

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada Bulan Maret sampai Agustus 2019. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia serta Laboratorium Biokimia di Gedung Pusat Penelitian Universitas Padjajaran.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

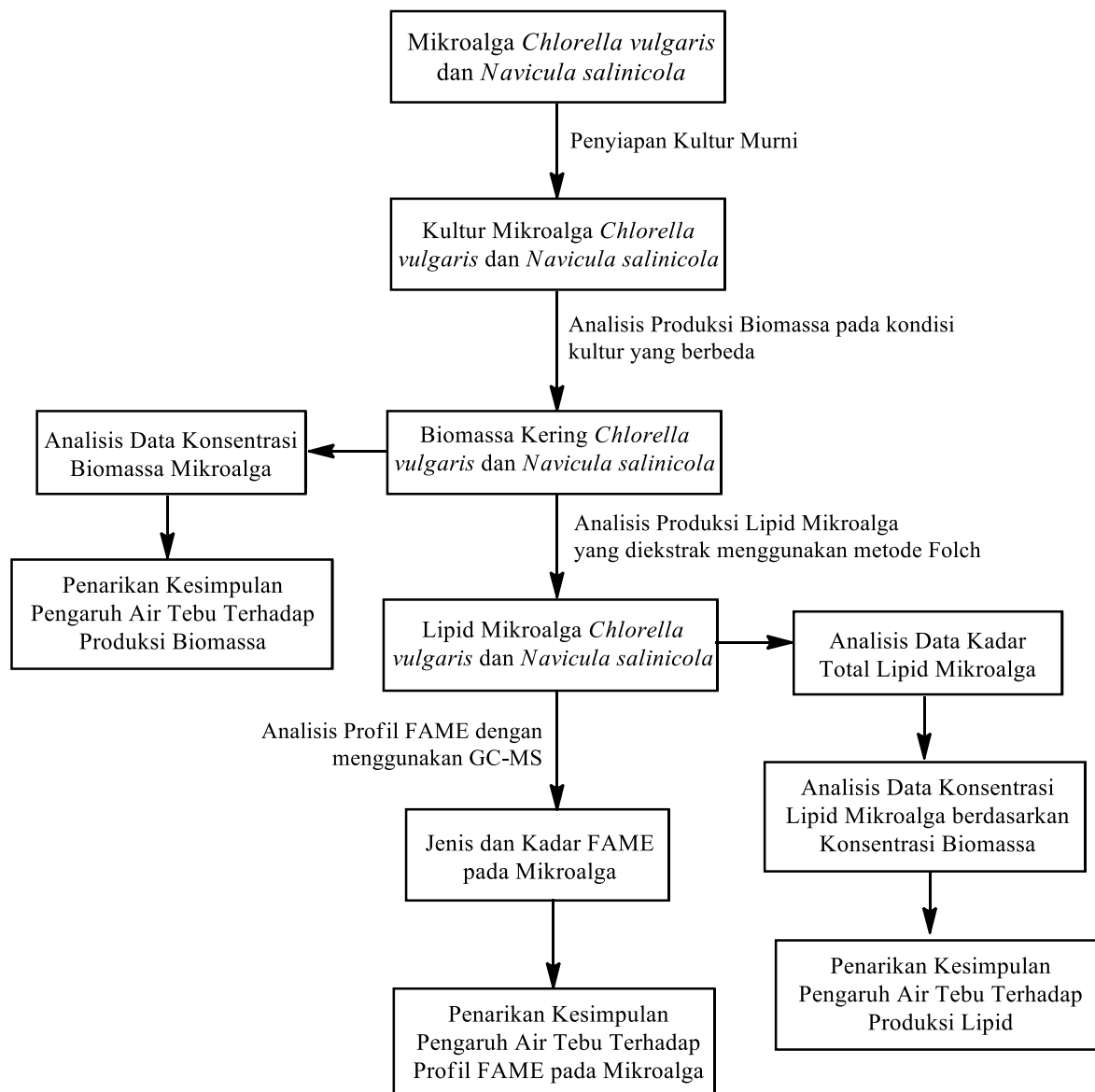
Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah; 1) Penyiapan kultivasi murni: autoklaf, *syringe*, botol steril; pipa L steril; aerator akuarium; selang; mikropipet 1000 μ L dan 100 μ L; dan lampu putih, 2) Analisis biomassa pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola* dengan kondisi kultivasi autotropik dan fotoheterotropik: botol steril; pipa L steril; fotobioreaktor sederhana; gelas ukur steril; mikropipet 1000 μ L dan 200 μ L; *freeze dry*; dan neraca analitik, 3) Analisis konsentrasi lipid pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola*: neraca analitik; gelas kimia; pipet; tabung sentrifus; *shaker*; dan botol vial, 4) Analisis FAME: gelas kimia; pipet; hotplate; dan GC-MS.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola*, medium Walne, vitamin B₁ dan B₁₂, larutan NaSi₂O₃, air tebu, aluminium foil, kloroform p.a, metanol p.a, NaCl 0,9%, BF₃-metanol. Mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola* diperoleh dari Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

