BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan dari bulan Februari sampai bulan September 2017 di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), sedangkan penumbuhan *Spirulina fusiformis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjajaran (FMIPA UNPAD).

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah; 1) Pembuatan pelarut: neraca analitik, labu takar 1 liter, corong, spatula, batang pengaduk, pH meter (Me204 Mettler Toledo), 2) Ekstraksi pigmen: labu erlenmeyer 250 mL, gelas kimia 400 mL, gelas ukur 100 mL, batang magnet, tabung *centrifuge*, sonikator *ultrasonic cleaner Honda W-211*, *magnetic stirrer* dan *heater* (Wisestir Wisol *B* Lab Instrument), *centrifuge* (H-103n Kokusan), 3) Uji Termal dan Pengaruh Aditif: botol vial 10 mL, tabung reaksi 15 cm (Pyrex), prop karet, termometer (alkohol, 0-100°C), mikropipet (Mettler Toledo), makropipet (Kokusan), *waterbath* (NTS Thermoshaker). Pengukuran spektroskopi dilakukan menggunakan Shimadzu UV-Mini 1240 dan Spectronic 20.

3.2.2. Bahan

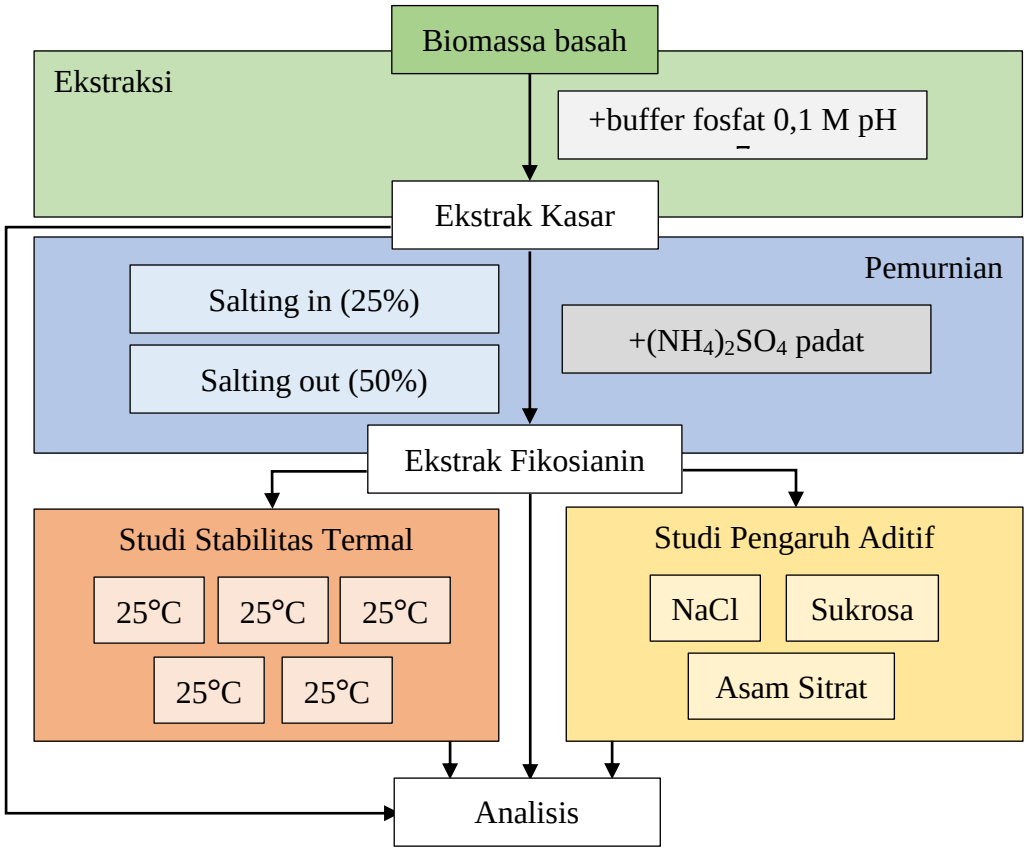
Sampel *Spirulina fusiformis* diperoleh dari Departemen Biologi Universitas Padjajaran. Bahan kimia yang digunakan dalam pembuatan pelarut adalah aquades, natrium fosfat (NaH_2PO_4, teknis, PT. Bratachem), natrium hidroksida (NaOH, P.a., CV. Menara Agung Abadi). Bahan yang digunakan pada proses pemurnian adalah ammonium sulfat ($(NH_4)_2SO_4$, teknis, PT. Bratachem). Pada pengamatan pengaruh aditif pada stabilitas fikosianin digunakan bahan sebagai berikut; natrium klorida (NaCl, P.a., PT. Bratachem), sukrosa (NaCl, P.a.,

