

IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2020 sampai dengan bulan Februari 2021, bertempat di Laboratorium Kimia dan Analisis Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya. Pengujian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Analisis Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan umum seperti masker, sarung tangan, tampah, penyaring, labu erlenmeyer 50 ml, pipet tetes, pipet ukur 10 ml, karet penghisap, tabung sentrifuge 15 ml, tabung reaksi, batang pengaduk, corong kaca, botol vial, kaca arloji, statif dan clem, *aluminium foil*, cuvet, rak tabung reaksi, gelas ukur 10 ml, beaker glass, labu ukur 250 ml, oven, dan termometer digital. Selain itu, peralatan khusus yang digunakan seperti timbangan analitik 2100 gr (Ohaus[®] PA2102 Pioneer) dan 210 gr (Ohaus[®] PA214 Pioneer), *grinder* (Fomac[®] FCT Z200), *vortex* (Dragon Lab[®] MX-S), *hot plate & magnetic stirrer* (Barnstead Thermolyne[®] SP131635), *sentrifuge* (Hettich[®] EBA 20 centrifuge), *spectrofotometri UV-Vis* (Human Corporation[®] X-ma 1200), *UPS* (OUA), *ultrasonic bath* (DSA), *moisture analyze* (BEL Engineering[®] iThermo Touch 163), mikro pipet 100-1000 μ L (Dragon Lab Scientific[®] MicroPette), lemari *freezer* (GEA[®] pharmaceutical refrigerator), lemari asam (Fume Hood[®]).

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan baku utama yang digunakan pada penelitian ini adalah teripang (*Paracaudina* sp.) yang diambil dari Perairan Pantai Timur Kenjeran Surabaya. Bahan kimia yang digunakan antara lain, ChCl (Himedia, 99% wt, CAS Number: 67-48-1), gliserol (Himedia, 99,5% wt, CAS Number: 56-81-5), akuades, aseton, metanol (MERCK, 99,9% wt, CAS Number: 67-56-1), dan 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (TCI, 97% wt, CAS Number: 1898-66-4).

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 3 variabel penelitian, yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat. Penelitian ini menggunakan 3 variabel bebas yang dapat dilihat pada (Tabel 1). Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah sampel Teripang (*P. Australis*) dan pelarut DESs yang digunakan. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas antioksidan ekstrak teripang yang diuji menggunakan metode DPPH.

Tabel 1. Parameter Variabel Bebas

Parameter	Level		
	1	2	3
Konsentrasi Pelarut DES (Chcl:Gly)	5%	15%	25%
Waktu	15 menit	30 menit	45 menit
Suhu	20°C	30°C	40°C

Metodologi respon permukaan yang digunakan adalah model *Box-Behnken Design*. Penggunaan *Box-Behnken Design* selain untuk mengevaluasi pengaruh dari 3 variabel bebas, yaitu (A) konsentrasi pelarut, (B) waktu ekstraksi, dan (C) suhu ekstraksi juga bertujuan mempersingkat waktu penelitian dengan memangkas jumlah perlakuan dari 27 menjadi 17 kali percobaan dengan 2 ulangan seperti pada (Tabel 2).

Tabel 2. Variabel Perlakuan Ketentuan *Box-Behnken*

No.	Nama Data	Pelarut Kombinasi	Waktu	Suhu	Ulangan	
1.	A1	5%	15 menit	30°C	1	2
2.	A2	25%		30°C		
3.	A3	15%		40°C		
4.	A4	15%		20°C		
5.	B1	5%	30 menit	20°C		
6.	B2	25%		40°C		
7.	B3	5%		30°C		
8.	B4	25%		30°C		
9.	B5	15%		30°C		
10.	B6	15%		30°C		
11.	B7	15%		30°C		
12.	B8	15%		20°C		
13.	B9	15%		40°C		
14.	C1	5%	45 menit	30°C		
15.	C2	25%		30°C		
16.	C3	15%		40°C		
17.	C4	15%		20°C		

Penggunaan 2 kali ulangan pada penelitian ini berdasarkan perhitungan jumlah pengulangan sampel menurut rumus (Kusriningrum, 2012) adalah sebagai berikut:

$$t(n - 1) \geq 15$$

Kerangan:

n = jumlah pengulangan

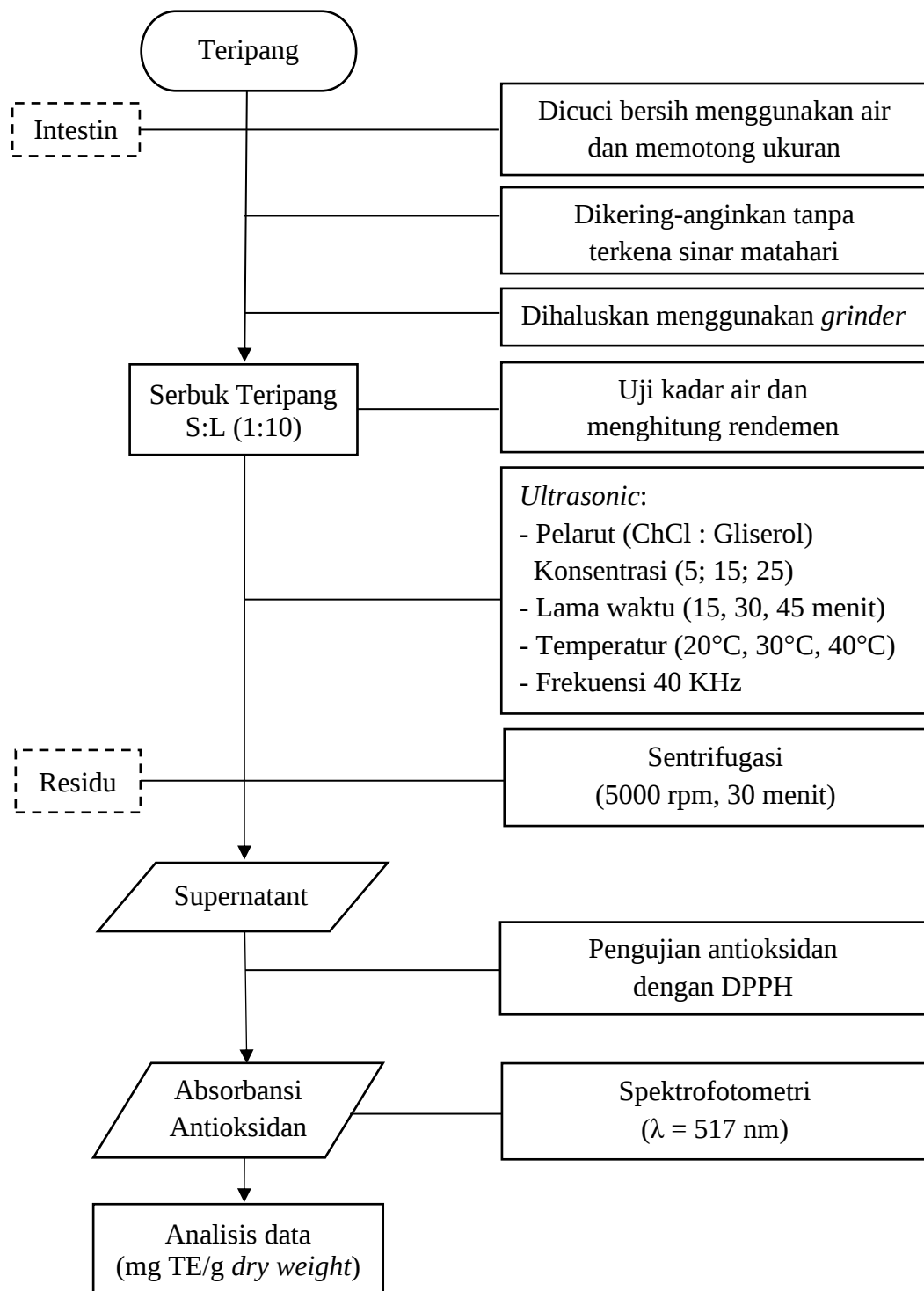
t = jumlah perlakuan

Maka jumlah pengulangan dan sampel yang dibutuhkan dalam kelompok adalah:

$$\begin{aligned} t(n - 1) &\geq 15 \\ 17(n - 1) &\geq 15 \\ 17n - 17 &\geq 15 \\ 17n &\geq 15 + 17 \\ 17n &\geq 32 \\ n &\geq 1,88 \\ n &\geq 2 \end{aligned}$$

4.3.2 Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, tahap pertama adalah pembuatan pelarut DESs. Tahap selanjutnya adalah persiapan awal sampel teripang, kemudian pembuatan ekstrak DESs Teripang (*Paracaudina sp*) yang dilakukan dengan bantuan metode *ultrasonic*. Tahapan yang terakhir adalah persiapan ekstrak untu diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian

A. Persiapan Bahan Baku

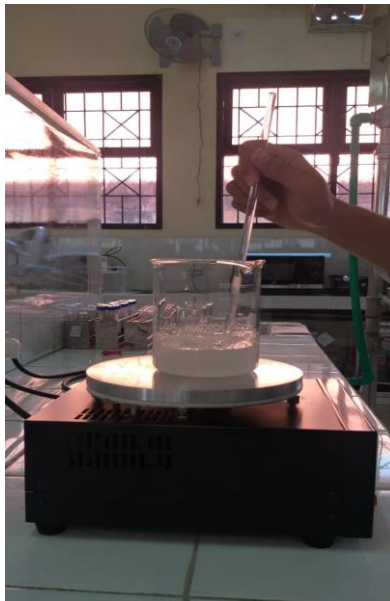
Bahan baku teripang diperoleh dari Perairan Pantai Timur Kenjeran Kota Surabaya. Sampel teripang dipisahkan antara daging dan jeroannya menggunakan pisau dan dibawa ke laboratorium menggunakan *coolbox*. Kemudian teripang dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Teripang yang telah dipotong di keringkan dalam suhu ruang dengan cara diangin-anginkan selama 72 jam menggunakan kipas angin tanpa terkena sinar matahari. Tahap terakhir adalah menghaluskan hingga menjadi bubuk menggunakan mesin grinder. Persiapan bahan baku dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Persiapan Bahan Baku (Dokumentasi Pribadi, 2020)

B. Persiapan Pelarut DESs

Pelarut DES dengan Campuran Kolin Klorida (HBA) dan Gliserol (HBD) dicampur dalam rasio molar 1:2, dengan perhitungan ChCl ditimbang sebanyak 140 gram untuk 1 mol sedangkan gliserol 184 gram untuk 2 mol, kemudian panaskan giserol dan ChCl menggunakan *hotplate* dan diaduk dengan *magnetic stirring* pada suhu 60° C dengan waktu ± 10 menit sampai terbentuk campuran larutan. Atur konsentrasi DES dengan menambahkan air hingga mencapai konsentrasi 5%, 15%, dan 25%. Karakterisasi pelarut DES dapat dilihat dari sifat fisiknya yaitu densitas dan viskositas Persiapan pelarut DES dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Persiapan Bahan Baku (Dokumentasi Pribadi, 2020)

C. Ekstraksi Dengan *Ultrasonic*

Sampel sebanyak satu gram bubuk teripang ditambahkan ke masing-masing pelarut yang telah dibedakan berdasarkan konsentrasi sebanyak 10 mL dalam tabung erlenmeyer 50 mL. Kemudian hasil campuran disonikasi dengan *ultrasounic bath* pada suhu 20°C, 30°C, dan 40°C selama 15, 30, dan 45 menit, yang dapat dilihat pada Gambar 6 . Campuran tersebut kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 30 menit, supernatan yang telah terpisah dipindahkan dengan perlahan ke dalam tabung reaksi untuk analisis lebih lanjut. Proses ekstraksi menggunakan ultrasonik dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Proses ekstraksi menggunakan ultrasonik (Dokumentasi Pribadi, 2020)

D. Pengujian DPPH

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Pembuatan larutan baku DPPH adalah dengan menimbang 0,006 gr DPPH kemudian ditambahkan metanol hingga mencapai volume 250 mL. Supernatan diambil sebanyak 500µl dan dilarutkan kedalam 5 mL DPPH menggunakan micropipet. Setelah itu, larutan

diinkubasi di dalam ruang gelap selama 30 menit. Nilai absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm menggunakan blanko metanol. Perhitungan yang digunakan adalah nilai %inhibisi yang didapatkan dengan membandingkan absorbansi analit & DPPH dengan nilai absorbansi pelarut & DPPH. Hasil pengujian antioksidan menggunakan DPPH dapat dilihat pada Gambar 7.

Aktivitas antioksidan diukur menggunakan kurva standar (mg Trolox/g = $441,8 \times \%AA - 16,725$; $R^2 = 0,99$) dimana %AA merupakan persentase reduksi DPPH yang bisa dilihat pada rumus berikut (2):

$$\%AA = \frac{ABS_b - ABS_a}{ABS_b} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

ABS_b = Absorbansi blanko

ABS_s = Absorbansi sampel

ABS_b merupakan nilai absorbansi blanko, sedangkan ABS_a merupakan nilai absorbansi sampel (Alkadri et al., 2019). Hasil aktivitas antioksidan dikonversikan dalam mg Trolox ekuivalen per gram berat kering teripang (mg TE/g dw). Kesetaraan Trolox digunakan sebagai tolok ukur kapasitas antioksidan dari campuran tersebut (Huang *et al.*, 2005), dimana %AA adalah persentase penurunan DPPH, yang diberikan oleh persamaan berikut (3):

$$TE/g\ dw = (((441,8 \times (AA\%/100)) - 16,75) \times ((5,5/0,5) \times (10/1000))) \times 0,85 \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan:

441,8 = Konstanta konversi mg Trolox/L ke mg TE/g dw

16,75 = Konstanta konversi mg Trolox/L ke mg TE/g dw

- 0,5 = Faktor pengenceran nilai sampel (ml)
- 5,5 = Faktor pengenceran nilai DPPH (ml)
- 10 = Kuantitas analit yang digunakan (ml)
- 1000 = Nilai konversi liter ke mili liter
- 0,85 = Persentase banyaknya sampel per kadar air



Gambar 7. Hasil Pengujian Antioksidan dengan DPPH (Dokumentasi Pribadi, 2021)

4.3.3 Parameter

Parameter dalam penelitian ini terbagi menjadi dua yakni parameter utama dan parameter pendukung. Parameter utama dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas antioksidan dari pengujian dengan metode DPPH yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi. Parameter pendukung dalam penelitian ini meliputi rendemen teripang kering, kadar air sampel teripang kering, serta viskositas dari DES.

4.3.4 Analisis Data

Perangkat lunak Design Expert versi 11.0.3 (Star-Ease Inc., Minneapolis, AS) digunakan untuk melakukan semua desain eksperimental dan analisis respons permukaan (RSM). Data eksperimental dimasukkan kedalam model Box Behnken Design (BBD) untuk menentukan model regresi polynomia yang merepresentasikan pengaruh variabel bebas pada variabel terikat (Ling *et al.*, 2020). Penggunaan *Box-Behnken Design* juga digunakan untuk mencari optimasi dari ketiga parameter variabel bebas. Model yang digunakan yaitu model regresi polynomial sebagai berikut (4)

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \dots \dots \dots (4)$$

Keterangan:

- X_1 = Variabel bebas
- I = 1, 2, 3,, k
- B_0 = Konstanta
- B_1 = Koefisien parameter model

Analisis varian (ANOVA) juga diterapkan untuk menentukan koefisien regresi, untuk menyelidiki interaksi antara variabel dependen dan independen, serta untuk memilih model polinomial yang paling sesuai untuk data eksperimen. Hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat disajikan secara grafis melalui plot permukaan respon. Semua percobaan dilakukan dalam rangkap tiga (Ling *et al.*, 2020). Hal tersebut dapat diketahui melalui nilai $P < 0,05$ dan nilai F hitung lebih besar daripada F tabel (F_{crit}). Model dari percobaan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) faktorial, sebagai berikut (5):

$$X_{npq} = \mu + \alpha_p + \beta_q + (\alpha\beta)_{pq} + \varepsilon_{npq} \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan:

X_{npq}	= Observasi/pengamatan pada satuan percobaan ke n dari kombinasi perlakuan pqr dengan faktor A taraf ke p dan faktor B taraf ke q
μ	= Rataan umum
α_p	= Pengaruh faktor A pada taraf ke p
β_q	= Pengaruh faktor B pada taraf ke q
$(\alpha\beta)_{pq}$	= pengaruh interaksi faktor A taraf ke p dan faktor B ke q
ε_{npq}	= pengaruh eror/galat yang muncul dari kombinasi percobaan ke n dalam faktor A taraf ke p dan faktor B taraf ke q

Apabila dari hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh nyata, maka perhitungan dilanjutkan dengan penambahan uji LSD (*Least Significance Difference*), yang dilakukan untuk melakukan uji t di antara seluruh pasangan kelompok mean. Uji ini sangat baik apabila pengujian *mean* yang akan dibandingkan sebelumnya telah direncanakan