

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Agustus 2024 di Laboratorium Riset Program Studi Kimia, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya neraca analitik, blender, ultrasonikator, set alat filtrasi vakum, *multi shaker*, sentrifugator (Kokusan H-103N), oven (Memmert), *hot plate*, *magnetic stirrer*, termometer, pH meter, *water bath*, pipet volumetri, mikro pipet, buret, vortex, *microplate*, *microplate reader* (SpectraMax ABS Plus 14), spektroskopi FTIR (Shimadzu 8400), dan spektrofotometer UV-Vis (UV mini-1240, Shimadzu).

3.2.2 Bahan

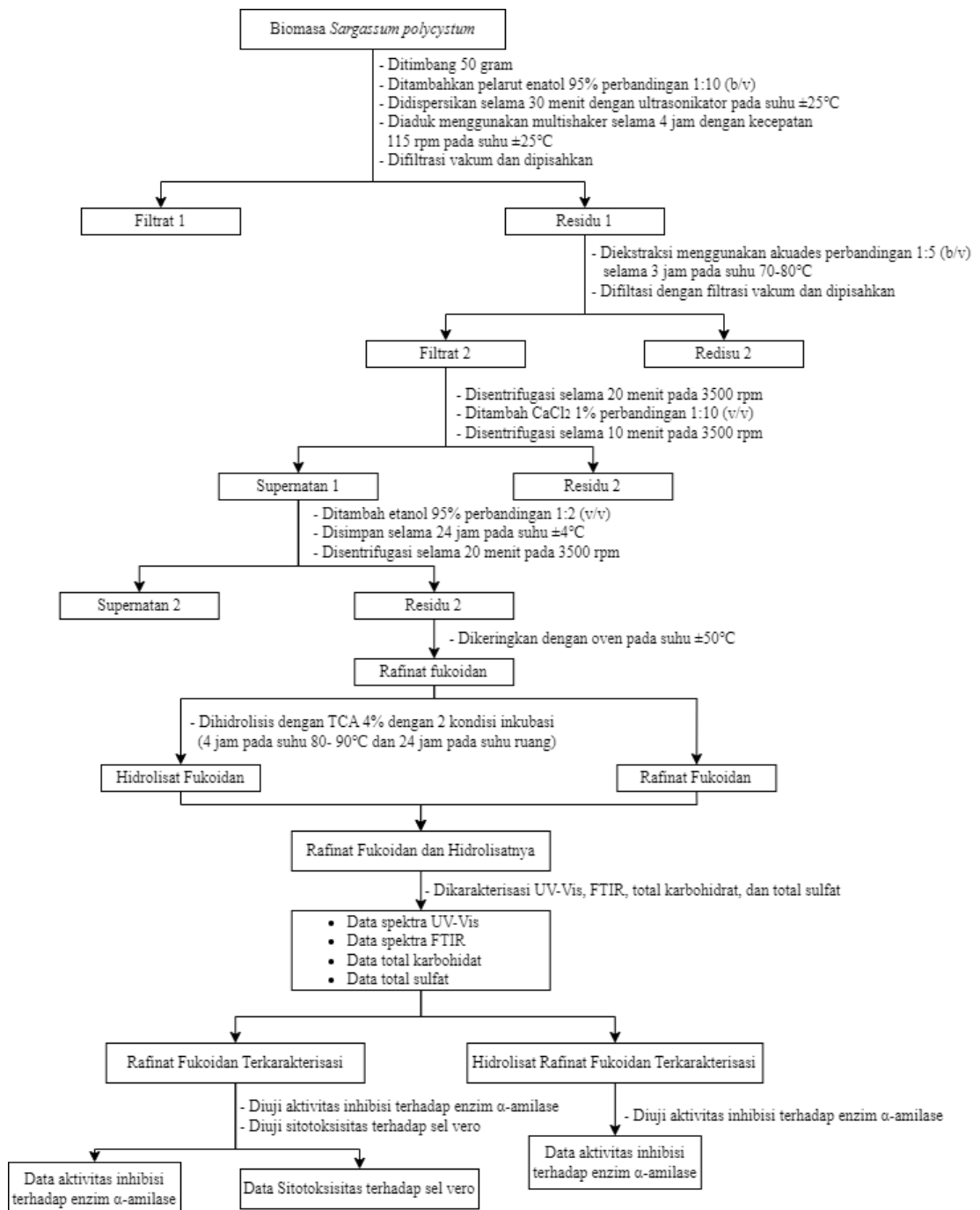
Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya biomassa *Sargassum polycystum*; akuades; etanol 95% (teknis); asam trikloroasetat (TCA) 4% (pro analisis, Merck); NaOH 1N, CaCl₂ (pro analisis, Merck); KBr; H₂SO₄ pekat (pro analisis, Merck); fenol (pro analisis, Merck); D-glukosa (pro analisis, Merck); gelatin ikan (pro analisis, Sigma-Aldrich); BaCl₂ (pro analisis, Merck); K₂SO₄ (pro analisis, Merck); larutan α -amilase dari saliva nondiabetes dan saliva penderita diabetes melitus tipe 2; buffer fosfat (pH 6,9); larutan pati 1% (pro analisis, Merck); asam 3,5-3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS); akarbosa; maltosa (pro analisis, Merck).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Diagram Penelitian

Secara keseluruhan, penelitian karakterisasi dan uji aktivitas rafinat fukoidan dari *Sargassum polycystum* sebagai inhibitor enzim α -amilase dapat

dilakukan melalui tahapan preparasi sampel, karakterisasi, uji aktivitas, dan uji Sitotoksitas. Diagram alir secara lengkap ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Diagram Penelitian Secara Keseluruhan

3.3.1 Ekstraksi Fukoidan dari *Sargassum polycystum*

Ekstraksi fukoidan dari *Sargassum polycystum* dilakukan berdasarkan metode Palanisamy et al. (2017) dan Şahin & Şamli (2013) dengan modifikasi. Biomassa *Sargassum polycystum* dicuci terlebih dahulu dengan air bersih mengalir untuk menghilangkan kotoran seperti pasir dan garam. Setelah bersih, alga ditingkan di tempat terbuka selama ± 15 jam pada suhu ruang. Alga kering kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk untuk mempermudah dan mempercepat proses ekstraksi. Alga kemudian dicampur dengan pelarut etanol 95% dengan perbandingan 1:10 (b/v).

Campuran alga dan etanol 95% didispersi menggunakan ultrasonikator selama 30 menit pada suhu 25 °C. Setelah proses ultrasonikasi, campuran diaduk dengan *multi shaker* selama 4 jam pada 115 rpm untuk memastikan homogenisasi dan kontak yang optimal antara pelarut dan biomassa. Selanjutnya, campuran difiltrasi vakum untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu kemudian dikeringkan pada suhu ruang selama 1x24 jam untuk menguapkan sisa pelarut. Residu kering kemudian diekstraksi kembali dengan akuades dengan perbandingan 1:5 (b/v) menggunakan *waterbath* selama 3 jam pada suhu 60-70 °C. Filtrat hasil ekstraksi kemudian disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi kemudian ditambahkan larutan CaCl_2 1% dengan perbandingan 1:10 (v/v), lalu diaduk dengan *stirrer* selama 10 menit pada suhu ruang. Campuran kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit pada 3.500 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian ditambah etanol 95% dengan perbandingan 1:2 (v/v), lalu disimpan selama 24 jam pada suhu ± 4 °C. Setelah itu, campuran disentrifugasi selama 20 menit pada 3.500 rpm hingga diperoleh pelet atau padatan berwarna coklat. Padatan tersebut kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu ± 50 °C. Setelah kering, padatan dihaluskan hingga menjadi serbuk yang kemudian disebut sebagai rafinat fukoidan. Persen rendemen rafinat fukoidan dari hasil ekstraksi dihitung melalui persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \left(\frac{\text{massa kering rafinat fukoidan yang diperoleh}}{\text{massa kering } Sargassum \text{ polycystum}} \right) \times 100 \quad (1)$$

3.3.2 Karakterisasi Rafinat Fukoidan dari *Sargassum polycystum*

3.3.2.1 Analisis UV-Vis

Rafinat fukoidan yang telah diperoleh dikarakterisasi menggunakan UV-Vis dilakukan berdasarkan metode Manikandan et al. (2020) dengan modifikasi. Larutan rafinat fukoidan 100 ppm dibuat dengan cara melarutkan 1 mg rafinat fukoidan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL. Larutan rafinat fukoidan kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm dengan alat spektrofotometer UV-Vis (UV mini-1240, Shimadzu).

