

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juli 2025. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pusat Riset Mikrobiologi Terapan Badan Riset dan Inovasi Nasional Cibinong, Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), dan tempat tinggal peneliti di Kecamatan Tanah Sareal, Kota Bogor, Jawa Barat.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, laminar *air flow* (ESCO), botol scott 1 L, *hotplate stirrer*, *magnetic stirrer*, *autoclave* (Hirayama), mikropipet (10-1.000 μ L, Dragon Lab), tabung mikro (1,5 mL dan 2 mL, Eppendorf), varioskans lux (Thermo Scientific), *well-plate* 96, sentrifugasi (Tomy MX-305), botol sentrifugasi (50 mL, Corning), oven, oven vakum (Binder), neraca analitik (Kern ABJ-NM), gelas kimia (50 mL, Pyrex), gelas ukur (100 mL, pyrex), pipet seukuran (1 dan 10 mL, Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), labu takar (5 mL), ultrasonik (Bio Base), *tissue lyser* (Qiagen), vortex (Delta Mixer), sentrifugasi (Sorvall), mortar dan alu, *glass bead*, varioskans Lux (Thermo Scientific), dan spektrofotometer Uv-Vis (Shimadzu)

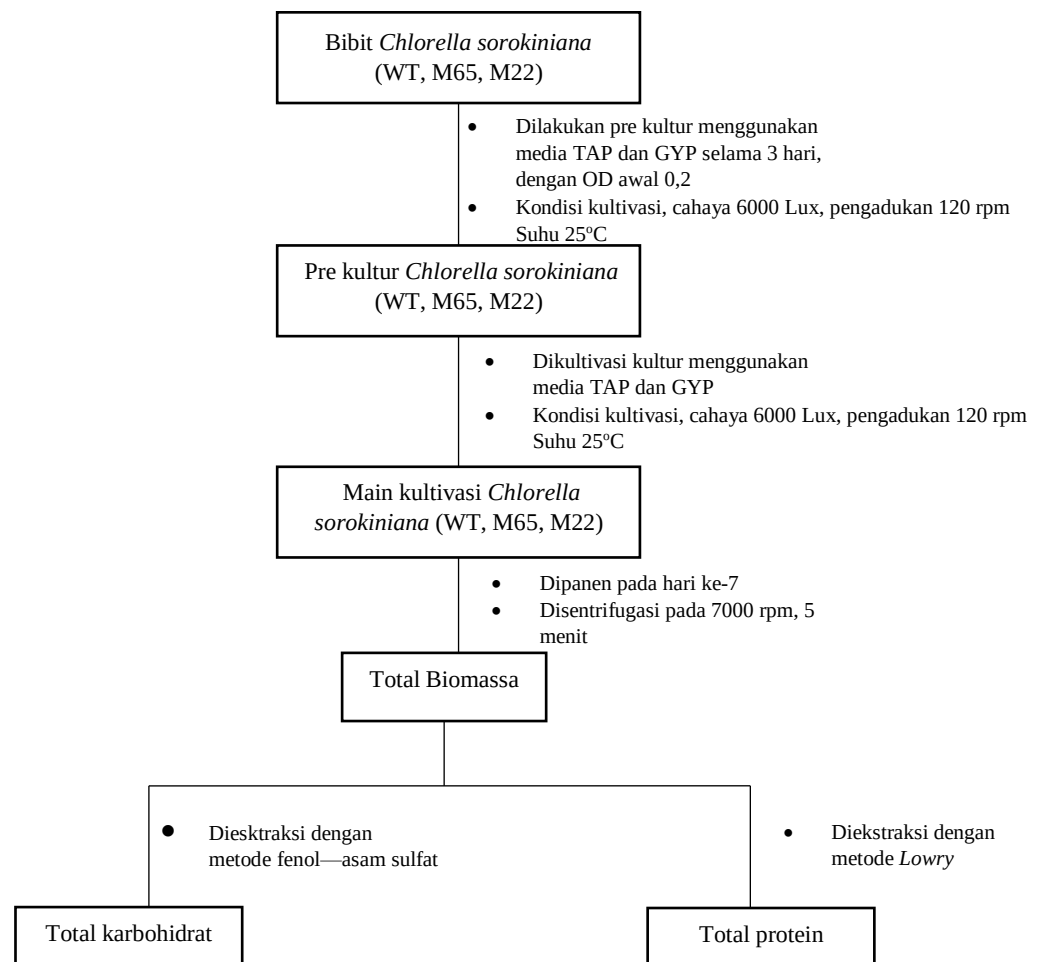
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Chlorella sorokiniana* Wild Type dan mutan yang diperoleh dari Badan Riset dan Inovasi Nasional (Brin) Kst Cibinong, Bogor, tris base (Himedia), *hunter trace element*, magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck), kalsium klorida dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck), ammonium klorida (NH_4Cl , Merck), D-glukosa (Merck), *yeast extract* (Himedia), pepton (Himedia), aquades, asam sulfat (Merck), fenol (Merck), kloroform (Merck), metanol (Merck), etanol (Merck), BSA (Sigma), Natrium Hidroksida (NaOH, Merck), ABTS (Sigma), kalium persulfate (Sigma), SDS, Natrium Karbonat (Na_2CO_3), tembaga(II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck), kalium

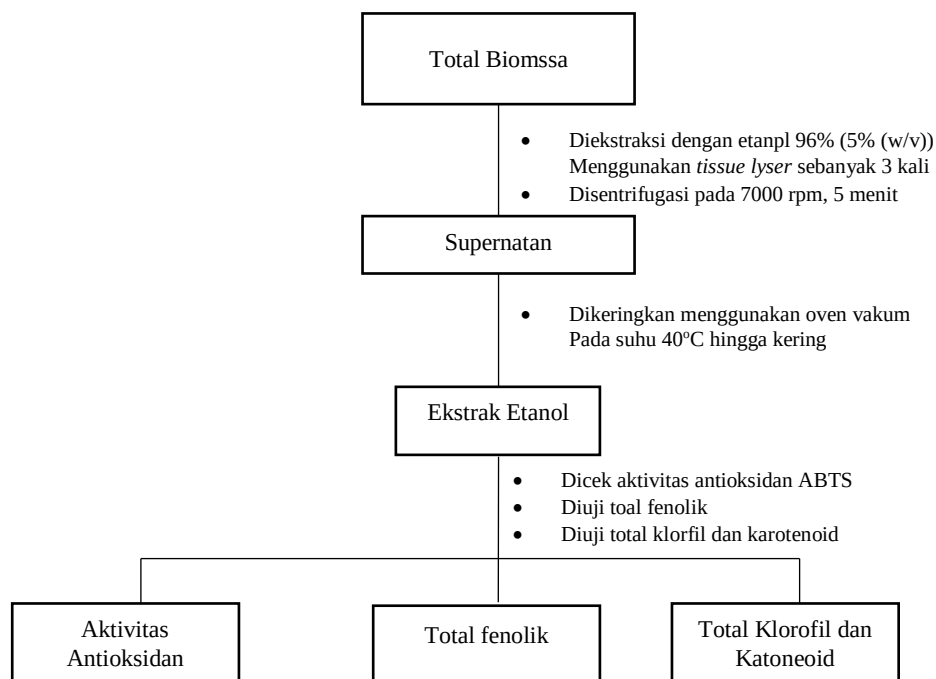
natrium tartrat tetrahidrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck), folin-Ciocalteu (Merck), dikalium fosfat (K_2HPO_4 , Merck), dan kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 , Merck), asam galat.

3.1 Diagram Alir Penelitian

3.3.1 Profil Biokimia *Chlorella sorokiniana*



3.3.2 Profil ekstrak etanol *Chlorella sorokiniana*



3.2 Prosedur Penelitian

3.4.1 Kultur *Chlorella sorokiniana* wild type dan mutan

Strain *C. sorokiniana* (WT, M22, dan M65) diperoleh dari Laboratorium Mikroalga BRIN Cibinong. Kultivasi mikroalga dilakukan menggunakan media *Tris Acetic Phosphate* (TAP) dan media *Glucose Yeast extract Peptone* (GYP). Adapun komposisi media TAP dan GYP ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1. Komposisi Media a) TAP dan b) GYP

a. Komposisi Media TAP

Komponen	Jumlah (g/L)	Volume (ml/L)
Tris Base	2,42	-
Asam Asetat	-	1
Larutan Stok Tap Salt		
MgSO ₄ .7H ₂ O	4	25
CaCl ₂ .2 H ₂ O	2	

