

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2014-Maret 2015 di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung. Untuk karakterisasi digunakan Spektrofotometer UV-Vis di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung dan Spektrofotometer IR di Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : satu set alat kultivasi yaitu culture flask 500 mL, tabung kultivasi 1 L, tabung kultivasi 15 L, pompa aerator, selang, oven vacum, sentrifuse Hitachi CF16RXII, satu set perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan plat alumunium silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) dan C₁₈, mikroskop Zeiss A10, spektrofotometer Uv-Vis , dan spektrofotometer IR.

Bahan yang digunakan yaitu mikroalga *Dunaliella sp* (Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung), air laut, pupuk (Urea, TSP dan ZA) dan pelarut aseton, kloroform serta metanol.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Bibit Kultur

Mikroalga *Dunaliella sp* dikultivasi dalam media *conwy/walne* pada 3 *culture flash* 250 ml selama 7 hari. Kondisi kultivasi dengan intensitas cahaya 42 watt, pH 7,5-8,5, suhu 25 °C dan salinitas 2,5 °Be

3.3.2 Kultivasi

Bibit kultur yang digunakan untuk kultivasi yaitu 1:3 dari media kulturnya. Kultivasi dilakukan pada skala laboratorium 500 mL hingga 15 L. Media kultur terdiri dari Urea, TSP dan ZA dengan pelarut air laut. Kondisi kultur dengan intensitas cahaya 42 watt, pH 7,5-8,5, suhu 25 °C dan salinitas 2,5 °Be dan 10 °Be.

3.3.3 Perhitungan Kepadatan Sel

Untuk mengetahui pertumbuhan mikrolaga dalam rentan waktu 14 hari. Sel diukur menggunakan *Haemocytometer* dengan bantuan mikroskop. Untuk jenis mikroalga bergerak seperti *Dunaliella sp*, maka selnya harus didiamkan terlebih dahulu dengan penambahan metanol ataupun formaldehid. Sebanyak $\pm 10 \mu\text{L}$ kultur diletakkan pada *Haemocytometer*, kemudian dihitung sel dengan bantuan mikroskop. Jika kepadatan sel menumpuk, maka dilakukan pengenceran terlebih dahulu.

3.3.4 Pemanenan Biomassa *Dunaliella sp*.

Setelah kultur mencapai fase stasioner pada hari ke-11, mikroalga dipanen menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm, 30 menit pada suhu 25°C.

Biomassa harus disimpan dalam kondisi tidak terpapar oleh cahaya dan oksigen. Hal ini untuk mencegah terjadinya oksidasi senyawa.

3.3.5 Ekstraksi dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Biomassa basah mikroalga sebanyak 17,3 gr diekstraksi secara ultrasonifikasi selama 15 menit menggunakan 150 ml pelarut aseton dan dilakukan pengulangan ekstraksi kembali. Kemudian hasil ekstraksi disaring untuk memisahkan residu dan filtrat ekstrak. Filtrat ekstrak diuapkan pelarutnya menggunakan penguap putar vakum. Ekstrak kasar yang diperoleh yaitu 756 mg. Selanjutnya ekstrak kasar ini diidentifikasi komponen senyawa xantofil menggunakan plat KLT dengan fase diam silika (SiO_2) dengan eluen kloroform : aseton (9:1).

3.3.6 Kromatografi Kolom

Ekstrak yang menunjukkan pemisahan terbaik senyawa xantofil, selanjutnya difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika (SiO_2) dengan eluen kloroform : aseton (9:1). Dan difraksinasi kembali dengan fase diam C_{18} dan eluen metanol 100 %. Fraksi positif xantofil di uji KLT dst, hingga diperoleh fraksi murni.

3.3.7 Karakterisasi dengan Spektroskopi

Fraksi murni dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis 400-500 nm dan spektrofotometer IR.