

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan selama 6 bulan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjajaran (FMIPA UNPAD), Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI).

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada tahap penyiapan biomassa *Spirulina fusiformis* adalah aerator, selang aerator, termometer, saringan kain (Tile), neraca analitik. Pada tahap isolasi dan karakterisasi alat yang digunakan adalah peralatan gelas, makropipet, labu takar, *ultrasonic cleaner Honda W-211*, spatula, mikropipet, *magnetic stirrer*, botol vial, *rotatory evaporator*, alat sentrifugasi, alat *freeze dryer*, *chamber KLT*, pinset, *set alat SDS-PAGE (Biorad)* dan *Shimadzu UV mini 1240*. Alat yang digunakan pada tahap pengujian aktivitas antioksidan adalah neraca analitik, spatula, labu takar, mikropipet, makropipet, corong leher pendek, batang pengaduk, gelas kimia, botol vial dan instrumen spektrofotometer *Shimadzu UV mini 1240*.

Pada penelitian ini bahan yang digunakan dalam tahapan penyiapan biomassa kering yaitu *Spirulina fusiformis* galur *wild type* (WT) dan galur mutan (MT) yang diperoleh dari Laboratorium Biologi FMIPA UNPAD, pelarut metanol 95%, n-heksan 95%, aseton 95%, dan air destilasi digunakan sebagai pelarut untuk ekstraksi pigmen *Spirulina fusiformis* galur WT dan MT. Garam ammonium sulfat digunakan untuk melakukan pemurnian pigmen fikosianin hasil isolasi. Bahan-bahan kimia tersebut diperoleh dari PT Bratacco Indonesia. Untuk pengujian aktivitas antioksidan pigmen kasar, pigmen ekstrak aseton, ekstrak n-heksan digunakan metanol 95% sebagai pelarut. Pigmen fikosianin hasil *freeze dry* diuji aktivitas antioksidan menggunakan metanol teknis dan air destilasi

sebagai pelarut. DPPH (*2,2 phenyl-1-picrylhydrazyl*) (Sigma) digunakan sebagai sumber radikal.

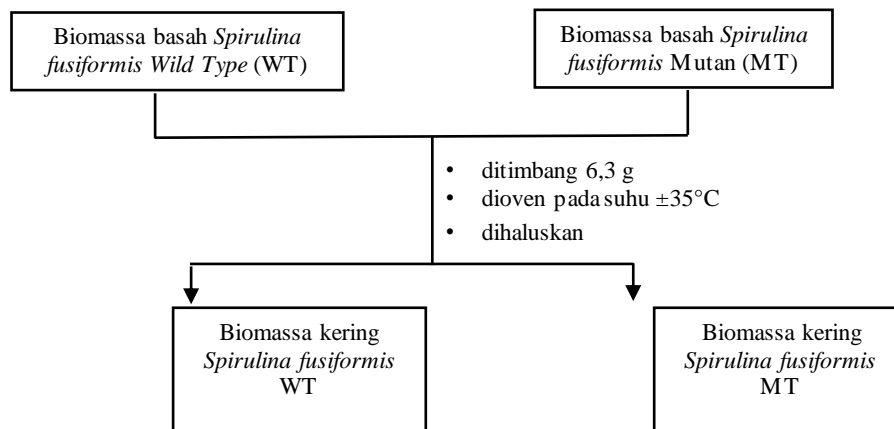
Bahan tersebut tersedia di Lab Riset Kimia Material dan Hayati FPMIPA UPI.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 3 tahap, yaitu tahap penyiapan biomassa kering *Spirulina fusiformis* galur *wild type* (WT) dan mutan (MT), tahap isolasi dan karakterisasi pigmen ekstrak metanol, pigmen fikosianin, pigmen ekstrak n-heksan, dan pigmen ekstrak aseton *Spirulina fusiformis* galur *wild type* (WT) dan mutan (MT), serta tahap pengujian aktivitas antioksidan pigmen-pigmen tersebut dengan metode DPPH. Penjelasan lebih lengkap untuk setiap tahapan penelitian tersebut dijelaskan pada uraian-uraian berikut.

3.3.1 Penyiapan Biomassa Kering *Spirulina fusiformis* Galur WT dan MT

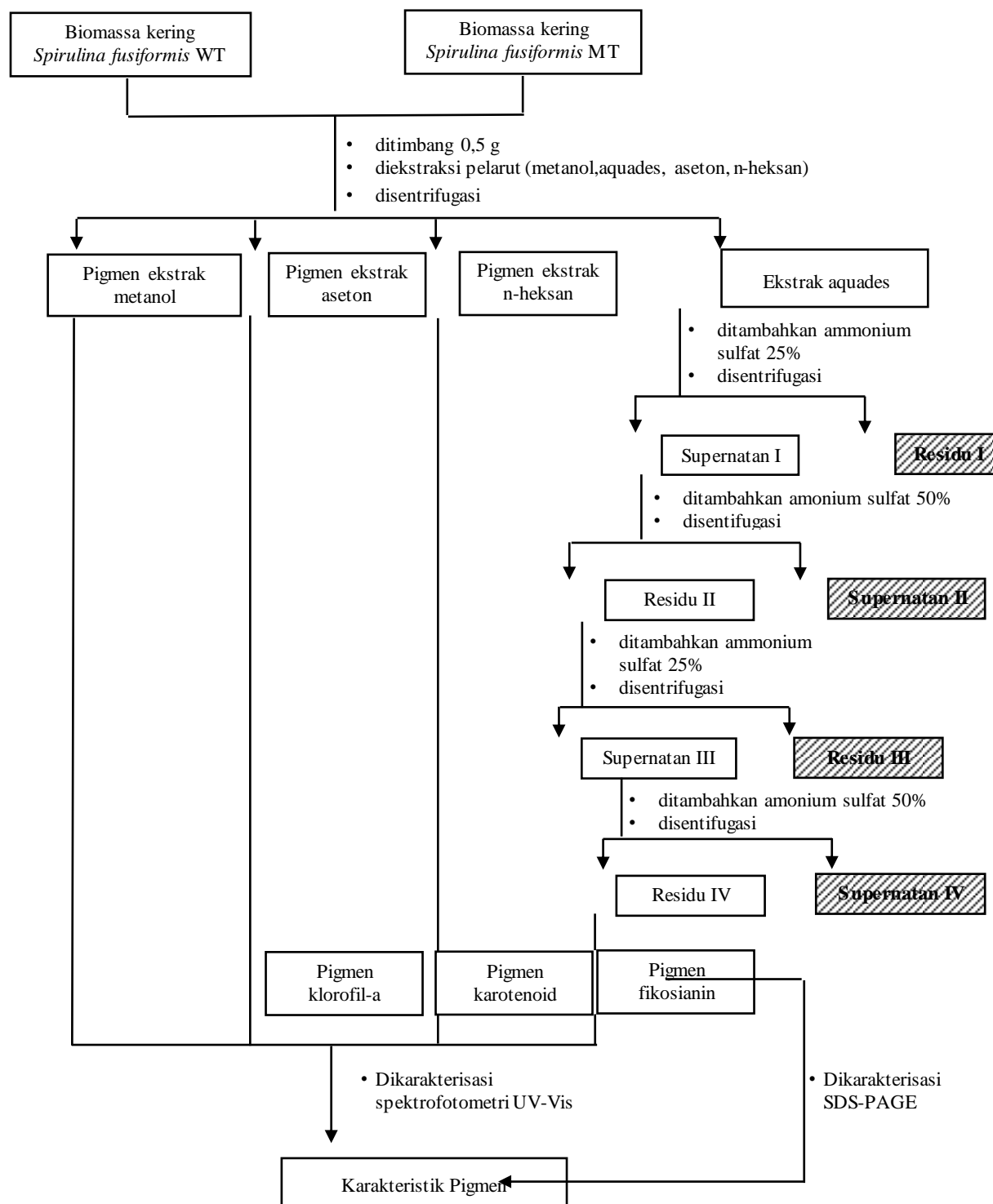
Penyiapan biomassa kering mikroalga *Spirulina fusiformis* galur WT dan MT menggunakan metode El-baky, *et al.* (2008) yang dimodifikasi. Biomassa kering diperoleh dengan menimbang biomassa basah mikroalga *Spirulina fusiformis* galur WT dan MT sebanyak 6,3 g kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya, biomassa kering dihomogenkan dengan cara digerus menggunakan lumpang dan alu. Prosedur penyiapan biomassa kering *Spirulina fusiformis* ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Tahap Penyiapan Biomassa Kering *Spirulina fusiformis* Galur WT dan MT

3.3.2 Isolasi dan Karakterisasi *Spirulina fusiformis* Galur WT dan MT

Isolasi dan karakterisasi pigmen dilakukan pada biomassa kering *Spirulina fusiformis* galur WT dan MT. Tahap isolasi dan karakterisasi pigmen *Spirulina fusiformis* galur WT dan MT secara umum ditunjukkan pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Tahap Isolasi dan Karakterisasi Pigmen-Pigmen *Spirulina fusiformis* Galur WT dan MT

3.3.2.1 Pigmen Ekstrak Metanol *Spirulina fusiformis* Galur WT dan MT

Tahap isolasi pigmen ekstrak metanol dilakukan dengan melarutkan sebanyak 0,5 g biomassa kering *Spirulina fusiformis* WT dan MT dalam 30 mL pelarut metanol, disonikasi selama 15 menit kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada 2500

rpm selama ± 3 jam pada suhu ruang, selanjutnya disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit. Residu hasil sentrifugasi dilarutkan kembali dalam 20 mL pelarut metanol, kemudian diaduk kembali dan disentrifugasi dengan perlakuan yang sama dengan sebelumnya. Teknik yang sama diulangi kembali kemudian supernatan yang diperoleh disimpan dalam ruang asap sampai kering. Pigmen ekstrak metanol dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 100 ppm dan dikarakterisasi dengan *scanning* spektrofotometri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-800 nm.

3.3.2.2 Pigmen Fikosianin *Spirulina fusiformis* WT dan MT

Sebanyak 0,5 g biomassa kering *Spirulina fusiformis* WT dan MT dilarutkan dalam 15 mL aquades, dilakukan sonikasi selama 15 menit dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu rendah ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) pada kecepatan 2500 rpm selama ± 4 jam, selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit (Kamble, *et al.*, 2013). Supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan amonium sulfat 25% pada suhu rendah sambil diaduk, kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan ditambahkan ammonium sulfat 50% untuk mengendapkan fikosianin, kemudian endapan dilarutkan kembali dalam aquades (Patel, *et al.*, 2005). Metode sentrifugasi yang digunakan mengalami modifikasi yaitu dengan dilakukan secara berulang dikarenakan kecepatan sentrifugasi yang rendah. Ekstrak fikosianin yang diperoleh kemudian difreeze *dry* selama 1 hari, sehingga diperoleh fikosianin dalam keadaan kering. Karakterisasi fikosianin dilakukan dengan metode spektrofotometri dengan melakukan *scanning* pada panjang gelombang 200-800 nm. Konsentrasi fikosianin dapat ditentukan melalui persamaan berikut (Bennett & Bogorad, 1973).

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

Karakterisasi lain yang digunakan pada ekstrak fikosianin adalah teknik SDS-PAGE yang diawali dengan menyiapkan *stacking* dan *separating gel* dari 40% akrilamid, Tris-Cl 1 M pH 6.8, 10% SDS, 10% amonium ferosulfat (APS), dan tetrametilen diamida (TEMED). Selain itu, digunakan pula *buffer running* yang disiapkan dari glisin, SDS, tribase dan aquades, sedangkan *buffer sampel* disiapkan dari Tris-Cl 1 M pH 6.8, 10% SDS, gliserol dan aquades. Gel dibuat dengan ketebalan 15 mm dan dimasukkan ke dalam alat SDS-PAGE, kemudian dimasukkan *running buffer* sampai gel terendam dan menyisakan bagian

sumur. Sampel yang telah dicampur *buffer* sampel kemudian dipipet ke dalam sumur pada gel sebanyak 20 μL . Marker yang digunakan dalam analisis adalah *pagerulertm plus Prestained protein ladder* sebanyak 20 μL . Alat SDS-PAGE diset pada tegangan 150 volt selama 40 menit kemudian dilakukan *staining* selama ± 20 jam menggunakan *Coomasie blue* yang dicampurkan dengan aquades dan CH_3COOH glasial. Gel yang telah *distaining* kemudian dilakukan *destaining* dengan merendam gel dalam larutan yang terdiri atas metanol, aquades dan CH_3COOH glasial.

3.3.2.3 Pigmen Ekstrak n-Heksan *Spirulina fusiformis* WT dan MT

Pada tahap ini biomassa kering *Spirulina fusiformis* WT dan MT sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 15 mL pelarut n-heksan, disonikasi selama 15 menit dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 5 jam, kemudian disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit. Residu dilarutkan kembali dalam 15 mL pelarut n-heksan kemudian dilakukan langkah yang sama dengan sebelumnya. Residu hasil sentrifugasi dilakukan dimaserasi menggunakan pelarut n-heksan selama 24 jam dan disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan yang diperoleh disimpan dalam ruang asap sampai kering (Promya, *et al.*, 2008). Metode yang digunakan merupakan hasil modifikasi untuk mengoptimasi ekstraksi pelarut menggunakan n-heksan. Penggunaan pelarut n-heksan bertujuan untuk mengekstraksi karotenoid secara maksimal. Konsentrasi total karotenoid ditentukan melalui persamaan berikut.

$$\text{Karotenoid}(\mu\text{mol/L}) = \frac{(A_{480} + (0,114 \times A_{663})) - (0,638 \times A_{645} \times V \times 10^3)}{112,5 \times W}$$

(Harborne, 1987 dalam Kurniawan, *et al.*, 2010).

Pigmen ekstrak n-heksan dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 100 ppm dan dikarakterisasi dengan *scanning* spektrofotometri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-800 nm.

3.3.2.4 Pigmen Ekstrak Aseton *Spirulina fusiformis* WT dan MT

Pigmen pada ekstrak aseton diisolasi menggunakan metode yang dilakukan Campana (2003) yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 g biomassa kering *Spirulina fusiformis* WT dan MT dilarutkan dalam 15 mL pelarut aseton, disonikasi selama 15 menit, kemudian diaduk

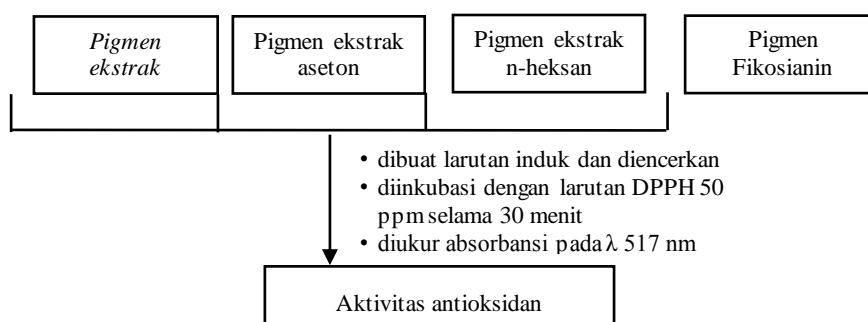
menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 5 jam dan disentrifugasi pada 1500 rpm selama 10 menit. Residu hasil sentrifugasi dilarutkan kembali dalam 15 mL pelarut aseton kemudian dilakukan langkah yang sama dengan sebelumnya. Residu hasil sentrifugasi dimaserasi menggunakan pelarut aseton selama 24 jam, disentrifugasi selama 10 menit pada 2000 rpm kemudian supernatan yang diperoleh disimpan dalam ruang asap sampai kering. Pigmen ekstrak aseton dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 100 ppm dan dikarakterisasi dengan *scanning* spektrofotometri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-800 nm. Konsentrasi klorofil yang diperoleh ditentukan menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Klorofil (mg/L)} = 25,5 \times A_{650} + 4 \times A_{665}$$

(Bajpai & Bajpai, 1993)

3.3.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pada pengujian aktivitas antioksidan, sampel yang digunakan adalah pigmen ekstrak metanol, pigmen fikosianin, pigmen ekstrak n-heksan dan pigmen ekstrak aseton. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode Jerley & Prabu (2015) yang dimodifikasi. Tahapan pengujian ini ditunjukkan Gambar 3.3



Gambar 3.3 Tahap Pengujian Aktivitas Antioksidan Pigmen-Pigmen *Spirulina fusiformis* Galur WT dan MT

3.3.3.1 Pengujian Aktivitas Antioksidan Pigmen Ekstrak Metanol WT dan MT

Pengujian ini diawali dengan membuat larutan induk pigmen ekstrak metanol WT dan MT pada konsentrasi 100 ppm dalam pelarut metanol 95%. Larutan induk diencerkan menjadi konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm dengan konsentrasi DPPH sebesar 50 ppm.

Sampel diinkubasi dengan larutan DPPH pada perbandingan 5:2 pada suhu ruang selama 30 menit. Sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

$$\text{Penangkapan radikal DPPH (\%)} = AB - \frac{AS}{AB} \times 100\%$$

(Jerley & Prabu, 2015)

3.3.3.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan Pigmen Fikosianin WT dan MT

Pengujian ini diawali dengan membuat larutan induk fikosianin WT dan MT pada konsentrasi 1000 ppm dalam pelarut campuran metanol:akuades (2:1). Larutan induk diencerkan menjadi konsentrasi 200, 400, 600, dan 800 ppm dengan konsentrasi DPPH sebesar 50 ppm. Sampel diinkubasi dengan larutan DPPH pada perbandingan 3:1 pada suhu ruang selama 30 menit. Sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

$$\text{Penangkapan radikal DPPH (\%)} = AB - \frac{AS}{AB} \times 100\%$$

(Jerley & Prabu, 2015)

3.3.3.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan Pigmen Ekstrak n-Heksan WT dan MT

Pengujian ini diawali dengan membuat larutan induk pigmen ekstrak n-heksan WT dan MT pada konsentrasi 1000 ppm dalam pelarut campuran metanol:akuades (2:1). Larutan induk diencerkan menjadi konsentrasi 200, 400, 600 dan 800 ppm dengan konsentrasi DPPH sebesar 50 ppm. Sampel diinkubasi dengan larutan DPPH pada perbandingan 5:2 pada suhu ruang selama 30 menit. Sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

$$\text{Penangkapan radikal DPPH (\%)} = AB - \frac{AS}{AB} \times 100\%$$

(Jerley & Prabu, 2015)

3.3.3.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan Pigmen Ekstrak aseton WT dan MT

Pengujian ini diawali dengan membuat larutan induk pigmen ekstrak aseton WT dan MT pada konsentrasi 100 ppm dalam pelarut metanol 95%. Larutan induk diencerkan menjadi konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm dengan konsentrasi DPPH sebesar 50 ppm. Sampel diinkubasi dengan larutan DPPH pada perbandingan 3:1 pada suhu ruang selama

30 menit. Sampel kemudian diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

$$\text{Penangkapan radikal DPPH (\%)} = AB - \frac{AS}{AB} \times 100\%$$

(Jerley & Prabu, 2015)