

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah tentang kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak rumput laut *Padina australis* sebagai kandidat antioksidan alami untuk menangkal efek radikal bebas diperairan.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang dipakai dalam penelitian ini adalah metode deskriptif eksploratif. Penelitian deskriptif melakukan analisis hanya sampai taraf deskripsi yaitu menganalisis dan menyajikan data secara sistematis, Sehingga lebih mudah untuk dipahami dan disimpulkan sedangkan eksploratif adalah jenis penelitian yang bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala, fakta dan penyakit tertentu. Menurut Hamdi dan Bahruddin (2014), metode deskriptif yaitu suatu metode yang ditujukan untuk menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, yang berlangsung pada saat ini atau saat yang lampau. Metode deskriptif dapat mendeskripsikan suatu keadaan saja, tetapi bisa juga mendeskripsikan keadaan dalam tahapan-tahapan perkembangannya.

3.4 Teknik Pengambilan Data

Pengambilan data pada penelitian ini meliputi data primer dan data sekunder. Data primer didapat dari observasi, wawancara dan partisipasi

aktif. Sedangkan data sekunder diperoleh dari studi pustaka yaitu dapat berasal dari buku, jurnal, laporan skripsi dan sebagainya.

3.4.1 Data Primer

Data primer merupakan data asli oleh peneliti untuk menjawab masalah penelitiannya secara khusus. Data ini tidak tersedia, sebab sebelumnya belum pernah ada penelitian sejenis. Penelitian yang mengandalkan data primer relatif membutuhkan waktu, sumber daya dan biaya yang lebih besar. Kelebihan dari data primer adalah kredibilitasnya relatif tinggi, sebab pepenelitian mampu mengontrol data yang akan digunakan dalam penelitiannya (Istijantijanto, 2005 ; Kurnianingtyas dan Nugroho, 2012). Data primer yang diambil dalam penelitian ini meliputi kadar kandungan senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak rumput laut *padina australis*. Data primer dalam penelitian ini diperoleh dari hasil observasi. Observasi dapat disebut juga sebagai pengamatan, pada kegiatan observasi akan didapatkan sebuah data atau gambaran-gambaran secara khusus. Pada pengumpulan data dengan cara observasi akan didapatkan data yang menyeluruh dan sesuai dengan kenyataannya karena dilakukan langsung dari objek penelitian melalui pengamatan. Pada metode ini didapatkan hasil deskriptif yang relatif lengkap (Soekanto, 1986 ; Djaelani, 2013). Adapun Observasi yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain pembuatan ekstrak rumput laut *Padina australis*, pengujian identifikasi ekstrak rumput laut *Padina australis* dengan metode GC-MS, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan IC₅₀.

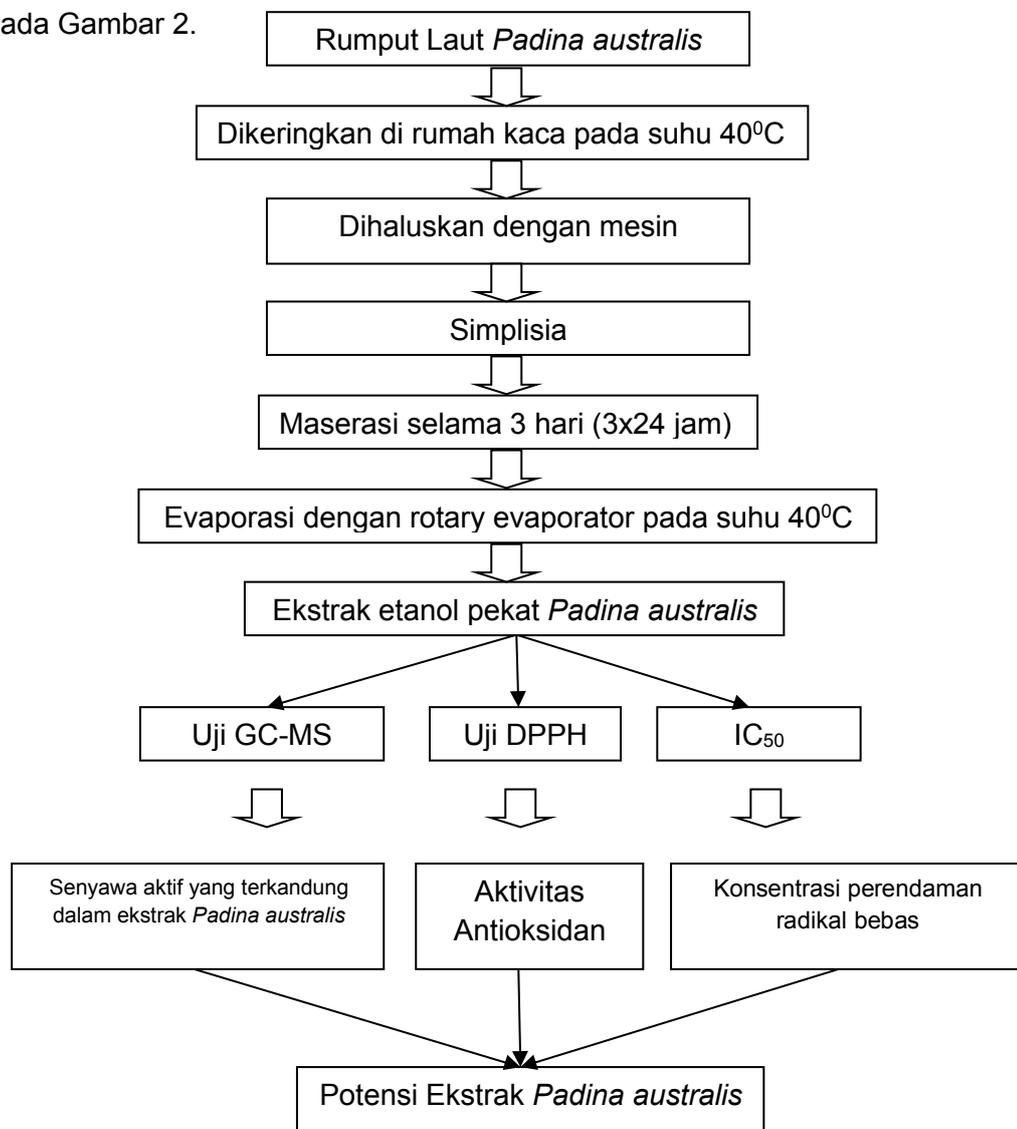
3.4.2 Data Sekunder

Data sekunder merupakan data primer yang yang diperoleh pihak lain (telah diolah) dan disajikan baik oleh pengumpul maupun pihak lain. Data sekunder bersifat sebagai pendukung untuk melengkapi data primer. Contoh dari data

sekunder seperti penelitian kepustakaan, pusat bank data, media masa dan lembaga penelitian (Mulyanto, 2008). Data sekunder dalam penelitian ini didapat dari laporan, jurnal, majalah, laporan PKL/Skripsi, situs internet serta kepustakaan yang menunjang penelitian ini.

3.5 Prosedur penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu ekstraksi rumput laut, Identifikasi Senyawa Ekstrak *Padina australis* dengan GC-MS, Uji Antioksidan yang meliputi uji inhibisi dan IC₅₀. Diagram alir tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram alir tahapan penelitian

3.5.1 Pengambilan Rumput Laut *Padina australis*

Rumput laut *Padina australis* diperoleh dari lokasi budidaya rumput laut di Pantai Poteran Kecamatan Talango Kabupaten Sumenep, Madura. Secara geografis Pantai Poteran terletak pada 113, 920 – 114, 08^o LS dan 7, 040 – 7, 12^oBT (Peta Lokasi dapat dilihat pada Lampiran 3). Penanganan sampel di lapang dilakukan dengan metode penurunan suhu yang dilakukan dengan menyimpan sampel pada *ice box* yang berisi balok es untuk menjaga kesegaran selama perjalanan dari lokasi pengambilan ke laboratorium.

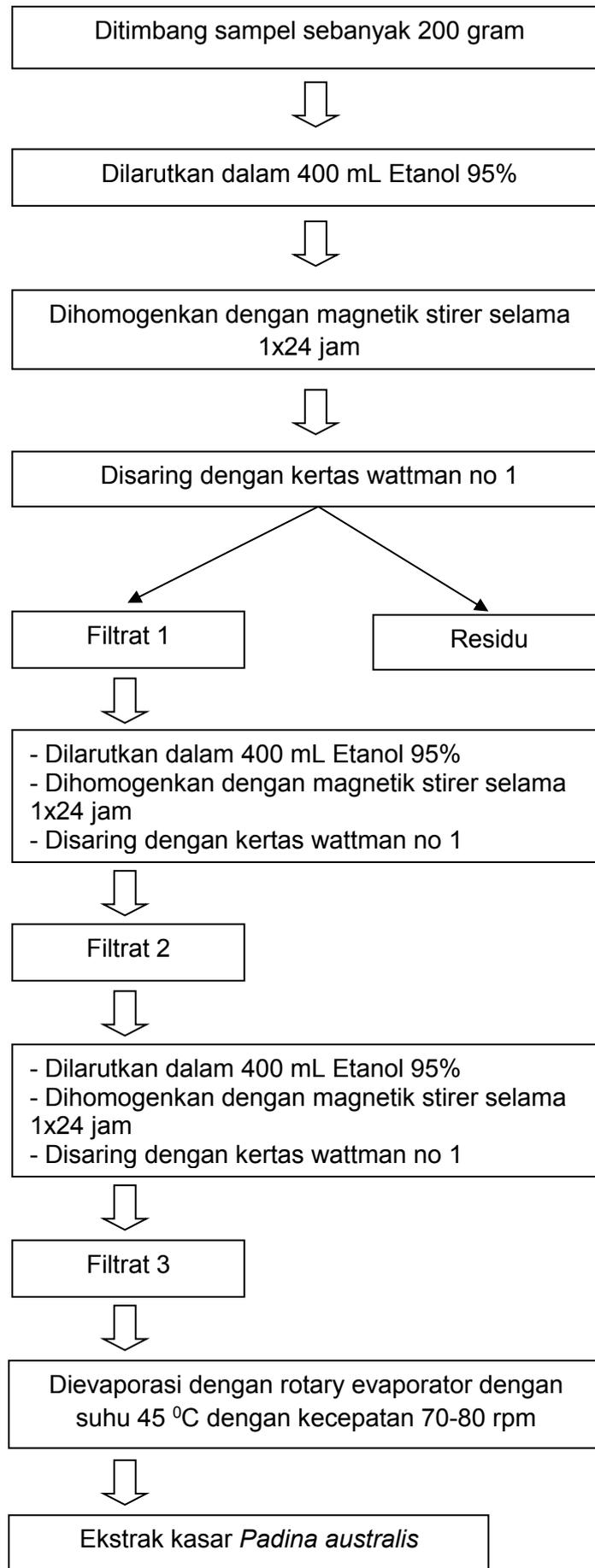
3.5.2 Persiapan dan Pembuatan Ekstraksi Rumput laut *Padina australis*

Proses ekstraksi rumput laut *Padina australis* dilakukan di Teknologi Hasil Perikanan Divisi Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Rumput laut yang sudah diperoleh dari perairan Pantai Pulau Poteran Talango Madura sebanyak 15 kg, kemudian dibersihkan dari kotoran-kotoran yang melekat dan kemudian dicuci dengan air mengalir (Siregar *et al.*, 2012). Sebelum dikeringkan sampel terlebih dahulu ditimbang guna diketahui berat basah. Rumput laut dikeringkan dengan cara dikering anginkan di rumah kaca yang bersuhu 40^oC selama 5 hari, dengan tujuan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Proses pengeringan yang benar akan menghasilkan senyawa aktif yang nantinya dapat digunakan lebih lanjut (Masduqi *et al.*, 2014).

Rumput laut yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan mesin giling hingga menjadi serbuk simplisia. Penghalusan dilakukan dengan tujuan memperluas permukaan sampel, sehingga mempermudah kontak antara pelarut dan sampel pada saat ekstraksi maserasi. Serbuk simplisia yang diperoleh sebanyak 750 gram. Serbuk simplisia kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95% dengan perbandingan

pelarut dan sampel yaitu 2:1 selama 24 jam. Simplisia ditimbang sebanyak 200 gram dan dimasukkan ke beaker glass. Selanjutnya dilakukan perendaman (maserasi) dengan pelarut etanol 400 ml dan diredam selama 2x12 jam pada filtrat pertama, kemudian maserat disaring menggunakan kertas *whatman* no. 1 sehingga diperoleh filtrat pertama. Filtrat pertama disimpan di dalam botol sedangkan ampas sampel direndam kembali dengan pelarut yang sama dengan perbandingan pelarut dan sampel yaitu 2:1. Hal yang sama dilakukan pada maserasi ketiga selama 24 jam. Hasil maserasi yang telah disaring kemudian dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* pada suhu 45°C agar terbentuk ekstrak kental (Zen *et al.*, 2015).

Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan stirer dan hot plate. Sampel dikondisikan dalam keadaan gelap dan kedap udara dengan menutup beaker glass menggunakan plastik warp kemudian dilapisi kembali dengan aluminium foil. Hal ini dikarenakan kelemahan dari antioksidan diantaranya adalah sifatnya yang mudah rusak bila terpapar oksigen, cahaya, suhu tinggi dan pengeringan (Suryaningrum, 2006). Simplisia yang sudah dimaserasi kemudian disaring dan menghasilkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh dari hasil maserasi sebanyak 1000 ml. Filtrat rumput laut *Padina australis* yang terkumpul kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dengan kecepatan 70-80 rpm. Ditunggu sampai tidak terjadi lagi pengembunan pelarut pada kondensor atau menunjukkan semua pelarut telah menguap hingga filtrat menjadi pasta berwarna hijau tua pekat. Ekstrak dalam bentuk pasta kemudian ditimbang dan didapatkan hasil sebanyak gram. Diagram alir tahapan Ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram alir tahapan Ekstraksi

3.5.3 Identifikasi Senyawa Ekstrak Rumput Laut *Padina australis* dengan Gas Chromatography Mass Spectrofotometry (GC-MS)

Metode GC-MS adalah sebuah metode uji yang menggabungkan metode kromatografi gas dan spektrofotometri massa sehingga dapat memisahkan dan mengidentifikasi satu demi satu komponen-komponen yang ada dalam sampel.. Identifikasi senyawa ekstrak *padina australis* dengan GC-MS mengacu pada penelitian Darmapatni *et al.* (2014), analisis ini dilakukan dengan alat kromatografi gas jenis Agilent 6890N yang dilengkapi dengan detektor massa selektif jenis Agilent 5973. helium (99%) digunakan sebagai gas pembawa pada laju air 1 ml/menit, 1 μ L ekstrak disuntikkan dengan suhu injektor 250 $^{\circ}$ C, suhu detektor 230 $^{\circ}$ C dan split rasio 1:20. Program temperatur pada kolom adalah suhu awal kolom 70 $^{\circ}$ C ditahan selama 5 menit, dinaikkan 10 $^{\circ}$ C/menit hingga suhu 270 $^{\circ}$ C dan ditahan 5 menit sehingga diperoleh total waktu 30 menit.

3.5.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) DPPH dan Perhitungan IC₅₀

Menurut Sari *et al.* (2015), adapun prosedur pengukuran aktivitas senyawa antioksidan dengan menggunakan DPPH adalah sebagai berikut (bagan alir prosedur DPPH dapat dilihat pada Gambar 4) :

- a. Pembuatan larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) konsentrasi (0,1 mM). Ditimbang 4 mg DPPH (Ar 394,32) lalu dilarutkan dengan etanol hingga 100 ml, kemudian ditempatkan dalam botol gelap (Perhitungan pembuatan larutan dapat dilihat pada Lampiran 4).
- b. Pembuatan larutan blanko dengan cara menggunakan pipet volume dengan mengambil 1 ml larutan DPPH (0,1 mM) ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5 ml, lalu ditambahkan etanol hingga tanda, dan dihomogenkan. Mulut tabung ditutup dengan *aluminium foil*.

- c. Pembuatan larutan induk ekstrak *Padina australis*. Ditimbang 40 mg sampel, lalu dilarutkan dalam 20 ml etanol.
- d. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak *Padina australis* dengan cara sebanyak 250, 500, 1000 dan 2000 µl dari larutan induk ekstrak *Padina australis* diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5 ml untuk mendapatkan konsentrasi sampel 100, 200, 400 dan 800 ppm ke dalam masing-masing tabung. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH dan ditambahkan dengan etanol sampai tanda 5 ml. Campuran dihomogenkan dan mulut tabung ditutup dengan *aluminium foil*. Diamati perubahan warna yang terjadi dan catat hasilnya.
- e. Pembuatan Larutan Induk Vitamin C dengan cara ditimbang 4 mg sampel, lalu dilarutkan kedalam 20 ml metanol pa untuk mendapatkan konsentrasi 200 ppm.
- f. Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C dengan cara sebanyak 125, 250, 375 dan 500 µl dari larutan induk vitamin C diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditata 5 ml untuk mendapatkan konsentrasi sampel 5, 10, 15 dan 20 ppm ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 1 ml larutan DPPH dan ditambahkan dengan etanol sampai tanda 5 ml. Campuran dihomogenkan dan mulut tabung ditutup dengan *aluminium foil*. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi dan catat hasilnya.
- g. Pengukuran Serapan dengan cara beberapa konsentrasi diinkubasi 37°C selama 30 menit dengan inkubator, serapan diukur pada panjang gelombang maksimum 517 nm menggunakan spektrofotometer uv-vis. Menurut Pratiwi *et al.* (2006), radiaksi bebas DPPH stabil dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 517 nm dan dapat

direduksi oleh senyawa antioksidan. Kemudian dicatat hasil absorpsi tiap sampel uji.

