

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Analisis Elektrokimia Dengan Metode Voltammetri

Voltammetri merupakan salah satu teknik dalam analisis elektrokimia.

Voltammetri adalah elektrolisis dalam ukuran skala mikro dengan menggunakan mikro elektroda kerja, disebut juga teknik arus voltase. Potensial dari mikro elektroda kerja divariasikan dan arus yang dihasilkan dicetak sebagai fungsi dari potensial. Hasil cetakan ini disebut voltammogram. Voltammetri berkembang pesat dibandingkan dengan metode analisis lain, hal ini dikarenakan kelebihan dalam sensitifitas, selektifitas, kesederhanaan, dan kemudahan dalam melakukan analisis (Haryadi, 1993).

Voltammetri mempelajari hubungan voltase arus-waktu selama elektrolisis dilakukan dalam suatu sel, dimana suatu elektroda mempunyai luas permukaan yang relatif besar dan elektroda yang lain (elektroda kerja) mempunyai luas permukaan yang sangat kecil sehingga seringkali dirujuk sebagai mikro elektroda, lazimnya teknik ini mencakup pengkajian pengaruh perubahan voltase pada arus yang mengalir di dalam sel. Mikro elektroda ini biasanya dibuat dari bahan tak reaktif yang menghantar listrik seperti: emas, platinum atau karbon, dan dalam beberapa keadaan dapat digunakan suatu elektroda tetes merkuri (D.M.E), untuk kasus istimewa ini teknik itu dirujuk sebagai polarografi.

Voltammetri merupakan metoda elektrokimia yang mengamati perubahan arus dan potensial. Potensial divariasikan secara sistematis, sehingga zat kimia tersebut mengalami oksidasi dan reduksi di permukaan elektroda. Dalam voltammetri, salah satu elektroda pada sel elektrolitnya terpolarisasi. Proses pada sistem tersebut diikuti dengan kurva arus tegangan. Metode ini umum digunakan untuk menentukan komposisi dan analisis kuantitatif larutan (Liadler, 1996).

Dalam voltammetri digunakan tiga elektroda yang dicelupkan dalam larutan elektrolit. Yang pertama adalah elektroda kerja, elektroda ini memiliki berbagai bentuk dan ukuran tergantung penggunaannya. Biasanya berbentuk pelat kecil atau piringan kecil konduktor yang dipres dan diletakkan dalam batang (*rod*) material inert, misalnya teflon. Konduktor yang biasa digunakan adalah logam inert, seperti platina, emas, *glassy carbon* atau grafit, maupun logam yang dilapisi oleh raksa. Elektroda kerja berfungsi sebagai tempat terjadinya reaksi oksidasi atau reduksi, yang menunjukkan respon terhadap analit yang dianalisa. Elektroda kedua merupakan elektroda referensi (biasanya berupa kalomel jenuh atau Ag/AgCl), yang memiliki potensial tetap selama eksperimen berlangsung. Elektroda yang ketiga disebut elektroda pembantu. Elektroda ini berupa kawat platinum yang fungsinya untuk mengalirkan listrik yang berasal dari sumber sinyal melalui larutan menuju elektroda kerja (Skoog *et al.*, 1998).

Arus akan mengalir ketika potensial pada elektroda kerja cukup negatif untuk terjadinya reaksi reduksi, atau potensial cukup positif untuk terjadinya reaksi oksidasi. Pada potensial dimana arus mulai mengalir berhubungan dengan E_0

untuk tiap pasangan reaksi, hal ini disebut sinyal analitik kualitatif. Besarnya arus berhubungan dengan konsentrasi analit yang bereaksi pada elektroda, ini disebut sinyal analitik kuantitatif. Ada tiga mekanisme aliran arus yang muncul pada sistem, yaitu :

1. Konveksi, yaitu aliran arus yang disebabkan oleh pengadukan.
2. Migrasi, yaitu arus yang timbul akibat adanya tarik-menarik elektrostatik antara muatan elektroda dengan muatan ion-ion analit.
3. Difusi, yaitu aliran arus yang berhubungan dengan gradien konsentrasi.
Analit akan mengalir secara spontan dari daerah konsentrasi tinggi menuju ke konsentrasi rendah.

Arus konveksi dapat diminimalkan dengan cara menghilangkan pengadukan dan pengukuran dilakukan pada temperatur yang tetap. Arus migrasi tidak dapat dihindari, karena ketika arus mengalir, muatan harus dibawa melalui larutan. Jika suatu garam inert dengan konsentrasi tinggi ditambahkan dalam larutan, misalnya KCl, maka muatan akan dibawa oleh ion garam ini, sehingga arus migrasi dapat diminimalkan. Garam inert yang ditambahkan disebut elektrolit pendukung, harus memiliki konsentrasi 50 sampai 100 kali lebih tinggi dari konsentrasi analit. Arus yang berhubungan dengan reaksi analit adalah arus difusi (Kennedy, 1990). Pada potensial tertentu larutan elektrolit pendukung mengalami proses oksidasi-reduksi. Dengan adanya proses ini akan mempengaruhi voltammogram yang dihasilkan. Oleh karena itu, diperlukan daerah potensial tertentu untuk menghindari interferensi dari larutan elektrolit pendukung (Skoog *et al.*, 1998).

