

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini ada bahan utama, bahan kimia, serta bahan pembantu. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut hijau *Caulerpa rasemosa* yang didapatkan dari desa Pedike, pulau Talango, Sumenep, Madura. Sedangkan bahan kimia yang digunakan yaitu aseton, metanol, heksan, dietil eter, etil asetat,  $\text{CaCO}_3$ , akuades, silica gel,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%, pereaksi folin ciocalteu, pereaksi DPPH serta larutan asam galat. Selanjutnya bahan pembantu terdiri dari garam gosok, aseton teknis, air, kertas label, kapas, tisu, cling wrap, aluminium foil, gas nitrogen, pasir laut, kain saring dan kertas saring.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat untuk ekstraksi, isolasi pigmen fukosantin, uji aktivitas antioksidan dan uji total fenol. Pada ekstraksi, peralatan yang digunakan antara lain nampan, *rotary vacuum evaporator*, timbangan digital, *beaker glass* (ukuran 1000 ml, 500 ml dan 50 ml), gunting, corong pisah, *magnetic stirrer*, *hot plate*, mortar, pipet tetes, bola hisap, pipet volume 1 ml dan 10 ml, spatula, botol sampel, corong, gelas ukur 100 ml, dan *erlenmeyer* 1000ml.

#### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini menggunakan metode eksploratif untuk menguji aktivitas fukosantin murni pada alga hijau *Caulerpa rasemosa*. Penelitian eksploratif bersifat menjelajah yaitu merupakan

suatu penelitian yang dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali.

Menurut Irawan (2007), metode eksploratif adalah penelitian 33 yang digunakan untuk mengumpulkan data-data awal tentang sesuatu. Metode eksploratif digunakan untuk mengkaji sesuatu seperti apa adanya (variable tunggal) atau pola hubungan (korelasional) antara dua atau lebih variable.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

