

Bab VI. Hasil Dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian yaitu mikroalga laut *Porphyridium cruentum*. Sampel ini didapatkan dari Pusat Penelitian *Oseanografi* LIPI Ancol Jl. Pasir Putih Raya No.1, RT/RW 08/10, Pademangan, Jakarta Utara pada tanggal 19 oktober 2018.

VI.2 Aktivasi

Sampel mikroalga laut *Porphyridium cruentum* yang didapatkan dari *Oseanografi* LIPI Ancol diaktivasi di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung. Aktivasi mikroalga dilakukan dalam medium walne, medium ini dipilih karena medium walne merupakan medium normal yang kaya akan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroalga. aktivasi ini dilakukan selama 3-4 hari, karena diperkirakan selama waktu 3-4 hari mikroalga dapat tumbuh dan beradaptasi dengan medium dan lingkungan barunya. Hal ini dapat dilihat dari pertambahan intensitas warna dan jumlah selnya. Perubahan intensitas warna dapat dilihat pada gambar VI.1



Gambar VI.1. Aktivasi : Hari pertama bening (A), setelah 3 hari sel kultur berubah warna menjadi kemerahan (B), semakin lama seiring dengan makin padatnya sel, kultur menghasilkan warna merah (C).

VI.3 Kurva Pertumbuhan

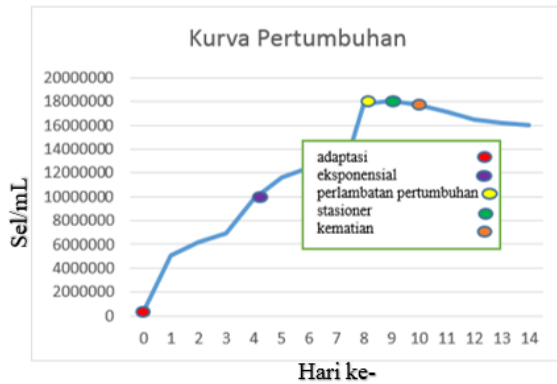
Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk menggambarkan siklus pertumbuhan dari mikroalga terhadap ketersediaan nutrisi dan lingkungan sekitar. Kurva pertumbuhan (kurtum) dibuat untuk melihat waktu panen dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. Kurtum dilakukan selama 14 hari dengan menggunakan medium walne, dalam rentang waktu tersebut diamati lima fasa, yaitu fasa adaptasi, eksponensial, perlambatan pertumbuhan, stasioner dan kematian. Metode untuk penentuan kurva pertumbuhan menggunakan metode *Haemocytometer* dan metode *Optical Density*.

1. Metode *Haemocytometer*

Penentuan kurva pertumbuhan metode ini dengan melihat pembelahan sel mikroalga *P. cruentum* setiap 1x24 jam. Pengamatan pertumbuhan diperoleh dari pengambilan sampel sebanyak 1 mL dari ketiga botol setiap 1x24jam, masing-masing sampel dari setiap botol diteteskan pada alat *Haemocytometer* dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x untuk diamati pembelahan sel. Sel *P. cruentum* berbentuk bulat dengan diameter 4 - 9 μm (Lee, 1989). Sel inokulum mikroalga pada hari ke-0 sebanyak 500.000 sel/mL. Pada hari pertama pertumbuhan sel mikroalga sebanyak 5.075×10^3 dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa mikroalga dapat beradaptasi dengan baik. Peningkatan sel optimum mulai terjadi pada hari ke-8 sebanyak 17,791.667 sel/mL dan waktu mulainya terjadi penurunan sel terjadi pada hari ke- 10 sebanyak 17,658.333 sel/mL (Tabel VI.1).

Tabel VI.1. Kurva pertumbuhan metode *Haemocytometer*

<i>Haemocytometer</i>				
Hari	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Rata-rata
0	500000	500000	500000	500000
1	6400000	4675000	4150000	5075000
2	7225000	6075000	5175000	6158333
3	7575000	7625000	5500000	6900000
4	10525000	10850000	8250000	9875000
5	13100000	11750000	10000000	11616667
6	13875000	12675000	10850000	12466667
7	11050000	9525000	10550000	10375000
8	18350000	18100000	16925000	17791667
9	18500000	18350000	17300000	18050000
10	15650000	18025000	19300000	17658333
11	15200000	17785000	18335000	17106667
12	14600000	17110000	17750000	16486667
13	14400000	17000000	17245000	16215000
14	14000000	16880000	17050000	15976667



Gambar VI.2 : Kurva pertumbuhan *P. cruentum*

Pada hari ke- 0-1 merupakan fasa adaptasi, dimana mikroalga mulai beradaptasi dengan mediumnya dan lingkungan tempat tumbuh. Hari ke- 1-7 mulai memasuki fasa eksponensial, dimana pada fasa ini terjadi proses pertumbuhan yang sangat cepat sehingga pertumbuhan mikroalga mengalami peningkatan yang signifikan (Barsanti & Gualteri, 2006). Hari ke 8 mulai terjadi peningkatan sel optimum pada mikroalga atau memasuki fasa perlambatan pertumbuhan sel. pada waktu inilah mikroalga dapat dipanen. Fasa kematian mikroalga dimulai pada hari ke- 10.

2. Metode *Optical Density*

Penentuan kurva pertumbuhan pada metode ini menggunakan spektrofotometri visible. Pemilihan dari spektrofotometri (visible) ini tentunya dari warna sampel mikroalga *Porphyridium cruentum* yang berwarna merah. Sebelum melakukan pengukuran terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang, didapatkan panjang

gelombang λ 680 nm. Panjang gelombang ini yang digunakan untuk mengamati proses pertumbuhan dari mikroalga.

Tabel VI.2. Kurva pertumbuhan metode *Optical Density*

Metode <i>Optical Density</i>				
Hari ke-	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Rata-rata
0	0,09	0,088	0,087	0,088333333
1	0,141	0,136	0,121	0,132666667
2	0,271	0,268	0,238	0,259
3	0,412	0,359	0,227	0,332666667
4	0,587	0,625	0,555	0,589
5	0,884	0,841	0,784	0,836333333
6	0,931	0,954	0,877	0,920666667
7	1,122	1,14	1,035	1,099
8	1,182	1,24	1,122	1,181333333
9	1,224	1,253	1,176	1,217666667
10	1,38	1,391	1,322	1,364333333
11	1,327	1,45	1,258	1,345
12	1,496	1,452	1,397	1,448333333
13	1,544	1,547	1,484	1,525
14	1,727	1,645	1,602	1,658



Gambar VI.3 : Kurva pertumbuhan *P. cruentum* Metode *Optical Density*

Hasil dari grafik kurva pertumbuhan dapat diamati bahwa fasa adaptasi terjadi pada hari ke- 1, mulai dari hari ke-2 sampai dengan hari ke-14 terjadi fasa eksponensial. Pada metode *Optical Density* ini pengamatan pada waktu panen tidak dapat diamati karena terus terjadi peningkatan nilai absorbansi. Hal ini bisa disebabkan karena semakin pekatnya warna dari mikroalga *P. cruentum* semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Sesuai dengan hukum Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi terhadap konsentrasi dan pekat larutan merupakan garis linier (Sastrohamidjojo, 1985). Karenanya menggunakan metode ini untuk melihat pertumbuhan dari mikroalga akan semakin sulit dalam menentukan fasa perlambatan pertumbuhan untuk pemanenan mikroalga (Gambar VI.2).

VI.4 Kultivasi mikroalga *Porphyridium cruentum*

Tujuan dari kultivasi yaitu untuk mengumpulkan biomasa sebanyak-banyaknya. Kultivasi mikroalga *Porphyridium cruentum* dilakukan dengan menggunakan teknik kultur *Batch*, teknik ini dilakukan hanya menginokulasi sel tunggal dengan periode pertumbuhan tertentu dan dipanen ketika kepadatan mikroalga mencapai maksimum. Sistem kultur *Batch* diterapkan karena sederhana dan fleksibel. (Barsanti dan Gualteri, 2006). Sel yang digunakan pada saat kultivasi sebanyak 500.000 sel/mL. Kultivasi dilakukan pada suhu ruang (25-27⁰c), fotoperiode 12:12 (12 jam hidup, 12 jam mati), intensitas cahaya 10,000 lux dan aerasi 24 jam.

