

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif. Metode deskriptif dengan pendekatan kuantitatif digunakan untuk dapat menjelaskan suatu objek yang diteliti dengan dukungan studi kepustakaan sehingga lebih memperkuat analisa peneliti dalam membuat suatu kesimpulan, dimana hasil penelitian diperoleh dari hasil perhitungan indikator variabel penelitian yang kemudian dipaparkan secara tertulis. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi untuk ekstraksi etanol dan *freeze-thaw* untuk ekstraksi fikosianin, adapun pengujian antidiabetes yang dilakukan adalah inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase secara *in vitro* dan skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder pada ekstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi ekstrak etanol, pigmen fikosianin, dan non protein *Spirulina platensis* terhadap aktivitas inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2023, bertempat di Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan, Mikrobiologi Hasper, Terpadu, dan Biofarmaka Institut Pertanian Bogor serta Laboratorium Sumberdaya Kelautan dan Perikanan Universitas Pendidikan Indonesia Kampus Daerah Serang.

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

##### **3.3.1 Populasi**

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas objek/subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2015). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Spirulina platensis* dengan pertimbangan penelitian terdahulu yang membuktikan *S. platensis* berpotensi baik

dalam bidang farmasi. *S. platensis* dalam penelitian ini didapatkan melalui metode kultur.

### 3.3.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2015). Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol, ekstrak fikosianin dan ekstrak non protein *Spirulina platensis*.

## 3.4 Instrumen Penelitian

### 3.4.1 Alat

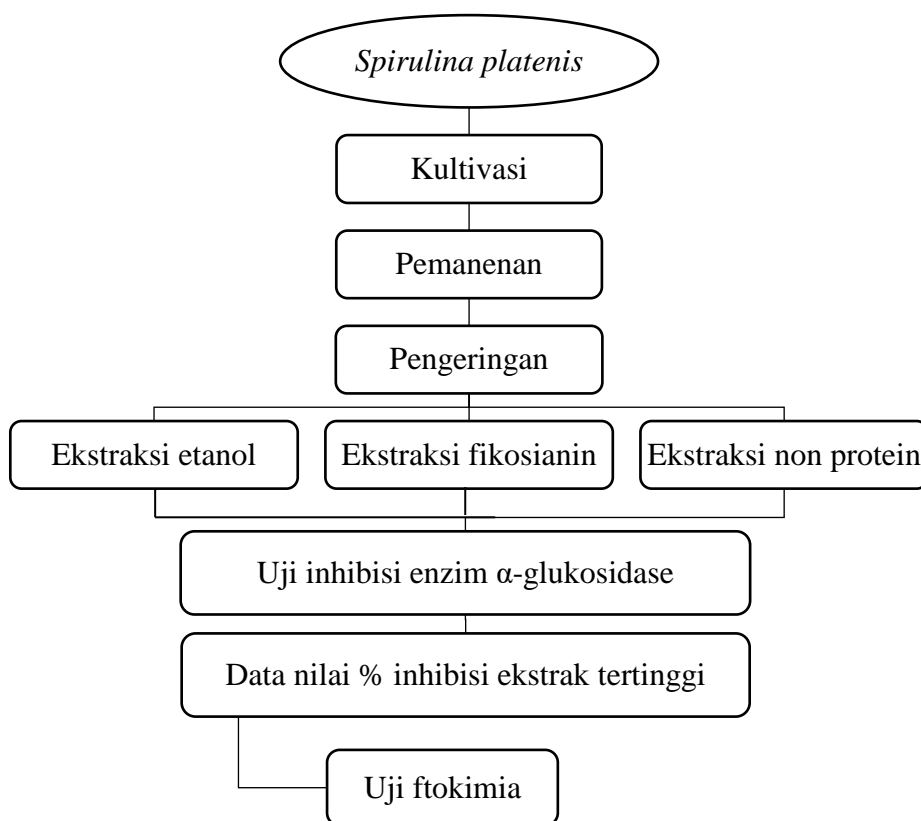
Alat yang digunakan untuk pertumbuhan, pemanenan dan pengeringan *Spirulina platensis* meliputi toples kaca, aerator (Recent AA-410), tutup plastik, kuvet (Quartz QS 10.00 mm), gelas ukur (Pyrex), selang, airstone batu aerasi, tisu, pipet ukur (HBG Germany), pipet filler (Dn), lampu (TL Philips LED), terminal (Uticon ST1582), spektrofotometer (vis-723G), corong plastik, loyang, oven (Universal Memmert UN110), timbangan digital (Ohaus PX523/E Pioneer), mortar dan alu serta saringan spirulina. Alat yang digunakan untuk ekstraksi dan uji fitokimia adalah erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan petri (Iwaki), timbangan digital (Ohaus PX523/E Pioneer), pengaduk, orbital *shaker* SK-0330-pro, *rotary evaporator* DLAB RE-100-Pro, *freezer* (Sharp), *centrifuge* (Centurion C1015), pH meter (WalkLAB TI-9000) dan pH meter (Hanna HI98107), spektrofotometer (vis-723G), autoklaf (Yamato SM52), corong kaca (Pyrex), aluminium foil roll (Best Fresh) dan kertas saring (Whatman no. 1). Alat yang digunakan untuk uji inhibisi  $\alpha$ -glukosidase adalah *microplate well*, inkubator, *laminar air flow*, *microplate reader* (Elisa *Microplate Spectrophotometer*) dan mikro pipet (Hettlite fixed volume).

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk kultivasi mikroalga adalah bibit *Spirulina platensis* (teknis) 200 ml, air tawar 16.000 ml, air laut 16.000 ml, walne (teknis) 42 ml, alkohol (teknis), dan akuades (teknis). Bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan uji fitokimia *S. platensis* adalah

serbuk *S. platensis* 21 gr, etanol 70% 100 ml, buffer fosfat 125 ml, asam asetat 1 tetes, akuades 150 ml, NaOH 1 N, HCl, reagen mayer, NaOH 2 N, dan FeCl<sub>3</sub> 5%. Bahan uji inhibisi  $\alpha$ -glukosidase adalah larutan buffer fosfat 0,1M (pH 7,0), 0,5 mM 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG)[sigma aldrich], larutan enzim  $\alpha$ -glukosidase[sigma aldrich], natrium karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0,2 M, dimetil sulfoksida (DMSO)[merck], asam klorida (HCl) 2N, serum bovine albumin.

### 3.5 Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

#### 3.5.1 Kultivasi *Spirulina platensis*

Kultivasi *Spirulina platensis* mengacu pada Ilhamdi (2020). Proses kultivasi dimulai dengan persiapan alat yang digunakan, yaitu toples kaca yang sudah disterilkan menggunakan alkohol dan dikeringkan dengan tisu, selang, gelas ukur, batu aerator, saringan, corong plastik, dan tutup plastik. Alat-alat tersebut disterilkan

menggunakan sinar UV selama 15 menit. Kultur *S. platensis* dilakukan sebanyak 2 L dengan perbandingan air laut:air tawar:bibit *S. platensis* adalah 4:4:2. Air laut sebanyak 800 ml dan air tawar 800 ml disaring ke dalam toples kaca yang telah steril. Toples kaca yang telah diisi air laut dan air tawar disterilkan kembali menggunakan sinar UV selama 45 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, campuran air laut dan air tawar ditambahkan bibit *S. platensis* sebanyak 400 ml. Media walne sebanyak 2 ml ditambahkan setelah bibit *S. platensis* dimasukkan. Setelah 8 hari kultivasi, selanjutnya dilakukan *scale up* skala 10 L dengan menggunakan perbandingan 4 L air laut : 4 L air tawar : 2 L bibit spirulina kedalam toples kaca skala 15 L yang telah disterilkan, lalu ditambahkan walne sebanyak 10 ml. Selanjutnya aerasi setiap hari, intensitas cahaya yang digunakan berkisar 3000-6000 lux dan tutup toples kaca menggunakan tutup plastik agar tidak terkontaminasi. Nilai *Optical Density* (OD) *S. platensis* dihitung setiap hari. Untuk pengukuran nilai OD dilakukan menggunakan alat spektrofotometer vis-723G pada  $\lambda$  620 nm dengan mode absorbansi.

### 3.5.2 Pemanenan *Spirulina platensis*

Pemanenan *Spirulina platensis* mengacu pada Widawati (2022). Panen *S. platensis* dilakukan saat kultur mencapai umur pertumbuhan 8 hari setelah *scale up*. Kultur yang sudah mencapai umur 8 hari diendapkan terlebih dahulu dengan cara mematikan aerasi. Pemanenan biomassa *S. platensis* dilakukan menggunakan saringan. Biomassa kemudian ditimbang untuk mengetahui jumlah total yang dihasilkan.

### 3.5.3 Pengeringan *Spirulina platensis*

Pengeringan *Spirulina platensis* dimulai dengan memasukkan biomassa segar *S. platensis* ke dalam loyang, kemudian biomassa *S. platensis* disebarakan ke loyang dengan tipis-tipis. Setelah itu loyang dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Setelah proses pengeringan, *S. platensis* ditumbuk hingga halus menggunakan mortar, lalu ditimbang untuk mengetahui total beratnya.

### 3.5.4 Ekstraksi Etanol *Spirulina platensis*

Ekstraksi etanol *Spirulina platensis* mengacu pada Pannindriya *et al.*, (2020). Ekstraksi etanol *S. platensis* dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk spirulina dilarutkan dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan sampel:pelarut 1:10 (m/v). Sebanyak 10 gr serbuk *S. platensis* dilarutkan dalam 100 ml etanol 70%, campuran kemudian diaduk hingga serbuk larut. Maserasi diinkubasi selama 2 x 24 jam menggunakan *shaker incubator* pada suhu ruang 125 rpm. Setelah proses inkubasi selesai, ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dengan ampasnya. Filtrat yang diperoleh diuapkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga terbentuk pasta.

### 3.5.5 Ekstraksi Pigmen Fikosianin *Spirulina platensis*

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode *freeze-thaw*. Mengacu pada Ojit *et al.*, (2015), *freeze-thaw* merupakan metode ekstraksi fikosianin dengan cara mengekstrak bahan dengan cara direndam dalam pelarut lalu kemudian diberikan *shock* suhu dengan dibekukan dan dicairkan sebanyak 3 siklus. Ekstraksi fikosianin dilakukan dengan perbandingan sampel:pelarut sebesar 1:25 (m/v). Sebanyak 5 gr serbuk *Spirulina platensis* dilarutkan dalam 125 ml pelarut buffer fosfat konsentrasi 10 mM pH 7, setelahnya kemudian diaduk hingga homogen. Campuran keduanya kemudian dilakukan proses *freeze-thaw* sebanyak 3 siklus.

Proses *freezing* dilakukan dengan meletakkan ekstrak kedalam *freezer* dengan suhu -20°C selama ±14 jam dan kemudian dilakukan *thawing* pada suhu *chilling* yaitu 10-15°C selama ±10 jam. Supernatan hasil *freeze-thaw* kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 4500 rpm selama 20 menit. Supernatan fikosianin hasil sentrifugasi kemudian diukur konsentrasi fikosianin pada panjang gelombang 620 nm dan 652 nm. Ekstrak fikosianin kemudian dilakukan *scanning* spektrum serapan untuk mengkonfirmasi keberadaan fikosianin pada  $\lambda$  620-660 nm menggunakan spektrofotometer.

### 3.5.6 Ekstraksi Non Protein *Spirulina platensis*

Metode ekstraksi non protein dilakukan menggunakan metode penelitian yang dilakukan oleh Sagara *et al.*, (2014). Serbuk *Spirulina platensis* dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan sampel:pelarut 1:25 (m/v). Sebanyak 5 gr serbuk *S. platensis* dilarutkan dalam 125 ml akuades, kemudian diaduk hingga homogen. Campuran keduanya kemudian diautoklaf dan disimpan hingga dingin. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring untuk memisahkannya dengan ampas. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 20 menit. Supernatan ditambahkan dengan asam asetat hingga pH 4,0 dan disimpan dalam lemari es semalaman. Larutan yang diasamkan disentrifugasi kembali pada 6.000 rpm selama 40 menit, memisahkan endapan yang mengandung protein dan menetralkannya dengan natrium hidroksida. Ekstrak non protein disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

### 3.5.7 Uji Inhibisi Enzim $\alpha$ -glukosidase

Pengujian aktivitas inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase mengacu pada Ariani (2017). Pengujian dilakukan dengan menggunakan substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (pNPG) dan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Larutan enzim dibuat dengan melarutkan 1,0 mg enzim  $\alpha$ -glukosidase dalam larutan buffer fosfat (pH 7) yang sebelumnya enzim diencerkan sampai 0,04 unit/ml dengan buffer fosfat pH 7. Sedangkan untuk membuat substrat p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida (p-NPG) dengan cara melarutkan 60,3 mg p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan dalam 10 ml akua demineralisata sehingga didapat konsentrasi 0,5 mM. Aktivitas inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase diuji terhadap sampel ekstrak etanol, fikosianin, dan non protein *Spirulina platensis*. Prinsip uji ini adalah penentuan aktivitas penghambatan berdasarkan kemampuan sampel menghambat reaksi katalisis hidrolisis p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida dan mencegahnya menjadi p-nitrofenol dan  $\alpha$ -D-glukopiranosida. Sampel atau inhibitor  $\alpha$ -glukosidase (IAG) yang digunakan akan menjadi penghambat dan penghalang substrat untuk

berikatan dengan enzim menjadi enzim kompleks. Sampel akan berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga substrat tidak dapat menyatu dengan enzim yang menyebabkan tertundanya pembentukan  $\alpha$ -D-glukopiranosida. Reaksi enzimatis tersebut ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari bening menjadi kuning. Sampel dengan kemampuan aktivitas inhibisi yang tinggi akan menghasilkan warna larutan yang semakin pudar. Pengujian ini dilakukan pada ekstrak dengan variasi konsentrasi.

Sampel berupa ekstrak etanol, ekstrak fikosianin, dan ekstrak non protein, dilarutkan dalam DMSO dan dibuat variasi konsentrasi, yaitu 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm. Kemudian, sampel ditambahkan 50  $\mu$ L buffer fosfat 0,1M (pH 7,0) dan 25  $\mu$ L 0,5 mM substrat 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosida. Selanjutnya ditambahkan 25  $\mu$ L larutan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit agar berlangsungnya proses enzimatis. Setelah itu, ditambahkan 100  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M untuk menghentikan aktivitas enzim substrat.

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan *microplate reader (Elisa Microplate Spectrophotometer)* pada  $\lambda$  410 nm. Pengujian ini dilakukan dengan 3x replikasi pada setiap sampel dengan perlakuan yang sama.

### 3.5.8 Uji Fitokimia Ekstrak *Spirulina platensis*

Uji skrining fitokimia bertujuan untuk menentukan secara kualitatif ada atau tidaknya golongan senyawa bioaktif. Pengujian fitokimia biasanya meliputi senyawa alkaloid, fenolik, triterpenoid, flavonoid, dan saponin (Mega dan Swastini, 2010). Uji fitokimia ekstrak *Spirulina platensis* merujuk pada metode Mane dan Chakraborty (2019).

#### 1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan 2 ml HCl pekat ke dalam 2 ml ekstrak *Spirulina platensis*, selanjutnya ditambahkan beberapa tetes reagen Mayer. Indikasi keberadaan senyawa alkaloid

ditandai dengan terbentuknya endapan putih.

## 2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan 1 ml NaOH 2 N ke dalam 2 ml ekstrak *Spirulina platensis*. Indikasi keberadaan senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning.

## 3. Uji Kuinon

Uji kuinon dilakukan dengan menambahkan NaOH 1 N ke dalam ekstrak *Spirulina platensis*. Indikasi keberadaan senyawa kuinon ditandai dengan terbentuknya warna kuning.

## 4. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menambahkan 1 ml FeCl<sub>3</sub> 5% ke dalam 1 ml ekstrak *Spirulina platensis*. Indikasi keberadaan senyawa tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman.

## 5. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan menambahkan 2 ml akuades ke dalam 2 ml ekstrak *Spirulina platensis*, selanjutnya campuran dipanaskan dan dilakukan pengocokan dalam gelas ukur selama 15 menit. Indikasi keberadaan senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya 1 cm lapisan buih.

### 3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan cara menghitung persentase inhibisi  $\alpha$ -glukosidase. Data diolah menggunakan program Microsoft Excel 2016. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi dapat dihitung menggunakan persamaan dalam Surbakti (2013) :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol}) - (\text{Absorbansi sampel uji})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Keterangan :

Absorbansi kontrol = Tanpa sampel (kontrol-blanko)

Absorbansi sampel uji = S<sub>1</sub>-S<sub>0</sub>

S<sub>1</sub> = Absorbansi sampel dengan penambahan enzim

S<sub>0</sub> = Absorbansi sampel tanpa penambahan enzim



Nilai % Rendemen pada ekstrak dapat dihitung menggunakan persamaan dalam Radiani (2019) :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100 \%$$

Adapun konsentrasi dan rendemen fikosianin dapat dihitung dengan persamaan Bennett & Bogoard (1973) :

$$PC = \frac{(OD615) - 0,474(OD625)}{5,34}$$

$$Yield = \frac{PC \times V}{DB}$$

Keterangan :

PC = Konsentrasi fikosianin

V = Volume pelarut (ml)

DB = Berat biomassa kering (gram)