
ANALISIS ASAM LEMAK MIKROALGA LAUT *Chlorella Sp.* PADA MEDIUM MODIFIKASI DENGAN KROMATOGRAFI GAS SPEKTROMETRI MASSA (KG-SM)**FATTY ACID ANALYSIS OF MARINE MICROALGAE *Chlorella Sp.* IN MODIFIED MEDIUM USED GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS)****Dewi Kurnia¹, Revi Asri¹, Deden Indra Dinata¹, Zeily Nurachman²**¹Bandung School of Pharmacy, West Java²Biochemistry, Chemistry Departement Institute of Technology Bandung, West JavaEmail: dewi.kurnia@stfb.ac.idReceived: 15 January 2018; Revised: March 2018; Accepted: March 2018; Available online: April 2018

ABSTRACT

Microalgae is known as a raw materials of pharmaceutical industry, it contains various chemical compounds such as protein, fatty acid, pigments and vitamins. The compound can be use as a basic ingredient of pharmaceutical also can be use as a treatment or prevention agent such as cancer and high cholesterol. Chlorella sp. is a green microalgae which can be found in Indonesia marine area, it also has a high enough of lipid. Compositon of fatty acid from marine microalgae Chlorella sp that cultivated with modification medium has been analyzed. Microalgae culture cultivated with GM 10% as a medium for 8 days. 51,55 L culture produced a 31,0537 gr dry biomass. 31,0537 gr dry biomass Soxhletation produced about 12,8818% w/w oil rendemen. The results of GC-MS analysis, there are 3 types of fatty acids identified in microalgae Chlorella Sp. The composition are palmitic acid (13,34%), linoleic acid (5,39%) and oleic acid (16,40%). Total fatty acid contained is 35,13%

Keywords: *Chlorella sp, fatty acids, GC-MS.***ABSTRAK**

Mikroalga saat ini dikenal sebagai bahan baku industri farmasi karena memiliki kandungan senyawa kimia seperti protein, asam lemak, pigmen dan vitamin. Kandungan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar sediaan farmasi untuk mengobati atau mencegah beberapa penyakit seperti kanker dan kolesterol tinggi. *Chlorella sp.* merupakan mikroalga hijau yang banyak ditemukan di perairan laut Indonesia dan memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi. Telah dilakukan analisis komposisi asam lemak yang terdapat pada mikroalga laut *Chlorella sp.* yang dikultivasi menggunakan medium modifikasi. Kultur mikroalga dikultivasi menggunakan medium GM 10% selama 8 hari. Biomassa kering yang diperoleh 31,0537 gram dari 51,55 L kultur. Soxhletasi biomassa kering 31,0537 gram dengan rendemen minyak yang dihasilkan sebesar 12,8818 % b/b. Hasil analisis KG-SM terdapat 3 jenis asam lemak yang teridentifikasi pada mikroalga *Chlorella Sp.* Komposisinya terdiri dari asam palmitat (13,34%), asam linoleat (5,39%) dan asam oleat (16,40%). Total asam lemak yang diperoleh adalah 35,13%.

Kata kunci: *Chlorella Sp, asam lemak, KG-SM.*

PENDAHULUAN

Mikroalga dikenal sebagai bahan baku industri farmasi karena memiliki kandungan senyawa kimia seperti protein, asam lemak, pigmen dan vitamin. Kandungan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar sediaan farmasi yang berfungsi untuk mengobati atau mencegah beberapa macam penyakit seperti kanker dan kolesterol tinggi. Pada umumnya bahan baku asam lemak diperoleh dari tanaman penghasil trigliserida seperti kelapa sawit, kedelai dan jarak. Budidaya tanaman tersebut membutuhkan lahan yang luas dengan waktu panen yang cukup lama. Hal ini berbeda dengan mikroalga yang tidak membutuhkan lahan yang luas dengan waktu panen yang singkat (Kawaroe, 2010).

Kandungan lipid dalam beberapa spesies mikroalga juga kaya akan asam lemak esensial seperti C18 linoleat dan turunan dari C20 seperti asam eikosapentanoat dan asam arachidoneat. Jenis-jenis asam lemak yang termasuk dalam komponen esensial dapat dimanfaatkan untuk membantu menurunkan berat badan pada manusia, disamping itu bisa juga dijadikan sebagai bahan aditif untuk pakan pertanian. (Kawaroe dkk,2010). Kandungan lipid dalam mikroalga biasanya dalam bentuk gliserol dan asam lemak dengan panjang rantai C14 sampai C22, dapat ditemukan dalam bentuk jenuh dan tidak jenuh. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Kawaroe dkk (2009) kandungan asam lemak dari *Chlorella sp* adalah asam laurat (0,02), asam stearat (29,50), asam palmitat (8,09), asam oleat (2,41), asam valerat (10,06), asam palmitoleat (2,15), asam linoleat (45,07) dan asam linolenat (11,49) (Kawaroe dkk,2010). Berdasarkan data yang telah ada, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis komposisi dan jenis asam lemak yang terdapat pada mikroalga laut *Chlorella sp.* dengan medium modifikasi.

METODE PENELITIAN

Sterilisasi alat gelas tahan panas dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi peralatan yang tidak tahan panas dilakukan dengan cara menyemprotkan larutan alkohol 70% secara merata. Alat yang sudah disterilkan dapat disimpan pada 70°C bila belum digunakan (Andersen, 2005). Kultur mikroalga laut *Chlorella sp.* diperoleh dari KK Biokimia ITB Bandung dalam medium Walne dengan salinitas 25 ppt. Aktivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan di laboratorium penelitian STFB pada medium GM dengan volume total kultur 900 mL, inokulum kultur mikroalga 10% (v/v) dari volume total kultur, dan medium 0,1% (v/v). Salinitas medium air laut diatur pada konsentrasi 25 ppt, aerasi selama 24 jam, suhu ruang ($\pm 25-27^\circ\text{C}$), fotoperiode 12:12 (gelap:terang) dengan intensitas cahaya 10,000 lux. Proses aktivasi dilakukan selama 4 hari (Brataningtyas, 2011).

Aktivitas pertumbuhan *Chlorella sp.* dilakukan selama 12 hari dalam medium modifikasi menggunakan pupuk NPK *Grow More* (20-20-20) dengan konsentrasi 5, 10 dan 15% pada air laut dengan salinitas 25 ppt, aerasi selama 24 jam, suhu ruang ($\pm 25-27^\circ\text{C}$), fotoperiode 12:12 (gelap:terang) dengan intensitas cahaya 10,000 lux. (Barsanti dan Gualteri, 2006). Kultivasi dilakukan menggunakan medium GM dengan konsentrasi yang memberikan aktivitas laju pertumbuhan terbaik dari mikroalga *Chlorella sp.* Pemanenan mikroalga dilakukan dengan teknik flokulasi menggunakan NaOH (1:1) selama ± 24 jam. pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 30°C selama 24 jam sampai diperoleh biomassa *Chlorella sp.* kering dengan kadar air kurang dari 10 % (Kumalasari dkk, 2014).

Kadar air biomassa kering ditentukan dengan metode gravimetri. Biomassa kering disimpan dalam cawan porselen yang dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama ± 15 menit, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit (AOAC, 1984). Berdasarkan SNI, biomassa kering mikroalga dinyatakan memenuhi syarat untuk dilakukan ekstraksi minyak bila kadar air <10%. Ekstraksi minyak dari biomassa kering dilakukan dengan metode ekstraksi yang dilakukan adalah soxhletasi menggunakan n-heksan selama 6 – 8 jam pada suhu 80 °C. Kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* (Kumalasari dkk, 2014). Proses esterifikasi dilakukan menggunakan BF₃ dalam methanol, dipanaskan selama 1 jam pada suhu 60 °C. Komposisi asam lemak yang dianalisis menggunakan KG-SM dengan jenis kolom Db-5, panjang 30 m, gas pembawa helium, pustaka WILEY7, mode injeksi split, suhu kolom 60°C, suhu injeksi 280°C, tekanan 100 kPa dan laju alir 1,61 mL/min. Data yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan metode ANOVA.

