

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai dengan Juli 2012 dengan tempat penelitian sebagai berikut :

1. Laboratorium Mutu Giling Balai Besar Penelitian Tanaman Padi untuk penggilingan sampel
2. Laboratorium Riset Kimia FPMIPA UPI untuk maserasi sampel, dan uji fitokimia
3. Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI untuk penentuan aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer visibel Shimadzu 1240

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

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat aspirator, penggilingan bertahap (alat pemecah kulit *Mini Husker* (Satake THU 35A), alat sosoh *Abrasive Mini Polisher Satake* TM-05A), alat pemisah beras kepala/*grinder satake*, alat penepungan, neraca analitik, kertas whatman, *rotary vacuum evaporator*, pipet. Spektrofotometer uv - visibel Shimadzu 1240, corong Buchner dan alat gelas (labu Erlenmeyer 300 mL dan 50 mL, labu mulut hisap, labu ukur 50, 25 dan 10 mL, pipet seukuran 5 mL dan 1 mL).

**Tri Adi Putra, 2012**

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah, Beras Hitam dan Beras Putih Dengan Perbedaan Waktu Sosoh

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini gabah beras merah aek Sibundong, beras hitam lokal Indramayu dan beras putih Ciherang yang belum matang fisiologi (belum cukup umur panen) dari kebun percobaan Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, metanol p.a, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), pereaksi uji fitokimia (kloroform, KI, HgCl<sub>2</sub>, serbuk Mg, HCl pekat, CH<sub>3</sub>COOH glasial, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, NaOH 0,1N).

### 3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan kegiatan yang akan dilakukan dalam penelitian ini meliputi :

#### 1. Tahap penggilingan sampel.

Sampel digiling pada penggilingan dua tahap sehingga menghasilkan beras pecah kulit, beras giling dan bekatul.

#### 2. Tahap ekstraksi sampel.

Seluruh sampel ditepungkan, ditimbang, dan di maserasi dengan pelarut metanol murni selama 1x 48 jam (2hari).

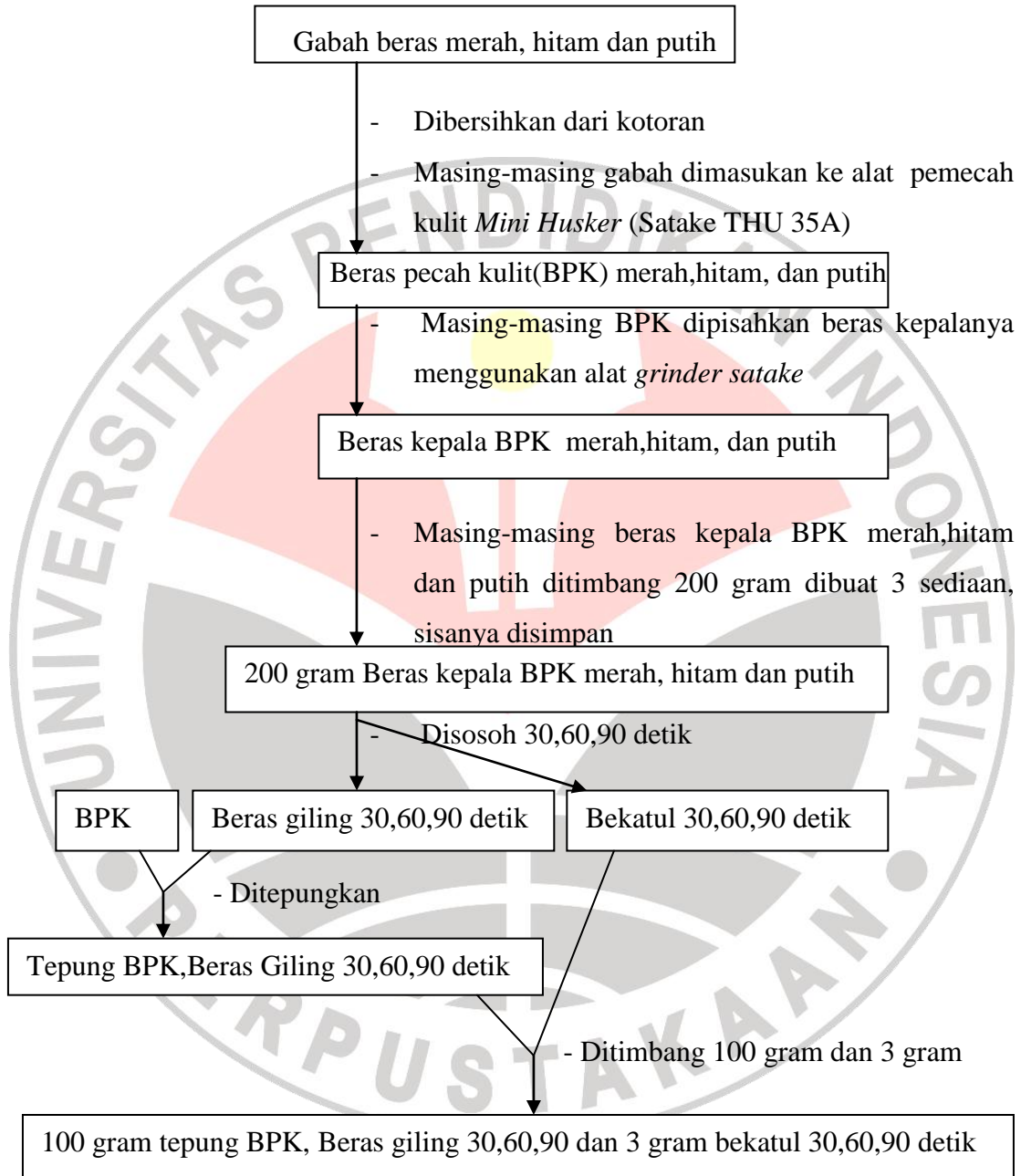
#### 3. Tahap pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

Seluruh ekstrak sampel diukur aktivitas antioksidannya terhadap DPPH dengan melihat absorbansinya pada spektrofotometer visibel Shimadzu 1240

#### 4. Tahap uji fitokimia.

Ekstrak beras pecah kulit, beras giling dan bekatul di uji fitokimia.

Alur penelitian ini ditunjukkan seperti bagan alir dibawah ini:

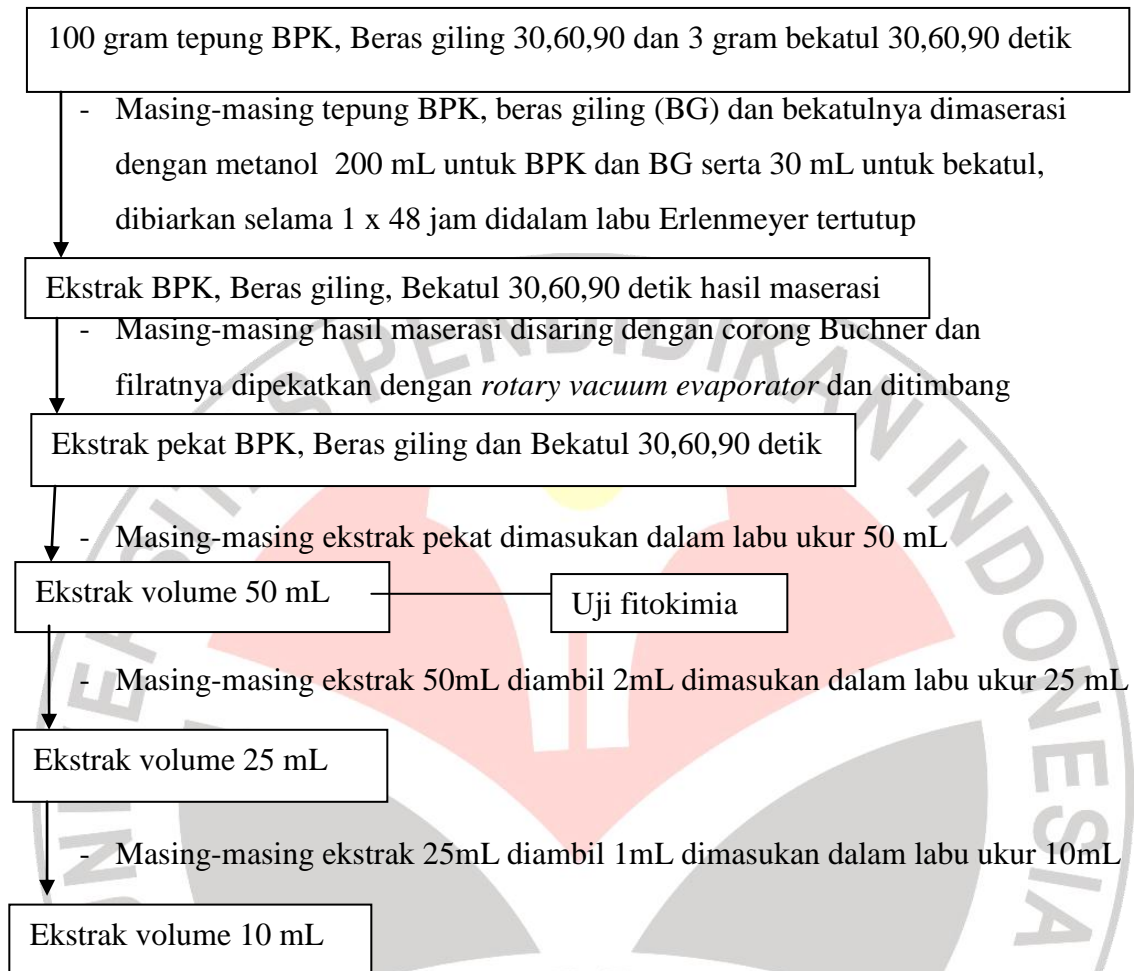


**Gambar 3.1.** Bagan Alir Preparasi Sampel

**Tri Adi Putra, 2012**

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah, Beras Hitam dan Beras Putih Dengan Perbedaan Waktu Sosoh

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu



**Gambar 3.2.** Bagan Alir Ekstraksi Sampel

Untuk bagan alir penentuan kurva kalibrasi dapat dilihat pada gambar 3.3 berikut ini.

#### Penentuan kurva kalibrasi DPPH

- Ditimbang DPPH sebanyak 10 mg, dan dimasukan dalam labu ukur 50 mL ditambah metanol hingga tanda batas sehingga konsentrasinya 200 ppm

**Tri Adi Putra, 2012**

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah, Beras Hitam dan Beras Putih Dengan Perbedaan Waktu Sosoh

