

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Dunaliella* sp. dimana bibit dan proses kultur dilakukan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, metanol (PA), n-heksan (PA), diethyl eter (PA), garam, nitrogen, aseton (PA), petroleum eter (PA), Na_2SO_4 , alumina, narium anhidrat, plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), Bahan-bahan lain yang digunakan kertas saring kasar dan halus, kapas, air, alumunium foil, *cling wrap*, kertas Whatman No. 42.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat *ultrasonic* (Restsch Ultrasonic Baths), timbangan digital, botol timbang, sendok bahan, timbangan analitik, oven, *crushable tank*, desikator, sendok bahan, gelas ukur (ukuran 250 mL dan 100 mL), beaker glass (ukuran 1000 mL 250 mL, 100 mL, dan 50 mL), spatula, erlenmeyer (ukuran 500 mL dan 250 mL), corong kaca, labu pemisah (corong pisah), *rotary vacuum evaporator*, *freezer*, statif, kromatografi kolom, *magnetic stirrer*, *hot plate*, tabung gas Nitrogen (N_2), pipet tetes, pipet volume (ukuran 1 mL dan 10 mL), bola hisap, pipa kapiler, cuvet, botol sampel (ukuran 100 mL dan 15 mL), tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikro pipet (ukuran 0,1 mL), tabung centrifuge, centrifuge, spektrofotometer UV-Vis merk pharo 300, SEM merek FEI tipe inspect S25.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Metode eksperimen digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap perlakuan yang lain dengan kondisi terkontrol. Metode eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap faktor lain dalam kondisi yang dikendalikan. Metode eksperimen biasanya diterapkan didalam laboratorium dan terdapat perlakuan (*treatment*) tertentu (Sugiyono, 2014). Metode eksperimen dilakukan untuk mengetahui sebab dan akibat dua variabel atau lebih dengan mengendalikan pengaruh dari variabel lain. Metode ini dilakukan dengan memberikan variabel bebas secara sengaja kepada objek penelitian secara sengaja pada objek penelitian untuk diketahui akibatnya dalam variabel terikat

Penelitian ini dilakukan dengan memberi variabel bebas secara sengaja dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode ekstraksi dan rasio ekstraksi mikro alga (*Dunaliella. Sp*) terhadap rendemen β -karoten. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah:

- Variabel bebas: Perbedaan konsentrasi pelarut dan metode ekstraksi
- Variabel terikat: β -karoten yang meliputi: berat ekstrak, *yield* ekstrak, total karotenoid, *yield* β -karoten.

Penelitian ini dilakukan dengan melalui beberapa tahap. Tahap pertama adalah dilakukan proses kultur mikroalga *Dunaliella sp.* hingga proses pemanenan, pengeringan, dan pembuatan tepung mikroalga. Tepung mikroalga diisolasi dengan kromatografi kolom untuk memperoleh β -karoten dan diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.1 Penelitian Tahap Pertama

Penelitian tahap pertama atau penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui karakteristik bahan baku melalui kadar air dan mendapatkan berat ekstrak dan *yield* β -karoten dari mikroalga *Dunaliella* sp. Terhadap perbedaan metode ekstraksi maserasi dan ultrasonik. Perlakuan percobaan yang dilakukan dalam penelitian pendahuluan adalah ekstraksi *Dunaliella* sp. (15 g) dengan menggunakan metode ultrasonik dengan menggunakan konsentrasi pelarut 1:10. Perlakuan ini didasarkan pada penelitian Manasika dan Simon (2015) yang melakukan ekstraksi senyawa β -karoten dengan menggunakan konsentrasi pelarut 1:9.

3.2.2 Penelitian Tahap Kedua

Penelitian tahap kedua ini merupakan tahap penelitian utama yang dilakukan berdasarkan hasil yang terbaik dari penelitian tahap pertama. Pada penelitian utama bertujuan untuk mengetahui perbandingan konsentrasi pelarut yang terbaik dalam ekstraksi ultrasonik dari hasil yang dilakukan pada penelitian pendahuluan. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian Utama yaitu rancangan acak lengkap. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ultrasonik (U) dan Maserasi (M) dan konsentrasi bahan:pelarut ekstraksi yang terdiri dari K8 (1:8), K10 (1:10), K12 (1:12), dilakukan sebanyak tiga kali. Penggunaan konsentrasi bahan:pelarut berdasarkan penelitian Manasika dan Widjarnoko (2015), yang menggunakan perbandingan konsentrasi bahan:pelarut (1:5, 1:7, 1:9). Berdasarkan perlakuan percobaan yang diterapkan maka penelitian ini dirancang dengan dua faktorial dengan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Kedua faktor tersebut dilakukan dengan tiga kali ulangan. Penentuan ulangan ini dapat diketahui melalui persamaan :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

Dimana: t = Perlakuan

r = Ulangan

Sesuai dengan persamaan diatas ulangan dari perlakuan yang diinginkan

dapat ditentukan. Banyaknya ulangan dapat dihitung sebagai berikut:

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$6 (r - 1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15 + 6$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3 \text{ (penggunaan ulangan sebanyak 3 ulangan)}$$

Metode pengujian data yang digunakan adalah sidik ragam (ANOVA)

dimana jika terdapat pengaruh yang nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Model statistika yang digunakan dalam penelitian tahap pertama sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor konsentrasi pelarut taraf ke-l, faktor lama ekstraksi taraf ke-j, pada ulangan ke -k

μ = Rataan umum

A_i = Pengaruh faktor konsentrasi pelarut pada taraf ke-i

B_j = Pengaruh faktor konsentrasi pelarut ekstraksi pada taraf ke-j

$(AB)_{ij}$ = Interaksi antara faktor konsentrasi pelarut dan faktor lama ekstraksi pada taraf ke-l, faktor lama ekstraksi taraf ke-j

ϵ_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor konsentrasi pelarut taraf ke-l, faktor ke faktor lama ekstraksi taraf ke-j pada ulangan ke-k

Tabel 3. Model Rancangan Percobaan Penelitian Utama

	Perlakuan	Ulangan		
		1	2	3
U (Ultrasonik)	K8(1:8)	(U+K8)1	(U+K8)2	(U+K8)3
	K10(1:10)	(U+K10)1	(U+K10)2	(U+K10)3
	K12(1:12)	(U+K12)1	(U+K12)2	(U+K12)3
M (Maserasi)	K8(1:8)	(M+K8)1	(M+K8)2	(M+K8)3
	K10(1:10)	(M+K10)1	(M+K10)2	(M+K10)3
	K12(1:12)	(M+K12)1	(M+K12)2	(M+K12)3

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini kemudian dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA) untuk mengetahui besarnya nilai F menggunakan Ms.Office Excel 2013. Jika hasil analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan pada taraf 5% maka dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan Ms.Office Excel 2007.

1.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Karakteristik Bahan Baku

Karakteristik bahan baku mikroalga *Dunaliella* sp. dilakukan untuk mengetahui rata rata kadar air yang terkandung dalam bahan baku berdasarkan metode *Thermogravimetri* (Sudarmadji *et al.*, 2003). Prinsip pengujian kadar air dengan *Thermogravimetri* adalah dengan menguapkan air yang ada dalam bahan dengan melakukan pemanasan kemudian menimbang bahan tersebut hingga memiliki berat konstan. Pengujian kadar air dilakukan dengan prosedur sebagai berikut :

- Pengovenan botol timbang dengan suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam
- Penimbangan botol dengan timbangan sartorius dan dicatat sebagai berat A
- Penimbangan sampel sebanyak ± 2 gram dicatat sebagai berat B
- Pemasukan sampel ke dalam botol timbang dan dioven selama 2 jam sampai beratnya konstan
- Penimbangan sampel dan botol timbang dengan timbangan Sartorius dan dicatat sebagai berat C. Setelah diketahui nilainya kemudian dilakukan perhitungan prosentase kadar air dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A+B)-(C)}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A= berat botol timbang (g)

B= berat sampel (g)

C= berat akhir (botol timbang+sampel)(g)

3.2.3.2 Ekstraksi Pigmen dan Saturasi Garam (Da costa *et al.*, 2009 dan Chen *et al.*, 2013 termodifikasi)

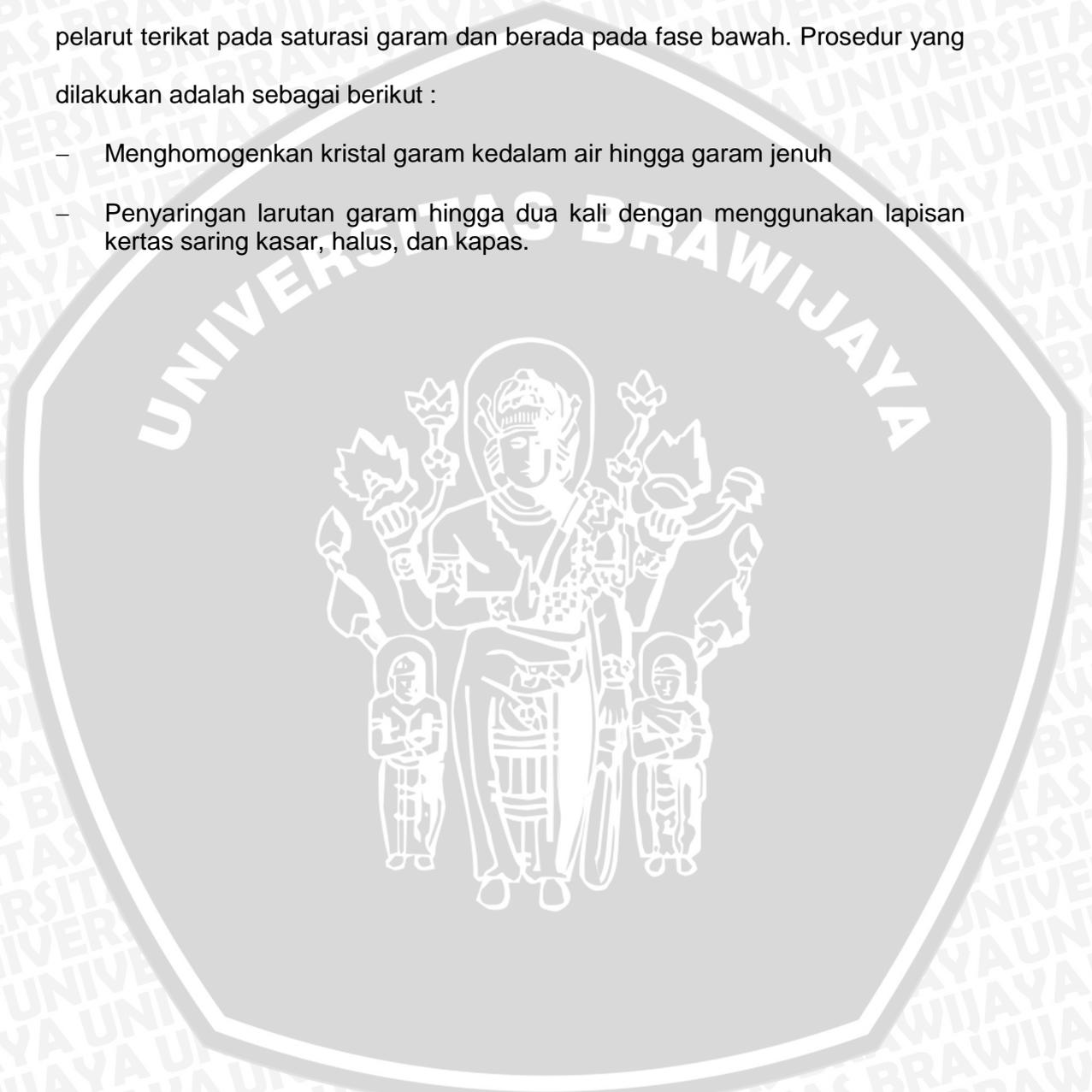
Ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. dilakukan menggunakan metode ultrasonik dan maserasi. Prinsip ekstraksi dengan menggunakan ultrasonik adalah dengan dengan perambatan energi melalui gelombang dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi. Prinsip ekstraksi dengan menggunakan maserasi adalah mencapai konsentrasi pada keseimbangan yang diperoleh dari perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Diagram alir proses ekstraksi tepung *Dunaliella* sp. dapat dilihat pada Gambar 5.

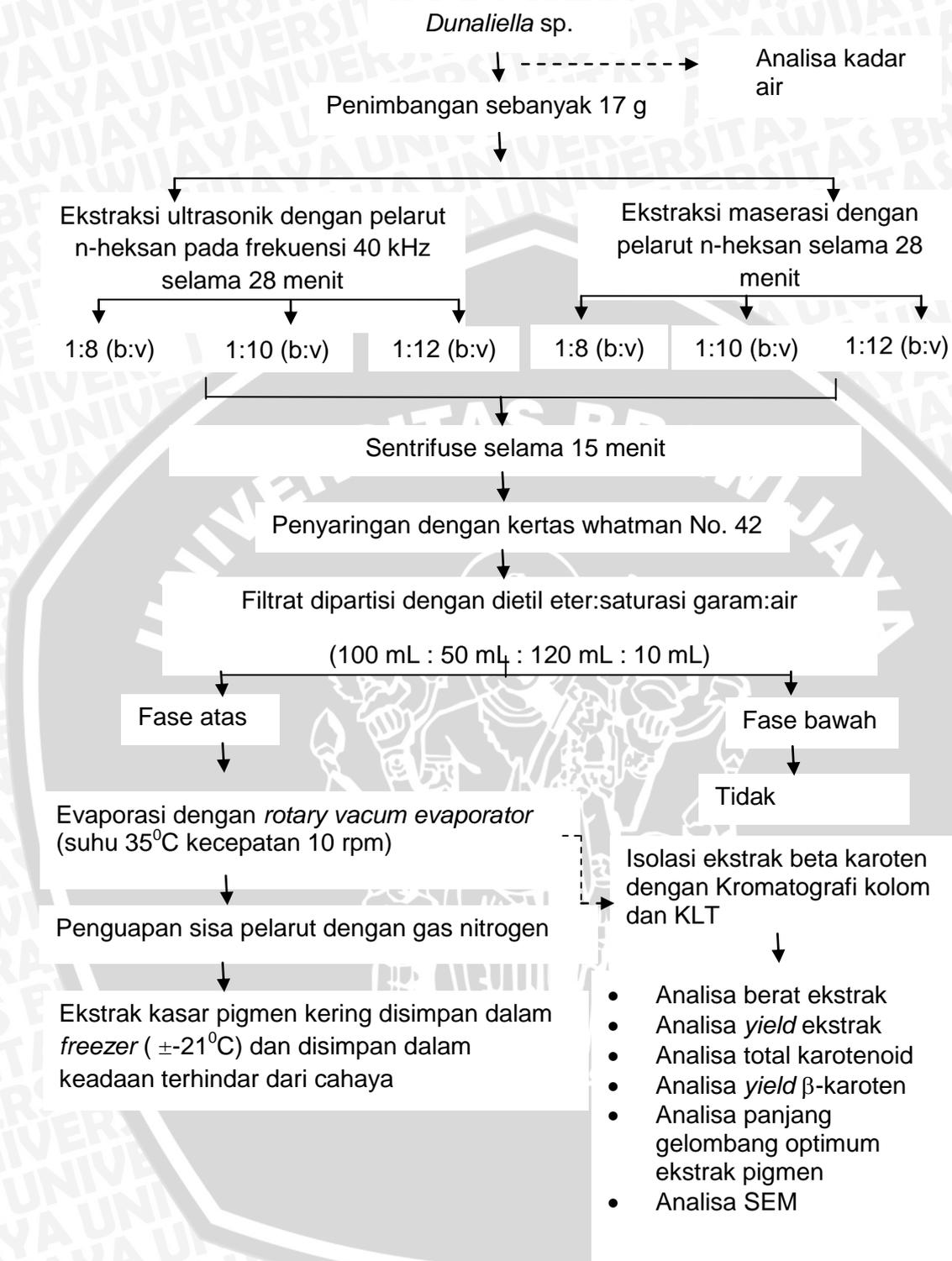
Prosedur ekstraksi adalah sebagai berikut :

- Penimbangan tepung *Dunaliella* sp. kering sebanyak 17 g
- Pelarutan sampel dengan pelarut n-heksan
- Konsentrasi pelarut ekstraksi sesuai dengan perlakuan penelitian
- Metode ultrasonik menggunakan frekuensi 40 kHz
- Metode maserasi menggunakan pengaduk (*magnetic stirrer*)
- Sentrifugasi filtrat dari ekstraksi dengan metode ultrasonik dan maserasi selama 20 menit
- Penyaringan hasil sentrifugasi menggunakan kertas whatman no. 42
- Partisi filtrat dengan menggunakan dietil eter : saturasi garam : air sebesar 100 mL : 120 mL : 10 mL untuk memisahkan fase atas dan fase bawah filtrat
- Penampungan fase atas dan pembuangan fase bawah
- Evaporasi fase atas dengan *vacum evaporator* dengan menggunakan suhu 35°C kecepatan 10 rpm
- Penguapan sisa pelarut ekstrak kasar *Dunaliella* sp. menggunakan gas nitrogen (N₂)
- Penyimpanan ekstrak kasar pigmen kering dalam *freezer* dengan suhu - ±21°C untuk menghindari degradasi senyawa pigmen.

Saturasi garam ini digunakan untuk bahan saat partisi (fraksinasi) ekstrak kasar pigmen pada *Dunaliella* sp. Prinsip saturasi garam membantu memisahkan pigmen karotenoid dari pelarut karena pelarut dapat mengikat larutan yang memiliki keelektronegatifan dan elektropositif dari pada senyawa target sehingga pelarut terikat pada saturasi garam dan berada pada fase bawah. Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- Menghomogenkan kristal garam kedalam air hingga garam jenuh
- Penyaringan larutan garam hingga dua kali dengan menggunakan lapisan kertas saring kasar, halus, dan kapas.





Gambar 5. Diagram Alir Ekstraksi Tepung *Dunaliella* sp. (Da costa *et al.*, 2009 dan Chen *et al.*, 2013 termodifikasi)

3.2.3.3 Isolasi Senyawa Beta Karoten *Dunaliella* sp. (Wahyuni dan Widjarnako, 2015 termodifikasi)

Isolasi β -karoten menggunakan kromatografi kolom dan Kromatografi lapis tipis. Prinsip kromatografi kolom adalah proses pemisahan yang tergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Prosedur preparasi kolom kromatografi adalah sebagai berikut :

- Penimbangan *silica gel* sebanyak 20 g
- Menstirer *silica gel* dengan fase gerak sebanyak 100 mL, selama satu jam
- Penyumbatan bagian bawah kolom disumbat dengan kapas yang telah dibasahi dengan fase gerak $\pm 1,5$ cm
- Pengisian *silica gel* dalam kolom sebanyak $\pm \frac{3}{4}$ kolom dengan menggunakan sendok secara terus menerus
- Perataan *silica gel* dalam kolom dengan mengetuk kolom secara perlahan.
- Pemadatan *Silica gel* dalam kolom dengan cara dibiarkan selama ± 12 jam
- Penambahan pasir laut (*sea sand*) sebanyak 3 g untuk memisahkan senyawa yang berukuran besar.

