

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK DAN ASAM LEMAK
MIKROALGA *Chlorella sp.* TERHADAP RADIKAL DPPH
(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)**

SKRIPSI

Oleh:

VERA SUSANTI

NIM. 10630072



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK DAN ASAM LEMAK
MIKROALGA *Chlorella sp.* TERHADAP RADIKAL DPPH
(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh:
VERA SUSANTI
NIM. 10630072**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vera Susanti

NIM : 10630072

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Dan Asam Lemak
Mikroalga *Chlorella Sp.* Terhadap Radikal DPPH
(*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*)

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 6 September 2014

Yang membuat Pernyataan,

Vera Susanti

NIM. 10630072

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK DAN ASAM LEMAK
MIKROALGA *Chlorella sp.* TERHADAP RADIKAL DPPH
(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)

SKRIPSI

Oleh:
VERA SUSANTI
NIM. 10630072

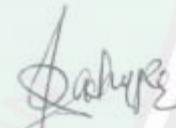
Telah disetujui oleh:

Dosen Pembimbing I



A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Dosen Pembimbing II



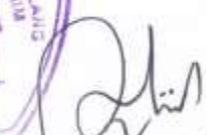
Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP. 19710311 200312 1 002

Malang, 6 September 2014

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang




Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19700620 200604 2 002

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK DAN ASAM LEMAK
MIKROALGA *Chlorella sp.* TERHADAP RADIKAL DPPH
(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)

SKRIPSI

Oleh:
Vera Susanti
NIM. 10630072

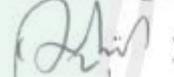
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Tugas Akhir dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si.)

Malang, 6 September 2014

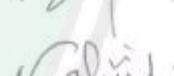
Susunan Dewan Penguji

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Penguji Utama | : Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002 |
| 2. Ketua Penguji | : Susi Nurul Khalifah, M.Si
NIPT. 20130902 2 317 |
| 3. Sekretaris Penguji | : A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002 |
| 4. Konsultan Penguji | : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIPT. 20140201 1 422 |
| 5. Anggota Penguji | : Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP. 19710311 200312 1 002 |

Tanda Tangan

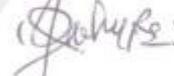
()

()

()

()

()

()

Mengetahui dan Mengesahkan
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang




Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

“ALHAMDULILLAH..”

Hanya itu yang bisa ku ucapkan saat ini. Akhirnya aku bisa mengucapkan terimakasih kepada beberapa pihak dan bahkan akan di abadikan oleh UNIVERSITAS terbaik di kota ini

(UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MALANG) :D

Sangat bersyukur dengan datangnya hari ini, hari dimana tangisan terasa membahagiakan :D

Terimakasih kepada orang tua yang tak pernah lelah memberikan nasehat dan dukungan (materiil dan moril). Maafkan aku, kalau sampai sebesar ini belum bisa memberikan kebanggaan kepada bapak dan ibu. Mungkin baru karya tulis ini yang bisa saya persembahkan untuk bapak dan ibu, Inshaallah air mata dan keringat bapak dan ibu segera tergantikan dengan rasa bangga dan bahagia. Tetaplah jadikan aku putri kecil kalian, yang mampu membuat kalian tertawa walau tak jelas apa yang ku lakukan.

Terimakasih juga kepada teman-teman yang telah membagi canda, tawa, dan air mata selama menempuh studi di Universitas ini. Ony yang rela baca materi kuliah keras-keras agar aku mampu menangkap materi (cara belajar cenderung audio), Diah dan Anik yang selalu menemaniku selama penelitian (memang sekelompok siih), mbk Desi yang bantuin edit naskah amburadul ini, afifah, ninis, oci terimakasih telah menjadi teman-teman terbaik selama kuliah; Ria, Mila, Mbk Yusti, dan mbk Dina terimakasih juga buat kalian yang selalu bersedia menampung candaan dan tangisanaku dengan ikhlas. Juga buat teman-teman Kimia 2010 yang banyak dan tak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih sudah bersedia menjadi teman dan partner dalam mengerjakan tugas selama perkuliahan. Tak lupa juga saya ucapkan banyak terimakasih untuk keluarga dan saudara yang senantiasa menyertai keberadaan ku di Malang dengan doa yang tulus.

Banyak terimakasih juga untuk Ega Yahya Fadillah yang mampu membuatku berfikir untuk menjadi manusia dan wanita lebih baik dan semoga mampu menjadi TERBAIK untukmu. Tak ingin terlupa, “matur nuwun sanget” buat kakak tingkat yang punya semboyan “**dilakoni wae**”, karena ternyata dari kata sederhana itulah yang mampu menguatkan ku hingga detik ini. :D

MOTTO



HIDUP ADALAH PERJALANAN

TAK BERARTI JALAN KITA LURUS DAN TAK BERBATU

HANYA BERJALANLAH KITA

SAMPAI TUHAN BERKATA "BERHENTILAH KAMU DAN KEMBALILAH PADAKU"

"DILAKONI WAE"

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.* TERHADAP RADIKAL DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)”**. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. yang telah memberi bimbingan ke jalan yang diridhoi oleh Allah SWT.

