

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium. Ekstrak etanol biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) diperoleh menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etanol 96%. Uji metabolit sekunder menggunakan metode tabung, uji kadar flavonoid total menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis ekstrak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) yang memiliki kandungan senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan terhadap DPPH.

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. Uji fitokimia, uji flavonoid dan uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi adalah kelompok subjek yang menjadi sasaran penelitian.

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan sacha inchi (*Plukenetia*

volubilis) yang diperoleh dari daerah Muntung, Temanggung, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) yang diekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etanol 96%.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional adalah batasan dan cara pengukuran variabel yang akan diteliti. Definisi operasional dibuat untuk memudahkan dan menjaga konsistensi pengumpulan data, menghindari perbedaan interpretasi serta membatasi ruang lingkup variabel.

1. Biji Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) yang digunakan merupakan biji yang sudah kering, tidak berjamur, berwarna coklat dan diambil bagian tengah berwarna putih susu. Biji ini diperoleh di daerah Muntung, Temanggung, Jawa Tengah.
2. Etanol 96% merupakan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi Biji Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*).
3. Minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) merupakan suatu bahan yang didapatkan dari ekstraksi dengan metode sokletasi.
4. Uji flavonoid total merupakan suatu metode untuk menganalisis berapa total kandungan flavonoid yang dimiliki biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*).

5. Uji aktivitas antioksidan merupakan suatu metode untuk menganalisis kandungan senyawa antioksidan di dalam minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) dengan metode DPPH.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 ppm.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) dengan metode DPPH.

F. Pengumpulan Data

1. Determinasi

Determinasi biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Alat dan Bahan

- a. Alat:

Gelas ukur 250 ml dan 500 ml (pyrex), cawan penguap, kain lap, timbangan elektrik, satu set alat sokletasi (statif, klem, kondensor, selang air masuk, selang air keluar, soklet, heating mantle), Waterbath, Tabung reaksi, Pipet tetes, kertas saring, pipet volum 1 ml dan 10 ml

(iwaki), kuvet, spektrofotometer Uv-Vis (shimadzu), aluminium foil, corong kaca, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, tisu.

b. Bahan

Biji kering sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) (didapatkan di daerah Temanggung, Jawa Tengah), etanol pa (PT. Smart Lab Indonesia), etanol 96% (dibeli dari pedagang bahan kimia), H_2SO_4 (laboratorium), asam asetat, DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil), kuersetin (laboratorium), $FeCl_3$ 3% (laboratorium), $AlCl_3$ 10% (laboratorium).

3. Ekstraksi

Ekstrak etanol biji sacha inchi diperoleh dengan metode sokletasi dalam etanol 96% yang dipanaskan diatas *heating mantle*. Ekstraksi dilakukan dengan 100 gram serbuk biji sacha inchi dibungkus menggunakan kertas saring kemudian dimasukkan kedalam kolom soklet. Tambahkan etanol 96% sebanyak 1:5 bagian kedalam labu alas bulat 500 ml. Pelarut yang digunakan sebanyak 500 ml, kemudian labu alas bulat dirangkai dengan tabung soklet dan kondensor serta selang air masuk dan selang air keluar. Diberikan vaselin pada bibir labu didih dan tabung soklet. Heating mantle disetting dengan suhu $70^{\circ}C$. Filtrat yang diperoleh dipisahkan menggunakan penguapan diatas waterbath dengan suhu $50^{\circ}C$ dan tekanan 1 atm. Ekstraksi menggunakan metode sokletasi menghasilkan filtrat sebanyak 850 ml dan setelah diuapkan diatas waterbath didapatkan 25 ml ekstrak kental minyak sacha inchi.

Tabel 3. 1 Hasil Ekstraksi Biji Sach Inchi

Sampel	Jumlah Simplisia (g)	Jumlah Pelarut (ml)	Filtrat (ml)	Ekstrak setelah diuapkan (ml)
Ekstrak etanol biji sacha inchi	300	1500	850	25

4. Rendemen Ekstrak

Setelah didapatkan ekstrak biji sacha inchi maka perlu dihitung %rendemen yang terkandung di dalam ekstrak. Tujuan dari perhitungan rendemen adalah untuk mengetahui berapa ekstrak yang didapatkan dari simplisia segar yang digunakan. Berikut hasil rendemen ekstrak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*):

Hasil rendemen ekstrak yang kurang memenuhi dapat diakibatkan dari penyiapan simplisia yang kurang baik. Penggunaan proses ekstraksi yang menggunakan suhu 60-70°C dimana suhu tersebut dinilai cukup tinggi untuk ekstraksi simplisia. Hal ini disebutkan pada penelitian Yuliantari *et al.* (2017) bahwa suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada bahan yang sedang diproses. Waktu ekstraksi juga berpengaruh terhadap senyawa yang dihasilkan. Menurut Agus budyanto dan yulianingsih (2008) waktu ekstraksi yang tepat akan menghasilkan senyawa yang optimal. Waktu ekstraksi yang terlalu lama akan menyebabkan ekstrak terhidrolisis, sedangkan waktu ekstraksi yang terlalu singkat menyebabkan tidak semua senyawa aktif terekstraksi dari bahan simplisia.

Tabel 3. 2 Hasil Rendemen Ekstrak

Berat simplisia (g)	Jumlah pelarut (ml)	Jumlah ekstrak (ml)	Rendemen (%)
300	1500	25	8,3
Rendemen = 8,3 < 10%			
Kesimpulan = kurang memenuhi			

5. Uji Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air menggunakan metode oven yaitu air yang terkandung di dalam ekstrak diuapkan dengan cara pengeringan oven pada suhu 105°C selama 1 jam. Ekstrak ditimbang pada cawan porselen kosong lalu dicatat hasilnya. Kemudian ekstrak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) ditimbang 10 mg dan dimasukkan ke dalam cawan porselen. Cawan porselen berisi minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) ditimbang kembali dan dicatat hasilnya. Setelah ditimbang cawan porselen diberi tutup menggunakan aluminium foil dengan rapat. Setelah diberi tutup aluminium foil, masukkan cawan ke dalam oven selama 1 jam dengan suhu 105°C. Setelah 1 jam keluarkan cawan porselen lalu ditunggu dingin dan ditimbang lagi kemudian tentukan kadar air dalam ekstrak tersebut.

Cara penghitungan kadar air dapat menggunakan rumus:

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

Keterangan:

a = berat cawan kosong

b = berat cawan kosong + sampel sebelum di oven

c = berat cawan kosong + sampel setelah di oven

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

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air} &= \frac{121,6 - 121,4}{121,6 - 116,6} \times 100\% \\ &= 4\% \end{aligned}$$

6. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya kandungan etanol dalam ekstrak. Pengujian dilakukan dengan memasukkan 1 ml ekstrak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan 2 tetes asam asetat lalu dipanaskan dan diamati hasilnya. Ekstrak dikatakan bebas dari etanol apabila tidak ada bau khas ester yang khas dari etanol (Tivani *et al.* 2021).

7. Uji Metabolit Sekunder

a. Identifikasi Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,5 ml ekstrak lalu ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan diberi 3 tetes HCl pekat. Pengujian dinyatakan positif mengandung flavonoid jika terbentuk perubahan warna merah, kuning atau jingga (Tivani *et al.* 2021).

b. Identifikasi Saponin

Uji identifikasi senyawa saponin dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak biji sacha inchi kemudian ditambahkan dengan 10 ml air panas, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik sampai timbul busa. Apabila terbentuk buih yang bertahan selama 10 menit dapat disimpulkan positif mengandung senyawa saponin (Tivani *et al.* 2021).

c. Identifikasi Tanin

Uji tanin dilakukan dengan mendidihkan ekstrak biji sacha inchi dalam 20 ml air kemudian ditambahkan dengan 3 tetes FeCl 3%. Larutan ekstrak diamati apabila menghasilkan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman maka ekstrak biji sacha inchi positif mengandung tannin (Tivani *et al.* 2021).

8. Penetapan Kadar Flavonoid (Ipandi *et al.* 2016)

a. Pembuatan Larutan

1) Pembuatan Larutan Kuersetin 1000 ppm (Larutan Induk)

10 mg kuersetin ditimbang kemudian dilarutkan dengan etanol pa hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan dalam labu takar 10 ml lalu ditambahkan etanol pa sampai tanda batas.

2) Pembuatan Larutan AlCl₃ 10%

Pembuatan larutan AlCl₃ 10%. dengan cara melarutkan 1 gram AlCl₃ 10% ke dalam aquades sebanyak 10 ml.

3) Pembuatan Larutan Asam Asetat 5%

Pembuatan larutan asam asetat 5% dengan cara melarutkan 5 gram asam asetat dalam aquades sebanyak 100 ml.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

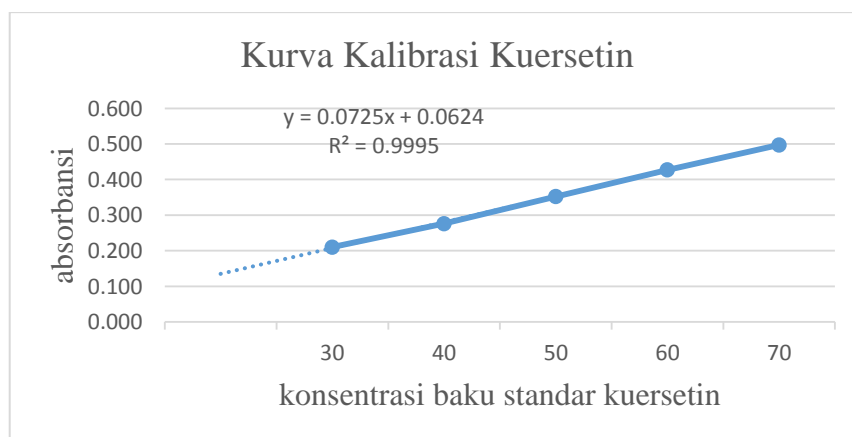
Larutan kuersetin 1000 ppm diencerkan menjadi 100 ppm kemudian diambil sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan dengan 1 ml AlCl₃ 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Dilakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-500 nm.

c. Penentuan Operating Time

Larutan kuersetin 1000 ppm diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.

d. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri kadar dibuat menggunakan kuersetin 1000 ppm sebagai baku standar. Dibuat seri kadar sebesar 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, dan 70 ppm. Sebanyak 1 ml larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi direaksikan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Larutan didiamkan selama 23 menit, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.



Gambar 3. 1 Kurva Kalibrasi Kuersetin

e. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Ekstrak etanol biji sacha inchi dibuat menjadi konsentrasi 1000 ppm, diambil sebanyak 1 ml, ditambahkan dengan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5% kemudian didiamkan selama 23 menit lalu dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Pengukuran dapat dilakukan sebanyak 3x.

9. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH 40 ppm

DPPH ditimbang sebanyak 4 mg dan dilarutkan dengan etanol pa hingga 50 ml dalam labu takar.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Larutan DPPH 40 ppm kemudian dibiarkan selama 30 menit lalu diukur pada spektrofotometri UV-Vis dan diperoleh panjang gelombang maksimum serta nilai absorbansinya.

c. Penentuan Operating Time

Penentuan operating time dilakukan dengan mengukur larutan DPPH 40 ppm pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh.

d. Penentuan Absorbansi Kontrol

Larutan blanko DPPH dibuat dengan memipet sebanyak 1 ml larutan induk DPPH dan ditambahkan dengan 4 ml etanol pa kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml lalu didiamkan selama operating time yaitu 29 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

$$\% \text{peredaman DPPH} = \frac{(\text{Absorban kontrol} - \text{absorban sampel})}{\text{Absorban kontrol}} \times 100\%$$

e. Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan kontrol positif kuersetin ditimbang sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml didapatkan larutan induk 100 ppm dan diencerkan hingga diperoleh larutan seri 1, 2, 3, 4, 5 ppm.

Larutan sampel ekstrak biji sacha inchi dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara melarutkan 25 mg ekstrak kedalam 25 ml labu ukur dan diencerkan hingga diperoleh larutan seri 100, 200, 300, 400, 500 ppm.

f. Pengukuran Absorbansi Sampel

Masing-masing larutan uji dipipet 1 ml kemudian ditambahkan 3 ml DPPH 40 ppm dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Setiap konsentrasi dilakukan replikasi 3x