

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan dengan uji laboratorium secara deskriptif terhadap *Spirulina platensis* hasil kultivasi dengan tiga ekstraksi yang berbeda, lalu uji antioksidan secara kuantitatif dengan metode DPPH, kemudian uji secara kualitatif skrining fitokimia.

3.1.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Keberlangsungan penelitian ± tiga bulan, mulai bulan Maret-Juni 2023. Tempat penelitian untuk kultivasi dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Institut Pertanian Bogor, uji aktivitas antioksidan (DPPH) dilakukan di Laboratorium Biofarmaka dan skrining fitokimia di Laboratorium Sumberdaya Kelautan dan Perikanan Universitas Pendidikan Indonesia Kampus Daerah Serang.

3.2 Instrumen Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk proses kultivasi sampai pemanenan *Spirulina* adalah alat sterilisasi dengan sinar UV, tube ukuran 5mL, selang, batu aerasi, tisu, pipet 10 mL (Iwaki), bola isap pipet (D&N Germany), lampu TL (Philips), pengaduk *stainless steel*, cawan petri (Duran), alu dan mortar, oven (Universal Memmert UN110), loyang, plastik tahan panas, plankton nett, teko plastik, spektrofotometer (Rayleigh) dan kuvet. Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol adalah neraca analitik (Pioneer), pengaduk, inkubator goyang (DIAB SK-O330-Pro), erlenmeyer 250 mL (Iwaki), beaker glass (Iwaki), cawan petri, rotary evaporator (DLAB RE100-Pro), corong dan kertas saring (Whatman 1). Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak non-protein adalah autoklaf (Yamato SM52), erlenmeyer (Iwaki), pengaduk, neraca analitik (RADWAG), cawan petri, kertas saring (Whatman 1), tube 15 mL, botol plastik, beaker glass (Duran), Kulkas (Sharp), *centrifuge* (Centurion), pH meter

(HANNA HI 98107 PHep dan WalkLab TI 9000) dan tisu. Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak fikosianin adalah spektrofotometer (Rayleigh), neraca analitik (Pioneer), kulkas (Sharp), botol plastik, botol kaca, cawan petri, beaker glass (Iwaki) dan alumunium foil (Klin Pak). Alat yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah neraca analitik, vial, mikropipet dan tip, labu ukur, alumunium foil, Elisa reader, microplate, kuvet, sonikator, vortex mixer dan beaker glass. Alat yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah tabung reaksi (Iwaki), timbangan, pipet 10 mL (Iwaki), bola isap pipet (D&N Germany), pengaduk kaca, pemanas, beaker *glass* 100 mL (Iwaki) dua buah, 250 mL dua buah (Iwaki) dan 500 mL (Pyrex).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk proses kultivasi sampai pemanenan *Spirulina* adalah bibit *Spirulina platensis* (*online*), walne ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (teknis), NaNO_3 (teknis), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (teknis), NaHCO_3 (teknis), K_2HPO_4 (teknis), K_2SO_4 (teknis), NaCl (teknis), CaCl_2 (teknis), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (teknis), Na_2EDTA (teknis), ZnCl_2 (teknis), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (teknis), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (teknis), H_3BO_3 (teknis), CoSO_4 (teknis), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (teknis), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (teknis), Na_2MoO_4 (teknis)), alkohol, air laut, air tawar. Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol adalah bubuk spirulina, Etanol 70%. Bahan yang digunakan untuk membuat ekstraksi non-protein adalah bubuk spirulina, akuades, asam asetat (Emsure), NaOH (Teknis). Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak fikosianin adalah bubuk spirulina kering dan buffer fosfat konsentrasi 10 mM pH 7. Bahan yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah sampel ekstraksi, DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) (teknis), etanol (teknis), DMSO. Bahan yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah Sampel ekstraksi dengan kandungan antioksidan terbesar, yaitu Ekstraksi Etanol, pereaksi meyer (Nitra Kimia), asam klorida (HCl) pekat (teknis), besi (III) klorida (FeCl_3) 5% (teknis), akuades, natrium hidroksida (NaOH) 1N dan 2N (teknis), Tween 80 (teknis), Etanol 70%.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Kultivasi Spirulina

Pembuatan media walne dengan cara mencampurkan bahan untuk larutan nutrient 500 mL ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 gr, NaNO_3 50 gr, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 gr, Na_2EDTA 22,5 gr) dan larutan trace metal 50 mL (ZnCl_2 0,105 gr, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gr, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,045 gr, H_3BO_3 1,68 gr, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 gr, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,065 gr, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,018 gr (Emsure)), lalu dicampurkan secara perlahan, lalu diaduk hingga kedua larutan tercampur merata, larutan siap digunakan, simpan larutan pada kulkas jika tidak digunakan (Suminto, 2009).