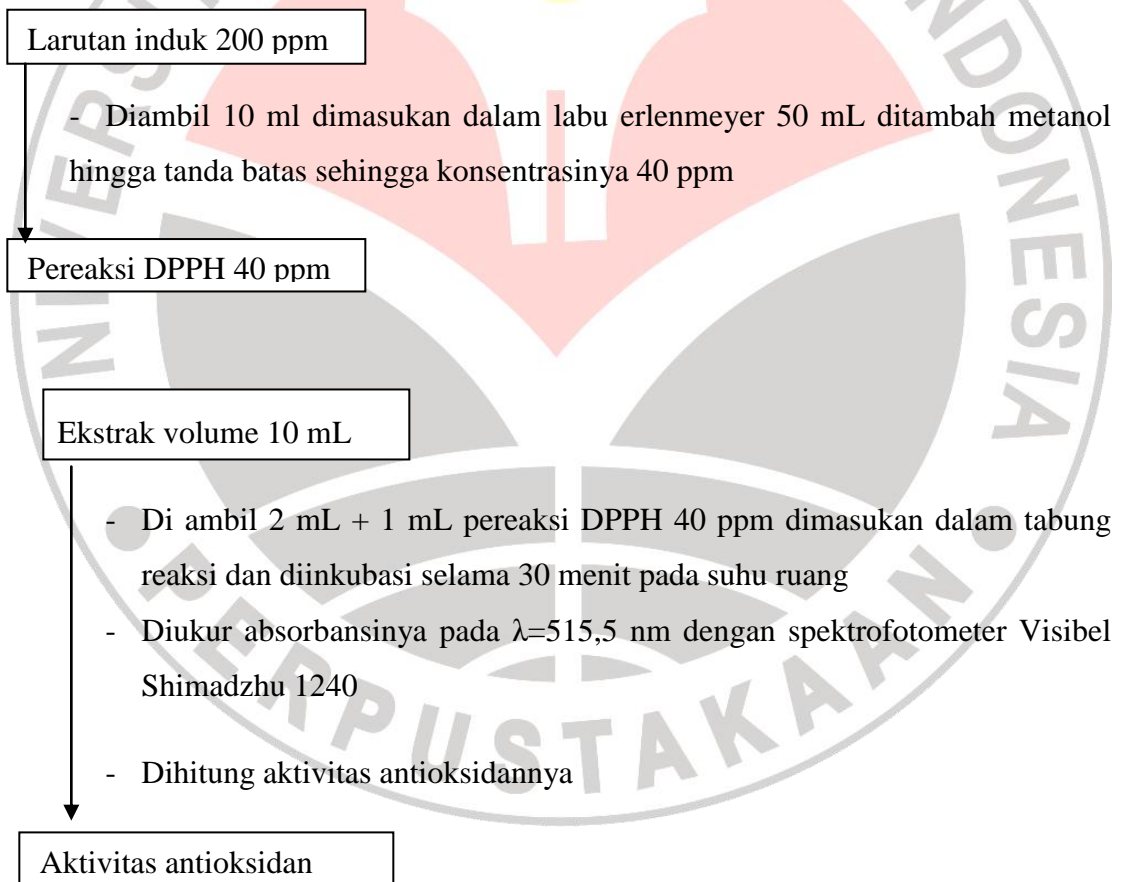
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

- Kemudian diencerkan dan dibuat konsentrasi 10,20,30,40,50 ppm dalam labu ukur 10 mL, masing-masing konsentrasi diukur pada  $\lambda=515,5$  nm dengan spektrofotometer Visibel Shimadzu 1240.

Kurva kalibrasi DPPH

**Gambar 3.3.** Bagan Alir Penentuan Kurva Kalibrasi

Untuk bagan alir pembuatan pereaksi DPPH 40 ppm dan uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada gambar 3.4 berikut ini.



**Gambar 3.4.** Bagan Alir Pembuatan Pereaksi DPPH 40 ppm dan

Uji Aktivitas Antioksidan

**Tri Adi Putra, 2012**

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah, Beras Hitam dan Beras Putih Dengan Perbedaan Waktu Sosoh

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

Uraian dari masing-masing pekerjaan yang dilakukan adalah sebagai berikut

### **3.3.1 Penyiapan Sampel**

#### **Penggilingan bertahap (penggilingan skala laboratorium)**

5 kg gabah beras merah, 5 kg gabah beras hitam, dan 5 kg gabah beras putih dibersihkan dan dimasukkan ke alat pemecah kulit dihasilkan beras pecah kulit. Sebagian beras pecah kulit (BPK) dari ketiga beras tersebut dimasukkan dalam plastik terpisah dan diberi label (sebagai sampel dalam keadaan awal atau belum disosoh). Sebagian beras pecah kulit dari ketiga beras tersebut disosoh dengan waktu sosoh masing - masing 30,60 dan 90 detik sehingga menghasilkan beras giling dengan derajat sosoh tertentu. Beras giling tersebut dan BPK ditepungkan dan di masukan dalam plastik terpisah dan di beri label(sebagai variabel berubah). Begitu juga dengan bekatulnya.(sebagai variabel berubah).