Tabel VI.3. Data Kultivasi Mikroalga *P. cruentum*

Kultivasi				
Medium	Volume(L)	Kerapatan		
		Biomasa Basah(G)	Biomasa Kering(G)	Biomasa (g/L)
Walne	4.5	24.9	1.09	5.533333333
Walne	5.7	32.5	1.97	5.701754386
Walne	8.7	44.3	2.69	5.091954023
Walne	6.7	35.4	2.18	5.28358209
Walne	8.75	46.3	2.96	5.291428571
Walne	7	38.1	2.37	5.442857143
Walne	9.3	50.9	3.88	5.47311828
Walne	10	65.72	4.15	6.572
Walne	9.7	63.57	3.94	6.553608247
Jumlah	70.35	401.69	25.23	50.94363607

kultivasi dilakukan di laboratorium Sekolah Tinggi Farmasi Bandung pada bulan Januari-Februari. Kultivasi dilakukan pada medium walne sebanyak sembilan kali (9x). Untuk waktu pemanenan dilakukan pada hari ke-8 sesuai dengan data kurva pertumbuhan (Gambar VI.1: Kurva Pertumbuhan *P. cruentum*). Volume yang didapatkan adalah 70.35 liter.

VI.5 Pemanenan Mikroalga *Porphyridium cruentum*

Pemanenan dilakukan dengan menggunakan teknik sentrifuga. Tujuan dari pemanenan dengan teknik sentrifuga ini adalah untuk menghindari kerusakan sel mikroalga dan meminimalisir kehilangan biomassa. Dari proses sentrifuga akan diperoleh cairan dan padatan, yang kemudian padatannya diambil untuk dikumpulkan sebagai biomassa basah dan cairannya dibuang. Biomassa basah selanjutnya di *freeze dryer* untuk menghilangkan sisa air laut yang masih ada. Tujuan dari proses *freeze dryer* ini untuk mencegah pembusukan biomassa dan menghindarkan dari cemaran bakteri atau jamur. Jumlah keseluruhan berat dari biomassa basah adalah 401,69 gram. Dan untuk jumlah keseluruhan berat biomassa kering adalah 25,23 gram.

VI.6 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara masasesi, proses ini dipilih karena merupakan proses yang paling sederhana dan efektif juga tidak memerlukan peralatan khusus. Maserasi dilakukan secara bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksan - etil asetat – etanol, dengan

prinsip *like dissolved like*, dimana pelarut yang bersifat non polar akan melarutkan senyawa-senyawa non polar yang ada pada sampel, begitupun pelarut yang bersifat semi polar dan polar. Selain itu juga dengan menggunakan metode maserasi bertingkat dapat menghasilkan randeman lebih banyak. Sebelum proses maserasi dilakukan terlebih dahulu biomassa kering mikroalga *P. cruentum* di sonikasi terlebih dahulu. Sonikasi dilakukan dengan tujuan agar dinding sel mikroalga dapat pecah. Saat sonikasi biomassa kering direndam dalam pelarut n-heksan, dimana pelarut ini digunakan pertama kali dalam metode maserasi bertingkat ini. Hasil dari proses ekstraksi dapat dilihat pada tabel

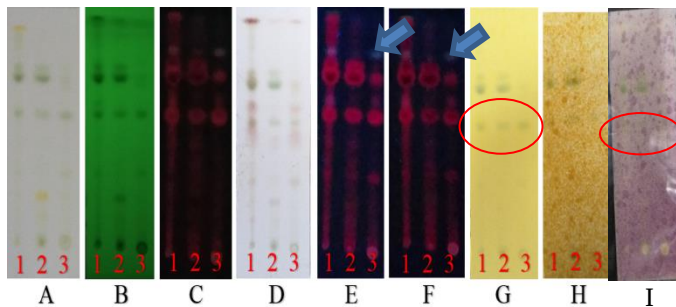
Tabel VI.4. Ekstraksi Mikroalga *P. cruentum*

Sampel	Pelarut	Bobot sampel (g)	Hasil ekstrak (g)	Hasil Rendeman (%)	Warna
<i>P. cruentum</i>	n-heksana	25	0.19	0.76	Hijau muda
<i>P. cruentum</i>	etil asetat	25	0.25	1	Hijau Pekat
<i>P. cruentum</i>	etanol	25	6.57	26.28	Hijau Pekat