NH ₄ Cl	16	
Larutan Stok Buffer Phosphate		
K ₂ HPO ₄	288	0,375
KH ₂ PO ₄	144	
Larutan Stok Hutner Trace Element		
EDTA	200	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	220	
H ₃ BO ₃	57	
MnCl ₂ .4H ₂ O	101.2	
CoCl ₂ .6H ₂ O	33.2	
CoSO ₄ .5H ₂ O	31.4	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	22	
FeSO ₄ .7H ₂ O	99.8	
KOH (20%)	200	

b. Komposisi Media GYP

Komponen	Jumlah (g/L)
D-Glukosa	5
Yeast	2.5
Peptone	5

Tahapan kultivasi *C. sorokiniana* (WT, M65, M22) dilakukan melalui dua tahap, yaitu *pre-culture* dan *main-culture*. *Pre-culture* dilakukan dengan menambahkan kultur inokulum dengan kondisi kepadatan sel awal 0.2 pada media steril dan dikultivasi selama 3 hari. Sedangkan *main-culture* dilakukan dengan menambahkan kultur hasil *pre-culture* dengan kondisi kepadatan sel awal 0.2 pada mediayang lebih besar. Kemudian dikultivasi selama 7 hari. Tahapan kultivasi baik *pre-culture* dan *main-culture* pada dikultivasi menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 120 rpm, suhu 25°C, serta cahaya sebesar 6000 lux.

3.4.2 Total Biomassa

Pemanenan biomassa *C. sorokiniana* dilakukan pada hari ke-7 menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 7.000 rpm selama 5 menit dan suhu 4 °C. Pelet sel hasil sentrifugasi dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kering.

3.4.3 Total Karbohidrat

Total karbohidrat ditentukan menggunakan metode fenol-asam sulfat berdasarkan metode (W. Chen et al., 2023) dengan modifikasi. Massa kering *C. sorokiniana* WT dan mutan masing-masing ditimbang dan dilarutkan dalam aquades. Kemudian sampel diinkubasi menggunakan *waterbath* pada suhu 90°C selama 5 menit. Sampel dipipet sebanyak 200 µL ke dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan fenol 5% serta asam sulfat pekat ke setiap tabung dan divortex hingga homogen. Setelah itu sampel diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 40°C selama 40 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 490 nm. Total karbohidrat ditentukan menggunakan kurva standar dengan konsentrasi standar glukosa 25-200 ppm. Persentase karbohidrat total ditentukan dengan persamaan (1) dan (2).

$$\text{Konsentrasi Karbohidrat (x)} = \frac{y-b}{a} \quad (1)$$

$$\text{Total Karbohidrat (\%)} = \text{konsentrasi karbohidrat} \times \frac{\text{total pelarut (mL)}}{\text{biomassa yang digunakan}} \times 100 \quad (2)$$

3.4.4 Total Protein

Pengujian protein ditentukan metode *Lowry* berdasarkan Zielinski et al. (2020).

3.4.4.1 Pembuatan reagen Biuret

Pembuatan reagen biuret dibagi menjadi tiga reagen yaitu, reagen A, B1 dan B2. Reagen A dibuat dengan melarutkan NaOH (natrium hidroksida) Na₂CO₃ (natrium karbonat) dalam 1 liter aquades. Pembuatan reagen B1 dibuat dengan melarutkan CuSO₄.5H₂O (tembaga (II) sulfat pentahidrat) dalam 1 liter aquades. Sedangkan reagen B2 dibuat dengan KNaC₄H₄O₆·4H₂O (kalium natrium tartrat) dalam 1 liter aquades. Sedangkan, pembuatan reagen C dibuat dengan menambahkan reagen A, reagen B1, dan reagen B2.

3.4.4.2 Uji Protein

Biomassa kering *C. sorokiniana* WT dan mutan ditambahkan 100 mg *glass bead* 0.2 mm dan PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Sampel diekstraksi menggunakan *tissue lyser* dengan periode 1 menit on, 1 menit off sebanyak 5 kali. Kemudian sampel disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 5 menit dan dipisahkan supernatan. Masing-masing sampel dipipet dan ditambahkan dengan SDS (*Sodium dodecyl sulfat*) serta reagen biuret, divortex dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah diinkubasi selama 10 menit, sampel ditambahkan 50 µL folin, divortex, dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Kemudian Absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm. Total protein ditentukan menggunakan kurva standar dengan konsentrasi standar BSA 1-5 mg/mL. Persentase protein total ditentukan dengan persamaan (4) dan (5).

$$\text{Konsentrasi Protein (x)} = \frac{y-b}{a} \quad (4)$$

$$\text{Total Protein (\%)} = \text{konsentrasi protein (x)} \times \frac{\text{total pelarut (mL)}}{\text{biomassa yang digunakan}} \times 10 \quad (5)$$

