

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2011 sampai Juni 2012 di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung. Karakterisasi struktur dengan spektroskopi IR dilakukan di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol timbang, pipet tetes, gelas ukur, gelas beaker, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, corong pisah, neraca Wigen Hauser 210, mesin pemutar vakum BUCHI rotavapor R210, LC-ELSD Varian 385, HPLC Varian 940, FT-IR Varian 2000.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kertas tisu, plastik wrap, aluminium foil, kapas, sponga, metanol, diklorometana, aquadest, metanol HPLC grade, aquabidest, pereaksi serium sulfat, pereaksi DPPH, pereaksi *Dragendorf*.

### C. Metode Kerja

#### 1. Sampel Sponga

Sampel sponga yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari koleksi deposit sponga Laboratorium Biomassa Universitas Lampung. Sampel sponga tersebut diperoleh dari perairan Teluk Kupang dengan menggunakan teknik *scuba dive*.

#### 2. Skrining awal antioksidan ekstrak kasar sponga

Ekstrak kasar dari kelima jenis sponga C21, C25, F49, A13, dan G50 dilarutkan dalam metanol hingga diperoleh konsentrasi 2 mg/mL. Terhadap masing-masing ekstrak kasar dilakukan uji antioksidan dengan metode cepat *microplate reader* DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,2 mM. Sebagai kontrol positif digunakan larutan vitamin C dengan konsentrasi 10, 50, dan 100 ppm. Ekstrak sponga diambil 100  $\mu$ L dan dimasukkan ke dalam *plate wells* kemudian ditambahkan pereaksi DPPH sebanyak 100  $\mu$ L di setiap *wells* sehingga konsentrasi akhir pereaksi DPPH dalam larutan adalah 0,1 mM. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap vitamin C sebagai kontrol positif dan metanol sebagai blanko. Perubahan warna yang terjadi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 492 nm. Larutan DPPH 0,2 mM dibuat dengan melarutkan DPPH sebanyak 0,4 mg ke dalam 5 mL metanol (modifikasi dari metode Marxen *et al.*, 2007). Untuk menghindari kesalahan dalam pengukuran, maka larutan DPPH dibuat dalam keadaan segar dan ditutup dengan aluminium foil untuk

mencegah kerusakan DPPH akibat pengaruh cahaya. Kemudian dihitung persen inhibisi yang dihasilkan oleh masing-masing ekstrak kasar.

$$\% \text{ inhibisi} = [(C-S)/C] \times 100 \%$$

dengan C = absorbansi blanko  
S = absorbansi sampel

### 3. Ekstraksi Sponga

Sponga dengan aktivitas antioksidan paling kuat dilakukan ekstraksi dalam jumlah besar. Sponga sebanyak 150 g dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan. Sampel sponga yang sudah kering kemudian dimaserasi dengan merendamnya dalam 1 L metanol (Aoki *et al.*, 2005). Proses maserasi dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil maserasi kemudian disaring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan mesin pemutar vakum BUCHI rotavapor 210 hingga diperoleh ekstrak kasar sponga. Ekstrak kasar tersebut kemudian dipartisi cair-cair menggunakan pelarut air-etil asetat.

### 4. Isolasi Senyawa Antioksidan

#### a. KLT Kualitatif Senyawa Antioksidan

Terhadap ekstrak kasar sponga A13 dilakukan KLT menggunakan fasa diam SiO<sub>2</sub> dan fasa gerak kombinasi DCM-MeOH. KLT ini dilakukan untuk mengetahui komponen-komponen senyawa dalam sampel dan untuk memperoleh pola pemisahan yang paling baik. Dengan KLT diharapkan

akan diperoleh kombinasi eluen untuk memisahkan senyawa antioksidan dari komponen senyawa lainnya. Untuk identifikasi senyawa bioaktif dilakukan visualisasi menggunakan lampu UV pereaksi serum sulfat, dan pereaksi DPPH.

#### b. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom dilakukan menggunakan SiO<sub>2</sub> sebagai fasa diam dan kombinasi DCM-MeOH sebagai fasa gerak. Hasil KLT digunakan sebagai referensi kombinasi eluen pada kromatografi kolom. Fraksi yang keluar kemudian ditampung dalam botol fraksi. Terhadap masing-masing fraksi kemudian dilakukan analisis kualitatif antioksidan dengan metode KLT. Visualisasi senyawa antioksidan dilakukan dengan menggunakan pereaksi DPPH. Pereaksi DPPH dibuat dengan melarutkan 5 mg DPPH dalam 2,5 mL MeOH sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 0,2 % (Mohammad *et al.*, 2004).

#### c. Analisis KCKT

Untuk analisis kemurnian senyawa antioksidan hasil isolasi dilakukan dengan KCKT (Varian) menggunakan kolom fasa terbalik (*reverse phase*) C<sub>18</sub>, 125 x 4,6 mm (varian, *prepacked*), fasa gerak metanol-air, detektor PDA (*photo dioda array*) dan ELSD (*evaporative light scattering detector*) (Varian-385).

## 5. Uji Aktivitas Antioksidan

Setelah diperoleh senyawa murni, maka dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap senyawa hasil isolasi. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan pereaksi DPPH dan diukur dengan *microplates reader* pada  $\lambda = 492$  nm. Sebagai kontrol positif digunakan larutan standar vitamin C dengan konsentrasi 1, 5, 10, 25, dan 50 ppm.

## 6. Karakterisasi dengan FT-IR

Senyawa hasil isolasi dari ekstrak metanol sponga dikarakterisasi menggunakan FT-IR (Varian 2000). Analisis menggunakan FT-IR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada senyawa. Analisis gugus fungsi senyawa hasil isolasi didasarkan pada spektrum serapan FT-IR pada daerah bilangan gelombang 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ .