

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan Penelitian

Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) yang berasal dari area persawahan di dari Desa Bungur Gede, Kecamatan Ciasem, Kabupaten Subang, Etanol 96% (PT. BRATACO), Etanol P.a (PT. MERCK), Metanol p.a (MERCK), DPPH (p.a) (SIGMA), Vitamin c (p.a) (PT. MERCK), Mg (PT. MERCK), HCL (PT. MERCK), H₂SO₄ p.a, (PT. MERCK), FeCl₃, Eter (PT. MERCK), Kloroform (PT. MERCK), Amil Alkohol (PT. MERCK), KOH, Vanilin, Reagen Dragendrof, Reagen Mayer, Gelatin.

3.2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah Maserator, Rotatory Evaporator (Eyela OSB-2100), *Water bath* (CECIL), Vakum Pump Elektrik, Neraca Analitik (ADAM SCIENTIFIC), gelas ukur (PYREX), gelas kimia (PYREX), labu ukur (PYREX), pipet tetes, *water bath* (CECIL), tabung reaksi (PYREX), cawan porselin, vial, Blender (PHILIPS), Spektrofotometer UV-Vis (THERMO SCIENTIFIC), Cuvet (QUARTZ), AAT Bioquest, Inc. dan Sentrifugasi (GEMMYCO).

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Semi Solid Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan selama 3 bulan terhitung dari bulan Maret-Mei 2021. Serta tanaman yang akan digunakan pada penelitian kali ini di determinasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang dipakai. Determinasi dilakukan di Laboratorium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) Institut Teknologi Bandung (ITB).

3.4. Proses Pembuatan Ekstrak Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*)

Beras ketan hitam yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari area persawahan di persawahan dari Desa Bungur Gede, kecamatan Ciasem, Kabupaten Subang. Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) yang sudah dihaluskan kemudian diayak, setelah diayak kemudian beras ditimbang menggunakan timbangan gram sebanyak 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah coklat atau alat maserator, rendam beras ketan hitam dengan etanol 96% 1000 mL. Rendam selama 24 jam lalu diaduk, setelah 3x24 jam kemudian disaring dengan menggunakan vakum elektrik, kemudian filtrat direndam kembali dengan etanol 96%. Ulangi perlakuan yang sama sampai mendapatkan hasil yang jernih. Filtrat diuapkan menggunakan *evaporator* (Eyela OSB-2100), setelah ekstrak di *evaporasi* kemudian di *water bath* (CECIL) untuk mendapatkan ekstrak kental. Pada saat proses uapkan fitokimia pemanasan dilakukan dengan suhu dibawah 50 °C karena dapat merusak kandungan fitokimia di dalamnya seperti flavonoid (Puspitasari, 2018).

3.5. Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia diawali dengan membuat filtrat A dan B, Filtrat A dibuat dengan cara mencampurkan 1 gram simplisia dengan akuades lalu dipanaskan dan setelahnya didinginkan lalu siap untuk diuji, dan filtrat B dibuat dengan cara 1 gram simplisia dicampurkan dengan eter dan digerus kuat lalu siap untuk diuji. Skrining fitokimia meliputi:

3.5.1 Alkaloid

Masing-masing tabung reaksi yang berisi 2-3 mL filtrat A, lalu tambahkan dengan masing-masing 1% amonia dan kloroform. Setelah itu ambil lapisan kloroform dan ditempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan HCL 1 N dan kocok kuat hingga terbentuk lapisan. Lapisan asam di pipet dan dibagi menjadi tiga tabung berbeda, tabung reaksi 1 ditambahkan pereaksi mayer, dan tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi dragendrof dan tabung ke tiga digunakan sebagai blangko. Hasil positif ditunjukkan pada tabung reaksi 1 dengan membentuk endapan putih dan tabung reaksi 2 merah kecoklatan (Tjitraresmi *et al.*, 2020).

3.5.2 Flavonoid

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan dengan 0,2 gram logam Mg dan 2 tetes HCl 2 N, lalu tambahkan amil alkohol dan kocok kuat, biarkan beberapa menit, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning sampai merah (Harborne, 1987).

3.5.3 Polifenol

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan FeCl₃ 1% jika terbentuk warna biru kehitaman maka hasil yang didapatkan ialah positif (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.4 Tanin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan pelarut gelatin 1% jika terbentuk endapan putih pada larutan menunjukkan hasil yang positif (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.5 Kuinon

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan larutan KOH 5%. Jika terbentuk warna kuning hingga merah maka menunjukkan hasil yang positif (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.6 Saponin

Filtrat filtrat A sebanyak 2-3 mL pada tabung reaksi ditambahkan akuades dan dididihkan, lalu filtrat dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa setelah didiamkan atau setelah penambahan HCL (Harborne, 1987; Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.7 Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Masukan filtrat filtrat B lalu diuapkan hingga kering. Lalu ditetaskan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna-warna (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.5.8 Triterpenoid dan Steroid

Masukan filtrat I filtrat B lalu diuapkan hingga kering, lalu ditetaskan pereaksi Lieberman-Burchard. Jika hasil positif senyawa golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu dan senyawa golongan steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan (Tjitraesmi *et al.*, 2020).

3.6. Standarisasi Ekstrak

Standarisasi ekstrak sesuai dengan (Depkes RI, 2000) yang terdiri atas parameter spesifik dan non spesifik.

3.6.1 Parameter spesifik

A. Identitas

Mendeskripsikan nama ekstrak, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan nama Indonesia dari tumbuhan yang digunakan.

B. Organoleptik

Mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa menggunakan panca indra.

C. Penentuan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

a. Kadar senyawa yang terlarut dalam air

Sejumlah 5 gr ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL akuades-kloroform (2,5 mL kloroform dalam akuades hingga 100 mL) dengan labu tersumbat dan dikocok selama 6 jam pertama lalu diamkan selama 18 jam, kemudian dilakukan penyaringan dan sebanyak 20 mL di uapkan dalam cawan penguap pada suhu 105 °C sampai bobot tetap. Kemudian hitung kadar dalam persen senyawa yang terlarut dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ kadar senyawa larut dalam air} = \frac{W2-W0}{W1} \times \frac{100}{10} \times 100\%$$

Keterangan:

W0 = berat cawan kosong

W1 = bobot ekstrak awal

W2 = berat cawan + hasil pengeringan

b. Kadar senyawa yang terlarut dalam etanol

Sejumlah 5 gr ekstrak di maserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95% dengan labu tersumbat sambil sesekali dikocok pada 6 jam pertama dan diamkan selama 18 jam, kemudian dilakukan penyaringan dan sebanyak 20 mL di uapkan dalam cawan penguap pada suhu 105 °C sampai bobot tetap. Kemudian hitung kadar dalam persen senyawa yang terlarut dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ kadar senyawa larut dalam etanol} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times \frac{100}{10} \times 100\%$$

Keterangan:

W0 = berat cawan kosong

W1 = bobot ekstrak awal

W2 = berat cawan + hasil pengeringan

3.6.2 Parameter Non Spesifik

A. Kadar air

Pada penelitian kali ini menggunakan metode gravimetri, yakni sebanyak 10 gram ekstrak di keringkan pada suhu 105 °C selama 5 jam dan setelahnya ditimbang. Lalu dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \%$$

Keterangan:

W1 = berat sebelum pengeringan

W2 = berat akhir

B. Susut Pengeringan

Lakukan pemanasan cawan pada suhu 105 °C selama 30 menit setelahnya ditambahkan 1-2 gr ekstrak, lalu ekstrak diratakan hingga membentuk lapisan setebal 5-10 mm kemudian dipanaskan kembali pada suhu 105 °C selama 30 menit, setelahnya masukan ke dalam desikator kemudian ditimbang. Ulangi perlakuan sampai bobot tetap. Susut pengeringan dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ Susut Pengeringan} = \frac{W_1 - W_0 - (W_2 - W_0)}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W0 = berat cawan kosong

W1 = berat cawan + ekstrak

W2 = berat cawan + hasil pengeringan

C. Kadar Abu Total

Masukan sejumlah 2 gram ekstrak kedalam kurs yang telah ditara, kemudian dipijarkan perlahan-lahan sampai ekstrak habis, lalu dinginkan dan ditimbang. Setelah itu dipijarkan kembali secara bertahap sampai mencapai 600 ± 25 °C,

selanjutnya di dinginkan dalam desikator, serta ditimbang berat abunya. Kadar abu dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W0 = berat cawan kosong

W1 = berat ekstrak awal

W2 = berat cawan + ekstrak yang telah diabukan

3.7. Uji Antioksidan Ekstrak Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*)

Uji antioksidan ekstrak ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) terdiri dari pembuatan larutan DPPH, penentuan Panjang Gelombang Maksimum, pembuatan larutan blanko, pembuatan larutan Vitamin c, pembuatan larutan ekstrak ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) dan uji aktivitas antioksidan ekstrak ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) (Agustini, 2020):

3.7.1 Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 50 ppm yakni dengan menimbang DPPH sebanyak 5 mg kemudian tambahkan metanol p.a sampai 100 mL (0,1 mM).