3.3.2.2 Analisis FTIR

Karakterisasi rafinat fukoidan dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dilakukan berdasarkan metode Manikandan et al. (2020) dengan modifikasi. Sebanyak 2 mg rafinat fukoidan dalam mortar ditambahkan 200 mg kristal KBr. Campuran tersebut kemudian diukur menggunakan alat spektroskopi FTIR (Shimadzu 8400) pada rentan bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} .

3.3.2.3 Kandungan Total Karbohidrat

Kandungan total karbohidrat rafinat fukoidan dan hidrolisatnya ditentukan berdasarkan metode uji fenol-asam sulfat dengan modifikasi (Dubois et al., 1956; Roy et al., 2024). Rafinat fukoidan dibuat pada konsentrasi 180 ppm dengan melarutkan 1,8 mg rafinat fukoidan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL. Adapun sampel hidrolisat rafinat fukoidan yang dihidrolisis dengan TCA 4% disiapkan dalam dua kondisi inkubasi yang berbeda, yaitu inkubasi suhu 80-90 °C selama 4 jam dan inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

Pengujian dilakukan dengan mereaksikan masing-masing 1 mL larutan rafinat fukoidan dan hidrolisatnya kemudian direaksikan dengan 5 mL H_2SO_4 pekat dan 1 mL fenol 5%. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, campuran dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu ruang.

Campuran kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Standar yang digunakan pada metode ini adalah larutan D-

glukosa yang dibuat pada konsentrasi 0, 10, 20, 30, dan 60 ppm. Kandungan total karbohidrat rafinat fukoidan dan hidrolisatnya dihitung menggunakan persamaan (2).

$$\% \text{ Total Karbohidrat} = \left(\frac{\text{Konsentrasi analit}}{\text{Konsentrasi sampel}} \text{ ppm} \right) \times 100 \quad (2)$$

3.3.2.4 Kandungan Total Sulfat

Kandungan total sulfat rafinat fukoidan dan hidrolisatnya ditentukan berdasarkan metode BaCl₂-gelatin dengan modifikasi (Dodgson & Price, 1962; W.-J. Kim et al., 2007). Larutan BaCl₂-gelatin dipreparasi dengan melarutkan 2 g gelatin dalam 400 mL akuades 60-70 °C. Larutan gelatin disimpan selama 24 jam pada suhu ±4 °C. Larutan gelatin ditambahkan 2 g BaCl₂ dan diaduk dengan *stirrer* hingga homogen. Campuran kemudian disimpan selama 1 minggu pada suhu ±4 °C. Sampel rafinat fukoidan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm dengan melarutkannya dalam akuades. Pada sampel hidrolisat rafinat fukoidan dengan inkubasi 4 jam pada suhu 80-90 °C dan 24 jam pada suhu ruang, pelarut akuades diganti TCA 4%. Masing-masing 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan BaCl₂-gelatin dan 1,4 mL TCA 4%.

Campuran kemudian diaduk secara mekanik selama 60 detik dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, masing-masing sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 360 nm. Larutan K₂SO₄ digunakan sebagai standar pada uji kandungan total sulfat yang dibuat pada konsentrasi 0, 400, 800, 1200, 2000, dan 2400 ppm. Kandungan total sulfat rafinat fukoidan dan hidrolisatnya ditentukan melalui persamaan (3).

$$\% \text{ Total Sulfat} = \left(\frac{\left(\frac{Mr \text{ SO}_4^{2-}}{Mr \text{ BaSO}_4} \right) \times \text{kadar BaSO}_4 \text{ (ppm)}}{\text{Konsentrasi sampel (ppm)}} \right) \times 100 \quad (3)$$

3.3.3 Aktivitas Inhibisi Rafinat Fukoidan Terhadap Enzim α -Amilase

3.3.3.1 Aktivitas Enzim α -Amilase Saliva Nondiabetes dan Saliva Penderita Diabetes

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -Amilase dari saliva nondiabetes (Saliva ND) dan saliva penderita diabetes T2DM (Saliva PD) dilakukan berdasarkan

metode Pambudi et al. (2021) dengan modifikasi. Saliva ND dan saliva PD diencerkan dengan buffer fosfat 0,02 M dengan pH 6,9 sebanyak 22 kali pengenceran. Masing-masing saliva ND dan saliva PD sebanyak 150 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup. Setelah itu, saliva ditambahkan 150 μ L larutan pati 1%, lalu diinkubasi dalam *watebath* selama 10 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Setelah diinkubasi, campuran saliva dan pati ditambah 600 μ L pereaksi 3,5-*Dinitrosalicylic acid* (DNS). Campuran kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah diinkubasi, campuran didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan 10 mL akuades.

Campuran yang sudah didinginkan kemudian diukur serapannya pada Panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Larutan maltosa digunakan sebagai standar yang dibuat pada konsentrasi 0, 200, 600, 1000, 1400, 1800, 2200, 2600, 3000 ppm. Aktivitas enzim α -amilase dari saliva ND dan saliva PD ditentukan melalui persamaan (4).

$$\text{Aktivitas Enzim} = \left(\frac{\text{Enzim (unit)}}{0,15 \times \text{Faktor pengenceran}} \right) \times 100 \quad (4)$$

3.3.3.2 Aktivitas Inhibisi Rafinat Fukoidan Terhadap Enzim α -Amilase Saliva Nondiabetes dan Saliva Penderita Diabetes

Penentuan aktivitas inhibisi rafinat fukoidan dan hidrolisatnya ditentukan berdasarkan metode Pambudi et al. (2021) dengan modifikasi. Larutan sampel disiapkan dengan melarutkan rafinat fukoidan dalam buffer fosfat 0,02 M dengan pH 6,9 dan dibuat konsentrasi 100, 200, dan 300 ppm. Sampel hidrolisat disiapkan dengan melarutkan rafinat fukoidan dalam TCA 4% kemudian diinkubasi dengan dua kondisi, yaitu inkubasi selama 4 jam pada suhu ± 4 $^{\circ}$ C dan inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Sebelum direaksikan, sampel hidrolisat dinetralkan terlebih dahulu dengan NaOH 1 N dan diukur pH nya menggunakan pH meter. Pengujian dilakukan pada saliva ND dan saliva PD. Sebanyak 150 μ L saliva ND dan saliva PD dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi yang berisi saliva ditambahkan 300 μ L masing-masing sampel rafinat fukoidan yang sudah dipreparasi sebelumnya. Campuran saliva dan sampel kemudian diinkubasi dalam *watebath* selama 10 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Setelah diinkubasi, campuran

ditambahkan 150 μL larutan pati 1%, lalu diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$.

Campuran hasil inkubasi kemudian ditambah 600 μL pereaksi 3,5-*Dinitrosalicylic acid* (DNS), lalu diinkubasi dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah diinkubasi, campuran didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin, campuran ditambahkan 10 mL akuades kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 540 nm dengan *microplate reader* (SpectraMax ABS Plus 14). Larutan akarbosa digunakan sebagai kontrol positif yang dibuat pada konsentrasi 100, 200, 300 ppm. Aktivitas inhibisi sampel terhadap enzim α -amilase dari saliva ND dan saliva PD ditentukan melalui persamaan (5).

$$\% \text{ Aktivitas Inhibisi} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol negatif}} \right) \times 100 \quad (5)$$

3.3.4 Sitotoksisitas Rafinat Fukoidan terhadap Sel Vero

Pengujian Sitotoksisitas rafinat fukoidan dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga. Sitotoksisitas rafinat fukoidan ditentukan berdasarkan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTT) *assay* (Angelina et al., 2024). Sampel diujikan terhadap sel vero dengan konsentrasi sampel 0,1; 1; 10; 100; 200; 400; 500; dan 100 ppm, kemudian intensitas warna ungu yang dihasilkan diukur serapannya pada Panjang gelombang 750 nm dan 560 nm menggunakan GloMax-Multi *Microplate Multimode Reader* (Promega). Hasil pengujian kemudian dibandingkan dengan kontrol yang merupakan sel dan medium tanpa penambahan sampel. Persentase viabilitas sel dihitung berdasarkan persamaan (6) dan persentase sitotoksisitas sampel dihitung berdasarkan persamaan (7).

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \left(\frac{\text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \quad (6)$$

$$\% \text{ Sitotoksisitas} = 100 - \% \text{ viabilitas sel} \quad (7)$$