Kolom kromatografi yang sudah siap kemudian digunakan untuk isolasi β karoten. Prosedur isolasi β karoten adalah sebagai berikut

- Pelarutan ekstrak kasar pigmen kering sebanyak $\pm 0,3$ g dilarutkan dalam 10 mL fase gerak petroleum eter : aceton (1:10)
- Memasukkan ekstrak kasar yang telah larut dalam kolom hingga melewati fase diam campuran *silica gel* dan pasir laut dengan menggunakan pipet tetes
- Membuka kran kolom kromatografi dan ditambahkan dengan fase gerak petroleum eter : aceton (1:10) hingga seluruh tabung kolom terisi penuh
- Penampungan seluruh fraksi warna dalam botol vial.
- Isolasi dengan teknik kromatografi lapis tipis isolat pigmen dari kromatografi kolom.

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan dengan menggunakan fase diam dan fase gerak. Prinsip dari isolasi kromatografi lapis tipis adalah memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Prosedur isolasi dengan KLT adalah sebagai berikut :

- Penotolan Isolat beta karoten *Dunaliella* sp. dari proses kromatografi kolom pada pelat KLT F-254 pada jarak 1,5 cm dari bawah dengan pipet kapiler
- Penotolan standart beta karoten ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1,5 cm dari bawah KLT
- Memasukkan plat KLT dalam beaker glas berisi fase gerak petroleum eter : aceton (10:1) dan sampai fase gerak bergerak hingga garis batas
- Pengangkatan plat KLT dan pengeringan lat KLT pada suhu ruang
- Pengambilan Spot β -karoten yang memiliki panjang sama dengan standart beta karoten dengan menggunakan silet
- Pemasuan spot KLT dalam botol fial dan pelarutan dengan pelarut petroleum eter : aceton (1:10) sebanyak 3 mL
- Penyaringan ekstrak β karoten dengan menggunakan kertas whatman 0,2.

3.2.4 Parameter yang Diamati

Parameter pengamatan pada penelitian pendahuluan adalah mengetahui, karakteristik bahan baku melalui rata rata kadar air, berat ekstrak, dan *yield* β -karoten. Sedangkan parameter pengamatan pada penelitian utama adalah mengetahui konsentrasi pelarut terbaik berdasarkan, berat ekstrak, total karotenoid dan *yield* β -karoten. Kemudian dilakukan pengukuran panjang gelombang optimum β -karoten menggunakan Spektrofotometer UV-Vis serta dilakukan analisa dinding sel mikroalga *Dunaliella* sp menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*).

3.2.4.1 Berat Ekstrak (Sudarmadji, 1997)

Ekstrak pigmen kasar yang dihasilkan setelah proses ekstraksi dan evaporasi kemudian ditimbang dan dicatat sebagai berat ekstrak kasar (g).

3.2.4.2 Yield Ekstrak

Yield ekstrak yang dihasilkan setelah proses ekstraksi dibandingkan dengan jumlah awal bahan baku yang digunakan. Perhitungan yield ekstrak dapat menggunakan rumus:

$$\text{ekstrak pigmen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar (g)}}{\text{Berat tepung } Dunaliella \text{ sp. (g)}} \times 100\%$$

3.2.4.3 Analisa Total Karotenoid (Wahyuni dan Widjarnako, 2015)

Analisa total karotenoid dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode spektrofotometer UV-Vis adalah suatu metode analisa kimia secara kualitatif maupun kuantitatif. Prinsip dasar analisis kualitatif maupun kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu menggunakan sumber cahaya dari sinar UV dan sinar tampak dengan pengaturan berkas cahaya menggunakan monokromator.

