

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Maret sampai Agustus 2019. Penelitian di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI). Salah satu tahapan penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini bergantung dari tahapan penelitian yang dilakukan. Pembuatan pelarut fikosianin menggunakan gelas kimia 1 L, *magnetic bar*, *magnetic stirrer* dan *heater* (IKA C-MAG HS 7), pH meter (Mc2014 Mettler Toledo), corong *buchner* (diameter 8 cm). Pada tahap penelitian uji stabilitas dan stabilitas antioksidan pigmen fikosianin dari *Spirulina platensis* terhadap sinar UV-A dan UV-B digunakan botol timbang, neraca analitik (AL204 Mettler Toledo), spatula, labu takar 100 mL, pipet tetes, corong gelas (diameter 5 cm), kertas hisap, batang pengaduk, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 2 mL, ball pipet, botol vial, lampu UV-A (T5 8 watt EVACO) dan lampu UV-B (TL 18 watt Neon Exoterra) . Untuk penentuan konsentrasi dan persen inhibisi radikal bebas digunakan Spektrofotometer UV-Vis (UV 1240 Shimadzu). Pada uji aktivitas bakteristatik terhadap *Propionibacterium acnes* digunakan jangka sorong, *laminar air flow*, labu erlenmeyer, cawan petri, kawat ose, inkubator/ inkubator CO₂, *shaking* inkubator, pinset, spirtus, mikropipet, *autoclave*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *96-well microplate*, tip pipet, *microtube*, Spektrofotometer UV-Vis, kuvet.

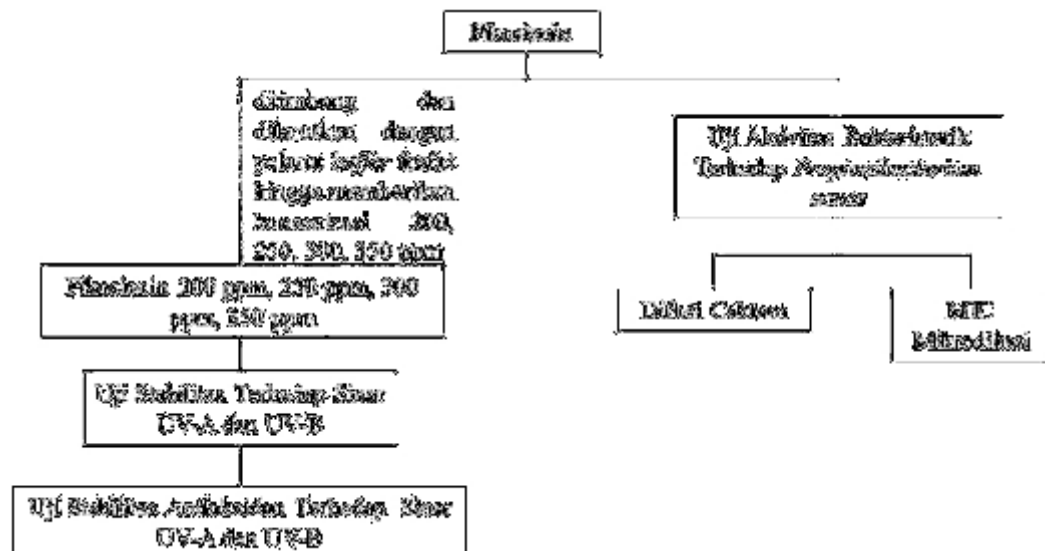
3.2.2. Bahan

Fikosianin dari *Spirulina platensis* diperoleh dengan ekstraksi dan pengeringan yang telah terkarakterisasi oleh Tim Mikroalga Kimia UPI. Bahan yang digunakan dalam pembuatan pelarut fikosianin diantaranya aquades, natrium

fosfat (NaH_2PO_4 , teknis), dinatrium fosfat (Na_2HPO_4 , teknis). Bahan yang digunakan dalam uji antioksidan diantaranya *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH, sigma aldrich) dan metanol (CH_3OH , p.a). bahan yang digunakan pada pengujian aktivitas bakteristatik terhadap *Propionibacterium acnes* adalah *paperdisk*, metanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), etanol 70%, akuabides, kapas lidi, kontrol antibiotik (tetrasiklin), bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC, *Mueller Hinton Agar*, *Mueller Hinton Broth*, *nutrient agar*, *nutrient broth*, parafilm, kontrol pelarut, *Tryptone Soya Broth*, *Tryptone Soya Broth Trisalt*, *agar bacteriological*.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu; 1) Uji Stabilitas Pigmen Fikosianin dari *Spirulina platensis* Terhadap Sinar UV-A dan UV-B; 2) Uji Stabilitas Antioksidan Pigmen Fikosianin dari *Spirulina platensis* Terhadap Sinar UV-A dan UV-B; 3) Uji Aktivitas Bakteristatik Pigmen Fikosianin dari *Spirulina platensis* Terhadap *Propionibacterium acnes*. Alur penelitian tersebut digambarkan seperti pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skema alur penelitian.

3.3.1. Uji Stabilitas Pigmen Fikosianin dari *Spirulina platensis* Terhadap Sinar UV-A dan UV-B

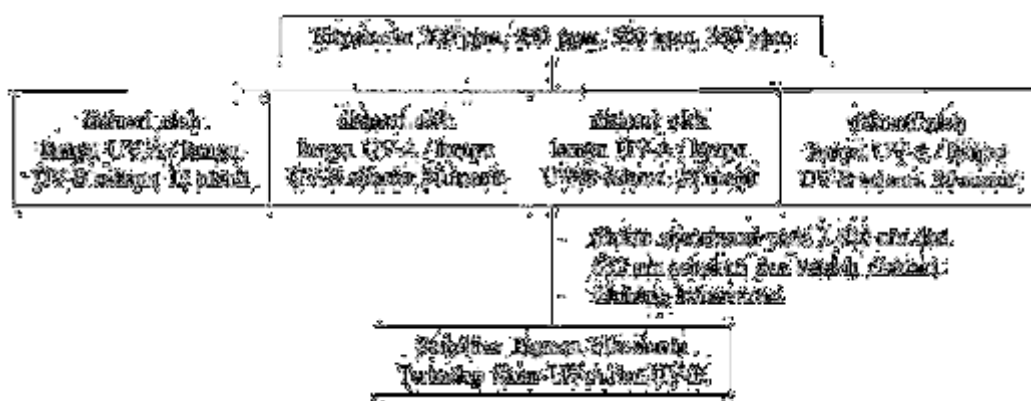
Prosedur pengujian stabilitas pigmen fikosianin menggunakan metode dari Rastogi *et al.* (2015) dengan beberapa modifikasi dan penyesuaian. Fikosianin dalam bentuk padatan ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan yaitu 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, dan 350 ppm dilarutkan dengan pelarut *buffer* fosfat pH 7. Fikosianin konsentrasi 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm disinari menggunakan lampu UV-A selama 15 menit, 20 menit, 25 menit, dan 30 menit. Ditentukan absorbansi pada panjang gelombang 620 nm dan 652 nm untuk menentukan konsentrasi fikosianin. Konsentrasi fikosianin ditentukan secara spektroskopi menggunakan persamaan berikut.

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

Keterangan : A_{620} = absorbansi sampel pada panjang gelombang 620 nm

A_{652} = absorbansi sampel pada panjang gelombang 652 nm

Untuk pengujian stabilitas pigmen fikosianin terhadap sinar UV-B dilakukan dengan prosedur yang sama dengan uji stabilitas pigmen fikosianin terhadap sinar UV-A, namun digunakan lampu UV-B. Tahapan uji stabilitas pigmen fikosianin dari *Spirulina platensis* terhadap sinar UV ditunjukkan pada Gambar 3.2. Pengujian stabilitas pigmen fikosianin terhadap sinar UV-A dan UV-B dilakukan duplo.



Gambar 3.2. Skema pengujian stabilitas pigmen fikosianin dari *Spirulina platensis* terhadap sinar UV-A dan UV-B.

3.3.2. Uji Stabilitas Antioksidan Pigmen Fikosianin dari *Spirulina platensis* Terhadap Sinar UV-A dan UV-B

Pengujian stabilitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH radikal. Prosedur pengujian menggunakan metode dari Brand William *et al.* (1995) dengan beberapa modifikasi dan penyesuaian. Fikosianin dengan konsentrasi 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, dan 350 ppm yang telah disinari dengan lampu UV-A dan lampu UV-B diambil sebanyak 4 mL dan dipindahkan ke botol vial yang ditutupi aluminium foil. Lalu ditambahkan 2 mL larutan DPPH 40 ppm. Larutan DPPH 40 ppm dibuat dengan menimbang padatan DPPH sebanyak yang dibutuhkan dan dilarutkan dengan metanol. Fikosianin yang telah ditambahkan larutan DPPH 40 ppm diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm.

Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dua kali (duplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi ditentukan menggunakan persamaan berikut.

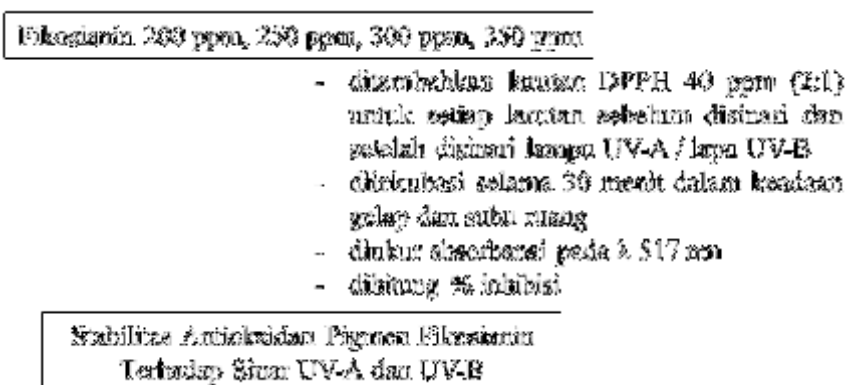
$$Q = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Keterangan: Q = persen inhibisi aktivitas radikal bebas

A_{kontrol} = absorbansi kontrol (pelarut+DPPH)

A_{sampel} = absorbansi sampel (fikosianin+DPPH)

Tahapan uji stabilitas antioksidan pigmen fikosianin dari *Spirulina platensis* terhadap sinar UV-A dan UV-B ditunjukkan pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Skema pengujian stabilitas antioksidan pigmen fikosianin dari *Spirulina platensis* terhadap sinar UV-A dan UV-B.

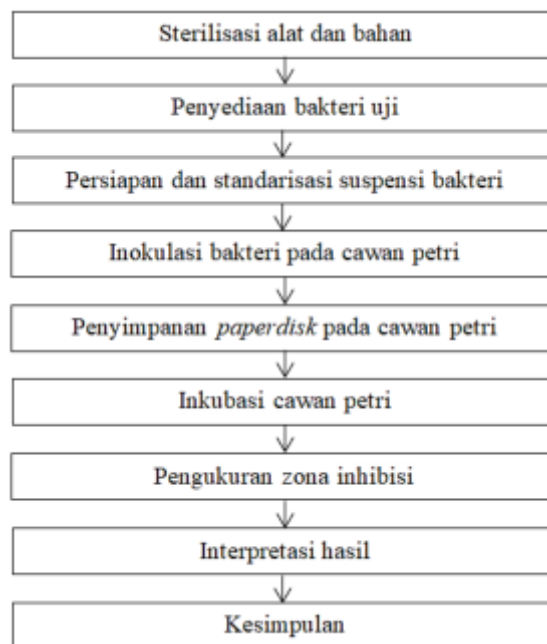
3.3.3. Uji Aktivitas Bakteristatik Pigmen Fikosianin dari *Spirulina platensis* Terhadap *Propionibacterium acnes*

Pengujian aktivitas bakteristatik pigmen fikosianin dari *Spirulina platensis* terhadap *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan dua metode. Metode yang pertama yaitu difusi cakram dan yang kedua yaitu *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) mikrodilusi.

3.3.3.1. Metode Difusi Cakram

Prosedur metode uji difusi cakram mengacu pada *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* (2005). Pertama-tama dilakukan sterilisasi alat dan bahan. Alat dan bahan yang akan digunakan di sterilkan terlebih dahulu dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Untuk penyediaan bakteri, bakteri uji yaitu *Propionibacterium acnes* ditanamkan di atas permukaan media agar dengan memilih beberapa koloni bakteri menggunakan kawat ose steril, di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan persiapan dan standarisasi suspensi bakteri. Bakteri disuspensikan kedalam media cair, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Kekekruhan suspensi bakteri distandarisasi setara dengan standar 0,5 Mc Farland. Lalu dilakukan uji antibakteri dengan menyiapkan cawan petri berisi media agar pada suhu kamar selama 10-15 menit. Vortex suspensi bakteri hingga homogen kemudian dimasukkan kapas lidi steril kedalam suspensi, dioleskan pada lapisan agar secara merata, dibiarkan selama 15 menit agar bakteri berada pada media agar. Kemudian, disiapkan *paperdisk* steril yang telah dijenuhkan oleh sampel, disimpan *paperdisk* pada lapisan atas agar yang telah dioleskan bakteri, di inkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan diukur zona inhibisi yang terbentuk.

Pengukuran zona inhibisi yang terbentuk menggunakan jangka sorong (mengukur diameter/jari-jari zona inhibisi). Tahapan pengujian menggunakan metode difusi cakram ditunjukkan pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Skema tahapan uji metode difusi cakram.

3.3.3.2. MIC Mikrodilusi

Prosedur MIC mikrodilusi mengacu pada *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (2005) dan *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (2009). Pada metode MIC perlu dilakukan juga sterilisasi alat dan bahan. Alat dan bahan yang akan digunakan di sterilkan terlebih dahulu dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Bakteri uji ditanamkan di atas permukaan media agar dengan memilih beberapa koloni bakteri menggunakan kawat ose steril, di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Dalam persiapan dan standarisasi suspensi bakteri disuspensikan kedalam media cair, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Kemudian, kekeruhan suspensi bakteri distandarisasi setara dengan standar 0,5 Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL), lalu diencerkan dengan perbandingan 1:20 untuk menjadi suspensi dengan kepadatan 5×10^5 CFU/mL.

Pada 96-well *microplate* disiapkan dengan format: Media+Sampel (Kontrol Sampel), Media+Pelarut (Kontrol Pelarut), Media+Sampel+Bakteri (Sample Uji), Media+Pelarut+Bakteri (Pelarut Uji). Kemudian, dimasukkan media cair sebanyak 100µL ke dalam *microplate*, dimasukkan sample sebanyak

100 μ L kedalam well pertama microplate lalu dilakukan pengenceran bertingkat, dan dimasukkan suspensi bakteri sebanyak 10 μ L ke dalam *microplate*. Inkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam. Kemudian diukur absorbansinya pada λ 620 nm.

MIC terletak pada rentang konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (bening, sesuai dengan kontrol negatif) dan konsentrasi pertama yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (keruh). Persen kematian sel ditentukan menggunakan persamaan berikut.

$$\% \text{ Kematian sel} = \frac{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol sampel}}) - (A_{\text{pelarut}} - A_{\text{kontrol pelarut}})}{(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol sampel}})} \times 100$$

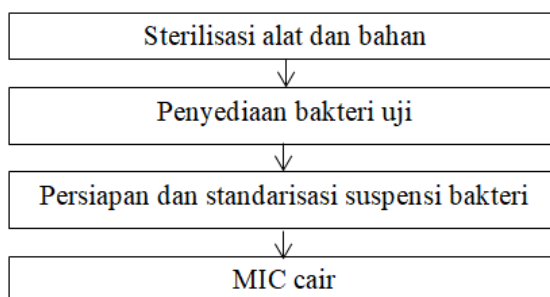
Keterangan : A_{sampel} = absorbansi sampel perlakuan

$A_{\text{kontrol sampel}}$ = absorbansi kontrol sampel

A_{pelarut} = absorbansi pelarut perlakuan

$A_{\text{kontrol pelarut}}$ = absorbansi kontrol pelarut

Tahapan uji metode MIC ditunjukkan pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5. Skema tahapan uji metode MIC.