3.3. Metode Penelitian

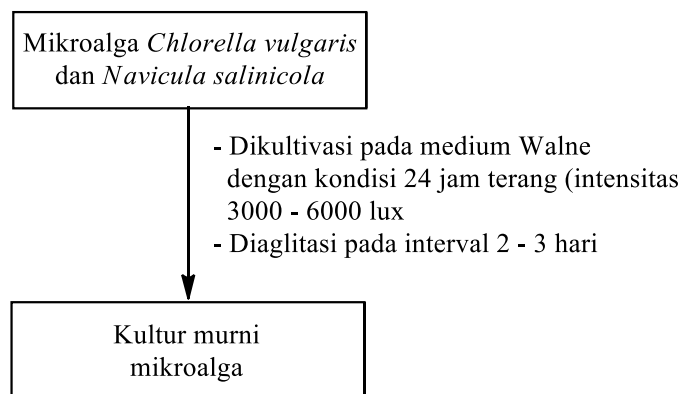
Secara garis besar, metode penelitian yang dilakukan yaitu; 1) Kultivasi murni, 2) Analisis biomassa pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola*, 3) Analisis konsentrasi lipid pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola*, 4) Analisis *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME). Skema penelitian ini secara umum dapat ditunjukkan seperti pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3. 1. Skema Penelitian.

3.3.1. Kultivasi Murni

Mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola* dikultivasi pada botol 1 L dengan kondisi kultivasi autotropik (24 jam terang) dalam medium Walne sebanyak 900 μ L. Medium ini berdasarkan Barsanti (2006) mengandung $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,3 mg/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mg/L; H_3BO_3 33,6 mg/L; Na_2EDTA 45 mg/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L; NaNO_3 0,1 g/L; ZnCl_2 0,021 mg/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 mg/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,9 mg/L; dan HCl pekat 0,0001 mL/L serta tambahan mikronutrien yaitu vitamin B₁ 0,1 mg/L dan vitamin B₁₂ 0,005 mg/L sebanyak 90 μ L. Khusus untuk *Navicula salinicola*, ditambahkan juga larutan NaSi_2O_3 sebanyak 450 μ L. Sebelumnya, untuk air laut, medium, vitamin, dan larutan NaSi_2O_3 yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Air laut, medium, dan larutan NaSi_2O_3 disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm, sedangkan untuk vitamin disterilisasi dengan menggunakan *syringe* dan filter steril dengan ukuran 0,45 μ m. Kultivasi ini dilakukan di bawah cahaya dengan lampu berwarna putih dengan intensitas 3000 – 6000 lux pada suhu kamar. Kultur diaglitasi pada interval 2 – 3 hari. Bagan alir metode ini ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3. 2. Bagan Alir Kultivasi Murni Mikroalga

3.3.2. Analisis Biomassa pada Mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola* dengan Kondisi Kultivasi Autotropik dan Fotoheterotropik.

