

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi dua macam yaitu bahan utama dan bahan tambahan. Bahan utama yaitu berupa alga coklat *Sargassum duplicatum* yang nantinya akan di ekstraksi untuk didapatkan senyawa aktifnya. Alga coklat jenis *Sargassum duplicatum* didapatkan dari Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Letak dari pulau ini pada sebelah utara berbatasan dengan Selat Talango, sebelah selatan berbatasan dengan Selat Madura, sebelah timur berbatasan dengan Selat Sapudi dan sebelah barat berbatasan dengan Selat Talango sendiri. Selain itu, minyak ikan lemuru yang digunakan sebagai bahan utama dalam uji aktivitas antioksidan yang didapatkan dari pelabuhan Muncar, Banyuwangi. Bahan-bahan penunjang lain yang digunakan berupa pelarut N-heksan, etil asetat, *sea sand* dan silica gel didapatkan dari Panadia Jalan Taman Sulfat Malang.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital merk *Mettler Toledo*, gunting, mortar, beaker glass 40 mL, 45 mL, 200 mL dan 1000 mL dengan merk *pyrex*, Erlenmeyer 250 mL merk *pyrex*, gelas ukur 10 mL dan 100 mL merk *pyrex*, corong kaca merk *pyrex*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *rotary evaporator vacuum* merk Hahn Shin, spatula, botol sampel, pipet volume 1 mL dan 10 mL, bola hisap, pipet tetes, statif, dan corong pisah. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah spektrofotometer UV-Vis 1601 merk Shimadzu, LC-MS merk *Eluent MeOH* kolom kromatografi dengan panjang 30 cm dan diameter 2 cm, tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikro pipet, dan penggaris.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dan deskriptif. Hasan (2002), menyebutkan bahwa metode eksperimental memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti sebab akibatnya, sedangkan deskriptif berarti mendeskripsikan variabel demi variabel, satu demi satu dengan tujuan untuk mengumpulkan informasi aktual secara rinci yang menggambarkan gejala yang ada, mengidentifikasi masalah atau memeriksa suatu kondisi dan membuat evaluasi.

Penelitian kali ini, peneliti mencoba untuk mengetahui konsentrasi optimasi dari senyawa aktif *Sargassum duplicatum* sehingga mampu menghambat terjadinya oksidasi pada minyak ikan lemuru. Penelitian ini dibagi menjadi dua tahapan, yaitu: penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan menggunakan bahan utama dari hasil ekstraksi alga coklat *Sargassum duplicatum* yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan yang kemudian diambil ekstrak kasar alga coklat *Sargassum duplicatum* dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Lalu hasil ekstrak diisolasi dengan menggunakan kromatografi kolom untuk mendapatkan berbagai jenis senyawa aktif yang dikelompokkan kedalam fraksi warna. Setelah itu dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan terhadap minyak ikan lemuru menggunakan uji peroksida dan iod, kemudian hasil fraksi warna dengan aktivitas antioksidan terbaik berdasarkan hasil uji peroksida dan iod akan dijadikan acuan untuk dilanjutkan kedalam penelitian utama.

Penelitian utama menggunakan fraksi warna yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, yang kemudian dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu: 0 ppm; 100 ppm; 200 ppm dan 300 ppm dengan masa simpan 1 hari; 5 hari dan 10 hari yang masing-masing diujikan kedalam 5 ml minyak ikan lemuru dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi

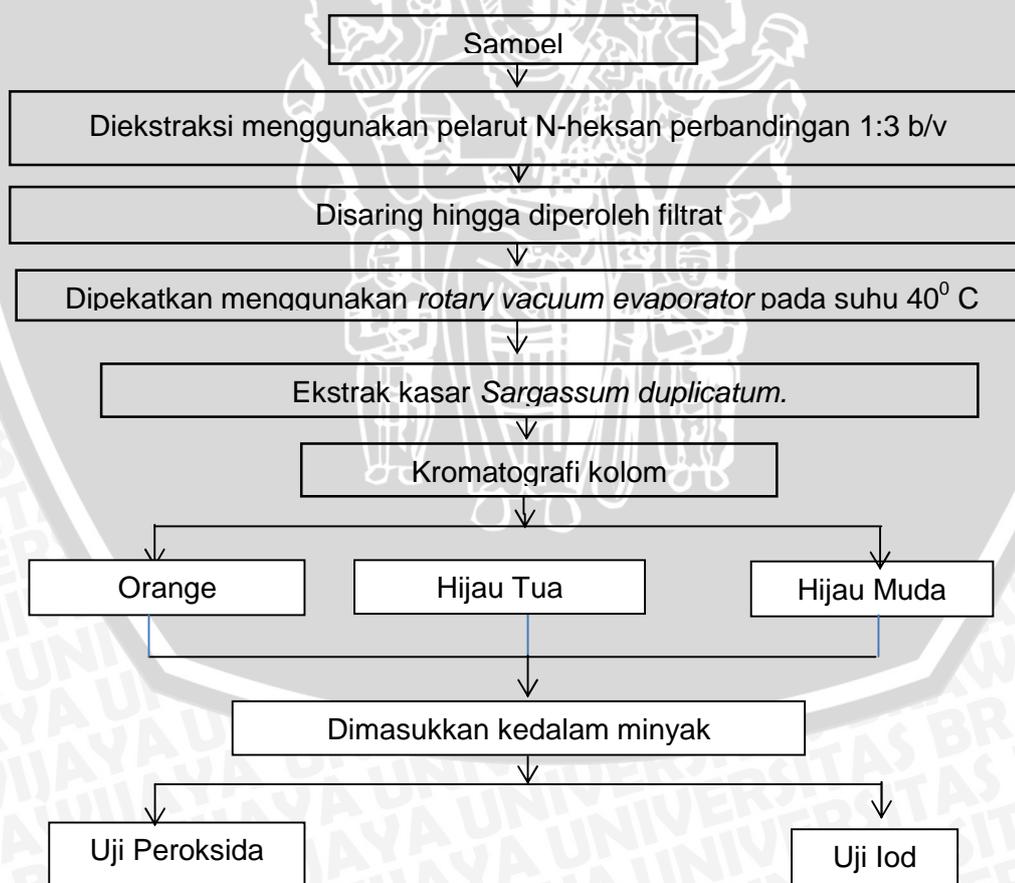
optimasi aktivitas antioksidan dalam menghambat oksidasi lipid berdasarkan uji peroksida, iod dan DPPH.

Selain itu, dari hasil fraksi penelitian pendahuluan dilakukan uji dengan alat spektrofotometri UV-Vis untuk menduga komponen senyawa yang terkandung dalam fraksi warna tersebut berdasarkan panjang gelombangnya. Kemudian diperkuat dengan uji LC-MS untuk mengetahui gugus fungsi dari senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi warna tersebut.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Kegiatan dalam penelitian pendahulu meliputi isolasi senyawa yang terdapat pada *Sargassum duplicatum* dan uji senyawa antioksidan fraksi-fraksi terhadap daya hambat radikal bebas pada minyak ikan lemuru. Diagram alir proses penelitian pendahuluan dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan (Khotimah, 2013)

3.3.1.1 Penanganan Sampel

Sargassum duplicatum adalah bahan utama dalam uji senyawa antioksidan yang didapat dari perairan di Desa Cabiya, Pulau Talango, Madura. Bahan baku diambil secara langsung dari dalam laut dan langsung dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran dan lendir yang menempel, kemudian dibilas dengan air sampai bersih dengan menggunakan air tawar. Alga coklat *Sargassum duplicatum* selanjutnya dimasukkan ke dalam kantong *polybag* hitam dan disimpan ke dalam *coolbox* yang ditambahkan air laut. Tujuannya untuk mempertahankan kesegaran bahan utama hingga sampai di Malang, dan penyimpanan selanjutnya dilakukan di dalam *freezer*.

