

### BAB III. METODE PENELITIAN

Penelitian akan dilaksanakan di laboratorium Universitas Bhakti Kencana Bandung pada bulan Februari hingga Juni 2022. Tujuan dilakukan penelitian ini selain mengetahui aktivitas ekstrak makroalga *Eucheuma cottonii* dalam menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase, juga untuk menentukan nilai *Inhibitor Concentration 50* (IC<sub>50</sub>) ekstrak makroalga *Eucheuma cottonii* terhadap enzim  $\alpha$ -glukosidase. Makroalga *Eucheuma cottonii* yang digunakan berasal dari Pantai Onaria, Ds. Tri Dharmayoga, Kec. Ketapang Lampung Selatan. Penelitian ini akan dilakukan secara *In vitro* dengan tahapan yang akan dilakukan antara lain penyiapan bahan, karakterisasi sampel, ekstraksi, pemantauan ekstrak, serta pengujian aktivitas penghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase.

Penyiapan bahan yang dilakukan meliputi pengumpulan bahan dan determinasi untuk memastikan identitas sampel yang dilakukan di Herbarium Bandung SITH ITB (Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung). Sampel basah di cuci terlebih dahulu, lalu sampel dipotong kecil untuk dilakukan pretreatment dengan delignifikasi dan ditambahkan CaCO<sub>3</sub> sampai terendam, setelah itu dibilas dengan air, lalu dilakukan perendaman kembali dengan NaOH sampai terendam disimpan selama 24 jam, dibilas dengan air panas dan dikeringkan selama 1-3 hari dibawah sinar matahari.

Ekstrak sampel diperoleh menggunakan metode ekstraksi maserasi bertingkat dengan tiga pelarut yang berbeda kepolaran berturut-turut yaitu, n-heksana, etil asetat dan etanol 70%. Ekstraksi dilakukan selama 3×24 jam dan ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan.

Pemantauan ekstrak dari makroalga *Eucheuma cottonii* dipantau dengan menggunakan KLT berupa fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan berbagai fase gerak. Kromatogram dilihat pada lampu UV menggunakan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kemudian dibandingkan antara sebelum disemprot atau sesudah disemprot oleh penampak bercak Dragendorff, Lieberman-Buchard, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, dan sitroborat di bawah lampu UV, lalu dihitung Nilai Rf dari masing-masing bercak.

Tahapan terakhir yaitu melakukan uji aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase. Enzim  $\alpha$ -glukosidase berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* dan sebagai substrat digunakan *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosa (pNPG). Sebelum dilakukan uji aktivitas dilakukan optimasi substrat terlebih dahulu. Kemudian dilakukan pengujian blanko, kontrol blanko, standar dan kontrol standar yang kemudian sampel diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm dengan acarbose sebagai standar pembanding. Persentase aktivitas inhibisi  $\alpha$ -glukosidase ditentukan dengan persamaan berikut:

$$\%Inhibisi = \frac{B - S}{B} \times 100\%$$

Penentuan  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi yang dapat menginhibisi sebesar 50% aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase ditentukan dengan persamaan regresi linear  $y = a + bx$  dimana  $x$  merupakan konsentrasi sampel dan  $y$  adalah % inhibisi enzim.