (AAS), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Gas Liquid Chromatography* (GLC), dan spektrofotometer.

3.3 METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan gizi, senyawa bioaktif, dan kapasitas antioksidan dari jamur pangan pelawan (*Boletus* sp.). Analisis yang dilakukan ialah analisis komposisi proksimat, profil asam amino, profil asam lemak, kandungan vitamin, kandungan mineral, kandungan serat pangan, komponen antioksidan, dan kapasitas antioksidan

3.3.1 Persiapan Sampel

Pada penelitian ini, pengambilan sampel dilakukan dengan dua kali ulangan. Selanjutnya untuk masing - masing ulangan, sampel jamur pangan pelawan kering tanpa pemisahan antara tudung dan tangkai dihaluskan menggunakan blender. Selanjutnya sampel dikemas dalam plastik dan disimpan dalam lemari pendingin hingga akan digunakan kembali untuk keperluan analisis.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

3.3.2 Kadar Air (AOAC, 1995)

Sampel seberat 1-2 g ditimbang pada sebuah wadah kering yang telah diketahui bobotnya. Sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Pekerjaan tersebut diulangi hingga tercapai bobot yang konstan.

$$\text{Kadar air} = \frac{A-B}{C} \times 100\% \quad (3.1)$$

Keterangan :

A = Bobot wadah + sampel sebelum dikeringkan (g)

B = Bobot wadah + sampel setelah dikeringkan (g)

C = Bobot sampel awal (g)

3.3.3 Kadar Protein (AOAC, 1995)

Sampel seberat 100-250 mg ditimbang dan dipindahkan ke dalam labu Kjeldahl 30 ml, kemudian ditambahkan 1.9 g K₂SO₄, 40 mg HgO, dan 3.8 ml H₂SO₄. Sampel dididihkan selama 1-1.5 jam hingga cairan jernih. Sampel didinginkan dan ditambah sejumlah kecil air secara perlahan dan didinginkan kembali. Isi labu dipindahkan ke dalam alat destilasi, dan labu dibilas 5-6 kali dengan 1-2 ml akuades. Air pembilas dipindahkan ke dalam alat destilasi dan ditambahkan 8-10 ml larutan 60% NaOH - 5% Na₂S₂O₃.

Erlenmeyer 250 ml yang berisi 5 ml larutan H₃BO₃ dan 2-4 tetes indikator merah metilen – biru metilen diletakkan di bawah kondensor. Ujung tabung kondensor harus terendam dalam larutan H₃BO₃. Destilasi dilakukan hingga tertampung sekitar 15 ml destilat dalam erlenmeyer. Destilat dititrasi dengan HCl 0.02 N hingga terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Penetapan blanko juga dilakukan untuk mengurangi bias dalam pengukuran.

Kadar protein dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Kadar N} = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml blanko}) \times \text{N HCl} \times 14.007}{\text{Bobot sampel awal (mg)}} \times 100\% \quad (3.2)$$

$$\text{Kadar protein} = \text{Kadar N} \times 4.38^* \quad (3.3)$$

* Sumber : Chang dan Miles (2004) dan Barros *et al.* (2008)

3.3.4 Kadar Lemak (AOAC, 1995)

Labu lemak yang digunakan dikeringkan di dalam oven, kemudian didinginkan di dalam desikator dan ditimbang. Sebanyak 5 g sampel dibungkus dalam kertas saring dan ditutup dengan kapas bebas lemak.

Kertas saring yang berisi sampel dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi Soxhlet, kemudian kondensor dipasang di bagian atas, dan labu lemak di bagian bawah. Pelarut heksana dituang secukupnya ke dalam labu lemak.

Sampel direfluks selama 5 jam. Pelarut yang digunakan didestilasi dan ditampung. Kemudian labu lemak yang berisi lemak hasil ekstraksi dikeringkan dalam oven dengan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

suhu 105°C hingga bobot konstan. Labu lemak selanjutnya didinginkan dalam desikator dan ditimbang beserta dengan lemak di dalamnya.

$$\text{Kadar lemak} = \frac{\text{Bobot lemak (g)}}{\text{Bobot sampel awal (g)}} \times 100\% \quad (3.4)$$

3.3.5 Kadar Abu (AOAC, 1995)

Sampel seberat 2-3 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya. Sampel dalam cawan diarangkan pada pemanas dan diabukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 550°C sampai pengabuan sempurna. Sampel didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot konstan.

$$\text{Kadar abu} = \frac{A-B}{C} \times 100\% \quad (3.5)$$

Keterangan :

A = Bobot cawan + sampel kering (g)

B = Bobot cawan kosong kering (g)

C = Bobot sampel awal (g)

3.3.6 Kadar Karbohidrat (AOAC, 1995)

Kadar karbohidrat sampel dihitung dengan cara 100% kandungan gizi sampel dikurangi dengan kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak. Nilainya ditentukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Kadar karbohidrat} = 100\% - (A + B + C + D) \quad (3.6)$$

Keterangan :

A = Kadar air

B = Kadar abu

C = Kadar protein

D = Kadar lemak

3.3.7 Analisis Komposisi Asam Amino Metode *High Performance Liquid Chromatography* (AOAC, 1995)

Sebanyak 0.15 g sampel dimasukkan ke dalam tabung 25 ml dan ditambahkan 10 ml HCl 6 N. Sampel dipanaskan selama 24 jam pada suhu 110°C dan disaring. Hasil saringan diambil sebanyak 30 ml dan ditambahkan dengan larutan pengering metanol, piklotiosianat, dan trietilamin dengan perbandingan 2:2:1 dan dilakukan penambahan gas N₂. Kemudian sampel ditambahkan dengan larutan derivatisasi dari campuran metanol, natrium asetat, dan trietilamin dengan perbandingan 3:3:4. Selanjutnya sampel yang sudah kering dilarutkan dengan 10 ml buffer natrium asetat 1 M, lalu dibiarkan selama 20 menit.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Kolom HPLC yang digunakan ialah kolom *pico tag* 3.9 x 150 mm dengan fase gerak asetonitril 60% dan buffer natrium asetat 1 M. Detektor yang digunakan ialah UV dengan panjang gelombang 254 nm. Penentuan kadar asam amino ditentukan dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar asam amino} = \frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times \text{BM} \times \text{FP} \times 100 \quad (3.7)$$

Keterangan :

- A = Luas area sampel
- B = Luas area standar
- C = Konsentrasi standar
- D = Bobot sampel awal (μg)
- BM = Bobot molekul masing asam amino
- FP = Faktor pengenceran

3.3.8 Analisis Komposisi Asam Lemak Metode *Gas Liquid Chromatography* (AOAC 991.39)

Sebanyak 100 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian sampel ditambah dengan 1 ml larutan standar internal (SI) (asam lemak margarat/C17:0) dan 1.5 ml NaOH metanolik 0.5 N. Tabung diisi dengan N_2 lalu ditutup rapat dan divorteks. Tabung dipanaskan dalam penangas bersuhu 80-100°C selama 5 menit, kemudian didinginkan. Sebanyak 2 ml BF_3 metanol (14% b/v) ditambahkan ke dalam tabung, kemudian tabung diisi dengan N_2 dan ditutup rapat. Tabung dipanaskan kembali pada suhu 80-100°C selama 30 menit selanjutnya didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Heksana sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam tabung dan divorteks, kemudian ditambah 3 ml larutan NaCl jenuh dengan segera lalu dikocok. Lapisan heksana dipisahkan dan ditambah dengan Na_2SO_4 anhidrous.

Sampel disuntikkan ke dalam alat GLC dengan suhu injektor 250°C, dan suhu detektor 260°C. Suhu kolom diatur secara gradien, yaitu suhu awal kolom 120°C dipertahankan selama 6 menit, peningkatan suhu kolom 3°C/menit hingga mencapai suhu 230°C dan dipertahankan selama 25 menit. Tekanan gas helium diatur pada 1 kg/cm^2 , tekanan gas hidrogen dan udara masing - masing 0.5 kg/cm^2 . Asam lemak standar digunakan untuk identifikasi dan kuantifikasi asam lemak sampel.

Perhitungan jumlah asam lemak (g asam lemak/100 g) dapat dilakukan dengan rumus :

$$\text{Kadar asam lemak} = \frac{A}{B} \times \text{RF} \times \frac{\text{mg SI}}{\text{bobot sampel awal (mg)}} \times 100 \quad (3.8)$$

Keterangan :

- A = Area asam lemak A
- B = Area standar internal (SI)

Nilai *Respond Factor* (RF) tiap asam lemak dihitung dari kromatogram standar eksternal FAME.

$$RF A = \frac{\text{area SI}}{\text{konsentrasi SI}} \times \frac{\text{konsentrasi asam lemak A dari standar}}{\text{area asam lemak A dari standar}} \quad (3.9)$$

3.3.9 Kadar Vitamin

1. Vitamin C

Sampel sebanyak 1-10 g ditambahkan dengan 50-60 ml asam metafosforat 5% w/v dan dihomogenisasi. Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditera dengan asam metafosforat 5% w/v, kemudian didinginkan selama semalam. Sebanyak 5 ml sampel ditambahkan dengan 2-3 tetes 2,6 dichloroindophenol (DCP) 0.2% w/v sampai terbentuk warna yang konstan. Kemudian ke dalam sampel ditambahkan 5 ml Thiourea 2% w/v dalam asam fosforat 5% w/v, dan ditambahkan 1 ml dinitrophenilhidrazine (DPNH) 2% w/v dalam asam sulfat 9 N. Sampel diinkubasi dalam penangas air 50°C selama 90 menit. Selanjutnya sampel didinginkan dan ditambah asam asetil 5 ml dan digoyang selama 1 jam. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 800 g selama 5 menit dan diukur dengan HPLC.

2. Vitamin B1 (Tiamin)

Sebanyak 1 g sampel ditambahkan 60 ml asam asetat 2%, kemudian dipanaskan selama 20 menit dan disonikasi selama 5 menit. Setelah dingin, ke dalam sampel ditambahkan dengan 25 ml metanol dan ditepatkan hingga 50 ml dengan asam asetat 2%. Kemudian sampel disentrifugasi pada kecepatan 1450 g selama 5 menit dan supernatan dipisahkan untuk diinjeksikan ke HPLC.

3. Vitamin B2 (Riboflavin)

Sebanyak 10 g sampel ditambahkan dengan 40 ml asam sulfat 0.2 N dan dipindahkan ke dalam labu takar 100ml. Sampel dipanaskan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, sampel ditambahkan 6-7 ml larutan natrium asetat untuk mengatur pH sampai 4.5. Selanjutnya sampel ditambahkan dengan 5 ml klara-diestase dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 60-90 menit. Setelah dingin, sampel ditambahkan dengan 4 ml asam sulfat 5 N dan ditepatkan dengan akuades sampai 100 ml. Kemudian sampel disaring dan filtrat diukur dengan HPLC

4. Vitamin B3 (Niasin)

Sebanyak 2 g sampel ditambahkan dengan 60 ml asam asetat 2%, dipanaskan dengan penangas air selama 20 menit. Kemudian sampel dihomogenisasi selama 5 menit dengan sonikasi dan didiamkan pada suhu ruang sampai dingin. Selanjutnya ke dalam sampel ditambahkan 25 ml metanol dan ditepatkan dengan asam asetat 2% hingga volume 50 ml. Sampel disentrifugasi pada 1450 g selama 30 menit. Selanjutnya supernatan dipisahkan untuk diukur dengan HPLC.

5. Biotin

Sebanyak 0.2 g sampel ditambahkan dengan 50 ml buffer fosfat 10mM (pH=3.5) dan disonikasi. Kemudian sampel disentrifugasi pada 360 g selama 5 menit. Selanjutnya sampel disaring diukur dengan HPLC.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

3.3.10 Kadar Mineral

Mineral yang dianalisis ialah K, P, Ca, Na, Fe, dan Zn. Sebanyak 2 gram sampel diabukan kemudian didinginkan selama semalam. Abu selanjutnya ditambahkan dengan 40-50 ml HCl 1% v/v dan dipanaskan selama 60 menit. Kemudian ke dalam tabung ditambahkan 10 ml HCl dan air, dan selanjutnya dituang ke dalam labu takar 100 ml (ditera dengan air destilata). Kandungan mineral selanjutnya diukur dengan menggunakan *Atomic Absorption Flame Emission Spectrophotometer* (AAS).

3.3.11 Kadar Serat Pangan (Asp *et al.*, 1983)

Sebanyak 1 g sampel kering bebas lemak dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambah dengan 25 ml buffer fosfat 0.08 M pH 6.0 dan termamyl sebanyak 100 μ l. Sampel diinkubasikan dalam penangas air mendidih selama 30 menit dan diaduk setiap 5 menit. Selanjutnya sampel didinginkan lalu ditambah dengan 20 ml air destilata dan pH diatur menjadi 1.5 dengan HCl 4M. Kemudian ke dalam sampel ditambahkan 100 mg pepsin dan diagitasi selama 60 menit. Berikutnya sampel ditambahkan dengan 20 ml air destilata dan pH sampel diatur menjadi 6.8 dengan NaOH, lalu ditambahkan 100 mg pakreatin, ditutup, dan diinkubasikan pada suhu 40°C selama 60 menit sambil diagitasi, selanjutnya pH sampel diatur dengan HCl menjadi 4.5.

1. Analisis Kadar Serat Tidak Larut (IDF)

Sampel disaring dengan kertas Whatman, kemudian residu dicuci dengan 2 x 10 ml air destilata, 2 x 10 ml etanol 95%, dan 2 x 10 ml aseton. Kertas saring dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama semalam, didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Selanjutnya kertas saring diabukan dalam tanur.

$$\text{Kadar IDF (\%)} = \frac{D1-I1-B1}{\text{Bobot Sampel Awal (g)}} \times 100\% \quad (3.10)$$

Keterangan :

D1 = Bobot kertas saring setelah analisis dan dikeringkan (g)

I1 = Bobot kertas saring setelah diabukan (g)

B1 = Bobot blanko bebas serat (g)

2. Analisis Kadar Serat Larut (SDF)

Filtrat ditepatkan volumenya dengan air sampai 100 ml, lalu ditambahkan dengan 400 ml etanol 95% bersuhu 60°C, dan didiamkan selama 60 menit. Selanjutnya filtrat disaring dengan kertas Whatman dengan bantuan Buchner. Kemudian residu dicuci dengan 2 x 10 ml etanol 78%, 2 x 10 ml etanol 95%, dan 2 x 10 ml aseton. Kertas saring dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama semalam, didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Selanjutnya kertas saring diabukan dalam tanur.

$$\text{Kadar SDF (\%)} = \frac{D2-I2-B2}{\text{Bobot Sampel Awal (g)}} \times 100\% \quad (3.11)$$

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Keterangan :

D2 = Bobot kertas saring setelah analisis dan dikeringkan (g)

I2 = Bobot kertas saring setelah diabukan (g)

B2 = Bobot blanko bebas serat (g)

$$TDF = IDF + SDF \quad (3.12)$$

Keterangan :

TDF = Kadar Total serat pangan

IDF = Kadar Serat pangan tak larut

SDF = Kadar Serat pangan larut

3.3.12 Analisis Total Fenolik

Sebanyak 2 g sampel kering dilarutkan dalam 20 ml etanol kemudian dimaserasi dengan pengocokan selama semalam. Campuran tersebut disaring dan kemudian disentrifugasi pada 1450 g selama 5 menit. Sebanyak 0.5 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0.5 ml etanol 95%, 2.5 ml akuades, dan 2.5 ml reagen Folin Ciocalteu 50%. Campuran didiamkan selama 5 menit, lalu ditambahkan 0.5 ml Na₂CO₃ 5% dan divortex. Selanjutnya campuran disimpan dalam ruang gelap selama 1 jam. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 725 nm. Sebagai larutan standar digunakan asam galat dengan variasi konsentrasi 50-250 mg/L, sehingga kandungan total fenolik dinyatakan dalam mg *Gallic Acid Equivalent* (GAE)/g sampel.

3.3.13 Analisis Total Antosianin (Giusti dan Worlsted, 2001)

Sebanyak 1 g sampel dilarutkan dalam 20 ml campuran larutan 15% HCL 1.5 N-85% metanol. Larutan didiamkan selama 2 jam dalam ruang gelap, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Sebanyak masing-masing 1 ml sampel dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambah larutan potasium klorida 0.025 M pH 1 sebanyak 9 ml dan tabung reaksi kedua ditambahkan sodium asetat 0.4 M pH 0.45 sebanyak 9 ml. Pengaturan pH dalam pembuatan potasium klorida dan sodium asetat menggunakan HCL pekat. Absorbansi dari kedua perlakuan pH diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm dan 700 nm setelah didiamkan selama 15 menit.

Nilai absorbansi sampel ekstrak dihitung dengan menggunakan persamaan : $A = [(A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4.5}]$. Total antosianin dihitung dengan sianidin-3-glikosida menggunakan koefisien ekstingsi molar sebesar 26900 L mol⁻¹ cm⁻¹ dan berat molekul 449.2 g mol⁻¹. Total antosianin dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Total antosianin(mg/ml)} = \frac{A \times BM \times FP}{\epsilon_{510} \text{ nm} \times b} \quad (3.13)$$

Keterangan :

- A = Absorbansi
 ϵ = Koefisien absorptivitas (26900 L/mol cm)
b = Diameter kuvet (1 cm)
BM = Berat molekul sianidin-3-glikosida (449.2 g/mol)
FP = Faktor pengenceran

3.3.14 Penentuan Total β -karoten dan Likopen (Barros *et al.*, 2007 yang dimodifikasi)

Sebanyak 2 g sampel ditambahkan dengan 30 ml larutan aseton-heksana (4:6), kemudian digoyangkan dengan *shaker* selama semalam pada suhu ruang dan tempat gelap. Larutan kemudian disaring dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 453, 505, 663 nm. Likopen dan β -karoten kemudian dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Likopen (mg/100ml)} = -0.0456 \times A_{663} + 0.372 \times A_{505} - 0.0806 \times A_{453} \quad (3.14)$$

$$\beta\text{-Karoten (mg/100ml)} = 0.216 \times A_{663} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453} \quad (3.15)$$

3.3.15 Analisis Kapasitas Antioksidan

Sebanyak 2 g sampel kering dilarutkan dalam 20 ml etanol kemudian dimaserasi dengan pengocokan selama semalam. Campuran tersebut disaring dan selanjutnya dibuat 1 seri pengenceran sampel yaitu 10, 15, dan 20 kali dengan etanol.

Sebanyak 1 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 7 ml etanol. Untuk larutan blanko digunakan 8 ml etanol. Selanjutnya, ke dalam tabung ditambahkan 2 ml larutan DPPH 1 mM dan dikocok kuat. Larutan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi sampel yang menghasilkan penghambatan radikal DPPH sebesar 50%.

$$\text{Kapasitas antioksidan (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100\% \quad (3.16)$$

$$IC_{50} = 0.5 \times A \quad (3.17)$$

Keterangan :

- A = Absorbansi blanko
B = Absorbansi larutan sampel

Asam askorbat digunakan sebagai pembanding, sehingga kapasitas antioksidan dinyatakan dalam *Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity* (AEAC).