

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan model penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi panas yaitu sokletasi pada suhu 70°C dan dingin yaitu maserasi pada suhu ruang (20-25°C) terhadap aktivitas antioksidan ekstrak bekatul padi (*Oryza sativa* L.) dengan pelarut etanol 96% menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan metode ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)*) yang ditunjukkan dengan parameter nilai IC<sub>50</sub>.

#### **B. Lokasi Penelitian**

1. Identifikasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi Dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.
2. Ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
3. Skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
4. Uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (*2,2'- azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)*) dilaksanakan di Laboratorium Instrument Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

### **C. Subjek Penelitian**

Pada penelitian ini menggunakan sampel bekatul padi yang diperoleh dari daerah Boyolali. Bekatul padi yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 1 kg.

### **D. Definisi Operasional**

1. Uji fitokimia meliputi alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, steroid dan triterpenoid untuk menentukan kandungan zat aktif yang terdapat pada ekstrak bekatul padi (*Oryza sativa* L.).
2. Metode ekstraksi adalah suatu cara mengisolasi zat atau senyawa dari simplisia menggunakan pelarut khusus, metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi dan sokletasi.
3. Antioksidan yaitu senyawa yang mampu menetralsir radikal bebas yang dapat melindungi sel-sel tubuh.
4. Nilai  $IC_{50}$  adalah nilai yang menggambarkan kemampuan senyawa untuk menangkap radikal bebas sebagai indikator aktivitas antioksidannya.

### **E. Variabel Penelitian**

1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi bekatul padi.

2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan metabolit, uji flavonoid total dan nilai  $IC_{50}$  sebagai parameter aktivitas antioksidan ekstrak bekatul padi.

### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu, waktu dan uji aktivitas antioksidan.

## F. Pengumpulan Data

### 1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *moisture analyzer* (ohaus), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung, pipet tetes, pipet ukur (Pyrex), *beaker glass* (Iwaki Pyrex), timbangan analitik (Excellent), gelas ukur (Iwaki Pyrex), labu ukur (Iwaki Pyrex), toples kaca, batang pengaduk, *aluminium foil*, cawan porselen, spatula, corong, pot, kertas label, *waterbath* (Memmert), *rotary evaporator* (RE 2000E), spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *muffle furnace* (Thermo Scientific), kain flanel.

### 2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bekatul padi yang diperoleh dari daerah Boyolali, aquadest (Farmasetis MKR), etanol 96%, metanol p.a, etanol p.a, HCL 2N (p.a Merck), pereaksi mayer, bouchardat dan dragendorff, FeCl<sub>3</sub> (p.a Merck), HCl pekat (p.a Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p.a Merck), Serbuk Magnesium (Mg) (p.a Merck), ABTS (Sigma Aldrich), CH<sub>3</sub>COOH glasial (p.a Merck), kalium persulfate (p.a Merck), AlCl<sub>3</sub> 2% (p.a Merck) dan kuersetin.

### 3. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro.

#### 4. Pembuatan Ekstrak

##### a. Maserasi

Serbuk bekatul padi 500 gram dimaserasi dengan cara direndam menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10 selama 5 hari dan diremaserasi selama 2 hari (Riskiyani et al., 2020). Selama proses ini diaduk sesekali dengan tujuan untuk meratakan kadar zat aktif pada pelarut yang mampu meningkatkan kecepatan kontak antara pelarut dengan serbuk (Kurniasari et al., 2022). Hasilnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C untuk menguapkan pelarut yang digunakan pada saat proses ekstraksi lalu dikentalkan menggunakan waterbath (Surtina et al., 2020).