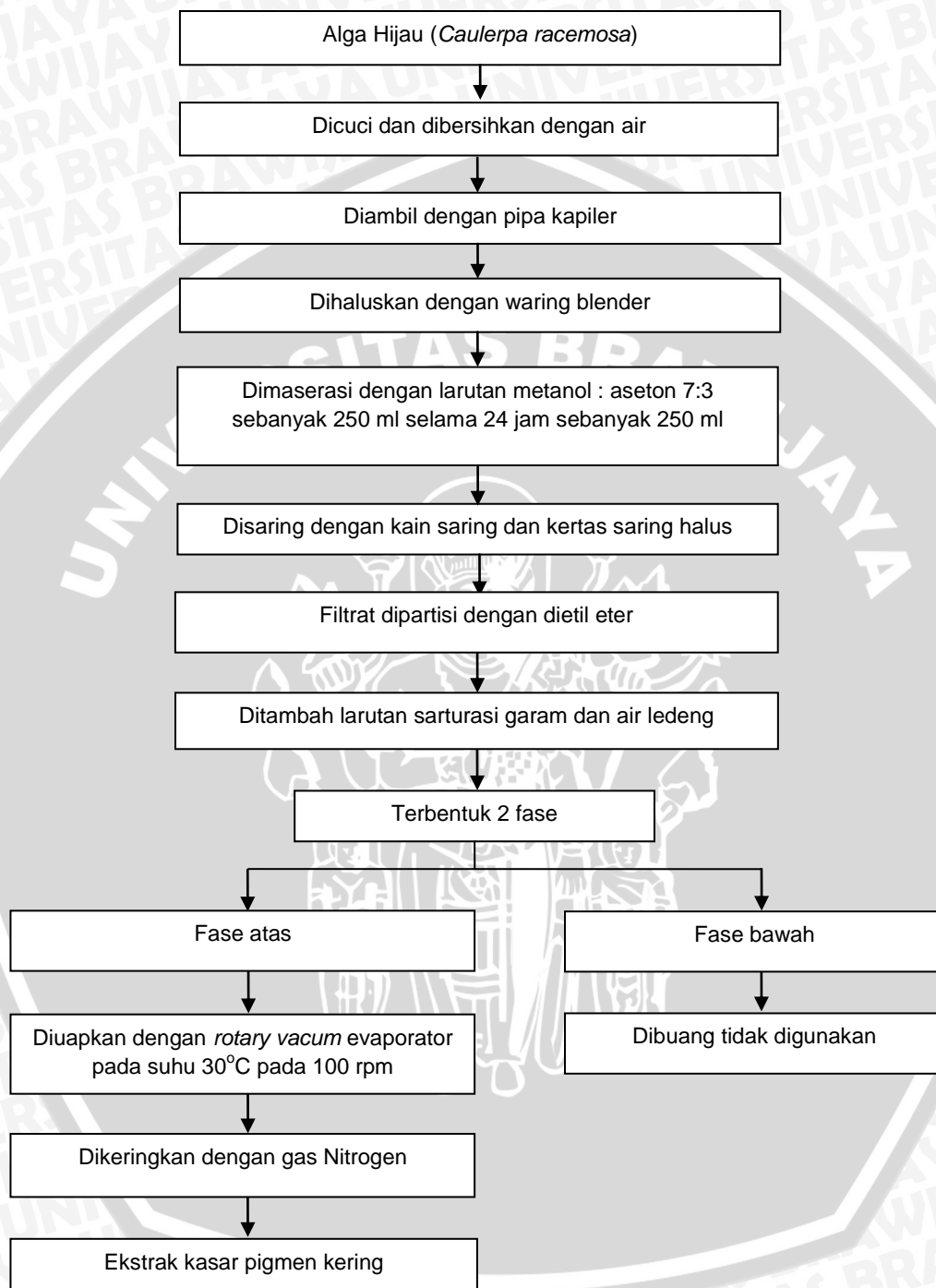
#### **3.3.1 Persiapan Sampel**

Sampel berupa alga hijau *Caulerpa rasemosa* dicuci bersih dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran selanjutnya sampel di keringkan dengan kain. Selama perjalanan rumput laut disimpan di *coolbox* dan dibawa ke laboratorium mikrobiologi Fakultas perikanan dan ilmu kelautan Universitas Brawijaya. Setelah itu sampel dicuci dan di tiriskan untuk menghilangkan sisa air.

#### **3.3.2 Ekstraksi Fukosantin**

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti *et al.*, (2007) yang dimodifikasi oleh Mu'amar (2009). Rumput laut hijau *Caulerpa rasemosa* segar dicuci sampai bersih dan dibersihkan dari kotoran yang menempel. Selanjutnya rumput laut dipotong kecil-kecil sebesar 0,5 cm x 0,5 cm dan diangin-anginkan untuk mengurangi kadar air sampel diatas koran. Rumput laut segar diambil sebanyak 100 g dengan menggunakan timbangan digital  $10^{-2}$  dan dihaluskan dengan blender selama kurang lebih 1 menit dengan tujuan untuk memperluas permukaan. Kemudian dilakukan maserasi dengan menambahkan bahan kimia metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) dan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) dengan perbandingan (7 metanol : 3 aseton) sebanyak 250 ml selama 24 jam pada suhu kamar. Tujuan dari penggunaan methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) agar dapat melarutkan semua senyawa

organik yang terkandung dalam bahan. Sedangkan penggunaan pelarut aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) adalah untuk mengangkat pigmen yang bersifat polar.



**Gambar 7 .** Ekstraksi dan Partisi *Caulerpa Rasemosa* untuk Isolasi (Pangestuti, *et al.*, 2007) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009)

### 3.3.3 Partisi Fukosantin

Setelah dilakukan maserasi, selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kain saring dan kertas saring halus hingga diperoleh filtrat dari rumput laut. Proses penyaringan ini bertujuan untuk mengambil zat-zat yang mengandung pigmen sedangkan sisa-sisa (ampas) rumput laut dibuang, kemudian filtrat di partisi. Selanjutnya filtrat di partisi menggunakan corong pisah dengan larutan dietil eter, saturasi garam dan air. Penggunaan dietil eter berfungsi untuk mengikat seluruh senyawa yang bersifat non polar sehingga senyawa tersebut berada pada fase atas, lalu ditambahkan dengan saturasi garam grosok dan air yang berfungsi untuk mengikat senyawa yang bersifat polar serta agar pelarut lebih tertarik mengikat larutan saturasi garam grosok dan air yang memiliki elektronegatifan dan elektropositifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut metanol dan aseton terikat pada larutan saturasi garam grosok dan air sehingga berada dibawah. Fase yang diambil dalam partisi adalah fase atas karena hampir seluruh pigmen berada pada fase ini, dan hasil dari fase bawah tidak digunakan karena merupakan campuran dari methanol, aseton serta air. Hasil dari fase atas dimasukkan kedalam tabung *rotavapor* kemudian di *rotary vacuum evaporator* pada suhu 30°C dengan kecepatan 100 rpm yang bertujuan untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Filtrat kemudian dipindahkan kedalam botol vial dan filtrat dikeringkan dengan gas nitrogen yang bertujuan agar pigmen tidak rusak sehingga pigmen kering sempurna. Ekstrak pigmen kering ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam *freezer*.

### 3.3.4 Isolasi Klorofil

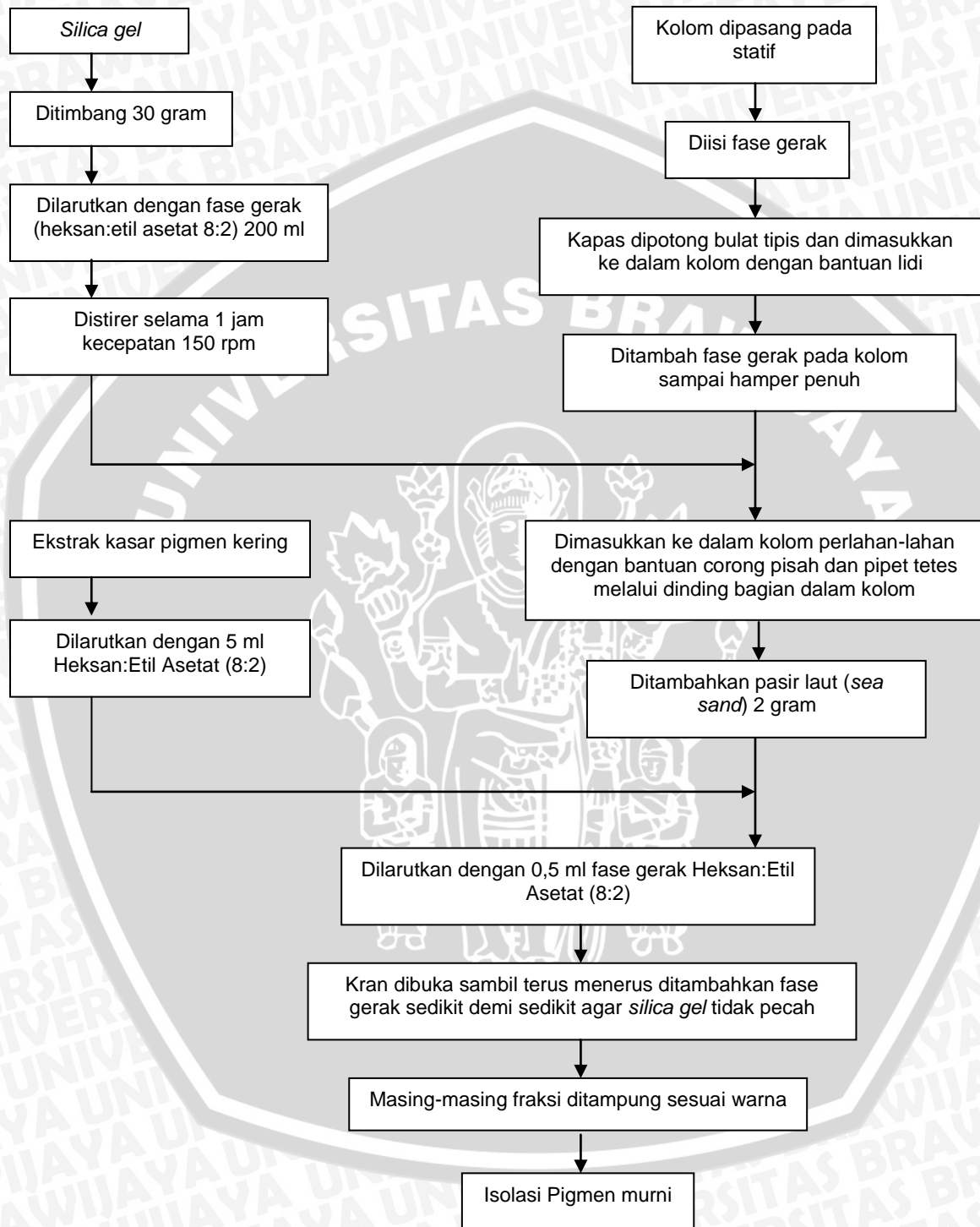
Isolasi klorofil dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* sedangkan fase gerak menggunakan heksan : etil asetat. Hal pertama yang dilakukan adalah preparasi fase diam (*silica gel*) untuk

kromatografi kolom dengan menggunakan *beaker glass* dimana *Silica gel* sebanyak 30 gram dilarutkan dalam heksan : etil asetat (8 : 2) 200 mL dan distirer selama  $\pm 1$  jam dengan kecepatan 150 rpm. Tujuan di stirer adalah agar tidak ada lagi udara didalam *silica gel* sehingga kolom tidak pecah atau retak.

Tahap selanjutnya kolom di pasang pada statif dan dimasukkan sedikit fase gerak untuk membasahi kapas. Kapas tipis dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi, kemudian ditambahkan fase gerak sampai hampir penuh. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom dengan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara di tengah tengah kolom. Timbunan bubuk *silica gel* akan mencapai  $\frac{3}{4}$  tinggi kolom. Pada proses tersebut kolom yang telah berisi fase diam dibiarkan selama 12 jam yang bertujuan untuk mengetahui apakah *silica gel* (fase diam) pecah atau tidak, jika pecah atau retak sebaiknya diulang lagi dari proses awal guna memperoleh hasil yang terbaik yaitu proses penyerapan oleh *silica gel* terhadap senyawa dengan sempurna, jika retak fase diam tidak melakukan proses penyerapan dengan baik. Selanjutnya ditambahkan *sea sand* (pasir laut) agar pelarut tidak mengenai silika gel dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Ekstrak kasar klorofil dari *Caulerpa racemosa* kering yang telah dilarutkan dalam 10 mL fase gerak (heksan : etil asetat 8:2), kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Kran kolom yang berada di bawah dibuka. Ekstrak akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Selanjutnya dimasukkan fase gerak sambil kran kolom dibuka. Fase gerak akan mengalir terus menerus, sehingga perlu menambahkan fase gerak baru agar kolom tidak menjadi kering. Fase gerak yang ditambahkan kedalam kolom ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikkan konsentrasi etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan untuk heksan:etil asetat 8:2v/v, 7:3 v/v. 6:4 v/v. Kemudian fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan menggunakan tabung

reaksi berdasarkan warnanya. Selanjutnya dianalisis dengan menggunakan KLT.



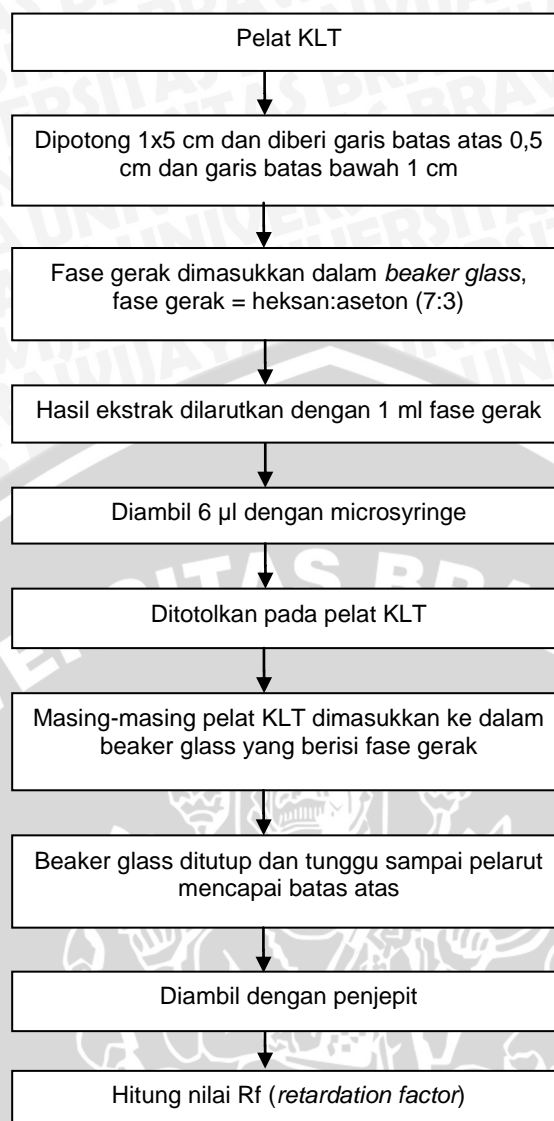
**Gambar 8.** Kromatografi kolom (Pangestuti, *et al.*, 2007) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009)

### 3.3.5 Identifikasi Kandungan Fukosantin

#### 3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil dari isolasi fukosantin tersebut kemudian di uji KLT dimana pada fase diam menggunakan *silica gel* F-254 dan fase gerak menggunakan heksan : aseton dengan perbandingan (7:3 v/v). Tujuan dari penggunaan fase gerak heksan dan aseton adalah untuk melarutkan senyawa yang non polar, polar maupun semi polar sehingga senyawa tersebut dapat larut dan tertarik keatas sesuai tingkat kepolarannya.

Selanjutnya, hasil dari isolasi yang ditampung dalam botol vial diambil secukupnya menggunakan tusuk gigi dan ditotolkan pada pelat KLT sambil diangin-anginkan. Setelah bercak tersebut mengering, pelat dimasukkan dalam *beaker glass* berisi fase gerak. Fase gerak yang dimasukkan dalam *beaker glass* jumlahnya tidak terlalu banyak sekitar 4ml. Selanjutnya *beaker glass* ditutup dengan plastik wrap dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Kemudian diambil dengan pinset tanpa menyentuh garis atas pelat. Totol yang terbentuk pada pelat diamati dan dihitung nilai Rf-nya (*retardation factor*).

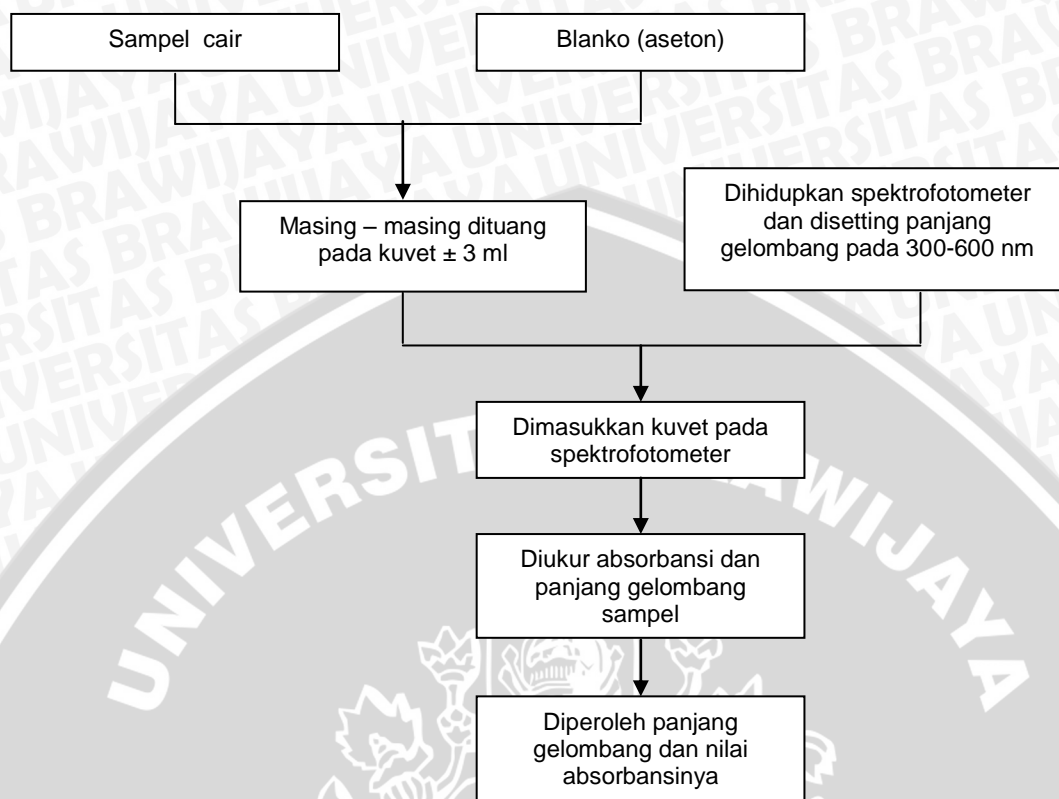


**Gambar 9.** Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti, *et al.*, 2007)

### 3.3.5.2 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi fukosantin rumput laut *Cauleurpa rasemosa* yang diamati. Di dalam analisa kuantitatif dengan metode spektrofotometri, panjang gelombang sinar yang digunakan harus dipilih terlebih dahulu, agar komponen yang dianalisa menyerap sinar tersebut semaksimal mungkin. Spektrofotometer UV-VIS ini berfungsi untuk analisis kualitatif atas dasar spektrum dan analisis kuantitatif atas dasar serapan.





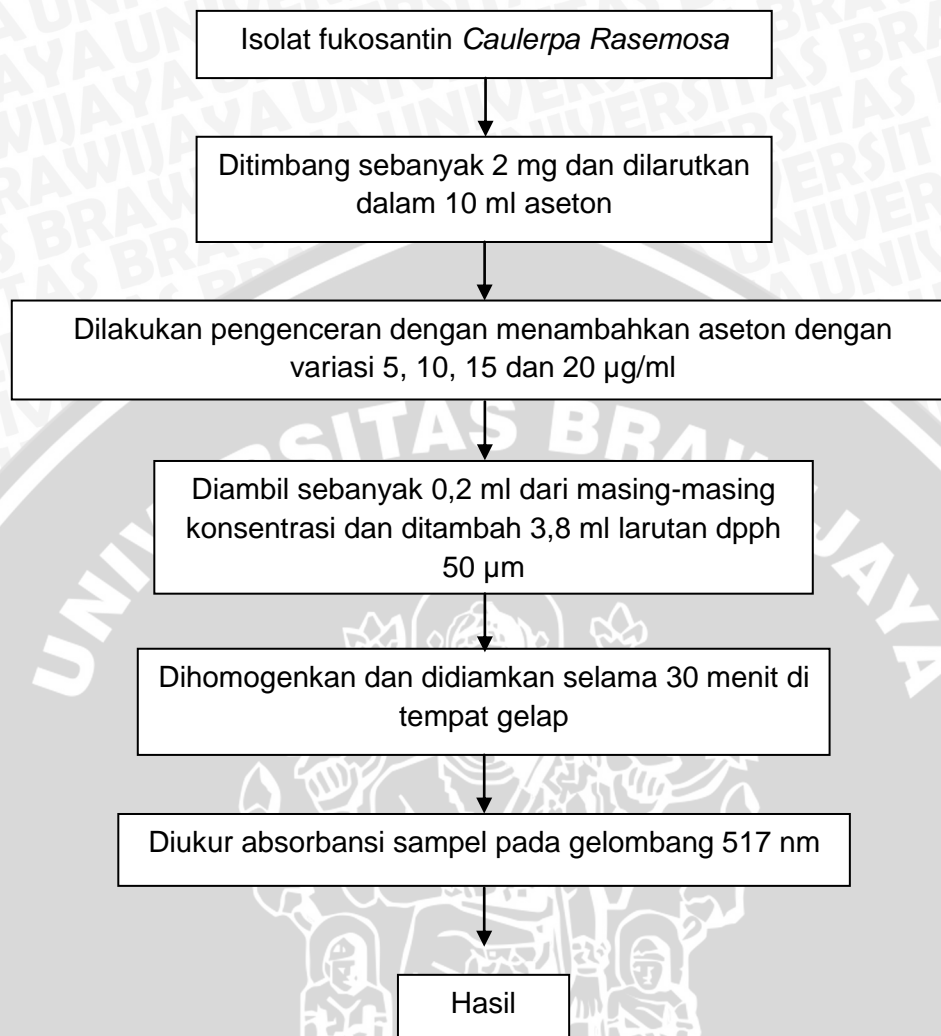
**Gambar 10.** Analisa menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Jenie, *et al.*, 1997)

### 3.3.6 Uji Aktivitas Antioksidan Fukosantin Dengan Metode DPPH

Untuk menguji aktivitas antioksidan digunakan metode radikal DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl), karena metode ini cukup sederhana, mudah dikerjakan, dan tidak membutuhkan banyak waktu. Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuan untuk menangkap radikal DPPH. Keberadaan antioksidan akan menetralsasi radikal DPPH dengan menyumbangkan elektron kepada DPPH, menghasilkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Penghilangan warna akan sebanding dengan jumlah elektron yang diambil oleh DPPH sehingga dapat diukur secara spektrofotometri (Prakash *et al.*, 2007).