HASIL DAN PEMBAHASAN**Aktivasi Mikroalga *Chlorella sp.***

Aktivasi mikroalga dalam medium GM 5% dilakukan untuk mempersingkat fase adaptasi sel terhadap kondisi medium dan kondisi lingkungan pertumbuhan yang baru. Aktivasi dilakukan selama 4 hari karena diperkirakan selama waktu 4 hari mikroalga dapat tumbuh dan beradaptasi dengan medium atau lingkungan barunya. Hal ini dapat dilihat dari pertambahan intensitas warna dan jumlah selnya. Perubahan pada kondisi tumbuh dapat menjadi penyebab gangguan pada pertumbuhan mikroalga seperti perlambatan pertumbuhan bahkan bisa menyebabkan adanya kontaminasi dan kematian pada mikroalga jika tidak sesuai dengan kondisi lingkungan pertumbuhannya. Medium GM 5% dipilih karena memiliki komposisi yang tidak terlalu berbeda dengan medium Walne dan mengandung nutrisi yang diperlukan oleh mikroalga. Selain itu, medium ini sudah pernah diujikan pada penelitian di ITB dengan konsentrasi dan komposisi yang berbeda (Kurnia, 2013). Aktivasi dilakukan dalam 1 botol yang berisi air laut 810 mL, 1 mL medium GM 5% dan sejumlah bibit *Chlorella sp.* (± 20 mL). Setelah melewati masa aktivasi kepadatan sel yang diperoleh sebesar $35,9 \times 10^6$ sel/mL.

Kurva Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.*

Kurva GM dengan beberapa konsentrasi yaitu 5%, 10% dan 15% secara duplo dengan kepadatan awal 10^6 sel/mL (Tabel 1). Medium ditambahkan setiap hari, dengan tujuan memberikan makanan pada mikroalga agar pertumbuhannya baik. Setiap hari selama 12 hari jumlah sel dihitung menggunakan *haemocytometer* dan dilakukan perhitungan laju pertumbuhan spesifik (Tabel 2).

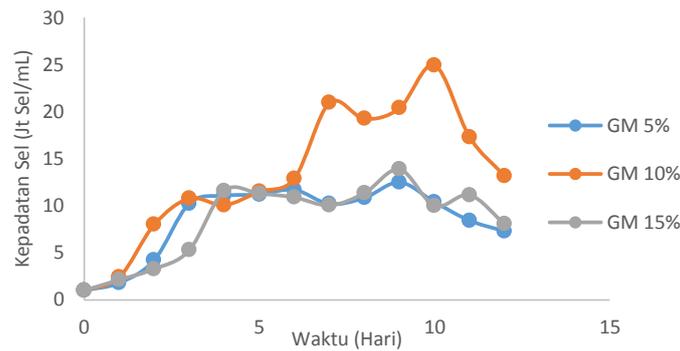
Tabel 1. Kepadatan Sel Mikroalga *Chlorella sp.*

Hari Ke-	Medium GM		
	5%	10%	15%
0	1	1	1
1	1,8	2,4	2,13
2	4,23	8	3,28
3	10,25	10,78	5,28
4	11,08	10,08	11,6
5	11,2	11,5	11,3
6	11,7	12,9	10,9
7	10,2	20,95	10,05
8	10,85	19,25	11,35
9	12,5	20,38	13,88
10	10,4	24,95	10
11	8,43	17,3	11,15
12	7,3	13,15	8,05

Tabel 2. Laju Pertumbuhan Spesifik Mikroalga *Chlorella sp.*

Hari ke	Medium GM		
	5%	10%	15%
1	0,588	0,875	0,756
2	-0,427	-0,602	-0,216
3	-1,475	-0,497	-0,793
4	-0,214	0,185	-2,164
5	-0,041	-0,501	0,100
6	-0,211	-0,555	0,174
7	0,804	-2,840	0,476
8	-0,425	0,582	-0,836
9	-1,117	-0,450	-1,587
10	1,637	-1,801	2,918
11	2,081	3,628	-1,079
12	1,571	2,994	3,556

Dari data diatas didapat kurva pertumbuhan sebagai berikut :



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Chlorella Sp.*

Berdasarkan data di atas medium GM dengan konsentrasi 10% memberikan hasil pertumbuhan *Chlorella sp.* lebih cepat dibandingkan konsentrasi lainnya. Kepadatan sel maksimum $19,25 \times 10^6$ sel/mL dan laju pertumbuhan spesifiknya 0,582. Dari data tersebut maka untuk tahapan selanjutnya medium yang digunakan adalah GM 10% dengan waktu panen pada hari ke-8. Berdasarkan data kepadatan sel, dilakukan juga pengujian secara statistik menggunakan metode *one way ANOVA* berikut data statistik yang diperoleh:

Tabel 3 Uji ANOVA Medium GM

Hasil				
	Jumlah Kuadrat	Kotak Berarti	F	Sig.
Kelompok Antara	396.881	198.441	5.540	.006
Kelompok Dalam	2686.706	35.823		
Total	3083.587			

Hasil				
Medium	N	Bagian alpha = 0.05		Sig.
		1	2	
Duncan ^a 15%	26	8.4538		
dimensi 5%	26	8.5308		
1 10%	26		13.2769	
				.963
				1.000

Dari pengolahan data statistik (tabel 3) diperoleh adanya perbedaan yang signifikan pada kepadatan sel yang menggunakan medium GM 10% dengan kepadatan sel yang menggunakan medium GM 5% dan GM 15%. Medium GM 10% merupakan konsentrasi medium terbaik untuk digunakan pada saat kultivasi dibuktikan secara statistik dengan nilai homogenitas yang paling tinggi.

Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Kultivasi dilakukan untuk mengumpulkan biomassa sebanyak-banyaknya. Komposisi medium pertumbuhan akan berpengaruh terhadap biomassa dan kandungan lipid yang akan dihasilkan. Pada

konsentrasi nitrogen dan intensitas cahaya yang tinggi mikroalga memiliki laju pertumbuhan dan biomassa yang tinggi tetapi memiliki kandungan lipid yang rendah. Pada kondisi konsentrasi nitrogen yang rendah mikroalga akan membentuk lipid sebagai cadangan makanan (Becker, 1994).

Dari kurva pertumbuhan diketahui waktu panen yang optimum adalah pada hari ke-8. Kultivasi mikroalga dilakukan dengan kondisi yang sama dengan aktivasi di dalam medium GM 10% dan kepadatan sel inokulum kultur sebesar 10^6 sel/mL. Pemanenan dilakukan pada hari ke-8 dan dilakukan perhitungan rata-rata jumlah sel yang dipanen. Pemanenan dilakukan dengan metode flokulasi (pengendapan) menggunakan NaOH dengan perbandingan 1:1 dilakukan selama 24 jam kemudian dipisahkan biomasa dan cairan jernihnya.. Tujuan dari penambahan NaOH adalah untuk mematikan mikroalga. *Chlorella sp.* termasuk mikroalga yang hidupnya tersebar mengambang di air laut maka dari itu NaOH yang mempunyai pH basa akan menyebabkan kondisi lingkungan yang ekstrim sehingga mikroalga bisa mati dan mengendap. Setelah 24 jam cairan jernih dibuang dan biomassa yang sudah mengendap disaring menggunakan kanebo. Kain kanebo dipilih sebagai penyaring karena memiliki diameter pori yang sangat kecil (60μ). Residu yang tersaring dibilas kembali dengan aquades untuk menghilangkan garam yang masih ada dalam biomassa tersebut. Hasil dari penyaringan akan diperoleh biomassa basah mikroalga yang berbentuk pasta (gambar 2). Selanjutnya biomassa basah dimasukkan kedalam cawan yang sudah ditimbang lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 30°C selama ± 24 jam dengan tujuan untuk menghilangkan air yang masih tersisa.



Gambar 2. Biomassa basah mikroalga

Analisis Kadar Air

Kadar air merupakan parameter penentu bisa atau tidaknya dilakukan ekstraksi lipid pada suatu sampel. Dalam penelitian ini sampelnya adalah biomassa kering dari mikroalga *Chlorella Sp.* Penentuan kadar air biomassa kering dilakukan dengan metode gravimetri. Prinsip dari metode gravimetri adalah kehilangan bobot pada pemanasan 105°C yang dianggap sebagai kadar air yang terdapat pada sampel. Pada pengujian kadar air dilakukan secara triplo. Kadar air yang diperoleh adalah 9,4%. Syarat kadar air maksimal untuk dilakukan proses ekstraksi lipid berdasarkan SNI adalah $<10\%$. Dengan demikian, sampel biomassa kering telah memenuhi persyaratan kadar air maksimal untuk tahapan selanjutnya yaitu ekstraksi lipid.

Ekstraksi Minyak *Chlorella Sp.*

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah soxhletasi. Prinsip dari metode ini yaitu menggunakan pelarut yang selalu baru dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik. Pelarut yang digunakan adalah N-heksan. Pelarut ini merupakan pelarut non polar yang dapat melarutkan lipid dari mikroalga dalam kondisi biomassa kering. Pelarut n-heksan dapat digunakan dengan meminimalkan kandungan air di dalam mikroorganisme tersebut. Kandungan air maksimal sebesar 5% berat/berat di dalam mikroorganisme yang akan diekstrak menggunakan n-heksan sebagai pelarutnya. Biomassa kering yang digunakan untuk ekstraksi adalah 10,3842 gram. Minyak yang diperoleh dari ekstraksi mikroalga *Chlorella Sp.* berwarna kuning kecoklatan dan randemen minyak yang diperoleh yaitu 12,8818 % b/b (gambar 3). Randemen minyak yang diperoleh cukup kecil. Hal ini mungkin

disebabkan karena adanya gangguan kadar air dalam biomassa kering yang masih cukup tinggi yakni 9,4%, meskipun kadar tersebut masuk ke dalam ambang batas kadar air menurut SNI. Sebagai alternatif, disarankan digunakan pelarut yang saling larut dengan air misalnya isopropanol untuk mengekstrak minyak dari mikroorganisme yang umumnya mengandung 70-95% air di dalam tubuhnya. Namun penggunaan pelarut isopropanol, dapat menyebabkan ikut terekstraknya komponen lain selain trigliserida (TGs) seperti: fosfolipid dan komponen-komponen dinding sel sehingga memerlukan proses pemurniaan lebih lanjut untuk memisahkan residu-residu yang terikut (Rachmaniah, 2010).



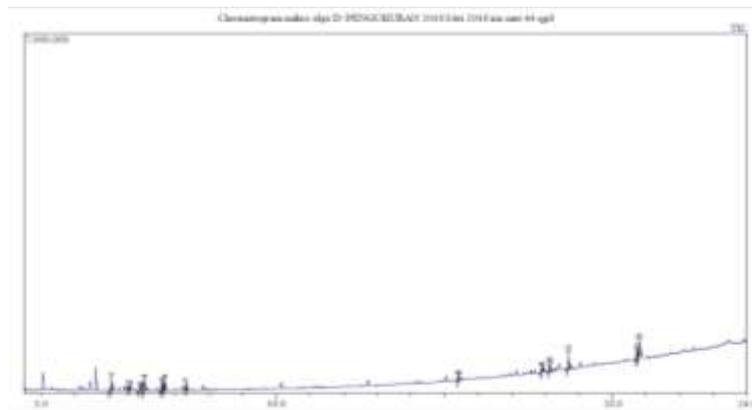
Gambar 3. Minyak hasil ekstraksi

Esterifikasi Minyak *Chlorella sp.*

Esterifikasi dilakukan bertujuan untuk mengubah asam lemak yang direaksikan dengan alkohol menjadi bentuk esternya. Minyak yang diperoleh dari hasil ekstraksi ditambahkan BF_3 dalam metanol dan dipanaskan pada suhu 60°C . Pada saat esterifikasi yang bereaksi adalah metanol dan BF_3 berfungsi sebagai katalis. Setelah itu terbentuk 2 lapisan, lapisan atas merupakan bagian senyawa non polar dimana terdapat asam lemak. Lapisan atas ini kemudian diambil dan diinjeksikan kedalam KG-SM sebanyak $0,20 \mu\text{L}$

Analisis KG-SM

Dari hasil analisis asam lemak mikroalga *Chlorella Sp.* menggunakan kromatografi gas spektrometri massa diperoleh data kromatogram yang disajikan dalam gambar berikut:



Gambar 4. Kromatogram KG-SM hasil analisis asam lemak mikroalga *Chlorella Sp.*

Dari data kromatogram terdapat 13 puncak yang menunjukkan kandungan senyawa asam lemak pada mikroalga *Chlorella sp* (gambar 4).

Tabel 4. Senyawa dalam ekstrak minyak *Chlorella sp.* Hasil analisis KG-SM

Puncak	Nama Senyawa	% Area
1	1,2,3 Trimetilbenzen	10,12%
2	1,3-Dimetil-5-etilbenzen	3,55%
3	1-metil-4-isopropilbenzen	7,77%
4	1,3-dimetil-5-etilbenzen	8,77%
5 dan 6	1,2,3,4-tetrametilbenzen	14,90%
7	Furan Dicarboxylic Acid (FDCA)	5,39%
8	Stearol	4,45%
9	Neoptadin	4,75%
10	Eicosyne	5,17%
11	Metil Palmitat	13,34%
12	Metil Linoleat	5,39%
13	Metil Oleat	16,40%

Penentuan senyawa yang terdeteksi dari hasil kromatogram dilakukan dengan melihat derajat kemiripan (SI) dan pola fragmentasi. Hasil sampel tersebut dibandingkan dengan pustaka WILEY7. Hasil analisis memperlihatkan terdapat 13 puncak dengan 12 senyawa dan 3 diantaranya adalah senyawa asam lemak (tabel 4). Senyawa selain dari asam lemak diperkirakan pengotor dari pelarut pada saat proses ekstraksi yang kemudian ikut terbaca oleh KG-SM. Dari kromatogram jenis asam lemak yang teridentifikasi pada mikroalga *Chlorella Sp.* adalah asam palmitat, asam linoleat dan asam oleat. Pada puncak ke-11 diidentifikasi sebagai asam palmitat yang termasuk kedalam asam lemak jenuh dengan kadar 13,34%. Pada puncak ke-12 diidentifikasi sebagai asam linoleat yang termasuk kedalam asam lemak tak jenuh dengan kadar 5,39%. Sedangkan pada puncak ke-13 diidentifikasi sebagai asam oleat yang termasuk kedalam asam lemak tak jenuh dengan kadar 16,40%. Total asam lemak yang diperoleh adalah 35,13%. Berdasarkan pustaka dari semua asam lemak yang teridentifikasi merupakan asam lemak yang lazim ditemukan dalam mikroalga *Chlorella sp.*

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan medium dan waktu panen yang digunakan dalam penelitian ini adalah GM 10% selama 8 hari. Hasil analisis menggunakan KG-SM diperoleh 3 metil ester asam lemak yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella Sp.* yaitu metil palmitat (13,34%), metil linoleat (5,39%) dan metil oleat (16,40%). Total metil ester asam lemak yang diperoleh adalah 35,13%.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, R. (2005). *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press. United Kingdom.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Barsanti, L., dan Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor dan Francis Group Florida: USA
- Becker. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. London: Cambridge University Press.
- Brataningtyas, D.S. (2011). *Potensi Mikroalga Laut Tropis Untuk Bahan Baku Senyawa Karoten dan Klorofil*. Tesis. Program Studi Kimia: Institut Teknologi Bandung
- Kawaroe, M.P. Tri dan D. Ratih. (2009). Pengembangan Kultivasi Mikroalga Penghasil Biofuel di Fotobioreaktor Dengan Menggunakan Media Air Limbah dan Gas Buang CO₂. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2009*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Institut Pertanian Bogor
- Kawaroe, M., Prartono, T., Sunuddin, A., Sari, D.W., Agustine, D. (2010). *Mikroalga: Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press
- Kumalasari, D., Fasya, G.A., Adi, K.T., Maunatin, A. (2014). Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy*. 3, 163 – 172
- Kurnia, Dewi. (2013). *Ekspresi biopigmen mikroalga chlorella sp. dan aplikasinya sebagai pemeka cahaya sel surya*. Tesis, Program Studi Kimia: Institut Teknologi Bandung.

Rachmaniah, O.; Setyarini R. D.; Maulida, L. (2010). Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari *Chlorella sp.* dan Prediksinya sebagai Biodiesel. *Prosiding Seminar Teknik Kimia Soehadi Reksowardojo*.