3.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Ambil larutan DPPH sebanyak 4 mL pada kuvet kemudian dimasukkan pada spektrofotometri UV-Vis dan mengukurnya pada panjang gelombang 517 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$.

3.7.3 Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 2 mL larutan DPPH di dimasukkan kedalam kuvet lalu ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 2 mL (dengan perbandingan 1:1), kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C, lalu diukur serapan nya pada Panjang gelombang 517 nm. Semua perlakuan di ruangan yang tertutup dan terhindar dari cahaya serta pengerjaan dilakukan replikasi sebanyak 4x.

3.7.4 Pembuatan Larutan Vitamin c

Membuat larutan Vitamin c dengan menimbang sebanyak 5 mg Vitamin c kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas, sehingga didapat larutan vitamin c dengan konsentrasi 50

ppm. lalu dari larutan induk 50 ppm dibuat variasi konsentrasi 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm dan 1 ppm. dengan cara memipet larutan induk sebanyak 4 mL, 2 mL, 1 mL, dan 0,5 mL dan dilarutkan kedalam 25 mL metanol p.a.

3.7.5 Pembuatan Larutan Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*)

Pembuatan larutan baku pada konsentrasi 10000 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 100 ppm, 250 ppm, 750 ppm, 2500 ppm, 7500 ppm dan masing-masing variasi konsentrasi dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a pada labu ukur 25 mL.

3.7.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*)

Pengujian dilakukan dengan cara memipet larutan induk ekstrak ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Lalu di inkubasi selama 30 menit. Kemudian ukur absorbansi nya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan perlakuan dilakukan berulang sebanyak 4x. setelah itu dilakukan pengukuran IC₅₀ dengan Y

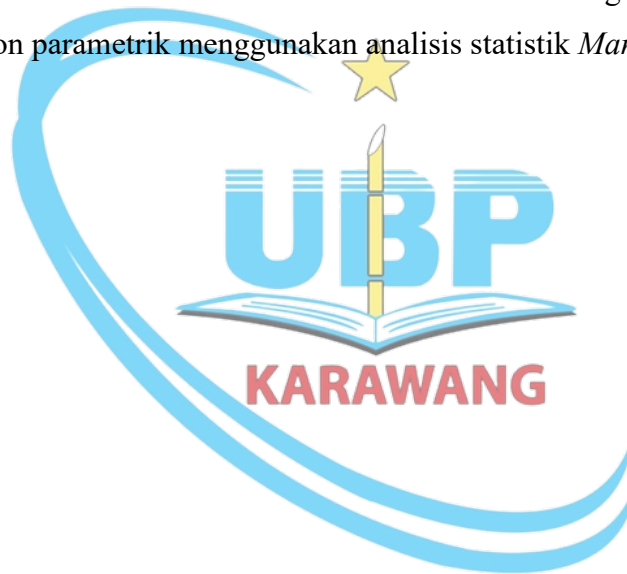
$$= \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \frac{X}{\text{IC}_{50}} \text{Hill coefficient}}$$

3.8. Uji Sun Protection Factor (SPF) Ekstrak Ketan Hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*)

Dilakukan pengenceran ekstrak ketan hitam (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) ditambahkan dengan etanol p.a 25 mL sampai mendapat konsentrasi sebesar 1.000, 5.000, 10.000 ppm. Lalu disaring dan di endapkan menggunakan alat sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, setelahnya lakukan penyaringan larutan menggunakan kertas Whatman No.1 (Ermawati *et al.*, 2020; Widyawati *et al.*, 2019). Setelah itu ditentukan absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 290, 295, 300, 305, 310, 315 dan 320 nm untuk penentuan nilai SPF pada setiap interval 5 nm dan bandingkan menggunakan etanol sebagai blanko, serta dilakukan 4 kali penentuan pada setiap titik Panjang gelombang lalu dilanjutkan dengan penghitungan nilai SPF menggunakan persamaan Mansur setelah itu hitung efek perlindungannya dalam perlindungan dari radiasi UV-B. Sebelum dilakukan pengujian maka dilakukan kalibrasi spektrofotometri UV-Vis terlebih dahulu dengan menggunakan etanol p.a. (Dutra *et al.*, 2004; Widyawati *et al.*, 2019).

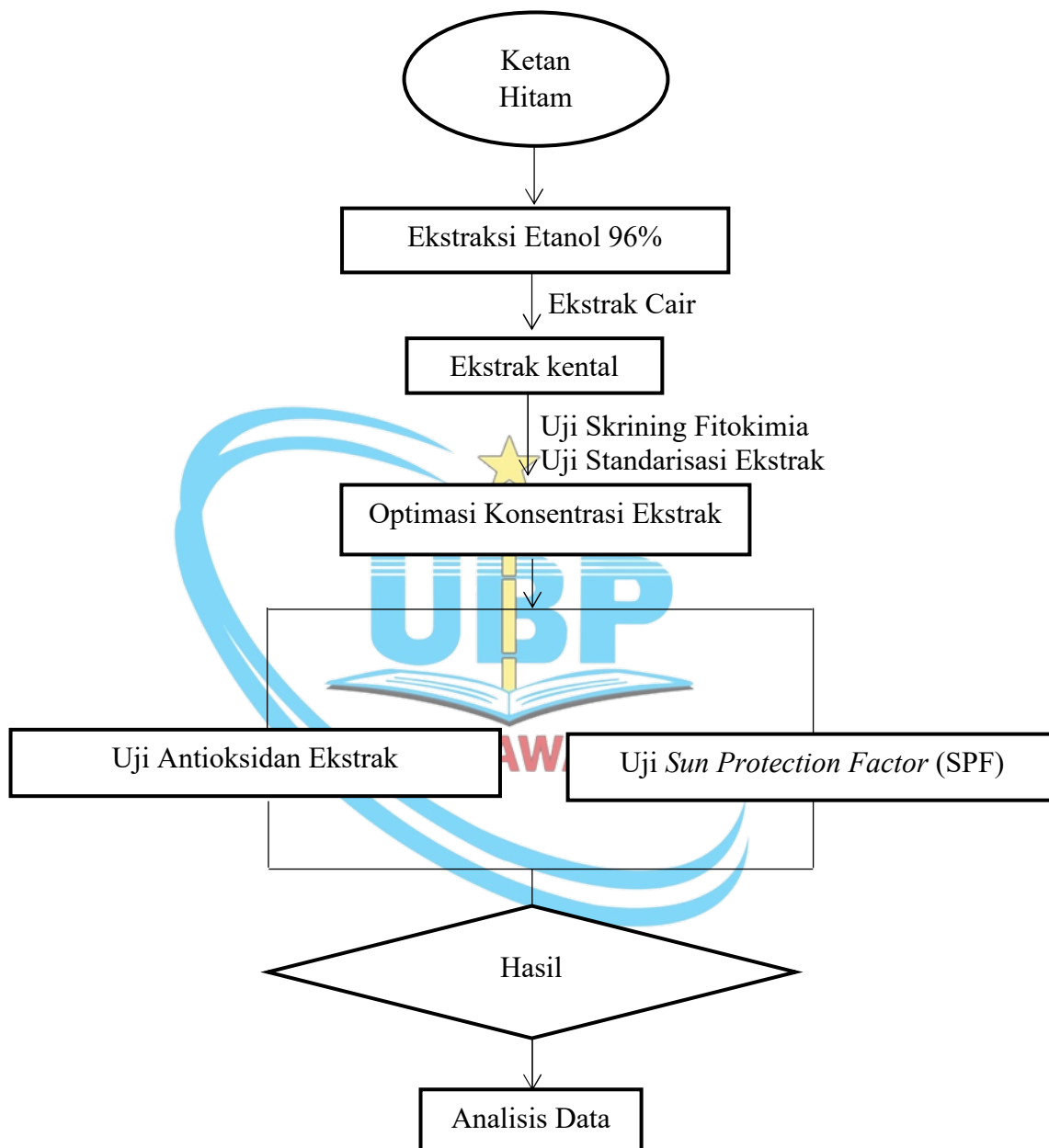
3.9. Analisis Data

Pengujian aktivitas tabir surya dianalisis menggunakan statistik SPSS versi 21, yakni antara lain uji normalitas serta uji homogenitas dengan menggunakan analisis (*Shapiro Wilk*) dan (*uji levene*). Jika data yang dihasilkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *oneway* ANOVA untuk melihat perbedaan rata-rata nilai SPF terhadap konsentrasi ekstrak yang digunakan, ketika hasil H_0 ditolak maka dilanjutkan menggunakan analisis *uji honestly significant difference* (HSD) untuk mengetahui nilai *sun protector factor* (SPF) pada konsentrasi berapa yang berbeda signifikan. Tetapi jika data yang dihasilkan tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik menggunakan analisis statistik *Mann-whitney U*.