Seiring dengan terselesaikannya penyusunan skripsi ini, dengan penuh rasa hormat, kesungguhan, dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si., selaku pembimbing utama yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan demi terselesaikannya skripsi ini;
2. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc, selaku konsultan yang banyak memberikan masukan dalam menyelesaikan naskah skripsi ini;
3. Bapak Ahmad Abtokhi, M.Pd selaku Pembimbing Agama;
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Penguji Utama;
5. Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si, selaku Ketua Penguji.

Yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, motivasi, nasehat, doa, dukungan dan bantuan materi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, Penulis mengucapkan terimakasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Kedua orang tua dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa, semangat dan motivasi kepada saya untuk menuntut ilmu;
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang;
3. Ibu Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maliki Malang;

4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang;
5. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen wali yang telah banyak memberikan bantuan, motivasi dan dukungan dari awal saya masuk jurusan Kimia;
6. Seluruh Dosen pengajar di Jurusan Kimia yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis selama kuliah di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang;
7. Seluruh staf Laboratorium (Mas Abi, Mas Taufik, Mbak Rika, Mbak Susi, dan Mbak Mei) dan staf administrasi (Mbak Ana dan Mbak Is) Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, terimakasih atas bantuannya;
8. Teman-teman kimia angkatan 2010 khususnya Kimia B, terimakasih atas dukungan, motivasi, kebersamaan, kekompakannya dan canda tawa selama kuliah;
9. Semua pihak yang tidak tertulis, terimakasih atas bantuan dan dukungannya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu saya mengharapkan saran dan kritik demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 6 September 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
HALAMAN MOTTO	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mikroalga	9
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	12
2.3 Manfaat <i>Chlorella sp.</i>	15
2.4 Kultur Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	18
2.5 Ekstraksi Minyak Metode <i>Soxhletasi</i>	23
2.6 Asam Lemak	26
2.7 Isolasi Asam Lemak	27
2.8 Antioksidan	28
2.8.1 Antioksidan Alami	31
2.8.2 Antioksidan Sintetik	33
2.9 Radikal Bebas	34
2.10 Mekanisme Antioksidatif	35
2.11 Uji Aktivitas Antioksidan	37
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	41
3.2 Alat dan Bahan	41
3.2.1 Alat.....	41
3.2.2 Bahan	42

3.3 Rancangan Penelitian	42
3.4 Tahapan Penelitian	43
3.5 Pelaksanaan Penelitian	44
3.5.1 Sterilisasi Alat	44
3.5.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge	44
3.5.3 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	44
3.5.4 Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	45
3.5.5 Preparasi Sampel	45
3.5.6 Analisis Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	45
3.5.7 Ekstraksi Minyak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	46
3.5.8 Hidrolisis Minyak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	47
3.5.9 Uji Aktifitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH ..	47
3.5.11.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	47
3.5.11.2 Penentuan Waktu Kestabilan Antioksidan	47
3.5.11.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel	47
3.6 Analisis Data	49
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1 Sterilisasi Alat	50
4.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge	50
4.3 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	52
4.4 Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	54
4.5 Preparasi Sampel	56
4.6 Analisis Kadar Air	57
4.7 Ekstraksi Minyak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	58
4.8 Hidrolisis Minyak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	60
4.9 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH	64
4.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	64
4.9.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan	65
4.9.3 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel	68
4.10 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Sebagai Antioksidan dalam Perspektif Islam	73
BAB V PENUTUP	78
5.1 Kesimpulan	78
5.2 Saran	78
DAFTAR PUSTAKA	79