Analisis biomassa pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola* dengan kondisi kultivasi autotropik dan fotoheterotropik digunakan mikroalga

Chlorella vulgaris dan *Navicula salinicola* yang ditumbuhkan pada medium Walne sebanyak 900 μL dan mikronutrien (vitamin B₁ dan vitamin B₁₂) sebanyak 90 μL , serta tambahan larutan NaSi₂O₃ sebanyak 450 μL untuk *Navicula salinicola*. Intensitas cahaya yang digunakan adalah pada 3000 – 6000 lux yang diukur dengan menggunakan *lux meter*. Air tebu yang digunakan diperoleh dari penjual sari tebu di daerah Ledeng, Bandung. Sebelum digunakan, air tebu dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf. Konsentrasi air tebu yang digunakan sebagai sumber karbon organik mengikuti metode yang digunakan oleh Mondal *et al.* (2017b) yaitu sebesar 5 g/L.

Kultivasi ini dilakukan selama periode 15 hari. Pemanenan dilakukan dengan menggunakan teknik sentrifugasi pada hari ke 15 yang selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry*. Biomassa kering yang diperoleh ditimbang dan dikonversi menjadi konsentrasi biomassa dalam satuan gram/L. Bagan alir metode ini ditunjukkan pada **Gambar 3.3**.

3.3.3. Analisis Konsentrasi Lipid Pada *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola*.

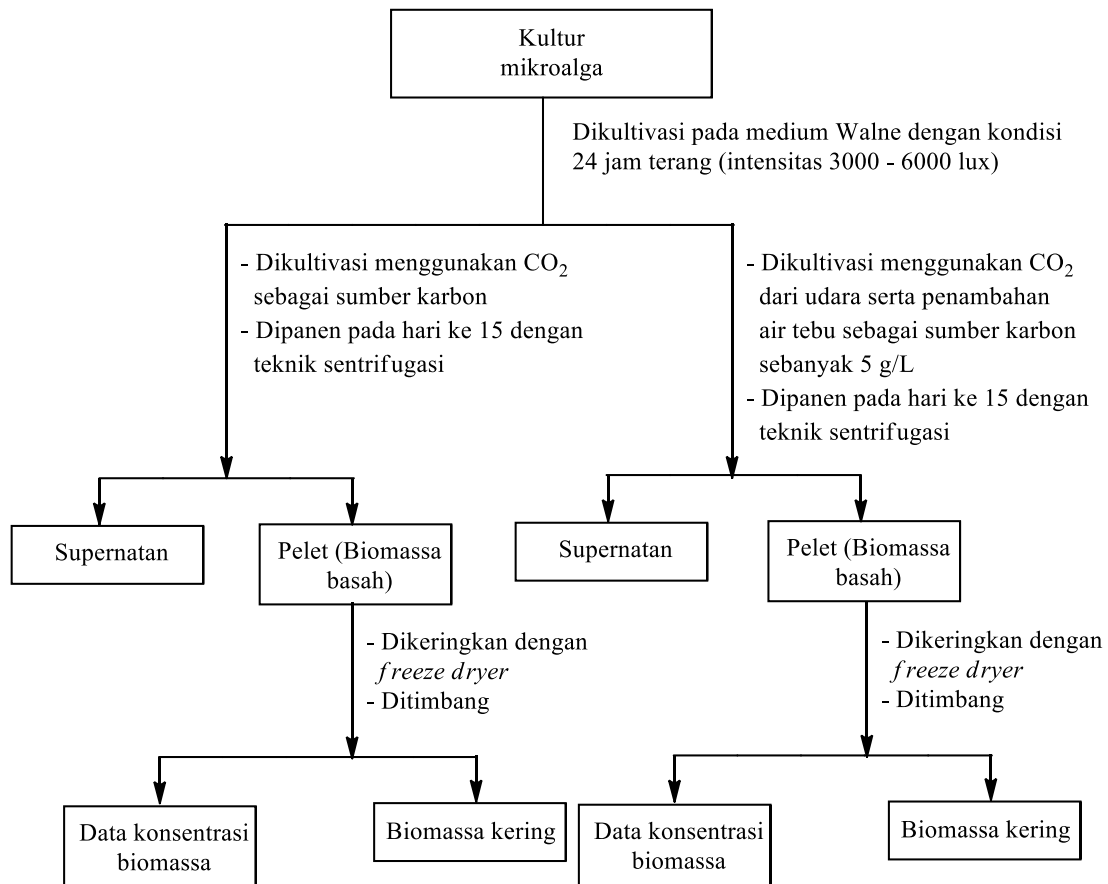
Kadar total lipid ditentukan dengan menggunakan metode Folch yang sudah dimodifikasi (Mondal, *et al.* 2017b). Biomassa *Chlorella vulgaris* dan *Navicula salinicola* kering yang diperoleh dari hasil panen hari ke 15 ditimbang sebanyak 0,3 gram dan dihaluskan terlebih dahulu dengan menggunakan lumpang alu. Kemudian, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 15 mL. Kemudian dimasukkan 3,5 mL metanol dan diinkubasi pada 160 rpm selama satu jam. Inkubasi dilanjutkan pada 160 rpm selama dua jam setelah ditambahkan 7 mL kloroform. Setelah inkubasi, dilakukan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit dan supernatan dituangkan ke dalam tabung sentrifus sedangkan pelet diekstrak kembali dengan menggunakan prosedur yang sama.

Supernatan yang diperoleh dicuci dengan menggunakan NaCl 0,9% sebanyak 4,5 mL lalu disentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit. Sentrifugasi akan mempercepat proses pemisahan supernatan menjadi dua lapisan. Lapisan bawah, yang merupakan kloroform dan lipid, diambil dan dimasukkan kembali pada tabung sentrifus

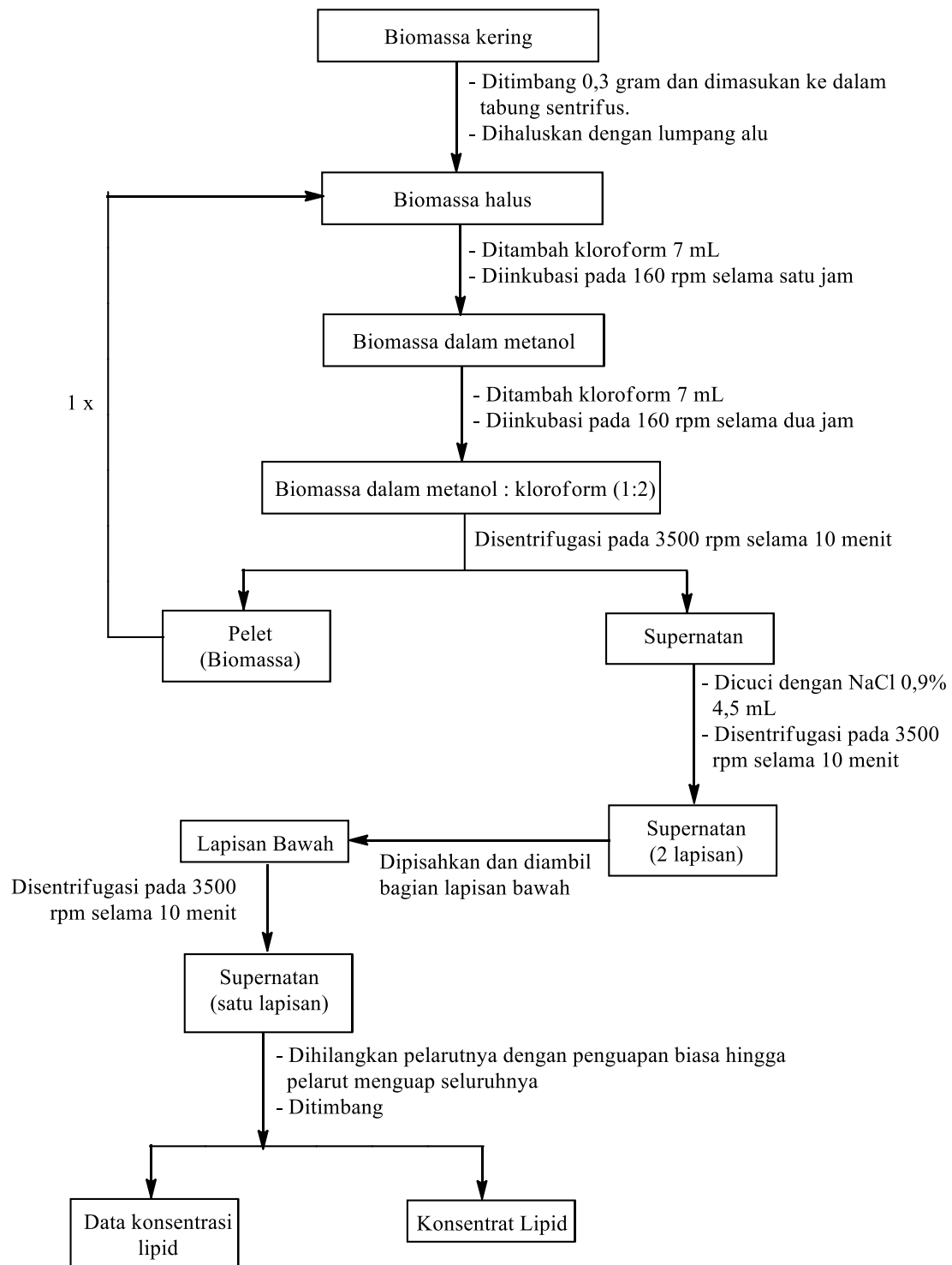
lain lalu disentrifugasi kembali untuk mengeleminasi seluruh air dan padatan yang tertinggal sehingga diperoleh larutan ekstrak. Larutan tersebut selanjutnya diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh konsentrat dengan massa yang konstan. Konten total lipid dapat diperoleh dalam bentuk % *dry cell weight* (DCW) dengan menggunakan persamaan (1). Selanjutnya, konsentrasi lipid dapat diperoleh dalam bentuk gram lipid tiap 1 Liter kultur dengan menggunakan persamaan (2). Bagan alir metode ini ditunjukkan pada **Gambar 3.4**.

$$\text{Total Lipid (\% DCW)} = \left(\frac{\text{massa lipid}}{\text{massa biomassa}} \right) \times 100\% \dots\dots\dots \text{pers. (1)}$$

$$\text{Konsentrasi lipid (g/L)} = \text{Konsentrasi biomassa (g/L)} \times \text{Kadar Total Lipid (\%)} \dots\dots\dots \text{pers. (2)}$$



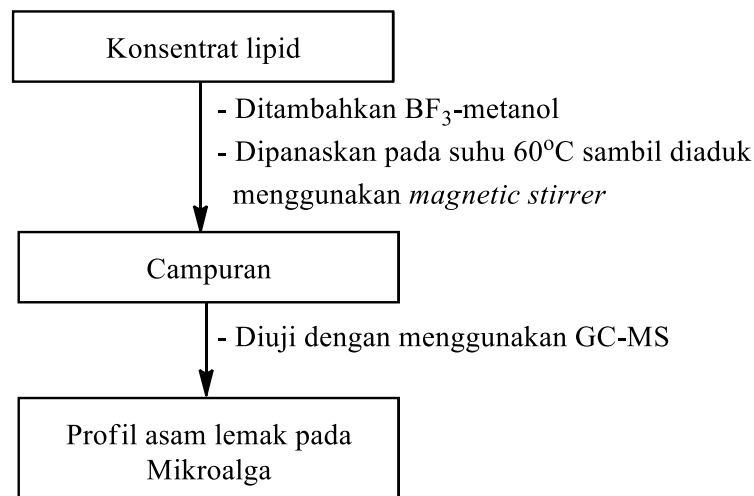
Gambar 3.3. Bagan Alir Analisis Biomassa Pada Berbagai Mikroalga Dengan Berbagai Kondisi Kultivasi.



Gambar 3. 4. Bagan Alir Analisis Konsentrasi Lipid Pada Berbagai Mikroalga

3.3.4. Analisis *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME)

Lipid hasil ekstraksi adalah sampel yang digunakan untuk analisis FAME. Ekstrak lipid ini dilakukan transmetilasi dengan menggunakan larutan BF_3 -metanol yang dimodifikasi dari penelitian Liu *et al.* (2017). Campuran dipanaskan pada suhu sekitar 60°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Campuran yang dihasilkan digunakan untuk analisis menggunakan GC-MS Shimadzu. Campuran dialirkan melalui kolom kapiler DB5MS menggunakan helium sebagai gas pembawa dengan laju 1,31 mL/menit. Suhu injektor diset pada 280°C sedangkan suhu detektor untuk sumber ion 230°C dan untuk *interface* 250°C . Bagan alir metode ini ditunjukkan pada **Gambar 3.5**.



Gambar 3. 5. Bagan Alir Analisis *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME)