

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai dengan Juli 2017. Adapun pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia (LKOB), dan Laboratorium Kimia Instrumen (LKI) Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI).

#### 3.2. Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, termometer, labu ukur, pipet mikro, tabung sentrifuse, corong buchner, pompa vakum, ayakan ukuran 70 mesh, *tray*, neraca analitik, *heat mat* merk Hyindoor 12 V, *fog generator* 24 V, *thermostat*, *germinator*, *freezer*, *oven*, *water bath*, sonikator, *centrifuge* H-103-n Kokusan, *rotary vacuum evaporator*, dan *high energy milling* HEM-E3D.

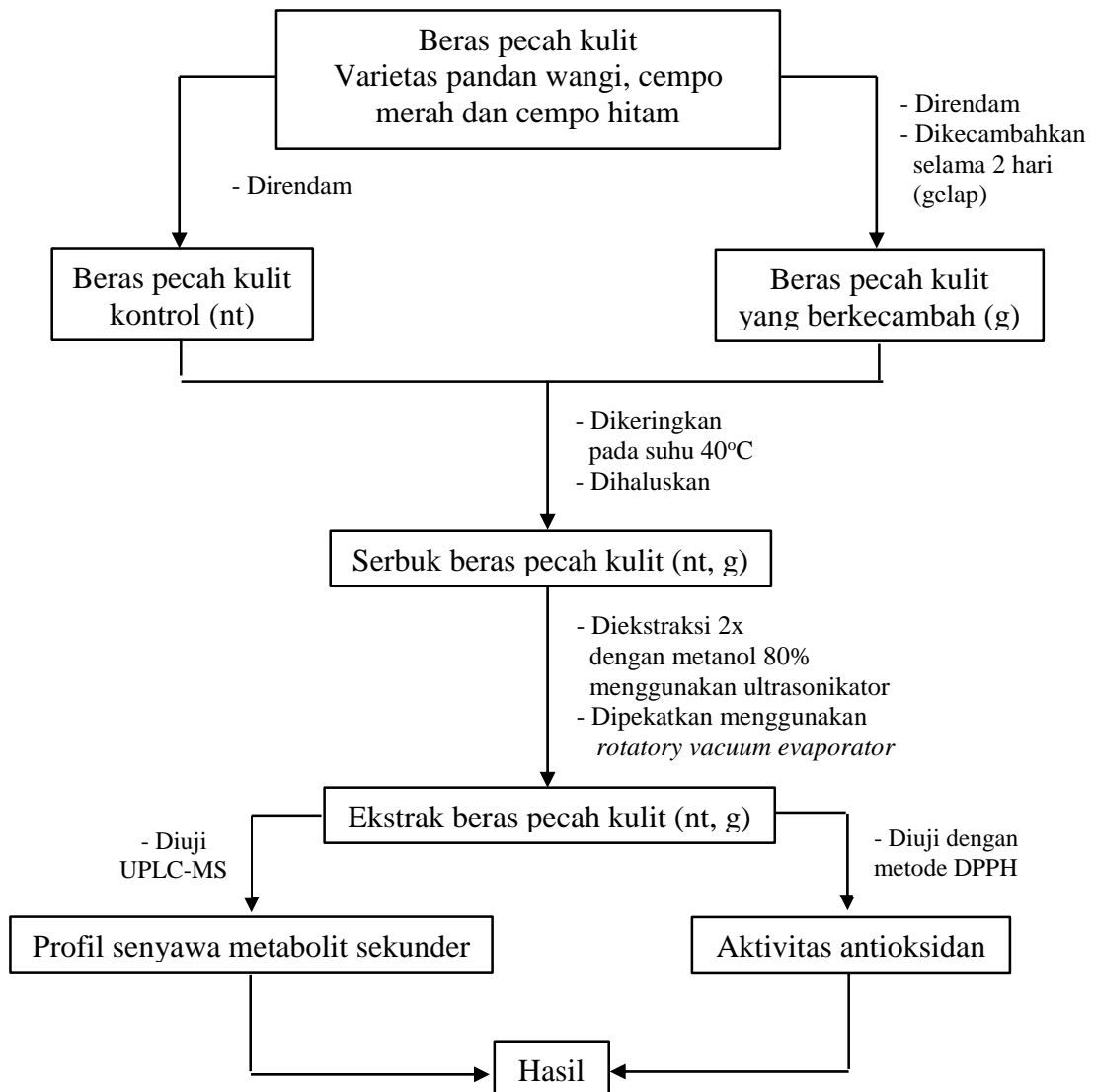
Pada tahap analisis, instrumen yang digunakan adalah UPLC-ESI-QTOF XEVO-QTOFMS untuk mengetahui profil senyawa metabolit sekunder dan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu MiniUV 1240 untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari setiap sampel.

##### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari beras cokelat (Pandan Wangi), beras merah (Cempo Merah) dan beras hitam (Cempo Hitam), diperoleh dari “Javara” yang berlokasi di Jakarta. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah akuades, 0.07% NaOCl, akuabides, metanol 80%, *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH), dan kertas saring Whatman No. 93, diperoleh dari “Sakura Medical Dental Laboratory & Chemical” yang berlokasi di Bandung.

### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap meliputi tahap pembuatan dan optimasi mesin pengecambahan, proses perkecambahan beras, ekstraksi, pengujian kandungan metabolit sekunder, dan pengujian aktivitas antioksidan. Alur metode penelitian untuk proses pengecambahan, ekstraksi, dan analisis, dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3. 1** Alur Metode Penelitian

#### 3.3.1. Pembuatan dan Optimasi Mesin Pengecambahan

Pembuatan alat pengecambahan merujuk metode penelitian Aisyah, Gruppen, Madzora, & Vincken (2013) dengan modifikasi. Mesin pengecambahan

sederhana skala laboratorium dirancang dan dioptimasi untuk memberikan kondisi yang mendukung proses pengecambahan. Mesin terbuat dari box berwarna hitam. Suhu (25-30)°C dikontrol dengan adanya *heating mat* yang dilengkapi dengan *thermostat* dan ditempatkan pada bagian bawah mesin. Uap air yang disemprotkan dibuat dari *fog generator* yang ditempatkan dalam kotak berisi air yang berada di dalam mesin. Kotak berisi air dilengkapi dengan *fan* untuk membuat uap air tersebar secara merata. Optimasi yang dilakukan adalah waktu nyala kipas 10 menit/3 jam dan 5 menit/3 jam serta suhu 30°C dan 26°C.

### 3.3.2. Pengecambahan Beras

Metode pengecambahan beras dilakukan menurut metode Ti et al. (2014); Ekowati dan Purwestri (2016) dengan modifikasi. 40 g beras pecah kulit yang telah disortir direndam dalam 200 ml 0,07% NaOCl selama 30 menit lalu dibilas dengan akuades sebanyak 3x. Kemudian beras pecah kulit direndam dalam 200 ml akuabides, untuk beras cokelat dan beras merah direndam pada suhu ruang selama 23,5 jam sedangkan untuk beras hitam direndam pada suhu 37°C selama 11,5 jam. Beras yang sudah direndam kemudian ditiriskan dan dipisahkan menjadi dua bagian. Bagian pertama digunakan sebagai kontrol sedangkan bagian kedua dilanjutkan untuk kemudian dikecambahkan. Beras yang akan dikecambahkan ditata pada *tray*, terbuat dari box plastik yang dilapisi kain tile. Pengecambahan dilakukan dengan menggunakan mesin sederhana skala laboratorium yang dirancang dan dioptimasi untuk memberikan kondisi yang mendukung proses pengecambahan. Pengecambahan dilakukan selama 2 hari dalam kondisi gelap pada suhu 26°C dan kelembaban 99%. *Fogger* dinyalakan setiap 5 menit/3 jam. Kemudian dipisahkan beras yang berkecambah dan tidak berkecambah untuk dihitung persen pengecambahannya. Beras kontrol dan beras yang telah dikecambahkan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 6 jam (sampai kadar air  $\geq 10\%$ ). Selanjutnya, beras dihancurkan menggunakan *high energy milling* HEM-E3D dengan *ball to powder ratio* (BPR) 20:1 dan *on-off timer* masing-masing 1 menit. Setelah itu, serbuk beras diayak dengan ayakan ukuran 70 mesh dan disimpan dalam *freezer* sebelum diekstraksi lebih lanjut.

### 3.3.3. Ekstraksi Beras

Metode ekstraksi beras dilakukan menurut metode Ti et al. (2014) dengan modifikasi. 0,2 gram tepung beras kecambah diekstraksi dengan 25 ml metanol 80% dengan bantuan ultrasonikator selama 30 menit dan disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Kemudian difiltrasi menggunakan kertas saring Whatman No. 93, residu diekstraksi kembali dengan prosedur yang sama. Kedua supernatan yang diperoleh dicampurkan dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* selama 30 menit. Kemudian ekstrak dilarutkan dengan metanol 80% hingga mencapai volume 10 ml dan disimpan dalam *freezer* sebelum dianalisis lebih lanjut.

### 3.3.4. Analisis Senyawa dengan Menggunakan UPLC-MS

Ekstrak beras dianalisis menggunakan instrumen UPLC-ESI-QTOF XEVO-QTOFMS, 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.

### 3.3.5. Uji Aktivitas Antioksidan

Metode pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menurut S. C. Lee et al. (2003) dengan modifikasi. DPPH ditimbang sebanyak 1,2 gram dan dilarutkan dengan 30 ml metanol p.a sehingga diperoleh larutan DPPH 40 ppm sebagai DPPH induk. Kemudian larutan DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 26,75 ml dan diencerkan hingga volume 100 ml sehingga diperoleh larutan DPPH 10,7 ppm. Masing-masing sampel dipipet sebanyak 1 ml dan direaksikan dengan 5 ml larutan DPPH 10,7 ppm yang kemudian diinkubasi selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis Shimadzu MiniUV pada

panjang gelombang 517 nm. Sebagai pembanding dibuat larutan kontrol dengan mencampurkan 1 ml metanol 80% dan 5 ml larutan DPPH 10,7 ppm dan diinkubasi selama 10 menit. Persen aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

Abs. DPPH kontrol: absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel

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