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi kimia <i>Chlorella sp.</i>	15
Tabel 2.2 Komposisi lemak <i>Chlorella sp.</i>	15
Tabel 2.3 Perbandingan komposisi dan nilai gizi antara biji kacang hijau dan setelah dikecambahkan dalam 100 gr.....	21
Tabel 2.4 Persen aktivitas antioksidan ekstrak <i>Chlorella sp.</i> dan pembanding...	30
Tabel 2.5 Nilai EC ₅₀ pada ekstrak <i>Chlorella sp.</i> dan pembanding asam askorbat dan BHT	30
Tabel 2.6 Nilai EC ₅₀ hasil uji aktivitas antioksidan	30
Tabel 2.7 Sumber-sumber radikal bebas	35
Tabel 2.8 Ketentuan kekuatan antioksidan	39
Tabel 4.1 Waktu kestabilan masing-masing ekstrak	66
Tabel 4.2 Nilai EC ₅₀ masing-masing ekstrak	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Kurva pertumbuhan mikroalga	11
Gambar 2.2	<i>Chlorella sp.</i>	13
Gambar 2.3	Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	14
Gambar 2.4	Rerata kerapatan sel mikroalga <i>Chlorella sp.</i> pada saat <i>peak</i> pada Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan nilai pH awal berbeda	20
Gambar 2.5	Grafik logaritma rerata kerapatan sel mikroalga <i>Chlorella</i> dalam Medium Ekstrak Tauge dengan variasi pH	23
Gambar 2.6	Proses pembentukan trigliserida	24
Gambar 2.7	Struktur Umum Asam Lemak	26
Gambar 2.8	Reaksi Hidrolisis Minyak	28
Gambar 2.9	Struktur kimia asam askorbat	32
Gambar 2.10	Struktur BHT (<i>Butylated hydroxytoluene</i>)	33
Gambar 2.11	Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida	36
Gambar 2.12	Reaksi penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan	36
Gambar 2.13	Resonansi DPPH (<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>)	37
Gambar 2.14	Reaksi DPPH dengan antioksidan	37
Gambar 4.1	MET sebelum dan sesudah diencerkan	51
Gambar 4.2	Warna kultur <i>Chlorella sp.</i> pada hari berbeda	53
Gambar 4.3	Proses pemisahan biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	54
Gambar 4.4	Kurva pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	55
Gambar 4.5	Proses preparasi biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	56
Gambar 4.6	Minyak mikrolaga <i>Chlorella sp.</i> hasil ekstraksi <i>Soxhlet</i>	59
Gambar 4.7	Reaksi hidrolisis trigliseril palmitin	62
Gambar 4.8	Pembentukan sabun pada proses saponifikasi	62
Gambar 4.9	Reaksi pembentukan asam lemak	64
Gambar 4.10	Grafik panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM	65
Gambar 4.11	Waktu kestabilan minyak (inkubasi 37 °C)	66
Gambar 4.12	Waktu kestabilan asam lemak (inkubasi 37 °C)	67
Gambar 4.13	Waktu kestabilan BHT (inkubasi 37 °C)	67
Gambar 4.14	Waktu kestabilan asam askorbat (inkubasi 37 °C)	67
Gambar 4.15	Persen (%) aktivitas antioksidan ekstrak mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	69
Gambar 4.16	Reaksi DPPH dengan asam palmitat	73
Gambar 4.17	Reaksi asam askorbat dengan DPPH	74
Gambar 4.18	Reaksi BHT dengan DPPH	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 <i>Tahapan penelitian</i>	86
Lampiran 2 Skema kerja	87
Lampiran 3 Perhitungan kadar air	93
Lampiran 4 Perhitungan rendemen ekstrak	94
Lampiran 5 Perhitungan dan pembuatan larutan	95
Lampiran 6 Data uji aktivitas antioksidan	99
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian	111



ABSTRAK

Susanti, Vera. 2014. Uji **Aktivitas Antioksidan Minyak Dan Asam Lemak Mikroalga *Chlorella sp.* Terhadap Radikal DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)**
Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd;
Konsultan: A. Hanapi, M.Sc.

Kata kunci: Aktivitas antioksidan, Minyak, Asam lemak, *Chlorella sp.*, DPPH

Chlorella sp. termasuk dalam spesies mikroalga dari kelompok *Chlorophyta* yang mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Selain metabolit sekunder, *Chlorella sp.* juga menghasilkan metabolit primer, salah satunya adalah minyak dan asam lemak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*

Penelitian diawali dengan mengkultivasi mikroalga dalam medium ekstrak tauge dengan kondisi rak kultur pada suhu 25-27 °C dan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux. Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dipanen pada hari ke-8 kultivasi. Ekstraksi minyak dilakukan dengan metode *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana. Minyak hasil *Soxhletasi* dihidrolisis dengan menggunakan basa KOH 12 % untuk mendapatkan asam-asam lemaknya. Minyak dan asam lemak selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan metode radikal DPPH.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen dari ekstraksi minyak adalah sebesar 8,39 (b/b). Sedangkan rendemen yang dihasilkan pada proses hidrolisis minyak menjadi asam lemak adalah sebesar 47,30 (b/b). Uji antioksidan minyak dan asam lemak memberikan aktivitas antioksidan yang tergolong sedang dengan nilai EC_{50} yang tidak jauh berbeda, secara berturut-turut nilai EC_{50} yang diperoleh adalah sebesar 123,8 dan 122,4 ppm.

ABSTRACT

Susanti, Vera. 2014. **The Antioxidant Activity Test Oil And Fatty Acids Microalgae *Chlorella sp.* Against Radical DPPH (1,1-Diphenyl Picrylhydrazyl -2)**

Advisor I: A. ghanaim Fasya, M.Si; Advisor II: Abtokhi Ahmad, M. Pd; Consultant: A. Hanapi, M.Sc.

Keywords: Antioxidant activity, oil, fatty acids, *Chlorella sp.*, DPPH

Chlorella sp. is one group of *Chlorophyta* species of microalgae-containing compounds that have potential as antioxidants. Beside secondary metabolites, *Chlorella sp.* also produce primary metabolites, one of which is oil and fatty acids. This study aims to determine the antioxidant activity of the oils and fatty acids of microalgae *Chlorella sp.*

Microalgae was cultivated in medium extracts of bean sprouts with rack culture conditions at a temperature of 25-27 °C and light intensity of 1000-4000 lux. Biomass of microalgae *Chlorella sp.* harvested on the 8th day cultivation. Oil extraction is done by using Soxhlet method (solvent n-hexane). Oil was hydrolyzed using 12 % KOH to obtain fatty acids. Oil and fatty acids were further tested antioxidant activity using DPPH radical method.