VI.7 Pemantauan Ekstrak Mikroalga

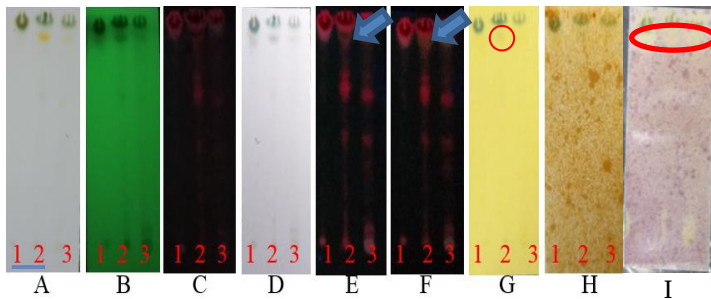
Pemantauan ekstrak dilakukan untuk melihat senyawa yang terkandung dalam ekstrak secara kualitatif dengan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄. Pengamatan dilakukan di bawah lampu uv

254nm, uv 365nm dan penampak bercak yang digunakan adalah H_2SO_4 10%, AlCl_3 5%, Sitroborat 10%, FeCl_3 10%, Dragendorff.



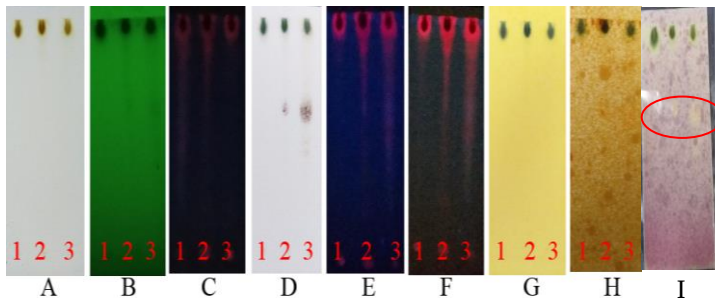
Gambar VI.4 : Kromatogram (1) ekstrak n-heksan, (2) ekstrak etil asetat, (3) ekstrak etanol, fase diam silika gel F_{254} , fase gerak non polar n-heksan - etil asetat – etanol (8:1.5:0.5), visual (A), sinar UV λ 254 nm (B), sinar UV λ 366 nm (C), visual H_2SO_4 10 % (D), sinar UV λ 366 nm AlCl_3 5 % (E), sinar UV λ 366 nm sitroborat 10 % (F), FeCl_3 10% (G), Dragendorff (H), DPPH (I).

Dari hasil pemantauan diatas dapat dilihat pada plat yang diberi penampak bercak AlCl_3 dan sitroborat terdapat bercak berwarna biru yang dapat dilihat dibawah sinar UV λ 366 nm, hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak n-heksana terdapat senyawa flavonoid. Pada plat dengan penampak bercak FeCl_3 terdapat bercak kehitaman sehingga menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana terdapat senyawa fenol. Pada plat dengan penampak bercak DPPH terlihat bercak kuning dengan latar ungu dan bercak tersebut sejajar dengan bercak FeCl_3 . Yang mana dapat disimpulkan senyawa aktif sebagai antioksidan adalah fenol. nilai RF yang dihasilkan adalah 0,72.



Gambar VI.5 : Kromatogram (1) ekstrak n-heksan, (2) ekstrak etil asetat, (3) ekstrak etanol, fase diam silika gel F_{254} , fase gerak semi polar etil asetat – n-heksan - etanol (7:2.5:0.5), visual (A), sinar UV λ 254 nm (B), sinar UV λ 366 nm (C), visual H_2SO_4 10 % (D), sinar UV λ 366 nm $AlCl_3$ 5 % (E), sinar UV λ 366 nm sitroborat 10 % (F), $FeCl_3$ 10% (G), Dragendorf (F), DPPH (I).

Sama seperti hasil pemantauan ekstrak n-heksana hasil dari ekstrak etil asetat memiliki hasil yang serupa yaitu dari hasil pemantauan diatas dapat dilihat pada plat yang diberi penampak bercak $AlCl_3$ dan sitroborat terdapat bercak berwarna biru yang dapat dilihat dibawah sinar UV λ 366 nm, hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etil asetat terdapat senyawa flavonoid. Pada plat dengan penampak bercak $FeCl_3$ terdapat bercak kehitaman sehingga menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat terdapat senyawa fenol. Pada plat dengan penampak bercak DPPH terlihat bercak kuning dengan latar ungu dan bercak tersebut sejajar dengan bercak $FeCl_3$. Yang mana dapat disimpulkan senyawa aktif sebagai antioksidan adalah fenol. nilai RF yang dihasilkan adalah 0,91.



