

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Agustus 2024. Penelitian dilakukan di laboratorium riset Kimia Hayati Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitis, alat gelas, sentrifus kokusan H-103n, sentrifus Hettich EBA 12, mikropipet Rainin RL-200 *autoclave*, *incubator*, *chiller*, *freezer*, *micro pipet*, spektrofotometer, lux meter, lampu LED merah, lampu LED putih, pH meter, pipa L dan sumbat, selang, aerator, serta tabung falcon 15 mL dan 50 mL, tabung reaksi, *micro tube* 1,5 mL dan 2,5 mL, GC-MS, UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu), dan Genesys 10S UV-Vis.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah bibit *Chlorella vulgaris*, methanol 96%, aquades, n-heksana, kloroform, HCl, H₂SO₄ pekat, fenol 5%, NaOH, metanol, BF₃, dan media F/2 dengan komposisi seperti Tabel 3.1. Komposisi media F/2 yang digunakan, diperoleh dari *database University of Texas at Austin* (web.biosci.utexas.edu) untuk 1 liter volume total.

Tabel 3.1. Komposisi media F/2 Guillard

Senyawa	Konsentrasi Larutan Stok	Volume
NaNO ₃	75 g/L dH ₂ O	1 mL
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O*	30 g/L dH ₂ O	1 mL
Trace Metal Solution	Lihat resep	1 mL
Vitamin Solution	Lihat resep	0,5 mL
Artificial Seawater	25 ppt	900 mL

*Hanya untuk mikroalga yang memerlukan silika

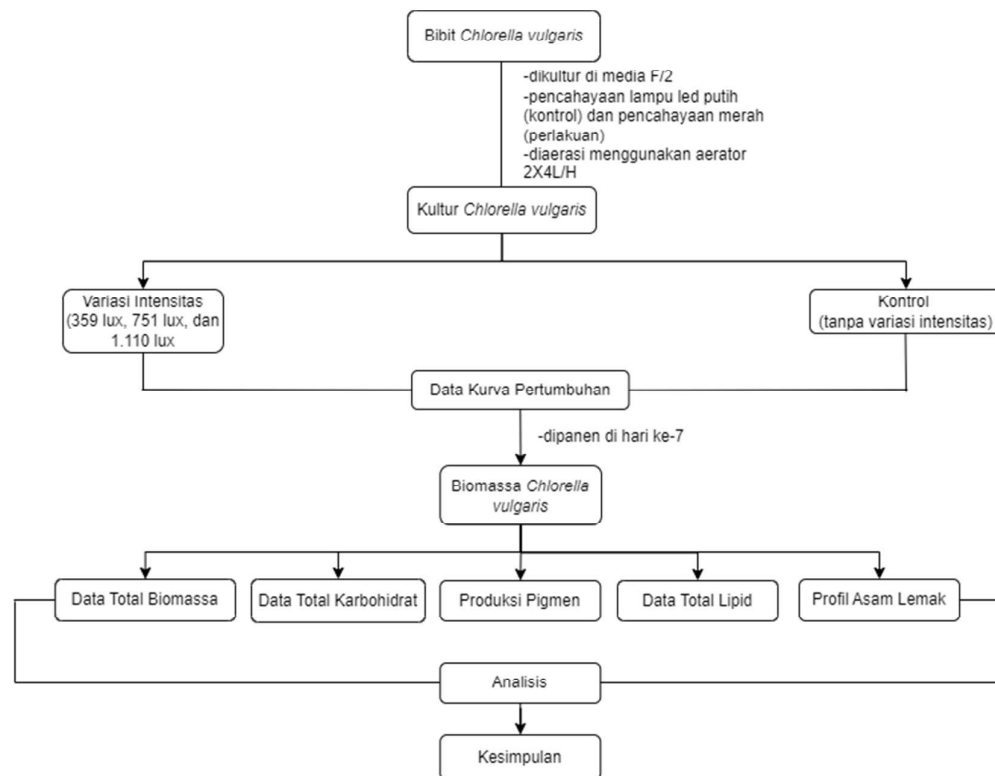
Tabel 3.2. Komposisi Trace Metals Solution

Senyawa	Konsetrasi Stok	Volume
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	3,15 g
Na ₂ EDTA	-	4,16 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	980 mg/100 mL	1 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	630 mg/100 mL	1 mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 g/100 mL	1 mL
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1 g/100 mL	1 mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18 g/100 mL	1 mL
H ₂ O	-	950 mL + x mL (setelah adjust pH)
NaOH*	1 N	(adjust hingga pH 4,5)

*Hanya digunakan jika larutan “cloudy”

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro*. Keseluruhan tahapan pada penelitian ini akan digambarkan dalam skema alur penelitian.