#### **3.3.2 Ekstraksi Sampel**

Beras pecah kulit hasil penepungan dari gabah beras merah, gabah beras hitam dan gabah beras putih masing- masing ditimbang 100 gram dan dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer 300 mL diberi pelarut metanol 200 mL disumbat mulutnya. Diamkan selama 1 x 48 jam. Beras giling 30,60,90 detik dari beras merah, beras hitam dan beras putih yang mempunyai derajat sosoh yang berbeda masing- masing ditimbang 100 gram sedangkan bekatul 3 gram,



dimasukan kedalam labu Erlenmeyer ditambah pelarut metanol 200mL dan untuk bekatul 30mL di sumbat mulutnya. Diamkan selama 1x 48 jam. Seluruh sampel setelah 1x 48jam disaring dengan corong Buchner dan diuapkan pelarutnya dengan rotari vakum evaporator. Ekstrak pekat dari masing-masing sampel dimasukan dalam labu ukur 50 mL, kemudian diambil 2mL dimasukan ke labu ukur 25mL dan ekstrak 25ml diambil 1 mL dimasukan dalam labu ukur 10 mL disimpan di vial coklat dan disimpan di freezer.

### **3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah, Beras Hitam dan Beras Putih**

#### **Pembuatan Kurva Kalibrasi DPPH**

10 mg DPPH dimasukan di labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas (200ppm). Kemudian diencerkan kedalam labu ukur 10mL dengan konsentrasi 10,20,30,40 dan 50 ppm. Kemudian ukur kelima konsentrasi tersebut pada  $\lambda=515,5$  nm. Didapatkan kurva kalibrasi DPPH.

#### **Penentuan aktivitas antioksidan**

Ekstrak volume 10 mL diambil 2 mL sebagai sampel. Sedangkan untuk pembuatan larutan DPPH 40 ppm yang digunakan sebagai pereaksi pada sampel, sebanyak 10 mL larutan DPPH induk dimasukan pada labu ukur 50 mL ditambah metanol hingga tanda batas sehingga larutan DPPH yang digunakan 40 ppm. Setiap pengujian sampel diambil 1 mL larutan DPPH

40 ppm dicampur dengan 2 mL sampel dimasukkan dalam botol vial kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu dimasukkan ke kuvet dan diukur serapannya pada  $\lambda = 515,5 \text{ nm}$ .

Aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs. DPPH kontrol} - \text{Abs. sisa DPPH}}{\text{Abs DPPH Kontrol}}$$

Keterangan:

Abs. DPPH Kontrol : absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel

Abs .sisa DPPH : absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel.

### **3.3.4 Uji Fitokimia Ekstrak Fraksi Penggilingan Beras Merah, Beras**

#### **Hitam dan Beras Putih**

Sampel di uji fitokimia yakni pemeriksaan alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, tanin, kuinon dan antosianin. Dalam pengujian fitokimia ekstrak sampel mempunyai warna tertentu, maka selalu diperiksa perubahan warna ekstrak awal di bandingkan dengan warna ekstrak setelah diberi pereaksi. Hal tersebut agar mengurangi kesalahan dalam pemeriksaan dan penentuan golongan bahan alam yang terkandung dalam ekstrak. Prosedur kerjanya sebagai berikut :

#### **1. Pemeriksaan alkaloid**

Pemeriksaan alkaloid diuji dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambah 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereksi Mayer.

Terbentuknya endapan putih menandakan adanya senyawa golongan alkaloid.

**Tri Adi Putra, 2012**

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah, Beras Hitam dan Beras Putih Dengan Perbedaan Waktu Sosoh

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu



Pereaksi Mayer dibuat dengan melarutkan 1 gram KI dalam 20 mL aquades hingga semuanya larut lalu dimasukan 0,271 gram  $HgCl_2$  kedalam larutan KI tersebut, diaduk hingga larut.

## 2. Pemeriksaan flavonoid

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

## 3. Pemeriksaan terpenoid dan steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid diuji dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1mL ditambah 1ml  $CH_3COOH$  glasial dan 1mL  $H_2SO_4$  pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya senyawa golongan steroid.

## 4. Pemeriksaan tannin

Pemeriksaan tanin diuji dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1mL ditambah beberapa tetes  $FeCl_3$  1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

## 5. Pemeriksaan kuinon

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

#### 6. Pemeriksaan antosianin

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

