

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan dari bulan Maret sampai Juni 2021. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Fisika dan Anorganik Departemen Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

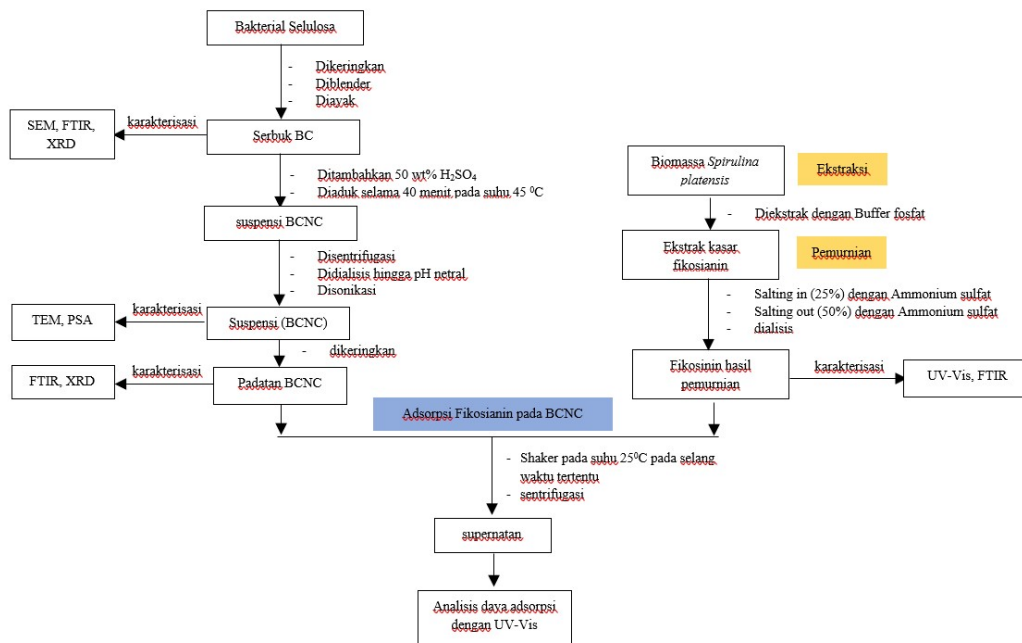
Peralatan yang digunakan pada penelitian ini bermacam-macam tergantung dengan jenis pekerjaan yang dilakukan. Pada Isolasi BCNC digunakan peralatan seperti oven, loyang kue, pisau, blender, saringan 100 mesh, gelas kimia 250 mL dan 1 L, gelas ukur 100 mL, batang pengaduk, pipet tetes, spatula, reaktor, *magnetic stirrer*, *stirrer* dan *waterbath*. Pada pembuatan buffer fosfat digunakan peralatan seperti neraca analitik, pH meter, kaca arloji, gelas kimia 2L, batang pengaduk, dan spatula. Pada ekstraksi dan pemurnian Fikosianin digunakan peralatan seperti *magnetic stirrer*, batang magnet, labu Erlenmeyer 250 mL, *centrifuge* (Corona GL-08), *falcon tube* 15 mL, neraca analitik, membran selulosa, spatula, gelas kimia 100 mL dan Spektrofotometer UV-Vis. Pada adsorpsi Fikosianin digunakan *thermostatic waterbath shaker*, Spektrofotometer UV-Vis, alat sentrifugasi, labu ukur, gelas ukur, labu erlenmeyer, dan pipet.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini bermacam-macam tergantung dengan jenis pekerjaan yang dilakukan. Isolasi BCNC menggunakan *nata de coco*, H₂SO₄ 50%, dan akuades. Ekstraksi dan pemurnian Fikosianin menggunakan biomassa *Spirulina platensis*, buffer fosfat, ammonium sulfat, akuades. Adsorpsi Fikosianin pada BCNC menggunakan BCNC, Fikosianin, dan buffer fosfat.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 3 tahap, yaitu: 1) Isolasi Nanokristal Selulosa Bakteri 2) Ekstraksi Fikosianin dan Pemurnian fikosianin, 3) Adsorpsi Fikosianin pada nanokristal selulosa.



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.3.1 Isolasi Nanokristal Selulosa Bakteri

Bakterial selulosa (BC) *nata de coco* dikeringkan di dalam oven hingga kering. BC yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk BC. Serbuk BC disaring menggunakan saringan berdiameter 100 mesh. Serbuk BC dihidrolisis menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) 50 wt. % dengan suhu 45 °C dan proses pengadukan selama 40 menit. Rasio H_2SO_4 :BC yang digunakan sebesar 50 mL/g. Proses hidrolisis dihentikan dengan diencerkan sebesar 10 kali menggunakan aquades. Endapan nanokristal selulosa yang diperoleh kemudian dilakukan sentrifugasi, didialisis hingga mencapai pH netral, dan dilakukan proses sonikasi di dalam ice bath dan dilakukan freeze dry untuk penelitian tahap selanjutnya (Anwar et al., 2016)

3.3.2 Ekstraksi dan Pemurnian Fikosianin

Tahap ekstraksi fikosianin menggunakan metode maserasi yang mengacu pada penelitian sebelumnya (Kamble *et al.*, 2013) dan dilakukan beberapa penyesuaian.

Ekstraksi fikosianin menggunakan larutan buffer fosfat sebagai pelarut dengan perbandingan 1:20 (w/v) yang didasarkan pada metode yang dilakukan oleh Wang (2017). Pada ekstraksi tersebut biomassa *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, kemudian ditambahkan larutan buffer fosfat sebanyak 100 mL, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4 °C selama ± 20 menit. Larutan tersebut kemudian diinkubasi lebih lanjut dalam lemari es pada suhu -4 °C selama ± 20 menit. Setelah inkubasi tersebut larutan kemudian di sentrifugasi selama 20 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 3000 – 4000 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar fikosianin dan disimpan dalam wadah gelap dengan suhu dingin (-4 °C).

Pemurnian fikosianin dilakukan dengan metode *salting out* oleh garam amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) yang didasarkan pada metode sebelumnya (Munawaroh *et al.*, 2018). Proses pemurnian meliputi penjuhan amonium sulfat 25% dan penjuhan amonium sulfat 50% yang dilakukan sebanyak 3 kali. Pada penjuhan 25% akan diperoleh residu berwarna kehijauan dan supernatan berwarna biru. Kemudian pada supernatan tersebut dilakukan penjuhan 50% yang akan memperoleh residu warna biru dan supernatan tak berwarna. Residu penjuhan 50% dilarutkan kembali dengan buffer fosfat kemudian didialisis menggunakan membran selulosa untuk menghilangkan amonium sulfat yang masih tersisa. Pemurnian 4 (dialisis) fikosianin dilakukan selama 6 hari dengan penggantian pelarut buffer fosfat pH 7 sebanyak 1 kali perhari. Setelah didialisis fikosianin dikeringkan dengan metode *freeze dry*.

Konsentrasi fikosianin ditentukan secara spektroskopi melalui persamaan berikut (Munawaroh *et al.*, 2018). Kadar kemurnian fikosianin dapat dihitung secara kuantitatif dengan cara menghitung absorbansi yang didapat dari hasil ekstraksi.

$$C_{PC} = \frac{(OD_{620} - 0.474_{652})}{5.43}$$

Di mana C_{PC} adalah konsentrasi C-phycoyanin dalam mg.mL^{-1} , OD_{620} adalah kerapatan optik sampel pada 620 nm, dan OD_{652} adalah kerapatan optik pada 652 nm. Kemurnian fraksi C-phycoyanin diukur secara spektrofotometri dengan rasio absorbansi pada 620 nm dibagi 280 nm dengan menggunakan Persamaan. (2).

$$EP = \frac{OD_{620}}{OD_{280}}$$

Dimana EP adalah kemurnian ekstrak, OD_{620} adalah kerapatan optik sampel pada 620 nm, dan OD_{280} adalah kerapatan optik pada 280 nm.

3.2.4 Adsorpsi Fikosianin pada BCNC

Adsorpsi fikosianin pada BCNC dilakukan secara isothermal pada suhu 25 °C dalam kondisi pH 7,5. Studi adsorpsi dilakukan sesuai dengan prosedur berikut: sejumlah CNC yang diketahui 20 mg ditambahkan ke serangkaian labu Erlenmeyer yang berisi 12 mL larutan dengan Fikosianin 62 ppm. Semua labu ditempatkan dalam *thermostatic water bath shaker* selama 3 jam. Sampel diambil pada menit ke-1, 2, 4, 10, 20, dan 40 hingga 3 jam. Selama proses adsorpsi, temperatur sistem diatur pada 25 °C.

Konsentrasi awal (C_0) dan kesetimbangan (C_e) fikosianin dalam larutan diukur menggunakan Spektrofotometer Farmasi Shimadzu UV / VIS-1700 pada panjang gelombang maksimum (620 nm). Besarnya fikosianin yang terserap oleh CNC pada kondisi kesetimbangan (q_e) dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} V \quad (1)$$

Dimana m dan V adalah massa CNC dan volume larutan. Studi adsorpsi dilakukan dalam tiga percobaan. Sampel dipisahkan dari larutan dengan cara sentrifugasi dan diukur konsentrasinya untuk studi release obat.