

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini masuk ke dalam jenis penelitian *eksperimental murni* dengan tujuan menentukan pengaruh perbedaan metode ekstraksi panas dan dingin terhadap efektivitas antioksidan. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi kandungan yang terdapat pada ekstrak bekatul beras putih (*Oriza sativa* L.) adalah maserasi dan sokletasi dengan menggunakan pelarut etil asetat, sedangkan pengukuran antioksidan untuk menentukan nilai IC_{50} menggunakan metode ABTS (2,2- *azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid*) dengan pembanding kuersetin. Penelitian ini dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi bekatul beras putih (*Oryza sativa* L.) dikerjakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Fakultas Sains dan Matematika Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak bekatul bekatul beras putih (*Oryza sativa* L.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pengujian metabolit sekunder dan flavonoid total bekatul beras putih (*Oryza sativa* L.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo

4. Pengujian aktivitas antioksidan bekatul bekatul beras putih (*Oryza sativa L.*) dilakukan di Laboratorium Instrumen Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Bekatul beras putih (*Oryza sativa L.*) diperoleh dari daerah Boyolali, Jawa Tengah dengan jumlah yang digunakan sebanyak 1 kg.

D. Definisi Operasional

1. Simplisia Bekatul Beras Putih

Simplisia bekatul beras putih diperoleh dari Boyolali, Jawa Tengah dan dilakukan pengeringan dengan matahari tidak langsung.

2. Ekstraksi bekatul beras putih dilakukan dengan dua metode yaitu metode panas sokletasi dan dingin maserasi menggunakan pelarut etil asetat.

3. Ekstrak Bekatul Beras Putih

Ekstrak Bekatul beras putih selanjutnya dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator*.

4. Pengujian antioksidan dilakukan dengan metode ABTS ABTS (2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada parameter IC₅₀.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel yang terdapat hipotesis penelitian serta berpengaruh pada variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian yaitu metode ekstraksi metode panas dingin menggunakan maserasi dan sokletasi.

2. Variabel Tergantung

Variabel Tergantung merupakan variabel yang ada dalam hipotesis penelitian serta dipengaruhi adanya variabel lain. Pada penelitian ini kandungan metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak bekatul beras putih dan parameter IC_{50} ekstrak menggunakan metode ABTS dengan pembanding kuersetin adalah variabel tergantungnya.

3. Variabel Terkendali

Waktu, cahaya, suhu, reagen, ABTS dan absorbansi panjang gelombang adalah variabel terkendali.

F. Instrumen Penelitian

Alat yang dipakai pada penelitian ini diantaranya *beaker glass*, rak dan tabung reaksi batang pengaduk, serta timbangan analitik (Mettler Toledo 2.0.0), gelas ukur, kertas saring, corong kaca, erlenmeyer, waterbath (Faithful/DK-98-IIA), *rotary evaporator* (RE 2000E), *muffle furnace* (*thermo scientific*) labu takar, pipet ukur, moisture analyzer (Ohaus MB90), spatula, kuvet, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900I).

Bahan-bahan yang dipakai untuk penelitian adalah bekatul beras putih yang didapatkan dari Boyolali, Jawa Tengah. Bahan kimia yang akan

digunakan yaitu etil asetat, pereaksi mayer, dragendorf, bouchardat, FeCl₃, K₂S₂O₈, magnesium, H₂SO₄ HCl, etanol p.a, asam asetat, kuersetin, akuadest, ABTS.

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Bekatul Beras Putih (*Oryza sativa L.*)

a. Persiapan Bekatul Beras Putih (*Oryza sativa L.*)

Bekatul beras putih (*Oryza sativa L.*) sebelumnya dilakukan sortasi untuk memisahkan bekatul dan kotoran serta partikel asing yang terikut. Bekatul dicuci dan dikeringkan menggunakan cahaya matahari tidak langsung kemudian dilakukan pengecekan kandungan air dan dihaluskan dengan menggunakan blender, selanjutnya diayak menggunakan ayakan nomor 40 dan serbuk bekatul halus dapat digunakan untuk ekstraksi.

b. Pembuatan Ekstrak Bekatul Beras Putih (*Oryza sativa L.*)

a. Metode Sokletasi

500 g bekatul dimasukkan ke dalam kertas saring dan dibungkus sebanyak 10 buah, kemudian bekatul yang telah dibungkus diletakkan pada *Soxhlet extractor* lalu di ekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1:10 sebanyak 5000 mL dengan 10 kali siklus (Hibrah *et al.*, 2022). Ekstraksi dengan suhu 77°C dilakukan sesuai dengan titik didih etil asetat (Pranata dan Marcellia, 2021).

b. Metode Maserasi

500 g bekatul dimasukkan ke wadah maserasi lalu ditambahkan dengan etil asetat perbandingan 1:10 sebanyak 5000 mL (Sari *et al.*, 2021). Biarkan 5 hari dan terlindungi dari paparan sinar matahari langsung kemudian diperas untuk memisahkan pelarut dan menghasilkan maserat (Islamiyati *et al.*, 2024). Pemekatan dilakukan memakai alat *rotary evaporator* 50°C untuk mendapatkan ekstrak kental (Faham *et al.*, 2019). Remaserasi dilakukan pada ekstrak dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 5000 mL selama 2 hari (Hasibuan dan Edrianto, 2021).

2. Standarisasi Spesifik Ekstrak

a. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan pemeriksaan warna, aroma dan bentuk untuk mengetahui kondisi fisik ekstrak (Fitria dan Ratu, 2022).

b. Uji Flavonoid

0,5 g ekstrak dilakukan penimbangan kemudian dilarutkan dalam 5 mL akuadest, selanjutnya panaskan 5 menit kemudian tambahkan 0,1 g serbuk Magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl) pekat 1-2 tetes selanjutnya dikocok. Hasil dapat diketahui dengan

berubahnya warna menjadi kuning, jingga atau merah (Dewi, Saptawati dan Rachma, 2021).

c. Uji Alkaloid

0,5 g ekstrak tambahkan HCl 1 mL serta akuadest 9 mL lalu panaskan 5 menit. Larutan dibuat menjadi 3 bagian, tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua 3 tetes pereaksi Dragendorff dan tabung ketiga 3 tetes pereaksi Bouchardat. Alkaloid ditandai dengan adanya endapan, pereaksi mayer menunjukkan hasil positif apabila terbentuk endapan putih, pereaksi dragendorff akan memberikan hasil positif apabila terbentuk endapan berwarna jingga, sedangkan pereaksi bouchardat akan positif apabila terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam (Dewi, Saptawati dan Rachma, 2021).

d. Uji Tanin

0,5 g ekstrak ditimbang lalu masukkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan FeCl_3 10%. Ekstrak mengandung senyawa yang ditunjukkan oleh perubahan warna menjadi hijau dan biru kehitaman serta terbentuknya endapan (Mourena dan Komala, 2021).

e. Uji Saponin

0,5 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan pada tabung reaksi, digojok vertikal dalam kurun waktu 10 detik, saponin positif ditandai adanya busa dengan tinggi 1-10 cm yang stabil selama 15

menit serta tidak menghilang apabila ditambahkan 1 tetes HCl 2 N (Yasser *et al.*, 2022).

f. Uji Steroid dan Triterpenoid

0,5 g ekstrak masukkan pada tabung reaksi setelahnya tambahkan beberapa tetes asam asetat glasial lalu tambahkan dengan H₂SO₄ 2-3 tetes. Hasil triterpenoid terbentuk jika warna berubah kecoklatan maupun violet dan steroid jika terbentuk warna biru kehijauan (Khafid *et al.*, 2023).

g. Uji Flavonoid Total

1. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Timbang 10 mg kuersetin setelah itu masukkan pada labu ukur 100 mL dan ad etanol p.a hingga tanda batas dan diperoleh konsentrasi 100 ppm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

2. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Induk kuersetin konsentrasi 100 ppm kemudian dibuat menjadi larutan baku kuersetin. Larutan induk kuersetin masing-masing 2,5 mL, 5 mL, dan 7,5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga 10 mL pada masing-masing larutan. Seri pengenceran larutan baku kuersetin 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

3. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Larutan baku kuersetin 100 ppm diambil 1 mL setelahnya tambahkan 1 mL AlCl₃ 2% dan 8 mL asam asetat 5%.

Pembacaan dilakukan menggunakan spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 410,5 nm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

4. Penentuan *Operating Time*

Larutan baku kuersetin 100 ppm dengan banyak 1 mL diambil dan tambahkan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5%. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum 410,5 nm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

5. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

Larutan baku kuersetin 25, 50, 75 dan 100 ppm sebanyak 1 mL tiap konsentrasi diambil lalu dimasukkan pada tabung reaksi. Kemudian tambahkan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5% lalu diamkan selama menit ke 40 hingga 45. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 410,5 nm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

6. Penentuan Kadar Flavonoid Total

0,8 gram ekstrak ditimbang kemudian dicukupkan dengan pelarut hingga 25 mL. 1 mL larutan ekstrak dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 2% dan 8 mL asam asetat 5%. Tiap campuran dikocok dan diamkan dengan suhu ruang sesuai dengan *operating time*. Setiap larutan diukur absorbansinya dalam panjang gelombang maksimum. Larutan blangko dapat dibuat dengan menggabungkan 1 mL AlCl_3 2%

dan 8 mL asam asetat 5% digojok sampai homogen (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

3. Standarisasi Non Spesifik Ekstrak

a. Uji Kadar Air

Sebanyak 2 g simplisia dan ekstrak ditimbang dan masukkan ke alat *moisture analyzer* dengan suhu kurang lebih 105 °C selama 10 menit (Nielse, 2017).

b. Uji Kadar Abu

Sebanyak 2 g simplisia dan ekstrak ditimbang lalu masukkan dalam kurs yang sudah ditimbang dan dipijarkan menggunakan oven dengan suhu 500 °C. Simplisia dan ekstrak didinginkan dalam desikator dan timbang berat abu (Fikayuniar *et al.*, 2023).

