

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai dengan Juli 2010 di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Material Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, alat-alat gelas, pengaduk, timbangan, blender, kertas Whatman, *ricecooker*, dandang, kompor gas, seperangkat alat destilasi, *Rotary Evaporator Buchi*, dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1240).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras merah yang berasal dari Cianjur, beras hitam yang berasal dari daerah Punclut Bandung, air, DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*), metanol *p.a.*, aquades, kloroform,

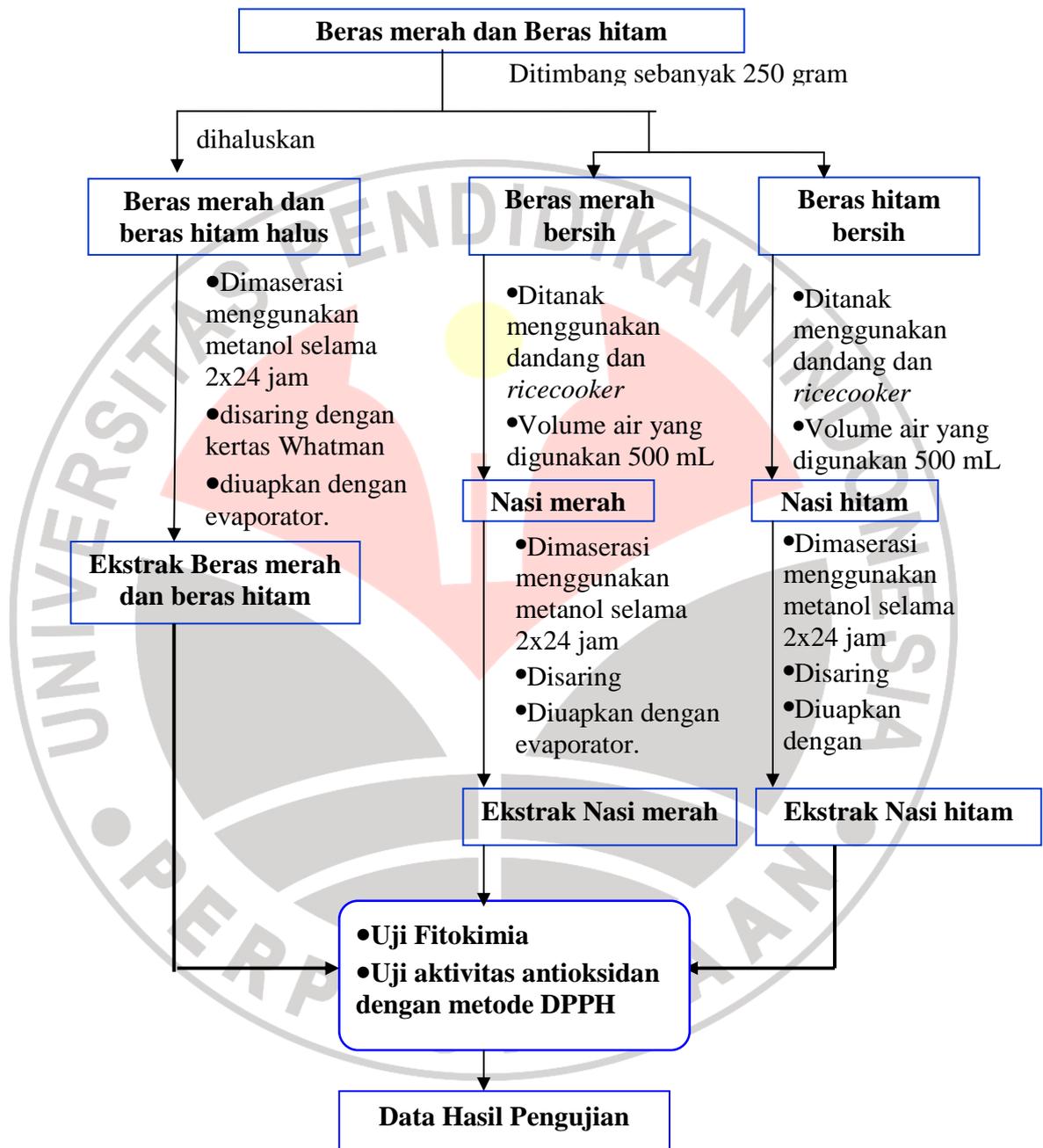
KI, HgCl₂, serbuk Mg, HCl pekat, CH₃COOH glasial, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, NaOH 0,1 N