The results showed that the yield of extraction of oil is equal to 8.39 b/b. While the yield produced on hydrolysis process oils into fatty acids amounted to 47.30 b/b. Antioxidants test of oil and fatty acids provide antioxidant activity were moderate with EC₅₀ values were not much different, respectively EC₅₀ values obtained amounted to 123.8 and 122.4 ppm.

الملخص

سوسانتي، فيرا . ٢٠١٤ . اختبارالنشاط مضادات الأكسدة و النفط والأحماض الدهنية الطحالب طحلب. ضد DPPH الراديكالي (١,١-ثنائي الفينيل-٢-فيجريلي درازيل) .
المشرف الأول: أحمد غنائم فاشا الماجستير، المشرف الثاني: أحمد أبطحي الماجستير، المشرف مستشار: أحمد حنفي الماجستير

كلمات الرئيسية : النشاط المضاد للأكسدة، والنفط، والأحماض الدهنية، طحلب، DPPH

طحلب. تضمينها في مجموعة من الأنواع كلوروفيتا من المركبات التي تحتوي على الطحالب التي لديها إمكانات ومضاد للأكسدة. بالإضافة إلى المركبات الثانوية، طحلب. أيضا إنتاج نواتج الأيض الأولية، واحدة منها هي الأحماض الدهنية النفط. وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد نشاط مضادات الأكسدة من الزيوت والأحماض الدهنية من الطحالب طحلب.

الطريقة البحث يبدأ مع زراعة الطحالب الدقيقة في مقتطفات المتوسطة من براعم الفاصوليا مع شروط الثقافة رف في درجة حرارة ٢٥-٢٧ درجة مئوية، وشدة الضوء من ١٠٠٠-٤٠٠٠ لوكس. الكتلة الحيوية ميكروالغاطحلب. تحصد على زراعة حاسي ٨. استخراج النفط باستخدام بسوكليت مذيب ن-الهكسان. وتحلل النفط سوكلت استخدام ١٢٪ KOH قلوية محفز للحصول على الأحماض الدهنية. تم اختبار مزيد من الأحماض الدهنية النفط والنشاط المضادة للأكسدة باستخدام طريقة DPPH جذري .

النتائج أظهرت أن العائد من استخراج النفط، b/b ٨,٣٩. في حين أن العائد على إنتاج الزيوت عملية التحلل إلى أحماض دهنية بلغت ٤٧,٣٠ b/b. وتوفر مضادات الأكسدة النفط اختبار والأحماض الدهنية وكان النشاط المضادة للأكسدة معتدلة مع القيم ٥٠ EC لم تختلف كثيرا، على التوالي بلغت القيم ٥٠ EC حصلت على ١٢٣,٨ و ١٢٢,٤ ppm

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Zaman semakin berkembang dari waktu ke waktu, sehingga banyak hal positif yang dapat dinikmati oleh manusia, seperti halnya dengan semakin pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi guna memudahkan manusia dalam melakukan aktifitas sehari-hari. Namun, tidak hanya efek positif yang dapat dinikmati, melainkan juga efek negatif seperti meningkatnya berbagai macam penyakit kronis seperti jantung, kanker, dan penurunan fungsi ginjal. Berbagai penyakit degeneratif tersebut muncul karena adanya sel-sel mutan yang ada di dalam tubuh. Sel mutan tersebut terbentuk dikarenakan oleh adanya radikal bebas dalam tubuh yang akan mengambil elektron atom lain dari susunan DNA dan sel, sehingga akan menghasilkan reaksi yang berlangsung secara terus-menerus (berantai) yang mengakibatkan terjadinya perubahan struktur pada sel dan DNA. Ketika struktur DNA dan sel pada tubuh mengalami perubahan secara terus-menerus, maka fungsi dari sel juga akan mengalami perubahan secara signifikan yang berakibat pada terganggunya proses metabolisme dalam tubuh.

Penyakit degeneratif seperti kanker mengalami peningkatan secara terus-menerus. Kepala Departemen Radioterapi Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo, Profesor Soehartati Gondhowiardjo menyatakan bahwa jumlah penderita kanker di Indonesia meningkat berdasarkan data dari Kementerian Kesehatan (Kemenkes) tahun 2012 yaitu prevalensi kanker mencapai perbandingan 4,3 banding 1000

orang, padahal sebelumnya disebutkan bahwa prevalensinya adalah 1 banding 1000 orang (Kartika, 2013). Badan Kesehatan Dunia (WHO) dan Serikat Pengendalian Kanker Internasional (UICC) memprediksi, akan terjadi peningkatan penderita kanker sebesar 300 persen di seluruh dunia pada tahun 2030. Dinyatakan pula bahwa 70 persen dari jumlah tersebut akan dialami oleh negara berkembang seperti Indonesia (Kartika, 2013).

Tubuh manusia sebenarnya mampu menetralsisir radikal bebas karena adanya antioksidan yang mampu diproduksi oleh tubuh secara alami. Namun produksi antioksidan dalam tubuh seringkali tidak mencukupi untuk menetralsisir radikal bebas, karena radikal bebas yang ada di lingkungan terus mengalami peningkatan dari waktu ke waktu, seperti halnya radikal bebas yang disebabkan oleh adanya asap rokok, asap kendaraan bermotor, asap buangan pabrik, radiasi sinar ultraviolet, radiasi dan cemaran bahan-bahan kimia berbahaya serta pencemaran lingkungan lainnya. Sehingga tubuh membutuhkan asupan antioksidan untuk meminimalisir efek yang dapat ditimbulkan oleh radikal bebas. Cara yang dapat ditempuh selain melakukan olah raga adalah dengan mengkonsumsi suplemen yang memiliki fungsi sebagai antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya atau disebut dengan reduktan. Senyawa ini mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara membentuk radikal yang tidak lebih reaktif daripada radikal bebas. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat

radikal bebas dan molekul reaktif, sehingga mampu menghambat kerusakan sel (Winarsih, 2007).

Firman Allah Swt. dalam surat asy Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

“dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”. (Qs. asy Syu'ara (26): 7).

Pada ayat tersebut dapat diketahui bahwa Allah telah menciptakan beraneka macam tumbuhan yang baik (memiliki manfaat) di muka bumi ini. Baik berupa tumbuhan yang berukuran mikro maupun makro. Tumbuhan banyak dimanfaatkan oleh manusia sebagai bahan untuk mencukupi kebutuhan nutrisi tubuh, selain itu banyak tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan alami. Salah satu contohnya adalah adanya aktivitas antioksidan dalam ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*, semakin tinggi konsentrasi sampel uji maka % aktivitas antioksidan meningkat. Penelitian tersebut menyatakan bahwa nilai EC₅₀ ekstrak metanol sebesar 18,610 ppm dan ekstrak etil asetat sebesar 27,320 ppm (Bariyyah, 2013).

Sumber antioksidan dapat berasal dari tanaman, bakteri dan mikroalga. Salah satu spesies mikroalga yang memiliki aktivitas antioksidan adalah dari golongan Chlorophyta, yaitu *Chlorella sp.* Menurut Sidabutar (1999), *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau berkelompok, tidak mempunyai batang, akar, dan daun. *Chlorella sp.* dapat

berkembang dengan baik dengan memperhatikan faktor air, sinar matahari, dan udara.

Proses penumbuhan *Chlorella sp.* dalam suatu medium disebut dengan kultivasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultivasi *Chlorella sp.* adalah kualitas air yang meliputi suhu dan kekuatan cahaya (Rostini, 2007). Selain itu, komposisi nutrisi yang lengkap dan konsentrasi nutrisi yang tepat dalam media kultivasi menentukan produksi biomassa serta kandungan gizi mikroalga (Prihantini, dkk., 2007).

Medium Ekstrak Tauge (MET) merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga. Richmond (1986) dalam Prihantini, dkk. (2007), menyatakan bahwa tauge kacang hijau merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang bersifat toksik bagi tubuh. Media perlakuan MET mengandung nutrisi organik seperti karbohidrat, protein, vitamin dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga. Selain itu, media MET juga mengandung makronutrien anorganik seperti K, P, Ca, Mg, dan Na yang dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel, sedangkan mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel sebagai kofaktor enzim dan sebagai komponen pembentuk klorofil. Dikatakan bahwa senyawa-senyawa tersebut dalam media kultur juga akan mengaktifkan fotosintesis pada mikroalga. Diimbuhkan oleh Wulandari, dkk. (2010) bahwa, fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan.

Chlorella sp. memiliki kandungan gizi yang sangat baik. Dinyatakan oleh Rachmaniah (2010), bahwa mikroalga *Chlorella sp.* memiliki kandungan lemak perhari sebesar 42,1 mg/L serta kandungan asam lemak terbesar adalah asam palmitat, yaitu sebesar 76,83 % (metode *osmotic shock*) dan asam miristat sebesar 29,06 (metode *soxhletasi*). Sedangkan menurut Kawaroe (2010), kandungan asam lemak terbesar dalam mikroalga *Chlorella sp.* adalah asam stearat yaitu sebesar 29,50 %, Diimbuhkan oleh Rachmaniah (2010), bahwa hasil terbaik untuk mengekstrak minyak dari sampel kering mikroalga *Chlorella sp.* adalah dengan metode *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana yaitu dengan hasil rendemen sebesar 16,57 %.

Kawaroe (2012) melakukan ekstraksi asam lemak dari mikroalga *Spirulina platensis*, *Isochrysis sp.* dan *Porphyridium cruentum* pada hari ke-8 (fase awal stasioner) sehingga metabolit yang dihasilkan mikroalga berupa metabolit primer. Pada penelitian tersebut digunakan metode *Soxhletasi* dengan menggunakan 2 pelarut berbeda, yaitu kloroform dan n-heksana. Rendemen yang dihasilkan pada ekstrak kloroform sebesar 12,36 % sedangkan ekstrak n-heksana sebesar 10,17 %. Katili (2012) mengekstrak minyak dari mikroalga jenis *Skeletonema costatum*, *Thalassio sira sp.*, dan *Chaetoceros gracilis*. dengan menggunakan 2 pelarut, yaitu kloroform dan n-heksana. Rendemen ekstrak minyak lebih besar ketika menggunakan pelarut kloroform. Namun peneliti menyarankan agar penelitian selanjutnya dilakukan dengan menggunakan pelarut non-polar agar lipid netral dapat terekstrak dengan baik.

Lemak dapat diubah menjadi asam lemak melalui proses hidrolisis, Fasya (2011) melakukan hidrolisis terhadap minyak biji selasih dengan menggunakan katalis basa KOH 12 % dalam metanol. Rendemen asam lemak yang diperoleh sebesar 75,01 %. Dinyatakan pula bahwa asam lemak mampu berperan sebagai antioksidan, aktivitas antioksidan asam lemak biji selasih memiliki nilai EC_{50} sebesar 595,93 ppm untuk asam 9,12,15-oktadekatrienoat hasil inklusi, Metil 9,12,15-oktadekatrienoat hasil inklusi sebesar 770,34 ppm, Metil 9,12,15-oktadekatrienoat hasil kolom sebesar 667,29 ppm, Metil 10,12,14-oktadekatrienoat hasil isomerisasi sebesar 510,23 ppm. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Orhan (2009) menyatakan nilai % penghambatan radikal DPPH pada minyak *Coryllus avellana*, *Juglans regia*, *Arachis hypogea*, dan *Pinus pinea* berturut-turut adalah sebesar 73,58 %, 65,10 %, 39,55 % dan 39,55 % ketika konsentrasi sampel sebesar 100 mg mL⁻¹.

DPPH merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan. Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Dehpour dkk., 2009). Menurut Aji (2009), metode DPPH dipilih karena memiliki beberapa keunggulan, yaitu sederhana, cepat, sensitifitas tinggi dan hanya membutuhkan sedikit sampel.

Berdasarkan alasan-alasan tersebut maka dilakukan ekstraksi asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* dan dilakukan pengujian aktivitas antioksidannya. Metode yang digunakan adalah *Soxhletasi* dengan menggunakan pelarut n-heksana untuk mengekstrak minyak mikroalga *Chlorella sp.* Selanjutnya

dilakukan hidrolisis dengan katalis basa (KOH 12%) dan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode radikal DPPH.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah aktivitas antioksidan minyak hasil ekstraksi *Soxhlet* menggunakan pelarut n-heksana ?
2. Bagaimanakah aktivitas antioksidan asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan minyak mikroalga *Chlorella sp.* hasil ekstraksi *Soxhlet* menggunakan pelarut n-heksana.
3. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.*

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang dikultivasi di laboratorium jurusan Biologi fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Kultur yang digunakan pada kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) pada suhu 25 – 27 °C, dan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux.
3. Metode ekstraksi adalah *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana.

4. Senyawa aktif yang diuji adalah minyak dan asam lemak mikroalga *Chorella sp.*
5. Metode pengujian aktivitas antioksidan yaitu metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

1.5 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan informasi kepada lembaga akademis tentang aktivitas minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* sebagai antioksidan
2. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang manfaat mikroalga *Chlorella sp.* bagi kesehatan yaitu sebagai antioksidan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Allah menjelaskan dalam surat Ali ‘Imran ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (Qs. Ali ‘Imran: 191).

Surat ali ‘Imran ayat 191 menjelaskan bahwa apapun yang tercipta di muka bumi tidaklah pernah memiliki suatu kesia-siaan. Segala sesuatu memiliki manfaat baik manfaat yang kecil maupun manfaat yang begitu besar. Hal tersebut tentunya juga berlaku untuk tumbuhan yang berukuran mikro sekalipun, seperti misalnya mikroalga.

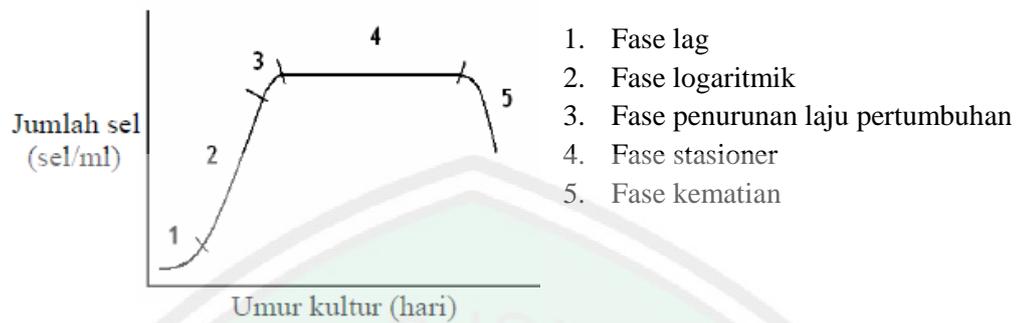
Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, diameternya antara 3 – 30 μm , baik sel tunggal maupun koloni yang hidup di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut fitoplankton (Romimohtarto, 2004). Mikroalga ini dapat melakukan fotosintesis dan hidup dari nutrien anorganik serta menghasilkan zat-zat organik dari CO_2 oleh fotosintesis. Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen) klorofil yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H_2O , CO_2 dan sinar matahari

untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan penambahan sel, bergerak atau berpindah dan reproduksi (Pranayogi, 2003).

Mikroalga merupakan salah satu golongan jasad renik yang dinilai cukup potensial karena dapat dimanfaatkan sebagai pakan maupun pangan. Lebih dari 32 jenis mikroalga telah diketahui dan diteliti oleh para algalog yang diketahui mempunyai nilai ekonomis dalam bidang farmasi, kesehatan maupun sebagai suplementasi pangan, dan sebagainya (Agustini, dkk., 2008).

Kultur mikroalga dalam skala laboratorium biasanya memerlukan kondisi lingkungan yang terkendali. Pertumbuhan mikroalga sangat erat kaitannya dengan ketersediaan unsur hara makro dan mikro serta dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga, antara lain cahaya, suhu, pH, air, dan salinitas (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Sampai saat ini kepadatan sel digunakan secara luas untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga (Isnansetyo dan Kurniastuty 1995). Pertumbuhan mikroalga dalam kultur sangat dipengaruhi oleh kondisi cahaya, suhu, aerasi dan nutrisi (Yudha, 2008). Pertumbuhan mikroalga dibagi dalam lima fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian (Fogg, 1975 dalam Yudha, 2008).



Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroalga

1. Fase lag

Fase ini ditandai dengan peningkatan populasi yang tidak nyata. Fase ini disebut juga sebagai fase adaptasi karena sel mikroalga sedang beradaptasi terhadap media tumbuhnya. Lamanya fase lag tergantung pada umur inokulum yang dimasukkan. Sel-sel yang diinokulasikan pada awal fase log akan mengalami fase lag yang singkat. Inokulum yang berasal dari kultur yang sudah tua akan mengalami fase lag yang lama, karena membutuhkan waktu untuk menyusun enzim-enzim yang tidak aktif. Ukuran sel pada fase lag ini pada umumnya meningkat. Organisme mengalami metabolisme, tetapi belum terjadi pembelahan sel sehingga kepadatan sel belum meningkat.

2. Fase logaritmik atau eksponensial

Fase ini diawali oleh pembelahan sel dan ditandai dengan naiknya laju pertumbuhan hingga kepadatan populasi meningkat. Laju pertumbuhannya meningkat dengan pesat dan selnya aktif berkembang biak. Ciri metabolisme pada fase ini adalah tingginya aktivitas fotosintesis yang berguna untuk pembentukan protein dan komponen-komponen penyusun plasma sel yang dibutuhkan dalam pertumbuhan.

3. Fase penurunan laju pertumbuhan

Fase ini ditandai dengan penurunan laju pertumbuhan. Selain itu terjadi penurunan pertumbuhan populasi per satuan waktu bila dibandingkan dengan fase eksponensial sehingga fase ini disebut juga fase *decline*.

4. Fase stasioner

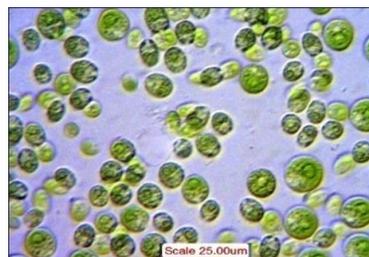
Pada fase ini, pertumbuhan mengalami penurunan dibandingkan fase logaritmik. Laju reproduksi sama dengan laju kematian. Dengan demikian penambahan dan pengurangan jumlah mikroalga relatif sama atau seimbang sehingga kepadatannya tetap. Jumlah sel cenderung tetap diakibatkan sel telah mencapai titik jenuh.

5. Fase kematian

Fase ini ditandai dengan kepadatan populasi selnya yang terus berkurang.

2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

Penamaan *Chlorella sp.* diberikan karena tumbuhan ganggang ini mengandung klorofil yang tertinggi dari tumbuh-tumbuhan yang ada di dunia ini, yang merupakan dasar permulaan kebanyakan rantai makanan akuatik karena kegiatan fotosintetiknya, oleh sebab itu dinamakan produsen primer bahan organik (Chalid, dkk., 2012).



