

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama lima bulan, dimulai pada bulan Maret hingga Agustus 2024 di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia FPMIPA UPI. Proses yang dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati ini meliputi preparasi hingga pelaksanaan uji kandungan total florotanin. Pengujian karakterisasi UV-Vis, FTIR, aktivitas antioksidan, dan aktivitas inhibisi ekstrak florotanin terhadap α -amilase saliva dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro* ini yaitu neraca analitik Mettler Toledo ME204, wadah kedap udara, botol *vial*, *stirring hot plate* Thermo Scientific Cimatec+, blender, oven, spatula, batang pengaduk, kaca arloji, gelas kimia 1 L, gelas kimia 100 mL, gelas kimia 250 mL, gelas kimia 400 mL, tabung *centrifuge*, *centrifuge* Kokusan H-103N, corong pisah, klem ring corong pisah, tiang statif, *rotary evaporator* Buchi R3, pipet tetes, pipet seukuran 5 dan 10 mL, tabung reaksi, mikropipet 200-1000 μ L, alumunium foil, plastik *wrap*, labu ukur 25 mL, labu ukur 10 mL, labu ukur 50 mL, labu ukur 100 mL, Erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 50 mL, gelas ukur 100 mL, mortar alu, *magnetic stirrer*, *vortex mixer* Scilogex MX-S, termometer, *waterbath*, spektrofotometer FTIR (Shimadzu 8400), spektrofotometer UV-Vis (UV Mini 1240, Shimadzu), dan lemari *freezer*.

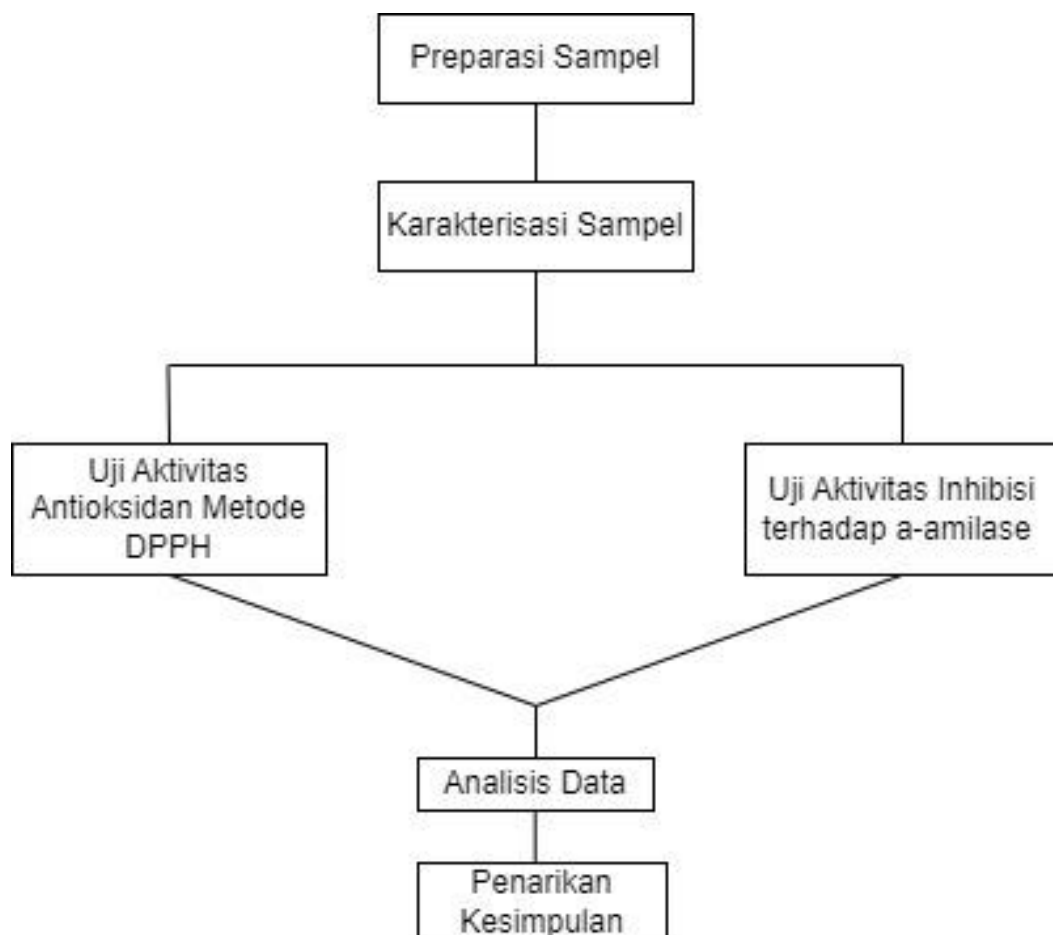
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro* ini yaitu biomassa alga *Sargassum polycystum* dari FPIK Undip Semarang, air tawar, akuades, etanol 50%, etil asetat teknis, metanol teknis, kertas saring Whatman No.1, pereaksi Folin-Ciocalteu (Merck), natrium karbonat (7,5% dalam akuades), floroglusinol (pro analis, Merck), larutan buffer natrium fosfat 0,02 M (pH 6,9 dengan 0,006 M NaCl), larutan α -amilase yang dibuat dari saliva manusia non-penderita diabetes dan saliva

manusia penderita diabetes, akarbosa 100 mg, larutan pati 1%, pereaksi DNS (pro analis, Himedia), dan NaOH (Philip Harris), DPPH (pro analis, Merck), dan asam askorbat (pro analis, Merck).

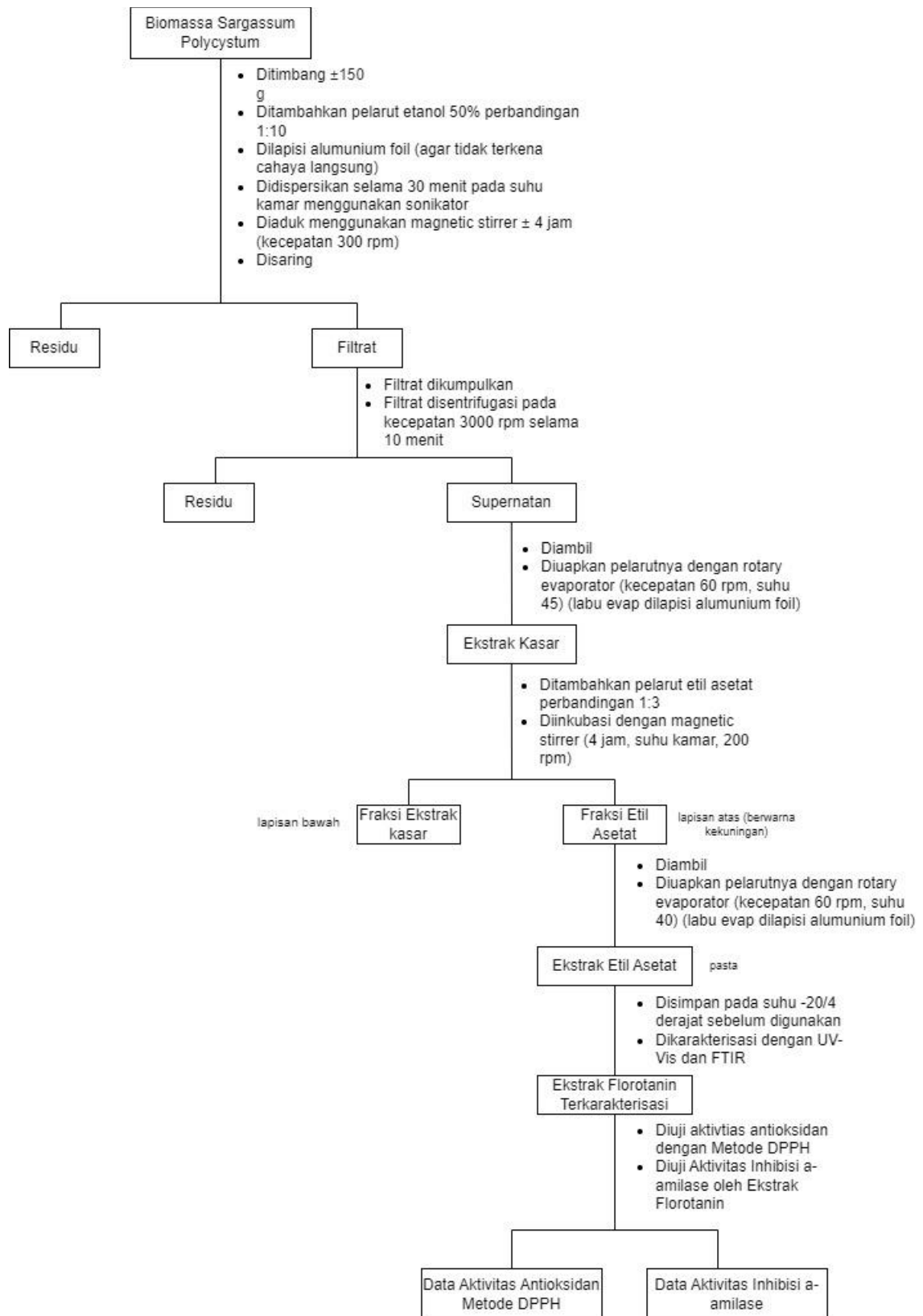
3.3 Diagram Alir Penelitian

Penelitian mengenai karakteristik ekstrak florotanin dari alga coklat *Sargassum polycystum* dan aktivitasnya sebagai kandidat antidiabetes dapat dilakukan dengan melakukan ekstraksi senyawa florotanin dari alga tersebut. Ekstrak yang didapat kemudian dikarakterisasi menggunakan UV-Vis untuk menentukan panjang gelombang maksimal dan menentukan kandungan total florotanin, serta mengidentifikasi gugus fungsi dengan FTIR. Ekstrak florotanin yang telah dikarakterisasi kemudian diuji aktivitasnya dengan uji antioksidan dan uji inhibisi ekstrak florotanin terhadap enzim α -amilase sebagai kandidat antidiabetes secara *in vitro*. **Gambar 3.1** menunjukkan diagram penelitian yang akan dilakukan secara keseluruhan.



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian secara keseluruhan

Diagram alir untuk pengujian secara *in vitro* ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Diagram alir penelitian *in vitro*

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel Alga Coklat *Sargassum Polycystum*

Preparasi sampel dilakukan untuk mengawali penelitian yaitu dimulai dari pencucian alga *Sargassum polycystum* segar dengan air mengalir untuk menghilangkan zat atau kontaminan yang terbawa, lalu pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan dua cara yaitu dijemur di bawah sinar matahari dan menggunakan oven pada suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ untuk memastikan alga terbebas dari air. Setelah itu, alga yang sudah kering dihaluskan dengan blender kemudian disimpan dalam wadah kedap udara sebelum digunakan.

3.4.2 Ekstraksi Florotanin dari Alga Coklat *Sargassum Polycystum*

Proses ekstraksi florotanin dari *Sargassum polycystum* dilakukan berdasarkan metode Mugozin & Husni (2019) dan Anggrainy Sianipar *et al.* (2022) dengan sedikit modifikasi. Serbuk kering *Sargassum* sp. sebanyak 180 g didispersikan dalam 1800 mL (1:10) pelarut etanol 50% selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah itu, dilakukan inkubasi dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 4 jam pada suhu kamar dengan kecepatan 300 rpm. Campuran kemudian disaring untuk memisahkan residu alga dan filtrat-nya.

Filtrat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk menghilangkan residu yang masih terbawa. Setelah selesai, supernatan diambil selanjutnya disebut sebagai ekstrak kasar. Ekstrak kasar dikumpulkan dan pelarut-nya dihilangkan menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan 60 rpm, suhu 45°C hingga pekat. Ekstrak kasar yang sudah pekat diekstraksi kembali menggunakan pelarut etil asetat teknis dengan perbandingan 1:3 sebanyak dua kali ekstraksi. Campuran tersebut kemudian diinkubasi menggunakan *magnetic stirrer* (20 menit, suhu kamar, 300 rpm). Setelah diinkubasi, akan terbentuk larutan ekstrak terpisah yang terbagi menjadi dua lapisan. Lapisan yang dibawah adalah fraksi ekstrak kasar dan lapisan di atas adalah fraksi etil asetat.

Fraksi etil asetat dikumpulkan dalam cawan penguapan lalu pelarut-nya dihilangkan dengan pemanasan di atas penangas air pada suhu 40°C hingga menjadi pasta. Pasta tersebut selanjutnya disebut sebagai ekstrak florotanin. Ekstrak kemudian disimpan pada $-14^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}$ sebelum digunakan

3.4.3 Penentuan Kandungan Total Florotanin

Penentuan kandungan total florotanin terhadap ekstrak florotanin dilakukan berdasarkan metode Ismail *et al.* (2023) dengan sedikit modifikasi. Penentuan dari ekstrak yang dihasilkan dilakukan dengan cara mengambil 400 μ L larutan sampel 1000 ppm pada tabung reaksi yang dicampur dengan 2,6 mL aquades dan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu. Setelah itu, ditambahkan 2 mL natrium karbonat (7,5% dalam akuades) setelah 5 menit dari proses pencampuran. Sampel kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dalam keadaan gelap. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 770 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan florotanin dalam ekstrak dapat dikalkulasi dengan menggunakan floroglusinol sebagai standar yang dibuat mulai dari 0-100 ppm. Hasil pengukuran tersebut ekuivalen dengan miligram floroglusinol per gram sampel (mg PGE/g). Ketika reaksi berlangsung, gugus hidroksil fenolik (ekstrak florotanin) akan bereaksi dengan Folin-Ciocalteu yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer. Reaksi yang terjadi tersebut menunjukkan adanya pembentukan kompleks asam fosfomolibdat biru dengan struktur yang tidak diketahui. Apabila warna biru yang terbentuk semakin gelap, maka hal tersebut menunjukkan kesetaraan dengan konsentrasi ion fenolik yang terbentuk, artinya konsentrasi senyawa fenoliknya akan semakin tinggi. Dalam hal ini, senyawa fenolik yang dituju adalah senyawa florotanin yang terkandung di dalam ekstrak.

3.4.4 Karakterisasi Ekstrak Florotanin dengan UV-Vis

Karakterisasi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan metode Gheda *et al.* (2023) dengan sedikit modifikasi. Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan antara sampel ekstrak florotanin dan floroglusinol untuk standar sebagai pembandingnya. Sebanyak 1 mg ekstrak florotanin dan floroglusinol masing-masing dilarutkan dengan pelarutnya (etanol 50%) dalam labu ukur 10 mL. Setelah itu, larutan sampel ekstrak florotanin diukur daerah serapannya dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Hal yang sama dilakukan dengan larutan standar floroglusinol yang telah dibuat.

3.4.5 Karakterisasi Ekstrak Florotanin dengan FTIR

Karakterisasi dilakukan menggunakan spektroskopi FTIR berdasarkan metode Bai *et al.* (2022) dengan sedikit modifikasi. Instrumen FTIR yang digunakan yaitu Shimadzu 8400 dengan kisaran bilangan gelombang 4000-400 cm⁻¹. Sebanyak ± 2 mg ekstrak florotanin digunakan untuk menentukan gugus fungsi pada ekstrak florotanin *Sargassum polycystum* tanpa pelet KBr karena sampel berbentuk pasta.

3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan mulai dari pembuatan larutan DPPH hingga sampel dilakukan berdasarkan metode metode Fadhli *et al.* (2019) dan Erika Maulydy *et al.* (2023) dengan modifikasi.

3.4.6.1 Pembuatan Larutan DPPH 30 ppm

Pembuatan larutan DPPH dilakukan berdasarkan metode dengan modifikasi. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ditimbang sebanyak 2,5 mg kemudian dilarutkan menggunakan metanol hingga tanda batas di dalam labu ukur 25 mL untuk pembuatan larutan induk DPPH 100 ppm terlebih dahulu. Larutan DPPH tersebut diambil sebanyak 7,5 mL ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan pelarut metanol hingga tanda batas dan dihomogenkan untuk membuat larutan DPPH 30 ppm.

3.4.6.2 Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Florotanin dan Larutan Asam Askorbat

Ekstrak florotanin ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 50 mL dengan metanol hingga tanda batas dan dihomogenkan untuk membuat larutan induk sampel 200 ppm. Larutan induk 200 ppm tersebut diencerkan masing-masing untuk mendapatkan konsentrasi 12,5;50;62,5;125;150; dan 172,5 ppm dalam 5 mL.

Pembuatan larutan asam askorbat juga dilakukan dengan menimbang asam askorbat 0,625 mg kemudian dilarutkan menggunakan pelarut metanol dalam labu ukur 25 ml hingga tanda batas dan dihomogenkan untttuk membuat larutan induk 25 ppm. Larutan induk tersebut diencerkan masing-masing untuk

pembuatan konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, 9 ppm, dan 11 ppm dalam 5 mL.

3.4.6.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Florotanin

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan metode Fadhli *et al.* (2019) dan Erika Maulydya *et al.* (2023) dengan modifikasi. Larutan sampel ekstrak florotanin dengan konsentrasi yang telah dibuat masing-masing ditambahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL. Setelah itu dilakukan penambahan larutan DPPH 30 ppm sebanyak 2,5 mL. Hal yang sama dilakukan untuk larutan asam askorbat dengan konsentrasi yang telah dibuat. Setelah itu campuran larutan diinkubasi di tempat yang tertutup dari cahaya selama 30 menit.

Pengukuran dapat dilakukan pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penghambatan serapan radikal bebas dari DPPH dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (1):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \quad (1)$$

Hasil persen inhibisi aktivitas antioksidan tersebut kemudian digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linier untuk perhitungan nilai IC₅₀. Sumbu X merupakan konsentrasi sampel yang digunakan dan sumbu Y merupakan persen (%) inhibisi dari ekstrak florotanin.

3.4.7 Penghambatan Enzim α -Amilase secara *In Vitro*

Ekstrak florotanin alga mempunyai kemampuan dalam penghambatan aktivitas enzim α -amilase dalam pemecahan ikatan glikosidik dalam molekul pati menjadi gula sederhana seperti glukosa berdasarkan pada metode penelitian sebelumnya oleh Husni *et al.* (2018) dan Ismail *et al.* (2023) dengan sedikit modifikasi. Tahap yang pertama dilakukan yaitu mempersiapkan larutan buffer natrium fosfat 0,02 M (pH 6,9 dengan 0,006 M NaCl). Tahap selanjutnya, disiapkan larutan α -amilase yang dibuat dari saliva non-penderita diabetes dan saliva penderita diabetes. Larutan α -amilase tersebut diencerkan dengan buffer natrium fosfat sebanyak 22 kali pengenceran. Ekstrak florotanin disiapkan dengan

melarutkannya dalam buffer natrium fosfat dengan konsentrasi yang berbeda (100, 200, dan 300 ppm).

Reaksi inhibisi aktivitas enzim α -amilase saliva dilakukan dengan memasukkan 150 μ L larutan α -amilase yang telah dibuat dan 300 μ L larutan ekstrak florotanin ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, campuran dihomogenisasi menggunakan *vortex mixer* lalu diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah itu, dilakukan penambahan 150 μ L larutan pati 1% dan inkubasi ulang dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan melakukan penambahan pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) sebanyak 600 μ L. Setelah penambahan DNS, dilakukan inkubasi di dalam air mendidih selama 5 menit yang dilanjutkan dengan pendinginan pada suhu kamar. Apabila campuran telah mencapai suhu kamar kemudian ditambahkan 10 ml aquades untuk dilakukan pengenceran. Setelah itu campuran diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Pembuatan kontrol positif (akarbosa) dan blanko dibuat tanpa adanya penambahan sampel ekstrak florotanin dengan cara yang sama. Tahap terakhir yaitu dilakukan perhitungan mengenai tingkat persentase inhibisi aktivitas α -amilase yang dapat dihitung menggunakan persamaan (2). Aktivitas penghambatan α -amilase ditentukan dengan menghitung perubahan asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi nitro-aminosalisilat menggunakan spektrofotometri. Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung persentase (%) penghambatan dari enzim.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol negatif}} \times 100\% \quad (2)$$