3.3 Tahapan Penelitian

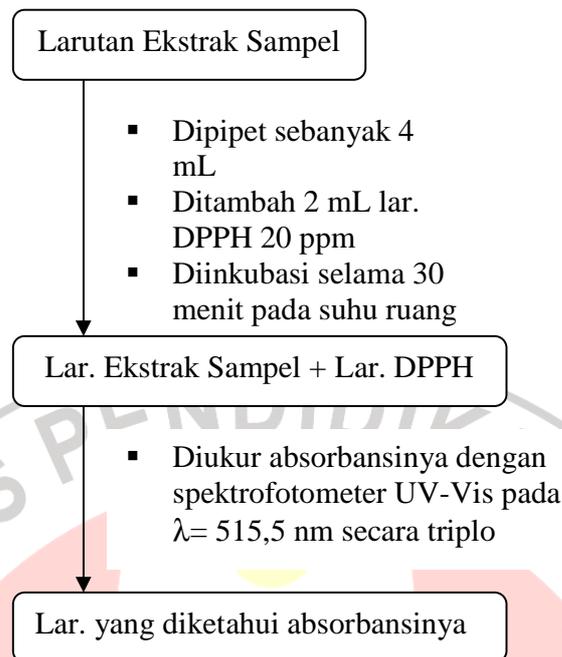
Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu:

1. Tahap penyiapan sampel beras merah dan beras hitam serta nasi,
2. Tahap pembuatan nasi
3. Tahap ekstraksi sampel,
4. Tahap uji fitokimia,
5. Tahap uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan pengukuran absorbansi menggunakan instrument spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1240.

Secara keseluruhan, penelitian ini ditunjukkan seperti bagan alir di bawah ini:



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.2 Bagan Alir Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Uraian dari masing-masing pekerjaan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.1 Penyiapan Sampel

Pada awal penelitian, beras merah dan beras hitam yang akan diekstrak terlebih dahulu ditumbuk hingga halus. Sedangkan beras merah dan beras hitam yang akan diolah menjadi nasi terlebih dahulu dibersihkan dengan cara dicuci dengan air kran pada suhu ruangan dan setelah menjadi nasi dilakukan penghalusan menggunakan blender.

3.3.2 Pembuatan Nasi

Beras merah dan beras hitam sebanyak 250 gram yang telah dibersihkan ditanak hingga menjadi nasi. Dengan perbandingan antara beras

dan air adalah sebanyak 1:2. Proses penanakan dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menggunakan *ricecooker* dan dandang.

3.3.3 Ekstraksi Sampel

Serbuk beras merah dan beras hitam serta nasi merah dan nasi hitam, masing-diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol dengan perbandingan 1:2 selama 2x24 jam.

Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring lalu filtratnya dipekatkan menggunakan *rotary vaccum evaporator*. Ekstrak pekat metanol kemudian ditimbang.

3.3.4 Uji Fitokimia

Tiap ekstrak bahan diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam masing-masing ekstrak bahan. Uji fitokimia dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, tanin, kuinon, dan antosianin.

Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

1. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah 5 tetes kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu satu gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut. Lalu ke dalam larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram HgCl₂ sampai larut.

2. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah 1 gram serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah 1 mL CH₃COOH glasial dan 1 mL H₂SO₄ pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

4. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah beberapa tetes FeCl₃ 1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

5. Pemeriksaan Kuinon

Pemeriksaan kuinon dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah beberapa tetes NaOH 0,1 N. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa kuinon.

6. Pemeriksaan Antosianin

Pemeriksaan antosianin dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah beberapa tetes HCl 0,1 N. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa antosianin.

3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah dan Beras Hitam serta Produk Olahannya yaitu Nasi

Pada tahap awal pengujian, dibuat terlebih dahulu kurva kalibrasi untuk larutan DPPH. Sebanyak 5 mg DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dalam pelarutnya metanol. Larutan DPPH yang dibuat memiliki konsentrasi 100 ppm, kemudian diambil sejumlah larutan DPPH tersebut dan dilakukan pengenceran dalam labu ukur 10 mL hingga didapat variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm. Selanjutnya diukur serapannya pada $\lambda = 515,5$ nm.

Untuk uji aktivitas antioksidan pada ekstrak beras merah dan beras hitam serta produk olahannya yaitu nasi, hal yang pertama dilakukan adalah pengenceran larutan sampel, 1 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam labu

ukur 100 mL kemudian ditambahkan pelarut metanol hingga tanda batas. Sedangkan untuk pembuatan larutan DPPH yang digunakan sebagai pereaksi pada sampel, sebanyak 1 mg DPPH dilarutkan menggunakan metanol ke dalam labu ukur 50 mL hingga tanda batas sehingga konsentrasi larutan DPPH yang digunakan adalah 20 ppm. Kemudian sebanyak 2 mL larutan DPPH dalam metanol dicampur dengan 4 mL larutan sampel dalam botol vial. Kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu larutan yang telah siap diukur dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu pada $\lambda = 515,5$ nm. Pengukuran aktivitas antioksidan ini dilakukan secara triplo.

Sementara itu aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs DPPH kontrol} - \text{Abs sisa DPPH}}{\text{Abs DPPH kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

Abs DPPH kontrol : absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel

Abs sisa DPPH : absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel