

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan selama bulan Februari sampai bulan Agustus 2019. Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia 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

3.2.1 Alat

Pada pembuatan larutan buffer digunakan alat pH meter Mettler Toledo, batang magnet, *magnetic stirrer* Thermo Scientific CIMAREC dan alat – alat gelas lainnya. Alat dalam metode ekstraksi dan pemurnian fikosianin menggunakan alat *magnetic stirrer* WiseStir MSH-20D, *centrifuge* Kokusan H103-n, batang magnet dan alat – alat gelas lainnya. Metode *crosslink* atau modifikasi fikosianin digunakan alat *magnetic stirrer* WiseStir MSH-20D, batang magnet dan alat – alat gelas lainnya.

Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-Mini 1240, FT/IR-4100 Jasco, dan Mini-PROTEAN Tetra Cell-BIO-RAD digunakan dalam metode karakterisasi fikosianin dan fikosianin-formaldehid. Fungsi dari alat – alat tersebut secara berturut – turut adalah mengukur serapan UV-Vis dari fikosianin dan fikosianin formaldehid, mengukur spektrum IR dari fikosianin dan fikosianin-formaldehid, dan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul dari fikosianin dan fikosianin-formaldehid. Metode pengamatan fotostabilitas dari fikosianin dan fikosianin-formaldehid digunakan set alat dengan 1 lampu LED putih Philips (18W), 1 lampu LED kuning SEMNY LIGHTING (14W), 1 set alat lampu UV A T5 EVACO (8W) dan 1 set alat lampu UV B TL 18 Neon Exoterra. Metode pengamatan stabilitas termal digunakan alat Lab. *Incubator DigiSystem* Inst.Lab.

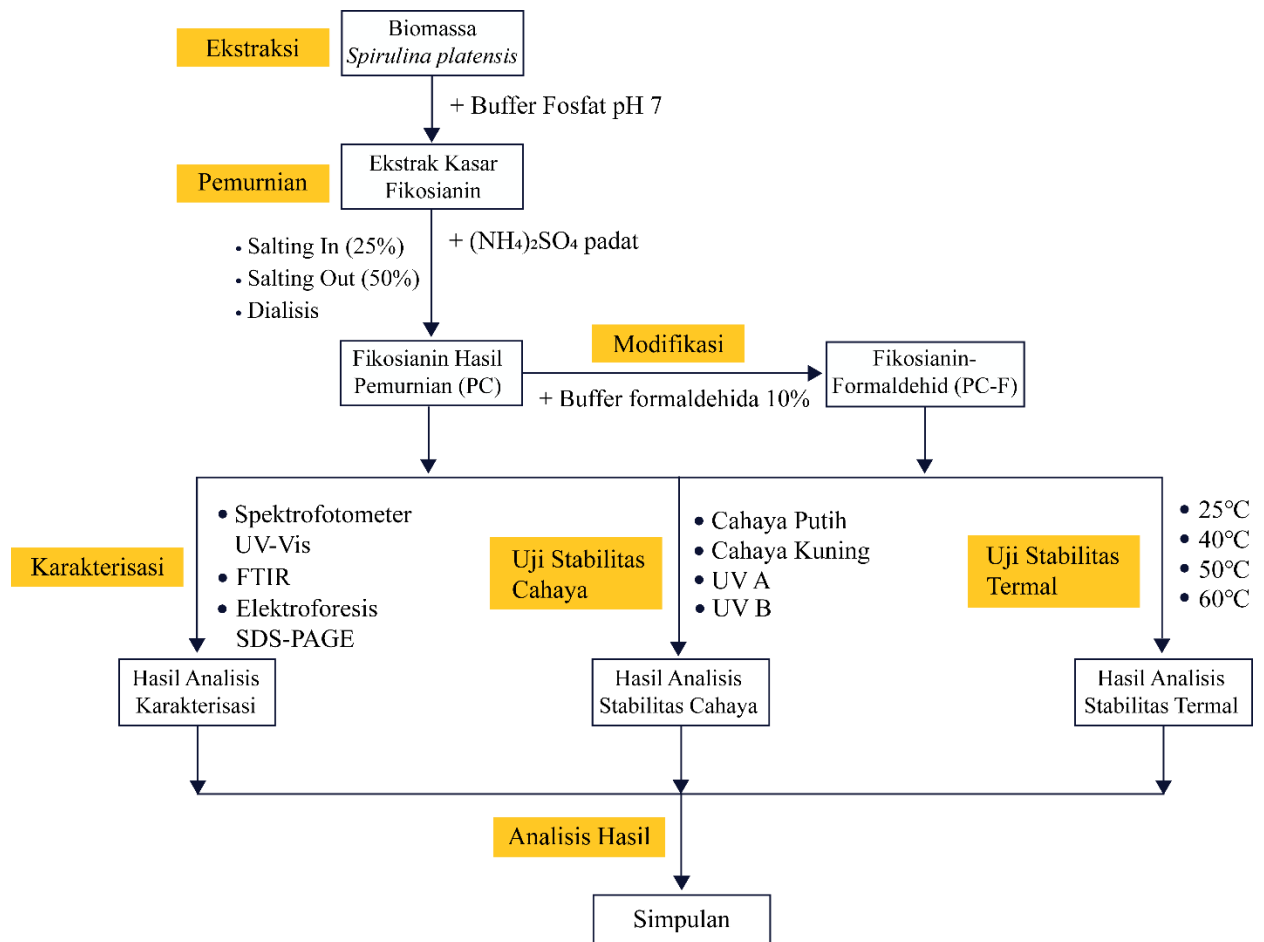
3.2.2 Bahan

Fikosianin yang digunakan adalah hasil ekstraksi dan pemurnian dari mikroalga *Spirulina platensis*. Aquadest, natrium fosfat (NaH_2PO_4 , teknis), dan dinatrium fosfat (Na_2HPO_4 , p.a) yang digunakan untuk membuat larutan buffer

fosfat sebagai pelarut ekstraksi fikosianin. Garam Amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) digunakan untuk proses pemurnian fikosianin, dan membran selulosa digunakan sebagai membran dialisis fikosianin dan fikosianin-formaldehid. Formaldehid 37% (teknis) digunakan dalam proses modifikasi fikosianin.

3.3 Prosedur Penelitian

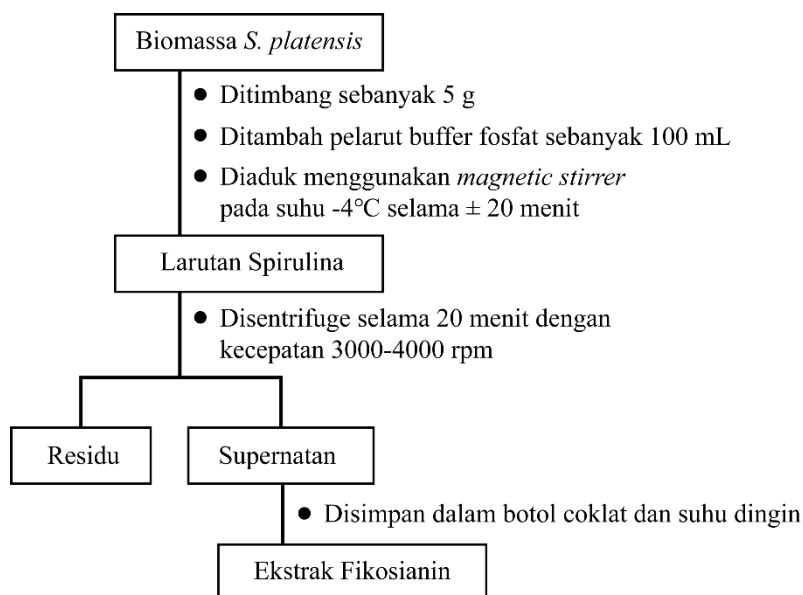
Penelitian ini terdiri dari; 1) Ekstraksi dan Pemurnian, 2) Modifikasi Fikosianin dengan Formaldehid, 3) Karakterisasi Pigmen Fikosianin (PC) dan Fikosianin-Formaladehid (PC-F), 4) Pengamatan Stabilitas Cahaya Fikosianin (PC) dan Fikosianin-Formaldehid (PC-F), 5) Pengamatan Stabilitas Termal Fikosianin (PC) dan Fikosianin-Formaldehid (PC-F). Skema alur penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Skema Penelitian.

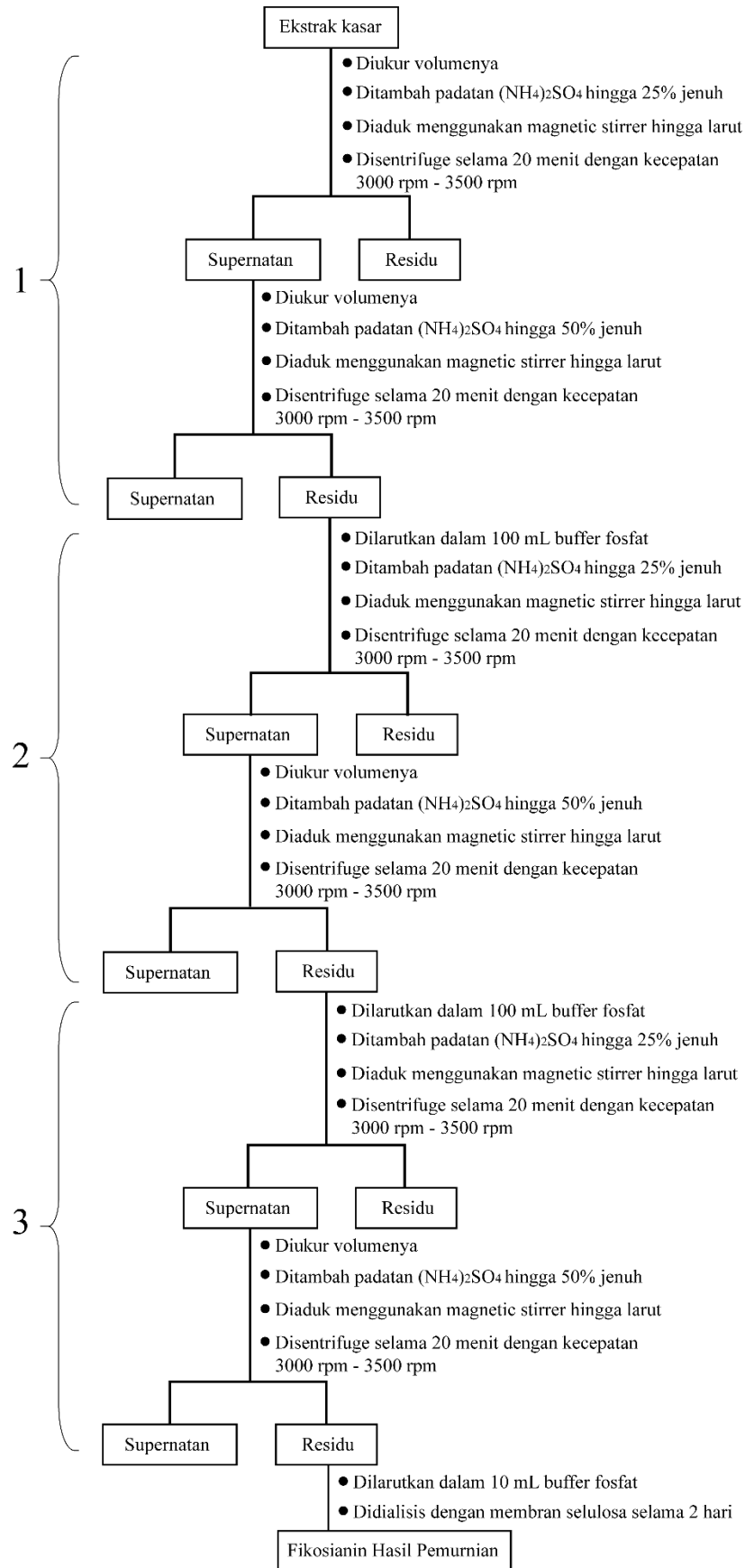
3.3.1 Ekstraksi dan Pemurnian

Tahap ekstraksi fikosianin menggunakan metode maserasi didasarkan pada Kamble, Gaikar, Padalia, & Shinde, (2013) dan dilakukan beberapa penyesuaian. Ekstraksi fikosianin menggunakan larutan buffer fosfat sebagai pelarut dengan perbandingan 1:20 (w/v) yang didasarkan pada Wang & Zhang, (2017) Biomassa *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Lalu ditambah larutan buffer fosfat sebanyak 100 mL dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu -4°C selama ± 20 menit. Larutan tersebut disentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 3000-4000 rpm. Supernatan hasil sentrifuge merupakan ekstrak kasar fikosianin dan disimpan dalam botol gelap. Tahap ini divisualisasikan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2. Tahapan Ekstraksi Fikosianin dengan Metode Maserasi.

Pemurnian fikosianin dilakukan dengan metode *salting out* oleh garam ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang didasarkan pada Munawaroh, Darojatun, Gumilar, Aisyah, & Wulandari, (2018). Proses pemurnian fikosianin meliputi penjenuhan ammonium sulfat 25% dan penjenuhan ammonium sulfat 50% yang dilakukan sebanyak tiga kali. Pada penjenuhan 25% akan diperoleh residu warna kehijauan dan supernatan warna biru. Kemudian pada supernatan tersebut dilakukan penjenuhan 50% yang akan memperoleh residu warna biru dan supernatan tak berwarna. Residu dari penjenuhan 50% dilarutkan kembali dengan buffer fosfat. Tahapan pemurnian fikosianin divisualisasikan pada **Gambar 3.3**.



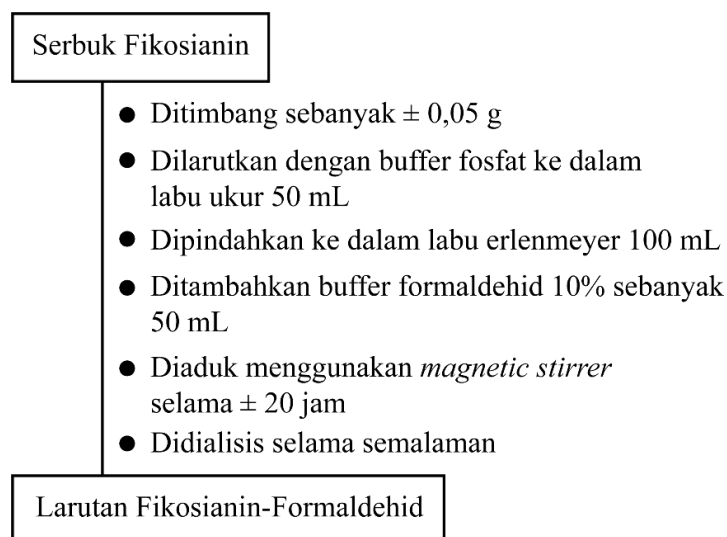
Gambar 3.3. Tahap Pemurnian Fikosianin.

Fikosianin hasil pemurnian didialisis menggunakan membran selulosa untuk menghilangkan ammonium sulfat yang masih tersisa. Dialisis fikosianin dilakukan selama dua hari dengan pergantian pelarut sebanyak dua kali. Konsentrasi fikosianin ditentukan secara spektroskopi melalui persamaan berikut (Munawaroh *et al.*, 2018)

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

3.3.2 Modifikasi Fikosianin dengan Formaldehid

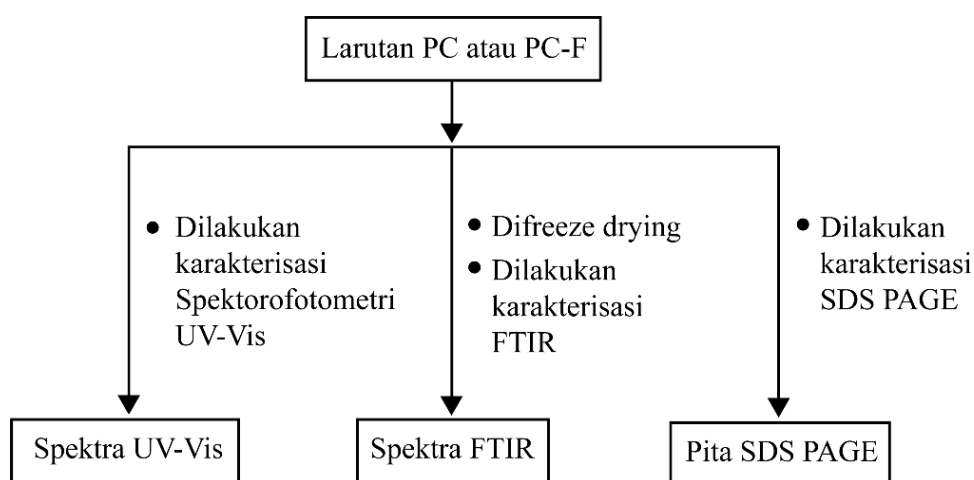
Modifikasi fikosianin dengan formaldehid didasarkan pada Sun, Wang, & Qiao, (2006), kemudian dilakukan beberapa penyesuaian. Fikosianin sebanyak 0,05 g dilarutkan ke dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya ditandabatkan menggunakan larutan buffer fosfat dan larutan dihomogenkan. Larutan fikosianin dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 mL dan dimasukkan larutan buffer formaldehid 10% sebanyak 50 mL diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 20 jam. Larutan tersebut kemudian didialisis selama semalaman dengan pergantian larutan buffer sebanyak 2 kali. Larutan fikosianin hasil modifikasi dipindahkan ke dalam botol yang telah ditutupi aluminium foil dan disimpan dalam lemari es. Tahap ini divisualisasikan pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3.4. Tahapan Modifikasi Fikosianin dengan Formaldehid.

3.3.3 Karakterisasi Fikosianin dan Fikosianin-Formaldehid

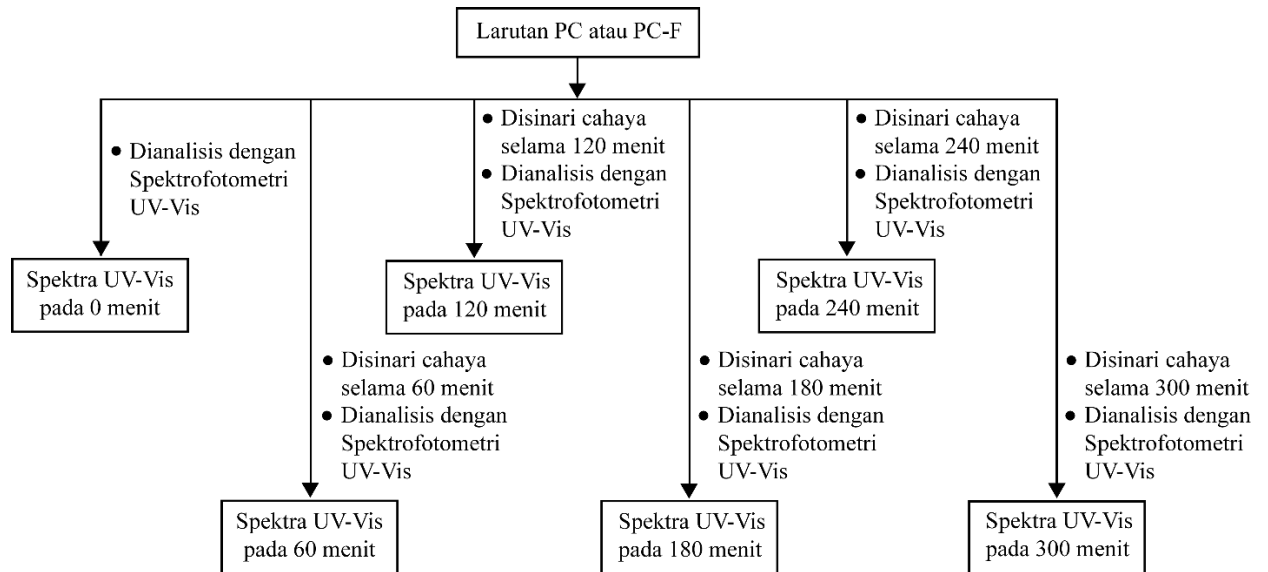
Karakterisasi yang dilakukan antara lain; Spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan SDS-PAGE. Spektrofotometer UV-Vis yang digunakan yaitu Shimadzu UV-Mini 1240 pada panjang gelombang 240 nm – 800 nm. FTIR yang digunakan yaitu FT/IR-4100 Jasco dan pengukuran dilakukan pada bilangan gelombang 399 cm^{-1} - 4500 cm^{-1} . Sampel PC dan PC-F yang digunakan berwujud padatan. Karakterisasi SDS-PAGE menggunakan alat Mini-PROTEAN Terta Cell-BIO-RAD dan digunakan standar peqGOLD dengan ukuran 14,4 – 116 kDa. Tahap ini divisualisasikan pada **Gambar 3.5**.



Gambar 3.5. Karakterisasi Fikosianin (PC) dan Fikosianin-Formaldehid (PC-F).

3.3.4 Pengamatan Stabilitas Cahaya Fikosianin dan Fikosianin-Formaldehid

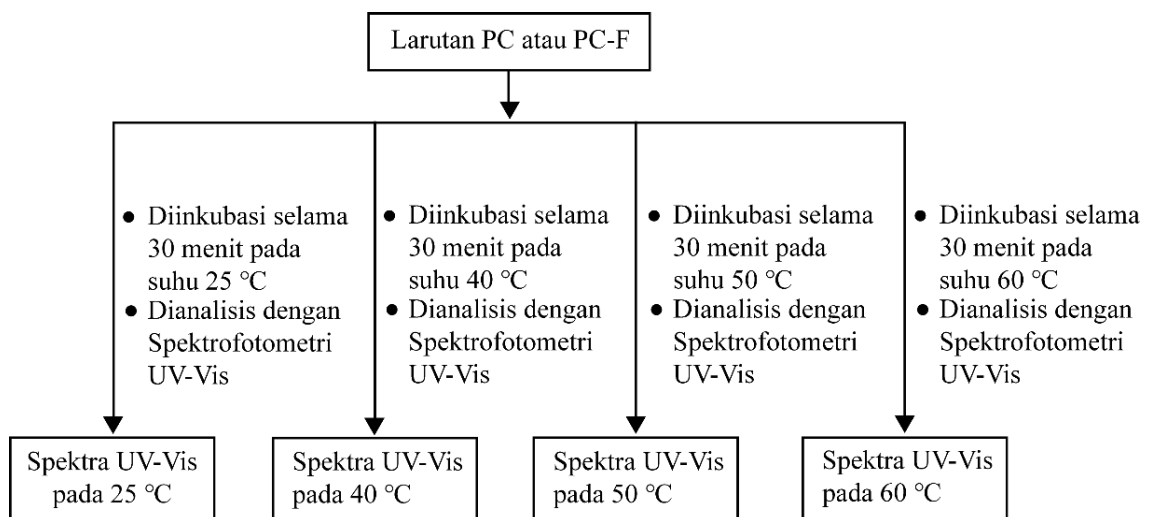
Stabilitas cahaya dimaksudkan untuk mengetahui ketahanan PC dan PC-F terhadap cahaya. Sumber cahaya yang digunakan antara lain cahaya lampu putih, dan cahaya lampu kuning. Pengamatan stabilitas cahaya didasarkan pada pengamatan panjang gelombang dari cahaya matahari, kemudian dilakukan beberapa penyesuaian. Larutan Fikosianin hasil pemurnian (PC) dan Fikosianin-Formaldehid (PC-F) disinari oleh cahaya putih, cahaya kuning, UV A dan UV B terhadap waktu penyinaran 0 menit, 60 menit, 120 menit, 180 menit, 240 menit, dan 300 menit. Larutan PC dan PC-F yang telah disinari dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya, yaitu pada 620 nm untuk PC dan 612 nm untuk PC-F. Tahap ini divisualisasikan pada **Gambar 3.6**.



Gambar 3.6. Pengamatan Stabilitas Cahaya Fikosianin (PC) dan Fikosianin-Formaldehid (PC-F).

3.3.5 Pengamatan Stabilitas Termal Fikosianin dan Fikosianin-Formaldehid

Pengamatan dilakukan didalam inkubator dan pengamatan stabilitas termal didasarkan pada pengamatan suhu ruang dilingkungan, kemudian dilakukan beberapa penyesuaian. Tahap pengamatan stabilitas fikosianin (PC) dan Fikosiann-formaldehid (PC-F) divisualisasikan pada **Gambar 3.7**.



Gambar 3.7. Tahap Pengamatan Stabilitas Termal Fikosianin (PC) dan Fikosianin-Formaldehid (PC-F) pada berbagai suhu selama 30 menit.

Pengujian stabilitas termal larutan fikosianin (PC) dan fikosianin-formaldehid (PC-F) pada berbagai suhu diukur pada suhu 25 °C, 40°C, 50 °C, dan 60 °C dengan waktu inkubasi selama 30 menit. Pengujian stabilitas termal pada berbagai suhu didasarkan pada pengamatan lingkungan dan dilakukan beberapa penyesuaian. Larutan PC dan PC-F yang telah diinkubasi dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimumnya, yaitu pada 620 nm untuk PC dan 612 nm untuk PC-F.