

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2025 di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Kimia Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan porselen, batang pengaduk, corong pisah, blender, *waterbath* (DFS), cawan porselen, *chamber*, gelas ukur 10mL (*phyrex*), pipet tetes, beaker glass(*phyrex*), erlenmeyer (*phyrex*), sonikasi, oven, thermometer, mikro pipet, labu ukur 100mL (*phyrex*), timbangan analitik, ayakan mesh 60, plat silika gel GF 254, kertas saring, vial, kuvet, sentrifugasi dan *Spektrofotometer UV-Vis(shimadzu)*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah cangkang lobster air tawar, aseton (*Pt emex*), n-heksan (*Pt emex*), PE(*Pt smart lab*), NaCl (*Kimia jaya lab*), aquadest (*Pt brataco*), asam asetat glasial (*Pt smart lab*), asam asetat 0,1 M (*Pt kimia jaya lab*) dan astaxanthin (*p.a*) (*pt kimia jaya lab*).

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk penentuan kadar astaxanthin secara kuantitatif serta metode KLT untuk penentuan kandungan astaxanthin secara kualitatif.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Bahan Pembuatan Serbuk

Sampel cangkang lobster air tawar diperoleh dari distributor lobster air tawar di Kecamatan Gombang Kabupaten Kebumen sampel dikumpulkan pada bulan Mei. Lobster bersihkan terlebih dahulu menggunakan air mengalir hingga bersih, keringkan cangkang lobster menggunakan oven pada suhu 65°C selama 3-4 jam, haluskan menggunakan blender dan yang terakhir diayak dengan ayakan mesh 60 untuk mendapatkan serbuk agar lebih halus (Pebiansyah & Yuliana, 2021).

3.4.2 Pembuatan Larutan NaCl 0,73%

Timbang 0,1095 gram natrium klorida menggunakan timbangan analitik. Masukkan NaCl yang telah ditimbang ke dalam Erlenmeyer yang bersih. Tambahkan air suling (aquades) secara bertahap dari total 15 mL sambil mengaduk hingga NaCl larut sepenuhnya. Setelah larutan menjadi jernih dan tidak ada kristal yang tersisa, tambahkan sisa air suling hingga volume total

mencapai 15 mL. Aduk kembali untuk memastikan larutan homogen (Sukawaty *et al.*, 2016).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Cangkang Lobster Air Tawar

Cangkang yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 45 gram, lalu sampel dilarutkan dengan 450 mL aseton:n-heksana (1:1) kemudian disonikasi dalam suhu 20°C - 40°C dengan frekuensi 35 kHz selama 120 menit. Selanjutnya ekstrak disaring menggunakan kertas saring, kemudian dilakukan partisi dengan menggunakan corong pisah. Lalu filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan 450 mL petroleum eter. Setelah pencampuran, epifase (filtrat bagian atas) dikumpulkan lalu ditambahkan 450 mL NaCl 0,73%. Kemudian lapisan epifase dikumpulkan kembali dan ditambahkan 450 mL aquadest, fase air yang berada di bagian bawah dibuang dan lapisan epifase bagian atas dikumpulkan lalu diuapkan di waterbath pada suhu 60°C (Afifah *et al.*, 2024).

3.5 Analisis Kualitatif Astaxanthin

Kromatografi lapis tipis (KLT) pada penelitian ini menggunakan plat KLT silika gel GF 254 dan dielusi dengan pelarut aseton:n-heksana (1:3) sebanyak 15 mL. Empat pola pemisahan pigmen diamati berdasarkan noda warna yang terbentuk, kemudian dilakukan perhitungan nilai retardation factor (Rf) dari

masing-masing noda dan dibandingkan dengan nilai R_f astaxanthin standar (Afifah *et al.*, 2024).

3.6 Analisis Kuantitatif Astaxanthin

3.6.1 Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 10 mg astaxanthin (*p.a*) ke dalam campuran pelarut yang terdiri dari asam asetat glasial dan asam asetat 0,1 M dengan perbandingan 3:1. Larutan ini kemudian diencerkan hingga volume total mencapai 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Sebagai kontrol, larutan blanko disiapkan dengan menggunakan campuran pelarut yang sama, namun tanpa penambahan astaxanthin. Larutan stok selanjutnya diproses dengan metode sonikasi pada suhu antara 20°C hingga 40°C, menggunakan frekuensi gelombang ultrasonik antara 35 kHz selama 30 menit. Setelah itu, larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan partikelnya. Supernatan yang terbentuk dari larutan stok kemudian dikumpulkan dan diencerkan hingga mencapai konsentrasi akhir 100 ppm. Larutan blanko tetap digunakan sebagai pembanding tanpa mengalami perubahan (Afifah *et al.*, 2024).

3.6.2 Penentuan Panjang Gelombang

Sebanyak 0,4 mL larutan stok dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan campuran asam asetat glasial dan asam asetat 0,1 M

dengan perbandingan 3:1 hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 4 ppm. Setelah itu, serapan larutan diukur pada panjang gelombang antara 200 hingga 400 nm (Afifah *et al.*, 2024).

3.6.3 Penetapan Kurva Baku Astaxanthin

Pengenceran dilakukan dengan mengambil larutan stok sebanyak 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; dan 0,7 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan campuran asam asetat glasial dan asam asetat 0,1 M dengan perbandingan 3:1 hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 2; 3; 4; 5; 6; dan 7 ppm. Setiap larutan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Data yang diperoleh kemudian disusun dalam bentuk kurva linier yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi secara linier (Afifah *et al.*, 2024).

3.6.4 Penetapan Kadar Astaxanthin Dalam Cangkang Lobster Air Tawar

Sebanyak 10 mg ekstrak cangkang lobster air tawar ditimbang dan dilarutkan dalam campuran asam asetat glasial dan asam asetat 0,1 M dengan perbandingan 3:1 hingga volume total mencapai 10 mL, menghasilkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut kemudian diencerkan hingga mencapai konsentrasi 6 ppm. Proses ini dilakukan dalam tiga kali replikasi. Setelah itu, serapan larutan diukur pada

panjang gelombang maksimum. Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung menjadi konsentrasi dengan menggunakan persamaan kurva baku (Afifah *et al.*, 2024).

3.7 Analisis Data

a. Persamaan Garis Regresi Linier

$$Y = a + bx$$

Keterangan:

Y = Serapan

a = Intersep

x = Konsentrasi

b = Slop kemiringan

b. Perhitungan kadar astaxanthin

$$\frac{r = \text{Konsentrasi (mg/L)} \times \text{Volume sampel (L)} \times fp}{\text{Berat sampel (g)}}$$

Keterangan:

fp = Faktor Pengenceran

86,583 mg/L