3.10. Diagram Alir Penelitian

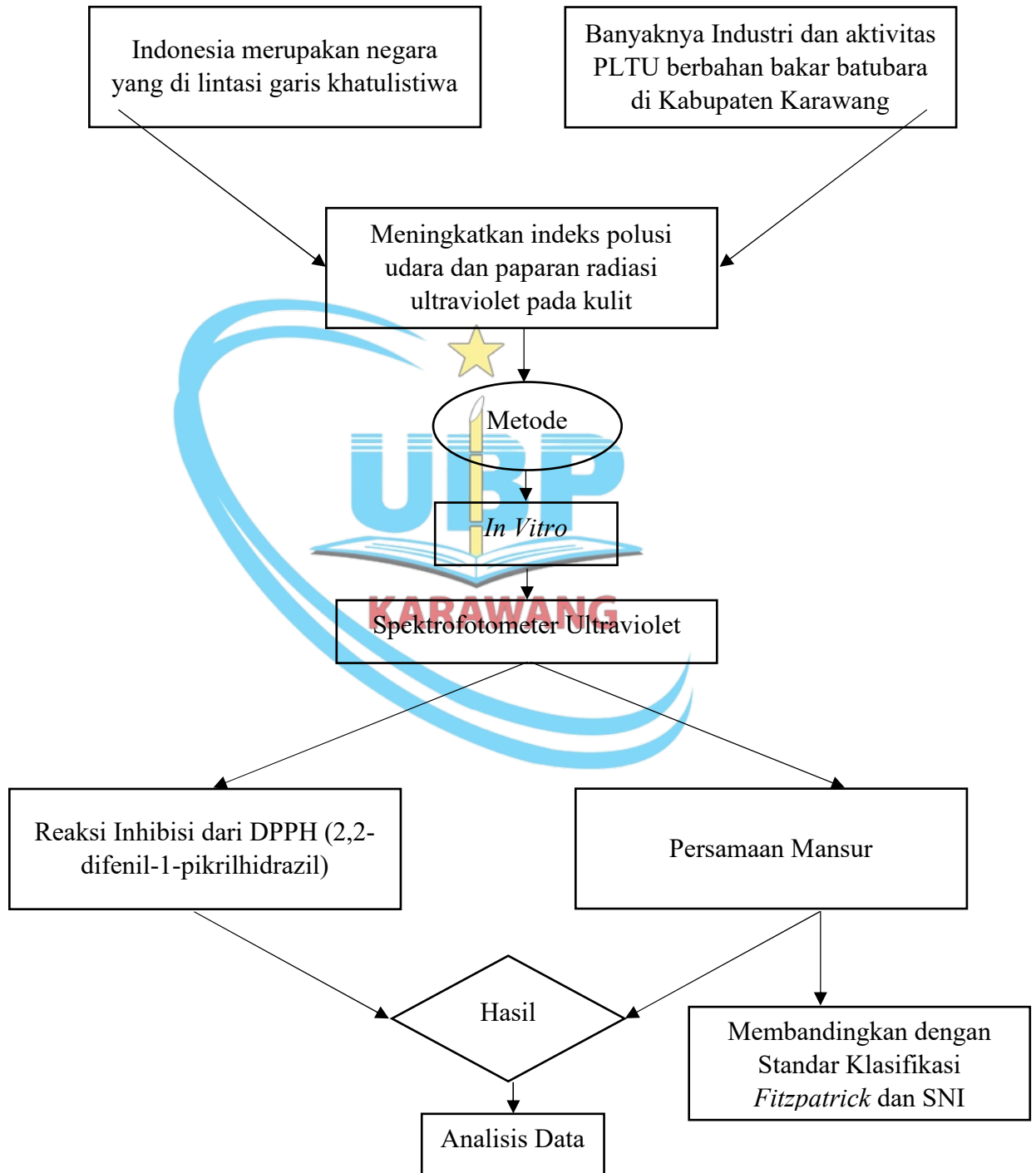
Berikut ini merupakan diagram alir penelitian:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.11. Kerangka Pemikiran

Gambaran secara sistematis mengenai kerangka penelitian ini dapat di cermati pada gambar dibawah ini:



Gambar 3.2 Kerangka Pemikiran