

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi penelitian

Materi penelitian ini adalah tentang kandungan senyawa bahan aktif dalam ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii* sebagai antioksidan alami untuk meredam efek radikal bebas di perairan.

3.2 Alat dan Bahan

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

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen. Penelitian eksperimen adalah suatu cara untuk mencari hubungan sebab-akibat antara 2 faktor yang sengaja ditimbulkan dengan mengeleminasi dan mengurangi faktor-faktor lain yang mengganggu. Eksperimen selalu dilakukan dengan maksud untuk melihat akibat suatu perlakuan (Arikunto, 2013). Penelitian eksperimen sangat sesuai untuk pengujian hipotesa tertentu dan dimaksud untuk mengetahui hubungan sebab akibat variabel penelitian (Singarimbun dan Effendi, 1989).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan gambaran umum penelitian yang akan dilaksanakan oleh peneliti untuk mencapai tujuan tertentu. Rancangan penelitian menunjukkan adanya format penulisan yang disusun secara sistematis dan operasional meliputi langkah-langkah dan tahapan yang harus dijalani. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Menurut Hanafiah (2013), Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan lainnya.

Dalam rancangan ini tidak terdapat kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat. Kondisi ini hanya dicapai diruangan-ruangan terkontrol seperti laboratorium. Adapun model rancangan acak lengkap secara umum dinyatakan dalam model matematika adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

3.4.1 Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan adalah parameter uji kualitatif dan kuantitatif. Parameter uji kualitatif diperoleh dari hasil uji menggunakan GCMS dan hasil uji aktivitas antioksidan berdasarkan perubahan warna. Parameter uji kuantitatif diperoleh dari hasil perhitungan %inhibisi dan IC_{50} .

3.4.2 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) atau uji sidik ragam untuk mengetahui pengaruh konsentrasi terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf 5% dan 1% dan jika didapatkan hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNT.

3.5 Jenis Pengambilan Data

Jenis pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah mengambil dua macam data, yaitu data primer dan data sekunder. Data primer didapatkan dari observasi, sedangkan data sekunder didapat dari jurnal, perpustakaan atau dari laporan-laporan.

3.5.1 Data Primer

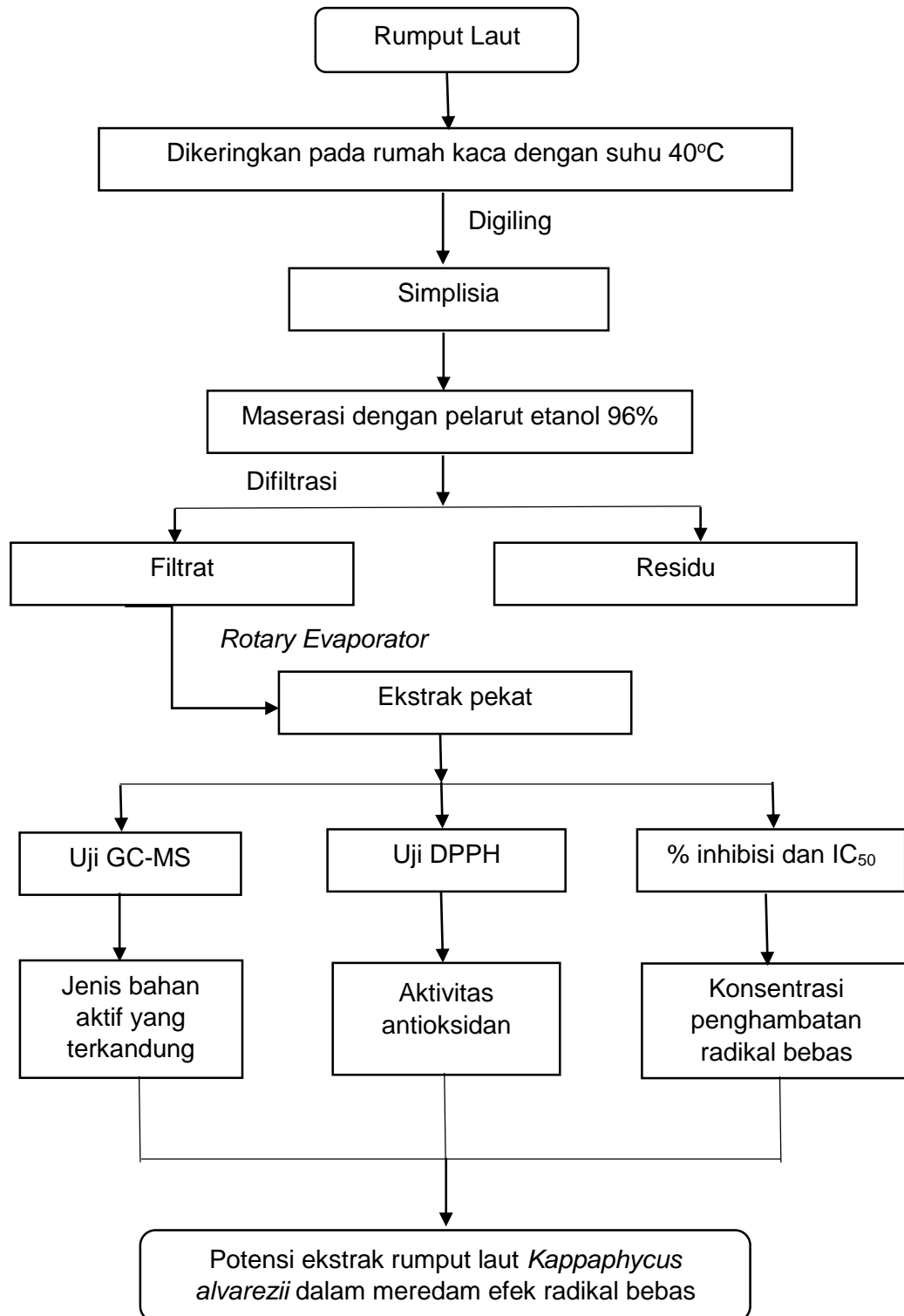
Menurut Musanto (2004), data primer yaitu data yang berasal langsung dari objek penelitian, yaitu berupa kuisisioner yang diberikan secara langsung kepada responden untuk memperoleh informasi tentang kepuasan dan loyalitas seseorang. Data primer merupakan data yang didapatkan langsung dari subjek yang diteliti dengan cara observasi. Observasi adalah pengamatan dan penginderaan langsung secara sistematis terhadap suatu benda, kondisi, situasi, proses atau gejala. Dalam arti luas observasi sebenarnya tidak hanya terbatas kepada pengamatan yang dilakukan secara langsung maupun tidak langsung (Faisal, 2003 *dalam* Khotimah, 2013). Adapun observasi yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain membuat ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii*, pengujian identifikasi ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dengan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS), uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan IC₅₀.

3.5.2 Data Sekunder

Menurut Batubara (2013), data sekunder adalah sumber data yang tidak langsung memberikan data kepada pengumpul data. Data sekunder dalam penelitian ini didapat dari laporan, jurnal, majalah, laporan PKL/Skripsi, situs internet serta kepustakaan yang menunjang penelitian ini.

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan. Diagram alir tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir tahapan penelitian

3.6.1 Pengambilan Rumput Laut

Rumput laut *Kappaphycus alvarezii* diperoleh dari lokasi budidaya rumput laut di perairan Pantai Pulau Poteran Talango Madura dengan titik koordinat lokasi pulau berada pada 113,920-114,080 °LS dan 7,040-7,120 °BT. Peta lokasi pulau Poteran dapat dilihat pada Lampiran 2. Penanganan sampel di lapang dilakukan dengan metode penurunan suhu menggunakan *ice blok* yang diletakkan pada *ice box* dengan tujuan untuk menjaga kesegaran selama perjalanan dari lokasi pengambilan ke lokasi ekstraksi (di laboratorium).

3.6.2 Persiapan dan Pembuatan Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii*

Proses ekstraksi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dilakukan di Laboratorium Hidrobiologi divisi biota perairan dan di Laboratorium Eksplorasi Ilmu Kelautan 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 (sortasi basah) dan kemudian di cuci dengan air mengalir (Siregar *et al.*, 2012). Sebelum dikeringkan sampel terlebih dahulu ditimbang guna diketahui berat biomassa basah. Rumput laut dikeringkan dengan cara dikering anginkan menggunakan rumah kaca yang bersuhu 40°C (selama 5-6 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 dengan perbandingan 1:3 (m/v) selama 3x24 jam. Simplisia ditimbang sebanyak 300 gram dan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer. Selanjutnya dilakukan perendaman (maserasi) dengan larutan etanol sebanyak 900 ml dan direndam selama 3x24 jam. Perendaman tersebut berfungsi untuk menyerap senyawa-senyawa organik yang terkandung dalam simplisia. Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan stirer dan hot plate. Sampel dikondisikan dalam keadaan gelap dan kedap udara dengan menutup breaker glass menggunakan plastik *wrap* kemudian dilapisi kembali dengan alumunium foil. Hal ini dikarenakan kelemahan dari antioksidan di antaranya adalah sifatnya yang mudah rusak bila terpapar oksigen, cahaya, suhu tinggi, dan pengeringan (Suryaningrum, 2006).

Simplisia yang sudah dimaserasi kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan menghasilkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh dari proses maserasi sebanyak 600 ml. Filtrat rumput laut *Kappaphycus alvarezii* 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 1,85 gram.

3.6.3 Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan GCMS

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. Penggunaan alat GC-MS mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Darmapatni *et al.* (2014), analisis GC-MS dilakukan dengan Agilent 6890N kromatografi gas yang dilengkapi dengan Agilent 5973 detektor masa selektif.

Helium (99%) digunakan sebagai gas pembawa pada laju alir 1mL/menit. 1 µL ekstrak disuntikkan dengan suhu injektor 250°C, suhu interface 270°C, suhu detektor 230°C dan split rasio 1:20. Program temperatur pada kolom adalah suhu awal kolom 70°C ditahan selama 5 menit, kemudian dinaikkan 10°C/menit hingga suhu 270° dan ditahan selama 5 menit sehingga diperoleh total waktu 30 menit. Setelah 30 menit maka akan keluar hasil berupa chart dan berbagai senyawa yang terkandung.

3.6.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

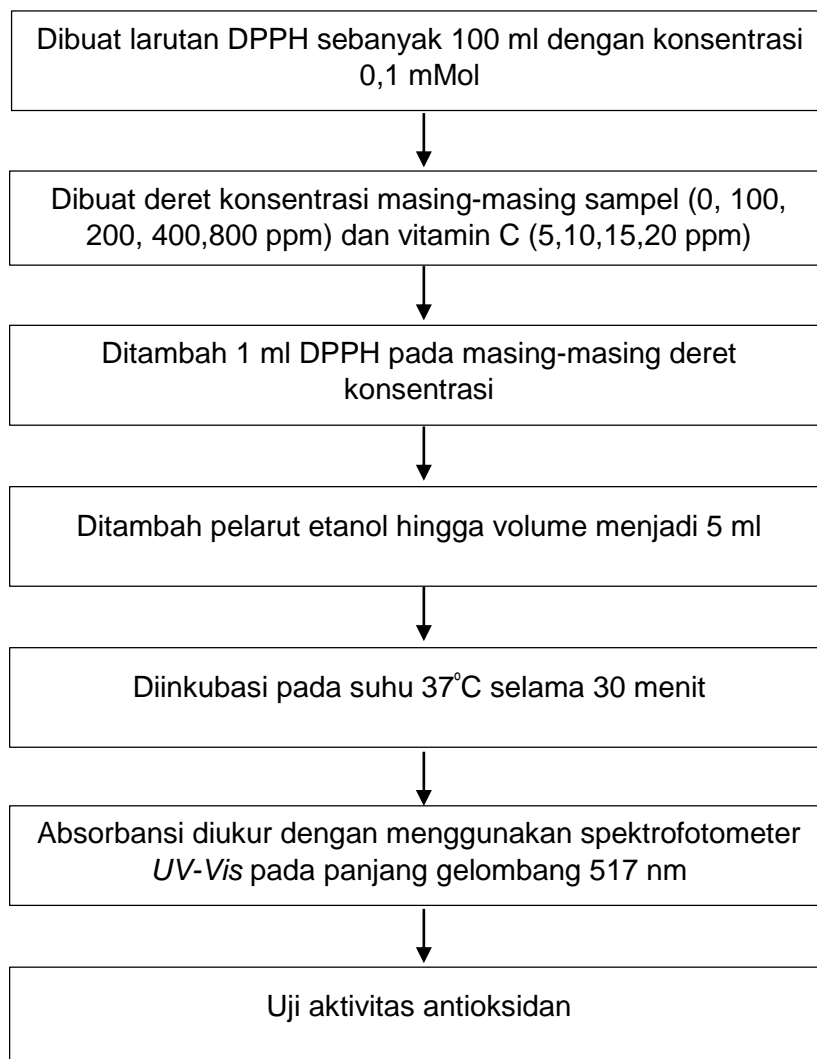
Setelah proses ekstraksi dan identifikasi senyawa dengan metode GC-MS selesai, tahap berikutnya adalah pengujian aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii*. Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. Sebelum pengujian antioksidan dengan DPPH, maka dibuatlah larutan DPPH terlebih dahulu dengan cara DPPH sebanyak 4,0 mg dilarutkan dalam 100 ml etanol sehingga didapat larutan DPPH sebanyak 100 ml dengan konsentrasi 0,1 mMol. Larutan dijaga pada suhu rendah, terlindung dari cahaya untuk segera digunakan (Windono *et al.*, 2004).

Cara kerja pengujian aktivitas antioksidan mengacu pada Sari *et al.* (2015), ekstrak rumput laut *Kappapycus alvarezii* sebanyak 40 mg dilarutkan dalam 20 ml etanol *pro analis* (2000 ppm). Kemudian dibuat deret konsentrasi sampel masing-masing 0, 100, 200, 400 dan 800 ppm. Antioksidan vitamin C sebagai pembanding dan kontrol positif. Vitamin C dilarutkan dalam etanol dan dibuat deret konsentrasi 5, 10, 15 dan 20 ppm. Ke dalam setiap tabung sampel dan kontrol positif ditambahkan 1 ml larutan DPPH 1 mMol, kemudian ditambahkan etanol p.a hingga volume menjadi 5 ml dan kemudian dihomogenkan. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Uji serapan dilakukan pada panjang gelombang 517 nm dengan

menggunakan *spektrofotometry UV-Vis*. Masing–masing sampel diukur absorbansinya dan kemudian dicari nilai % inhibisi (peredaman). Nilai % inhibisi diperoleh dengan cara membandingkan nilai absorbansi sampel dengan absorbansi blanko atau *reference* yaitu dengan rumus berikut:

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

Reference atau blanko adalah absorban larutan DPPH tanpa sampel antioksidan. Dari masing masing sampel dapat diketahui nilai % inhibisinya (Miryanti *et al.*, 2011). Skema uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram alir uji aktivitas antioksidan

3.6.5 *Inhibition Concentration 50% (IC₅₀)*.

IC₅₀ merupakan besarnya konsentrasi larutan uji untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas. Nilai IC₅₀ diperoleh setelah melakukan perhitungan % inhibisi sampel. Selanjutnya hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu Y) dan persamaan garis yang diperoleh digunakan untuk menghitung *Inhibition Concentration 50% (IC₅₀)*. Nilai IC₅₀ dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50%. $Y = a + bx$ (Cahyana, 2002 dalam Zuhra *et al.*, 2008).