

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah alga coklat *Sargassum filipendula* segar yang diperoleh dari perairan Sumenep Madura Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan adalah aseton PA (Pro analisis) dan teknis, metanol PA, heksan PA, etil asetat PA, dietil eter PA, CaCO_3 , Asam sitrat, Na-sitrat, aquades, air ledeng, larutan saturasi garam dapur, *silica gel*, alumunium foil, *cling wrap*, kertas saring kasar, kertas saring halus, tisu, gas nitrogen, dan pasir laut (*sea sand*), kapas, dan kertas label.

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, gunting, mortar, beaker glass 1000 ml, Erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 50 ml dan 100 ml, corong kaca, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *rotary evaporator vacuum*, spatula, botol sampel, pipet volume 1 ml dan 10 ml, pipet tetes, statif, dan corong pisah. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah spektrofotometer UV-Vis 1601 Shimadzu, kolom kromatografi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, KLT (Kromatografi Lapis Tipis), pipet kapiler, penggaris, beaker glass 100 ml, dan cawan petri, pH meter dan *color reader*.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif bersifat menjelajah, artinya penelitian yang dilakukan apabila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus dari suatu kelompok atau golongan tertentu, yang masih kurang diketahui orang. (Yumei dan Yulia, 2009). Ditambahkan oleh Singarimbun dan Effendi (1989), metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam.

Penelitian eksploratif dapat digunakan untuk mengamati gejala yang sedang terjadi, atau gejala yang terjadi di masa lalu. Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian eksploratif, dapat dikembangkan berbagai penelitian lain, seperti penelitian deskriptif dan eksperimen. Penelitian eksploratif sering disebut penelitian pendahuluan (Umami, 2009).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Sampel dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran, kemudian dibilas dengan air tawar untuk menghilangkan pengaruh garam, selanjutnya sampel dikeringkan dengan kain dan dimasukkan ke dalam kantong *polyback* hitam dan disimpan ke dalam *freezer*.

3.3.2 Ekstraksi Pigmen Alga Coklat

Alga coklat jenis *Sargassum filipendula* pertama-tama dicuci dan dibersihkan untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat selanjutnya dipotong-potong sekitar 1 cm, tujuan dipotong kecil – kecil yang bertujuan supaya rumput laut cepat kering dan juga bertujuan untuk memperluas permukaan. Kemudian alga coklat ditimbang sebanyak 200 gram, dihaluskan dengan mortar yang bertujuan untuk memperluas permukaan bidang permukaan saat diekstraksi. Lalu ditambahkan $\text{CaCO}_3 \pm 0,5$ gram sebagai penetral, sebab fukosantin tidak tahan pada pH tertentu (basa). Alga coklat yang telah ditimbang diekstraksi selama 20 menit dengan menggunakan pelarut metanol : aseton (7 : 3, v/v) sebanyak 750 ml. Adapun tujuan dari pemberian metanol yaitu karena pelarut metanol merupakan pelarut senyawa organik yang dapat melarutkan senyawa polar dan non polar, sedangkan aseton adalah untuk mengangkat pigmen semi polar (pelarut yang cocok untuk fukosantin). Prinsip dari maserasi ini adalah mengambil senyawa target dengan cara merendam atau memecah glukoprotein. Menurut Lenny (2006), maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan diluar sel (secara difusi) sehingga metabolit sekunder yang ada dalam protoplasma akan membengkak dan pecah kemudian terlarut dalam pelarut organik. Sehingga ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Hal ini sesuai dengan pendapat Voight (1994), dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel secara difusi akan menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya. Tahapan setelah ekstraksi dilakukan penyaringan menggunakan

kertas saring halus kemudian kertas saring kasar. Proses penyaringan ini bertujuan untuk mengambil zat-zat yang mengandung pigmen dan sisa-sisa rumput laut dibuang sehingga filtrat yang dihasilkan bersih tanpa ada kotoran yang tertinggal.

