

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini membahas mengenai waktu dan lokasi penelitian, alat dan bahan, prosedur penelitian, bagan alur penelitian, dan metodologi penelitian yang meliputi pengolahan gabah, proses perkecambahan, ekstraksi, uji antioksidan dan analisis dengan HPLC.

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 5 bulan, yaitu pada bulan Maret sampai dengan bulan Juli dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan optimasi pertumbuhan jamur, perkecambahan sampel, iradiasi sampel menggunakan lampu UV-C, dan ekstraksi sampel.
- 2) Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI untuk melakukan uji sampel dengan alat spektrofotometer UV-Vis dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas (gelas kimia 250 ml, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 50 ml, gelas ukur 100 ml, kaca arloji, pipet, labu ukur 10 ml, corong kaca, batang pengaduk, labu erlenmeyer 100 ml, dan desikator) mikropipet, spatula, kertas saring, tabung *sentrifuge*, neraca analitik Metler Toledo, Yanmar Rice Huller (HW 60 AN, Indonesia), alat perkecambahan berupa *germinator* yang dilengkapi dengan *heating mat* 12 V (Hyindoor), *humidifier* DC 24 V, *mini fan* DC 12V, lampu UV 15 W (Yang), oven, kain tile, *tray* plastik.

Untuk proses ekstraksi dan analisis ekstrak digunakan beberapa alat yaitu *ball miller High Energy Milling-Ellipse 3D Motion* (HEM-E3D) (Nanotech Herbal, Indonesia), *ultrasonic cleaner* (Labocon, UK),

Salma Ghoribatulloh, 2018

PENGARUH pH DAN ZAT ADITIF TERHADAP STABILITAS FIKOSIANIN *Spirulina* sp. DAN APLIKASINYA PADA MODEL MINUMAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

centrifuge (Kokusan H-103n, Japan), *rotary vacuum evaporator* (Buchi R-3, Switzerland), *vortex* SciLogex MX-S, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu mini 1240 (Shimadzu, Japan), serta High Performance Liquid Chromatography (HPLC) seri D-7000 (Hitachi).

Salma Ghoribatulloh, 2018

PENGARUH pH DAN ZAT ADITIF TERHADAP STABILITAS FIKOSIANIN *Spirulina* sp. DAN APLIKASINYA PADA MODEL MINUMAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.2.2. Bahan

Sampel yang digunakan yaitu beras merah pecah kulit varietas Jembar Merah yang diperoleh secara komersil dari Soreang, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan yaitu air mineral, aquades, aquabides pro injeksi (Ikapharmindo Putramas, Indonesia), larutan natrium hipoklorit 0,07% (Johnson Home Hygiene Products, Indonesia), dan methanol grade p.a (Merck, Jerman) dan reagen 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA).

3.3. Prosedur Penelitian

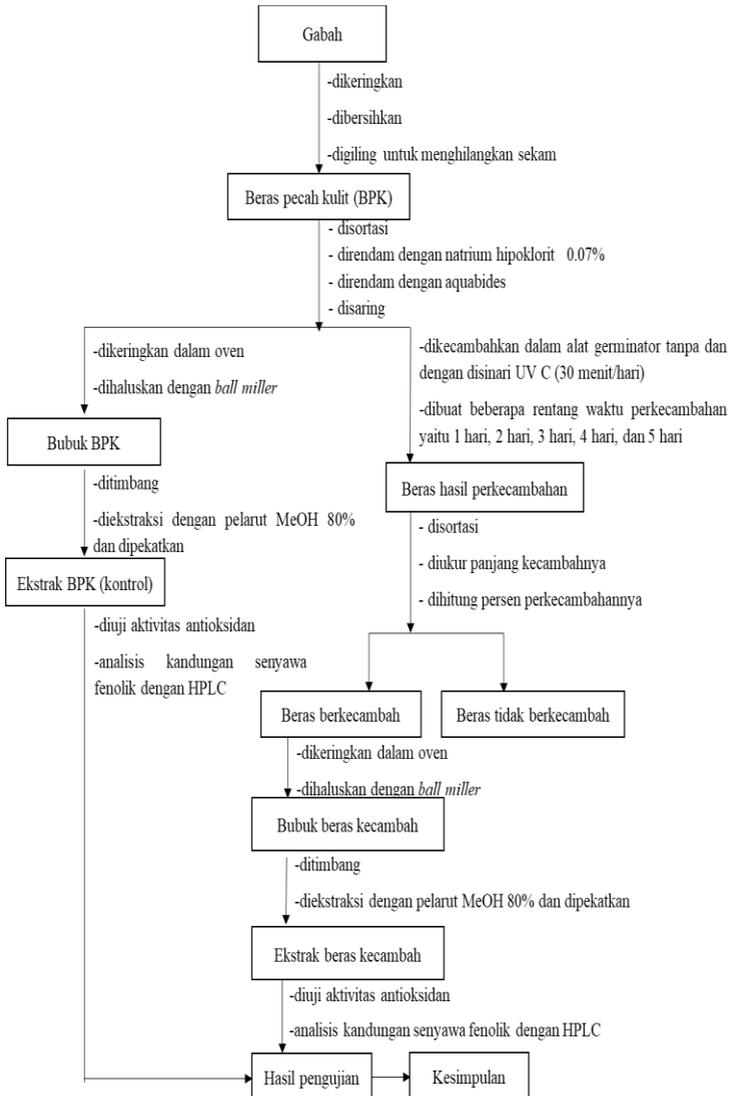
Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yaitu :