Persiapan pertama yang dilakukan adalah mensterilisasi alat yang akan digunakan dengan disemprotkan alkohol 70% dan selama 15 menit disteril dengan sinar UV, lalu toples yang sudah steril diberikan air laut dan air tawar (sebagai pengencer menurut Widawati *et al.*, 2022) dengan diberi saringan diharapkan kandungan-kandungan kasar tidak ikut masuk kedalam toples, air yang diberikan masing-masing 800 mL karena akan melakukan kultivasi sebanyak 2 L, kemudian air disteril kembali dengan sinar UV di tempat yang tertutup rapat selama 45 menit, ditambahkan bibit *S. platensis* sebanyak 400 mL dan walne sebanyak 2 mL (1 mL walne untuk 1 L media air dan bibit spirulina yang digunakan), lalu diberikan aerasi dan lampu, tidak lupa menutup toples dengan tutup plastik, melakukan refresh setelah seminggu dan *scale up* ke toples yang bisa menampung sebanyak 10 L dengan perbandingan air laut, air tawar, spirulina 4 L : 4 L : 2 L atau 2 : 2 : 1, pengambilan sampel spirulina dilakukan setiap hari, selama 12 hari untuk mengukur OD dengan spektrofotometer, dengan panjang gelombang 680 nm dan dengan mode absorbansi, kemudian pemanenan *S. platensis* dilakukan dengan mensteril semua alat yang digunakan dengan sinar UV pada tempat sterilisasi yang tertutup rapat, kemudian menyiapkan wadah untuk menyaring spirulina dengan plankton nett, lalu spirulina diambil menggunakan teko plastik yang ada pada laboratorium, hasil spirulina yang sudah disaring sampai air menyusut dikumpulkan, air masih bisa dipakai lagi jika ingin melakukan kultur kembali, kemudian spirulina dikeringkan dengan meratakan spirulina pada loyang yang

sudah diberikan plastik tahan panas lalu dimasukkan ke oven dengan suhu 40°C selama 24 jam, spirulina yang sudah mengering kemudian dihancurkan sampai bubuk dengan mortar dan alu yang dilapisi plastik *wrap* agar tidak ada spirulina hasil kultur yang terbuang sia-sia sebelum digunakan, kemudian *Spirulina platensis* siap digunakan untuk tahapan selanjutnya, yaitu ekstraksi (Ilhamdy *et al.*, 2020).

3.3.2 Pembuatan Ekstraksi Etanol

Etanol 70% dilarutkan dengan spirulina bubuk hasil kultivasi dengan perbandingan 1:10 (m/v), yaitu 10 gram : 100 mL untuk spirulina hasil kultivasi, lalu dimaserasi dan dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan shaker atau inkubator goyang dengan kecepatan 125 rpm, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 1, lalu ampas diberikan etanol 70% sebanyak 100 mL dan diinkubasi kembali seperti inkubasi pertama, yaitu 100 mL untuk spirulina yang dihasilkan dengan proses kultivasi, kemudian hasilnya disaring kembali dan diuapkan dengan rotary evaporator sampai menjadi pasta kering, hasil ekstraksi disimpan pada botol vial lalu dilapisi dengan aluminum foil dibagian luar, kemudian melakukan perhitungan rendemen (Pannindriya *et al.*, 2015).

Variasi dalam jumlah pengulangan maserasi dan pelarut yang digunakan dapat menyebabkan perbedaan dalam nilai hasil. Jumlah bahan kimia berkorelasi terbalik dengan durasi ekstraksi. Nilai hasil juga dapat dipengaruhi oleh rasio pelarut terhadap ekstrak. Semakin banyak bahan kimia yang dapat diekstraksi, semakin banyak pelarut yang digunakan. Komponen dalam sampel tidak dapat sepenuhnya diekstraksi jika pelarut tidak mencukupi, namun jika pelarut terlalu banyak, pelarut akan terbuang sia-sia (Kurd & Samavati, 2015).

3.3.3 Pembuatan Ekstraksi Non-Protein

Bubuk spirulina dicampurkan dengan akuades dengan perbandingan 1:25 (m/v), yaitu 6 gram : 150 mL untuk *S. platensis* hasil kultivasi, kemudian dilakukan autoklaf, lalu disaring dengan kertas saring. Proses autoklaf memiliki kemampuan untuk mematikan bakteri dan menghapus endotoksin yang ada dalam sel-sel spirulina. Namun, terdapat potensi bahwa endotoksin yang dilepaskan dari sel-sel yang mengalami kerusakan masih bisa tetap ada dalam larutan. Penggunaan metode penyaringan dapat membantu mengatasi masalah

endotoksin ini. Meskipun autoklaf mampu mengeliminasi sel-sel spirulina dan merusak dinding sel, masih mungkin terdapat sisa-sisa sel dan partikel kasar yang tertinggal dalam larutan. Proses penyaringan dapat menjadi solusi untuk menghapus sisa-sisa tersebut (Rahmi *et al.*, 2015).

Setelah larutan terpisahkan dari endapannya, dilakukan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan rotasi 5000 x g, sebelum dilakukan sentrifugasi larutan bersama tube sebagai wadah larutan untuk sentrifugasi dihitung terlebih dahulu untuk menyamakan massa agar seimbang ketika dilakukannya sentrifugasi, setelah selesai proses sentrifugasi, endapan dipisahkan lalu setelah selesai, larutan diberikan asam asetat hingga mencapai pH 4.

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, larutan asam asetat murni diberikan secara hati-hati agar larutan tidak terlalu asam dan pH menjadi terlalu kecil, pastikan pH meter sebelumnya telah didiamkan pada larutan penyangga dengan pH netral atau pH 7, terus aduk larutan yang telah diberikan asam asetat secara perlahan agar homogen, setelah itu disimpan di kulkas selama semalaman, lalu dilakukan sentrifugasi kembali pada kecepatan rotasi 12000 x g selama 20 menit, tidak lupa memisahkan endapan, kemudian diberikan natrium hidroksida hingga pH 7, lalu ekstrak disimpan pada *freezer* pada botol plastik hingga akan digunakan, ekstrak harus disaring terlebih dahulu sebelum digunakan (Sagara *et al.*, 2014).

3.3.4 Pembuatan Ekstraksi Fikosianin

Buffer fosfat pH 7 dicampurkan dengan spirulina, dengan perbandingan spirulina dan pelarut 1:25 (m/v), yaitu 5 gram : 125 mL untuk *S. platensis* hasil kultivasi, lalu dicampurkan hingga rata, kemudian melakukan *freeze-thaw* selama tiga siklus pengulangan, dengan memasukkan ekstraksi ke *freezer* dengan suhu -20°C selama ± 14 jam, lalu *thawing* atau suhu *chilling* $10-15^{\circ}\text{C}$ selama ± 10 jam.

Fungsi larutan penyangga tersebut adalah untuk menjaga pH agar stabil, sehingga setelah proses ekstraksi, larutan fikosianin tetap dalam kondisi stabil dan mengurangi degradasi pigmen. Degradasi fikosianin dapat terjadi jika derajat keasaman menurun atau alkalinitas meningkat, oleh karena itu menjaga pH dalam rentang stabil antara 4-9 sangat penting untuk mencegah degradasi

pigmen tersebut. Ekstrak fikosianin yang berasal dari *Spirulina* sp. memiliki potensi sebagai antioksidan alami. Penggunaan pelarut yang berbeda dalam proses ekstraksi memberikan perbedaan dalam aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Penggunaan pelarut buffer fosfat menghasilkan ekstrak fikosianin yang lebih banyak dan memiliki kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan air suling (akuades), namun, meskipun ekstrak yang dihasilkan menggunakan pelarut akuades memiliki kemurnian yang lebih rendah, aktivitas antioksidan ekstrak tersebut ternyata lebih kuat daripada ekstrak yang dihasilkan menggunakan pelarut buffer fosfat (Ridlo *et al.*, 2015).

Fikosianin adalah pigmen yang terkait dengan protein dan dapat larut dalam air, sehingga mudah dilepaskan melalui metode mekanis seperti perlakuan pembekuan dan pembekuan lalu dihancurkan (*freeze-thaw*). Dengan membekukan sel *Spirulina platensis*, protein yang terikat pada fikosianin dapat mengalami denaturasi, menghasilkan pembebasan yang efektif dari biopigmen Fikosianin. Prinsip utama dari proses *freeze-thaw* adalah menciptakan tekanan pada sel yang mempercepat pelepasan pigmen setelah proses pengeringan biomassa kering *Spirulina platensis* (Farihah *et al.*, 2014).

Dilakukan sentrifugasi pada suhu 4°C, kemudian mengukur konsentrasi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 615 nm dan 625 nm, hasil ekstraksi fikosianin disimpan tanpa terkena sinar matahari langsung agar tidak terjadi kerusakan, dengan cara ditutup memakai aluminium foil hingga ekstraksi akan digunakan, kemudian tidak lupa untuk menghitung konsentrasi hasil ekstraksi fikosianin dari hasil absorbansi spektrofotometer (Ojit *et al.*, 2015).

3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan DPPH dibuat sebanyak 125 µM dengan tahapan awal menimbang 2,5 mg DPPH, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a pada labu ukur sampai volume mencapai 50 mL, lalu lapisi labu ukur dengan aluminium foil, dengan ini larutan DPPH siap digunakan. Untuk preparasi sampel dan asam askorbat dimulai dengan menimbang masing-masing sebanyak 10 mg, lalu larutkan dengan DMSO sebanyak 1 mL, selanjutnya dilakukan sonikasi hingga larut, setelah itu melakukan vorteks dan selesai, siap untuk dipakai. Pengujian

dilakukan dengan memberikan sampel sebanyak 100 μL ke dalam *microplate*, untuk sampel ulangan 1 dan 2 ditambahkan DPPH sebanyak 100 μL , untuk kontrol negatif hanya menambahkan etanol p.a sebanyak 100 μL , setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu ruang dengan kondisi gelap selama 30 menit lamanya, kemudian melakukan pengukuran pada alat elisa dengan panjang gelombang 517 nm. Blanko untuk ulangan 1 dan 2 hanya diberikan 100 μL Etanol p.a dan menambahkan DPPH sebanyak 100 μL , untuk kontrol negatif hanya diberikan etanol p.a sebanyak 200 μL (Salazar-Aranda *et al.*, 2011).

3.3.6 Uji Aktivitas Fitokimia

Kandungan alkaloid pada ekstrak *Spirulina platensis* diuji dengan langkah-langkah berikut, menambahkan 1 mL HCl pekat ke dalam 1 mL ekstrak *Spirulina platensis*, kemudian tambahkan beberapa tetes reagen mayer. Jika terbentuk endapan putih, itu menandakan adanya senyawa alkaloid. Untuk menguji flavonoid pada ekstrak *Spirulina platensis*, dapat melakukannya dengan menambahkan 0,5 mL NaOH 2 N ke dalam 1 mL ekstrak *Spirulina platensis*, jika terbentuk warna kuning, maka terdapat kandungan senyawa flavonoid. Selanjutnya untuk menguji keberadaan kandungan tanin pada ekstrak *Spirulina platensis*, dilakukan penambahan 1 mL FeCl_3 5% ke dalam 1 mL ekstrak *Spirulina platensis*, jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman, itu menandakan adanya senyawa tanin. Kemudian untuk menguji saponin pada ekstrak *Spirulina platensis*, dilakukan dengan menambahkan 1 mL akuades ke dalam 1 mL ekstrak *Spirulina platensis*, selanjutnya, dihomogenkan dalam gelas ukur selama 15 menit, jika terbentuk lapisan putih dengan ketebalan sekitar 1 cm, maka itu menjadi penanda adanya senyawa saponin (Mane dan Chakraborty, 2018).

Kuinon dapat diketahui dengan menambahkan NaOH 1 N beberapa tetes ke dalam 1 mL ekstrak *Spirulina platensis* kemudian diamati perubahan warnanya, jika warna mengalami perubahan menjadi warna kuning, maka terdapat kandungan senyawa kuinon pada ekstrak tersebut (Suratno, 2016).

3.4 Analisis Data

Analisa data dilakukan secara deskriptif yang dibuat dalam diagram batang. Hasil kultur *Spirulina platensis* akan dibuatkan kurva pertumbuhan selama 12 hari masa kultivasi untuk *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer berdasarkan pengamatan di laboratorium saat akan dilakukan kultur sampai akan dipanen dilakukan pengambilan sampel setiap hari, perhari diambil 2 mL sampel kultivasi spirulina yang dilakukan. Hasil ekstraksi etanol dihitung dengan persamaan (Pannindriya, 2020) :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{Bobot simplisia (g)}} \times 100\%.$$

Konsentrasi Fikosianin (PC) dihitung dengan persamaan Bennet dan Bogorad (1973) :

$$PC = \frac{(OD_{615}) - 0,474(OD_{625})}{5,34}$$

PC = konsentrasi fikosianin (mg/mL)

OD = *optical density*

kemudian untuk menghitung rendemen digunakan persamaan :

$$\text{Rendemen} = \frac{PC \times V}{DB}$$

PC = konsentrasi fikosianin (mg/mL)

V = volume pelarut (mL)

DB = berat biomassa kering (gram)

Uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol, non-protein dan pigmen fikosianin dari spirulina hasil kultivasi. Persen Aktivitas Antioksidan dihitung dengan rumus :

$$\text{Antioksidan (\%)} = \frac{(A \text{ blanko} - A \text{ sampel})}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

A blanko = serapan radikal DPPH

A sampel = serapan radikal DPPH setelah diberi perlakuan sampel

Rumus pengenceran untuk ekstrak diuji antioksidan dengan metode DPPH (Muzeka, 2019) :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

V_1 = volume larutan standar yang diencerkan

V_2 = volume larutan pengenceran

M_1 = konsentrasi larutan yang diencerkan

M_2 = konsentrasi larutan pengenceran

Uji kualitatif dilakukan untuk pengujian skrining fitokimia, agar dapat diketahui jenis golongan senyawa bioktif apa saja yang terkandung dalam hasil ekstraksi *Spirulina platensis*, apakah ada atau tidaknya senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan (Firdiyani *et al.*, 2015).