Gambar VI.6 : Kromatogram (1) ekstrak n-heksan, (2) ekstrak etil asetat, (3) ekstrak etanol, fase diam silika gel F_{254} , fase gerak polar BAW (4:5:1), visual (A), sinar UV λ 254 nm (B), sinar UV λ 366 nm (C), visual H_2SO_4 10 % (D), sinar UV λ 366 nm $AlCl_3$ 5 % (E), sinar UV λ 366 nm sitroborat 10 % (F), $FeCl_3$ 10% (G), Dragendorff (F), DPPH (I).

Untuk pemantauan ekstrak etanol tidak terlihat adanya bercak pada plat dengan penampak bercak $AlCl_3$, sitroborat dan $FeCl_3$. Tetapi pada plat dengan penampak bercak DPPH terlihat adanya bercak berwarna kuning. Hal ini mungkin disebabkan kerana kandungan senyawa dalam ekstrak etanol lebih sedikit sehingga tidak terlalu terlihat, atau bisa juga karena pemisahan senyawa yang kurang baik. Nilai RF yang dihasilkan adalah 0,54.

VI.8. Karakterisasi

Tabel VI.5 Hasil Karakterisasi biomassa Mikroalga *Porphyridium cruentum*

Parameter	Hasil (%) b/b)
Kadar Abu Total	45,33
Kadar Abu Tidak Larut Asam	20,67
Kadar Sari Larut Air	36,16
Kadar Sari Larut Etanol	53,65
Susut Pengeringan	7,82

Karakterisasi biomassa kering dari mikroalga *Porphyrium cruentum* sama seperti pada simplisia lainnya, ada beberapa karakterisasi yang dilakukan meliputi penetapan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, dan susut pengeringan. Tujuan dari karakterisasi ini untuk mengetahui kualitas dari biomassa yang digunakan sebagai bahan dalam penelitian. Setiap parameter uji karakterisasi memiliki persyaratan yang harus dipenuhi untuk dapat menjamin mutu dari bahan yang digunakan.

Penetapan kadar abu total bertujuan untuk menunjukkan kandungan mineral yang terkandung didalam biomassa mikroalga *Porphyrium cruentum* baik mineral internal maupun eksternal (Depkes RI, 2000). Bahan organik yang ada didalam bahan akan terbakar oleh proses pembakaran dengan tanur, akan tetapi bahan anorganik seperti silikat akan tertinggal. Hasil penetapan kadar abu total mikroalga

Porphyrium cruentum adalah sebesar 45,33 %, sedangkan kadar abu tidak larut asam mikroalga *Porphyrium cruentum* adalah sebesar 20,67 %. Kadar abu tidak larut asam menunjukkan kadar pengotor yang terdapat pada sampel.

Dari data hasil kadar abu total biomassa mikroalga *Porphyrium cruentum* didapatkan hasil kadar abu total yang tinggi dan melebihi batas normal ($> 10\%$). Tingginya kadar abu total pada penelitian ini diduga karena biomassa setelah pemanenan tidak dicuci, sehingga masih tercampur dengan garam mineral dari media kultur *Porphyrium cruentum*. Hal ini bisa juga disebabkan karena mikroalga ini banyak mengandung mineral dan hal ini sejalan dengan jenis mikroalga *Porphyrium cruentum* yang merupakan diatom yang memiliki silika pada dinding selnya. Selain itu mikroalga dikultivasi menggunakan air laut yang disertai penambahan mineral tertentu untuk menunjang pertumbuhan mikroalga laut. Selain itu air laut mengandung berbagai komponen mineral diantaranya Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , (SO_4^{2-}) dan Br^- .

Penetapan kadar sari ini bertujuan untuk menggambarkan jumlah sari atau senyawa yang dapat terlarut dalam suatu pelarut tertentu (Depkes RI, 2000:31). Pada penetapan kadar sari ini menggunakan dua pelarut yaitu air dan etanol. Hasil penetapan kadar sari larut air mikroalga *Porphyrium cruentum* adalah sebesar 53,65 %, hasil itu menunjukkan banyaknya senyawa yang terlarut dalam pelarut air. Sedangkan penetapan kadar sari larut etanol menunjukkan