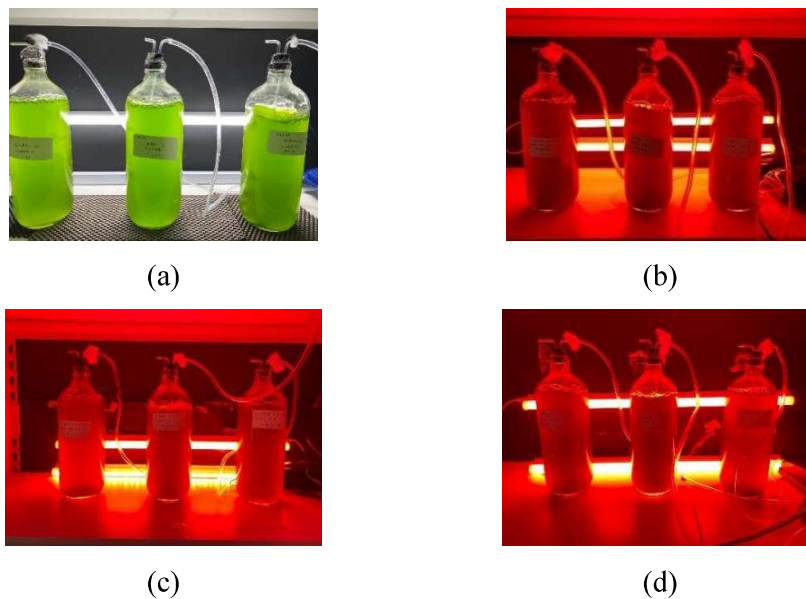
Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

3.4. Eksperimen

3.4.1. Kultivasi

Kultivasi *Chlorella vulgaris* dilakukan skala laboratorium dengan menggunakan sistem menyerupai fotobioreaktor tertutup. Sampel bibit *Chlorella vulgaris* diperoleh dari Laboratorium Riset Kimia Hayati Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia diperoleh dari Universitas Padjajaran Jatinangor. Bibit *Chlorella vulgaris* dikultur di dalam media F/2 dengan kadar garam di dalamnya 25 ppt yang sebelumnya sudah disterilisasi menggunakan autoklaf. Suhu dan pH optimal untuk melakukan kultivasi ini adalah 25-27°C atau suhu ruang dengan pH 7. Proses kultivasi

dilakukan dengan steril di bawah kondisi pencahayaan lampu LED berwarna merah. Pada penelitian ini, proses kultivasi *Chlorella vulgaris* diberi perlakuan kultivasi di bawah kondisi pencahayaan lampu LED merah dengan intensitas yang berbeda beda. Intensitas yang digunakan, antara lain 359 lux, 751 lux, dan 1.110 lux (Gambar 3.2). Kontrol untuk penelitian ini menggunakan lampu LED putih dengan intensitas 1.110 lux (LP;1.110 lux). Kultivasi dilakukan selama 9 hari untuk mendapatkan hasil kurva tumbuh dari *Chlorella vulgaris*.



Gambar 3.2. Desain Kultivasi *Chlorella vulgaris* (a) desain kontrol (LP;1.110 lux) (b) desain 359 lux (c) desain 751 lux (d) desain 1.110 lux

3.4.2. Analisis Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* ditentukan menggunakan pengukuran *Optical Density* (OD) menggunakan Genesys 10S UV-Vis dengan panjang gelombang 680 atau OD₆₈₀ (Adochite & Andronic, 2021).

3.4.3. Total Biomassa

Berdasarkan prosedur yang dibuat oleh Nam Sun Wang (user.eng.umd.edu) dimodifikasi. Pisahkan sel dari media dengan cara disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit kemudian fasa media dibuang dan pasta sel atau pelet diambil dan ditaruh ke cawan penguap yang sebelumnya sudah ditimbang. Tabung sentrifugasi

dibilas dengan aquades untuk memastikan seluruh biomassa terambi dan dituangkan lagi ke cawan penguap. Tahap selanjutnya adalah pengeringan menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 40-50°C. Setelah kering, berat biomassa ditimbang hingga mencapai konstan (g/L) (Mousavian et al., 2023).