Ekstrak fukosantin ditimbang sebanyak 0,2 mg. kemudian dilarutkan dengan 10 ml aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) dalam labu ukur maka didapatkan konsentrasi 1 mg/ml. Selanjutnya lakukan pengenceran dengan menambahkan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (5,10,15,20  $\mu\text{g/ml}$ ). Masing - masing konsentrasi di pipet sebanyak 0,2 ml larutan sampel dengan pipet mikro dan dimasukkan kedalam botol vial. Kemudian ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH 50  $\mu\text{M}$ . campuran selanjutnya dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap dan serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas penangkapan radikal bebas ditetapkan sebagai persentase penghambatan yang dapat dihitung berdasarkan persamaan % Inhibisi =  $[(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1)/\text{Abs}_0] \times 100\%$ , dimana  $\text{Abs}_0$  merupakan absorbansi blanko dan  $\text{Abs}_1$  merupakan absorbansi sampel. Selanjutnya nilai konsentrasi sampel dari masing-masing dan hambatan radikal bebas (% inhibisi) di plot masing-masing pada sumbu x dan y dengan persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dari bentuk persamaan  $y = a + bx$  akan digunakan untuk mencari nilai  $\text{IC}_{50}$  (*inhibitor concentration 50%*).

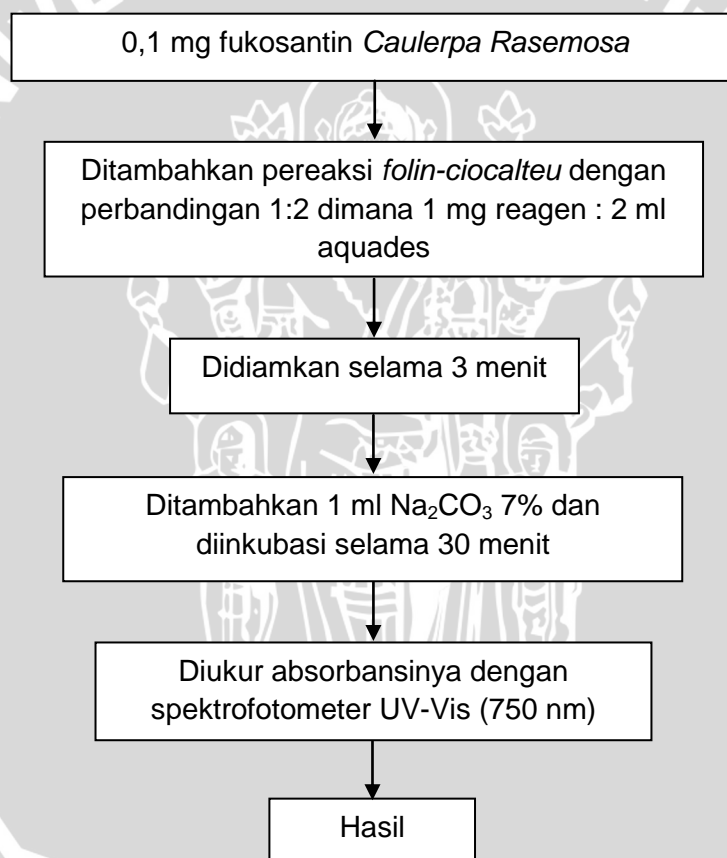


Gambar 11. Diagram Alir Metode DPPH

### 3.3.7 Uji Total Fenol Fukosantin Dengan Metode *Folin-Ciocalteu*

Menurut Shahidi dan Marian (1995) dalam Yulia O. (2007) pengujian total fenol bertujuan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung dalam sampel, sehingga diduga jika kandungan senyawa fenolik di dalam sampel tinggi maka aktivitas antioksidannya akan tinggi juga. Menurut Tamat, *et al.* (2007), senyawa fenol adalah senyawa antioksidan peredam radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen (proton) dari gugus hidroksil yang terikat cincin aromatik.

Analisa total fenol dapat diukur dengan spektrofotometer menggunakan pereaksi *folin ciocalteu*. Ekstrak fukosantin rumput laut *Caulerpa Rasemosa* diambil sebanyak 0,1 mg kemudian ditambahkan dengan *folin ciocalteu* perbandingan 1:2 dimana 1 mg reagen : 2 ml aquades. Kemudian di fortteks lalu didiamkan selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% dan diinkubasi selama 30 menit. Kemudian dibaca pada absorbansi dengan panjang gelombang 725 nm. Serapan yang telah diperoleh lalu dimasukkan kedalam persamaan kurva standart asam galat. Total fenol yang telah diperoleh hasilnya sebagai mg equivalen asam galat (mg GAE/g sampel).



**Gambar 12.** Diagram Alir Uji Total Fenol