3.3.3 Fraksinasi Pigmen Alga Coklat

Setelah proses penyaringan selesai dan diperoleh filtrat, kemudian filtrat difraksinasi (partisi) dengan menggunakan corong pisah. Tujuan dari fraksinasi ini adalah pemisahan agar terbentuk 2 lapisan berdasarkan berat jenis (berat jenis yang tinggi berada dibawah dan berat jenis yang rendah berada di atas). Larutan yang diambil adalah larutan yang terdapat pigmen di lapisan atas. Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien (Anonymous, 2010^e). Proses fraksinasi ini dilakukan dengan menggunakan larutan dietil eter dan kemudian ditambahkan juga saturasi garam dan air ledeng (jika terjadi saturasi). Perbandingan yang digunakan antara filtrate : Dietil Eter : saturasi garam dalam proses partisi ini adalah 50:25:60:5 ml. Tujuan menggunakan dietil eter adalah untuk mengikat senyawa yang bersifat semi polar sehingga senyawa tersebut tertarik dengan pelarut dietil eter dan berada pada fase atas, kemudian mempermudah penghilangan pelarut (methanol dan aceton) dan air yang lebih bersifat lebih polar. Tujuan penambahan saturasi garam adalah agar pelarut lebih tertarik mengikat larutan saturasi garam yang memiliki elektropositifan dan elektonegatifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut methanol dan aceton terikat pada saturasi garam dan ikut terbuang. Apabila pemisahan antara kedua fase atas dan fase bawah masih tidak sempurna (terjadi saturasi/gelembung udara) maka dilakukan penambahan air ledeng secukupnya. Tujuan penambahan air

ledeng adalah hampir sama dengan penambahan saturasi garam yaitu meningkatkan elektropositifan dan elektonegatifan sehingga pelarut lebih tertarik mengikat larutan saturasi garam dan air ledeng yang memiliki banyak mineral dan elektropositifan dan elektonegatifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut methanol dan acetone tertarik pada saturasi garam dan ikut terbuang.

Fase yang diambil dalam fraksinasi adalah fase atas karena hampir seluruh pigmen berada pada fase ini. Hasil dari fase bawah tidak digunakan karena kandungan pigmennya sangat sedikit. Hasil dari fase atas ditampung pada erlenmeyer kemudian di *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 30°C dan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Filtrat kemudian dipindahkan ke dalam botol sampel dan dikeringkan dengan gas nitrogen sampai kering sempurna. Ekstrak pigmen kering ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam *freezer*. Tujuan dari dikeringkan dengan nitrogen ini adalah untuk menarik air dan pelarut yang ada pada pigmen setelah dari proses *rotary evaporator vacuum*. Prosedur ekstraksi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 6.

3.3.4 Isolasi Fukosantin

Isolasi pigmen dari alga coklat dilakukan dengan kromatografi kolom dengan ukuran kolom yaitu panjang (P) = 40 cm dan diameter (d) = 3 cm, menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak heksan : etil asetat (8 : 2, v/v) ± 150 ml. Fase diam (*Silica gel*) sebagai fase penjerap akan menahan komponen campuran yaitu dengan prinsip absorpsi pada silika gel dengan komponen senyawa tersebut sehingga komponen tertahan pada fase diam (silika gel), sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen

yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat.

Silika gel ditimbang sebanyak 40 gram dan dilarutkan dengan fase gerak heksan : etil asetat (8 : 2, v/v) ± 100 ml dan distriker selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm, agar saat silika gel dimasukkan ke dalam kolom tidak retak atau pecah. Sementara itu disiapkan kolom yang telah dipasang pada statif dan diisi fase gerak sedikit untuk membasahi kapas. Kapas tipis yang telah dicelupkan pada fase gerak dimasukkan ke dalam ujung bawah kolom dengan bantuan lidi kemudian ditambahkan fase gerak sampai hampir penuh. Tahapan selanjutnya, bubuk *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom dengan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara ditengah-tengah kolom ketika *silica gel* tersebut dimasukkan ke dalam kolom. Timbunan bubuk *silica gel* akan mencapai tiga perempat tinggi kolom, selanjutnya ditambahkan *sea sand* (pasir laut) yang bertujuan sebagai penanda dan penyaring ketika ditambahkan pelarut.

Tahap selanjutnya adalah pemasukkan sampel kering yang telah dilarutkan dengan 0,5 ml fase gerak heksan : etil asetat (8 : 2, v/v), kemudian dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan dengan menggunakan pipet volume 10 ml pada pingir kolom agar tidak merusak permukaan kolom dan *sea sand*. Ekstrak, akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Setelah itu dimasukkan fase gerak heksan : etil asetat sambil kran kolom dibuka. Fase gerak akan mengalir kontinyu sehingga perlu menambahkan fase gerak baru dari bagian atas kolom agar kolom tidak menjadi kering. Fase gerak heksan : etil asetat yang ditambahkan kedalam kolom ditingkatkan kepolarannya dengan menambahkan etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan adalah heksan : etil asetat (8:2, 7:3 dan 6:4, v/v). Tujuan penggunaan pelarut heksan adalah heksan

