

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 6 bulan, yaitu pada bulan Februari sampai dengan bulan Juli dengan tempat serta kegiatan penelitian sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan untuk tahapan optimasi perkecambahan, perkecambahan sampel, iradiasi sampel menggunakan lampu UV-C, dan ekstraksi sampel.
- 2) Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI untuk uji aktivitas antioksidan.
- 3) Laboratorium Kimia Universitas Padjadjaran untuk analisis metabolit sekunder menggunakan UPLC-ESI-QTOF.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas (kaca arloji, gelas kimia 250 mL, gelas ukur 50 mL, labu mulut hisap, labu ukur 10 mL), neraca analitik Metler Toledo, kertas saring, corong Buchner, *tray* plastik untuk proses perkecambahan, alat perkecambahan yang dilengkapi *heating mat* 12V (Hyindoor), *mini fan* DC 5V, dan *humidifier* DC 24V, inkubator UV-C dengan lampu UV 15 W (Yang), oven (Memmert).

Untuk keperluan ekstraksi dan analisis ekstrak digunakan *ball miller High Energy Milling - Ellipse 3D Motion* (HEM-E3D) (Nanotech Herbal, Indonesia) *ultrasonic cleaner* (Honda W-211, Japan), *centrifuge* (Kokusen H-103n, Japan) *rotary vacuum evaporator*, *vortex* SciLogex MX-S, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu mini 1240 (Shimadzu, Japan), serta *Ultra Performance Liquid*

Chromatography (UPLC) dengan metode ionisasi dan detektor massa ESI-QTOF Xevo ToF-1(Waters, USA).

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan yaitu beras coklat varietas pandan wangi dan beras merah pecah kulit varietas cempo merah produksi PT. Kampung Kearifan Indonesia (Jakarta, Indoneisa) yang diperoleh secara komersil. Bahan kimia yang digunakan antara lain larutan natrium hipoklorit 0,07% (Johnson Home Hygiene Products, Indonesia), akuabides pro-injeksi (Ikapharmindo Putramas, Indoneisa), metanol grade p.a. (Merck, Jerman), dan reagen 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA).

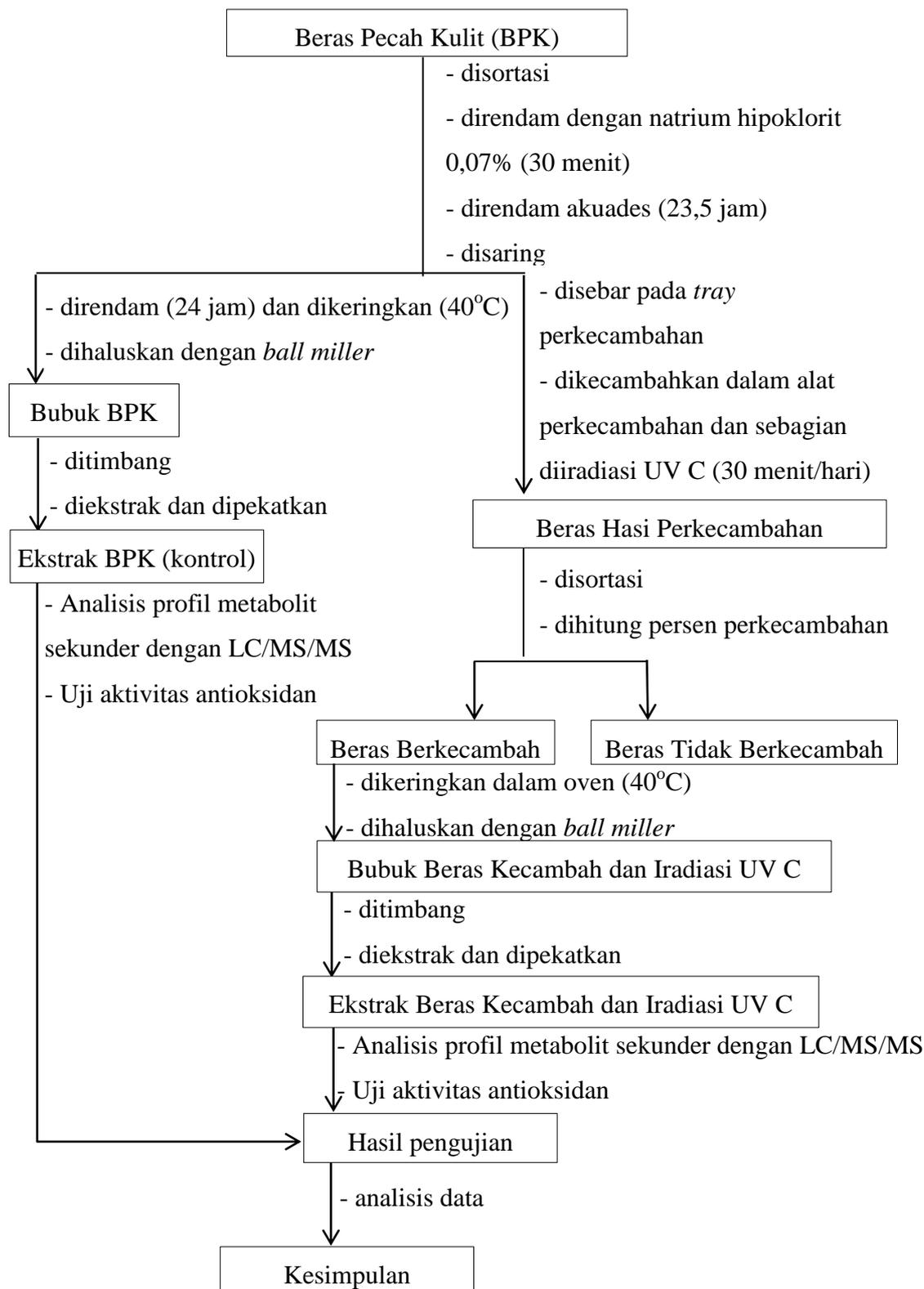
3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap meliputi:

- 1) Tahap pembuatan dan optimasi alat untuk perkecambahan.
Pengaturan alat untuk perkecambahan disesuaikan agar kondisi suhu dan kelembaban optimum untuk terjadinya proses perkecambahan beras.
- 2) Tahap perkecambahan dan iradiasi sampel dengan UV-C.
Perkecambahan beras dilakukan dalam alat perkecambahan, sampel diiradiasi dalam UV-C *box* selama 30 menit setiap hari pada masa perkecambahan.
- 3) Tahap ekstraksi
Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *ultrasonic vibrator*. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*..
- 4) Tahap analisis UPLC-ESI-QTOF.
Identifikasi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan UPLC-MS resolusi tinggi. Data waktu retensi, massa per muatan (m/z) ion induk, dan ion fragmen dibandingkan dengan referensi untuk identifikasi metabolit sekunder.
- 5) Tahap pengujian antioksidan.

Aktivitas antioksidan ekstrak sampel diuji menggunakan metode DPPH, melalui pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Bagan alur penelitian secara umum dapat dilihat pada gambar 3.1 berikut



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Tahap pembuatan dan optimasi alat untuk perkecambahan

Proses perkecambahan beras dilakukan dalam alat perkecambahan (*germinator*) skala laboratorium yang dirancang dan dioptimasi untuk mengakomodasi kebutuhan proses pengecambahan. Faktor yang dikontrol dalam mesin perkecambahan ini adalah kelembaban, suhu, dan intensitas cahaya. Alat yang digunakan dalam pembuatan mesin *germinator* ini adalah boks berwarna hitam, *heating mat* yang dilengkapi dengan thermostat, *mini fan* DC 5V, *humidifier* DC 24V, dan mikro timer.

Mesin perkecambahan dibuat berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa untuk perkecambahan beras, dibutuhkan kelembaban sebesar 99% (Ti et al., 2014). Kontrol kelembaban dilakukan dengan cara mengatur waktu nyala kipas dan *humidifier* pada alat perkecambahan dengan menggunakan mikro timer. Percobaan yang dilakukan yaitu dengan melakukan pengamatan perubahan kelembaban di dalam alat perkecambahan. Untuk kontrol suhu, desain alat dibuat berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa untuk perkecambahan dibutuhkan suhu 25-30°C. Pengaturan suhu dilakukan menggunakan *heating mat* pada bagian dasar alat perkecambahan (Aisyah, Gruppen, Madzora, & Vincken, 2013) dan disambungkan dengan termostat.

3.4.2 Tahap perkecambahan dan iradiasi sampel dengan UV C

Beras yang digunakan adalah jenis beras pecah kulit dari dua varietas berbeda. Beras pecah kulit sebelum digunakan disortasi untuk menghilangkan pengotor serta beras yang patah. Beras yang telah disortasi kemudian disterilisasi berdasarkan metode yang telah dijelaskan sebelumnya oleh Ti et al. dengan sedikit modifikasi, menggunakan larutan natrium hipoklorit 0,07% sehingga tidak ada pengaruh mikroorganisme selama masa perkecambahan. Perendaman beras dengan larutan natrium hipoklorit dilakukan selama 30 menit kemudian dicuci dengan akuades hingga pH netral (Ti et al., 2014), kemudian beras direndam dalam akuades selama 23,5 jam. Selama masa perendaman dengan larutan

natrium hipoklorit dan dengan akuades tersebut, beras dibiarkan pada suhu ruang dan dalam ruang gelap sehingga terhindar dari pengaruh cahaya yang ada di lingkungan sekitar.

Perkecambahan dilakukan selama 2 hari dengan bantuan alat perkecambahan dalam keadaan gelap, sebagian beras dikecambahkan dengan iradiasi sinar UV C 30 menit selama masa perkecambahan. Setelah proses perkecambahan tanpa dan dengan iradiasi sinar UV C selesai, beras yang berkecambah dan tidak berkecambah dipisahkan. Beras berkecambah yang telah dipisahkan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 6 jam hingga kadar air sekitar 10%. Beras berkecambah yang telah kering dihaluskan menggunakan *ball miller* dengan rasio *ball to sample* 20:1. Hasil penggilingan dengan *ball miller* selanjutnya disaring menggunakan mesh berukuran 70 mesh. Bubuk beras kecambah disimpan dalam *freezer* untuk keperluan analisis selanjutnya.

3.4.3 Tahap ekstraksi beras kecambah

Ekstraksi beras dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Moongngarm & Saetung (2010) dengan sedikit modifikasi. Bubuk sampel beras ditimbang sebanyak 200 mg dan diekstraksi dengan pelarut sebanyak total 50 mL untuk masing-masing sampel bubuk beras kecambah. Tahapan ekstraksi yang dilakukan yaitu dengan melarutkan bubuk sampel beras dalam pelarut sebanyak 25 mL, dilakukan ekstraksi menggunakan *ultrasonic vibrator* selama 30 menit (Moongngarm & Saetung, 2010). Pemisahan dilakukan menggunakan metode sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, supernatan yang diperoleh selanjutnya difiltrasi gravitasi menggunakan kertas saring. Residu diekstraksi kembali menggunakan pelarut sebanyak 25 mL dengan tahap yang sama seperti sebelumnya.

Filtrat yang diperoleh sebanyak 50 mL dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*, ekstrak yang didapatkan dimasukkan kedalam labu ukur kemudian diemcerkan kembali menggunakan pelarut metanol 80% hingga volume 10 mL. Ekstrak beras kecambah yang diperoleh dihomogenasi menggunakan

vortex selama 2 menit kemudian disimpan dalam *freezer* untuk keperluan analisis kromatografi dengan UPLC-ESI-QTOF dan uji aktivitas antioksidan.

3.4.4 Tahap analisis profil metabolit sekunder menggunakan UPLC-ESI-QTOF

Ekstrak beras coklat dan merah dengan ketiga perlakuan berbeda masing-masing dianalisis dengan menggunakan instrumen UPLC-ESI-QTOF Xevo ToF-1 yang terdiri dari bagian kromatografi cair (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) yang dihubungkan dengan spektroskopi massa resolusi tinggi dengan teknik ionisasi *Electron Spray Ionization* (ESI) dan penganalisis massa *Quadrupole Time-Of-Flight* (Q-TOF) pada mode positif. Kolom yang digunakan adalah C-18 ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (1.7 μm VanGuard™ Pre-Column 3/Pk (2.1x5 mm). Pelarut yang digunakan adalah pelarut A: Air; pelarut B: Asetonitril, dengan perbandingan 30:70, dengan laju alir 0.200 mL/min. Volume sampel 7.5 μL . Mode operasi untuk spektroskopi massa adalah ESI (+); *capillary voltage*: 3,0 KV; *cone voltage*: 60 V; *low collision energy (CE)* : 6,0 V; *acquisition range*: 100 - 1000 Da.

3.4.5 Tahap uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak sampel diukur menggunakan metode DPPH, melalui pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis. Pembuatan pereaksi DPPH dilakukan dengan cara menimbang DPPH sebanyak 12 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol 100% hingga 30 mL sehingga diperoleh larutan stok DPPH 40 ppm. Kemudian larutan DPPH 40 ppm sebanyak 26,75 mL diencerkan menggunakan metanol hingga volume 100 mL sehingga diperoleh larutan DPPH 10,7 ppm.

Perbandingan volume DPPH dengan volume sampel yang digunakan yaitu berdasarkan metode yang telah dilakukan sebelumnya oleh Lee et al., sampel sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan DPPH 10,7 ppm sebanyak 5 mL, diinkubasi pada suhu ruang dan dalam keadaan gelap selama 10 menit, kemudian dilakukan pengukuran menggunakan UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm

(Lee et al., 2003). Persen aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \left[\frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \right] \times 100$$

(Blois, 1958).

Aktivitas antioksidan beras kecambah yang diiradiasi sinar UV C dibandingkan terhadap aktivitas antioksidan beras tanpa perlakuan dan beras yang dikecambahkan dalam keadaan gelap untuk mengetahui pengaruh iradiasi sinar UV C terhadap beras yang dikecambahkan.