

3. METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Pada bahan penelitian ini menggunakan alga coklat pada jenis *Sargassum fillipendula* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Rumput laut yang dipanen dari daerah budidaya dan pada saat pemanenan bahan langsung dicuci dengan air laut. Sampel dicuci dengan air laut dengan tujuan untuk membersihkan sisa-sisa lumpur, pasir dan kotoran lainnya yang masih melekat pada rumput laut.

Kemudian sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik warna hitam untuk menghindari kontak dengan sinar matahari agar tidak terjadi pigmentasi (pencoklatan). Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam *coolbox* lalu diberi dengan es balok dan bagian luar *coolbox* disegel dengan lakban untuk mempertahankan suhu rendah dalam *coolbox* selama proses transportasi dan agar *coolbox* tidak rusak sampai tujuan. Selang waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium adalah sehari semalam.

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi antioksidan alga coklat *Sargassum filipendula* yaitu pelarut etanol teknis. Digunakan pelarut etanol karena etanol memiliki kepolaran yang hampir sama dengan karakteristik antioksidan *Sargassum filipendula*. Bahan lain yang digunakan adalah aquadest yang digunakan pada *waterbath* pada saat proses pengentalan ekstraksi (pemisahan pelarut dari ekstrak) dengan *vacum rotary evaporator*.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji DPPH adalah serbuk DPPH, bahan ini dapat diperoleh di Laboratorium THP Fakultas Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang.

3.1.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada proses maserasi (ekstraksi) senyawa antioksidan pada alga coklat *Sargassum filipendula* adalah baskom, gunting, pisau, timbangan analitik, spatula, erlenmayer 300ml, *beaker glass* 300 ml, gelas corong, gelas ukur, dan shaker. Peralatan yang digunakan pada kadar air bahan ialah menggunakan nampan seng, timbangan analitik, *crushable tank*, desikator dan botol timbang. Sedangkan pada peralatan yang digunakan pada saat pemisahan pelarut dari ekstrak adalah 1 unit *rotary vacum evaporator* dan botol vial. Dan pada peralatan yang digunakan untuk uji dpph adalah botol vial, *beaker glass* 100 ml, erlenmeyer 250 ml, bola hisap, pipet volume 5 ml dan pipet volume 10 ml. Untuk mengidentifikasi pada senyawa fitokimia menggunakan alat *beaker glass* 100 ml, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, dan gelas ukur.

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding (Nazir,1989).

Eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengaturan kadar air bahan dan lama waktu fermentasi dengan starter jamur *Aspergillus niger* terhadap aktifitas antioksidan ekstrak kasar alga coklat *Sargassum fillipendula*.

Pelaksanaan penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

3.2.1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini dibagi menjadi dua tahap, tahap yang pertama bertujuan untuk menentukan kadar air bahan yang berbeda. Sedangkan pada tahap yang kedua ialah bertujuan untuk menentukan lama fermentasi yang tepat untuk inkubasi sampel. Penelitian pendahuluan ini tidak menggunakan ulangan sehingga data yang diperoleh berupa data primer. Penelitian terbaik dari tahap pendahuluan ini selanjutnya akan digunakan pada penelitian utama.

3.2.1.1 Penelitian Pendahuluan Tahap Pertama

Pada tahap pertama penelitian pendahuluan ini untuk menentukan kadar air bahan berbeda untuk digunakan pada penelitian utama. Prosedur penelitian pendahuluan tahap pertama untuk menentukan kadar air bahan yang berbeda:

- Disiapkan alat berupa timbangan analitik 0,001 gram, loyang besi, desikator.
- Dimasukan botol timbang kedalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam
- Diangkat botol timbang dan dimasukan kedalam desikator selama 15 menit
- Botol timbang ditimbang dengan timbangan analitik, lalu diambil sampel sebanyak 10 gram dan dimasukan kedalam botol timbang kemudian ditimbang. Dihitung sebagai berat awal (A)
- Dimasukan botol timbang yang telah berisi sampel kedalam oven dan ditunggu selama 24 jam
- Diangkat botol timbang dengan *crushable tank* dan dimasukan desikator selama 15 menit
- Ditimbang botol timbang sebagai berat akhir (B)
- Dihitung kadar air dengan rumus :

$$\frac{\text{Berat Akhir (B)} - \text{Berat Awal (A)}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

Setelah diketahui kadar air bahan segar, kemudian dilanjutkan prosedur untuk menentukan kadar air bahan 20%, 35% dan 50%. Prosedur penelitian pendahuluan dengan kadar air bahan 20%, 35% dan 50% sebagai berikut:

- Sampel *Sargassum fillipendula* segar dicuci bersih dan direndam dengan air garam selama 5 menit
- Sampel ditiriskan lalu dipotong kecil-kecil menggunakan gunting untuk mempermudah proses maserasi bahan
- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 525 gram lalu dikeringkan sampai kadar air 20%, ditimbang sebanyak 450 gram lalu dikeringkan sampai kadar air 35%, ditimbang sebanyak 300 gram lalu dikeringkan sampai kadar air 50%, dan 100 gram sebagai kadar air segar 85% (kontrol). Tujuan berat sampel berbeda untuk mempermudah pada proses maserasi agar berat sampel yang telah dikeringkan 100 gram.
- Cara menghitung kadar air bahan agar sesuai yang diinginkan :
Dari 100 gram dengan kadar air bahan segar 85% agar didapatkan 20% ialah :

$$100\text{gram} \times \frac{85}{100} = 85 \text{ gram (air)}$$

$$15 \text{ gram (bahan baku)}$$

$$\frac{20}{100} = \frac{A - bk}{A}$$

$$\frac{20}{100} = \frac{A - 15}{A}$$

$$20A = 100A - 1500$$

$$80 A = 1500$$

$$A = 18.75 \text{ gram}$$

Keterangan : A = Berat rumput laut telah dikeringkan

bk = Bahan baku

- Tiap sampel dimasukkan ke dalam Beaker glass 500ml, ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil
- Sampel dimaserasi dengan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 48 jam
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan *vacuum rotary evaporator* selama 3 jam
- Diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Sunarni *et al.*, 2005)

3.2.1.2 Penelitian Pendahuluan Tahap Kedua

Prosedur penelitian pendahuluan tahap kedua untuk menentukan lama fermentasi :

- Sampel *Sargassum fillipendula* segar dicuci bersih dan direndam dengan air garam, perendaman ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran dan mineral pengotor yang masih menempel pada bahan
- Sampel ditiriskan lalu dipotong kecil-kecil menggunakan gunting untuk memperluas permukaan bahan dan mempermudah proses maserasi bahan
- Ditimbang dengan timbangan digital sebanyak 100 gram untuk tiap perlakuan
- Tiap sampel dimasukkan ke dalam Beaker glass 500ml, ditutup dengan alufo yang telah diberi lubang-lubang kecil lalu difermentasi selama 9, 11 dan 13 hari dan 0 hari sebagai kontrol
- Sampel dimaserasi dengan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 1:3 selama 48 jam
- Disaring dengan kertas saring kasar lalu dipisahkan antara pelarut dan sampel menggunakan *vacuum rotary evaporator* selama 3 jam
- Diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (Sunarni *et al.*, 2005)

3.2.2. Penelitian Utama

Penelitian utama mengambil standar acuan dari perlakuan terbaik penelitian pendahuluan. Penelitian utama ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas antioksidan terbaik dari semua perlakuan dengan penambahan starter jamur *Aspergillus niger*.

3.2.2.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan

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 yang digunakan. Perlakuan yang pertama yaitu faktor waktu fermentasi (W) dengan level 11 hari (W1), 13 hari (W2), dan 15 hari (W3). Perlakuan kedua yaitu faktor perbedaan kadar air bahan (K) dengan level 35% (K1), 50% (K2) dan 85% (K3). Variabel terikat penelitian ini adalah parameter yang diamati, yaitu nilai inhibition concentration (IC₅₀) dari sampel dengan perlakuan yang berbeda-beda.

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktor (faktor W dan faktor K) yang terdiri dari 3 level (1,2,3) dan 2 kali ulangan. Model matematika dari penelitian ini yaitu :

$$y_{ijk} = \mu + w_i + k_j + (w_i k_j) + \xi_{ijk}.$$

μ adalah rata-rata umum, w_i adalah faktor w dengan level i, k_j adalah faktor p dengan level j, $(w_i k_j)$ adalah korelasi antara faktor w_i dan k_j , dan ξ_{ijk} adalah galat dari semua faktor. Desain rancangan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Desain Rancangan Penelitian

	Perlakuan		
	K		
	K1	K2	K3
W1	(W1K1) ₁	(W1K2) ₁	(W1K3) ₁
	(W1K1) ₂	(W1K2) ₂	(W1K3) ₂
W2	(W2K1) ₁	(W2K2) ₁	(W2K3) ₁
	(W2K1) ₂	(W2K2) ₂	(W2K3) ₂
W3	(W3K1) ₁	(W3K2) ₁	(W3K3) ₁
	(W3K1) ₂	(W3K2) ₂	(W3K3) ₂

Keterangan :

K1 : Kadar air 35%

K2 : Kadar air 50%

K3 : Kadar air 85%

W1 : Waktu fermentasi 11 hari

W2 : Waktu fermentasi 13 hari

W3 : Waktu fermentasi 15 hari

3.2.3. Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan dalam penelitian yaitu kapasitas antioksidan, total senyawa fenolat, uji fitokimia dan uji kadar air. Uji kapasitas antioksidan berdasarkan metode Sunarni *et al.* (2005), menggunakan radikal bebas DPPH sebagai penangkap senyawa antioksidan. Uji total senyawa fenolat berdasarkan metode Folin ciocalteau yaitu dengan menggunakan reagen folin-ciocalteau. Uji kualitatif senyawa fitokimia berdasarkan metode Harbone (1987). Uji ini dibagi menjadi tiga yaitu uji alkaloid, uji flavonoid dan uji fenol. Uji kadar air berdasarkan metode thermogravimetri dari Sudarmadji *et al.*, (1997).

3.3. Prosedur Penelitian Utama

3.3.1. Pembuatan media dan pembiakan kultur jamur *Aspergillus niger*

- Cawan petri, labu erlenmeyer 250ml dan jarum ose dicuci bersih kemudian dioven dengan suhu 35°C untuk menghilangkan air
- Untuk penanaman pertama, diambil serbuk media PDA (*Potatoes dextrose agar*) sebanyak 5.85 gram untuk dilarutkan ke dalam 150ml aquadest lalu dimasukan kedalam labu erlenmeyer 250ml
- Cawan petri, jarum ose dan labu erlenmeyer direbus dalam panci selama 10 menit dengan suhu 100°C
- Selanjutnya dimasukan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 15 menit dengan tekanan 0.1 MPa
- Media PDA lalu dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi lalu dibiarkan dingin agar menjadi gel
- Lalu jamur *Aspergillus niger* diambil dari stok menggunakan jarum ose lalu ditanam pada media PDA dengan posisi terbalik
- Diinkubasi dalam incase dan ditunggu selama 1 minggu
- Setelah jamur tumbuh merata, disiapkan media PDB (*Potatoes dextrose broth*) untuk penanaman kedua sebanyak 21,6 gram dan dilarutkan dalam 900ml aquadest
- Pisau dan labu erlenmeyer yang telah berisi media PDB direbus dalam panci kemudian disterilisasi untuk mencegah dari kontaminan
- Setelah disterilisasi, labu dibiarkan sebentar agar dingin lalu disiapkan jamur *Aspergillus niger* yang telah tumbuh dimedia PDA untuk ditanam ke media PDB dengan menggunakan pisau

- Lalu diinkubasi dalam incase selama 12 hari agar jamur tumbuh secara merata sambil tiap hari digoyang-goyang labunya agar nutrient yang mengendap bisa tercampur merata.

3.3.2. Pengaturan Kadar Air Bahan

Pengaturan kadar air bahan dibagi menjadi 2 tahap yaitu, pengukuran kadar air segar dan pengaturan kadar air bahan 35% dan 50%.

- Pengukuran kadar air bahan segar :
 - Disiapkan alat berupa timbangan analitik 0,001 gram, loyang besi, desikator
 - Dimasukan botol timbang kedalam oven dengan suhu 105°C selama 24 jam
 - Diangkat botol timbang dan dimasukan kedalam desikator selama 15 menit
 - Botol timbang ditimbang dengan timbangan analitik, lalu diambil sampel sebanyak 10 gram dan dimasukan kedalam botol timbang kemudian ditimbang. Dihitung sebagai berat awal (A)
 - Dimasukan botol timbang yang telah berisi sampel kedalam oven dan ditunggu selama 24 jam
 - Diangkat botol timbang dengan *crushable tank* dan dimasukan desikator selama 15 menit
 - Ditimbang botol timbang sebagai berat akhir (B)
 - Dihitung kadar air dengan rumus :

$$\frac{\text{Berat Akhir (B)} - \text{Berat Awal (A)}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

- Pengaturan kadar air bahan 35% dan 50% yaitu :
 - Sampel ditimbang sebanyak 250 gram dan 300 gram, kemudian dimasukan kedalam loyang besi dan dijemur bawah sinar matahari selama 3 jam
 - Kemudian ditimbang dengan timbangan analitik dan dihitung kadar airnya. Apabila masih lebih dari 35% dan 50% maka dijemur kembali hingga didapatkan kadar air 35% dan 50%
 - Dari 450 gram dengan kadar air 85% agar didapatkan 35% ialah :

$$450\text{gram} \times \frac{85}{100} = 382,5 \text{ kadar air}$$

67,5 gram (bahan baku)

$$\frac{35}{100} = \frac{A - \text{bk}}{A}$$

$$\frac{35}{100} = \frac{A - 67,5}{A}$$

$$35A = 100A - 6750$$

$$65 = 6750$$

$$A = 103 \text{ gram}$$

- Dari 450 gram dengan kadar air 85% agar didapatkan 50% ialah :

$$350\text{gram} \times \frac{85}{100} = 297,5 \text{ kadar air}$$

52,5 gram (bahan baku)

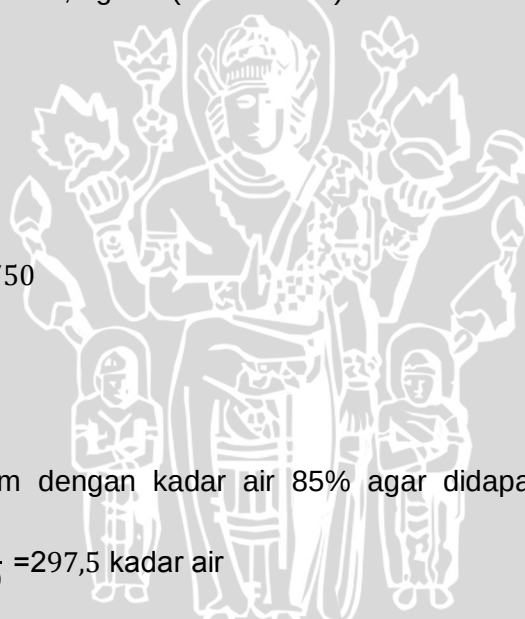
$$\frac{50}{100} = \frac{A - \text{bk}}{A}$$

$$\frac{50}{100} = \frac{A - 52,5}{A}$$

$$50A = 100A - 5250$$

$$50A = 5250$$

$$A = 105 \text{ gram}$$



3.3.3. Fermentasi Alga Coklat *Sargassum fillipendula* (Sasmito, 2011)

- Alga coklat *Sargassum fillipendula* segar dicuci menggunakan air lalu ditambahkan garam secukupnya
- Setelah dicuci, kemudian diangin-anginkan hingga kering beralaskan koran
- Kemudian *Sargassum fillipendula* dipotong kecil-kecil menggunakan gunting
- Setelah dipotong kemudian ditimbang 100 gram, 350 gram dan 450 gram dan diulangi lagi masing-masing sebanyak 6 kali
- Dari sampel 350 gram dijemur bawah sinar matahari sampai 105 gram dengan kadar air bahan 35% dan pada sampel 450 gram sampai 103 gram dengan kadar air bahan 50%
- Semua sampel lalu ditambahkan dengan jamur *Aspergillus niger* sebanyak 5 gram untuk mempercepat proses fermentasi lalu difermentasi selama 11,13 dan 15 hari.

3.3.4. Ekstraksi *Sargassum fillipendula* (Suryaningrum et al., 2006)

- Semua sampel dimaserasi menggunakan pelarut ethanol 96% selama 24 jam dan dishaker menggunakan *waterbath shaker*. Perbandingan antara sampel dan pelarut yaitu 1:3
- Setelah dimaserasi sampel disaring menggunakan kertas saring kasar
- Sisa residu diambil untuk dianalisa kadar alginatnya sedangkan filtratnya di rotary dengan rotary vacuum evaporator suhu 40°C untuk memisahkan antara pelarut dengan sampel
- Setelah terpisah, ekstrak sampel diambil sedikit untuk dianalisa kadar airnya.

3.3.5. Prosedur Analisis Parameter

3.3.5.1. Uji Fitokimia (Harbone, 1987)

Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak *Sargassum fillipendula* masing-masing pelarut. Uji fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, flavonoid, dan fenolik. Metode uji didasarkan pada Harbone (1987).

- a. **Uji Alkaloid:** Larutan ekstrak sebanyak 3 ml ditambahkan dengan 1 ml HCL 2N, dan 6 ml aquadest, kemudian filtrat diperiksa adanya senyawa alkaloid dengan terdapatnya endapan berwarna putih.
- b. **Uji Fenol:** Sebanyak 20 ml etanol 96% dimasukan 1 gr sampel ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 . Senyawa fenol ditunjukan dengan pembentukan warna hijau tua atau hitam.
- c. **Uji Flavonoid:** Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan dengan sedikit serbuk magnesium (Mg) dan 2 ml HCL 2N. Senyawa flavonoid ditunjukan dengan pembentukan warna jingga hingga merah.

3.3.5.2. Uji Aktivitas Antioksidan (Sunarni *et al.*, 2005)

Analisis DPPH dilakukan terhadap hasil ekstrak kasar ethanol dari *Sargassum fillipendula* dan dilihat nilai anti radikal bebasnya. Analisis DPPH dilakukan berdasarkan metode (Sunarni *et al.*, 2005). Ekstrak ethanol dari *Sargassum fillipendula* dilarutkan dalam ethanol dan dibuat dalam konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 200 ppm). Masing-masing dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5ml. Kedalam tiap tabung reaksi ditambahkan 0,5 ml larutan DPPH 1mM dalam ethanol, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus:

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

Absorbansi blanko

Nilai konsentrasi dan hambatan ekstrak diplot masing-masing pada sumbu x dan y. Persamaan garis yang diperoleh dalam bentuk $y = b \ln(x) + a$ digunakan untuk mencari nilai IC (*inhibitor concentration*), dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀ menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Suryaningrum *et al.*, 2006).

3.3.5.3. Uji Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Analisa kadar air dilakukan untuk mengetahui jumlah air bebas ekstrak sampel dalam ethanol 96%. Uji yang dilakukan berdasarkan metode Thermogravimetri (Sudarmadji *et al.*, 1997) yaitu dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105-110°C selama 3 jam atau didapat berat yang konstan. Selisih berat tersebut dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air diuapkan. Kadang-kadang pengurangan dilakukan tanpa pemanasan. Bahan dimasukkan dalam desikator dengan H₂SO₄ pekat sebagai pengering sehingga mencapai berat yang konstan. Besarnya kadar air dapat dirumuskan :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(A+B)-(C)}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat botol timbang

B = Berat sampel

C = Berat akhir (Botol timbang + sampel)

3.4. Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1% dan jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNT pada taraf 1 % untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini waktu fermentasi dan kadar air bahan.