- Pelarutan ekstrak kasar kering seberat 0,2 g dalam 5 mL pelarut aseton dan 1 mL petroleum eter
- Sentrifugasi larutan selama 5 menit
- Proses sentrifugasi tersebut menghasilkan bagian bening dan endapan. Pengulangan sebanyak 3 kali pada bagian endapan sehingga diperoleh bagian bening dan bagian endapan lagi
- Pengambilan Bagian bening menggunakan pipet tetes dan ditampung dalam tabung reaksi
- Pemasukan zona bening dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan Petroleum eter:aseton (1:1) hingga batas 25 mL
- Pemasukan dalam erlenmeyer dan ditambahkan 25 mL aquades. menghasilkan lapisan air – aseton – lapisan eter

- Pembuangan lapisan air – aseton - eter dibuang dan dicuci sebanyak 25 mL akuades
- Penambahan 1,25 g setiap 25 mL Na_2SO_4 untuk mengikat air pada sampel.
- Sentrifugasi selama 5 menit
- Proses sentrifugasi menghasilkan bagian bening dan dimasukkan dalam labu ukur 25 mL
- Penambahan petroleum eter : aseton sampai batas 25 ml
- Pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm.

3.2.4.4 Yield β -karoten

Penentuan kadar *yield* β -karoten dengan cara membuat kurva standart larutan beta karoten (5 mg/mL). Prosedur penentuan β -karoten adalah sebagai berikut :

- Pelarutan 10 mg β -karoten standar dalam 2 mL petroleum eter dan aseton (1:1)
- Pengenceran sampai 25 mL dengan menambahkan petroleum eter:aseton (10:1)
- Pengambilan dari hasil pengenceran masing-masing 0; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 mL
- Pemasukan ke dalam labu ukur 25 mL kosong dan diencerkan dengan Petroleum eter : aseton aseton (10:1) sampai tanda batas labu ukur
- Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 450 nm
- Pembuatan kurva regresi antara konsentrasi beta karoten dan absorbansi.

3.2.4.4 Pengukuran Panjang Gelombang Optimum β -Karoten dengan Spektrofotometer Visible (Dey dan Rathod, 2013 termodifikasi)

Pengukuran panjang gelombang optimum menggunakan spektrofotometer Visible yang merupakan suatu metode analisa kimia secara kualitatif maupun kuantitatif. Prinsip dasar analisis kualitatif maupun kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu menggunakan sumber cahaya dari sinar UV dan sinar tampak dengan pengaturan berkas cahaya menggunakan monokromator.

Prosedur pengukuran panjang gelombang optimum β -karoten dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah sebagai berikut :

- Penambahan PE:aseton (10:1) sebanyak ± 10 mL pada isolat β -karoten *Dunaliella* sp
- Pemasuk isolat dalam cuvet dan disiapkan blanko berupa PE:aseton (10:1) sebanyak 10 mL
- Pemasukan cuvet pada spektrofotometer UV-Vis
- Pengukuran panjang gelombang optimum (*peak*) dan diukur absorbansi dengan panjang gelombang sampel.

3.2.4.5 Perubahan Dinding Sel Mikroalga dengan SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Analisa dinding sel mikroalga dilakukan menggunakan SEM (*Scanning Electron Mikroskop*.) Prinsip kerja SEM adalah menembakkan permukaan benda dengan berkas elektron berenergi tinggi seperti diilustrasikan pada permukaan benda yang dikenai berkas akan memantulkan kembali berkas tersebut atau menghasilkan elektron sekunder ke segala arah. Prosedur identifikasi SEM adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan sampel sebanyak 1g
- Menyiapkan sampel holder atau kotak sampel yang terbuat dari logam
- Melekatkan sampel dengan menggunakan selotip karbon. Sisa serbuk yang tidak menempel pada selotip karbon dibersihkan
- Peletakkan sampel beserta tempatnya ke dalam SEM.