

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimen yang dilakukan secara laboratorium yaitu untuk menguji aktivitas antioksidan pada ekstrak minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) menggunakan uji DPPH dengan ekstraksi sokletasi dengan pelarut n-heksan.

B. Lokasi Penelitian

1. Determinasi biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) menjadi minyak dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pada pengujian antioksidan minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Biji sacha inchi didapatkan dari Daerah Magelang, Jawa Tengah

D. Definisi Operasional

1. Simplisia Biji Sacha Inchi

Simplisia biji sacha inchi adalah simplisia yang berasal dari Daerah Magelang Jawa Tengah yang diproses pengeringan dengan matahari langsung dan oven.

2. Ekstrak Minyak Biji Sacha Inchi

Ekstrak minyak biji sacha inchi diperoleh dari ekstraksi dengan metode sokletasi selama 1,5 jam dengan 25 siklus serbuk simplisia biji sacha inchi 300 gram dalam pelarut N-Heksan 900 ml kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan waterbath menggunakan suhu 60⁰ C.

3. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Sesuai dengan tujuan penelitian yang akan di capai, maka variabel yang akan dipelajari dalam penelitian ini adalah antioksidan minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat adanya variabel bebas yaitu aktivitas antioksidan ekstrak minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Variabel terikat dalam penelitian ini diukur dengan DPPH (Sugiono,2013).

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu ekstrak, cahaya, dan asal dari sampel yaitu Daerah Magelang Jawa Tengah.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

- a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat sokletasi, blender, botol gelap, pipet, batang pengaduk, spatula, rak, dan tabung reaksi, cawan, timbangan analitik (Mettler Toledo 2.0.0), labu ukur, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10 vis Seris), waterbath (Faithful/DK-98-II A).

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu biji sacha inchi, DPPH (Sigma-Aldrich), N-Heksana, Kuarsetin (Sigma), Etanol pa (PT Smart Lab Indonesia), Pereaksi meyer, Dragendorf, Aquadest, FeCl_3 1%, H_2SO_4 Pekat.

2. Deteminasi Tumbuhan

Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang agar dapat mengetahui kebenaran serta keaslian dari biji sacha inchi sebagai tujuan menghindari adanya kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian.

3. Pembuatan Minyak Biji Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*)

a. Persiapan Biji Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*)

Biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) yang telah dilakukan pemisahan dari kulit biji melalui cara sortasi kering sebelumnya biji telah dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari selanjutnya di oven untuk memaksimalkan pengeringan, ketika biji sudah kering selanjutnya diblender untuk mendapatkan serbuknya (Julianty, 2021).

b. Pembuatan Ekstrak Minyak Biji Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*)

300 gram bubuk biji sacha inchi ditimbang, kemudian dimasukan ke dalam kertas saring dan dibungkus. Setelah itu, kertas saring dengan bubuk biji sacha inchi

dimasukan kedalam alat *soxhlet*. Pelarut n-heksana dimasukan kedalam labu leher tiga tersebut. Perangkat tersebut kemudian dioperasikan untuk melakukan ekstraksi pada suhu 50°C selama 1,5 jam dengan 25 siklus. Setelah proses ekstraksi selesai, ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan waterbath pada suhu 60°C (Julianty, 2021).

4. Pemeriksaan organoleptik

Pemeriksaan organoleptik merupakan pengenalan awal serbuk simplisia dan ekstrak biji sacha inchi secara objektif berupa bau, warna dan bentuk.

5. Uji Kadar Air

Ekstrak minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) diambil sebanyak 5 gram selanjutnya dimasukan kedalam cawan porselen yang sebelumnya sudah dipanaskan menggunakan oven pada suhu 105° C selama 30 menit. Minyak yang telah dimasukan dalam kurs lalu dipanaskan pada suhu 100° C. Kadar air yang diinginkan sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) adalah maksimal 0,15% b/b.

Rumus untuk mengitung kadar air yang digunakan yaitu :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat sampel dalam cawan sebelum pemanasan

b = berat sampel dalam cawan setelah pemanasan

c = berat sampel yang dilakukan sebelum pemanasan

6. Uji Bebas N-Heksana

Uji bebas n-heksana yaitu dilakukan dengan mengambil 2 ml minyak biji sacha inchi selanjutnya dibakar diatas api busen kemudian amati bau n-heksan. Jika terdapat

bau menyengat n-heksan maka perlu dilakukan penguapan kembali (Mierza *et al.*, 2022).

7. Identifikasi senyawa metabolit

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 2 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 3 tetes H_2SO_4 pekat, jika pada saat penambahan terbentuk warna kuning, merah bata menandakan adanya senyawa flavonoid (Ergina *et al.*, 2014).

b. Uji Alkaloid

Ekstrak minyak biji sacha inchi dilarutkan dengan 5 ml HCl 2N kemudian dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung pertama diisi sebagai blanko, tabung kedua di tambahkan pereaksi Dragendroff 3 tetes tabung ketiga diberi pereaksi Meyer 3 tetes jika terdapat endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Simaremare, 2014).

c. Uji Tanin

Sampel diambil sebanyak 2 ml kemudian ditetesi 3 tetes $FeCl_3$ 1%. Apabila larutan berubah menjadi berwarna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin (Ergina, 2014).

d. Uji Saponin

Sampel dididihkan dengan 2 ml air dalam penangas air. Filtrat dikocok selama 15 menit, jika terdapat busa yang stabil maka positif mengandung saponin (Ikalinus *et al.*, 2015).

8. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan larutan DPPH 30 ppm

DPPH ditimbang sebanyak 3 mg kemudian dilarutkan dengan etanol pa hingga 100 ml di dalam labu ukur.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Sebanyak 3 ml larutan DPPH dimasukan dalam kuvet dan ditambahkan dengan 1 ml etanol pa lalu dihomogenkan. Kemudian diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap dan tertutup, absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 450-550 nm untuk memperoleh absorbansi kurang lebih 0,2 – 0,8 (Ramatullah *et al.*, 2019).

c. Pembuatan larutan blanko

Larutan DPPH 30 ppm diambil sebanyak 3 ml selanjutnya dihomogenkan dengan etanol pa sampai 1 ml didalam kuvet kemudian didiamkan selama 30 menit, selanjutnya serapan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

d. Penentuan *Operating Time*

Operating Time dilakukan dengan larutan DPPH 30 ppm yang kemudian diukur pada panjang gelombang yang telah diperoleh (Rastuti dan Purwati, 2012).

e. Pembuatan kurva standar kuarsetin

Timbang kuarsetin sebanyak 1 mg kemudian dimasukan kedalam labu 10 ml dan didapatkan larutan induk ukuran 100 ppm selanjutnya diencerkan hingga diperoleh larutan seri 1, 2, 3, 4, 5 ppm.

f. Pembuatan larutan sampel minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*)

Minyak biji sacha inchi diambil sebanyak 100 mg kemudian ditambahkan dengan etanol pa dan dimasukkan ke labu ukur 100 ml sehingga diperoleh 1000 ppm. Selanjutnya dibuat ke dalam konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500ppm. Larutan baku minyak biji sacha inchi 1000 ppm dipipet 0,5 ml ; 1 ml ; 1,5 ml ; 2 ml ; dan 2,5 ml kemudian masing – masing dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml dilarutkan dengan etanol pa sampai tanda batas dan masing – masing larutan diukur absorbansinya.

- g. Penentuan aktivitas antioksidan minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) dan pembandingan kuersetin

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 ml larutan kuersetin dari berbagai konsentrasi (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm) dan larutan uji minyak dengan konsentrasi (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm), kemudian masing - masing ditambahkan 3 ml DPPH. Campuran kemudian dilakukan inkubasi selama operating time yang sudah ditetapkan kemudian diukur absorbansinya sesuai panjang gelombang 516 nm (Wanita, 2019).

G. Analisis Data

1. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

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

2. Antioksidan

Mengukur aktivitas antioksidan pada ekstrak minyak biji sacha inchi menggunakan spektrofotometri UV-Vis sebagai alat analisis, grafik dibuat berdasarkan data uji DPPH dengan tujuan untuk mengidentifikasi panjang gelombang yang tepat. Data absorbansi

yang diperoleh dari uji tersebut kemudian digunakan untuk mencari % inhibisinya. Rumus untuk mencari nilai % inhibisinya sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{a \text{ blanko} - a \text{ sampel}}{a \text{ blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

a blanko = absorbansi pada DPPH tanpa sampel

a sampel = absorbansi pada DPPH setelah ditambahkan sampel

IC₅₀ pada tingkat konsentrasi antioksidan diperlukan untuk mencapai penghambatan sebesar 50% terhadap radikal bebas. Semakin rendah nilai IC₅₀ semakin kuat aktivitas antioksidannya, nilai IC₅₀ dapat dihitung menggunakan persamaan linear yang mengukur sejauh mana ekstrak sampel dapat menghambat radikal DPPH, untuk mencari nilai IC₅₀ dapat dimasukkan ke persamaan berikut ini:

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