

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Objek dan Lokasi Penelitian**

Objek atau bahan penelitian ini adalah bekatul (*rice bran*) yang diperoleh di daerah kabupaten Bandung barat. Lokasi penelitian bertempat di Laboratorium *Research*, Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI, Kebun Botani FPMIPA UPI, dan Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi UPI Bandung.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah set alat maserasi, alat-alat gelas standar kimia organik dan biokimia, magnetik stirer, batu didih, neraca analitik, pemanas listrik, oven listrik, dan set alat uji hayati.

##### **3.2.2 Instrumen**

Instrumen yang digunakan yaitu *Gas Chromatography Mass spectroscopy* (GCMS) Shimadzu QP 5050 A.

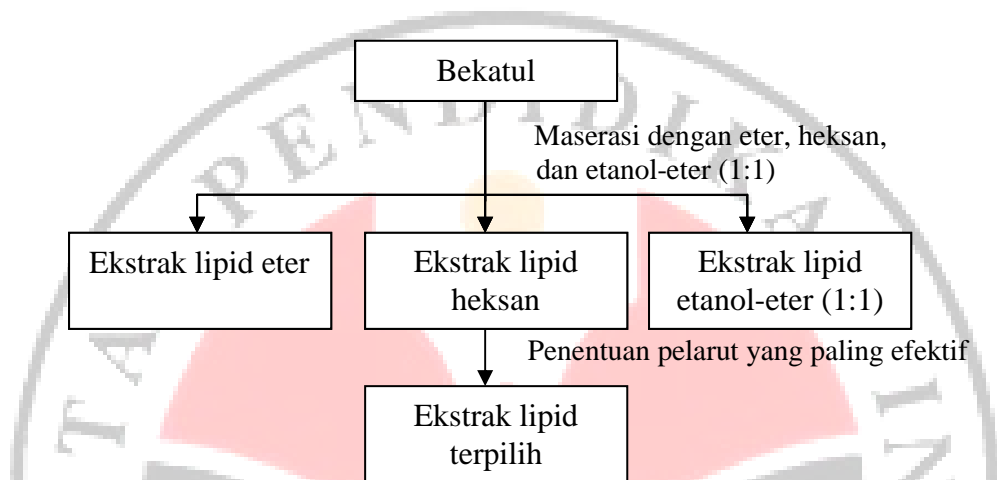
##### **3.2.3 Bahan**

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah bekatul (*rice bran*). Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis dan bahan pro analisis (p.a). Bahan-bahan tersebut adalah n-heksana pa, etanol, larutan BF<sub>3</sub>, eter, metanol pa, NaOH padat, HCl 6 N, kertas saring.

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

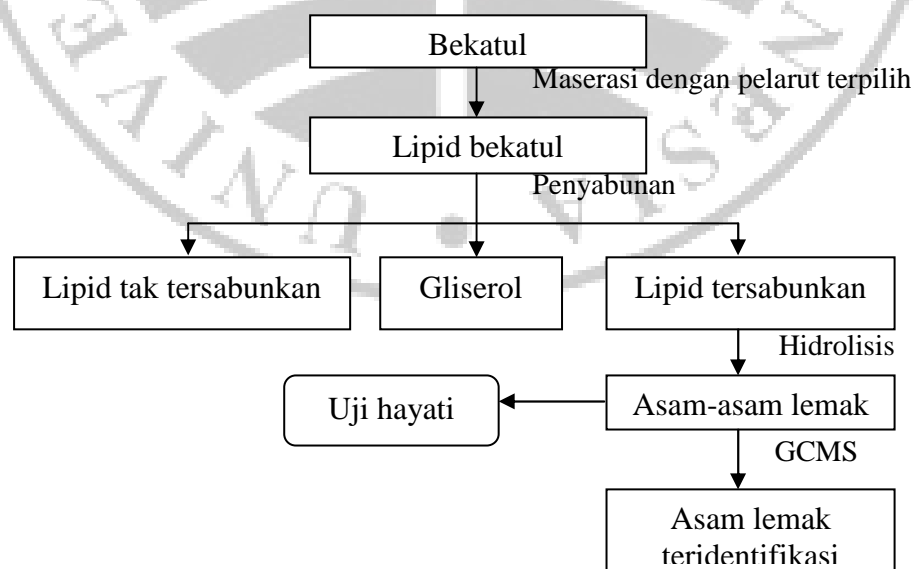
Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahapan yaitu penyiapan sampel, ekstraksi, pemisahan fraksi, identifikasi kandungan asam lemak, dan uji hayati. Bagan alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1, Gambar 3.2, dan Gambar 3.3.

#### 3.3.1 Pemilihan Pelarut



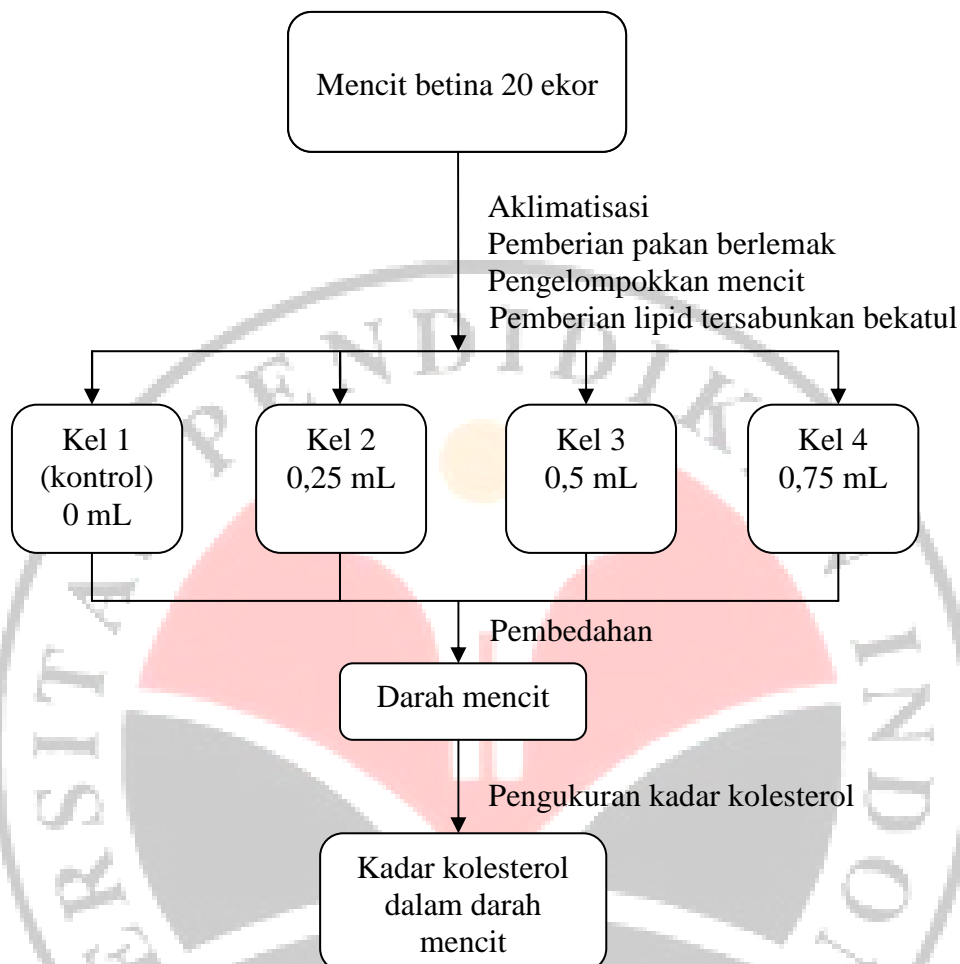
Gambar 3.1. Bagan alir pemilihan pelarut

#### 3.3.2 Ekstraksi dan Karakterisasi Lipid Bekatul



Gambar 3.2. Bagan alir ekstraksi dan karakterisasi lipid bekatul

### 3.3.3 Uji Hayati



**Gambar 3.3. Bagan alir uji hayati**

## 3.4 Cara Kerja

### 3.4.1 Penyiapan Sampel

Tahap awal penelitian dimulai dari pengambilan sampel bekatul (*rice bran*) di daerah kabupaten Bandung barat. Bekatul yang akan digunakan dipisahkan terlebih dahulu dari dedak padi kasar dengan cara menyaringnya

menggunakan saringan berukuran 60 mesh. Untuk penyimpanannya, bekatul harus disimpan dalam wadah tertutup di lemari es agar tidak berbau tengik. Waktu penyimpanan bekatul di dalam lemari es maksimal 1 bulan.

### 3.4.2 Ekstraksi Lipid Bekatul

Ekstraksi lipid dari bekatul dilakukan dengan pelarut yang berbeda. Hal ini dilakukan untuk menentukan pelarut yang paling baik dalam mengekstrak lipid dari bekatul. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi padat-cair dengan teknik maserasi. Sebanyak 20 gram bekatul ditempatkan dalam tiga wadah yang berbeda. Bekatul dalam setiap wadah direndam dengan pelarut n-heksan, eter, dan etanol-eter (1:1) masing-masing sebanyak 60 mL. Ekstrak hasil maserasi dari tiap wadah disaring menggunakan corong *Buchner*, lalu filtratnya dipekatkan dengan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum. Ekstrak lipid dari tiap pelarut ditimbang massanya, kemudian dari ketiga hasil ekstrak lipid tersebut dapat ditentukan pelarut yang terbaik.

Lipid yang akan digunakan untuk uji hayati dapat diekstrak dari 2 kg bekatul yang direndam dalam pelarut terpilih sebanyak 2 x 5 L masing-masing selama 24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring dengan menggunakan corong *Buchner*, kemudian filtratnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum. Ekstrak pekat ini berupa lipid yang kemudian ditimbang hingga diperoleh massanya.

### **3.4.3 Pemisahan Fraksi Lipid Tersabunkan**

#### **3.4.3.1 Penyabunan (*saponification*)**

Setiap 5 gram lipid bekatul disabunkan dengan menambahkan 50 mL larutan NaOH 15% dalam etanol. Campuran dipanaskan pada suhu 50°C sambil diaduk menggunakan magnetik stirer selama 30 menit. Untuk pembuatan larutan NaOH dalam etanol yaitu 15 gram NaOH padat dilarutkan dalam 100 mL etanol 95%. Lipid tersabunkan yang terbentuk, selanjutnya dipisahkan dari lipid tak tersabunkan dan ditampung dalam wadah lain.

#### **3.4.3.2 Hidrolisis Fraksi Tersabunkan oleh Asam**

Lipid tersabunkan dalam gelas kimia ditambah larutan HCl 6 N sebanyak 300 mL. Penambahan larutan HCl ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan magnetik stirer selama 30 menit.

### **3.4.4 Preparasi Analisis Komposisi Asam Lemak dengan GCMS (Transesterifikasi)**

Lipid bekatul sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam botol vial kecil, kemudian ditambahkan larutan BF<sub>3</sub>-metanol 20% sebanyak 3 mL. Perbandingan lipid dengan BF<sub>3</sub>-metanol adalah 1:3. Setelah itu, campuran dipanaskan di atas penangas air pada suhu 50°C sambil diaduk dengan stirer selama 2 jam.

### 3.4.5 Analisis Komposisi Asam Lemak dalam Fraksi Tersabunkan Lipid Bekatul dengan GCMS

Komposisi asam lemak yang terdapat dalam lipid bekatul dapat dianalisis dengan menggunakan alat *Gas Chromatography Mass spectroscopy* (GCMS). Analisis GCMS dilakukan di Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI. Adapun kondisi GCMS yang digunakan adalah sebagai berikut :

- Suhu kolom = 60°C
- Suhu injektor = 310°C
- Suhu detektor = 300°C
- Suhu awal 60°C ditahan selama 2 menit, tiap menit naik 10°C.
- Volume injeksi = 0,2 µL
- Tekanan = 100 kPa
- Laju alir = 36 mL/menit
- Gas pembawa = Helium
- Kolom = DB-5MS
- Panjang kolom = 30 m
- Diameter kolom = 0,25 mm
- Waktu analisa = 28 menit

### 3.4.6 Uji Hayati

#### 3.4.6.1 Aklimatisasi Mencit

Mencit diperoleh dari *green house* Kebun Botani FPMIPA UPI dengan galur, umur, jenis kelamin, dan kondisi lingkungan yang relatif sama untuk menghindari perbedaan aktivitas biologi. Mencit yang dipilih berjenis kelamin betina dan berumur delapan minggu.

Pemeliharaan dilakukan di *green house* Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Mencit-mencit dikelompokkan dalam kandang berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan lima ekor setiap kandang. Kandang yang digunakan terbuat dari PVC berukuran 30 cm x 20 cm x 12 cm, transparan, dan ditutupi oleh penutup yang terbuat dari besi dilengkapi dengan tempat air minum (botol).

Selama aklimatisasi, setiap mencit diberi pakan standar sebanyak  $\pm 6$  gram setiap hari dan air minum secara *ad libitum*. Botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diganti airnya atau diisi ulang apabila air sudah habis.

#### 3.4.6.2 Tahap Perlakuan

Perlakuan ini dilaksanakan selama dua minggu, dalam waktu satu minggu mencit diberi makan pakan berlemak  $\pm 6$  gram setiap hari/ekor dan air minum. Pemberian lipid tersabunkan bekatul secara oral dengan menggunakan jarum *gavage* dilakukan pada minggu berikutnya.

Kelompok pertama sebagai kontrol hanya diberi aquades dan pakan standar/hari. Kelompok perlakuan diberi lipid tersabunkan bekatul sebanyak 0,25

mL ; 0,5 mL ; 0,75 mL setiap hari. Selama perlakuan, mencit tetap diberi pakan standar setiap hari. Setelah satu minggu perlakuan, mencit ditimbang berat badannya kemudian dibedah untuk diambil sampel darahnya dari jantung. Sampel darah yang diperoleh, kemudian dipisahkan serumnya menggunakan alat sentrifugasi.

#### 3.4.6.3 Pengukuran Kadar Kolesterol Total Darah

Kadar kolesterol diukur dengan menggunakan metode CHOD-PAP *Enzymatic Colorimeter Test for Cholesterol with Lipid Clearing Factor* (LCF). Sampel dan standar diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20°C – 25°, kemudian dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 493 nm. Sampel dan standar ini diukur absorbansinya terhadap blanko (reagen) murni yang nantinya didapat  $\Delta A$ . Berikut ini adalah rumus pengukuran kadar kolesterol darah.

$$C = C_{\text{standar}} \times \frac{\Delta A \text{ sampel}}{\Delta A \text{ standar}}$$

Keterangan :  $\Delta A$  = Absorbansi  
C = Konsentrasi sampel (mg/dl)  
Cstandar = Konsentrasi standar (mg/dl)