

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian diawali dengan ekstraksi bekatul padi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode sokletasi pada suhu 70°C dan metode maserasi pada suhu 20-25°C untuk memperoleh ekstrak dari bekatul padi (*Oryza sativa* L.). Dilakukan pengujian secara kualitatif pada ekstrak dengan melakukan skrining fitokimia untuk menganalisis kandungan metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid berdasarkan prinsip reaksi warna.

Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan menganalisis total flavonoid yang terkandung pada ekstrak bekatul padi (*Oryza sativa* L.) serta dilakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak bekatul dengan metode ABTS menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan kuersetin sebagai pembanding. Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak bekatul padi dengan metode ABTS didasarkan pada parameter nilai  $IC_{50}$ .

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

1. Identifikasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro Semarang.

2. Proses Ekstraksi dan skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)*) dilaksanakan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

### C. Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini sampel bekatul padi yang digunakan berasal dari daerah Boyolali. Bekatul padi yang digunakan pada penelitian sebanyak 1 kg.

### D. Definisi Operasional

**Tabel 3. 1 Tabel Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Alat Ukur
1	Skrining Fitokimia	Metode untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, steroid/ triterpenoid yang terdapat pada ekstrak bekatul padi ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Perubahan warna atau terbentuknya endapan yang menunjukkan keberadaan senyawa fitokimia yang di analisis	Pereaksi Warna
2.	Metode Ekstraksi	Metode pemisahan zat atau senyawa dari simplisia dilakukan menggunakan teknik maserasi dan sokletasi dengan etanol 70% sebagai pelarut	Waktu ekstraksi, jenis pelarut, dan hasil ekstrak yang diperoleh	Seperangkat alat maserasi, seperangkat alat sokletasi, timbangan analitik
3.	Antioksidan	Senyawa yang mampu	Aktivitas penangkapan	Spektrofotometri UV-Vis

		memperbaiki dan mencegah kerusakan sel yang diakibatkan oleh radikal bebas	radikal bebas yang diuji menggunakan metode ABTS, nilai IC50	
4.	Nilai $IC_{50}$	Nilai yang menggambarkan kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal bebas dan menghambat oksidasi sebagai nilai aktivitas antioksidan.	Persentase inhibisi radikal bebas, konsentrasi senyawa/ekstrak yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas dalam uji antioksidan, nilai absorbansi, kurva regresi linier	Perhitungan regresi linear berdasarkan data absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis

## E. Variabel Penelitian

### 1. Variabel Independen (Bebas)

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi metode ekstraksi sokletasi dan maserasi bekatul padi.

### 2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kandungan metabolit sekunder 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**

Dalam penelitian ini, menggunakan alat *moisture analyzer* (Ohaus MB90), tabung reaksi (Iwaki), kain flannel, pipet ukur (Iwaki), *beaker glass* (Iwaki, Herma), labu takar (Iwaki, Pyrex), timbangan analitik (Mettler Toledo 2.0.0), toples kaca, tabung reaksi (Iwaki), benang, kertas saring, gelas ukur (Iwaki), batang pengaduk, pipet tetes, *aluminium foil*, cawan porselen, spatula, corong kaca, pot salep, kertas label, *waterbath* (Faithful/DK-98-IIA), *rotary evaporator* (RE 2000E), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900I), *muffle furnace* (Thermo Scientific), *Erlenmayer* (Iwaki), kuvet, spatula.

### **2. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu bekatul padi yang diperoleh dari daerah Boyolali, etanol 70% (Technical Grade), serbuk Magnesium (p.a Merck), HCl pekat (p.a Merck), HCl 2N (p.a Merck), pereaksi mayer, pereaksi dragendroff, pereaksi boucardat, CH<sub>3</sub>COOH glacial (p.a Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p.a Merck), FeCl<sub>3</sub> (p.a Merck), bubuk kuersetin, etanol p.a, AlCl<sub>3</sub> 2% (p.a Merck), asam asetat 5%, kalium persulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (p.a Merck), serbuk ABTS (Sigma Aldrich), aquadest (Farmasetis MKR).

### **3. Determinasi Tanaman**

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

#### 4. Pembuatan Ekstrak Bekatul

##### a. Metode Maserasi

Sebanyak 500 gram bekatul dimaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 20 dimana pelarut yang digunakan untuk maserasi sebanyak 5000 mL dan remaserasi sebanyak 5000 mL, sehingga total pelarut yang digunakan sebanyak 10.000 mL (Azzhar *et al.*, 2023). Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan pengadukan 6 jam sekali selama 5 menit. Campuran disimpan dalam toples tertutup dan terlindung dari cahaya pada suhu ruang (20-25°C) (Anggreni *et al.*, 2019). Setelah 5 hari, penyarian dilakukan menggunakan kain flanel untuk memisahkan cairan dari residu (Muthmainnah, 2017). Dilakukan proses remaserasi pada suhu kamar selama 2 hari lalu di saring dan filtrat diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan dikentalkan pada *waterbath* sampai diperoleh ekstrak dengan kandungan pelarut yang rendah (Muthmainnah, 2017).

Ekstrak yang sudah kental kemudian dihitung persentase rendemennya menggunakan persamaan :

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

##### b. Metode Sokletasi

Ditimbang 500 gram serbuk bekatul padi (*Oryza sativa* L.). Bekatul padi yang telah ditimbang dibagi masing-masing 50 gram serbuk bekatul kemudian dibungkus di dalam kertas saring yang dibentuk silinder dan diikat di kedua sisinya, sehingga dihasilkan 10 bungkus serbuk bekatul. Dimasukkan 1 bungkus bekatul ke dalam

soklet untuk satu kali proses sokletasi dan di ekstraksi hingga pelarut yang merendam bekatul menjadi tidak berwarna. Dalam sekali proses sokletasi, diperlukan waktu  $\pm 2,5$  jam dengan siklus penyarian sebanyak 23 siklus. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% dengan perbandingan pelarut 1 : 1, dimana untuk mengekstraksi 50 gram bekatul digunakan pelarut sebanyak 500 mL sehingga untuk mengekstraksi 500 gram bekatul digunakan pelarut sebanyak 5000 mL (Andini *et al.*, 2023). Ekstraksi dilakukan sesuai dengan titik didih etanol 70% agar dapat menarik seluruh komponen yang terkandung dalam bekatul padi yaitu pada suhu 70°C (E. Pujiastuti & Zeba, 2021). Hasil ekstraksi diuapkan menggunakan alat *rotaty evaporator* hingga dihasilkan ekstrak yang lebih pekat pada suhu 60°C (Aswandi, 2022). Pengentalan ekstrak pekat dilakukan di atas *waterbath* suhu 60°C hingga dihasilkan ekstrak yang kental (H. Wijaya *et al.*, 2018).

## 5. Uji Standarisasi Non-Spesifik Ekstrak

### a. Uji Kadar Air

Pengujian dilakukan menggunakan alat *moisture analyzer* dengan menimbang 2 gram ekstrak bekatul, dimasukkan ke dalam lempeng logam, diratakan. Nyalakan alat, diatur pada suhu 105°C dengan waktu analisis selama 15 menit, tutup alat dan ditunggu hingga alat berbunyi yang menandakan alat selesai menganalisis (Aini *et al.*, 2023).

b. Uji Kadar Abu

Dimasukkan 2 gram ekstrak bekatul ke dalam krus porselen. Dipanaskan di dalam *muffle furnace* selama 3 jam pada suhu 600°C, setelah proses pemanasan selesai lakukan penimbangan kadar abu (Aini *et al.*, 2023).

**6. Uji Standarisasi Spesifik Ekstrak**

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptik ekstrak bekatul padi meliputi bau, bentuk, dan warna (Najib *et al.*, 2017).

b. Skrining Fitokimia Ekstrak Bekatul Padi

1) Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak bekatul padi dicampur ditambah 5 mL etanol 70% di dalam tabung reaksi, panaskan  $\pm 5$  menit, ditambahkan 10 tetes HCl pekat dan 0,2 gram serbuk magnesium. Jika terbentuk warna kuning, jingga atau merah maka sampel positif mengandung flavonoid (Maryam *et al.*, 2020).

2) Alkaloid

Ekstrak 0,5 gram ditambah HCl 2N 1 mL dan aquadest 9 mL, dipanaskan selama 2 menit pada *waterbath*, campuran didinginkan dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring (Rahman *et al.*, 2023). Campuran dibagi dalam 3 tabung reaksi (Supriyanto *et al.*, 2021). Setiap tabung ditetaskan pereaksi yang berbeda yaitu pereaksi Mayer, Dragendrof dan Bouchardat. Positif mengandung alkaloid apabila saat penambahan pereaksi

Mayer terbentuk endapan kuning atau endapan putih, dikatakan mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan jingga pada penetesan pereaksi Dragendrof (Muthmainnah, 2017). Positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan kecoklatan-kehitaman saat penetesan pereaksi Bouchardat (Zulfiah *et al.*, 2020).

### 3) Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 0,5 ekstrak etanol 70% bekatul padi dalam cawan porselen diambahkan  $CH_3COOH$  glacial 10 tetes dan  $H_2SO_4$  pekat sejumlah 2 tetes. Apabila larutan berubah menjadi biru atau hijau maka positif mengandung steroid. Positif mengandung triterpenoid apabila terjadi perubahan warna menjadi merah atau ungu (Rante *et al.*, 2020).

### 4) Saponin

Ekstrak 0,5 gram dilarutkan dalam 10 mL air panas dalam tabung reaksi, setelah larutan dingin kocok kuat selama 10 menit. Positif mengandung saponin apabila buih yang terbentuk mantap dan stabil setinggi 1 sampai 10 cm serta tidak hilang setelah penetesan HCl 2N sebanyak 1 tetes (Izazi *et al.*, 2024).

### 5) Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan 5 mL aquadest dan dipanaskan, kemudian ditambahkan 3 mL  $FeCl_3$  1% (Supriyanto *et al.*, 2021). Positif tanin katekol jika berwarna hijau biru (hijau-hitam) dan positif

mengandung tanin pirogalol apabila berwarna biru-hitam maka (Muthmainnah, 2017).

c. Uji Flavonoid Total

1) Pembuatan larutan induk kuersetin

Sebanyak 10 mg serbuk kuersetin dimasukkan ke labu ukur 100 mL, ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga dihasilkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm.

2) Pembuatan larutan baku kuersetin

Sebanyak 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, dan 10 mL larutan induk kuersetin dipipet, masukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a. Diperoleh larutan baku kuersetin berturut-turut 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, dan 100 ppm.

3) Pembuatan reagen  $AlCl_3$  2% dan  $CH_3COOH$  5%

Larutan  $AlCl_3$  2% dibuat dengan memipet 0,2 mL larutan  $AlCl_3$  2% ad 10 mL dengan akuades. Larutan  $CH_3COOH$  5% dibuat dengan memipet  $CH_3COOH$  5% sejumlah 0,5 mL lalu ad hingga 10 mL dengan aquadest.

4) Penentuan panjang gelombang serapan maksimum ( $\lambda_{max}$ )

Dipipet 1 mL larutan baku kuersetin 100 ppm, tambahkan 8 mL asam asetat 5% dan  $AlCl_3$  2% sebanyak 1 mL. Pembacaan dilakukan pada panjang gelombang 370-450 nm menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Hasil pembacaan  $\lambda_{max}$  digunakan untuk mengukur absorbansi dari sampel ekstrak etanol 70%

bekatul padi. Pada penelitian (Pujiastuti *et al.*, 2022), dihasilkan panjang gelombang maksimum 413,5 nm.

5) Penentuan *operating time*

Sebanyak 1 mL larutan baku kuersetin 100 ppm ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  2% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada  $\lambda_{max}$  413,5 nm sesuai dengan *operating time* pada menit ke-30 yang didasarkan penelitian sebelumnya (Priamsari *et al.*, 2022).

6) Penentuan kurva baku kuersetin

Sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi larutan baku kuersetin yang telah dibuat ditambahkan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  2% dan 8 mL asam asetat 5%. Didiamkan selama *operating time* yang dihasilkan kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang yang dihasilkan.

7) Penentuan kadar flavonoid total ekstrak

Ekstrak ditimbang seksama  $\pm 0,8$  gram ekstrak etanol 70% bekatul padi metode maserasi dan sokletasi, masukkan ke dalam erlenmayer dan tambahkan etanol 70% sebanyak 25 mL sehingga dihasilkan campuran dengan konsentrasi 32000 ppm. Pipet 1 mL campuran yang telah dibuat, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan  $\text{AlCl}_3$  2 % sebanyak 1 mL dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL, dikocok dan diamkan selama 30 menit pada suhu ruang sesuai waktu operasional. Diukur serapannya

pada panjang gelombang serapan maksimum (Pujiastuti *et al.*, 2022).

Dipipet 1 mL  $\text{AlCl}_3$  2% dan 8 mL asam asetat 5% sebagai larutan blanko, dicampur hingga homogen. Pengukuran panjang gelombang blanko dilakukan dengan cara yang sama. (Pujiastuti *et al.*, 2022). Flavonoid total dihitung berdasarkan rumus (Utomo *et al.*, 2020) :

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

Keterangan : QE = Kuersetin Equivalen  
v = volume ekstrak yang digunakan  
c = Konsentrasi Sampel  
m = Berat sampel

## 7. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS

### a. Pembuatan larutan stok ABTS

Sebanyak 38,5 mg serbuk ABTS dan 6,6 mg serbuk  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan air suling hingga tanda batas. Kedua larutan direaksikan di dalam erlenmayer 25 mL pada ruangan gelap, dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a. Inkubasi selama 12-16 jam.

### b. Pembuatan larutan induk kuersetin 1000 ppm

Dilarutkan 10,0 mg bubuk kuersetin menggunakan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL, dicukupkan volumenya hingga tanda batas.

### c. Pembuatan larutan pengenceran kuersetin 100 ppm

Sebanyak 1 mL larutan induk kuersetin 1000 ppm diencerkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL.

d. Pengukuran panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ )

Sebanyak 0,1 mL larutan ABTS dimasukkan dalam labu ukur 5 mL, dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombangnya 700-750 nm sampai diperoleh panjang gelombang 751 nm yang didasarkan pada penelitian sebelumnya (Alim et al., 2023).

e. Penentuan *operating time*

Sejumlah 0,1 mL larutan ABTS dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a. Dilakukan pengukuran pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh sampai dihasilkan absorbansi yang stabil. Dari penelitian sebelumnya diperoleh *operating time* pada menit ke-24 (Siska et al., 2022).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan standar kuersetin

Larutan pengenceran 100 ppm dilakukan pipetasi masing-masing 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, dan 0,5 mL larutan, dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a. Diperoleh seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Dilakukan pipetasi sebanyak 0,2 mL pada masing-masing seri konsentrasi, masukkan ke dalam labu ukur 5 mL, ditambahkan 0,2 mL larutan radikal ABTS dan dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a. Larutan didiamkan sesuai *operating time* dan dilakukan pembacaan pada masing-masing

konsentrasi sebanyak 3 kali replikasi pada panjang gelombang maksimum ABTS yang dihasilkan (Tangkau *et al.*, 2023).

g. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Bekatul Padi

Dibuat larutan baku induk sampel dengan melarutkan 10 mg ekstrak dengan etanol p.a di dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan baku induk sampel konsentrasi 1000 ppm. Dipipet masing-masing 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL larutan induk 1000 ppm kemudian masukkan dalam labu ukur 5 mL, dicukupkan volumenya menggunakan etanol p.a sampai tanda batas. Didapatkan seri konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm. Dipipet 0,2 mL dari setiap seri konsentrasi dan dimasukkan dalam labu ukur 5 mL, ditambahkan 0,2 mL larutan ABTS dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Setelah itu, larutan seri konsentrasi didiamkan selama waktu operasional. Masing-masing seri konsentrasi diukur serapannya dengan 3 kali replikasi pada panjang gelombang ABTS yang telah diperoleh (Tangkau *et al.*, 2023).

### G. Pengolahan Data

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel serta grafik. Proses analisis data dilakukan menggunakan regresi linear dengan *Microsoft Excel* untuk menghitung nilai  $IC_{50}$ . Analisis statistik dilakukan menggunakan uji *shapiro-wilk* untuk normalitas dan uji *levene* untuk homogenitas terlebih dahulu. Uji normalitas adalah salah satu pengujian mendasar yang dilakukan sebelum melakukan analisis lanjutan. Tujuan pengujian ini yaitu untuk

mengetahui apakah data sampel yang digunakan memiliki pola distribusi yang normal atau mendekatinya (Purwitasari *et al.*, 2020). Pengambilan kesimpulan uji normalitas dilihat dari nilai signifikansi. Jika nilai signifikansi > 0,05, maka dinyatakan data berdistribusi normal. Jika nilai signifikansi < 0,05, maka dinyatakan data berdistribusi tidak normal (Permatasari & Pratama, 2021). Uji normalitas dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti Kolmogorov-Smirnov untuk sampel >50 dan metode *shapiro-wilk* untuk sampel <50. Uji Homogenitas dilakukan dengan metode *levne*. Jika diperoleh data normal dan homogen, dilanjutkan uji dengan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji LSD menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistics 25.

## H. Analisis Data

### 1. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yaitu  $IC_{50}$ . *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ) merupakan konsentrasi efektif (ppm) zat antioksidan yang dapat menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung dengan mengetahui % penghambatan dari pengujian yang dilakukan. % penghambatan dapat dihitung menggunakan rumus :

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

Kemudian dilakukan pembuatan kurva berdasarkan nilai persentase penghambatan yang diperoleh terhadap konsentrasi larutan uji. Dibuat regresi linear dari kurva untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  menggunakan rumus:

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = 50  
x = menentukan nilai  $IC_{50}$   
a dan b = nilai regresi linear

Penentuan nilai  $IC_{50}$  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 panas dan dingin dianalisis statistik menggunakan aplikasi SPSS 25. Analisis statistik dilakukan uji normalitas dengan metode kolmogorov-smirnov jika sampel >50 dan menggunakan metode shapiro-wilk jika sampel <50. Selain itu, dilakukan uji homogenitas dengan metode *levene*. Jika diperoleh data yang normal dan homogen maka dilanjutkan analisis dengan metode *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji LSD menggunakan aplikasi SPSS. Jika diperoleh data yang tidak berdistribusi normal, dilakukan pengujian menggunakan uji non parametrik 2 independen t-test yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.