

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah Keong Mas (*Pomacea canaliculata* L) yang diperoleh dari desa Singosari Kabupaten Malang, selain itu minyak ikan lemuru yang digunakan untuk penelitian didapatkan dari hasil samping pengalengan ikan di Muncar Banyuwangi Jawa Timur. Bahan – bahan yang digunakan pada proses ekstraksi antara lain metanol, aquades, kapas, kestas saring whatman no 1, almunium foil, plastik wrap. Bahan yang digunakan untuk uji daya antioksidan dengan metode DPPH adalah ekstrak keong mas, kristal *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH) p.a, metanol p.a., etil asetat p.a, kloroform p.a.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah *erlenmeyer* 500ml, *rotary vacuum evaporator*, corong, timbangan digital, gelas ukur 100ml, botol vial, *blender*, hot plate, oven, freezer, magnetic stirrer, beaker glass 1000 ml, beaker glass 500ml, corong, spatula. Sedangkan alat untuk identifikasi senyawa aktif dalam ekstrak antara lain spektrofotometer UV-Vis dan alat LC-MS. Sedangkan dalam uji kualitas minyak ikan adalah tabung reaksi, gelas ukur, Erlenmeyer 500ml, waterbath, spektrofotometer, spatula, kompor, baskom, pisau, pipet tetes, pipet volume, bola hisab, botol vial, Statif, buret, tabung destilasi.

3.2 Metode Penelitian

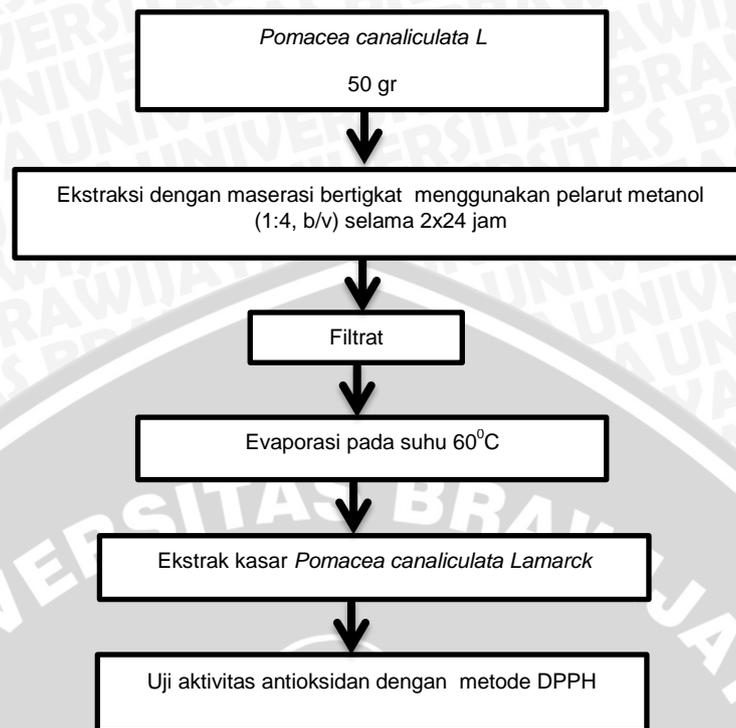
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat

suatu hasil. Hasil yang akan menegaskan bagaimana kedudukan hubungan kausal antara variabel yang diselidiki (Surakhmad, 1998). Sedangkan menurut Nazir (1998), tujuan penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan – perlakuan tertentu pada kelompok percobaan. Ditambahkan oleh Zulnaidi (2007), metode eksperimen adalah prosedur penelitian yang dilakukan untuk mengungkapkan hubungan sebab akibat dua variabel atau lebih, dengan mengendalikan dua pengaruh variabel yang lain. Metode ini dilaksanakan dengan memberikan variabel bebas secara sengaja kepada objek penelitian untuk diketahui akibatnya didalam variabel terikat.

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap antara lain penelitian pendahuluan yaitu ekstraksi keong mas (*Pomacea canaliculata* L) dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Selanjutnya ekstrak kasar keong mas yang diperoleh di uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*1,1 – Diphenly – 2 – Picril- Hydrazil*) yang bertujuan untuk menguatkan aktivitas suatu senyawa bioaktif dari ekstrak keong mas sebagai antioksidan.

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mendapatkan ekstrak keong mas dan menguji aktivitas antioksidan pada ekstrak keong mas. Penelitian pendahuluan ini dibagi menjadi dua tahap. Pada tahap pertama dilakukan ekstraksi keong mas (*Pomacea canaliculata* L) dan tahap kedua pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak keong emas dengan metode DPPH dan penelitian utama adalah uji Iod, Uji Bilangan Peroksida, Uji angka TBA, Uji LCMS. Diagram alir proses penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan

3.2.1.1 Prosedur Penelitian Pendahuluan

Ekstraksi *Pomacea canaliculata* L (Susanto, 2010)

Pada tahap pertama, ekstraksi dilakukan terhadap keong mas kering. Sebelum dilakukan ekstraksi isi cangkang keong mas yang telah diambil di area waduk daerah singosari Malang di bersihkan dan isi keong dipotong kecil – kecil lalu keong dioven dengan suhu 40°C selama 24 jam dengan tujuan untuk mengurangi kadar air yang ada didalam daging keong mas lalu ditimbang sebanyak 50gr.

