

BAB II METODE PENELITIAN

A. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari 2022 sampai bulan Agustus 2022 terdiri dari penelitian lapangan dan penelitian laboratorium. Sampel *Sargassum binderi*, *Sargassum cinereum*, *Padina australis*, dan *Turbinaria conoides* diambil dari Kepulauan Seribu (Coppejans *et al.*, 2009). Uji bahan bioaktif dari makroalga dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Biologi Universitas Nasional Jl. Bambu Kuning, Pejaten, Pasar Minggu, Jakarta Selatan. Uji skrining fitokimia dan kadar saponin dilakukan di laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat-obatan, Bogor.

B. Instrumen penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *grinder*, ayakan 60 mesh, neraca analitik, kaca arloji, cawan kaca, spatula, spektrofotometer UV-Vis, *software* UV-Vis, kuvet kuarsa, labu Erlenmeyer, pipet volume, *bulb*, pengaduk kaca, mikropipet, mikrotip, pipet tetes, kertas saring, botol gelap, *rotary evaporator* BUCHI Rotavapor, kertas saring, corong, labu ukur, gelas piala, tabung reaksi, labu spiritus, *TLC Scanner* Camag 3, lempeng KLT *aluminium sheet silica gel 60 GF 254*, dan *shaker*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia makroalga yang sudah dikeringkan, akuadestilata, etanol 70%, etanol absolut, HCl 2N, HCl pekat, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk Mg, FeCl₃ 0,1 %, gelatin 1 %, asam tanat, Folin Ciocalteu, Na₂SO₃ 20 %, kuarsetin, AlCl₃ 10 %, spiritus, CHCl₃, etil asetat, saponin, dan asam asetat glasial.

Variabel penelitian yang digunakan yaitu kandungan fitokimia secara kualitatif dan kuantitatif (tabel 1).

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)

No	Variabel	DOV	Sumber	Satuan
1	Spesies makroalga	Spesies makroalga yang diambil, terdiri dari <i>Sargassum binderi</i> , <i>Sargassum cinereum</i> , <i>Padina australis</i> , <i>Turbinaria conoides</i>	primer	-
2	Kandungan fitokimia secara kualitatif	Hasil pengujian <i>screening</i> alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin	primer	-
3	Kandungan fitokimia secara kuantitatif	Konsentrasi kandungan tanin dan flavonoid setiap 100 gram sampel	primer	mg/mL

C. Cara kerja

1. Pengambilan sampel dan persiapan

Sampel makroalga segar diambil dari lokasi di Kepulauan Seribu kemudian dijemur di bawah sinar matahari sampai kering. Sampel kering kemudian dibawa ke lab untuk proses ekstraksi dan uji fitokimia.

2. Ekstraksi makroalga

Setiap spesies makroalga kering digiling dengan *grinder* sampai halus, kemudian disaring menggunakan ayakan 60 mesh. Serbuk hasil penggilingan kemudian dimaserasi dengan etanol 70 % selama 3 hari dan dikocok selama 5 menit setiap harinya. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* sampai membentuk ekstrak kental.

3. Uji Kualitatif

a. Uji alkaloid

Sebanyak 0,5 g serbuk sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan HCl 2 N dan akuadestilata dengan rasio 1:9. Kemudian sampel dipanaskan menggunakan labu spiritus sampai mendidih, setelah itu disaring dengan kertas saring ke dalam tabung reaksi yang lain. Filtrat dibagi ke tiga tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan pereaksi yang berbeda, yaitu pereaksi Dragendorff, Wagner, dan Mayer sebanyak 10 tetes

pada setiap tabung yang berbeda. Indikasi alkaloid positif oleh pereaksi Dragendorff membentuk endapan berwarna merah-jingga, dengan pereaksi Wagner membentuk endapan berwarna coklat-merah, sedangkan dengan pereaksi Mayer membentuk endapan berwarna kuning (Tiwari *et al.*, 2011).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dengan 10 mL etanol 70 %. Sampel dipanaskan dengan labu spiritus kemudian disaring menggunakan kertas saring ke tabung reaksi yang berbeda. Filtrat sampel ditambahkan 0,03 g serbuk Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Indikasi flavonoid positif jika warna filtrat berubah menjadi kemerahan (Samejo *et al.*, 2013).

c. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL akuadestilata. Sampel dipanaskan dengan labu spiritus sampai mendidih kemudian disaring dengan kertas saring ke tabung reaksi yang berbeda. Filtrat dibagi ke dua tabung berbeda, pada tabung pertama ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 0,1% dan pada tabung kedua ditambahkan gelatin 1 % yang mengandung NaCl. Indikasi tanin positif apabila membentuk warna hijau-cokelat, biru, hingga hitam pada penambahan FeCl_3 dan terbentuknya endapan berwarna putih pada penambahan gelatin (Samejo *et al.*, 2013; Tiwari *et al.*, 2011).

d. Uji Saponin

Sebanyak 1 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL akuadestilata. Sampel dipanaskan dengan labu spiritus, lalu sampel didinginkan, lalu sampel dikocok selama satu menit sampai terbentuk busa yang bertahan selama 10 menit (Tiwari *et al.*, 2011).

4. Uji Kuantitatif

a. Uji spektrofotometri Tanin

1) Penentuan panjang gelombang maksimal

Panjang gelombang maksimal didapatkan dengan menggunakan fitur *peak wavelength* pada aplikasi mesin *Labdex Double Beam Spectrophotometer LX242DS*. Pengambilan nilai panjang gelombang maksimal diambil dari nilai absorbansi tertinggi

pada pembacaan absorbansi sampel asam tanat dengan konsentrasi yang sudah ditentukan dalam rentang panjang gelombang 400 – 800 nm.

2) Pembuatan kurva kalibrasi deret standar

Deret standar tanin disiapkan dengan membuat larutan stok asam tanat 100 ppm sebanyak 50 mL. Sebanyak 5 mg serbuk asam tanat dilarutkan dalam 50 mL akuadestilata, kemudian diencerkan dengan seri konsentrasi deret sebesar 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm dan 3,125 ppm masing-masing sebanyak 10 mL. Sebanyak 0,5 mL Folin Ciocalteu dan 7,5 mL akuadestilata ditambahkan ke setiap konsentrasi deret, lalu didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,5 mL Na_2CO_3 20 % ke setiap deret dan dibiarkan homogen dengan didiamkan pada tempat yang tidak terkena cahaya selama 30 menit. Lalu, absorbansi deret diukur pada panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva kalibrasi standar untuk menentukan persamaan regresi antara konsentrasi dan absorbansi standar menggunakan rumus $y = a + bx$ (Aryantini, 2021; Chaovanalikit dan Wrolstad, 2004; Makkar *et al.*, 1993).

3) Pengujian kadar tanin

Pengujian ini dilakukan dengan membuat larutan sampel, 25 mg sampel dalam 10 mL akuadestilata. Lalu, sebanyak 0,5 mL sampel diambil dan dicampurkan dengan 0,5 mL Folin Ciocalteu serta 7,5 mL akuadestilata. Larutan sampel didiamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan Na_2CO_3 20%. Sampel dihomogenkan dengan cara didiamkan pada tempat yang tidak terkena cahaya selama 30 menit. Kemudian, larutan sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya (Chaovanalikit dan Wrolstad, 2004). Data absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung kadar total menggunakan persamaan sebagai berikut (Wachidah, 2013; Winahyu *et al.*, 2019):

$$\text{Kadar} = \frac{X \times V}{W} \times Fp$$

Keterangan:

Kadar = mg/g

X = konsentrasi (mg/L)

V = Volume sampel (L)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat ekstrak (g)

b. Uji spektrofotometri flavonoid

1) Penentuan panjang gelombang maksimal

Panjang gelombang maksimal didapatkan dengan menggunakan fitur *peak wavelength* pada aplikasi mesin *Labdex Double Beam Spectrophotometer LX242DS*. Pengambilan nilai panjang gelombang maksimal diambil dari nilai absorbansi tertinggi pada pembacaan absorbansi sampel kuarsetin dengan konsentrasi yang sudah ditentukan dalam rentang panjang gelombang 400 – 800 nm.