3.4.5 Ekstraksi Etanol *C. sorokiniana*

Preparasi ekstrak *C. sorokiniana* WT dan mutan dilakukan dengan secara mekanik. Biomassa kering *C. sorokiniana* WT dan mutan ditambahkan 100 mg *glass bead* dan diekstraksi menggunakan etanol 96% (5% w/v) secara mekanik menggunakan *tissue lyser* dengan periode 1 menit on, 1 menit off sebanyak 3 kali. Ekstrak kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C untuk memisahkan supernatan dengan biomassa. Supernatan dipisahkan dan residu hasil ekstraksi dilakukan ekstraksi kembali sebanyak 2 kali, sehingga total ekstraksi sebanyak 3 kali. Supernatan kemudian dikeringkan menggunakan oven vakum.

3.4.6 Analisis Kandungan Total Klorofil dan Karotenoid

Analisis kandungan total klorofil dan karotenoid ekstrak *C. sorokiniana* dilakukan dari ekstrak dilakukan berdasarkan metode (Kulkarni & Nikolov, 2018) dengan modifikasi. Ekstrak kering dilarutkan menggunakan etanol, kemudian ekstrak diukur absorbansi menggunakan *Varioskan Lux* dengan panjang gelombang

470 nm, 649 nm, dan 665 nm. Total klorofil dan karotenoid dihitung dengan persamaan (6), (7), dan (8).

$$C_a = 13,95A_{665} - 6,88A_{649} \quad (6)$$

$$C_b = 24,96A_{649} - 7,32A_{665} \quad (7)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 2,05C_a - 114,8C_b}{245} \quad (8)$$

3.4.7 Karakterisasi Klorofil dan Karotenoid Ekstrak *Chlorella sorokiniana* dengan Uv-Vis

Analisis spektrum klorofil dan karotenoid dilakukan menggunakan *Varioskan Lux*. Analisis pada ekstrak dilakukan pada panjang gelombang panjang gelombang 400 – 800 nm.

3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan ABTS

Pengujian aktivitas antioksidan ABTS dilakukan berdasarkan metode Wołosiak et al. (2022) dengan modifikasi.

3.4.8.1 Pembuatan Larutan Kerja ABTS

Pembuatan larutan kerja ABTS dilakukan dengan mereaksikan larutan kalium persulfat 2,45 mM dan larutan ABTS (2,2'-Azino-bis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 7 mM. Kemudian, larutan kalium persulfate dan larutan ABTS dicampurkan dengan perbandingan 1:1 (v/v) dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, larutan kerja ABTS ditambahkan aquades hingga menghasilkan absorbansi $0,7 \pm 0,05$ pada panjang gelombang 734 nm.

3.4.8.2 Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol *C. sorokiniana*

Ekstrak etanol dibuat larutan induk pada 1000-4000 ppm. Larutan induk diencerkan masing-masing untuk mendapatkan konsentrasi 4000-31,25 ppm

3.4.8.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Larutan sampel ekstrak dengan konsentrasi yang telah dibuat masing-masing dipipet 10 μ L ke dalam *well plate* dan ditambahkan 190 μ L larutan kerja ABTS. Setelah itu campuran larutan diinkubasi di tempat yang tertutup dari cahaya selama 5 menit. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 734 nm menggunakan spektrofotometer *Varioskan Lux*. Penghambatan serapan radikal bebas dari ABTS dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (9):

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \quad (9)$$

Hasil persen inhibisi aktivitas antioksidan tersebut kemudian digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linier untuk perhitungan nilai IC₅₀. Sumbu X merupakan konsentrasi sampel yang digunakan dan sumbu Y merupakan persen (%) inhibisi dari ekstrak etanol *C. sorokiniana*.

3.4.9 Total Fenolik

Pengujian total fenolik dilakukan berdasarkan metode dengan modifikasi. Ekstrak etanol dengan konsentrasi tertentu dipipet sebanyak 10 µL ke dalam *well plate*-96, kemudian ditambahkan 10 µL etanol 96%, 50 µL aquades serta 50 µL folin 50% dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah 5 menit, sampel ditambahkan 10 µL Na₂CO₃ 5% dan diinkubasi selama 2 jam. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 725 nm menggunakan Varioskan Lux. Total fenolik ditentukan menggunakan kurva standar dengan konsentrasi standar asam galat 12,5-200 ppm.