Isi cangkang keong mas yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender, sehingga diperoleh tekstur yang agak halus. Ukuran sampel yang lebih kecil diharapkan dapat memperluas permukaan bahan yang dapat berkontak langsung dengan pelarut, sehingga proses ekstraksi komponen bioaktif dapat berjalan dengan maksimal. Langkah selanjutnya adalah ekstraksi bahan aktif, metode estraksi yang digunakan adalah ekstraksi bertingkat dengan

menggunakan pelarut metanol p.a perbandingan (1:4) selama 2x24 jam, dengan mengganti pelarut setiap harinya. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring whattman no 1 dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* vakum pada suhu 40°C dan putaran 100 rpm. Diperoleh ekstrak kasar berupa cairan pekat berwarna hijau tua yang bertekstur kental keenceran (Gambar 5). Ekstrak metanol keong mas (*Pomacea canaliculata Lamarck*) selanjutnya disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 4 °C untuk digunakan pada analisis selanjutnya.



Gambar 5. Ekstrak kasar keong mas

Uji Aktifitas Antioksidan Dengan Metode DPPH (Blois 1958 dalam Hanani et al, 2005)

Ekstrak kasar keong mas dari hasil ekstraksi tunggal menggunakan pelarut metanol dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600 ppm. Larutan DPPH yang akan digunakan, dibuat dengan melarutkan kristal DPPH dalam pelarut metanol. Proses pembuatan larutan DPPH 1 mM dilakukan dalam kondisi suhu rendah dan terlindung dari cahaya matahari. Masing – masing konsentrasi sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 1 mM dalam metanol. Setelah itu campuran diinkubasi pada suhu 37C⁰ selama 30 menit, selanjutnya serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Sebagai kontrol negatif menggunakan larutan DPPH dan metanol (tanpa ekstrak). Nilai antioksidan diperoleh dari persamaan:

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

Nilai konsentrasi dan persen inhibisinya diplot masing-masing pada sumbu x (konsentrasi ppm DPPH) dan y (aktivitas % DPPH) pada persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan $y = a + bx$, digunakan untuk mencari nilai IC50 (inhibitor concentration 50%) dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC50. Nilai IC50 menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50%.

3.2.1.2 Parameter Uji Penelitian Pendahuluan

Parameter yang digunakan dalam penelitian pendahuluan yaitu parameter kuantitatif berdasarkan data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas antioksidan keong mas (*Pomacea canaliculata L*) dengan metode DPPH pada konsentrasi yang berbeda.

3.3 Penelitian Utama

3.3.1 Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktorial yaitu faktor pertama dengan konsentrasi 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm dan faktor yang kedua adalah dengan masa simpan 1 hari, 7 hari dan 14 hari dengan 3 kali ulangan. Model rancangan percobaan

dapat dilihat Tabel 2. Jika hasil dari pengujian menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata pada selang 95% ($\alpha = 0,05$) maka dilakukan uji lanjut BNT

Tabel 2. Model Rancangan Percobaan

Massa simpan	Konsentrasi (ppm)	Ulangan		
		1	2	3
1 hari (S)	0 ppm (a)	Sa1	Sa2	Sa3
	200 ppm(b)	Sb1	Sb2	Sb3
	400 ppm(c)	Sc1	Sc2	Sc3
	600 ppm(d)	Sd1	Sd2	Sd3
7 hari (L)	0 ppm (a)	La1	La2	La3
	200 ppm(b)	Lb1	Lb2	Lb3
	400 ppm(c)	Lc1	Lc2	Lc3
	600 ppm(d)	Ld1	Ld2	Ld3
14 hari (SE)	0 ppm (a)	SEa1	SEa2	SEa3
	200 ppm(b)	SEb1	SEb2	SEb3
	400 ppm(c)	SEc1	SEc2	SEc3
	600 ppm(d)	SEd1	SEd2	SEd3

3.3.2 Penentuan Kualitas Minyak Ikan

3.3.2.1 Uji bilangan Peroksida (AOAC, 1990).

Metode uji bilangan peroksida pada minyak ikan menggunakan metode yang digunakan oleh Rasyid (2003). Sampel sebanyak 5 ml dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml, ditambahkan 30 ml pelarut campuran asam asetat glasial dan kloroform dengan perbandingan 3:2 lalu dihomogenkan. Kemudian ditambahkan 0,5 ml KI jenuh sebagai katalisator reaksi dan didiamkan selama 2 menit pada ruangan gelap dengan sesekali dikocok. Setelah itu larutan ditambahkan 30 ml aquades. Langkah terakhir larutan dititrasi dengan sodium tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N. Bilangan peroksida dinyatakan dalam persamaan :

$$\text{Bilangan peroksida} = \frac{(v \text{ titran sampel} - v \text{ titran blanko}) \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 1000}{v \text{ sampel}}$$