3.4.4. Total Karbohidrat

Metode untuk penentuan total karbohidrat mengikuti penelitian sebelumnya oleh Soleimani khorramdashti et al. (2021), yaitu dengan fenol-sulfat. Untuk penentuan kurva standar, larutan induk dibuat 100 ppm kemudian untuk deret standar dibuat konsentrasi 10-60 ppm dalam labu ukur 10 mL. Dari masing-masing deret standar diambil 1 mL kemudian ditambahkan asam sulfat (H₂SO₄) dan fenol 5% 1 mL. Campuran didiamkan selama 10 menit kemudian divortex dan disimpan pada water bath suhu ruang selama 20 menit. Selanjutnya diukur dengan panjang gelombang 490 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Hal yang sama dilakukan untuk penentuan total karbohidrat pada sampel. Sebelum ditambahkan asam sulfat (H₂SO₄) dan fenol 5% 1 mL, dilarutkan 1 mg biomassa kering dengan 5 mL aquades (200 ppm).

3.4.5. Ekstraksi Pigmen dan Kuantifikasi

Pigmen (klorofil dan karotenoid) diekstrak menggunakan metode yang sudah digunakan oleh El-fayoumy et al. (2023) kemudian dimodifikasi. Diambil 5 mL sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang. Pellet diresuspensi menggunakan 5 mL metanol 96% dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit serta menggunakan sonikasi selama 5 menit. Hasil homogenisasi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada beberapa panjang gelombang *visible*, yakni 653, 666, dan 470 nm. Perhitungan konsentrasi pigmen dapat dihitung dengan menggunakan persamaan dibawah ini:

$$\text{Klorofil a } (\mu\text{g/mL}) = 15,65(A_{666}) - 6,34(A_{653})$$

$$\text{Klorofil b } (\mu\text{g/mL}) = 27,05(A_{653}) - 11,2(A_{666})$$

$$\text{Total Karotenoid } (\mu\text{g/mL}) = (1.000(A_{470}) - 2,86(\text{Klorofil a}) - 129,2(\text{Klorofil b}))/245$$

dimana A_{653} , A_{666} , dan A_{470} nm adalah absorbansi pada panjang gelombang tersebut.

3.4.6. Total Lipid dan Profil Asam Lemak

Metode ini sebelumnya sudah dilakukan oleh (Perdana et al., 2021) dimana ekstrak lipid dilakukan dengan cara mengambil 20 mg biomassa kering dan ditaruh ke dalam microtube 1,5 mL dilarutkan menggunakan 80 μL aquades selama 60 menit menggunakan sonikasi, kemudian ditambahkan 300 μL pelarut metanol:kloroform (2:1) dan divortex selama 2 menit. Selanjutnya sampel ditambahkan 100 μL kloroform dan divortex selama 30 detik. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 2500 x g selama 6 menit. Fasa atas dibuang dan fasa bawah atau pellet diekstraksi kembali dengan 100 μL sebanyak 3 kali. Ekstrak diuapkan dan persentase dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Untuk penentuan profil asam lemak, sebanyak 300 mg biomassa kering dilarutkan dengan 1 mL heksana, kemudian di sonikasi selama 90 menit. Selanjutnya distirer selama 60 menit untuk kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam. Setelah maserasi akan terbentuk 2 fasa, fasa atas diambil dan diuapkan kemudian ditambah BF_3 1 tetes. Suspensi tersebut kemudian distirer selama 60 menit kemudian dianalisa menggunakan GC-MS (Surani & Asmoro, 2022)

3.4.7. Analisis Statistika

Pada penelitian ini digunakan analisis pengujian Two Way Anova untuk data kurva pertumbuhan dan One Way Anova untuk total biomassa, total lipid, dan produksi pigmen serta menggunakan Uji Duncan untuk menentukan perbedaan diantara atau tiap perlakuan pada tingkat signifikansi 0,05. Seluruh analisis statistik menggunakan software IBM SPSS Statistics 26. Pengamatan dilakukan dengan 3

kali replikasi atau pengulangan, kecuali untuk data total biomassa dan total lipid dengan 2 kali pengulangan.