4. Pengujian Aktivitas Antioksidan

1. Pembuatan Larutan ABTS

ABTS 19 mg ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL akuadest. Penimbangan $K_2S_2O_8$ 3,2 mg dan dilarutkan pada 5 mL akuadest. Larutan ABTS dan $K_2S_2O_8$ dicampur dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga volumenya menjadi 25mL. larutan yang sudah tercampur diinkubasi selama 12 sampai 16 jam dalam ruangan gelap (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan ABTS dipipet 0,5 mL dan dicukupkan volumenya hingga 2,5 mL dengan etanol p.a selanjutnya dibaca dengan

spektrofotometri pada panjang gelombang 751,40 nm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

3. Penentuan *Operating Time*

Larutan ABTS dipipet sebanyak 0,5 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a 2,5 mL lalu absorbansinya dibaca pada menit ke 1 hingga menit ke 30 dan didapatkan absorbansi yang stabil yaitu pada menit ke 25 hingga menit ke 30 (Pujiastuti, Resti dan Sunnah, 2022).

4. Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Kuersetin

Penimbangan 1,25 mg kuersetin dan dilarutkan 12,5 mL etanol p.a sampai dihasilkan larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Pengenceran larutan menjadi konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm dengan memipet masing masing 0,05 mL, 0,1 mL, 0,15 mL, 0,2 mL dan 0,25 mL. Larutan dalam labu ukur 5 mL dan cukupkan menggunakan etanol p.a hingga tanda batas. 0,5 mL larutan kuersetin pada tiap konsentrasinya ditambahkan 1,5 mL larutan ABTS dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga 2,5 mL. Larutan yang sudah jadi didiamkan selama waktu *operating time* dan absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 751,40 nm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

5. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bekatul Maserasi dan Sokletasi

Penimbangan ekstrak bekatul sebanyak 5 mg dan cukupkan dengan etanol p.a sebanyak 5 mL hingga didapatkan larutan stok 1000 ppm dan seri konsentrasi 60, 70, 80, 90 dan 100 ppm dibuat. Pembuatan setiap larutan dilakukan dengan memipet 0,3 mL, 0,35 mL, 0,4 mL, 0,45 mL dan 0,5 mL dan masukkan pada labu ukur kemudian dicukupkan dengan etanol p.a sebanyak 5 mL. Masing-masing larutan dengan konsentrasi yang berbeda diambil 0,5 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL ABTS dan volumenya dicukupkan sampai 2,5 mL dengan etanol p.a. Seri larutan tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 751,40 nm (Pujiastuti, Erwiyani dan Sunnah, 2022).

H. Analisis Data

1. Rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

2. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibisi concentration* atau IC_{50} dimana konsentrasi sampel dapat meredam radikal ABTS. Semakin rendah nilai IC_{50} semakin kuat aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Rumus % inhibisi yaitu:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs kontrol : Absorbansi kontrol tanpa sampel

Abs sampel : Absorbansi setelah penambahan sampel

Setelah didapatkan presentase inhibisi dari setiap konsentrasi kemudian dilakukan perhitungan regresi linier (x,y). Nilai IC₅₀ didapatkan dengan menggunakan regresi linier dimana x adalah konsentrasi (µg/ml) dan y yaitu persentase aktivitas (%). Nilai IC₅₀ didapatkan dengan rumus:

$$Y = Bx + A$$

3. Analisis Data Secara Statistik

Data dianalisis secara statistika dengan SPSS. Analisis normalitas dan homogenitas dilakukan. Pengujian normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro wilk* dimana data terdistribusi normal jikalau nilai signifikan yang diperoleh >0,05 dan sebaliknya jika data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal maka nilai signifikansinya <0,05 (Ismail, 2022). Pengujian homogenitas menggunakan uji *Levene's test* dan uji parametrik ANOVA satu arah. Jika nilai signifikan yang didapatkan >0,05 maka tidak terdapat perbedaan, sebaliknya apabila nilai signifikan didapatkan <0,05 maka dalam data tersebut terdapat perbedaan sehingga dapat dilakukan dengan pengujian LSD (Devita, Si and Si, 2021).