3.3.2.2 Uji Bilangan Iod (Sudarmadji *et al.*, 2007).

Uji bilangan iod menggunakan metode yang diacu oleh Parhamitha (2012). Sampel sebanyak 2 gram dimasukan ke dalam erlenmeyer tertutup kemudian ditambahkan 20 ml kloroform dan 25 ml reagen yodium bromide, setelah itu didiamkan dalam tempat gelap selama 30 menit. Selanjutnya, larutan ditambahkan 10 ml larutan KI 15% dan 100 ml aquades mendidih. Setelah itu larutan segera dititrasi dengan larutan Natrium Thoisulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N hingga berwarna kuning pucat. Setelah itu ditambahkan 2 ml larutan pati, dan dilanjutkan dititrasi hingga warna biru hilang.

$$\text{Bilangan iod} = \frac{v \text{ titran blanko} - v \text{ titran sampel}) \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 12,69}{\text{berat sampel}}$$

3.3.2.3 Uji TBA (*Thiobarbituric Acid*) (Sudarmadji *et al.*, 2007).

Uji TBA digunakan untuk menentukan adanya ketengikan. Lemak atau minyak yang tengik akan bereaksi dengan asam tiobarbiturat menghasilkan warna merah. Intensitas warna yang dihasilkan menunjukkan derajat ketengikan (Kritianingrum, 2005).

Prosedur TBA yaitu 3 g sampel dimasukan kedalam tabung destilasi, kemudian dicuci dengan 48,5 ml aquadest dan ditambahkan 1,5 ml HCL 4 N. Setelah itu didestilasi hingga diperoleh destilat sebanyak 50 ml. Sebanyak 5 ml dari destilat dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml reagen TBA. Setelah itu dipanaskan selama 30 menit dan didinginkan, kemudian dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 528 nm.

$$\text{Nilai TBA} = \frac{3}{\text{Berat sampel}} \times \text{absorbansi} \times 7,8$$

3.4 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Pertama dilakukan pengisian kolom dengan cara bawah kolom diisi dengan sedikit kapas. Kemudian diisi dengan bubuk *silica gel* sebagai fase diam. Untuk membuat bubuk *silica gel* yaitu *silica gel* sebanyak 40 gram dilarutkan dengan fase gerak. Kemudian dimasukkan bubuk *silica gel* dan ditunggu selama 24 jam dan sesekali kolom diketuk sampai bubuk *silica gel* benar – benar mengendap. Panjang timbunan bubuk *silica gel* dalam kolom \pm 15 cm. Kemudian ditambahkan *sea sand* sebanyak 3 gram. Setelah persiapan dengan pengisian kolom, dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Mula – mula kromatografi kolom dialirkan ekstrak kasar *Pomacea canaliculata* L., kemudian kran kromatografi dibuka. Ekstrak akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Selanjutnya, dimasukkan pereaksi terus menerus sambil kran kolom dibuka. Pereaksi yang digunakan dalam pemisahan ini adalah eluen campuran pelarut non polar berupa kloroform dan polar berupa metanol teknis dengan perbandingan 5:5, 6:4, 7:3, 8:2. Fraksi yang terpisah ditampung dalam tabung reaksi sampai seluruh ekstrak terpisahkan.

3.5 Uji Spektrofotometri *Ultraviolet Visible* (UV – Vis)

Pengujian spektrofotometer UV – Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi sampel yang diamati, kemudian hasilnya digunakan untuk menganalisa karakteristik bioaktif ekstrak *Pomacea canaliculata* L. Pengujian ini menggunakan alat spektrofotometer UV – Vis. Menurut Fatimah *et al.*, (2009), cara analisa dengan alat spektrofotometer UV – Vis adalah mula – mula alat dinolkan dengan cara larutan blanko dimasukkan ke dalam dua buah kuvet lalu ditekan “*back correct*” dan “*run*”. Setelah alat dalam kondisi nol, salah

satu blanko dikeluarkan dan diganti dengan ekstrak *Pomacea canaliculata* L.. Kemudian, diatur panjang gelombang antara 200 nm – 700 nm. Maka akan muncul tampilan spektrum panjang gelombang dari ekstrak *Pomacea canaliculata* L.

3.6 Uji Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC – MS)

LC – MS adalah teknik di kimia analitik digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan menghitung setiap komponen dalam campuran. Hal ini bergantung pada pompa untuk lulus cairan bertekanan pelarut yang mengandung campuran sampel melalui kolom diisi dengan bahan padat adsorben. Setiap komponen dalam sampel berinteraksi sedikit berbeda dengan bahan adsorben, menyebabkan laju aliran yang berbeda untuk komponen yang berbeda dan mengarah ke pemisahan komponen karena mereka mengalir keluar kolom (Wikipedia, 2015).

