

3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Juli 2014. Sampel alga coklat *Sargassum cristaefolium* diambil dari perairan Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Proses ekstraksi dan analisis dilakukan di beberapa laboratorium yaitu : Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Faal FK Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Universitas Politeknik Negeri Malang, dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama, bahan untuk proses perendaman, proses ekstraksi, pengujian antioksidan dan pengujian kadar epigalokatekin galat (EGCG). Bahan utama yang digunakan berupa alga coklat *Sargassum cristaefolium* yang diperoleh dari Desa Cabiya, Kecamatan Talango, Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur.

Bahan yang digunakan untuk proses perendaman adalah larutan kapur (Ca(OH)_2) dan pH meter. Bahan yang digunakan untuk proses ekstraksi yaitu pelarut etil asetat teknis, kertas saring Whatman no. 42, aluminium foil, kertas label dan es batu. Bahan-bahan yang digunakan untuk pengujian antioksidan dengan metode DPPH (*2,2-diphenil-1-pikrilhidrazil*) adalah pelarut etil asetat P.A, aluminium foil dan serbuk DPPH.

3.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk proses pembuatan 'teh' batang alga coklat, proses ekstraksi, proses pengujian antioksidan dan pengujian kadar epigalokatekin galat (EGCG). Alat-alat yang digunakan untuk proses pembuatan 'teh' batang alga coklat yakni pH meter, *microwave*, *coolbox*, sikat, nampan, gunting, baskom, blender dan timbangan digital. Alat-alat yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah *beaker glass* 500 ml, gelas ukur 100 ml dan 200 ml, erlenmeyer 250 ml dan 300 ml, spatula, timbangan digital, corong, *rotary vacuum evaporator*, blender dan kipas angin. Alat yang digunakan untuk pengujian antioksidan dengan metode DPPH yakni botol vial, pipet volume, bola hisap dan spektrofotometer uv-vis merk simatsu.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif (non hipotesis). Metode eksploratif dilakukan untuk mencapai tujuan yang utama yakni mengetahui jumlah kadar epigalokatekin galat (EGCG) dari "teh" batang alga coklat *Sargassum cristaefolium*. Metode eksploratif merupakan penelitian yang dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak sama sekali. Menurut Sandjaja dan Heriyanto (2006), penelitian deskriptif bertujuan untuk mendeskripsikan gejala-gejala yang terjadi pada masa itu. Desain penelitian ini biasanya hanya melibatkan satu variabel saja. Penelitian deskriptif umumnya tidak hendak menguji hipotesa, melainkan hanya memaparkan suatu obyek apadanya secara sistematis.

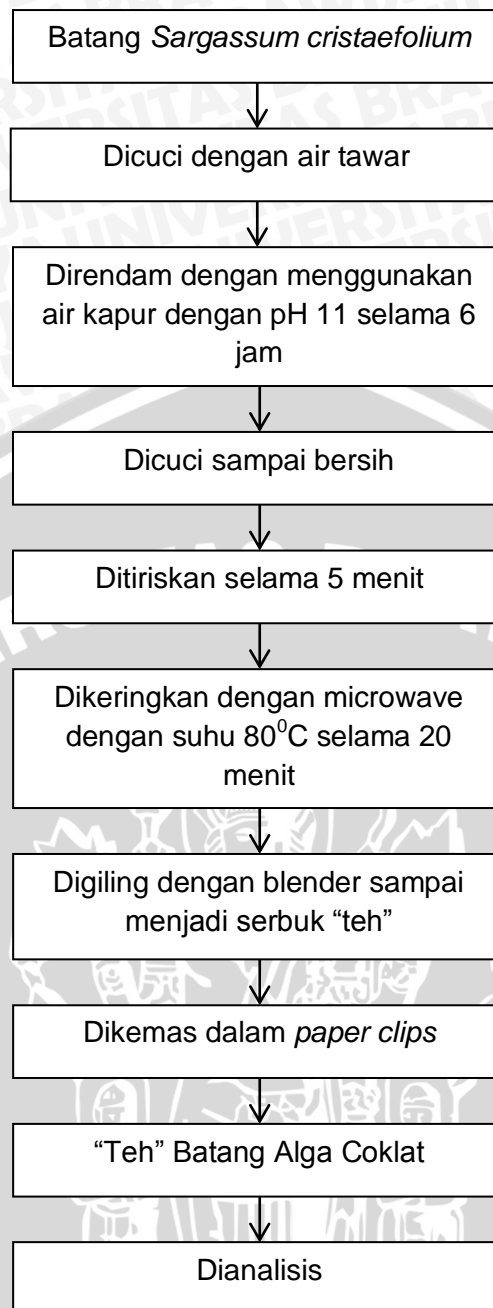
3.4 Variabel Penelitian

Menurut Surachmad (1994), ada dua macam variabel dalam penelitian yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang

diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan batang alga coklat *Sargassum cristaefolium* yang berbeda yaitu berupa segar (alga coklat diangin-anginkan selama 6 jam), kering (rumput laut yang dikeringkan dengan sinar matahari selama 2x24 jam), "teh" (rumput laut yang direndam dengan larutan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pH 11 selama 6 jam dan dikeringkan menggunakan *vacuum dryer* suhu 80°C selama 20 menit), serta perlakuan "teh seduh" batang alga coklat (berasal dari perlakuan "teh" yang diekstrak menggunakan pelarut aquades). Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar epigalokatekin galat (EGCG). Skema pembuatan "teh" alga coklat *Sargassum cristaefolium* dapat dilihat pada Gambar 4.