Bahan utama digunakan untuk uji senyawa antioksidan. Persiapan sampel yaitu *Sargassum duplicatum* diambil dari *freezer*, kemudian dicuci kembali dengan air tawar yang mengalir dan disikat bagian daunnya. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan kotoran seperti pasir dan lendir yang masih menempel pada alga coklat. Alga coklat yang telah bersih ditiriskan menggunakan keranjang, bertujuan untuk mengurangi resapan air yang terdapat pada bahan. Alga coklat yang sudah ditiriskan. Alga coklat dikeringkan dengan cara dibeberkan di atas lembaran koran untuk mengurangi kandungan air pada bahan, dan dilanjutkan ke tahap proses ekstraksi.

Alga coklat kemudian di angin-anginkan dengan suhu ruang. Alga coklat yang sudah kering selanjutnya digiling dengan blender sampai menjadi serbuk, dan siap dilakukan untuk tahapan selanjutnya yaitu ekstraksi.

3.3.1.2 Ekstraksi *Sargassum duplicatum* (Fahri, 2010; Darwis, 2000)

Sampel segar Alga coklat *Sargassum dupplicatum* yang telah dicuci bersih ditimbang sebanyak 100 gram. Selanjutnya *Sargassum dupplicatum* dipotong kecil-kecil dan di angin-anginkan. Ekstraksi yang dilakukan dengan

menggunakan metode maserasi yaitu merendam *Sargassum dupplicatum* dengan pelarut N-heksan (1:3 b/v) untuk menarik senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam *Sargassum dupplicatum*. Maserasi dilakukan selama 3 kali 24 jam, dengan mengganti pelarut baru setiap harinya untuk mengoptimalkan penarikan senyawa-senyawa aktif tersebut. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No. 1 dan pemekatan menggunakan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 40°C dan 100 rpm. Ekstrak kasar kemudian di Nitrogen agar menjadi ekstrak kering dan bebas dari campuran pelarut.

3.3.1.3 Pemisahan Fraksi dengan Kromatografi Kolom (Diah et al., 2003)

Pemisahan senyawa yang terdapat pada *Sargassum dupplicatum* dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Fraksinisasi pada kolom kromatografi menggunakan fase diam *silica gel* 60 GF₂₅₄ sedangkan fase gerak yang digunakan adalah N-heksan : etil asetat (8:2) v/v. Fase diam dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 40 gram bubuk *silica gel* 250 ml fase gerak kemudian diaduk dengan menggunakan *stirer* hingga didapatkan bubuk *silica gel*. Bubur *silica gel* dimasukkan secara perlahan dan tidak boleh terputus kedalam tabung kolom kromatografi agar tidak terbentuk gelembung udara. Tabung kromatografi kolom diketuk-ketuk dan diberi pasir halus sebagai pelapis, selanjutnya ditunggu hingga *silica gel* memadat sempurna. Ekstrak kasar *Sargassum dupplicatum* dilarutkan dengan fase gerak kemudian dimasukkan secara perlahan kedalam tabung kolom kromatografi. Katup pada tabung kolom kromatografi dibuka dan tetesan yang keluar ditampung pada tabung reaksi setiap 5 ml.

Pemisahan fraksi pada kolom kromatografi ini menghasilkan 40 fraksi, dengan fraksi yang berwarna hijau tua terdapat pada tabung ke-11 pada menit 20.53, pada fraksi warna hijau muda terdapat pada tabung ke-22 pada menit

00.21, dan pada fraksi warna orange terdapat pada tabung ke-31 pada menit 04.28.

3.3.1.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Minyak Ikan Lemuru

Minyak ikan lemuru yang telah didapatkan masih perlu diolah terlebih dahulu dengan melakukan pemurnian minyak ikan lemuru, tahapan pemurnian minyak ikan lemuru sebagai berikut : dilakukan proses degumming, degumming merupakan proses pemisahan antara kotoran dengan minyak dengan pengendapannya. Proses ini dilakukan dengan menambahkan larutan NaCl 8% sebanyak 40% dari volume minyak yang akan di murnikan pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian dilakukan proses netralisasi, minyak ikan yang sudah dilakukan proses proses degumming maka minyak ikan akan ditambahkan NaOH 0,02 M sesuai kandungan asam lemak bebasnya (ALB) dengan suhu 70°C selama 15 menit kemudian atau sampai sabun yang terbentuk menggumpal. Selanjutnya minyak didinginkan terlebih dahulu kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Kemudian didapatkan hasil minyak ikan lemuru murni.

3.3.1.4.1 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 250ml, 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 ruang gelap dengan sesekali dikocok. Setelah itu dilarutkan 30ml aquades. Langkah terakhir larutan dititrasi dengan sodium tiosulfat 0.01 N. Bilangan peroksida dinyatakan dalam persamaan:

$$\text{Bilangan Peroksida} = \frac{v \text{ titran sampel} - v \text{ titran blanko} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \times 1000}{v \text{ sampel}}$$

3.3.1.4.2 Uji Bilangan Iod (Sudarmadji et al., 2007)

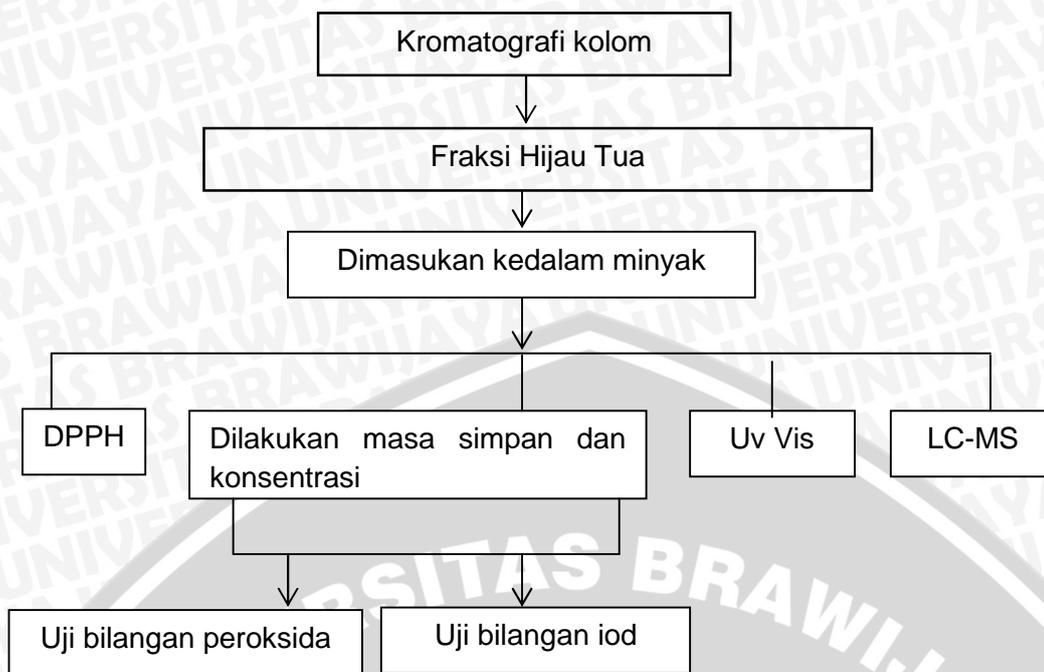
Uji bilangan iod menggunakan metode yang diacu oleh Paramitha (2012).

Sampel sebanyak 2 g dimasukan kedalam Erlenmeyer tertutup kemudian ditambahkan 20mL kloroform dan 25 mL reagen yodium bromide, setelah itu didiamkan dalam tempat gelap selama 30 menit. Selanjutnya, larutan ditambahkan 10mL larutan KI 15% dan 100mL aquades mendidih. Setelah itu larutan segera dititrasi dengan larutan Natrium Thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.1 N hingga berwarna kuning pucat. Setelah itu ditambahkan 2mL larutan pati, titrasi dilanjutkan hingga warna biru hilang. Persamaan Bilangan Iod

$$\text{Bilangan Iod} = \frac{v \text{ titran sampel} - v \text{ titran blanko} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 12.691}{v \text{ sampel}}$$

3.3.2 Penelitian Utama

Dari hasil penelitian pendahuluan fraksi yang terbaik dengan dilakukan uji senyawa antioksidan terhadap minyak ikan lemuru terdapat pada warna hijau tua, dari penelitian pendahulu dilanjutkan penelitian utama dengan mengidentifikasi senyawa antioksidan melalui DPPH dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan didalam komponen fraksi hijau mendungan dengan menggunakan LCMS. Diagram alir penelitian utama dapat dilihat pada **Gambar 5**



Gambar 5. Diagram Alir Penelitian Utama

3.3.2.1 Uji DPPH (Bios, 1958)

Uji DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) mengacu pada metode yang dilakukan oleh Hanani et al. (2005) dengan beberapa modifikasi. Ekstrak kasar *Sargassum duplicatum*. Dilarutkan dalam pelarut N-heksan lalu dibuat dalam berbagai konsentrasi antara lain 0 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm. Masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 1mM dalam N-heksan. Setelah itu, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Sebagai kontrol negatif, digunakan larutan dpph dan N-heksan (tanpa ekstrak). Nilai aktivitas antioksidan diperoleh dari persamaan

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

Nilai konsentrasi dan inhibi ekstrak diplot masing-masing sumbu X dan sumbu Y. persamaan garis yang diperoleh dalam bentuk $y = ax + b$ digunakan untuk memperoleh nilai IC (Inhibitor Concentration) dengan menyatakan nilai y

sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi 50% DPPH.

3.3.2.2 Parameter Uji Minyak Ikan Lemuru Terhadap Konsentrasi dan Masa Simpan

Minyak ikan lemuru yang telah didapatkan dari muncar banyuwangi masih perlu diolah terlebih dahulu dengan melakukan pemurnian minyak ikan lemuru, tahapan pemurnian minyak ikan lemuru sebagai berikut : dilakukan proses degumming, degumming merupakan proses pemisahan antara kotoran dengan minyak dengan pengendapannya. Proses ini dilakukan dengan menambahkan larutan NaCl 8% sebanyak 40% dari volume minyak yang akan di murnikan pada suhu $70^{\circ}C$ selama 15 menit, kemudian dilakukan proses netralisasi, minyak ikan yang sudah dilakukan proses degumming kemudian akan ditambahkan NaOH 0,02 M sesuai kandungan asam lemak bebasnya (ALB) lalu dipanaskan dengan suhu $70^{\circ}C$ selama 15 menit kemudian atau sampai sabun yang terbentuk menggumpal. Selanjutnya minyak didinginkan terlebih dahulu setelah itu disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Kemudian didapatkan hasil minyak ikan lemuru murni.

Setelah dilakukan pemurnian minyak ikan lemuru, ekstrak fraksi hijau tua dimasukkan kedalam minyak dengan perlakuan konsentrasi 0 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm, dengan masa simpan 1 hari, 5 hari, dan 10 hari, dimana pada masing-masing perlakuan, konsentrasi ekstrak fraksi hijau tua dilakukan ulangan sebanyak 3 kali dengan perbandingan tiap sampel sebanyak 5 ml minyak ikan dan 3 ml ekstrak fraksi hijau tua. Kemudian dilakukan pengujian bilangan peroksida dan bilangan iod, untuk menentukan nilai terbaik pada konsentrasi berapa dan masa simpan ke berapa.

3.3.2.2.1 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 250ml, 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 ruang gelap dengan sesekali dikocok. Setelah itu dilarutkan 30ml aquades. Langkah terakhir larutan dititrasi dengan sodium tiosulfat 0.01 N. Bilangan peroksida dinyatakan dalam persamaan:

$$\text{Bilangan Peroksida} = \frac{v \text{ titran sampel} - v \text{ titran blanko} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \times 1000}{v \text{ sampel}}$$

3.3.2.2.2 Uji Bilangan Iod (Sudarmadji et al., 2007)

Uji bilangan iod menggunakan metode yang diacu oleh Paramitha (2012). Sampel sebanyak 2 g dimasukan kedalam Erlenmeyer tertutup kemudian ditambahkan 20mL kloroform dan 25 mL reagen yodium bromide, setelah itu didiamkan dalam tempat gelap selama 30 menit. Selanjutnya, larutan ditambahkan 10mL larutan KI 15% dan 100mL aquades mendidih. Setelah itu larutan segera dititrasi dengan larutan Natrium Thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.1 N hingga berwarna kuning pucat. Setelah itu ditambahkan 2mL larutan pati, titrasi dilanjutkan hingga warna biru hilang. Persamaan Bilangan Iod

$$\text{Bilangan Iod} = \frac{v \text{ titran sampel} - v \text{ titran blanko} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 12.691}{v \text{ sampel}}$$

3.3.2.3 Spektrofotometri UV-Vis

Fraksi hasil dari kromatografi kolom yang berwarna hijau tua dikeringkan dengan gas nitrogen. Sampel kering ditambahkan N-heksan (p.a) \pm 3 mL. Kemudian disiapkan beaker glass 50 mL yang telah berisi N-heksan (p.a)

sebanyak 50 mL. Sampel kering yang telah diencerkan dengan N-heksan tadi di tuangkan kedalam beaker glass yang berisi N-heksan 50 mL, dengan menggunakan mikro pipet secukupnya sesuai dengan absorbansi yang diinginkan. Selanjutnya larutan sampel dituang pada kuvet \pm 3 mL selanjutnya kuvet dimasukkan kedalam alat spektrofotometer 1601 Shimadzu dan selanjutnya dilakukan pengujian.

3.3.2.4 LC-MS

Pengujian LC-MS merk *Eluent MeOH* dilakukan di Laboratorium Pusat Pengujian Kimia LIPI Serpong Tangerang Selatan. Uji LC-MS dilakukan untuk mengetahui gugus senyawa pada senyawa aktif *Sargassum duplicatum*. Pada uji LC-MS menurut Kazakevich dan Lubrutto (2007), pemisahan sampel dimulai dari kromatografi (LC) berdasarkan sifat kepolaran sampel dengan kolom dan fase gerak dalam kolom. Komponen - komponen sampel yang telah terpisah mengalami ionisasi yang kemudian berat molekul sampel dapat diidentifikasi berdasarkan fragmentasi komponen oleh detektor pada spektrometer (MS). Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yaitu pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gerak, menganalisis massa (memisahkan ion yang dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan tadi.

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion dan analisa massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan

dianalisa. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Agilent, 2001).

Menurut Maryam (2007), *Mass Spectrometer* (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dari struktur senyawa organik. Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen – komponen suatu senyawa. Perpaduan MS dengan HPLC (LC-MS) membuat alat ini semakin populer untuk mendeteksi berbagai senyawa termasuk mikotoksin.

3.3.3 Analisa Data

Dalam pengolahan data hasil penelitian untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur digunakan *Software Microsoft Excel*. Analisis data pada penelitian menggunakan *Analysis of varian* (ANOVA) One Way dengan hubungan interaksi yang terjadi pada selang kepercayaan 95%, apabila beda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT 5%.