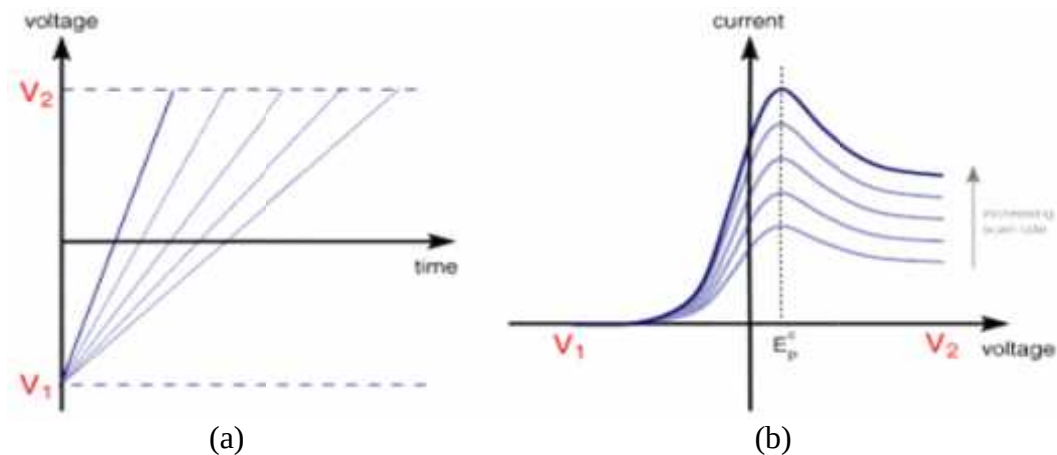
B. *Linear Sweep Voltammetry (LSV)*

Linear sweep voltammetry adalah istilah umum suatu teknik voltammetri dimana potensial yang diberikan pada elektroda kerja dengan variasi waktu linear. Metode ini juga mencakup polarografi, voltammetri siklik, dan voltammetri disk rotasi. *Slope* yang dihasilkan dari metode ini memiliki unit potensial (volt) per satuan waktu, biasanya disebut laju selusur percobaan. Nilai dari laju selusur percobaan dapat divariasikan dari tingkat rendah mV/detik (khusus untuk polarografi) sampai tingkat tinggi 1.000.000 V/detik (tercapai bila digunakan ultra mikro elektroda sebagai elektroda kerja). Dengan jalur linear potensial, arus faraday ditemukan untuk menaikkan laju selusur yang lebih tinggi.

Dalam voltammetri pemindaian linear (*linear sweep voltammetry, LSV*), pemindaian dilakukan dari batas potensial yang lebih rendah menuju yang lebih tinggi. Karakteristik *LSV* tergantung pada laju reaksi transfer elektron, reaktivitas kimia dari spesi-spesi elektroaktif, dan laju pemindaian potensial (Wang, 2001).

Pada *LSV*, potensial dari elektroda indikator bervariasi secara linear sebagai fungsi dari waktu. *Slope* yang dihasilkan dari metode ini memiliki unit potensial (volt) per satuan waktu, dan biasanya disebut scan rate percobaan. Tingkat pengukuran relatif lambat, yaitu < 5 mV/detik, yang memungkinkan waktu bagi analit untuk sampai ke elektroda sehingga elektroda selalu dalam kesetimbangan dengan larutan induk. *LSV* memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif. Nilai $E_{1/2}$ dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesi yang tidak diketahui,

sedangkan ketinggian dari arus dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi. Voltammogram *linear sweep* terdapat dalam Gambar 1 yang tercatat pada laju selusur tunggal.



Gambar 1. (a) Laju selusur tunggal dan (b) Voltammogram *linear sweep* (Andrienko, 2008).

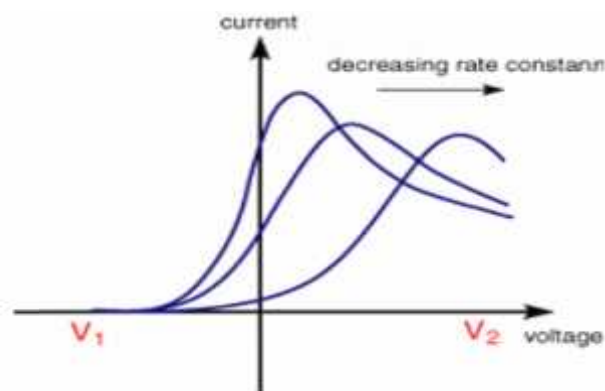
Gambar 1(a) menunjukkan laju selusur tunggal yang terjadi pada *linear sweep voltammetry* dengan potensial sebagai fungsi dari waktu dan gambar 1(b) merupakan voltammogram *linear sweep* dengan arus sebagai fungsi dari potensial (E_p). Karakteristik voltammogram *linear sweep* tergantung pada 2 faktor, yaitu:

1. Reaktivitas kimia dari spesi elektroaktif
2. Laju selusur tegangan

Dalam pengukuran LSV, respon arus diplotkan sebagai fungsi tegangan. Pemindaian dimulai dari sisi kiri arus / plot tegangan dimana belum adanya arus yang mengalir. Sepanjang jendela potensial, pemindaian lebih lanjut ke arah kanan (ke nilai yang lebih reduktif) dan arus mulai mengalir kemudian mencapai puncaknya. Untuk memberi alasan perilaku ini, perlu mempertimbangkan

pengaruh tegangan pada tetapan keseimbangan di permukaan elektroda. Laju transfer elektron dinilai cepat dalam perbandingan dengan laju pemindaian tegangan. Oleh karena itu, tetapan kesetimbangan pada sebuah permukaan elektroda identik dengan prediksi termodinamika.

Bentuk yang tepat dari voltammogram dapat dirasionalisasi dengan mempertimbangkan efek tegangan dan transportasi massa. Sebagai tegangan pemindaian awal dari V_1 , keseimbangan di permukaan mulai berubah dan mulai mengalir. Arus meningkat karena tegangan memindai jauh dari nilai awalnya sehingga posisi kesetimbangan bergeser lebih jauh ke arah kanan. Puncaknya terjadi, karena di beberapa titik lapisan difusi berada di atas elektroda sehingga fluks reaktan ke elektroda tidak cukup cepat untuk memenuhi persamaan Nernst. Dalam hal ini kondisi arus mulai turun sama seperti yang dilakukan dalam tahap pengukuran potensial. Gambar 2 menunjukkan serangkaian voltammogram *linear sweep* yang direkam pada laju selusur yang berbeda.



Gambar 2. Perubahan konstanta laju (Andrienko, 2008).

Gambar 2 menunjukkan laju selusur yang berbeda mempengaruhi perbedaan puncak potensial dan total meningkatnya arus bersamaan dengan meningkatnya

laju selusur. Hal ini dapat dirasionalkan dengan mempertimbangkan ukuran lapisan difusi dan waktu yang dibutuhkan untuk merekam laju. Jelas bahwa voltammogram *linear sweep* akan membutuhkan waktu lebih lama untuk merekam penurunan laju selusur. Oleh karena itu, ukuran lapisan difusi di atas permukaan elektroda akan berbeda tergantung pada laju selusur tegangan yang digunakan. Dalam pemindaian tegangan lambat, lapisan difusi akan bertambah jauh dari elektroda dibandingkan dengan pemindaian cepat. Akibatnya fluks pada permukaan elektroda jauh lebih kecil pada laju selusur lambat daripada laju selusur yang lebih cepat.

C. Validasi Metode

Validasi metode adalah suatu proses untuk mengkonfirmasi bahwa prosedur analisis yang dilakukan untuk pengujian tertentu sesuai dengan tujuan yang diharapkan. Validasi metode diperlukan untuk menilai kualitas, tingkat kepercayaan (*reliability*), dan konsistensi hasil analisis (Huber, 2001).

Laboratorium harus memvalidasi metode tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan, dan penegasan serta modifikasi dari metode baku untuk mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan (Hadi, 2007). Pemilihan parameter validasi tergantung pada beberapa faktor seperti: aplikasi, sampel uji, tujuan metode, dan peraturan lokal atau internasional. Parameter-parameter validasi meliputi ketepatan/akurasi,

ketelitian, spesifisitas, limit deteksi, limit kuantisasi, linearitas, rentang, *robustness*, dan *ruggedness* (ICH, 1996).

1. Ketepatan (*accuracy*)

Akurasi atau ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Ketepatan dapat juga menyatakan kedekatan dengan nilai yang dapat diterima, baik nilai sebenarnya maupun nilai pembandingan. Nilai benar dalam akurasi dapat diperoleh dengan beberapa cara. Salah satu alternatifnya adalah membandingkan hasil metode dengan hasil dari metode referensi yang sudah ditetapkan. Pendekatan ini mengasumsikan bahwa ketidakpastian metode referensi diketahui. Akurasi dapat dinilai dengan menganalisis sampel yang sudah diketahui konsentrasi (standar) dan membandingkan nilai terukur dengan nilai sebenarnya. Akurasi dapat menentukan adanya bias yang terdapat pada sampel dengan melakukan uji bias. Uji bias dapat diketahui dengan persamaan 1.

$$\mu - x_t = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

Keterangan :

μ : nilai benar dari referensi material
 x_t : rata-rata terukur referensi material
 t : nilai dari tabel t dengan tingkat kepercayaan yang diinginkan
 SD : simpangan baku
 n : jumlah pengulangan

Jika $\mu - x_t > \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$, maka ada bias terbukti. Begitu sebaliknya maka tidak ada bias hasil pengukuran (Nurhadi, 2012).

Akurasi juga dapat diketahui dengan melakukan uji perolehan kembali (*recovery*). Hasil uji akurasi ini dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan pada sampel. Perhitungan perolehan kembali dapat ditetapkan dengan persamaan 2 (Eurachem, 2014).

$$R (\%) = \frac{(\bar{x}' - \bar{x})}{X_{spike}} \times 100 \quad (2)$$

Keterangan:

$\bar{x}'$: konsentrasi rata-rata sampel yang ditambahkan standar
 $\bar{x}$: konsentrasi rata-rata sampel tanpa penambahan standar
 X_{spike} : konsentrasi standar yang ditambahkan ke dalam sampel

Rentang nilai penerimaan kecermatan suatu metode akan bervariasi sesuai kebutuhannya. Tabel 1 menjelaskan tentang data persentase *recovery* yang dapat diterima sesuai dengan konsentrasi analit.

Tabel 1. Persentase *recovery* yang dapat diterima sesuai dengan konsentrasi analit

(%) analit	Unit	Rata-rata <i>recovery</i> (%)
100	100%	98-102
10	10%	95-102
1	1%	97-103
0,1	0,10%	95-105
0,01	100 ppm	90-107
0,001	10 ppm	80-110
0,0001	1 ppm	80-110
0,00001	100 ppb	80-110
0,000001	10 ppb	60-115
0,0000001	1 ppb	40-120

(Sumber: AOAC, 2002).

2. Kecermatan (*precision*)

Presisi prosedur analisis menggambarkan kedekatan kesepakatan (derajat penyebaran) antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari beberapa pengambilan sampel homogen yang sama di bawah kondisi yang ditentukan. Presisi dapat dipertimbangkan pada tiga tingkatan, yaitu: pengulangan, presisi *intermediate*, dan reproduksibilitas. Simpangan baku, simpangan baku relatif (koefisien variasi), dan interval kepercayaan harus dilaporkan untuk penentuan nilai presisi (EMEA, 1995).

Cara yang terbaik untuk mengevaluasi ketelitian dari data analisis adalah dengan menghitung simpangan baku. Simpangan baku mengukur penyebaran data-data percobaan dan memberikan indikasi yang bagus mengenai seberapa dekat data tersebut satu sama lain (Nielsen, 2003). Simpangan baku dapat dihitung dengan persamaan 3.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

Cara lain untuk mengukur ketelitian adalah dengan menghitung nilai simpangan baku relatif (RSD). Nilai RSD ini merupakan nilai simpangan baku yang dinyatakan sebagai persentase dari rata-rata. RSD dapat dihitung dengan persamaan 4.

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan :

SD : simpangan baku
 x_i : nilai yang diperoleh setiap ulangan
 $\bar{x}$: nilai rata-rata
 RSD : simpangan baku relatif

3. Linearitas

Linearitas metode analisis menunjukkan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji, baik yang langsung maupun dengan definisi transformasi matematis yang baik, proporsional dengan konsentrasi analit dalam sampel pada range tertentu. Linearitas dapat diuji secara informal dengan membuat plot residual yang dihasilkan oleh regresi linear pada respon konsentrasi dalam satu seri kalibrasi (Thompson, 2002). Dalam penentuan linearitas, sebaiknya menggunakan minimum lima konsentrasi. Rentang penerimaan linearitas tergantung dari tujuan pengujian. Nilai koefisien korelasi yang memenuhi persyaratan adalah sebesar $\geq 0,99970$ (ICH, 1996), $\geq 0,97$ (SNI), $\geq 0,9980$ (AOAC, 2002), atau $\geq 0,99$ (EMEA, 1995).

4. Batas Deteksi

Batas deteksi merupakan jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak harus kuantitatif sebagai nilai yang pasti (EMEA, 1995). Batas deteksi (LOD) dapat ditentukan dengan persamaan 5.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD} \quad (5)$$

Keterangan :

LOD : batas deteksi (*limit of detection*)
 SD : simpangan baku hasil pengukuran (Eurachem, 2014).

D. Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang diperlukan tubuh untuk menangkap radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan dalam tubuh bermanfaat untuk mencegah reaksi oksidasi yang ditimbulkan oleh radikal bebas baik berasal dari metabolisme tubuh maupun faktor eksternal lainnya (Kikuzaki and Nakatani, 1993).

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi 2, yaitu:

1. antioksidan enzimatis
2. antioksidan non enzimatis yang berupa mikronutrien.

Antioksidan enzimatis dapat dibentuk dalam tubuh, seperti *super oksida dismutase* (SOD), *glutation peroksida*, katalase, dan *glutation reduktase*.

Sedangkan antioksidan non enzimatis yang berupa mikronutrien masih dibagi dalam 2 kelompok lagi, yaitu:

1. Antioksidan larut lemak, seperti: tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirium
2. Antioksidan larut air, seperti: asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Berdasarkan fungsinya, antioksidan dapat dibagi menjadi 4 tipe, yaitu:

1. Tipe pemutus rantai reaksi pembentuk radikal bebas, dengan menyumbangkan atom H, misalnya vitamin E
2. Tipe pereduksi, dengan mentransfer atom H atau oksigen, atau bersifat *scavenger*, misalnya asam askorbat
3. Tipe pengikat logam, mampu mengikat zat peroksidan, seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} , misalnya flavonoid
4. Antioksidan sekunder, mampu mendekomposisi hidroperoksida menjadi bentuk stabil, pada manusia dikenal *super oksida dismutase* SOD, katalase, dan *glutation peroksidase* (Hariyatmi, 2004).

E. Radikal Bebas

Secara teoritis radikal bebas adalah bahan kimia yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya, sehingga berusaha melengkapi dengan 2 cara, yaitu:

1. Menambah atau mengurangi elektron untuk mengisi maupun mengosongkan lapisan luarnya
2. Membagi elektron-elektronnya dengan cara bergabung bersama atom yang lain dalam rangka melengkapi lapisan luarnya.

Radikal bebas sangat reaktif dan mudah bereaksi dengan berbagai molekul lain, seperti protein, lemak, karbohidrat, dan DNA. Radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama dan segera berikatan dengan bahan sekitarnya, dengan cara menyerang molekul stabil yang terdekat dan mengambil elektron, zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas

juga sehingga akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya dapat merusak sel. Radikal bebas dapat terbentuk secara in-vivo dan in-vitro dengan 3 cara, yaitu:

1. Pemecahan satu molekul normal secara homolitik menjadi dua, ini memerlukan tenaga yang tinggi dari sinar ultraviolet, panas, dan radiasi ion
2. Kehilangan satu elektron dari molekul normal
3. Penambahan elektron pada molekul normal.

Radikal bebas terpenting adalah kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species*/ROS), termasuk didalamnya adalah triplet ($3O_2$), tunggal (singlet/ 1O), anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$), radikal hidroksil ($OH^{\bullet-}$), nitrit oksida ($NO^{\bullet-}$), peroksinitrit (ONOO), asam hipoklorus (HOCl), hidrogen peroksida (H_2O_2) radikal alkosil ($LO^{\bullet-}$), dan radikal peroksil ($LO^{\bullet-2}$). Radikal bebas yang mengandung karbon ($CCl_3^{\bullet-}$) yang berasal dari oksidasi radikal molekul organik dan radikal hidrogen hasil dari penyerangan atom H ($H^{\bullet-}$). Bentuk lain adalah radikal sulfur yang diproduksi pada oksidasi glutathione menghasilkan radikal thiyl ($RS^{\bullet-}$), radikal yang mengandung nitrogen, dan radikal fenyl diazin (Inoue, 2001; Albina and Reichner, 1998).

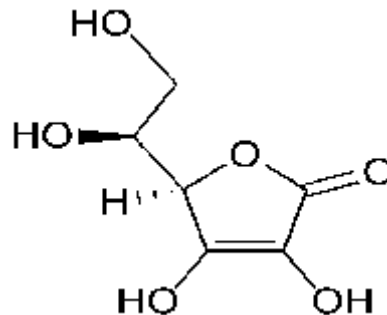
F. Asam askorbat

Asam askorbat adalah salah satu zat gizi yang berperan sebagai antioksidan dan efektif mengatasi radikal bebas yang dapat merusak sel atau jaringan, termasuk melindungi lensa dari kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh radiasi (Taylor, 1993). Berdasarkan kelarutannya asam askorbat termasuk antioksidan hidrofilik

dimana tidak terakumulasi dalam tubuh tetapi diekskresikan dengan cepat.

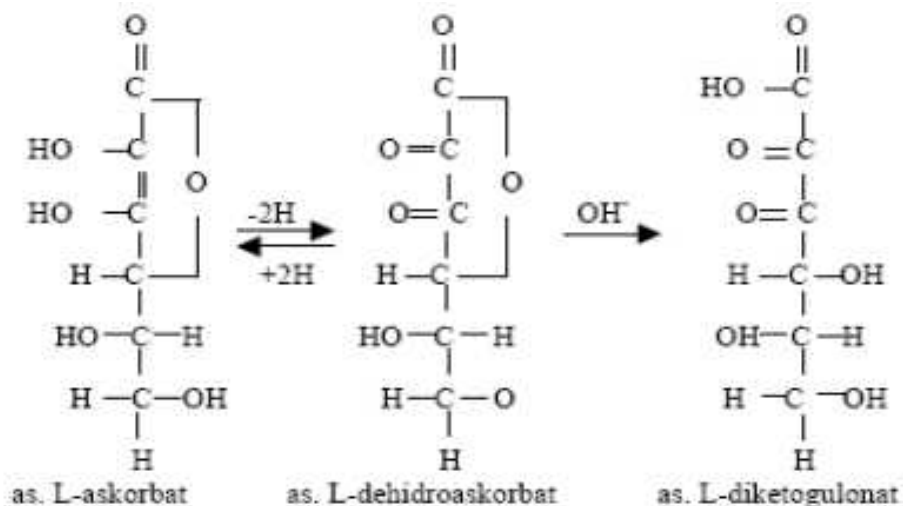
Asam askorbat (*L-ascorbic acid*) merupakan vitamin yang bersifat larut dalam air dan sangat efektif sebagai antioksidan penting dalam cairan ekstraseluler.

Asam askorbat sangat efisien dalam menangkap beberapa senyawa seperti superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksi dan radikal peroksil (Sies and Stahl, 1995). Asam askorbat mudah sekali terdegradasi oleh cahaya, temperatur, dan udara yang menyebabkan penurunan kadar asam askorbat. Struktur asam askorbat mirip dengan struktur monosakarida, tetapi mengandung gugus enediol seperti yang disajikan pada Gambar 3. Pada asam askorbat terdapat gugus enediol yang berfungsi dalam sistem pemindahan hidrogen yang menunjukkan peranan penting dari vitamin ini.



Gambar 3. Formula struktur kimia dari asam askorbat (Hadi, 2011)

Asam askorbat mudah dioksidasi menjadi bentuk L-dehidroaskorbat, keduanya secara fisiologis aktif dan ditemukan di dalam tubuh. Mekanisme oksidasi asam askorbat disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Mekanisme oksidasi asam askorbat (Winarno, 1984).

Pada Gambar 4 merupakan mekanisme oksidasi asam askorbat. Asam askorbat dapat dioksidasi menjadi asam L-dehidroaskorbat terutama jika terpapar cahaya, pemanasan, dan suasana alkalis. Asam L-dehidroaskorbat secara kimia sangat labil dan mengalami perubahan lebih lanjut menjadi asam L-diketogulonat yang tidak memiliki keaktifan sebagai asam askorbat lagi (Thurnham *et al.*, 2000).

G. Mikroalga

Mikroalga merupakan organisme perairan atau lebih dikenal dengan fitoplankton (alga laut bersel tunggal). Organisme ini dapat melakukan fotosintesis dan hidup dari nutrien anorganik serta menghasilkan zat-zat organik dari CO₂ oleh fotosintesis. Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen) klorofil yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H₂O, CO, dan sinar matahari untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan pertambahan sel, bergerak atau berpindah, dan reproduksi (Pranayogi, 2003). Mikroalga dapat tumbuh dimana saja, baik di

ekosistem perairan maupun di ekosistem darat. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga, diantaranya faktor abiotik (cahaya matahari, temperatur, nutrisi, O_2 , CO_2 , pH, salinitas), faktor biotik (bakteri, jamur, virus, dan kompetisi dengan mikroalga lain), dan faktor teknik cara pemanenan. Mikroalga dapat tumbuh dengan sangat cepat pada kondisi iklim yang tepat. Umumnya, mikroalga menduplikasikan diri dalam jangka waktu 24 jam atau bahkan 3,5 jam selama fasa pertumbuhan eksponensial (Chisti, 2007).

1. Faktor-faktor Pertumbuhan Mikroalga

a. Unsur Hara

Unsur hara yang dibutuhkan mikroalga terdiri atas unsur hara makro (N, P, K, S, Fe, Mg, Si, dan Ca) dan unsur hara mikro (Mn, Zn, Co, Bo, Mo, B, Cu, dan lain-lain). Setiap unsur hara mempunyai fungsi-fungsi khusus yang ditunjukkan pada pertumbuhan dan kepadatan yang dicapai. Unsur N, P, dan S penting untuk pembentukan protein. Nitrogen yang dibutuhkan untuk media kultur dapat diperoleh dari KNO_3 , $NaNO_3$, $NHCl$, dan lain-lain. Fosfor juga merupakan bahan dasar pembentuk asam nukleat, enzim, dan vitamin. Unsur fosfor dapat diperoleh dari KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Ca_3PO_4 dan unsur sulfur dapat diperoleh dari NH_4SO_4 , $CuSO_4$ (Tjahjo dkk., 2002). Unsur K berfungsi dalam metabolisme karbohidrat dan juga sebagai kofaktor untuk beberapa koenzim. Unsur kalium dapat diperoleh dari KCl , KNO_3 , KH_2PO_4 . Unsur Fe berperan dalam pembentukan klorofil dan sebagai komponen esensial dalam proses oksidasi. Unsur ini dapat diperoleh dari $FeCl_4$, $FeSO_4$, $FeCaH_5O$. Unsur Si dan

Ca merupakan bahan untuk pembentukan dinding sel atau cangkang. Vitamin B₇ banyak digunakan untuk memacu pertumbuhan melalui rangsangan fotosintetik (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Unsur hara mikro dibutuhkan untuk menjalankan berbagai fungsi dalam pertumbuhan mikroalga, misalnya Mn dan Zn diperlukan untuk fotosintesis, unsur Mo, Bo, Co diperlukan untuk metabolisme nitrogen, serta unsur Mn, B, Cu untuk fungsi metabolik lainnya (Krisanti, 2003). Unsur hara mikro dibutuhkan dalam jumlah kecil tetapi harus ada dan untuk menstabilkan fungsi hara mikro biasanya ditambahkan senyawa sitrat atau EDTA (Kabinawa, 1994).

b. Cahaya

Mikroalga merupakan organisme autotrof yang mampu membentuk senyawa organik dari senyawa anorganik melalui proses fotosintesis. Keberadaan cahaya menentukan bentuk kurva pertumbuhan bagi mikroalga yang melakukan fotosintesis. Cahaya matahari dapat diganti dengan sinar lampu TL dan kisaran optimum intensitas cahaya bagi mikroalga antara 2000-8000 lux. Pada mikroalga hijau, pigmen yang menyerap cahaya adalah klorofil a, disamping pigmen lain seperti karotenoid dan xantofil (Tjahjo dkk., 2002).

c. Suhu

Suhu secara langsung mempengaruhi efisiensi fotosintesis dan faktor yang menentukan dalam pertumbuhan. Pada kondisi laboratorium, perubahan suhu air dipengaruhi oleh temperatur ruangan dan intensitas cahaya. Suhu optimum

untuk kultur mikroalga di laboratorium antara 25-32 °C (Fogg, 1975). Kenaikan temperatur akan meningkatkan kecepatan reaksi. Umumnya setiap kenaikan 10 °C dapat mempercepat reaksi 2-3 kali lipat. Akan tetapi, temperatur tinggi yang melebihi temperatur maksimum akan menyebabkan proses metabolisme sel terganggu.

d. pH

Proses fotosintesis mengambil karbondioksida terlarut dari dalam air, yang berakibat penurunan kandungan CO terlarut di air. Penurunan ini akan meningkatkan pH berkaitan dengan kesetimbangan CO₂ terlarut, bikarbonat (HCO³⁻), dan ion karbonat (CO₃²⁻) dalam air. Oleh karena itu, laju fotosintesis akan terbatas oleh penurunan karbon dalam hal ini karbondioksida (Krisanti, 2003). Umumnya pH optimum bagi pertumbuhan mikroalga adalah 8-8,5.

e. Salinitas

Fluktuasi salinitas secara langsung menyebabkan perubahan tekanan osmosis di dalam sel mikroalga. Salinitas yang tinggi atau rendah dapat menyebabkan tekanan osmosis di dalam sel juga menjadi lebih rendah atau lebih tinggi, sehingga aktivitas sel menjadi terganggu. Hal ini dapat mempengaruhi pH sitoplasma sel dan menurunkan kegiatan enzim di dalam sel. Salinitas optimum bagi pertumbuhan mikroalga antara 25-35 ‰ (Tjahjo dkk., 2002).

f. Aerasi

Aerasi dibutuhkan untuk mencegah terjadinya sedimentasi pada sistem kultivasi mikroalga, selain itu juga untuk memastikan bahwa semua sel mikroalga mendapat cahaya dan nutrisi yang sama, untuk menghindari stratifikasi suhu dan tercampurnya air dengan suhu berbeda, terutama pada kultivasi di luar laboratorium, dan untuk meningkatkan pertukaran cahaya antara medium kultivasi dan udara. Udara merupakan sumber karbon untuk fotosintesis dalam bentuk karbon dioksida (CO_2). Untuk kultivasi yang sangat padat, CO_2 yang berasal dari udara (0,003% CO_2) tidak mencukupi bagi pertumbuhan optimal mikroalga, sehingga perlu ditambahkan dengan CO_2 murni (rata-rata 1% dari volume udara). Penambahan CO_2 selanjutnya menjadi pH buffer sebagai hasil dari kesetimbangan gas karbon dioksida (CO_2) dan asam karbonat (HCO_3). Gas CO_2 yang masuk ke perairan akan berubah bentuk menjadi asam karbonat (HCO_3) bergantung dari derajat keasaman (pH) air. Derajat keasaman yang optimum dapat melarutkan CO_2 adalah pada kisaran 6,5-9,5. Jika pH di bawah kisaran tersebut, maka karbon dioksida tetap berbentuk CO_2 , artinya dapat cepat lepas ke atmosfer sehingga tidak terserap oleh mikroalga. Sebaliknya, apabila kondisi pH di atas kisaran tersebut, maka CO_2 menjadi bikarbonat yang tidak dapat diserap oleh mikroalga. Perlu diperhatikan, bahwa tidak semua alga dapat mentoleransi aerasi yang kuat, karena proses pengadukan yang terlalu kencang dapat mengakibatkan rusaknya sel mikroalga sehingga mikroalga menjadi mati.

2. Pola Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Pertumbuhan mikroalga dalam kultur sangat dipengaruhi oleh kondisi aerasi, cahaya, nutrisi, dan suhu. Pertumbuhan mikroalga dibagi dalam lima fase pertumbuhan, yaitu: fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian (Fogg, 1975).

a. Fase Lag

Fase ini disebut juga sebagai fase adaptasi, karena sel mikroalga sedang beradaptasi terhadap media tumbuhnya. Fase ini ditandai dengan peningkatan populasi yang tidak nyata. Lamanya fase lag tergantung pada umur inokulum yang dimasukkan. Sel-sel yang diinokulasikan pada awal fase log akan mengalami fase lag yang singkat. Inokulum yang berasal dari kultur yang sudah tua akan mengalami fase lag yang lama, karena membutuhkan waktu untuk menyusun enzim-enzim yang tidak aktif. Ukuran sel pada fase lag ini pada umumnya meningkat. Organisme mengalami metabolisme, tetapi belum terjadi pembelahan sel sehingga kepadatan sel belum meningkat.

b. Fase Logaritmik atau Eksponensial

Pada fase ini akan diawali dengan pembelahan sel dan ditandai dengan naiknya laju pertumbuhan hingga kepadatan populasi meningkat. Laju pertumbuhannya meningkat dengan pesat dan selnya aktif berkembang biak. Ciri metabolisme

pada fase ini adalah tingginya aktivitas fotosintesis yang berguna untuk pembentukan protein dan komponen-komponen penyusun plasma sel yang dibutuhkan dalam pertumbuhan.

c. Fase Penurunan Laju Pertumbuhan

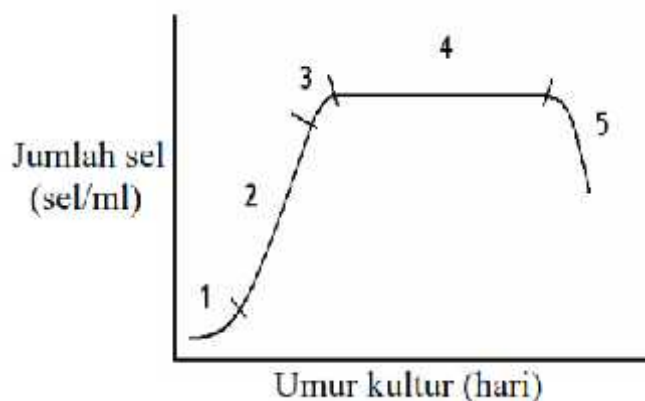
Fase ini ditandai dengan penurunan laju pertumbuhan. Selain itu, terjadi penurunan pertumbuhan populasi per satuan waktu bila dibandingkan dengan fase eksponensial sehingga fase ini disebut juga fase *decline*.

d. Fase Stasioner

Pada fase ini, pertumbuhan mikroalga mengalami penurunan dibandingkan fase logaritmik. Laju reproduksi sama dengan laju kematian. Dengan demikian penambahan dan pengurangan jumlah mikroalga relatif sama atau seimbang sehingga kepadatannya tetap. Jumlah sel cenderung tetap diakibatkan sel telah mencapai titik jenuh.

e. Fase Kematian

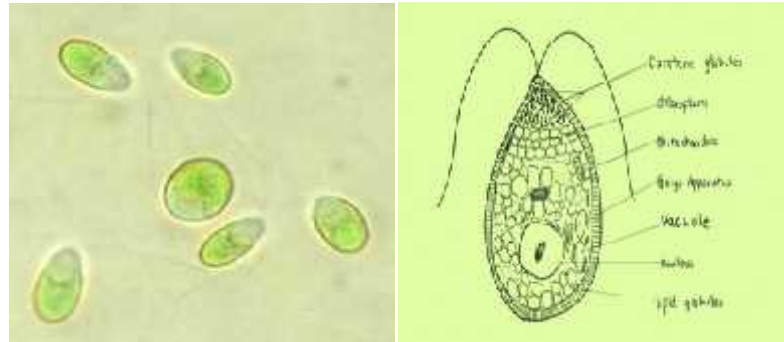
Pada fase ini, kepadatan populasi sel mikroalga terus berkurang, sedangkan proses pertumbuhan mikroalga, secara skematik disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Proses skematik pertumbuhan mikroalga pada: 1. fase lag, 2. fase logaritmik, 3. fase penurunan laju pertumbuhan, 4. fase stasioner, 5. fase kematian (Fogg, 1975).

H. *Dunaliella* sp.

Secara morfologi, *Dunaliella* sp. merupakan mikroalga yang bersifat uniseluler, mempunyai sepasang flagella yang sama panjangnya, sebuah kloroplas berbentuk cangkir, dan tidak memiliki dinding sel (Borowitzka and Borowitzka, 1988). *Dunaliella* sering juga disebut sebagai flagellata uniseluler hijau (*green unicellulair flagellate*). Bentuk selnya juga tidak stabil dan beragam, dapat berbentuk lonjong, bulat silindris, dan ellip seperti pada Gambar 6. Hal ini sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, pertumbuhan, dan intensitas sinar matahari (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). *Dunaliella* memiliki kisaran toleransi pH mulai dari pH 1 (*Dunaliella acidophila*) sampai pH 11 (*Dunaliella salina*), sedangkan kisaran toleransi suhu, mulai dari -35 °C sampai 40 °C (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Spesies *Dunaliella* sp. dapat tumbuh optimal pada pH 6-6,5 dan kisaran suhu antara 22-25 °C dengan salinitas air 30-35 ‰ (Tjahjo dkk., 2002).



Gambar 6. *Dunaliella* sp. (Seambiotic, 2008).

Gambar 6 merupakan *Dunaliella* sp. serta bagian-bagian selnya yang terdiri dari *carotene globules*, *chloroplasts*, *mitokondria*, *vacuole*, *nucleus*, dan *lipid globules*. *Dunaliella* diketahui memiliki aktivitas antioksidan, karena kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar karotenoid, digunakan dalam kosmetik dan suplemen makanan. *Dunaliella* termasuk kelompok Chlorophyceae (alga hijau) yang mengandung klorofil a dan b serta karotenoid yang umumnya berupa β -karoten (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Untuk bertahan hidup, organisme ini memiliki konsentrasi β - karoten yang tinggi untuk melindungi terhadap cahaya yang kuat dan konsentrasi gliserol yang tinggi untuk memberikan perlindungan terhadap tekanan osmotik. Adapun klasifikasi ilmiah *Dunaliella* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi ilmiah *Dunaliella* sp.

Tingkatan	Klasifikasi
Kingdom	<i>Plantae</i>
Phylum	Chlorophyta
Kelas	Chlorophyceae
Ordo	Volvocales
Family	Polyblepharidaceae
Genus	<i>Dunaliella</i>

(Sumber: Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

I. Pemanenan Mikroalga *Dunaliella* sp. dengan Metode Sentrifugasi

Pemanenan bertujuan untuk menyediakan stok biomasa dari mikroalga untuk tahap ekstraksi. Salah satu metode yang biasa dilakukan untuk pemanenan mikroalga adalah sentrifugasi. Sentrifugasi merupakan proses pemisahan yang menggunakan gaya sentrifugal sebagai *driving force* untuk memisahkan padatan dan cairan. Proses pemisahan ini didasarkan pada ukuran partikel dan perbedaan densitas dari komponen yang akan dipisahkan. Proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi secara efektif dapat memisahkan mikroalga dari cairan medianya. Tes laboratorium pada 500-1000 gr hasil kultivasi mikroalga dalam *pond* menunjukkan 80 - 90% mikroalga dapat dipisahkan dalam waktu 2-5 menit. Walaupun proses sentrifugasi efektif digunakan secara teknis, proses ini juga memiliki kelemahan terutama pada investasi alat dan biaya operasional yang tinggi (Chen *et al.*, 2011).

J. Freeze-Dry

Biomassa alga yang tersisa setelah pemanenan dapat dikeringkan untuk memperpanjang masa kadaluarsa biomassa. Metode pengeringan yang digunakan untuk mikroalga termasuk *sun drying*, *drum drying*, *spray drying*, dan *freeze-drying*. Penggunaan metode *sun drying* pada sampel *Dunaliella* dapat mengakibatkan β -karoten lebih cepat terdegradasi. Sebaliknya, *drum drying*, *spray drying*, dan *freeze-drying* memberikan hasil yang memuaskan dalam hal stabilitas karotenoid (Ben-Amotz *et al.*, 1988). *Freeze-drying* paling cocok

digunakan untuk skala laboratorium dibandingkan dengan *spray drying*, karena dapat menghasilkan pemulihan karotenoid yang lebih tinggi.

Prinsip metode *freeze-drying* adalah pengeringan suspensi sel dari fase cair dengan cara sublimasi melalui proses pembekuan terlebih dahulu. Proses *freeze-drying* dibagi ke dalam tiga tahap, yaitu:

- a. Tahap pertama, yaitu proses pembekuan.
- b. Tahap kedua, yaitu proses pengeringan primer melalui proses sublimasi pada suhu rendah, sehingga menyebabkan sebagian besar air tertarik dari suspensi beku sel.
- c. Tahap ketiga, yaitu proses pengeringan sekunder pada suhu yang lebih tinggi dengan tujuan mengeringkan sisa air (Matejtschuk, 2007).

K. Ekstraksi *Dunaliella* sp. dengan Ultrasonikasi

Metode ultrasonik adalah metode yang menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz (Suslick, 1988). Ultrasonik bersifat *non-destructive* dan *non-invasive*, sehingga dapat dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi (McClements, 1995). Manfaat metode ekstraksi ultrasonik adalah untuk mempercepat proses ekstraksi (Kuldiloke, 2002). Hal ini dibuktikan dengan penelitian tentang ekstraksi pati jagung yang menyebutkan rendemen pati jagung yang didapat dari proses ultrasonik selama 2 menit adalah sekitar 55,2-67,8 % hampir sama dengan rendemen yang didapat dari pemanasan dengan air selama 1 jam yaitu 53,4% (Cameron and Wang, 2006). Dengan penggunaan ultrasonik proses ekstraksi

senyawa organik pada tanaman dan biji-bijian dengan menggunakan pelarut organik dapat berlangsung lebih cepat. Dinding sel dari bahan dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah (Mason,1990).

Cara kerja metode ultrasonik dalam mengekstraksi yaitu dengan memanfaatkan gelombang ultrasonik yang terbentuk dari pembangkitan ultrason secara lokal dari kavitasi mikro pada sekeliling bahan yang akan diekstraksi sehingga terjadi pemanasan pada bahan tersebut, sehingga melepaskan senyawa ekstrak (Liu *et al.*, 2010). Terdapat efek ganda yang dihasilkan, yaitu pengacauan dinding sel sehingga membebaskan kandungan senyawa yang ada di dalamnya dan pemanasan lokal pada cairan serta meningkatkan difusi ekstrak (Keil, 2007).