merupakan pelarut tidak polar untuk melarutkan pigmen yang tidak polar juga. Sedangkan Etil asetat merupakan pelarut semi polar (lebih polar dari heksan) sehingga berguna untuk melarutkan pigmen yang semi polar. Hal ini sesuai dengan pendapat Lenny (2006), yang menyatakan bahwa pemilihan eluen (fase gerak) sebaiknya dimulai dari pelarut yang tidak polar seperti heksan dan selanjutnya dilakukan peningkatan kepolaran dengan etil asetat atau pelarut yang lebih polar lainnya. Hal ini dimaksudkan agar komponen dapat terpisahkan dengan baik.

Selanjutnya fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan menggunakan tabung reaksi berdasarkan masing-masing warnanya sambil terus menambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar silika gel tidak kering sampai di dapatkan warna orange gelap, untuk fukosantin biasanya bewarna orange gelap. Setiap fraksi terutama yang berwarna mirip orange dianalisis dengan menggunakan KLT untuk mengidentifikasi apakah termasuk fukosantin dan kemurnian fukosantin tersebut. Prosedur isolasi pigmen alga coklat dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 7.

3.3.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi pigmen fukosantin dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel dan fase gerak heksan : aseton (7 : 3, v/v). Tujuan penggunaan fase gerak heksan dan aseton adalah untuk melarutkan senyawa yang tidak polar, polar maupun semi polar seperti fukosantin, sehingga senyawa tersebut dapat larut dan tertarik keatas sesuai tingkat kepolaranya. Tahapan pertama dalam KLT adalah membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung pelat, bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika

ditotolkan sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut.

Tahap selanjutnya setiap fraksi hasil kromatografi kolom ditotolkan pada garis bagian bawah pelat dengan menggunakan pipa kapiler sambil ditiup-tiup. Setelah bercak tersebut mengering, pelat ditempatkan dalam *beakerglass* berisi fase gerak dalam jumlah yang tidak terlalu banyak dan kertas saring yang dipotong memanjang. *Beakerglass* ditutup dengan cawan petri dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas, kemudian diambil dengan penjepit tanpa menyentuh garis atas pelat. Tahap selanjutnya, warna dari tiap pigmen terutama warna orange gelap (fukosantin) pada pelat diamati dan dihitung nilai R_f -nya. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 8.

3.3.6 Pengukuran Pola Spektra Fukosantin

Metode Spektrofotometri dilakukan untuk mengetahui pola spektrum fukosantin pola spektra pigmen yang digunakan dalam proses identifikasi pigmen. Fraksi hasil kromatografi kolom dan KLT yang diyakini sebagai fukosantin berdasarkan warna dan nilai R_f -nya diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan dikeringkan dengan gas nitrogen kemudian dilarutkan dengan acetone 100% kemudian dituangkan ke dalam kuvet ± 1 ml. Selanjutnya kuvet dimasukkan kedalam instrumen spektrofotometer UV-VIS 1601. Serapan maksimum yang terbentuk pada pola spektranya dibandingkan dengan serapan maksimum spektra (pola spektra) fukosantin menurut Jeffrey, *et al* (1997).