Katon Dorojatun Ramadhan Wibowo, 2017
Karakterisasi Dan Pengaruh Aditif Pada Stabilitas Termal Fikosianin Dari Spirulina Fusiformis
repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

PT. Bratachem) dan asam sitrat (P.a, CV. Menara Agung Abadi). Bahan-bahan yang berkualitas teknis dimurnikan kembali melalui rekristalisasi.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu; 1) Ekstraksi dan Pemurnian, 2) Pengamatan Stabilitas Fikosianin, dan 3) Pengamatan Pengaruh Aditif pada Stabilitas Fikosianin.

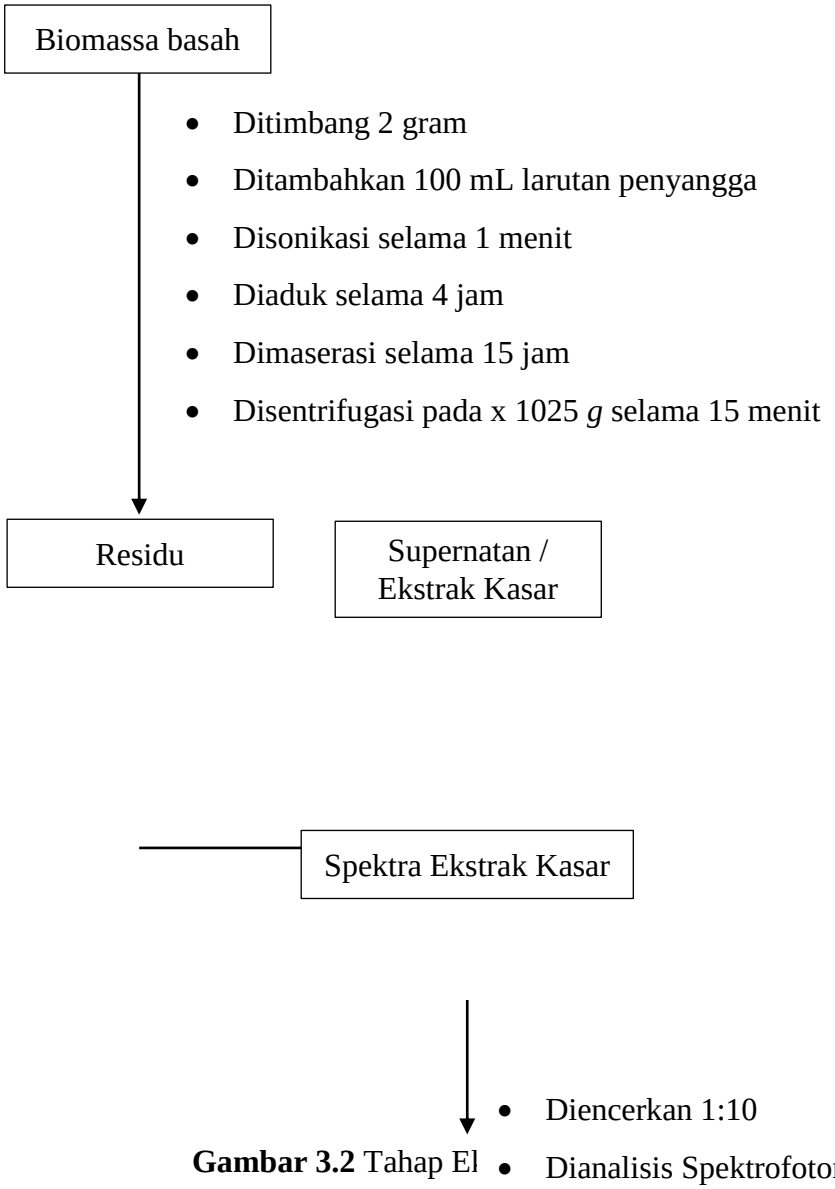


Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.3.1. Ekstraksi dan Pemurnian

Tahapan ekstraksi fikosianin ditunjukan pada Gambar 3.1. Ekstraksi fikosianin dilakukan dengan menggunakan biomassa basah. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode dari Minkova (2003) dengan beberapa modifikasi dan penyesuaian. Ekstraksi dilakukan menggunakan larutan penyangga Na-fosfat 0.1 M sebagai pelarut. Ekstraksi dilakukan dengan rasio biomassa 1:50 (massa biomassa : volume pelarut). Sonikasi dilakukan selama 1 menit dengan tujuan menghancurkan dinding sel dan membran lainnya, sehingga biomolekul yang diharapkan dapat larut dalam pelarut. Gelombang ultrasonik juga diberikan untuk

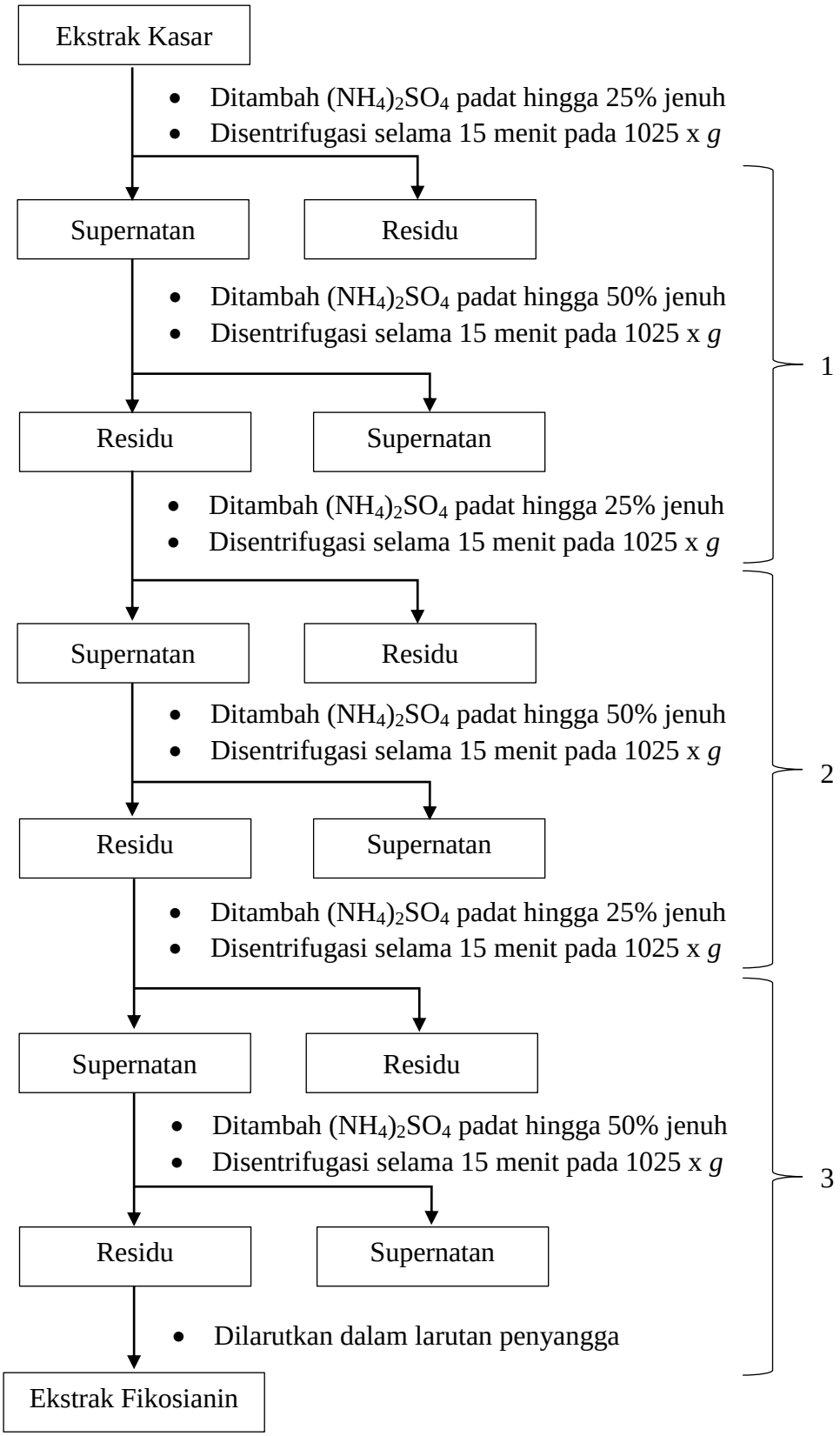
mengurangi kadar gas dalam larutan. Pengadukan dilakukan selama 4 jam dengan tujuan menghomogenkan biomassa dalam pelarut. Ekstraksi dilanjutkan dengan maserasi selama 15 jam untuk meningkatkan perolehan fikosianin. Sentrifugasi dilakukan untuk menghilangkan serpihan sel dan senyawa-senyawa lain yang tidak larut dalam larutan penyangga. Supernatan dinyatakan sebagai ekstrak kasar.



Gambar 3.2 Tahap El

Pemurnian fikosianin dilakukan melalui fraksinasi ammonium sulfat dan prosesnya ditunjukan pada Gambar 3.2. Proses pemurnian merujukan pada Minkova (2003) dan Bermejo (1997) dengan beberapa penyesuaian dan penyederhanaan. Pada dasarnya pemurnian dilakukan melalui dua bagian; 1) Penjenuhan ammonium sulfat 25%, dan 2) Penjenuhan ammonium sulfat 50%.

Kedua bagian tersebut menjadi satu tahapan yang kemudian diulangi sebanyak tiga kali. Proses penjenuhan pertama (25% jenuh) akan menghasilkan endapan berwarna kehijauan dan supernatan berwarna biru. Supernatan tersebut yang diambil dan digunakan untuk proses selanjutnya. Pada tahap berikutnya (penjenuhan 50%) akan diperoleh endapan berwarna biru dan supernatan tidak berwarna.



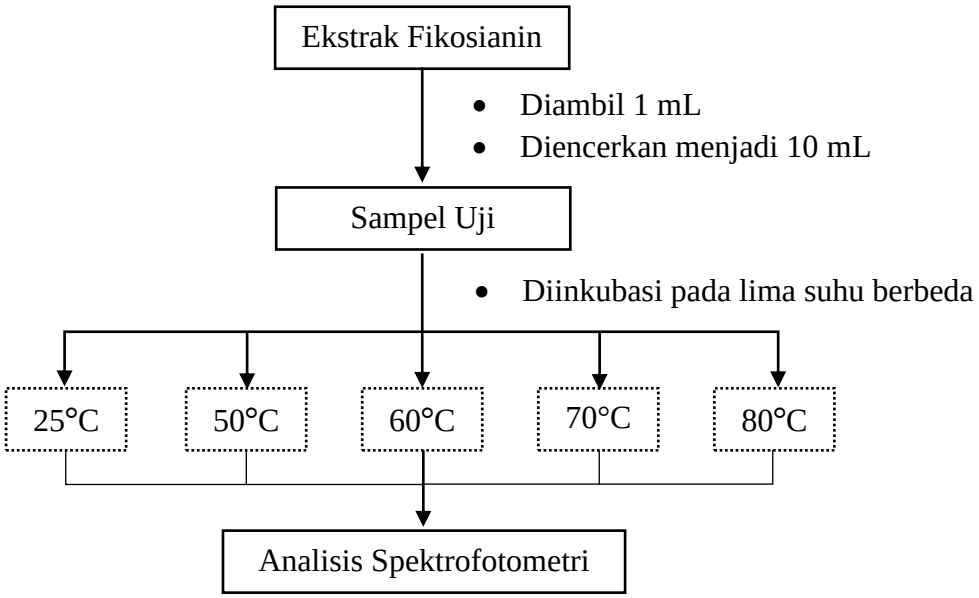
Gambar 3.3 Proses Pemurnian Fikosianin

Endapan biru yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam larutan penyangga Na-fosfat 0,1 M. Konsentrasi fikosianin ditentukan secara spektroskopi melalui persamaan berikut (Chaiklahan *et al*., 2011; Bennett dan Bogorad, 1973).

$$\text{Konsentrasi fikosianin (mg/mL)} = \frac{A_{620} - 0{,}474(A_{652})}{5{,}34}$$

3.3.2. Pengamatan Stabilitas Termal

Stabilitas termal fikosianin diamati melalui perubahan spektra yang diperoleh dari analisis spektrofotometri UV-Vis. Pengamatan stabilitas termal didasarkan pada Martelli *et al*. (2014), kemudian dilakukan dengan beberapa penyesuaian. Ekstrak fikosianin hasil pemurnian diencerkan dengan perbandingan 1:10 untuk menyesuaikan kurva absorbansi pada analisis spektrofotometri. Sampel uji diinkubasi menggunakan *waterbath* pada lima ragam suhu. Dalam sistem pelarut berbasis air terjadi perubahan signifikan pada ± 60°C (Chaiklahan, Chirasuwan, dan Bunnag, 2012) sehingga pada rentang suhu yang digunakan dalam penelitian ini dapat memperlihatkan stabilitas fikosianin.



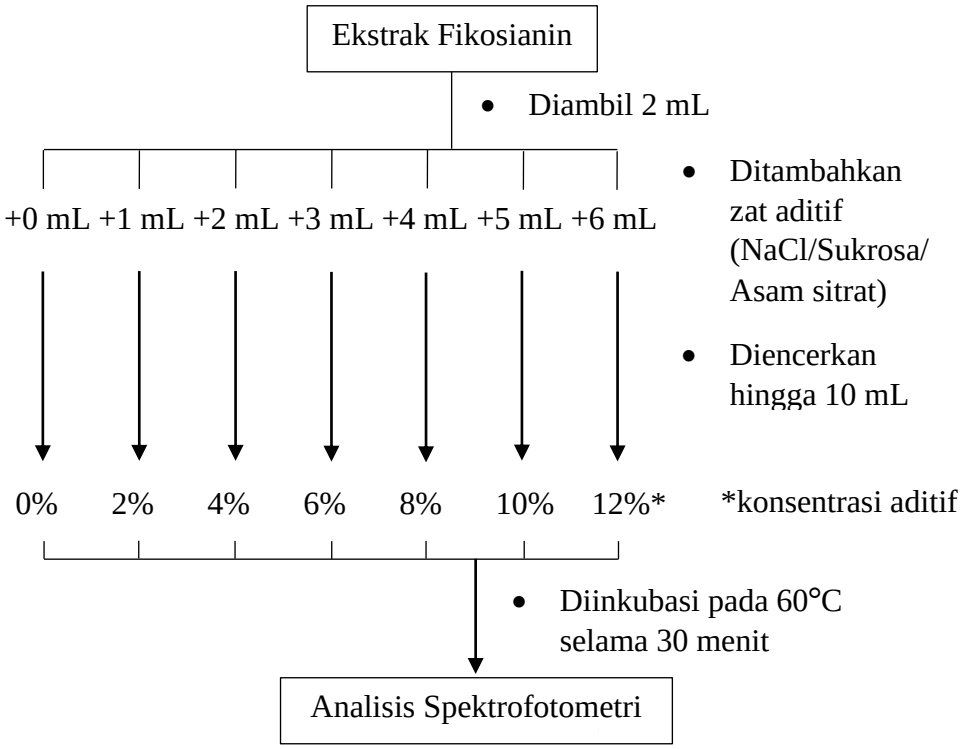
Gambar 3.4 Pengamatan Stabilitas Termal Fikosianin

Rentang suhu yang digunakan didasarkan pada stabilitas fikosianin yang teramati dari spesies lain (*S. plantesis*). Rentang suhu yang digunakan juga suhu optimum penggunaan air sebagai pelarut, karena pada suhu 90°C mulai terjadi

proses penguapan. Analisis spektrofotometri dilakukan menggunakan metode pemindaian panjang gelombang dari 700 nm sampai 300 nm. Pada rentang panjang gelombang tersebut adalah daerah yang dapat diamati oleh mata manusia. Tujuan pengamatan adalah mengamati pengaruh inkubasi termal terhadap sifat spektroskopi ekstrak fikosianin yang telah diperoleh sebelumnya.

3.3.3. Pengamatan Pengaruh Aditif

Penelitian pengaruh zat aditif terhadap stabilitas termal fikosianin dilakukan menggunakan NaCl, sukrosa dan asam sitrat (dilakukan secara terpisah). Zat aditif yang digunakan merupakan bahan kimia yang dapat digunakan dalam produk pangan dan berfungsi sebagai pengawet. Pengamatan pengaruh aditif didasarkan pada Pan-utai, Kahapana, dan Iamtham (2017) serta Martelli *et al*. (2014). Dalam penelitian ini digunakan ragam konsentrasi 0 sampai 12% (massa/volume) zat aditif. Konsentrasi fikosianin yang digunakan disamakan dan memiliki perbandingan 1:5 dengan ekstrak kasar. Analisis dilakukan sebelum dan sesudah inkubasi termal.



Gambar 3.5 Alur Percobaan Pengaruh Aditif

Pengaruh aditif terhadap stabilitas fikosianin diperhitungkan dengan membandingkan absorbansi dengan kontrol negatif (0% aditif). Peningkatan stabilitas termal ditandai dengan lebih besarnya absorbansi sampel uji terhadap kontrol negatif (0% aditif). Penurunan absorbansi jika dibandingkan dengan kontrol negatif menandakan terjadinya penurunan stabilitas termal. Analisis dilakukan secara triplo pada λ_{max} (620 nm) yang teramati pada proses ekstraksi, pemurnian dan penelitian sebelumnya (Glazer, Fang, dan Brown, 1973).

3.3.4. Analisis UV-Vis dan Statistika

Analisis spektrofotometri dilakukan menggunakan Shimadzu UV-Mini 1240 dan Spectronic 20. Instrumen yang digunakan tidak memberikan data digital dari hasil pengukuran, maka analisis grafis dilakukan untuk memperoleh informasi tersebut. Analisis grafis dilakukan menggunakan perangkat lunak Plot Digitizer untuk memperoleh data untuk kurva dan CorelDRAW® X6 untuk menentukan nilai absorbansi pada 280 nm dan 652 nm. Penelitian ini dilakukan replikasi secara triplo untuk menghasilkan data yang dapat dianalisis secara statistika. Signifikansi data diperhitungkan menggunakan metode ANOVA dua arah yang dapat membandingkan dua kelompok atau lebih. Analisis menggunakan perangkat lunak *SigmaPlot*. Analisis dilakukan berdasarkan algoritma yang berfungsi membandingkan variasi yang terdapat dalam populasi data. Signifikansi data dituntukan dengan nilai P dengan asumsi signifikan bila kurang dari hipotesis yang ditetapkan yaitu 0,05. Maka dua kelompok data yang memiliki nilai P kurang dari 0,05 dapat dipastikan bernilai signifikan secara statistik.