Setelah didapatkan hasil ekstrak kental maka ditimbang lalu dihitung rendemen dengan rumus (Syamsul et al., 2020):

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak (gram)}}{\text{Berat Simplisia Akhir (gram)}} \times 100\%$$

##### b. Sokletasi

Ekstraksi menggunakan sokletasi dilakukan dengan cara menimbang bekatul padi terlebih dahulu sebanyak 50 gram lalu bungkus dengan kertas saring dan masukkan pada alat soklet, sokletasi dilakukan sebanyak 25 siklus. Hal ini dilakukan sebanyak 10 kali sehingga sampel yang digunakan adalah 500 gram. Perbandingan serbuk bekatul padi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1:10 (Mahardika & Wartini, 2021). Proses ini dilakukan selama 2,5 – 3,5 jam dengan suhu 70°C. Suhu tersebut merupakan titik didih pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% (Wijaya et al., 2019). Selanjutnya hasil dari soklet diuapkan dengan

*rotary evaporator* untuk pengentalan zat aktif lalu dilanjutkan dengan pengentalan di *waterbath* (Kharisma & Safitri, 2020).

## 5. Uji Standarisasi Non-Spesifik Ekstrak

### a. Uji Kadar Air

Penetapan kadar air ekstrak menggunakan alat *moisture analyzer* dengan cara menimbang 2 gram ekstrak. Kemudian dimasukkan dalam lempeng logam dan ratakan. Setelah 15 menit, hasil kadar air akan tertera pada alat (Hidayati et al., 2018).

### b. Uji Kadar Abu

Sebanyak 2 gram ekstrak dimasukkan pada krus silikat di *muffle furnace*. Proses pemanasan dilakukan pada suhu 600°C selama 3 jam, setelah proses pemanasan selesai, lakukan penimbangan hasil kadar abu (Najib et al., 2018).

## 6. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak

### a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik pada ekstrak bekatul padi meliputi warna, bau dan bentuk konsistensi ekstrak (Octavia et al., 2023).

### b. Skrining Fitokimia Ekstrak Bekatul Padi

#### 1. Alkaloid

Ekstrak 0,5 g ditambah HCl 2 N 1 mL dan air suling 9 mL, dipanaskan pada *waterbath* selama 2 menit. Setelah itu, biarkan hingga campuran dingin dan saring (Rahman et al., 2023). Sebanyak 3 tabung reaksi dimasukkan 0,5 mL filtrat, ditambah pereaksi Mayer, Dragendoff dan Bouchardat. Jika setelah ditambahkan pereaksi

mayer menghasilkan endapan putih, maka positif alkaloid, penambahan pereaksi dragendroff dikatakan positif alkaloid jika terbentuk endapan jingga dan penambahan pereaksi bouchardat dikatakan positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan berwarna coklat sampai hitam (Sari, 2022). Ekstrak positif alkaloid jika 2 dari 3 pereaksi tersebut positif (Rahman et al., 2023).

## 2. Flavonoid

Ekstrak 0,5 g dicampurkan dengan etanol 5 mL kemudian dipanaskan selama  $\pm 5$  menit lalu tambahkan 10 tetes HCl pekat dan serbuk magnesium sebanyak 0,2 gram. Ekstrak positif mengandung flavonoid jika berwarna kuning (Sulistyarini et al., 2021).

## 3. Tannin

Sebanyak 0,5 g ekstrak dicampurkan air panas 10 mL, ditetesi 1-2 pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika terbentuk warna hijau kehitaman ekstrak positif mengandung tanin (Sulistyarini et al., 2021).

## 4. Saponin

Ekstrak 0,5 g dimasukkan dalam tabung reaksi dan tambahkan 10 mL air panas, dinginkan lalu kocok dengan kuat selama 10 menit. Jika buih terbentuk setinggi 1 cm sampai 10 cm dan ketika penambahan 1 tetes HCl 2N maka ekstrak menunjukkan adanya kandungan saponin (Rahman et al., 2023).

## 5. Steroid/Terpenoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 10 tetes  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Jika larutan berubah menjadi warna merah atau ungu maka positif mengandung triterpenoid dan berubah menjadi warna biru atau hijau jika positif mengandung steroid (Rante et al., 2020).

### c. Uji Kuantitatif Flavonoid Total

#### 1. Pembuatan larutan induk kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin dilakukan penimbangan, lalu dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga tercapai konsentrasi 100 ppm.

#### 2. Pembuatan larutan baku kuersetin

Sebanyak 2,5 mL, 5 mL dan 7,5 mL dan 10 mL larutan induk kuersetin dipipet lalu ditambah dengan etanol p.a pada labu ukur 10 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan baku kuersetin berturut-turut 25, 50,75 dan 100 ppm.

#### 3. Pembuatan reagen $\text{AlCl}_3$ 2% dan $\text{CH}_3\text{COOH}$ 5%

Larutan  $\text{AlCl}_3$  2% dibuat dengan memipet 0,2 mL larutan  $\text{AlCl}_3$  2% lalu ad hingga 10 mL dengan aquadest. Pembuatan larutan asam asetat 5% dilakukan dengan memipet 0,5 mL larutan asam asetat 5% lalu ad hingga 10 mL dengan aquadest.

#### 4. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum ( $\lambda$ maks)

Sebanyak 1 mL Larutan baku kuersetin 100 ppm ditambahkan dengan  $\text{AlCl}_3$  2% 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL.

dibaca pada panjang gelombang 370-450 nm dengan spektrofotometri UV-Vis. Hasil pembacaan digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak bekatul padi. Hasil penelitian sebelumnya diperoleh panjang gelombang maksimum yaitu 413,5 nm.

5. Penentuan *operating time* (OT)

Sebanyak 1 mL larutan baku kuersetin ditambah dengan  $\text{AlCl}_3$  2% 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 413,5 nm setelah waktu operasional pada menit ke-30 yang didasarkan pada penelitian sebelumnya (Primasari et al., 2022).

6. Penentuan kurva baku kuersetin

Konsentrasi yang sudah dibuat masing-masing diambil sebanyak 1 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi. Lalu tambahkan  $\text{AlCl}_3$  2% 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL. Biarkan selama 19 menit  $\text{AlCl}_3$  2% dan asam asetat 5%. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang yang telah diperoleh yaitu 413,5 nm.

7. Penentuan kadar flavonoid total

Ekstrak ditimbang secara seksama lebih kurang 0,8 gram lalu masukkan pada erlenmeyer lalu tambahkan etanol 96% 25 mL. Ambil 1 mL campuran yang sudah dibuat lalu tambahkan  $\text{AlCl}_3$  2% 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL dan diamkan 19 menitan pada suhu ruang sesuai waktu operasional. Kemudian ukur pada panjang gelombang serapan maksimum.

Sebanyak 1 mL  $\text{AlCl}_3$  2% dan asam asetat 5% 8 mL, lalu campur hingga homogen untuk membuat larutan blanko Pengukuran blanko dilakukan dengan cara yang sama (Anasthasia Pujiastuti et al., 2022).

Penentuan nilai flavonoid total dihitung berdasarkan rumus (Utomo et al., 2020) :

$$\text{Flavonoid total QE} = c (V/m)$$

Keterangan :

QE = Kuersetin equivalen

c = Konsentrasi sampel

v = Volume ekstrak bekatul padi

m = Berat ekstrak

## 7. Uji Aktivitas Antioksidan

### 1. Pembuatan Larutan ABTS

Sebanyak 38,5 mg ABTS dilarutkan dalam aqua deionisasi sebanyak 10 mL pada labu ukur, kalium persulfate 6,6 mg dilarutkan dalam 10 mL aqua deionisasi. Larutan ABTS dan  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  dicampur pada ruangan gelap suhu 22-24°C dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga 25 mL, kemudian diinkubasi selama 12-16 jam.

### 2. Pembuatan larutan induk kuersetin 1000 ppm

Standar kuersetin ditimbang secara seksama sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a sampai 10 mL dalam labu ukur.

3. Pembuatan larutan pengenceran 100 ppm

Sebanyak 1 mL larutan induk diencerkan dengan etanol p.a sampai 10 mL dalam labu ukur.

4. Pengukuran panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  maks)

Larutan ABTS 300 ppm dipipet sebanyak 0,1 mL dalam labu ukur, kemudian di cukupkan volumenya. Larutan dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 700-750 nm hingga diperoleh panjang gelombang 751 nm yang didasarkan pada penelitian sebelumnya (Alim et al., 2023).

5. Penentuan *operating time*

Larutan ABTS 300 ppm dipipet sebanyak 0,1 mL lalu dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan etanol p.a. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang 751,4 nm hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Hasil *operating time* pada penelitian sebelumnya yaitu pada menit ke-24 (Siska et al., 2022).

6. Pengukuran aktivitas antioksidan standar kuersetin

Larutan pengenceran 100 ppm dipipet masing-masing sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL dan 0,5 mL lalu ditambahkan etanol p.a pada labu ukur 5 mL, maka akan didapatkan seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Selanjutnya masing-masing konsentrasi dipipet 0,2 mL, ditambahkan dengan 0,2 mL larutan radikal ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan etanol p.a. Larutan didiamkan selama proses *operating time* dan lakukan

pengukuran masing-masing konsentrasi dengan 3 replikasi pada panjang gelombang yang telah didapatkan yaitu 751,4 nm.

7. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% bekatul padi secara ABTS

Ekstrak etanol 96% dibuat larutan baku induk sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dengan 10 mL etanol p.a dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Larutan induk dipipet masing-masing sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL dan 1,5 mL pada labu ukur 5 mL sehingga akan mendapatkan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm. Masing-masing konsentrasi di pipet 0,2 mL lalu tambahkan dengan larutan ABTS sebanyak 0,2 mL pada labu ukur 5 mL lalu dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan didiamkan selama *operating time* dan diukur serapan masing-masing konsentrasi dengan 3 replikasi pada panjang gelombang maksimum ABTS (Tangkau et al., 2023).

## G. Pengolahan Data

Hasil penelitian diolah menggunakan bentuk tabel serta grafik. Analisis data dilakukan dengan *Microsoft excel* untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  dan analisis statistik menggunakan uji *shapiro wilk* pada normalitas dan uji *levne* pada homogenitas terlebih dahulu. Jika data yang diperoleh normal dan homogen, selanjutnya pengujian dengan aplikasi SPSS yaitu uji One Way Anova dan lanjutkan dengan uji LSD.

## H. Analisis Data

### 1. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Hasil uji ekstrak bekatul padi secara ABTS dilakukan dengan perhitungan % inhibisi dengan rumus :

$$\%Inhibisi = \frac{Absorbansi\ blanko - Absorbansi\ sampel}{Absorbansi\ blanko} \times 100\%$$

Keterangan :

A blanko : Absorbansi yang tidak mengandung sampel

A sampel : Absorbansi yang mengandung sampel

Tahap selanjutnya, pembuatan kurva berdasarkan nilai persentase penghambatan yang diperoleh terhadap konsentrasi larutan uji. Dari kurva dibuat persamaan regresi linear untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> dengan rumus

:

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = 50

x = menunjukkan nilai IC<sub>50</sub>

a dan b = nilai regresi linier

Untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub> menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

Keterangan :

a = Titik potong kurva pada sumbu y (intersep)

b = Kemiringan kurva (slope)

### 2. Analisis Data Hasil Perbandingan Ekstraksi Metode Panas dan Dingin

Hasil perbandingan metode ekstraksi metode panas dan dingin dianalisa statistika dengan aplikasi SPSS yaitu dilakukan uji *shapiro wilk* pada normalitas dan uji *levne* pada homogenitas terlebih dahulu. Jika data

normal serta homogen, diuji dengan aplikasi SPSS menggunakan uji independent *t-test*.