

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan dari mulai bulan Maret sampai bulan Agustus 2023 di Laboratorium Riset Program Studi Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI).

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

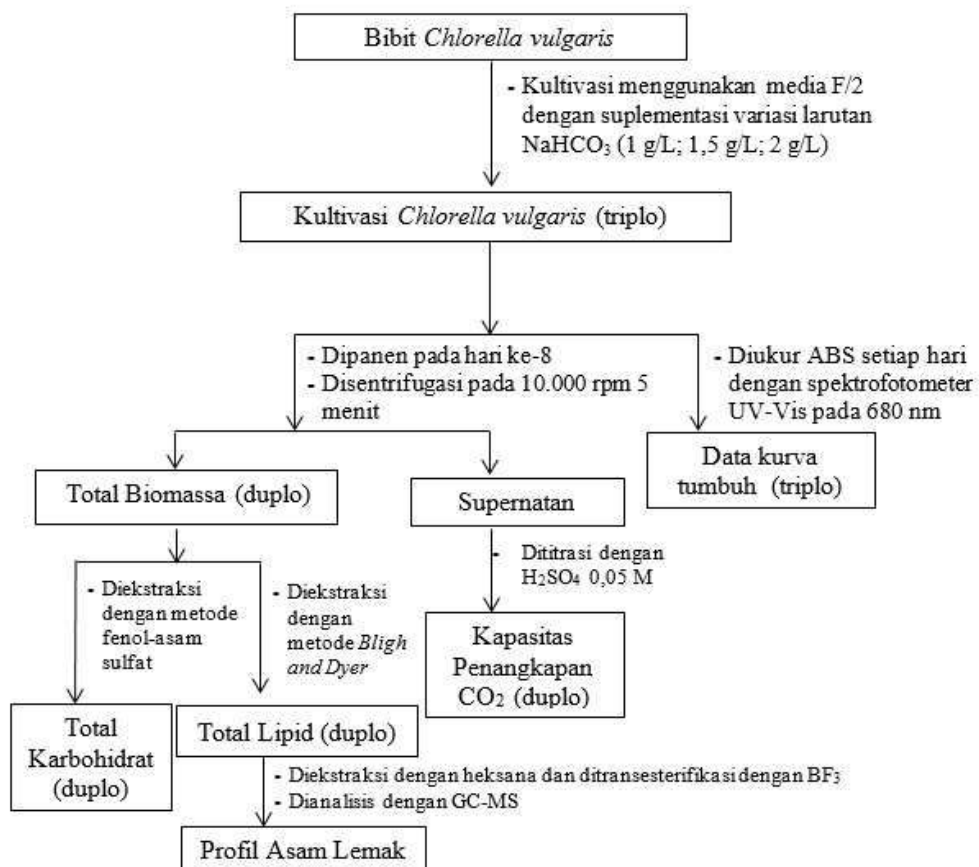
Peralatan yang digunakan untuk melakukan kultur *Chlorella vulgaris* diantaranya, botol vial 1 L, pipa L, kapas, selang, aerator (4L/Jam Kandila eco-888), lampu neon putih (10 watt, T5 LED), lux meter (UT383), pH meter, *autoclave*, dan syringe filter (0,45 μm , Membrane Solutions). Sementara itu, Peralatan yang digunakan untuk menentukan kurva pertumbuhan diantaranya mikropipet (100-1.000 μL , Dragon Lab), tabung mikro (2 mL, Eppendorf), kuvet 1 mL, dan spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific GENESYS 10S). Pada penentuan kapasitas penyerapan CO_2 , peralatan yang digunakan diantaranya buret (50 mL, Pyrex), erlenmeyer (100 mL, Duran), pipet tetes, statif klemp, botol sentrifugasi (15 mL, Onemed), dan sentrifugasi (Corona 80-2). Peralatan yang digunakan untuk menentukan total biomassa diantaranya botol sentrifugasi (50 mL, Onemed), sentrifugasi (Corona 80-2), *Freeze dryer* dan neraca analitik (Metler Toledo ME204). Pada penentuan total karbohidrat, peralatan yang digunakan diantaranya neraca analitik (Metler Toledo ME204), gelas kimia (50 mL, Pyrex), pipet seukuran (10 mL, Pyrex), pipet gondok (1 mL dan 5 mL, Pyrex), buret (10 mL, Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), dan spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu). Sementara itu, peralatan yang digunakan untuk penentuan total lipid diantaranya mikropipet (50-200 μL , Raini), mikropipet (100-1.000 μL , Dragon Lab), tabung mikro (1,5 mL, Eppendorf), *vortex*, sentrifugasi (Hettich EBA 12), dan botol vial 10 mL. Peralatan yang digunakan untuk menentukan profil asam lemak diantaranya mikropipet 100-1.000 μL , tabung ulir, *magnetic stirrer*, pipet tetes, dan gas-spektrometri massa (GC-MS).

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk kultur *Chlorella vulgaris*, yaitu bibit *Chlorella vulgaris* diperoleh dari Universitas Padjadjaran (UNPAD), media F/2, natrium hidroksida (NaOH pro analis, ROFA laboratorium center), asam klorida (HCl pro analis, Merck), dan natrium bikarbonat (NaHCO₃ pro analis Merck). Bahan yang digunakan untuk penentuan kurva tumbuh merupakan sampel kultur *Chlorella vulgaris* yang diambil setiap hari. Sementara itu, bahan yang digunakan untuk penentuan total biomassa merupakan biomassa *Chlorella vulgaris* pada hari ke-8 kultur. Adapun bahan yang digunakan untuk penentuan kapasitas penyerapan CO₂ diantaranya asam sulfat (H₂SO₄ pro analis, Merck), indikator fenolftalein (Merck), dan indikator metil oranye (SmartLab). Bahan yang digunakan pada penentuan total karbohidrat diantaranya asam sulfat pekat (H₂SO₄ pro analis, Merck), fenol (pro analis, Merck), dan standar D-glukosa (Merck). Sementara itu, Bahan yang digunakan untuk penentuan total lipid diantaranya kloroform (CH₃Cl pro analis, Merck) dan methanol (CH₃OH pro analis, Merck). Adapun Bahan yang digunakan untuk penentuan profil asam lemak diantaranya heksana (pro analis, Merck) dan boron trifluorida-methanol kompleks (BF₃ pro analis, Merck).

3.3. Diagram penelitian

Penelitian mengenai pengaruh variasi konsentrasi natrium bikarbonat (rumus kimia) terhadap pertumbuhan, kapasitas penyerapan CO₂, dan komposisi biokimia *Chlorella vulgaris* dilakukan melalui tahapan kultur. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan mengukur absorbansi sampel selama delapan hari. Hasil kultur disentrifugasi untuk dilakukan analisis lebih lanjut. Kapasitas penyerapan CO₂ ditentukan dengan mengukur selisih jumlah CO₂ awal dengan jumlah CO₂ yang tersisa dalam supernatant melalui metode titrasi. Adapun biomassa yang dihasilkan diukur sebagai total biomassa, kemudian dianalisis kandungan biokimianya yang meliputi total karbohidrat, total lipid, dan profil asam lemak. Diagram alir penelitian secara keseluruhan ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4. Prosesdur penelitian

3.4.1. Kultur *Chlorella vulgaris*

Dalam penelitian ini, kultur *Chlorella vulgaris* menggunakan media F/2 dengan (Ratomski *et al.*, 2021). Media F/2 disiapkan dengan membuat larutan air garam 25 *parts per trillion* (ppt), kemudian ditambahkan komponen lainnya dengan komposisi media ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi media F/2 (Ratomski *et al.*, 2021).

Komponen	Jumlah (g/L)	Volume (mL/L)
NaNO ₃	75	1
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5	1
Larutan Stok <i>trace metal</i>		
Na ₂ EDTA	4,16	1
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18	
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,18	
Larutan stok vitamin		
Sianokobalamin (vitamin B12)	0,0005	0,5
Thiamin HCl (vitamin B1)	0,1	
Biotin	0,0005	

Kultur disuplementasi Larutan NaHCO₃ dengan variasi konsentrasi 1 g/L; 1,5 g/L; dan 2 g/L. Larutan air garam disterilkan dengan autoklaf pada suhu 120°C selama 15 menit, sementara komponen lainnya disterilkan menggunakan *syringe* filter 0,45 µm. pH kultur diatur menjadi 7±0,2 dengan larutan 1 N HCl dan 1 N NaOH. Kultur mendapatkan pencahayaan terus menerus dari lampu neon putih 6000 Lux yang diukur dengan TES light meter. Kultur dilangsungkan pada suhu 25°C-30°C dengan aerasi 4 L/jam menggunakan aerator. Proses kultur dilakukan selama 8 hari.

3.4.2. Pengukuran Pertumbuhan

Dalam penelitian ini, pengukuran pertumbuhan *C. vulgaris* menggunakan metode yang telah dimodifikasi (Barahoei *et al.*, 2020). Pertumbuhan sel dari *C. vulgaris*. diukur setiap hari dengan absorbansi pada panjang gelombang 680 nm menggunakan spektrofotometer UV-vis.

3.4.3. Total Biomassa

Dalam penelitian ini total biomassa menggunakan metode gravimetri yang telah dimodifikasi (Najjar & Abu-Shamleh, 2020). Kultur *C. vulgaris* dilakukan hingga mencapai fase stasioner. Biomassa yang dihasilkan dipanen melalui sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, lalu dikeringkan dengan metode *freeze dryer* selama 42 jam. Setelah proses pengeringan, biomassa kering yang diperoleh ditimbang.

3.4.4. Kapasitas Penyerapan CO₂

Kapasitas Penyerapan CO₂ menggunakan metode titrasi yang telah dimodifikasi (Abinandan & Shanthakumar, 2016; Dhoke, 2023). Sampel kultivasi pada hari ke-0 dan hari ke-8 disentrifugasi untuk mendapatkan supernatan yang dititrasi terhadap standar H₂SO₄ pada konsentrasi 0,05 M. Supernatan sebanyak 10 mL dititrasi terhadap H₂SO₄ menggunakan indikator fenolftalein (PP) (pKa 8,6). Setelah titik akhir pertama, titrasi dilanjutkan dengan menggunakan indikator metil oranye (MO) (pKa 3,8) untuk mendapatkan titik akhir kedua. Pembacaan dicatat dan alkalinitas karbon anorganik terlarut ditentukan pada Persamaan (3).

$$\text{Alkalinitas (mg/L CaCO}_3) = \frac{\text{asam yang digunakan (mL)} \times \text{Molaritas asam (M)} \times 50 \times 1000}{\text{volumer sampel (mL)}}$$

(3)

Alkalinitas bergantung pada tiga spesies karbon anorganik. Pada pH 7, H₂CO₃ terdisosiasi menjadi HCO₃⁻. Peningkatan pH dapat terjadi karena penyerapan CO₂, sehingga reaksi akan bergeser menghasilkan CO₃²⁻.

Oleh karena itu, keberadaan CO_3^{2-} perlu ditentukan. Alkalinitas dapat ditentukan sesuai dengan yang dipaparkan tabel 3.2.

Tabel 3.2 Alkalinitas Karbon Anorganik (Abinandan & Shanthakumar, 2016)

No.	Hasil Titrasi	Jumlah OH^- Alkalinitas	Jumlah CO_3^{2-} Alkalinitas	Jumlah HCO_3^- Alkalinitas
1.	$P = 0$	Absen	Absen	T
2.	$P = T$	T	Absen	Absen
3.	$P = 1/2 T$	Absen	2P	Absen
4.	$P > 1/2 T$	2P-T	2[T-P]	Absen
5.	$P < 1/2 T$	Absen	2P	T-2P

Keterangan:

P = Volume asam yang digunakan saat menggunakan indikator PP.

T = Volume asam yang digunakan saat menggunakan indikator MO.

spesies karbon anorganik terlarut ditentukan pada Persamaan (4). Karbon anorganik terlarut direpresentasikan sebagai total spesies karbon anorganik CO_2 sebagai mg CaCO_3/L . Rasio CO_2 terhadap CaCO_3 adalah 1,4 yang diambil untuk mengestimasi CO_2 dari total spesies karbon anorganik dengan menggunakan persamaan (5). Kapasitas penyerapan CO_2 dihitung dengan Persamaan (6).

$$\text{CO}_2 (\text{CaCO}_3) \text{ mg/L} = \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-} \quad (4)$$

$$\text{CO}_2 (\text{CaCO}_3) \text{ mg/L} = \text{CO}_2 (\text{CaCO}_3) \text{ mg/L} \div 1,4 \quad (5)$$

$$\text{penyerapan CO}_2 (\%) = \frac{\text{CO}_2 \text{ awal} - \text{CO}_2 \text{ akhir}}{\text{CO}_2 \text{ awal}} \times 100 \quad (6)$$

3.4.5. Total Karbohidrat

Total karbohidrat ditentukan sesuai dengan metode fenol-asam sulfat (Khorramdashti *et al.*, 2021). Massa kering *C. vulgaris* sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 5 mL. Sampel diambil sebanyak 1 mL lalu dituangkan ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan 1 mL fenol 5% dan 5 ml asam sulfat 96% ke setiap tabung lalu dikocok dengan baik. Setelah 10 menit, campuran dalam tabung divortex dan disimpan dalam *water bath* pada suhu 25°C-30°C selama 20 menit. Absorbansi dievaluasi pada panjang gelombang 490 nm. Total karbohidrat ditentukan menggunakan kurva standar dengan konsentrasi standar glukosa pada 10-60 ppm.

3.4.6. Total Lipid

Total lipid ditentukan dengan metode *Bligh and Dyer* (Perdana *et al.*, 2021). Sebanyak 20 mg biomassa kering *C. vulgaris* dibasahi dengan 80 μL aquades selama 60 menit, kemudian ditambahkan 300 μL campuran kloroform : methanol (1:2) lalu divortex selama 2 menit. Selanjutnya, 100 μL kloroform ditambahkan dan divortex selama 30 detik. Sampel kemudian disentrifugasi pada 2500 x g selama 6 menit. Lapisan air dibuang, fase kloroform diambil, dan residu diekstraksi ulang dengan 100 μL kloroform sebanyak tiga kali. Ekstrak kemudian dikeringkan dan ditimbang. Persentase lipid total ditentukan dengan persamaan (7).

$$\text{Total lipid (\%)} = \frac{\text{massa lipid (g)}}{\text{massa biomassa sampel (g)}} \times 100 \quad (7)$$

3.4.7. Profil Asam Lemak

Profil asam lemak pada sampel dengan kadar lipid total tertinggi dan kontrol ditentukan menggunakan metode ekstraksi pelarut heksana dan transesterifikasi dengan BF_3 (Surani & Asmoro, 2022). Sebanyak 300 mg biomassa kering *C. vulgaris* dilarutkan dalam 1 mL heksana. Selanjutnya, sampel disonikasi selama 90 menit, diikuti dengan pengadukan selama 60 menit. Setelah maserasi selama 24 jam, sampel ditransesterifikasi dengan satu tetes BF_3 sambil diaduk selama 60 menit. Ekstrak asam lemak yang dihasilkan kemudian dianalisis menggunakan GC-MS dengan spesifikasi, yakni suhu oven kolom 50 $^{\circ}\text{C}$, suhu injeksi 250 $^{\circ}\text{C}$, tekanan 119,3 kPa, aliran total 30 mL/menit, waktu mulai 2,00 menit, waktu berakhir 60,54 menit, mulai m/z 40,00, dan akhir m/z 500,00.