3.3.7 Uji Karakteristik Pigmen Fukosantin Pada Variasi PH dan Kondisi Simpan

3.3.7.1 Preparasi Larutan Uji

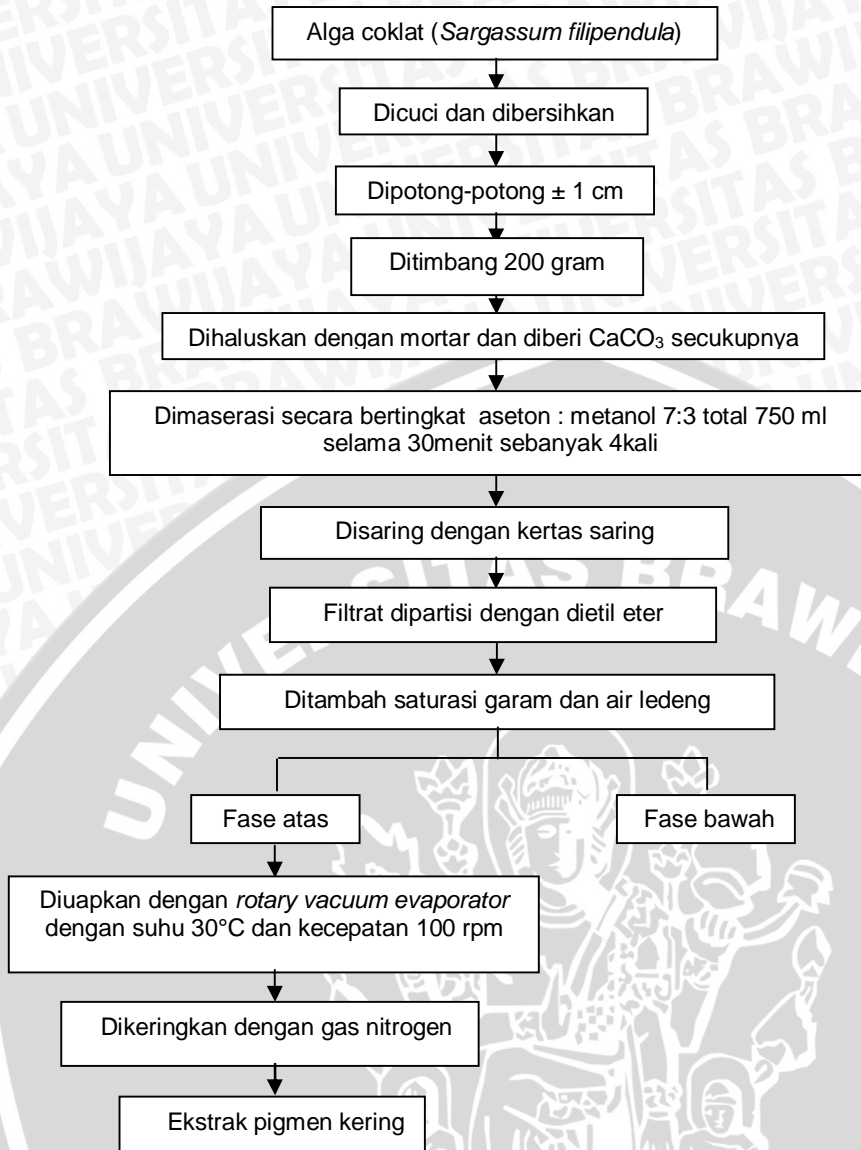
Isolat pigmen fukosantin murni yang telah dikeringkan dengan gas nitrogen dilarutkan dalam asetone 100% sampai pigmen memiliki absorbansi 1 pada

serapan maksimum fukosantin setelah diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk mendapatkan larutan uji pada absorbansi 1, larutan pigmen diencerkan menggunakan acetone terlebih dahulu kemudian diambil ± 1 mL dan dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilakukan pengukuran pola spektra menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601.

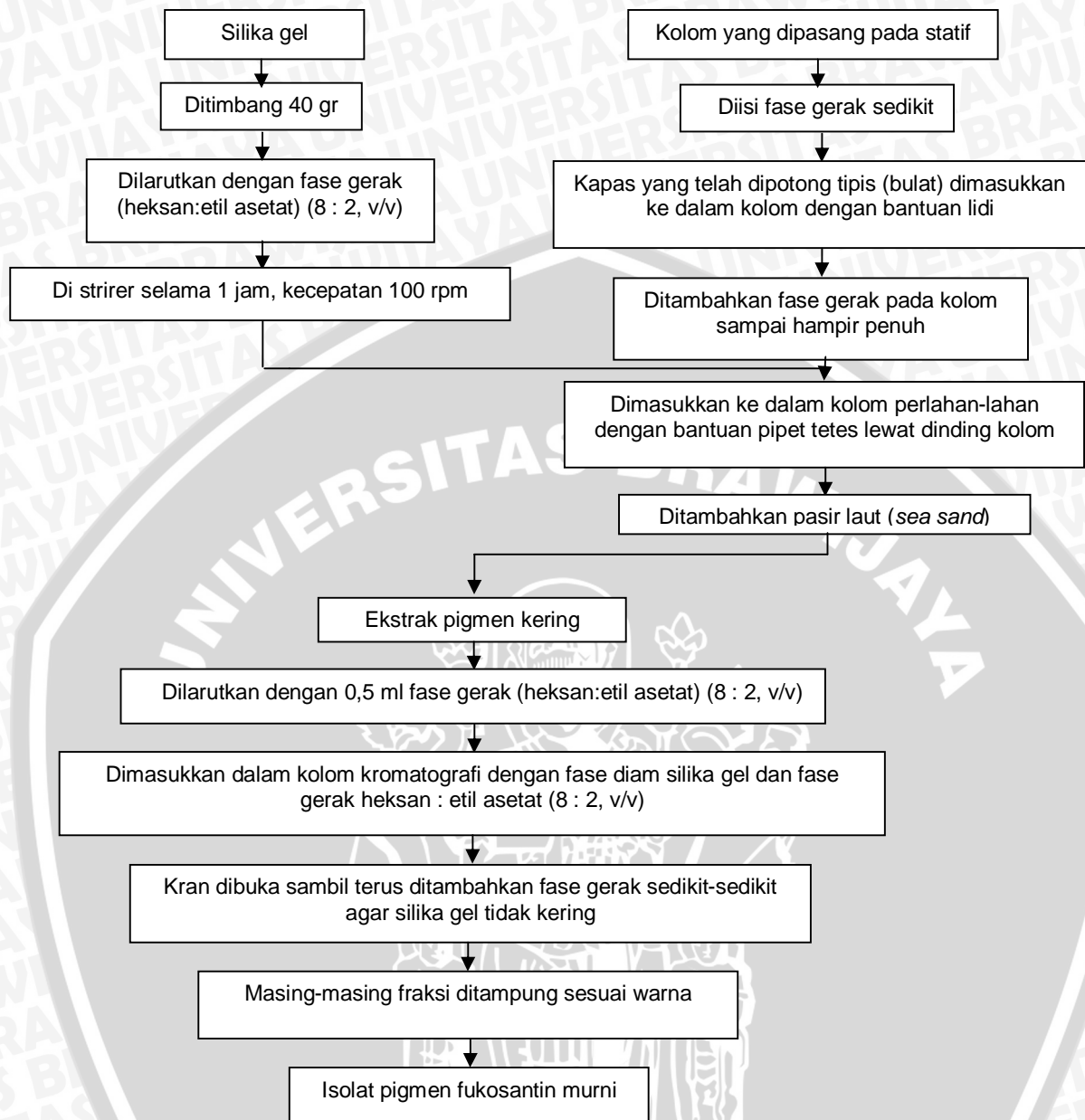
3.3.7.2 Analisa Karakteristik Pigmen Fukosantin

Uji Karakteristik pigmen fukosantin untuk uji pada variasi pH, pigmen fukosantin absorbansi 1 dimasukkan dalam 12 botol sampel yang masing-masing berisi 0,2 ml kemudian ditambah larutan buffer pH 3, 4, 5, dan 7 masing-masing 10 ml sehingga larutan total menjadi 10,2 ml untuk masing-masing ulangan, masing-masing uji 3 kali ulangan. Kemudian masing-masing perlakuan diukur serapan maksimum, pergeseran panjang gelombang (λ) menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601, pH akhir menggunakan pH meter, serta intensitas warna L, a, b dengan menggunakan *color reader*. Uji Karakteristik pigmen fukosantin pada variasi pH dapat dilihat pada Gambar 9.

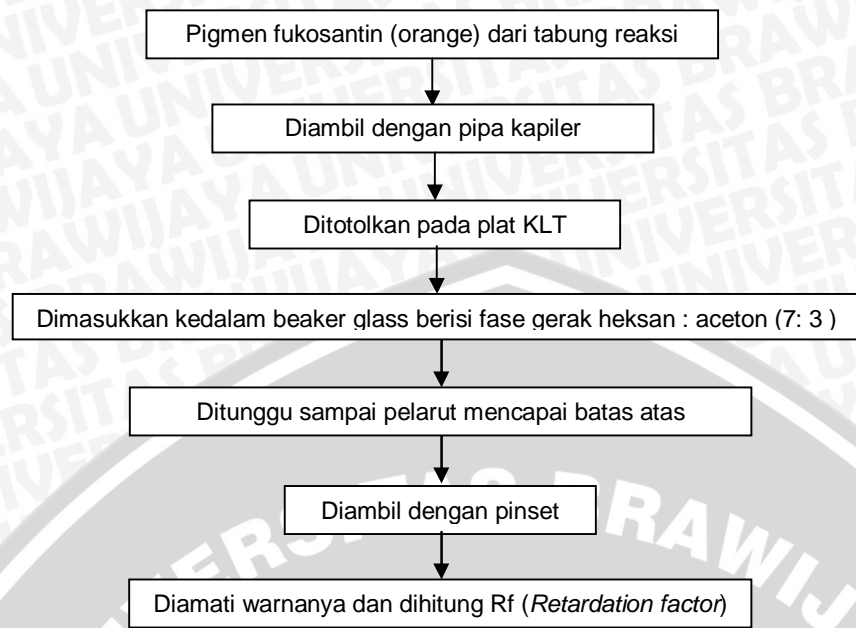
Uji karakteristik pigmen fukosantin pada kondisi simpan dilakukan dengan cara pigmen fukosantin absorbansi 1 dimasukkan dalam 9 botol sampel yang masing-masing berisi 10 ml yaitu suhu kamar, suhu dingin, dan suhu freezer masing-masing uji 3 kali ulangan dan lama penyimpanan selama 6 hari. Masing-masing perlakuan diukur penurunan puncak absorbansi dan pergeseran panjang gelombang (λ) menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1601. Uji Karakteristik pigmen fukosantin pada kondisi simpan yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 10.



