

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Desember 2014 sampai dengan Juni 2015 di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Laminar Air Flow, aerator, alat-alat gelas merk pyrex (erlenmeyer 250 mL, erlenmeyer 200 mL, erlenmeyer 1000 mL, erlenmeyer 2000 mL, gelas ukur 5 mL, pipet tetes, labu ukur 25 mL, labu ukur 5 mL, gelas kimia, pipet volum), botol film ukuran 10 mL, autoklaf (merk Tomy SX-700), lampu TL 40 Watt, sentrifugasi, mikroskop cahaya, *Haemocytometer*, ultrasonik, *freeze dryer* (merk Scanvic), neraca analitik (merk Wigen Housser), dan 1 set alat Potentiostat (eDAQ Pty Ltd) yang terdiri dari elektroda kerja emas, elektroda referensi Ag/AgCl, elektroda bantu platina, dan sel elektrokimia berukuran 2,5 mL.

Bahan – bahan yang digunakan adalah ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp., standar  $\beta$ -karoten murni (*merck* KGaA, Darmstadt Germany), air laut, alkohol 70%,

*aquapure water*,  $\text{NaNO}_3$  0,1 M , dimetil sulfoksida (DMSO), media Conwy (Tabel 1), formula logam renik (Tabel 2), tisu, dan aluminium foil.

Tabel 1. Formulasi media Conwy

No.	Bahan Kimia	Jumlah
1	$\text{NaNO}_3$ / $\text{KNO}_3$	11/116 gr
2	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	45 gr
3	$\text{FeCl}_3$	1,3 gr
4	$\text{MnCl}$	0,36 gr
5	$\text{H}_2\text{BO}_3$	33,6 gr
6	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	20 gr
7	<i>Trace Metal*</i>	1 mL
8	Vitamin	1 mL
9	Akuades	hingga 1 Liter

(Sumber: Pujiastuti dkk., 2010).

Tabel 2. Kandungan logam renik (cair) pada media Conwy

No.	Bahan Kimia	Berat	Pelarut	Volume
1	$\text{ZnCl}_2$	2,1 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL
2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL
3	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL
4	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,9 gram	Akuades	Labu ukur 100 mL

(Sumber: Pujiastuti dkk., 2010).

## **C. Metode Penelitian**

### **a. Kultivasi Mikroalga**

Mikroalga *Dunaliella* sp. diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengamati fase pertumbuhan mikroalga *Dunaliella* sp. dengan menggunakan media kultur Conwy.

Tahapan awal penelitian dilakukan dengan mensterilisasi alat dan media kultur yang digunakan. Sterilisasi alat dilakukan dengan autoclave dengan temperatur 121°C pada tekanan 2 atm selama 20 menit. Mikroalga dikultur pada skala laboratorium (indoor ) dalam erlenmeyer 250 mL, 500 mL, 1000 mL dan 2000 mL. Perbandingan volum kultur mikroalga dan air laut adalah 1:4. Media kultur yang akan digunakan berupa media cair berformula Conwy. Media kultur diberikan pada volum yang sama dengan rasio media kultur dan air laut kultur adalah 1:1000.

### **b. Menghitung Kepadatan Mikroalga**

Alat yang digunakan untuk mengetahui jumlah sel yang terdapat dalam suatu suspensi disebut dengan *Counting Chamber*. Perhitungan sel pada mikroalga *Dunaliella* sp. ini menggunakan *Hemocytometer*. Perhitungan sel dilakukan dari hari ke-0 sampai dengan hari ke 16. Karena pada rentang itu diharapkan untuk mendapatkan 4 fase pertumbuhan mikroalga, yaitu fase lag, fase eksponensial,

fase penurunan pertumbuhan (*Declining Growth*), fase stasioner dan fase kematian (Kawaroe, 2010).

Pada mikroalga *Dunaliella* sp., dengan media Conwy, ada 2 cara untuk menghitung sel dengan *Haemocytometer*, yaitu :

Cara I : adalah dengan pengenceran, yaitu 10  $\mu\text{L}$  mikroalga *Dunaliella* sp. ditambah dengan 90  $\mu\text{L}$  air laut dan 20  $\mu\text{L}$  metanol.

Cara II : 80  $\mu\text{L}$  mikroalga *Dunaliella* sp. ditambah dengan 20  $\mu\text{L}$  metanol.

Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah mikroalga dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah *Haemocytometer* yang disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Alat *Haemocytometer*

Cara kerja menggunakan *Haemocytometer*, yaitu :

1. *Haemocytometer* dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan tisu.

2. *Cover glass* diletakkan di atas alat hitung.
3. Dibuat campuran 80  $\mu$ l kultur dan 20  $\mu$ l metanol. Didiamkan selama 15 - 30 menit. Kemudian diteteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
4. Dibiarkan sejenak sehingga sel diam di tempat
5. Diletakkan alat hitung pada meja benda
6. Diatur fokusnya pada perbesaran 40x10.
7. Sampel dihitung sebanyak 5 kotak sedang.

### **c. Pemanenan**

Pemanenan mikroalga dapat dilakukan dengan berbagai macam teknik dengan tujuan memperoleh biomassa mikroalga secara optimal. Beberapa teknik yang populer dilakukan adalah penyaringan, flokulasi, dan sentrifugasi. Pemanenan dengan cara sentrifugasi dipilih sebagai cara pemanenan untuk mikroalga *Dunaliella* sp. Pemanenan dilakukan pada fase stasioner, karena pada fase ini pertumbuhan mikroalga terjadi secara konstan akibat dari keseimbangan katabolisme dan anabolisme di dalam sel (Kawaroe, 2010). Pada keadaan tersebut sel akan saling berebut untuk mendapatkan makanan dan berlomba-lomba mengeluarkan zat antibiotik untuk saling membunuh. Sehingga pada fase ini sangat baik untuk pemanenan mengingat mikroalga *Dunaliella* sp. kaya akan antioksidan  $\beta$ -karoten. Pemanenan mikroalga *Dunaliella* sp. dilakukan pada hari

ke 10. Pemanenan dengan cara sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 85.000 rpm selama 10 menit.

#### ***d. Freeze Drying***

Dalam sintesis kimia, produk sering dikeringkan dengan tujuan produk menjadi lebih stabil, atau mudah larut dalam pelarut yang digunakan. *Dunaliella* sp. hasil sentrifugasi di *freeze dry* sampai mendapatkan bubuk kering dari mikroalga *Dunaliella* sp. *Freeze dry* dilakukan selama 9 jam pada suhu  $-106^{\circ}\text{C}$  sampai suhu  $-108^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya hasil *freeze dry* akan diekstraksi dan dianalisis menggunakan teknik voltametri.

#### **e. Ekstraksi**

Ekstraksi *Dunaliella* sp. menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) yang kemudian diultrasonik. 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).

Bubuk *Dunaliella* sp. hasil *freeze dry* dilarutkan dengan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO), mengingat  $\beta$ -karoten dalam mikroalga *Dunaliella* sp. bersifat nonpolar sehingga dipilih DMSO yang merupakan pelarut bersifat nonpolar. Selanjutnya ekstraksi menggunakan metode ultrasonik selama 15 menit,

kemudian hasil ekstraksi disaring. Filtrat hasil penyaringan digunakan untuk dianalisis menggunakan voltammetri linier.

## **f. Persiapan Alat Voltammetri**

### **1. Elektrolit Pendukung**

Padatan  $\text{NaNO}_3$  ditimbang sebanyak 0,85 gram kemudian diencerkan dengan *aquapure* dalam labu ukur 25 mL dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan  $\text{NaNO}_3$  0,4 M yang digunakan sebagai larutan elektrolit pendukung.

### **2. Pembuatan Larutan Blangko**

Larutan dimetil sulfoksida (DMSO) dipipet sebanyak 2 mL kemudian ditambah dengan elektrolit pendukung 0,5 mL  $\text{NaNO}_3$  0,4 M dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan blangko.

### **3. Larutan Kerja $\beta$ -karoten**

Padatan  $\beta$ -karoten ( $M_r = 536,85$  mol/gram) ditimbang sebanyak 0,0671 gram kemudian dilarutkan dalam DMSO dalam labu ukur 25 mL dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan stok  $\beta$ -karoten 5 mM. Selanjutnya dibuat larutan kerja  $\beta$ -karoten dari larutan stok 5 mM dengan cara pengenceran. Larutan kerja  $\beta$ -karoten yang digunakan untuk analisis adalah konsentrasi 1 mM, 2 mM, 2,5 mM, dan 3 mM (perhitungan terlampir).

#### **4. Preparasi**

Biomassa *Dunaliella* sp. ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dilarutkan dengan DMSO dan diekstraksi menggunakan metode ultrasonik. Kemudian hasil ekstraksi disaring dan filtrat hasil penyaringan digunakan untuk dianalisis menggunakan voltammetri linier sweep.

#### **5. Voltammetri**

Pada penelitian ini digunakan alat voltammetri (eDaQ Potentiostat). Alat voltammetri dilengkapi dengan sambungan USB yang dapat terhubung pada laptop untuk melihat grafik oksidasi dan reduksi. Alat ini juga dilengkapi dengan tiga elektroda, diantaranya elektroda kerja emas, elektroda bantu platina dan elektroda *reference* perak perak klorida. Digunakan sel elektrokimia bervolum 2,5 mL untuk larutan kerja yang akan diuji aktivitas antioksidannya.

#### **6. Kondisi Pengukuran**

Ada dua kondisi pengukuran pada penelitian ini, yaitu kondisi 1 dan kondisi 2. Berikut uraian kondisi 1 dan kondisi 2 yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kondisi pengukuran 1 (reaksi oksidasi  $\beta$ -karoten) dan kondisi pengukuran 2 (reaksi reduksi oksigen)

<b>Kondisi 1</b>		<b>Kondisi 2</b>	
Mode	: Linier	Mode	: Linier
Initial E	: 0 mV	Initial E	: 0 mV
Final E	: 1000 mV	Final E	: -700 mV
Rate	: 100 mV/s	Rate	: 100 mV/s
Range	: 10 $\mu$ A	Range	: 10 $\mu$ A
Upper E	: 1000 mV	Upper E	: 0 mV
Lower E	: 0 mV	Lower E	: -700 mV

## 7. Analisis

Disusun sel elektrokimia yang terdiri dari tiga elektroda yaitu elektroda pembanding (Ag/AgCl), elektroda kerja (Au) dan elektroda bantu yaitu Platina. Dihubungkan elektroda pembanding / elektroda kerja / elektroda bantu pada konektor potensiostat yang sesuai, yaitu elektroda kerja dihubungkan pada kabel berwarna hijau, elektroda pembanding dihubungkan pada kabel berwarna kuning, dan elektroda bantu yaitu Platina dihubungkan pada kabel berwarna merah. Dihidupkan potensiostat dan komputer yang terhubung dengan alat tersebut serta dijalankan *software* yang mengontrol proses analisis voltammetri.

Langkah pertama dalam penelitian ini adalah dilakukan pemindaian pada kondisi 1 untuk oksidasi larutan blanko dan larutan kerja  $\beta$ -karoten serta hasil ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. Kemudian pemindaian kondisi 2 untuk reduksi pada larutan blanko dan larutan kerja  $\beta$ -karoten serta hasil ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. Lalu kembali ke *scan* kondisi 1 untuk pada larutan blanko dan larutan kerja  $\beta$ -karoten serta hasil ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. Diharapkan

pada pemindaian kondisi 1 yang pertama dan pemindaian kondisi 1 yang kedua dihasilkan nilai arus yang berbeda. Larutan pertama dalam proses ini adalah larutan blangko yaitu pelarut DMSO 2 mL dimasukkan ke dalam sel elektrokimia dan ditambahkan elektrolit pendukung  $\text{NaNO}_3$  sebanyak 0,5 mL.

Pada larutan blangko akan dihasilkan arus oksidasi yang dinyatakan sebagai nilai arus residual ( $I_{\text{res}}$ ). Kemudian perlakuan yang sama dilakukan pada larutan kerja  $\beta$ -karoten dan diberi penambahan 0,5 mL elektrolit pendukung  $\text{NaNO}_3$ . Pada larutan standar  $\beta$ -karoten yang memiliki konsentrasi tertinggi akan dihasilkan arus yang dinyatakan sebagai nilai arus tertinggi ( $I_{\text{or}}$ ). Kemudian hasil ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. memiliki perlakuan yang sama dengan blangko dan larutan kerja  $\beta$ -karoten dan diharapkan dihasilkan data analisis berupa arus oksidasi  $\beta$ -karoten pada larutan kerja dan hasil ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. serta arus reduksi.

## **8. Validasi Metode**

### **a. Linieritas**

Linieritas ditentukan dengan pengukuran 4 larutan standar  $\beta$ -karoten dan larutan blangko. Larutan standar diurutkan dari konsentrasi terendah sampai konsentrasi tertinggi. Masing-masing larutan standar yaitu konsentrasi 1 mM, 2 mM, 2,5 mM, dan 3 mM dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali. Catat arus oksidasi  $\beta$ -karoten hasil pengukuran masing-masing larutan standar. Kemudian dibuat grafik hasil

pengukuran larutan standar tersebut dan ditentukan koefisien regresi, kurva konsentrasi antioksidan dan terhadap respon arus.

#### **b. Presisi**

Presisi ditentukan 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  $\beta$ -karoten. Kemudian tentukan rata-rata (*mean*), simpangan baku (SD) dan persen relatif simpangan baku (%RSD) yang ditentukan sebagai persentase dari rata-rata.

#### **c. Akurasi**

Akurasi ditentukan dengan dengan menambahkan standar  $\beta$ -karoten 13 mM pada sampel ekstrak mikroalga *Dunaliella* sp. (*spiking*). Selanjutnya sampel ekstrak *Dunaliella* sp. yang sudah ditambahkan standar  $\beta$ -karoten dianalisis menggunakan teknik *linier sweep voltammetry*. Kemudian arus hasil pengukuran diplot ke grafik dan dilakukan perhitungan %perolehan kembali.

#### **d. Batas Deteksi**

Batas deteksi ditentukan dengan pengukuran larutan blangko. Larutan sampel blangko terdiri dari larutan DMSO 2 mL dan elektrolit pendukung  $\text{NaNO}_3$  0,5 mL. Larutan ini dilakukan pengukuran sebanyak 4 kali pengulangan.

Kemudian plot arus hasil pengukuran. Hitung simpangan baku (SD) hasil pengukuran. Nilai batas deteksi sebesar 3 kali SD (Eurachem, 2014).