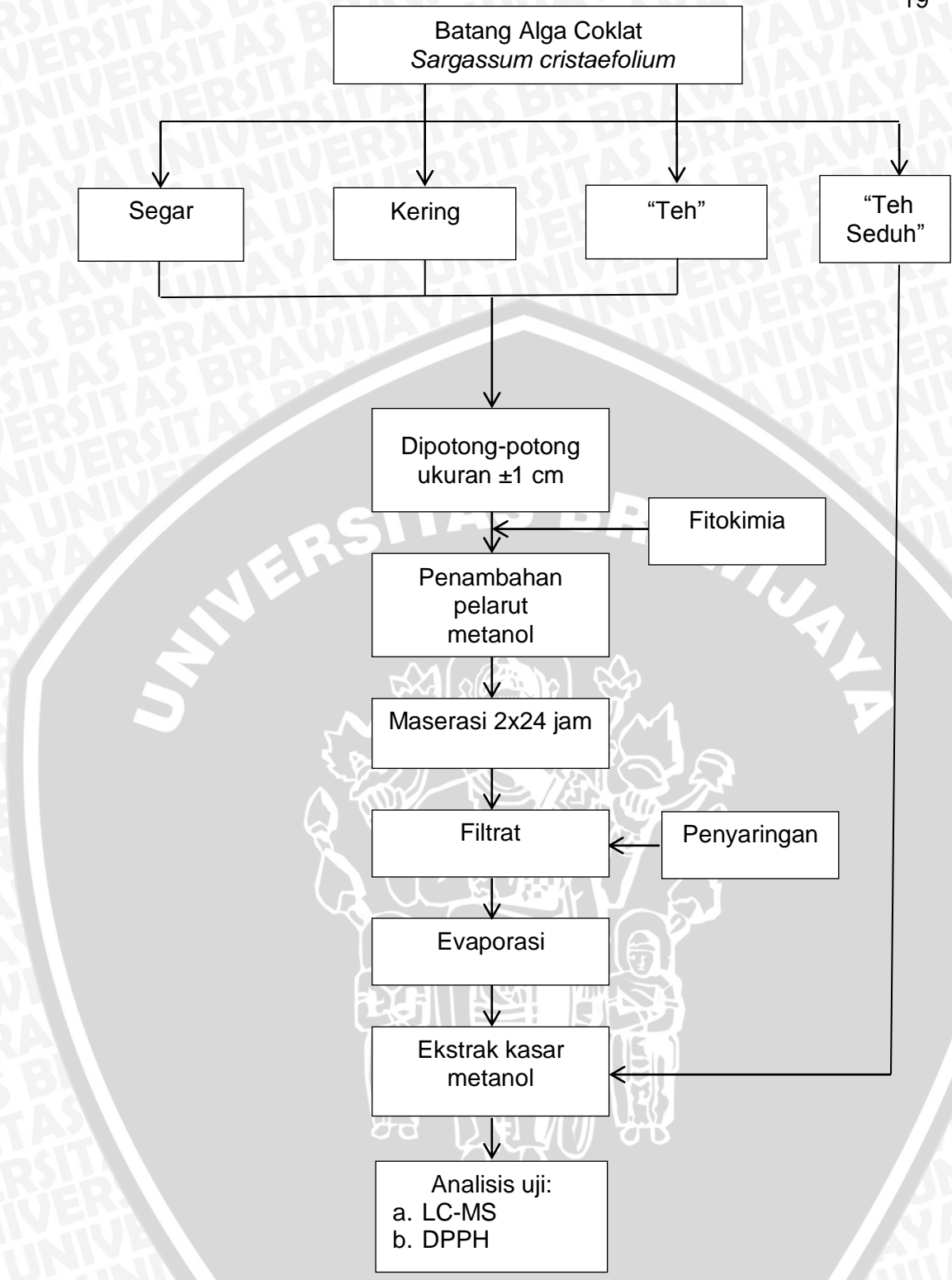
Gambar 4. Skema Pembuatan "Teh" Batang Alga Coklat (Hernawan, 2011)

3.5 Prosedur Penelitian

Sargassum cristaefolium yang telah dibedakan penanganannya awalnya diekstraksi. Ekstraksi *Sargassum cristaefolium* menggunakan pelarut metanol. Pada sampel segar batang alga coklat *Sargassum cristaefolium* dihaluskan dengan menggunakan blender dan ditimbang sebanyak 25 gram. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan pelarut sebanyak