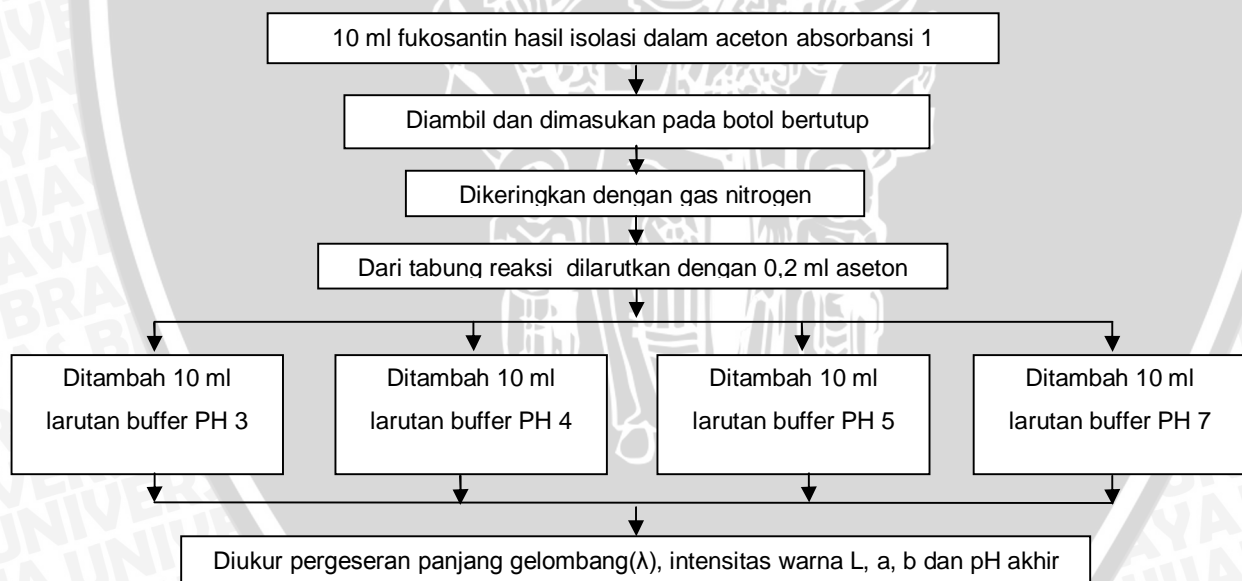
Gambar 6. Diagram Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen



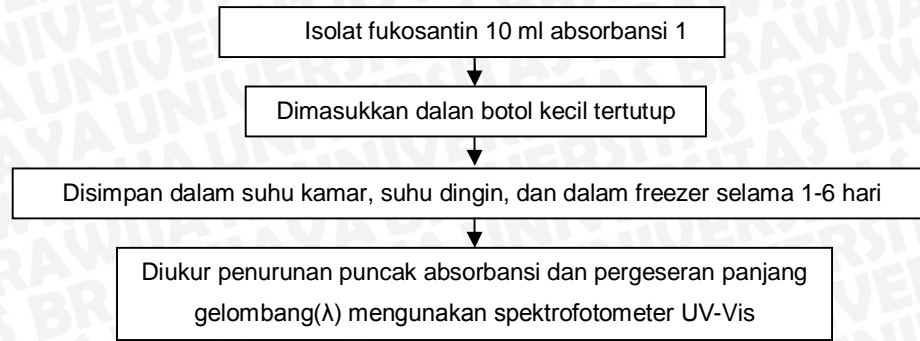
Gambar 7. Diagram Kromatografi Kolom



Gambar 8. Diagram Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Gambar 9. Uji Karakteristik Pigmen Fukosantin pada Variasi pH



Gambar 10. Uji Karakteristik Pigmen Fukosantin pada Kondisi Simpan yang berbeda

