

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Research ini menggunakan jenis penelitian *experimental* dengan dilakukannya Skrining Fitokimia, Uji Kadar Fenolik Total dan Kadar Flavonoid Total, serta dengan dilakukannya pengujian menggunakan metode analisis Antioksidan untuk mengetahui nilai IC50 yang ada di dalam ekstrak etanol *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum*. Rancangan penelitian ini adalah penelitian tunggal, di mana satu kelompok sampel ekstrak etanol *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum* akan diuji untuk mengidentifikasi dan mengukur kadar fenolik, flavonoid total, dan mengetahui nilai IC50 yang ada di dalam ekstrak etanol *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum* dengan metode spektrofotometri uv-vis.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini sudah dilakukan selama 6 bulan dari bulan Maret hingga Agustus 2025.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum* berasal dari pantai Karapyak, Desa Bagolo, Rt/09 Rw/06 Kecamatan Kalipucang Pangandaran Jawa Barat sebagai sampel.

3.4 Alat dan Bahan yang digunakan

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput laut merah (*Gracilaria chilensis*) dari pantai Karapyak, Desa Bagolo, Rt/09 Rw/06 Kecamatan Kalipucang Pangandaran Jawa Barat.

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu pisau, cawan porselin (Pyrex), oven (Mammert), timbangan analitik (Shimadzu), cawan krus, tanur (Nobetherm), desikator (Duran), batang pengaduk (Pyrex), spatula, tabung reaksi, toples bening, rak tabung reaksi, Vacum evaporator (OGAWA), pipet tetes, pipet mikro, gelas ukur (Iwaki), erlenmeyer (Pyrex), waterbath (Mammert), spektrofotometri uv-vis (Thermo), kuvet, beaker glass (Pyrex), labu ukur (Pyrex), wadah, botol vial, pipet tetes, blue tip, yellow tip.

3.4.2 Bahan

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96%, ammonia pekat, kloroform, reagen Mayer, reagen Dragendroff, FeCl_3 1%, serbuk magnesium, amil alkohol, asam klorida pekat, gelatin 1%, aquadest, reagen Liebermann-Bouchard, asam galat, larutan Na_2CO_3 7%, reagen folin ciocalteau, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), AlCl_3 10%, dan vitamin c (asam askorbat).

3.5 Variable Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variable

1. Variable Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum*.

2. Variable Terkait

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Standarisasi mutu simplisia, skrining fitokimia, uji total fenolik, uji total flavonoid, dan Antioksidan dengan metode Spektrofotometri uv-vis.

3. Definisi Operasional Variable

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variable Bebas	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Ekstrak Etanol <i>Gracilaria chilensis</i> dan <i>Sargassum polycystum</i>	Ekstrak etanol adalah ekstrak kental yang terbuat dari <i>Gracilaria chilensis</i> dan <i>Sargassum polycystum</i> yang sudah dikeringkan kemudian diekstraksi dengan etanol 96%	Observasi	Rasio	%

	untuk memperoleh rendemen			
Variable Terkait				
Organoleptik	Uji organoleptik adalah pegujian yang dilakukan dengan menggunakan panca indera	Panca Indera	Nominal	1. Aroma 2. Warna 3. Bentuk
Kadar Air	Parameter kadar air merupakan parameter untuk mengukur kadar air didalam Sampel	Metode gravimetri	Rasio	%
Kadar Sari Larut Etanol	Analisis kandungan kadar sari larut etanol untuk mengetahui jumlah zat yang laut dalam etanol	Metode gravimetri	Rasio	%

Kadar Sari Larut Air	Analisis kandungan kadar sari larut air untuk Mengetahui jumlah zat yang larut dalam air	Metode gravimetri	Rasio	%
Susut Pengeringan	Susut pengeringan adalah penurunan berat sampel setelah dikeringkan pada suhu tertentu hingga mencapai bobot tetap	Metode gravimetri	Rasio	%
Kandungan Metabolit Sekunder	Skrining Fitokimia Memerlukan pengujian pada tanaman untuk Memastikan keberadaan dan Jumlah Metabolit sekunder.	Uji kualitatif dengan memasukkan bahan kimia ke setiap sampel yang akan diteliti kemudian amati perubahan warna,	Nominal	1. Warna 2. Buih 3. Endapan

		endapan, dan buih.		
Uji Total Fenolik	Untuk mengetahui jumlah fenol yang terkandung dalam sampel	Menggunakan metode <i>Follin-ciocalteu</i> dan Spektrofotometri uv-vis	Rasio	Absorbansi
Uji Total Flavonoid	Untuk mengetahui jumlah flavonid yang terkandung dalam sampel	Analisi kuantitatif dengan menggunakan metode spektrofotometri uv-vis	Rasio	Absorbansi
Analisis Antioksidan Ekstrak Etanol 96% <i>Gracilaria chilensis</i> dan <i>Sargassum polycystum</i>	Untuk mengetahui nilai IC50 pada sampel	Menggunakan spektrofotometri uv-vis	Rasio	Absorbansi

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Laboratorium Biosistemika dan Molekuler, Departemen Biologi (FMIPA) Universitas Padjajaran, Sumedang, Jawa Barat. Untuk proses awal penelitian ini yaitu dilakukannya identifikasi dan determinasi tumbuhan terubuk dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis yang

terdapat dalam literatur, dengan cara memproses sampel tanaman secara utuh dari batang, akar, hingga daun.

3.6.2 Penyiapan Simplisia

Tanaman yang digunakan adalah rumput laut merah (*Gracilaria chilensis*) dan Rumput laut coklta (*Sargassum polycystum*) dari pantai Karapyak, Desa Bagolo, Rt/09 Rw/06 Kecamatan Kalipucang Pangandaran Jawa Barat, mengumpulkannya, dan meletakkannya dalam wadah yang sesuai. Rumput laut tersebut kemudian dicuci di bawah air mengalir untuk dihilangkan kotoran serta pasir yang menempel. Setelah itu, rumput laut dipotong lebih pendek dan dijemur di paparan sinar matahari. Rumput laut yang telah kering dipisahkan dari benda asing, kemudian dihancurkan menggunakan blender dan disaring melalui mesh 40. Sebelum proses maserasi dimulai, serbuk simplisia yang telah dihasilkan diuji terlebih dahulu untuk memastikan parameter standarisasi simplisia (Aulia et al., 2023).

3.6.3 Parameter Standarisasi Simplisia (*Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum*)

1. Parameter Spesifik

a. Kadar Sari Larut Air

Timbna 5 gram simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air jenuh kloroform (2,5 ml kloroform dalam air suling 1000 ml), dalam labu bersumbat, sambil dikocok tiap jam, selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Disaring, diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan petri yang telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. (Depkes RI, 2000).

$$\text{Kadar Sari Larut air} = \frac{\text{Berat Sari Air}}{\text{Berat Ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

b. Kadar Sari Larut Etanol

Timbang 5 g ekstrak, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (96%), menggunakan labu bersumbat sambil dikocok tiap jam, selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan petri telah ditara, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar Sari Larut Etanol dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (96%), terhadap ekstrak awal (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{Berat Sari Etanol}}{\text{Berat Ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

2. Parameter Non Spesifik

a. Susut Pengeringan

Timbang 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam cawan berlapis yang sudah ditara, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105°C ditimbang setiap 30 menit sampai bobot tidak berkurang. Bobot akhir dicatat dan dihitung susut pengeringannya (Utami *et al.*, 2017) susut pengeringan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Bobot Awal} - \text{Bobot Akhir}}{\text{Bobot Awal}} \times 100\%$$

b. Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan alat Moisture Balance. Siapkan alat Moisture Balance kemudian alat pengukur kadar air dipastikan ada pada posisi nol dan jarum berada pada posisi netral, anak timbangan 2 gram diletakkan dan kemudian masukan serbuk simplisia sebanyak 2 gram sampai stabil dengan posisi jarum

ditengah. Kemudian lampu dinyalakan dan suhu diatur maksimal 100 0C. Setelah suhu mencapai 100 0C dinyalakan stopwatch dan di hitung waktu selama 15 menit dan suhu tetap dijaga. Lampu dimatikan dan tombol pengukur diputar ke kiri sampai jarum menunjukkan keposisi semula, kemudian dihitung kadar air yang menyusut, lalu dicatat. (Wiendarlina, Rahmini wati and Gumelar, 2019).

$$\text{Kadar Air} = \frac{b - (c - a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

a : Berat cawan kosong (g)

b : Berat simplisia awal (g)

c : Berat cawan dan simplisia setelah di oven (g)

3.6.4 Proses Ekstraksi Simplisia (*Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum*)

Setelah dihaluskan dan disaring, simplisia (*Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum*) sebanyak 500 gram ditimbang, lalu diekstraksi dengan metode maserasi dimana sampel direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 15 L sampai sampel terendam. perendaman akan di lakukan selama satu hari di ruangan tanpa cahaya, lalu dilakukan penyaringan dan filtratnya dimasukkan ke dalam botol gelap, lalu lakukan remaserasi sampai 3 kali pengulangan dimana total waktu yang di gunakan selama 3 hari. Setelah itu hasil keseluruhan filtrat diuapkan menggunakan Vacum Evaporat untuk mengentalkan sampai terbentuk ekstrak kental. Kemudian, campuran dimasukkan ke dalam wadah steril. (Abiyoga et al., 2021). Nilai rendemen ditentukan dengan menggunakan rumus di bawah ini :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak (gr)}}{\text{Berat Sampel (gr)}} \times 100 \%$$

3.6.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder, dilakukan terhadap sampel serbuk simplisia dan ekstrak rumput laut *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum* meliputi :

A. Identifikasi Alkaloid

Sampel dibasakan dengan 1 mL ammonia pekat, kemudian ditambahkan kloroform 5 mL dan di kocok kuat. Lapisan kloroform dipipet, kemudian ke dalamnya ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat-kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian:

- Bagian pertama ditambahkan peraksi Mayer. Bila terjadi endapan atau kekeruhan putih, berarti dalam simplisia kemungkinan terkandung alkaloid.
- Bagian dua ditambahkan peraksi Dragendorff. Bila terjadi endapan atau kekeruhan berwarna jingga kuning, berarti dalam simplisia kemungkinan terkandung alkaloid.
- Bagian tiga digunakan sebagai blanko (Harborne, 2017).

B. Identifikasi Flavonoid

Sejumlah kecil sampel dalam tabung reaksi dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2N. Campuran dipanaskan di atas tangas air, lalu disaring. Kepada filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Harborne, 2017).

C. Identifikasi Fenol

Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan aquadest sebanyak 10 mL kemudian disaring. Filtrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna hijau, merah, ungu, biru, dan hitam (Harborne, 2017).

D. Identifikasi Tanin

Sejumlah kecil sampel dalam tabung reaksi dipanaskan di atas tangas air, kemudian disaring. Pada filtrat ditambahkan pereaksi besi (III) klorida 1% dan gelatin 1%. Adanya senyawa tanin ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru kehitaman dan sampel larut dalam gelatin (Harborne, 2017).

E. Identifikasi Saponin

Sampel ditambahkan aquadest panas 10 mL kemudian didinginkan dan dikocok kuat selama 10 detik. Terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama 10 menit. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, busa tidak hilang (Harborne, 2017).

F. Identifikasi Steroid dan Triterpenoid

Sampel ditambahkan dengan eter, kemudian disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Hasil pengeringan ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard. Terjadinya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid sedangkan adanya warna hijau biru menunjukkan adanya senyawa steroid (Harborne, 2017).

3.6.6 Penetapan Kadar Fenolik

a. Penentuan Operating Time

Sebanyak 1 mL larutan standar asam galat 50 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 4 mL Na_2CO_3 7%. Absorbansinya diukur dan diamati

setiap menit selama 20 menit pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Meilinda et al.,2022).

b. Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 1 mL larutan standar asam galat 50 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 4 mL Na_2CO_3 7%. Absorbansinya kemudian diukur pada panjang gelombang 400-800 nm (Meilinda et al.,2022).

c. Pembuatan Kurva Asam Galat

Larutan standar dengan konsentrasi 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, dan 10 ppm masing-masing diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 4 mL Na_2CO_3 7%. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang yang telah ditentukan dari pengukuran panjang gelombang maksimum (Meilinda et al.,2022).

d. Penetapan Kadar Fenolik Total

Larutan ekstrak etanol *Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum* yang telah dibuat, dipipet sebanyak 1 ml, kemudian tambahkan 0,4 ml reagen Follin-Ciocalteau. Sampel dikocok dan dibiarkan selama 4-8 menit. Setelah itu, tambahkan 4,0 ml larutan Na_2CO_3 7% dan kocok hingga tercampur sempurna. Aquadestilata ditambahkan hingga mencapai volume 10 ml, lalu campuran tersebut didiamkan selama 2 jam pada suhu ruang. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum 701 nm. Pengukuran diulang sebanyak 3 kali untuk menentukan kadar fenol yang dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat per gram ekstrak (Wahdaningsih et al.,2017).Perhitungan kandungan fenolik total menggunakan rumus berikut :

$$\text{TPC} = \frac{c.v.fp}{g} \times 100\%$$

Keterangan:

c = konsentrasi Fenolik (nilai asam galat)

v = volume ekstrak yang digunakan (ml)

fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan

3.6.7 Penetapan Kadar Flavonoid

a. Penentuan Operating Time

Ambil 1 mL larutan baku kerja 80 ppm menggunakan pipet, lalu tambahkan 3 mL metanol p.a, 0,2 mL larutan AlCl_3 (Aluminium Klorida), dan 0,2 mL larutan CH_3COOK 1M (Kalium Asetat). Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL. Absorbansi diukur setiap 5 menit mulai dari menit ke-0 hingga ke-60 pada panjang gelombang maksimum 430 nm, hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Safil *et al.*, 2023).

b. Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 1 mL larutan standar kuersetin 40 ppm dipipet, kemudian ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, dan 0,2 mL kalium asetat 1M. Larutan ini kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL, dibiarkan pada suhu 25-30°C selama 30 menit. Spektrum serapan larutan tersebut diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Sebagai blanko, digunakan campuran yang terdiri dari 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan akuades hingga mencapai volume 10 mL (Juliadi *et al.*, 2024).

c. Penentuan Kurva Baku Quersetin

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm masing-masing dipipet sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, serta 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan kemudian diencerkan dengan akuades hingga mencapai volume 10 mL. Setelah itu, larutan didiamkan pada suhu ruang 20-30°C selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Sebagai blanko, digunakan campuran yang terdiri dari 3 mL metanol, 0,2 mL Al 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan akuades hingga mencapai volume 10 mL (Juliadi et al., 2024).

d. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Sebanyak 25 mg ekstrak etanol daun terubuk ditimbang dan diarutkan dalam 25ml metanol PA. Prosedur ini dilakukan dalam tiga kali repikasi, di mana masing masing 0,5 ml larutan dipipet kemudian ditambahkan 3 ml metanol, 0,2 ml AlCl₃ 10%, 0,2 ml kalium asetat 1M, dan ditambahkan aquadest hingga mencapai volume 10 ml. setelah itu, campuran didiamkan pada suhu ruang 25-30o C selama 30 ment, kemudian absorbansinya diukur menggunakan Spektrofotometri UV- Vis pada panjang gelombang maksimum (Juliadi et al.,2024).

$$TFC = \frac{C.V.DF}{w} \dots$$

Keterangan:

TFC : Total Flavonoid Concentration

C : Phenol Concentration (nilai x)

V : Volume ekstrak (mL)

DF : Dilution Factor

w : berat sampel (mg)

3.6.8 Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH

Konsentrasi larutan DPPH 1000 ppm. ditimbang sebanyak 25 mg kemudian dilarutkan dalam 25mL etanol p.a, larutan dikocok hingga homogen. Larutan kontrol dibuat dengan cara dimasukkan larutan DPPH sebanyak 1 mL kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL etanol p.a (Hartanto, 2018).

b. Pembuatan Larutan Sampel Uji Ekstrak (*Gracilaria chilensis* dan *Sargassum polycystum*)

Pembuatan larutan induk ekstrak alga merah dengan cara ditimbang 25 mg ekstrak alga merah dan Alga coklat dilarutkan ke dalam 25 mL etanol p.a (1000 ppm). Kemudian dibuat beberapa konsentrasi larutan (100, 200, 400,800 ppm) (Hartanto, 2018).

c. Pembuatan Larutan Kontrol Positif (Vitamin C)

Cara membuat larutan induk vitamin C yaitu ditimbang 25 mg vitamin C, kemudian dilarutkan ke dalam 25 mL etanol p.a (1000 ppm). Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi larutan (5,10,15,20 ppm). Masukkan Ke dalam setiap tabung sampel dan kontrol positif ditambahkan 1 ml larutan DPPH 1 mMol, kemudian ditambahkan metanol p.a hingga 5 ml, (Hartanto, 2018).

d. Penetapan IC50 Peredaman DPPH

Sebelum melakukan pengukuran absorbansi, larutan yang sudah dibuat diantaranya adalah larutan kontrol, ekstrak rumput laut merah, dan kontrol positif (vitamin C) diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam keadaan gelap di inkubator. Kemudian diukur absorbansinya

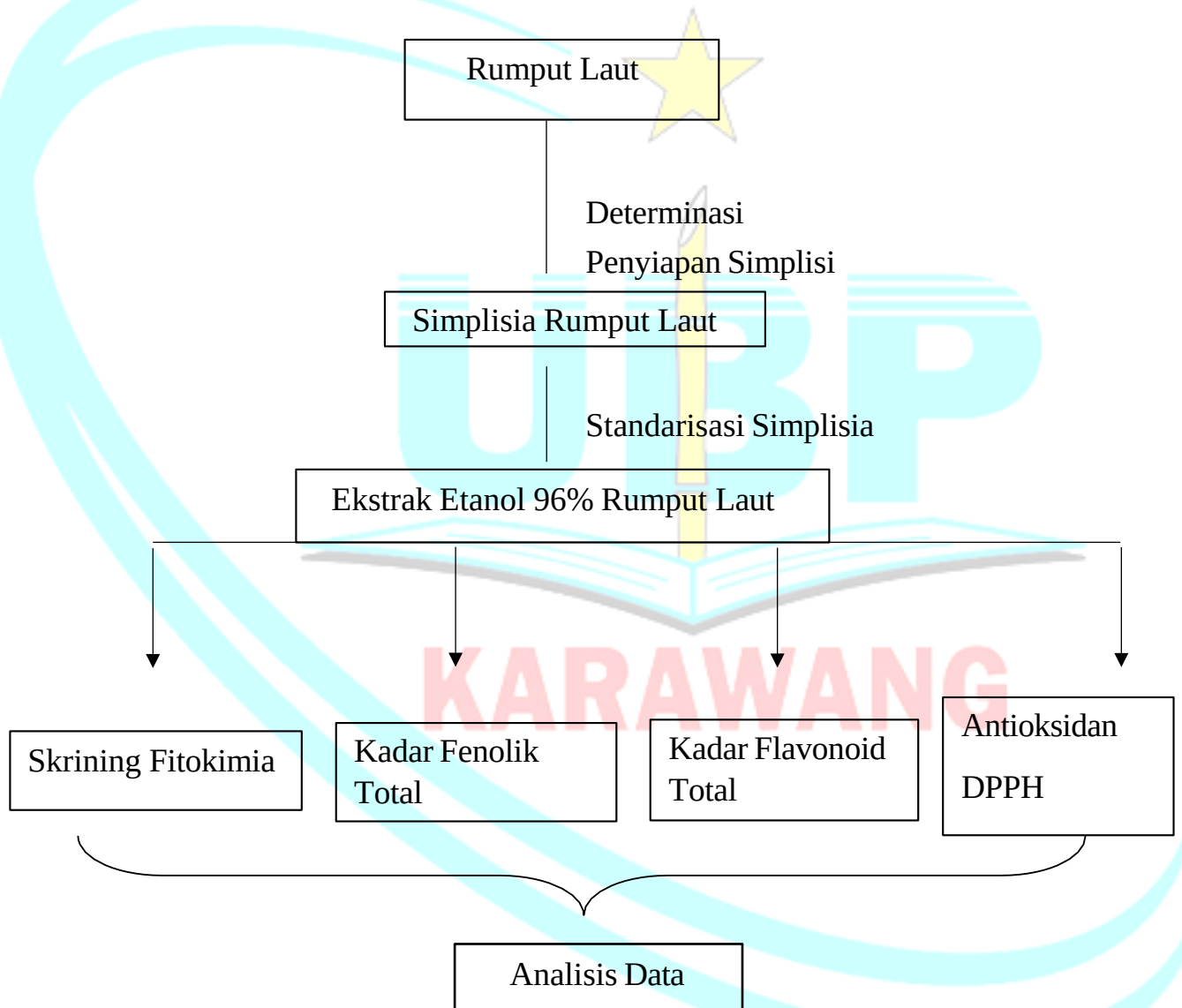
dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya. Setelah nilai absorbansi (A) diperoleh, dihitung persen hambatan atau % inhibisi pada masing-masing larutan. Setelah diperoleh % inhibisi untuk masing-masing larutan, kemudian dicari nilai IC50 menggunakan persamaan $y = ax + b$ yang diperoleh dari kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi dan presentase inhibisi (%). Nilai IC50 didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$ (Ningrum dkk, 2017).

3.7 Analisis Data

Semua hasil penelitian dinyatakan sebagai rata-rata $\pm$ standar deviasi. Analisis varians dilakukan dengan prosedur ANOVA satu arah-Tukey (nilai $p < 0,05$), dan analisis koefisien korelasi (r) digunakan untuk menentukan korelasi dua variabel dengan menggunakan analisis Pearson, analisis ini untuk menyatakan adanya korelasi antara perlakuan. Pengolahan analisis statistik ini dilakukan dengan menggunakan SPSS .

3.8 Diagram Alir

Diagram alir pada penelitian ini sebagai berikut



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian