BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB) di Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong. Penelitian ini berlangsung dari bulan Januari 2021 sampai dengan Juni 2021

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan untuk peralatan gelas dalam penelitian ini meliputi, neraca analitik, grinder, *hot plate stirrer*, *centrifuge*, oven, pipet tetes, buret, pipet volumetri, mikropipet, kolom kromatografi, waterbath, *96-well plate*, Vortex, dan kolom Hi-Plex. Instrumen analisis yang digunakan antara lain, *Ultra Violet-Visible spectrophotometer, Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrophotometer, ELISA Microplate Reader, High Performance* dan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

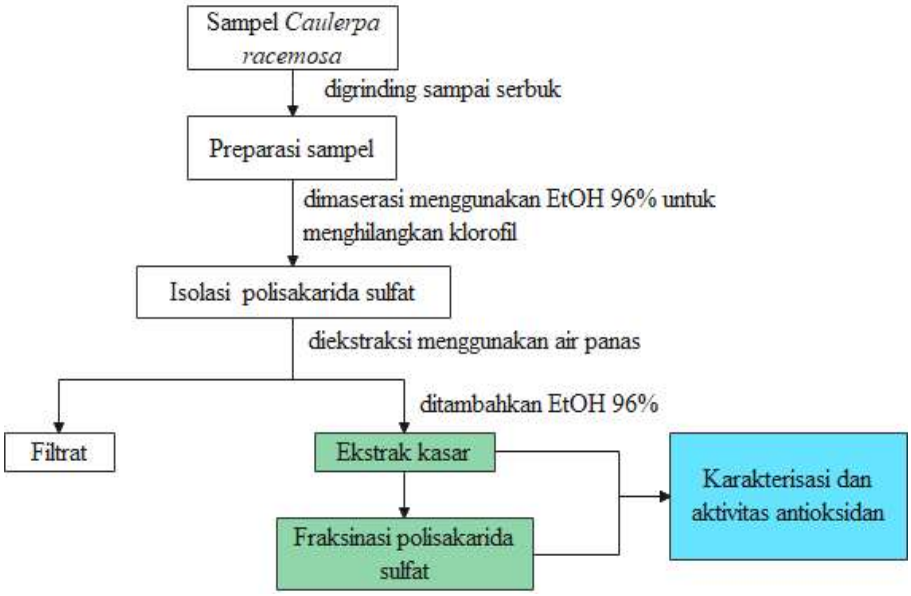
3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi, rumput laut hijau *(Caulerpa racemosa)* yang berasal dari Takalar, etanol 96%, aquades, asam sulfat (H_2SO_4), asam klorida (HCl), kalium sulfat (K_2SO_4), DEAE-sephadex a-50, natrium klorida (NaCl), gelatin, barium klorida ($BaCl_2$), asam trikloroasetat (TCA), fenol, standar monosakarida (glukosa, xylosa, galaktosa, maltosa, manosa, arabinosa, fruktosa), ABTS, dan $K_2S_2O_8$.

Tasya Rahmania, 2021
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK POLISAKARIDA SULFAT DARI RUMPUT LAUT HIJAU (Caulerpa racemosa)
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3 Diagram Penelitian

Prosedur penelitian dilakukan beberapa tahap yaitu, preparasi sampel *Caulerpa racemosa*, isolasi dan fraksinasi polisakarida sulfat. Hasil dari proses isolasi berupa ekstrak kasar selanjutnya difraksinasi untuk memperoleh fraksi-fraksi. Ekstrak kasar dan fraksi yang diperoleh kemudian dikarakterisasi untuk mengindentidifikasi struktur (gugus fungsi, monomer, total gula, dan kandungan sulfat) serta diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode ABTS. Diagram alir penelitian secara garis besar ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel Rumput Laut Hijau *Caulerpa racemosa*

Rumput laut hijau, *Caulerpa racemosa* yang berasal dari Takalar, dicuci dengan air lalu dikeringkan menggunakan jaring hitam selamat 24 jam dan dalam oven (±50^{o}C) selama 3 malam. Rumput laut hijau kering kemudian dihancurkan sehingga menjadi serbuk menggunakan *grinder.*

3.4.2 Ekstraksi Polisakarida

Sampel tepung rumput laut hijau, *Caulerpa racemosa* sebanyak 100 gram dimaserasi menggunakan 1000 mL etanol (1:10) selama 24 jam untuk

menghilangkan pigment lipofilik (klorofil dan karoten) dan protein dengan berat molekul yang rendah. Setelah itu, larutan maserasi disaring menggunakan planktonet dan dipisahkan antara filtrat dan residu nya, kemudian residu dikeringkan selama semalaman pada suhu ruang. Residu hasil maserasi ditambahkan aquades untuk selanjutnya diekstraksi menggunakan *waterbath* selama 3 jam dengan suhu 75–80^{o}C sambil sesekali diaduk. Larutan kemudian disaring kembali menggunakan planktonet dan disentrifugasi. Filtrat yang telah ditampung kemudian ditambahkan etanol 96% (1:2), dan didiamkan selama semalaman dalam suhu ±4^{o}C. Kemudian campuran disentrifugasi selama 50 menit dengan kecepatan 6.000 rpm untuk memisahkan endapan berwarna putih. Kemudian endapan yang didapatkan dan dikeringkan dalam suhu ±50^{o}C yang kemudian dihaluskan sehingga didapatkan ekstrak kasar polisakarida dari rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* (Imjongjairak et al., 2016).

3.4.3 Fraksinasi Ekstrak Polisakarida

Hasil ekstrak kasar polisakarida sebanyak satu gram dilarutkan pada aquades 30 mL dan dipanaskan pada suhu 75-80^{o}C sampai seluruh padatan ekstrak kasar larut sempurna. Pemurnian ini dilakukan dengan menggunakan kromatografi penukar ion resin DEAE-Sephadex a-50. Larutan ekstrak kasar tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang sebelumnya telah diberi resin. Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam kolom selanjutnya dielusi menggunakan larutan NaCl (natrium klorida) dengan variasi peningkatan konsentrasi (0,5 – 3.5 M). Hasil yang sudah dipisahkan melalui kolom ditampung setiap 15 mL di dalam botol vial dan didapatkan 25 fraksi utama.

Selanjutnya dilakukan penggabungan fraksi dikelompokkan berdasarkan hasil nilai absorbansi pada pengujian total gula menggunakan metode fenol-H_2SO_4 dan FTIR.. Untuk penggabungan fraksi menggunakan pengujian total fenol-H_2SO_4 diperoleh 7 fraksi (F1-F7) dari 25 fraksi. Setiap fraksi yang diperoleh ditambahkan etanol (1:2) dan didiamkan selama semalaman dalam suhu ±4^{o}C. Kemudian fraksi disentrifugasi selama 40

menit dengan kecepatan 6.000 rpm selama 50 menit untuk memisahkan endapan. Kemudian endapan yang didapatkan dikeringkan dalam suhu ±50^{o}C dan dihaluskan sehingga diperoleh fraksi polisakarida dari rumput laut hijau *Caulerpa racemosa.* Setelah diperoleh endapan pada setiap fraksi dilakukan pegabungan kembali menggunakan FTIR dan diperoleh 3 fraksi utama dari 7 fraksi yaitu fc, fb, dan fc (Zhao et al., 2014).

3.4.4 Karakterisasi Ekstrak Polisakarida

3.4.4.1 Penentuan Gugus fungsi

Struktur dari gugus fungsi pada hasil ekstrak rumput laut hijau diketahui dengan menggunakan *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy Alpha II-Bruker*. Sampel langsung dimasukkan ke dalam ATR dan sinyal yang dikumpulkan secara otomatis menggunakan 128 kali pembacaan dengan rentang 4000-500 cm-^{1}.

3.4.4.1 Penentuan Kandungan Sulfat

a. Preparasi $BaCl_2$ – Gelatin

Gelatin sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 100 mL air panas dengan suhu berkisar antara 60-70^{o}C dan kemudian disimpan selama 24 jam pada suhu ±4^{o}C. Selanjutnya, $BaCl_2$ sebanyak dua gram dilarutkan dalam cairan semigelatin dan hasilnya larutan keruh dibiarkan selama 2-3 jam sebelum digunakan. Larutan ini dapat disimpan pada suhu 4^{o}C selama 1 minggu sebelum digunakan (Rizki et al., 2020)

b. Preparasi Sampel

Sampel ektrak kasar dan fraksi polisakarida dilarutkan sebanyak 6 mg dalam 2 mL HCl 3,5 N (± konsentrasi sebesar 3000 ppm) dan dihidrolisis selama 17-18 jam pada suhu 105-110^{o}C (waterbath di dalam oven). Kemudian, sebanyak 10 µL masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk kemudian ditambahkan dengan TCA 3% (150 µL) dan $BaCl_2$–gelatin 0,5% (50 µL) lalu diinkubasi selama 20 menit. Standar yang digunakan yaitu K_2SO_4 dibuat pada konsentrasi bervariasi. Sampel, standar, dan blanko diukur dengan *Elisa Microplate*

Reader pada λ = 360 nm (Rizki et al., 2020). Ditentukan nilai kandungan sulfat dari ekstrak kasar dan fraksi yang diperoleh dengan rumus :

$$\boldsymbol{Kadar\ SO_4(\%) = \left(\frac{\left(\frac{Mr\ SO_4^{2-}}{Mr\ BaSO_4} \right) x\ kadar\ BaSO_4\ (ppm)}{konsentrasi\ analit\ (ppm)} \right) x\ 100\%}$$

3.4.4.2 Penentuan Total Gula

Ekstrak kasar dan fraksi polisakarida rumput laut hijau dilarutkan di dalam aquades dan dibuat dalam konsentrasi 100 ppm. Kandungan total gula diukur dengan menggunakan metode uji fenol-asam sulfat, dengan penambahan 20 µL fenol 5% dan 100 µL H_2SO_4 pekat ke dalam sampel. Setelah diaduk menggunakan vortex, sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu ±4^oC (direndam dalam air es). Setelah inkubasi, sampel kemudian diaduk kembali dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm menggunakan *Elisa Microplate Reader.* Standar yang digunakan yaitu galaktosa dengan variasi konsentrasi dimulai dari 5, 10 15, 20, dan 25 ppm (Rizki et al., 2020). Ditentukan nilai total gula dari ekstrak kasar dan fraksi yang diperoleh dengan rumus :

$$\boldsymbol{\%\ Total\ gula\ = \left(\frac{konsentrasi\ analit\ (ppm)}{konsentrasi\ sampel\ (ppm)} \right) x\ 100\%}$$

3.4.4.3 Penentuan Monomer

Sampel ektrak kasar dan fraksi polisakarida dilarutkan sebanyak 6 mg dalam 2 mL HCl 3,5 N (± konsentrasi sebesar 3000 ppm) dan dihidrolisis selama 17-18 jam pada suhu 105-110^oC (waterbath di dalam oven). Setelah itu hidrolisat dinetralisasi dengan Na_2CO_3 40% (jenuh) untuk menetralkan asam HCl nya. Setelah itu hidrolisat disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit, untuk memisahkan supernatan nya. Supernatan yang telah terpisah selanjutnya dianalisis untuk menentukan jenis monosakaridanya dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography) WATERS e2695* dengan *kolom Hi-Plex* untuk karbohidrat. Sebelum sampel diinjek terlebih dahulu, standard digunakan

untuk menentukan waktu retensi yang akan menjadi acuan penentuan monosakarida. Standard yang digunakan adalah glukosa, xylosa, maltosa, manosa, arabinosa, fruktosa, dan galaktosa dengan variasi konsentrasi 25; 50; 100; 250; dan 500ppm (Rizki et al., 2020)

3.4.4.4 Uji Aktivias Antioksidan Metode ABTS

Sampel ekstrak kasar dan murni polisakarida dilarutkan dengan aquades dan dibuat variasi konsentrasi 500; 1000; 1500; 2000; dan 2500 ppm. Untuk pengujian antoksidan dengan metode ABTS digunakan standar trolox dengan variasi konsentrasi dimulai dari 0.5; 2; 3; 4; dan 5 ppm.

Untuk pembuatan larutan ABTS- $K_2S_2O_8$ dilakukan penimingan ABTS (Mr = 548,67 g/mol) terlebih dahulu sebanyak 19,20 mg dan dilarutkan dengan 5 mL aquadest. Untuk pembuatan larutan $K_2S_2O_8$ (Mr =270,33 g/mol) ditimbang sebanyak 1,8923 gram kemudian dilarutkan dengan 50 mL aquades. Pipet 5 mL larutan ABTS dan dicampur dengan 88 µL larutan $K_2S_2O_8$ 140 mM dan simpan ke dalam wadah gelap untuk diinkubasi selama16-17 jam. Kemudian diukur absorbansinya hingga 0,7 ± 0,02 pada panjang gelombang 734 nm.

Sampel yang telah dibuat variasi konsentrasi dipipet 100 µL sampel ke dalam *96-well microplate* dan ditambahkan larutan ABTS-$K_2S_2O_8$ 100 µL ke dalam *96- well microplate* diinkubasi selama 6 menit ditempat gelap. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 734 nm menggunakan *Elisa Microplate Reader.* (Rahmawati & Suntornsuk, 2016). Ditentukan persen inhibisi yang diperoleh dari sampel dengan rumus :

$$\%\ \boldsymbol{inhibisi} = \frac{(\boldsymbol{Ao - A1})}{\boldsymbol{Ao}} \boldsymbol{x100}\%$$

Keterangan:

% inhibisi= persentase penghambatan antioksidan

Ao= absorbansi blanko

A1= absorbansi larutan uji

Dan untuk menghitung IC_{50} yang diperoleh dari sampel menggunakan perhitungan % inhibisi masing-masing sampel dan di plot grafik untuk mendapatkan regresi linear. Diperoleh regresi linear $y = ax + b$, dimana nilai y=50 dan diperoleh nilai x yang merupakan IC_{50}.