1. Tahap pengolahan gabah
Pada proses penggilingan, gabah yang sudah kering dimasukkan ke dalam alat penggilingan yang pertama dan dihasilkan beras pecah kulit kasar. Pada proses penggilingan kedua dihasilkan beras pecah kulit bersih.
2. Tahap perkecambahan dalam keadaan tanpa disinari dan dengan disinari UV C
Perkecambahan dilakukan dalam alat germinator dengan interval waktu 1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari dan 5 hari dengan dua kondisi, yaitu tanpa disinari UV dan dengan disinari lampu UV C setiap harinya selama 30 menit.
3. Tahap ekstraksi
Ekstraksi dilakukan menggunakan alat *ultasonic vibrator* selama 30 menit, lalu ekstrak dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Ekstraksi dilakukan sebanyak dua kali pada satu sampel.
4. Tahap uji antioksidan
Dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada panjang gelombang 517 nm. Sampel diukur dengan alat Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu mini 1240 (Shimadzu, Japan) sehingga diketahui absorbansi dan dapat dihitung persen aktivitas antioksidannya. Dilakukan uji statistika *one way ANOVA* metode *dunnet* untuk mengetahui signifikansi kontrol terhadap sampel yang dikecambahkan dengan dan tanpa iradiasi UV C.

5. Tahap analisis dengan HPLC

Analisis dilakukan dengan menggunakan fasa terbalik dengan fasa diam kolom C-18 . Hal ini bertujuan untuk mengetahui profil senyawa fenolik ekstrak beras kecambah pada panjang gelombang 280 nm.

3.4. Alur Penelitian

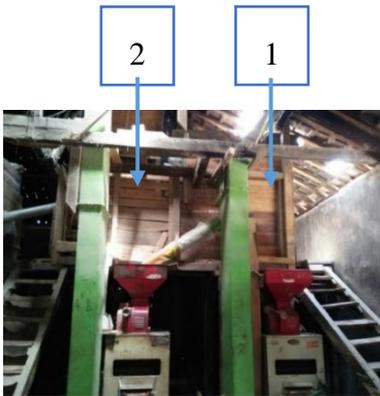


Gambar 3.1. Bagan alur penelitian

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Tahap pengolahan gabah

Pada penelitian ini digunakan beras pecah kulit berwarna merah dengan varietas Jembar Merah yang diperoleh secara komersial dari daerah Soreang, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Benih padi ditanam selama 100 hari lalu disimpan selama 3 minggu dan dikeringkan dengan cara dijemur selama 1 minggu sebelum proses penggilingan. Pada proses penggilingan, gabah yang sudah kering dimasukkan ke dalam alat penggilingan yang pertama. Dari proses ini dihasilkan beras pecah kulit kasar, dimana masih terdapat banyak gabah yang menempel pada bulir padi. Pada proses penggilingan kedua dihasilkan beras pecah kulit bersih, dimana pada proses ini bulir padi sudah bersih dari kulit gabahnya. Pada proses penggilingan ketiga dihasilkan beras yang sudah disosoh atau dihilangkan kulit arinya, sehingga siap untuk lanjut ke proses *packing* (Gambar 3.2)



Gambar 3.2. Pemecah kulit ke-1 dan ke-2 **Gambar 3.3.** Pemecah kulit ketiga

Pada penelitian ini digunakan beras yang diproses sampai pada penggilingan kedua, dikarenakan pada proses ini didapatkan beras pecah kulit yang bersih dari gabah dan kulit arinya belum terkelupas. Dipilih beras pecah kulit karena beras dapat dikecambahkan dalam bentuk beras pecah kulit yang masih memiliki lapisan kulit ari (aleurone dan pericarp) dan embrio (Komatsuzaki *et al*, 2007; Young, *et al*, 2012).

3.5.2. Tahap perkecambahan

3.5.2.1. Alat perkecambahan

Perkecambahan beras dilakukan dalam alat mesin perkecambahan (*germinator*) skala laboratorium yang dibuat dan dioptimasi mengikuti penelitian yang dilakukan oleh Aisyah, *et al.* (2013) dengan modifikasi. Faktor yang dikontrol dalam mesin perkecambahan ini adalah kelembaban, suhu, dan intensitas cahaya. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa untuk proses perkecambahan beras dibutuhkan kelembaban sebesar 99% (Ti *et al.*, 2014). Kontrol kelembaban diatur dengan mengatur waktu nyala *humidifier* dan kipas pada alat perkecambahan dengan mikrotimer. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk perkecambahan diperoleh dengan mengatur *humidifier* dan kipas setiap 3 jam dengan durasi 5 menit (Nurnaistia *et al.*, 2017). *Humidifier* yang terdapat di dalam wadah air akan mengkonversi air menjadi kabut air. Selama *humidifier* menyala, sebuah kipas yang ada di dalam alat bekerja mendistribusikan kabut air ke seluruh area alat perkecambahan. Suhu dalam alat (25-30 °C) dijaga oleh *heat mat* (*Hyindoor* 12 V) disertai termostat yang diletakkan di bawah alat. Sensor termometer dan higrometer dipasang di dalam alat perkecambahan untuk mengetahui suhu dan kelembaban selama waktu perkecambahan. Untuk menjaga sampel dari cahaya digunakan box germinator berwarna hitam agar tidak ada cahaya yang masuk dari luar. Sebelum digunakan, alat perkecambahan disterilisasi dengan menggunakan lampu UV selama 15 menit, disemprotkan alkohol 70 % dan disemprotkan larutan hipoklorit (NaOCl) 0,07% (v/v) ke seluruh bagian alat lalu dibiarkan selama 15 menit.



Gambar 3.4. Skema Alat Germinator

3.5.2.2. Proses perkecambahan

Beras merah pecah kulit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan varietas Jembar Merah. Beras pecah kulit disortasi terlebih dahulu dengan cara memilih beras yang tidak patah dan kulit arinya tidak terkelupas. Proses selanjutnya yaitu sterilisasi berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Ti *et al.*, dengan sedikit modifikasi menggunakan larutan natrium hipoklorit 0,07% untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan. Perendaman dengan larutan natrium hipoklorit 0.07% ini dilakukan selama 30 menit lalu dicuci dengan aquades hingga pH netral (Ti *et al.*, 2014). Setelah itu dilakukan lagi perendaman dengan aquabides selama 23,5 jam. Selama proses perendaman dengan natrium hipoklorit dan aquabides itu beras disimpan di suhu ruang dan di tempat yang gelap agar terhindar dari pengaruh cahaya yang berasal dari lingkungan sekitar.

Dibuat lima sampel berbeda untuk beberapa interval waktu perkecambahan yaitu 1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, dan 5 hari. Beras dikecambahkan di dalam alat *germinator* dengan dua kondisi, yaitu tanpa disinari dan dengan disinari lampu UV C setiap harinya selama 30 menit. Sinar UV C merupakan penyebab stres abiotik yang dapat menginduksi respon pertahanan tanaman adaptif dengan meningkatkan kandungan senyawa fenolik (Urban *et al.*, 2016 ; Wrzaczek 2011). Penelitian sebelumnya juga melaporkan adanya peningkatan kapasitas antioksidan dan kandungan antosianin setelah iradiasi anggur dengan UV C (Pinto *et al.*, 2016). Setiap hari selama masa perkecambahan, beras yang berkecambah dan tidak berkecambah dipisahkan dan dihitung persen perkecambahannya. Beras yang berkecambah dikeringkan dengan menggunakan oven selama 6 jam dengan suhu 40°C hingga kadar air sekitar 10%. Beras berkecambah yang sudah kering digiling dengan menggunakan *ball miller* dengan rasio *ball to sample* 20:1. Beras hasil penggilingan *ball miller* selanjutnya disaring dengan penyaring berukuran 140 mesh. Hasil penyaringan bubuk beras berkecambah disimpan di *freezer* untuk proses analisis selanjutnya.

3.5.3. Tahap ekstraksi

Ekstraksi dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan Moongngarm & Saetung (2010) dengan sedikit modifikasi. Sampel bubuk beras sebanyak 1 gram dicampurkan dengan pelarut metanol 80% sebanyak 25 ml lalu diekstraksi menggunakan *ultrasonic vibrator* selama 30 menit (Moongngarm & Saetung, 2010). Pada penelitian ini digunakan

metanol sebagai pelarut sebab metanol sangat efektif mengekstraksi senyawa fenolik sehingga dihasilkan rendemen dan aktivitas antioksidan yang tinggi pada beras (Chakuton *et al.*, 2012). Dengan penggunaan ultrasonik proses ekstraksi senyawa organik pada tanaman dan biji-bijian dengan menggunakan pelarut organik dapat berlangsung lebih cepat. Dinding sel dari bahan dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah (Mason, 1990). Pemisahan dilakukan menggunakan alat sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, supernatan difiltrasi dengan menggunakan kertas saring. Residu diekstraksi kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 25 ml lalu dilakukan proses yang sama seperti sebelumnya.

Filtrat yang diperoleh sebanyak 50 ml dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak pekat diencerkan kedalam tabung sentrifuse dengan menggunakan pelarut metanol 80% hingga volume 10 ml. Ekstrak dihomogenisasi dengan menggunakan vortex selama 2 menit lalu disimpan di *freezer* untuk analisis lebih lanjut.

3.5.4. Tahap uji antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Metode DPPH merupakan metode yang mudah, cepat dan sensitif untuk pengujian aktivitas antioksidan senyawa tertentu atau ekstrak tanaman (Koleva *et al.*, 2010). Metode ini juga lebih mudah diterapkan karena senyawa radikal yang digunakan bersifat lebih stabil dibandingkan dengan metode lainnya. Prinsip dari metode ini adalah penangkapan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh DPPH. Ketika larutan DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, maka warna ungu larutan akan hilang seiring dengan tereduksinya DPPH. Botol vial dibilas dengan metanol lalu dikeringkan. Botol vial ditutup dengan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya dari lingkungan. Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam botol vial. Lalu ditambahkan larutan DPPH 25 ppm sebanyak 4 ml. Larutan dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit agar sampel dan DPPH bereaksi. Lalu dilakukan pengujian dengan spektrofotometer 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 yang tidak dikembangakan, beras yang dikembangakan tanpa disinari dan dengan disinari UV C dibandingkan untuk mengetahui pengaruh waktu perkecambahan dan iradiasi sinar UV C terhadap aktivitas antioksidan beras merah. Data hasil pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak beras merah kemudian diolah secara statistik menggunakan *one way* ANOVA metode Dunnet untuk mengetahui signifikansinya. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan software SPSS 22.

3.5.5. Tahap analisis dengan HPLC

Ekstrak beras kecambah dianalisis dengan menggunakan HPLC fasa terbalik untuk mengetahui kandungan senyawa fenoliknya. 20 μ L aliquot larutan sampel dipisahkan menggunakan sistem HPLC yang dilengkapi dengan detektor UV dan kolom Phenomenex Luna® 5 μ m C18(2) 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm. Fasa gerak terdiri dari asetonitril (B) dan asam asetat 0,5% dengan kecepatan aliran pelarut 0,8 mL/menit. Elusi gradien dilakukan sebagai berikut : dari 0 sampai 5 menit, gradien linear dari 5-9% pelarut B; dari 5 hingga 15 menit, 9% pelarut B; dari 15 hingga 22 menit, gradien linear dari 9-11% pelarut B; dan dari 22 hingga 35 menit, gradien linear dari 11-18% pelarut B. Suhu kolom ditetapkan pada 30 °C dan senyawa fenolik dideteksi pada panjang gelombang 280 nm.