2) Pembuatan kurva kalibrasi deret standar

Deret standar kuarsetin dibuat dengan melarutkan 2,5 mg kuarsetin di dalam 25 mL etanol absolut sebagai larutan stok 100 ppm. kemudian diencerkan dengan seri konsentrasi deret sebesar 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm dan 3,125 ppm masing-masing sebanyak 10 mL. Lalu, sebanyak 1 mL dari setiap konsentrasi pada deret diambil dan ditambahkan 3 mL etanol absolut, 0,2 mL AlCl₃ 10%, 0,2 mL asam asetat glasial, serta 5,6 mL akuadestilata. Kemudian larutan didiamkan selama 30 menit. Setelah itu, absorbansi deret standar diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan. Lalu, berdasarkan data absorbansi deret standar yang diperoleh, dibuat kurva standar untuk menentukan persamaan regresi menggunakan rumus $y = a + bx$ (Dahlia dan Ahmad, 2014; Haeria dan Andi, 2016).

3) Pengujian kadar flavonoid

Kadar flavonoid diuji dengan melarutkan 25 mg sampel pada 10 mL etanol absolut menjadi larutan sampel dengan konsentrasi 2.500 ppm. Kemudian, sebanyak 1 mL diambil dari larutan sampel dan ditambahkan 3 mL etanol absolut, 0,2 mL AlCl₃ 10%, 0,2 mL asam asetat glasial, serta 5,6 mL akuadestilata, lalu sampel didiamkan selama 30 menit. Setelah itu, ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya. Data absorbansi sampel yang didapat digunakan untuk menghitung kadar menggunakan persamaan regresi yang sudah dibuat (Ahmad *et al.*, 2015; Syafarina *et al.*, 2019). Data absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung kadar total menggunakan persamaan sebagai berikut (Wachidah, 2013; Winahyu *et al.*, 2019):

$$Kadar = \frac{X \times V}{W} \times Fp$$

Keterangan:

Kadar = mg/g

X = konsentrasi (mg/L)

V = Volume sampel (L)

Fp = Faktor pengenceran

W = Berat ekstrak (g)

c. Uji kadar saponin

Kadar saponin diuji dengan melarutkan 250 mg sampel ke dalam labu ukur 25 ml, kemudian ditambah akuadestilata sampai $\frac{1}{4}$ volume labu dan dikocok dengan *shaker* selama 2 jam. Setelah itu, volume ditepatkan sampai tanda tera pada labu dan disimpan selama 24 jam. Kemudian, filtrat disaring dan diteteskan pada lempeng *aluminium sheet silica gel 60 GF 254* sebanyak 5 μ l dengan menggunakan bahan pembanding saponin yang dilarutkan dalam akuadestilata dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 5 μ l. Lalu, dielusikan dengan menggunakan eluen CHCl_3 : etanol : etil asetat sampai batas eluen sepanjang 15 cm. Setelah itu, lempeng KLT dibiarkan kering dan diukur dengan menggunakan alat *TLC Scanner Camag 3* pada panjang gelombang 301 nm (Balitro).

D. Analisis data

1. Analisis data untuk uji kualitatif fitokimia

Hasil uji kualitatif fitokimia dimasukkan ke dalam Ms Excel, kemudian dianalisis secara deskriptif kandungan apa saja yang memiliki potensi.

2. Analisis data untuk uji kuantitatif fitokimia

Data kuantitatif fitokimia dimasukkan ke dalam Ms Excel kemudian dibandingkan antar sampel untuk melihat kandungan paling tinggi.