h. Cara perhitungan

Presentase inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

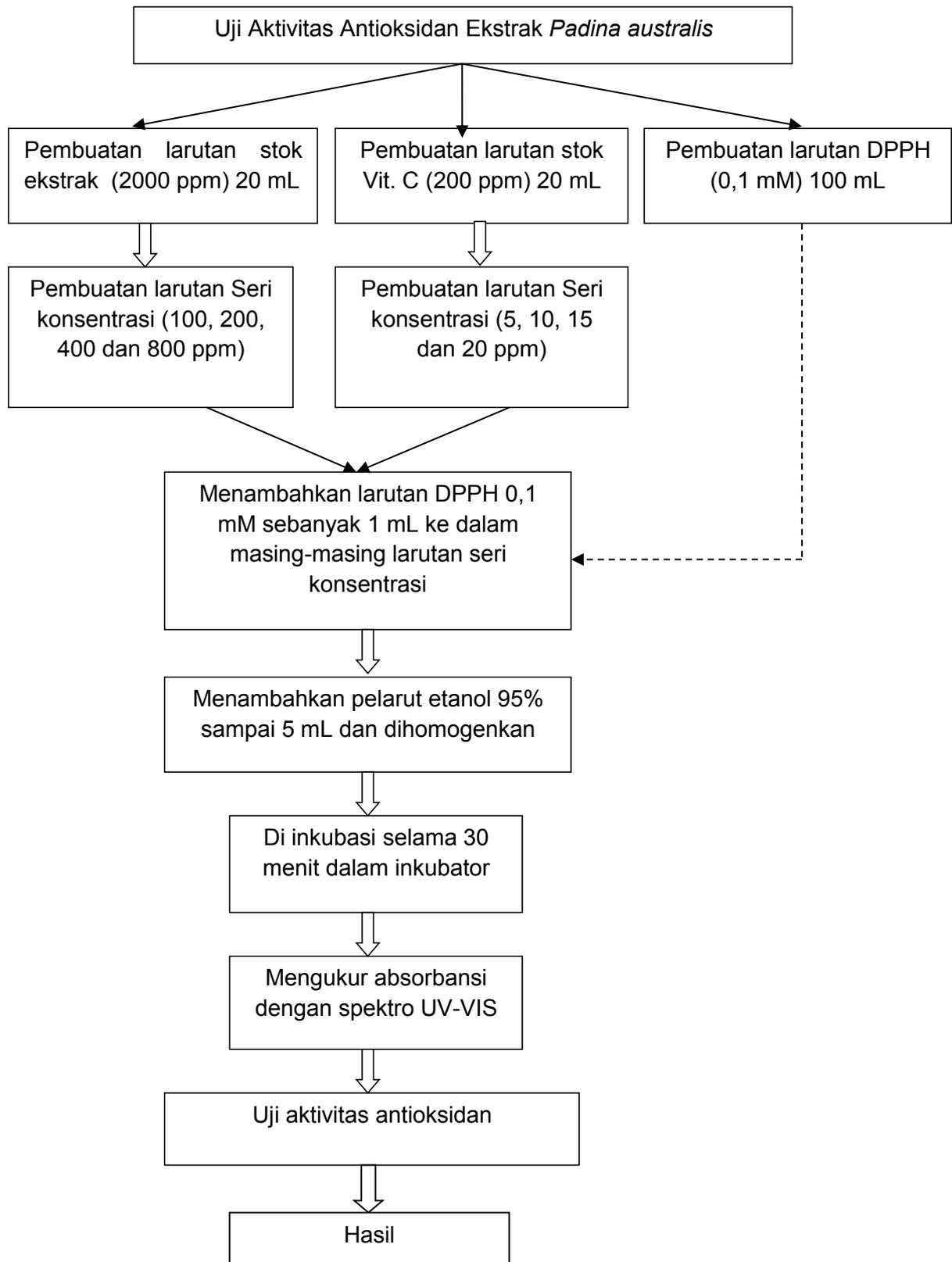
$$\text{Hambatan aktivitas radikal bebas (\%)} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\%$$

Keterangan :

Ab : Serapan larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dalam etanol

As : Serapan larutan DPPH (1,1-diferenil-2-pikrilhidrazin) setelah bereaksi dengan sampel

Nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration*) diperoleh dari perpotongan garis antara persen hambatan (sebagai sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x), kemudian dimasukkan ke dalam persamaan garis $Y = a + bx$, dimana $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC_{50} . Diagram alir tahapan Uji DPPH dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram alir tahapan Uji DPPH