

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014 sampai bulan Juni 2015 di UPT. Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas merk pyrex (labu ukur ukuran 25 mL 1 buah, labu ukur ukuran 5 mL 9 buah, labu ukur ukuran 10 mL 3 buah, pipet ukur ukuran 1mL 1 buah dan ukuran 2 mL 1 buah, pipet tetes, erlenmeyer ukuran 250 mL, 500 mL, 1 L, dan 2 L), neraca analitik (merk Wiggan Housser), aerator, lampu neon, *Haemocytometer*, autoklaf (merk Tomy SX-700), sentrifugasi (merk CAX-370), *freeze dryer* (merk Scanvic), alat pembuat *aquapure* (TKA smart2pure), ultrasonifikasi (merk Mujigae), serta seperangkat alat potensiostat (eDAQ Pty Ltd) yang terdiri dari elektroda kerja *glassy carbon*, elektroda referensi Ag/AgCl, elektroda bantu platina, dan sel elektrokimia berukuran 2,5 mL.

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam askorbat murni (merck KGaA, Darmstadt Germany), bibit *Dunaliella* sp., *aquapure water*, air

laut, alkohol 70%, etanol teknis, gas nitrogen, elektrolit pendukung NaCl 0,1 M, media Conwy, tisu, dan alumunium foil.

C. Prosedur Penelitian

1. Kultivasi *Dunaliella* sp.

Mikroalga *Dunaliella* sp. diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung. *Dunaliella* sp. dikultivasi dalam media kultur Conwy. Kultivasi dilakukan pada erlen meyer ukuran 250 mL, 500 mL, 1 L, dan 2 L dengan intensitas cahaya 3000 Lux, salinitas 10 Be, suhu 25-35°C, dan pH 8-8,5. Kepadatan awal sel dihitung menggunakan *haemocytometer*. Komposisi media Conwy disajikan dalam Tabel 3

Tabel 3. Komposisi media Conwy

No	Bahan Kimia	Jumlah
1	NaNO ₃ / KNO ₃	10 gram
2	Na ₂ EDTA	4,5 gram
3	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,15 gram
4	MnCl ₂	0,036 gram
5	H ₂ BO ₃	3,36 gram
6	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,0 gram
7	Logam renik	0,1 mL
8	Vitamin	0,1 mL
9	Akuades	hingga 100 mL

(Sumber: Pujiastuti dkk., 2010).

Dalam media Conwy terdapat komposisi logam renik yang disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kandungan logam renik pada media Conwy

No.	Bahan Kimia	Berat	Pelarut	Volume
1	ZnCl ₂	2,1 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL
2	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL
3	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL
4	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,9 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL

(Sumber: Pujiastuti dkk., 2010).

2. Pengukuran Kepadatan Sel dengan Metode *Haemocytometer*

Kultur sel *Dunaliella* sp dalam tiap wadah diambil sebanyak 10 µL, diencerkan dengan 90 µL air laut, dan ditambahkan 20 µL etanol teknis kemudian ditetaskan ke *haemocytometer* untuk dilakukan perhitungan kepadatan selnya (Lampiran 1). Kepadatan populasi sel yang dihasilkan dalam skala waktu dapat ditentukan dengan menggunakan alat *haemocytometer*. Cara penggunaan *haemocytometer* ini yaitu dengan cara meneteskan kultur sel *Dunaliella* sp. yang akan dianalisa kepadatan selnya sebanyak satu tetes ke masing-masing dua bagian *haemocytometer*. Tutup dengan menggunakan slide. *Haemocytometer* ini dilengkapi dengan mikroskop. *Haemocytometer* yang telah diberikan kultur sel *Dunaliella* sp. diletakkan di bawah lensa objektif dan difokuskan hingga terlihat kisi-kisi tempat perhitungan sel yang terdiri dari lima kisi perhitungan.

3. Pemanenan *Dunaliella* sp.

Pemanenan dilakukan pada fase stasioner yang diketahui dari kurva pertumbuhan mikroalga *Dunaliella* sp. (Lampiran 1) menggunakan teknik sentrifugasi.

Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C, kecepatan 8500 rpm, selama 15 menit.

Filtrat hasil sentrifugasi yang mengandung eksopolisakarida ditampung untuk kemudian dianalisis menggunakan potensiostat dan biomassa *Dunaliella* sp. yang diperoleh kemudian ditimbang dan diekstraksi menggunakan pelarut *aquapure water*.

4. *Freeze-Dry*

Biomassa basah *Dunaliella* sp. yang telah dipanen, kemudian dikeringkan dengan metode *freeze-dry*. Sampel divakum pada suhu -108°C, selama 2-3 hari hingga diperoleh biomassa kering.

5. Ekstraksi Biomassa Kering *Dunaliella* sp.

Ekstraksi biomassa kering *Dunaliella* sp. menggunakan metode ultrasonikasi.

Sebanyak 0,5 gram biomassa kering *Dunaliella* sp. dilarutkan dengan *aquapure water* dalam labu ukur 10 mL, kemudian diultrasonikasi menggunakan alat ultrasonik. Setelah diekstraksi dengan ultrasonik, larutan disaring dan diambil ekstraknya.

6. Pembuatan Larutan Blangko

Larutan blangko dibuat dengan mencampurkan 2 mL *aquapure water* dan 1 mL elektrolit pendukung NaCl 0,1 M. Larutan blangko dibuat duplo yaitu tanpa dan dengan kandungan oksigen. Larutan blangko tanpa oksigen dibuat dengan cara dijenuhkan dengan gas nitrogen selama 5 menit.

7. Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat Murni

a. Pembuatan Stok Larutan Standar

Larutan stok asam askorbat dibuat dengan konsentrasi 2,5 mM. Pembuatan larutan stok dilakukan dengan menimbang 0,011 gram asam askorbat ($M_r = 176,12$) kemudian dilarutkan dengan *aquapure water* ke dalam labu ukur 25 mL, diencerkan sampai tanda batas labu ukur (Lampiran 2).

b. Pembuatan Larutan Kerja Standar

Larutan kerja standar asam askorbat murni dibuat dengan mengencerkan larutan stok asam askorbat 2,5 mM. Variasi konsentrasi larutan kerja yang dipakai yaitu (mM): blangko; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1. Data pengenceran larutan kerja standar asam askorbat disajikan pada Tabel 5 dan perhitungannya terdapat pada Lampiran 2.

Tabel 5. Data pengenceran larutan kerja standar asam askorbat

Standar	V ₁ (mL)	M ₁ (mM)	V ₂ (mL)	M ₂ (mM)
0	0	2,5	5	0
1	0,2	2,5	5	0,1
2	0,4	2,5	5	0,2
3	0,6	2,5	5	0,3
4	0,8	2,5	5	0,4
5	0,9	2,5	5	0,5
6	1,0	2,5	5	0,6
7	1,2	2,5	5	0,7
8	1,4	2,5	5	0,8
9	1,8	2,5	5	0,9
10	2,0	2,5	5	1,0

8. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan teknik *linear sweep voltammetry*. Seperangkat alat potensiostat terdiri dari sel elektrokimia berukuran 2,5 mL dan tiga buah elektroda yaitu elektroda kerja *glassy carbon*, elektroda referensi Ag/AgCl, dan elektroda bantu Platina. Ketiga jenis elektroda tersebut dilakukan *polishing* sebelum pengukuran voltammetri dilakukan. Elektroda kerja dihubungkan pada kabel berwarna hijau, elektroda acuan dihubungkan pada kabel berwarna kuning, dan elektroda bantu dihubungkan pada kabel berwarna merah. Alat diatur dengan beberapa kondisi pengukuran reduksi oksigen dan oksidasi asam askorbat yang disajikan pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel 6. Kondisi pengukuran reduksi oksigen

Parameter	Keterangan
Mode	Linear
Initial E	0 mV
Final E	-1000 mV
Rate	100 mV/detik
Range arus	10 μ A

Tabel 7. Kondisi pengukuran oksidasi asam askorbat

Parameter	Keterangan
Mode	Linear
Initial E	0 mV
Final E	1000 mV
Rate	100 mV/detik
Range arus	10 μ A

Larutan standar dan larutan sampel yang sudah disiapkan, masing-masing dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam wadah (sel elektrokimia) berukuran 2,5 mL kemudian ditambahkan 1 mL elektrolit pendukung NaCl 0,1 M. Wadah ditutup rapat kemudian dilakukan pengukuran. Pengukuran larutan blangko tanpa oksigen akan dihasilkan arus yang dinyatakan sebagai nilai arus residual (I_{res}).

Pengukuran larutan blangko yang mengandung oksigen akan menghasilkan arus yang dinyatakan sebagai nilai limit arus oksigen (I_{or}). Pengukuran larutan standar antioksidan dilakukan dari konsentrasi terendah ke konsentrasi tertinggi, kemudian dilanjutkan dengan pengukuran larutan sampel. Data yang diperoleh berupa arus reduksi oksigen dengan potensial reduksi oksigen sekitar -850 mV.

Hasil *output* alat potensiostat adalah voltammogram (potensial vs arus).

Kemudian dibuat kurva konsentrasi antioksidan terhadap perubahan relatif

densitas arus reduksi oksigen. Koefisien aktivitas antioksidan (K) ditentukan dengan rumus:

$$K = \frac{\Delta j}{(j_{or} - j_{res}) \Delta c}$$

Keterangan:

- Δj : perubahan densitas arus reduksi oksigen
- j_{or} : densitas arus limit dari reduksi oksigen tanpa antioksidan (blangko)
- j_{res} : densitas arus residual tanpa oksigen
- Δc : perubahan konsentrasi antioksidan

9. Validasi Metode

a. Linieritas

Penentuan linieritas dilakukan dengan pengukuran 10 larutan standar asam askorbat. Masing-masing larutan standar dilakukan pengukuran sebanyak 1 kali. Pengukuran dilakukan dari konsentrasi asam askorbat terendah hingga konsentrasi asam askorbat tertinggi. Catat arus radikal anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) hasil pengukuran masing-masing larutan standar. Kemudian dibuat grafik hasil pengukuran larutan standar tersebut dan ditentukan koefisien regresi, kurva konsentrasi antioksidan terhadap respon arus (i_{red}).

b. Presisi

Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis larutan sampel yang sama pada hari yang sama. Larutan sampel dibagi menjadi 3 bagian. Masing-masing larutan sampel dianalisis sebanyak satu kali. Dibuat grafik antara arus hasil pengukuran

dan konsentrasi antioksidan. Kemudian tentukan rata-rata (*mean*), simpangan baku (SD) dan persen relatif simpangan baku (%RSD) hasil pengukuran tersebut.

c. Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menganalisis sampel yang ditambahkan larutan standar sebanyak 6 kali pengukuran. Kemudian arus hasil pengukuran diplot ke grafik. Kemudian dilakukan uji *recovery*.

d. Limit Deteksi

Penentuan limit deteksi dilakukan dengan pengukuran larutan blanko yang dibagi menjadi 3 bagian. Masing-masing larutan blanko dilakukan pengukuran sebanyak 1 kali pengulangan. Kemudian plot arus hasil pengukuran. Hitung simpangan baku (SD) hasil pengukuran. Nilai limit deteksi sebesar 3 kali SD.