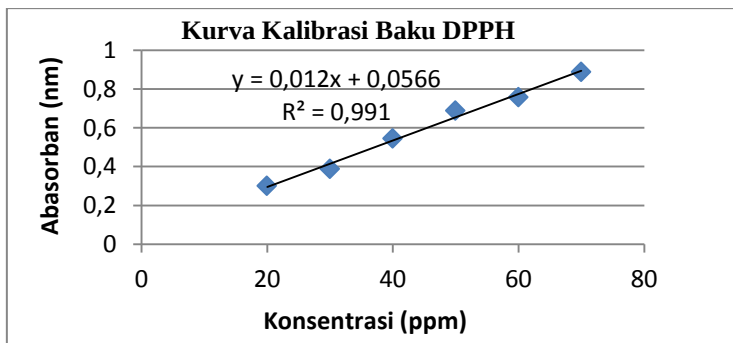
banyaknya senyawa yang terlarut dalam pelarut etanol, hasil penetapan kadar sari larut etanol mikroalga *Porphyrium cruentum* adalah sebesar 36,16 %. Dari hasil yang didapat kadar sari larut air lebih besar dibandingkan kadar sari larut etanol. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan senyawa yang larut dalam air lebih tinggi dibanding senyawa yang larut dalam etanol dari mikroalga *Porphyrium cruentum*.

Susut pengeringan merupakan parameter untuk menggambarkan kadar zat yang menguap di dalam suatu bahan, selain itu menggambarkan batasan maksimum rentang besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Hasil susut pengeringan mikroalga *Porphyrium cruentum* adalah sebesar 7,82 %.

VI.9. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) dengan alat uji spektrofotometri UV-Visible. Penangkap radikal bebas merupakan mekanisme utama antioksidan. Salah satu cara untuk menguji aktivitas suatu senyawa sebagai zat antioksidan adalah dengan mereaksikannya dengan reagen DPPH secara spektrofotometri. DPPH digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode ini dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

Hal pertama yang dilakukan pada uji aktivitas antioksidan yaitu membuat baku standar DPPH, vitamin C dan sampel. Sebelum pengujian terhadap sampel cari panjang gelombang maksimum dari DPPH terlebih dahulu. Tujuan dari pengukuran panjang gelombang maksimum adalah untuk mengetahui pada panjang gelombang berapa DPPH dapat memberikan serapan maksimum. Didapatlah panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 516 nm. Selanjutnya dilakukan pengukuran linieritas antara absorbansi dengan konsentrasi larutan DPPH. Penetapan kurva kalibrasi DPPH dibuat dari larutan induk 100 µg/mL kemudian dibuat seri konsentrasi 20,30,40,50,60,70 µg/mL dan diukur pada panjang gelombang 516 nm.



Gambar VI.7 Grafik kurva kalibrasi DPPH

Dilihat dari hasil pengukuran didapatkan linear yang mana semakin meningkat konsentrasi DPPH akan semakin meningkat absorbansinya. Data standar didapat dari hasil IC_{50} vitamin C, yang dibuat dalam beberapa konsentrasi dan masing-masing ditambahkan

dengan DPPH (1:1) lalu diinkubasi selama 30 menit. Diinkubasi selama 30 menit bertujuan untuk memaksimalkan reaksi antara senyawa antioksidan yang terkandung didalam sampel dengan radikal bebas. Dalam pengerjaan pembuatan kurva standar maupun pengujian terhadap sampel diharapkan dalam kondisi wadah yang gelap dan ruangan yang tidak terlalu terang. Dikarenakan DPPH mempunyai karakteristik sensitif pada cahaya sehingga dikhawatirkan kemampuannya dalam meredam radikal bebas kurang maksimal. Setelah proses inkubasi sampel dan standar kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-vis pada panjang gelombang 516 nm. Data absorbansi yang diperoleh dari sampel dan standar kemudian diukur % inhibisinya. Persen inhibisi dapat didefenisikan sebagai kemampuan bahan dalam menangkal radikal bebas yang berhubungan dengan konsentrasi bahan yang diuji. Semakin tinggi nilai %inhibisi semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya.

Dari hasil pengujian dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan terbaik terdapat pada ekstrak n-heksana dengan nilai IC_{50} paling kecil dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan etanol. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Dari hasil pengujian didapatkan nilai IC_{50} untuk ekstrak n-heksan 362,09 $\mu\text{g/mL}$; untuk ekstrak etil asetat 2704,4 $\mu\text{g/mL}$ dan untuk ekstrak etanol 2878 $\mu\text{g/mL}$.