

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca listrik "Kern Ger", satu set alat ekstraksi sokshlet, kompor listrik "Maspion", oven "Carbolite", blender "Maspion", termometer, viscometer "Ostwald", aquarium, lampu neon, botol vial, kertas saring, piknometer dan sejumlah peralatan gelas yang biasa dipakai dalam penelitian di laboratorium serta seperangkat instrumen GC-MS "Shimadzu".

3.1.2 Bahan

Bahan penelitian ini adalah minyak ikan yang diisolasi dari ikan layang (*Decapterus maruadsi*) menggunakan pelarut n-Heksana (teknis) dan metode ekstraksi sokshlet. Bahan lain yang digunakan adalah sodium sulfat 10%, sodium sulfat anhidrat sebagai pelarut dalam pemurnian minyak sedangkan dalam penghitungan angka penyabunan menggunakan etanol 95%, KOH 0,1 N, indikator PP, aquades, dan HCl 0,5 N, serta tween dalam uji toksisitas untuk membuat minyak ikan larut dalam air.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Preparasi Ikan Layang

Ikan layang diambil dari Juwana kemudian dicuci dan dioven. Suhu pengopenan antara 70-100°C. Ikan layang yang telah dioven kemudian didestruksi dengan blender hingga berbentuk serbuk.

3.2.2 Isolasi Minyak Ikan Layang dengan Ekstraksi Sokshlet

Serbuk ikan layang ditimbang sebanyak 75 gram kemudian dibungkus dengan kertas saring membentuk silinder agar menjadi timble kemudian dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi sokshlet dan diekstraksi sampai tetesan pelarut menjadi jernih. Dalam hal ini pelarut yang digunakan adalah n-heksana.

3.2.3 Pemurnian Minyak Ikan

Ekstrak minyak ikan yang diperoleh dimurnikan dengan larutan Sodium Sulfat 10% menggunakan metode ekstraksi pelarut untuk membuang senyawa non lipid. Fraksi minyak ikan yang terpisah ditambah sodium sulfat anhidrat untuk mengambil air yang ikut terlarut kemudian disaring. Selanjutnya refinat dimasukkan ke dalam labu *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut n-heksana yang tersisa.

3.2.4 Karakterisasi Minyak Ikan

3.2.4.1 Penentuan densitas

Piknometer kosong ditimbang terlebih dahulu kemudian diisi dengan minyak sampai penuh dan tidak boleh ada rongga udara. Piknometer yang berisi minyak ini kemudian ditimbang kembali. Perhitungan:

$$\text{Densitas} = \frac{\text{berat piknometer berisi minyak} - \text{berat piknometer kosong}}{\text{Volume piknometer}}$$

3.2.4.2 Penentuan viskositas

Pertama-tama minyak ikan dimasukkan ke dalam viskometer ostwald kemudian dihisap sampai cairan melewati batas atas pipa kapiler. Setelah itu hisapan dilepaskan dan dicatat waktu yang diperlukan oleh minyak tersebut untuk melewati batas bawah. Perlakuan ini diulang terhadap air. Nilai yang diperoleh pada minyak dibandingkan dengan nilai dari air.

3.2.4.3 Penentuan angka penyabunan

Minyak ditimbang dengan teliti antara 1,5-5,0 g dalam erlemeyer 200 ml. Kemudian ditambah 50 ml larutan KOH yang dibuat dari 40 g KOH dalam 1 liter alkohol. Setelah itu ditutup dan dididihkan dengan hati-hati selama 30 menit.

Selanjutnya didinginkan dan ditambahkan beberapa tetes indikator phenolphthalein (PP) dan kelebihan larutan KOH dititrasi dengan larutan standar 0,5 N HCL. Untuk mengetahui kelebihan larutan KOH ini perlu dibuat titrasi blanko, yaitu dengan prosedur yang sama kecuali tanpa bahan minyak.

Angka penyabunan dinyatakan sebagai banyaknya mg KOH yang dibutuhkan untuk menyabunkan lemak secara sempurna dari 1 gram lemak atau minyak (Sudarmadji, dkk., 1997).

$$\text{Angka penyabunan} = \frac{28,05 \times (\text{titrasi blanko} - \text{titrasi})}{\text{Berat sampe (g)}}$$

3.2.5 Uji Toksisitas

3.2.5.1 Penetasan *Artemia salina* Leach

Media untuk penetasan telur udang dibuat dengan melarutkan 38 gram garam laut ke dalam 1000 ml aquades sehingga menjadi air laut buatan. Tempat penetasan telur berupa aquarium diisi dengan air laut (hasil buatan) secukupnya. Telur udang *Artemia salina* Leach dimasukkan dalam bagian sisi gelap (tertutup) dari tempat penetasan. Setelah larva udang berumur 2 x 24 jam sudah bisa dipakai untuk uji toksisitas.

3.2.5.2 Penentuan ambang kematian *Artemia salina* Leach

Ambang kematian *Artemia Salina* Leach ditentukan dengan memasukkan 10 ml ekstrak dengan konsentrasi 10; 100; 1000 ppm dalam botol vial. Sebagai kontrol, 10 ml larutan blangko dimasukkan pada botol vial, ditambah 1 tetes heksana. Sepuluh ekor larva *Artemia Salina* Leach dimasukkan ke dalam botol vial tersebut. Botol vial dijaga agar tetap mendapat penerangan. Jumlah *Artemia Salina* Leach yang mati dalam tiap botol vial dihitung setelah 24 jam perlakuan. Uji toksisitas ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 5 kali.

3.2.5.3 Perhitungan harga LD₅₀

Untuk menentukan nilai LC₅₀ digunakan program *Probit Analysis*, melalui hubungan antara konsentrasi ekstrak minyak ikan dengan persen kematian larva *Artemia Salina Leach*.

3.2.6 Identifikasi Minyak Ikan dengan GC-MS

Minyak ikan yang telah dimurnikan kemudian diidentifikasi dengan GC-MS untuk membuktikan adanya senyawa aktif anti kanker yaitu DHA dan EPA. Terlebih dahulu minyak ikan direfluk dengan boron trifluorida dalam metanol selama 15 menit. Larutan kemudian didinginkan pada temperatur kamar hingga terbentuk dua lapisan dan dipisahkan. Produk pada lapisan atas diinjeksikan sebanyak 40 µL ke dalam GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom dengan panjang 25 m dan diameter 0,25 mm dan ketebalan 0,25 µm dan fasa diam CP-Sil 5CB pada temperatur yang diprogram antara 60-270 °C dengan kenaikan temperatur 10 °C/menit dan temperatur detektor 280 °C. Kecepatan alir 30 mL/menit. Kromatogram dan spektrogram masing-masing senyawa yang diperoleh diidentifikasi menggunakan perbandingan pada data yang terdapat dalam daftar pustaka. Kesamaan spektra disimpulkan berdasarkan indek kemiripan (*Similarity Indeks*), kesamaan ion molekul dan puncak dasar.