400 ml. Sampel kering dan basa kering dihaluskan dengan blender kemudian ditimbang sebanyak 10 gram. Sampel tersebut kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan ditambahkan pelarut sebanyak 160 ml. *Beaker glass* yang berisi sampel dan larutan kemudian di bungkus dengan aluminium foil lalu dimaserasi selama 2 x 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya sampel disaring dengan kertas saring Whatman no 42 sehingga akan diperoleh hasil filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan 75 rpm. Setelah sampel dievaporasi, diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenil-2picrylhydrazil) dan kadar epigalokatekin galat (EGCG) dengan metode LC-MS/MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*). Skema kerja prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.





Gambar 5. Skema Kerja Prosedur Penelitian



3.5.1 Uji fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya komponen bioaktif yang terdapat pada rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium*. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Metode uji didasarkan pada Harbone (1987) dan Tarigan *et al.*, (2008). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 10.

3.5.1.1 Alkaloid (Tarigan *et al.*, 2008)

Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N pada 1 gr sampel kemudian diuji dengan tiga pereaksi alkaloid yaitu, pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, dan pereaksi Wagner. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan putih kekuningan dengan pereaksi Meyer, endapan coklat dengan pereaksi Wagner dan endapan merah hingga jingga dengan pereaksi Dragendorff.

3.5.1.2 Flavonoid (Harborne, 1987)

Sejumlah sampel sebanyak 0,5 gr ditambahkan 15 ml metanol dan dipanaskan di *waterbath* dengan suhu 50 °C selama 5 menit kemudian disaring dan ditambahkan 5 tetes H₂SO₄ pekat. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

3.5.1.3 Tanin (Harborne, 1987)

Sejumlah sampel sebanyak 5 gr ditambahkan aquadest 50 ml dan dididihkan selama 10 menit dengan *waterbath* suhu 100 °C. Sampel disaring dan diperoleh filtrat kemudian ditetesi 3 tetes FeCl₃ 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kehijauan pada campuran.

3.5.1.4 Saponin (uji busa) (Harborne, 1987)

Saponin dapat dideteksi dengan cara 0,5 gr sampel dilarutkan dalam aquadest 20 ml kemudian dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 80 °C selama ±5 menit. Lalu sampel didinginkan, disaring dan dikocok selama 10 menit. Apabila terdapat busa menandakan adanya senyawa saponin yang terkandung di dalam sampel.

3.6.2 Uji Antioksidan (DPPH) (Andayani et al., 2008)

Uji aktivitas antioksidan sampel *Sargassum cristaefolium* dalam mereduksi radikal bebas diukur dengan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) (Andayani et al., 2008). Sebanyak 1 ml larutan DPPH 0,2 mM dalam metanol dimasukkan kedalam 1 ml larutan ekstral (konsentrasi 5, 10, 15, dan 20 ppm) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit. Serapan yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm, dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Prosedur uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada lampiran. Presentase penghambatam aktivitas radikal bebas diperoleh dari nilai absorbansi sampel yang dihitung dengan rumus :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Persamaan regresi diperoleh dari hubungan antara konsentrasi sampel dan presentase penghambatan aktivitas radikal bebas. Nilai konsentrasi penghambatan aktivitas radikal bebas sebanyak 50% (IC₅₀) dihitung dengan menggunakan persamaan regresi. Nilai IC₅₀ diperoleh dengan memasukkan y=50 serta nilai A dan B yang telah diketahui. Nilai x sebagai IC₅₀ dapat dihitung dengan persamaan:

$$y = A + B \ln(x)$$

Keterangan:

y = persen inhibisi

x = konsentrasi sampel (ppm)

A = *slope*

B = *intercept*

3.6.3 Uji LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) merupakan suatu teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Kelebihan dari teknologi ini adalah spesifitas (hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor), aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis, mampu mengukur analit yang sangat polar, fleksibilitas (pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat) dan kaya informasi baik data kuantitatif maupun kualitatif (Ginting, 2012).

Uji LC-MS dilakukan berdasarkan metode Chang *et al.*, (2010) yang telah dimodifikasi. Alat yang digunakan adalah *Liquid Chromatography Mass Spectroscopy waters* tipe Hitachi L 6200. Fase gerak berupa aseton ninhidril dan air bergerak menuju kolom yang berupa fase diam dengan menggunakan pompa. Sebanyak 1 ml standard EGCG dan sampel ekstrak batang alga coklat *Sargassum cristaefolium* dengan konsentrasi 0,25 ppm, 0,30 ppm, 0,35 ppm dan 0,43 ppm disuntikkan ke dalam kolom. Suhu 30°C digunakan secara tetap dan tidak berubah. Pada kolom, senyawa polar akan keluar lebih dahulu daripada senyawa non polar. Dideteksi dengan menggunakan MS (*Mass spectrometry*) dan dihitung berat massanya.