Gambar 2.2 *Chlorella sp.*

Klasifikasi *Chlorella sp.* menurut Vashista (1979) dalam Rostini (2007)

yaitu :

Filum : Chlorophyta

Kelas : Chlorophyceae

Ordo : Chlorococcales

Famili : Chlorellaceae

Genus : Chlorella

Spesies : *Chlorella sp.*

Chlorella sp. merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau berkelompok, tidak mempunyai batang, akar, dan daun. *Chlorella* tumbuh pada air tawar, air payau dan air asin, tetapi sebagian besar hidup di air tawar. *Chlorella sp.* juga dapat tumbuh pada tanah yang basah, batuan yang basah, dan pada dahan-dahan tumbuhan dan beberapa spesies hidup bersimbiosis dengan protozoa, hydra, sponge, atau mikroorganisme lainnya. Untuk tumbuh kembangnya yang baik, *Chlorella* memerlukan air yang jernih, sinar matahari, dan udara yang bersih (Sidabutar, 1999).

Sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat, hidup soliter, berukuran 2-8 μm . Sel *Chlorella sp.* di dalamnya mengandung protein, lemak serta vitamin A, B, D, E dan K, di samping banyak terdapat pigmen hijau (klorofil) yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis (Sachlan, 1982).

Reproduksi *Chlorella* adalah aseksual dengan pembentukan autospora yang merupakan bentuk miniatur sel induk. Tiap satu sel induk (*parent cell*) akan membelah menjadi 4, 8, atau 16 spora yang kelak akan menjadi sel-sel anak

(*daughter cell*) dan melepaskan diri dari induknya (Bold dan Wynne, 1985 dalam Prabowo, 2009). Pemanfaatan *Chlorella sp.* dilakukan menggunakan teknik kultur. Keberhasilan teknik kultur bergantung pada kesesuaian antara jenis mikroalga yang dibudidayakan dan beberapa faktor lingkungan (Fachrullah, 2011).

Menurut penelitian (Bariyyah, 2013), penentuan hari panen didasarkan pada kurva pertumbuhan yang diperoleh pada saat kultivasi. Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki kurva pertumbuhan seperti yang nampak pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp.*

Kandungan *Chlorella sp.* terdiri dari protein, karbohidrat, lipid, dan senyawa-senyawa lain yang belum diketahui (Ben-Amotz, dkk., 1987). (Renaud, dkk., 1994) mengatakan bahwa *Chlorella sp.* mengandung klorofil *a* sebesar 1,30 % dari berat kering. Komposisi kimia *Chlorella sp.* ditunjukkan dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia *Chlorella sp.*

Komposisi Kimia <i>Chlorella sp.</i>	(%)
Protein	30,9
Karbohidrat	20,6
Lipid	20,1
Lain-lain	28,4

Sumber : Ben-Amotz, *et al.* (1987)

Tabel 2.2 Komposisi Asam lemak *Chlorella sp.*

Asam Lemak	Komposisi (%) dari Total Asam Lemak
Jenuh	48,9
Tak Jenuh (<i>Monounsaturated</i>)	20,9
Tak Jenuh (<i>Polyunsaturated</i>)	23,7
<i>Trans</i>	4,9
Omega-3	5,0
Omega-6	12,5
Linoleat	2,3

Sumber : Makareviciene, *et al.* (2011).

Saadudin, dkk. (2011) menyatakan bahwa produktivitas minyak mikroalga jauh lebih besar dibandingkan dengan minyak yang berasal dari tumbuhan tinggi, minyak nabati yang dihasilkan mikroalga per hektar lahan dapat mencapai sedikitnya 10 kali minyak kelapa sawit (CPO) atau sekitar 30 kali minyak jarak (Saadudin, dkk., 2011). *Chlorella sp.* mempunyai kandungan lipid yang tertinggi dibanding spesies lainnya, seperti *Nannochloropsis*, *Spirulina sp.*, *Tertraselmis sp.*, dan *Dunaliella sp.* Diimbuhkan oleh (Othmer, 1971 dalam Wati, Tanpa tahun) bahwa, *Chlorella sp.* memiliki kandungan minyak sebesar 28 – 32 %.

2.3 Manfaat *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran.

Hal tersebut disebabkan *Chlorella sp.* mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi (Kawaroe, 2010 dalam Fachrullah, 2011). *Chlorella sp.* juga menghasilkan suatu antibiotik yang disebut Chlorellin, yaitu suatu zat yang dapat melawan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007).

Chlorella sp. mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut *Phycocyanin* merupakan protein kompleks. *Phycocyanin* merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kimia dan radiasi. Warna hijau dari klorofil pada *Chlorella sp.* disebut darah hijau (*green blood*) mempunyai kandungan zat besi pembentuk hemoglobin yang berfungsi sebagai penambah makanan bagi penyandang anemia. Pada *Chlorella sp.* terdapat warna kuning oranye merupakan kandungan karoten terdiri dari *xanthophyll*, *myxoxanthophyll*, *zeaxanthin*, *cryptoxanthin*, *echinenone*, *fucoxanthin*, *violaxanthin* dan *astaxanthin*. Total karoten yang terdapat pada *Chlorella sp.* per 10 gr yaitu 0,37 % (Pranayogi, 2003). Karoten mempunyai khasiat pada manusia sebagai antioksidan.

Kusmiati (2010) melakukan ekstraksi dan purifikasi senyawa lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink dimana lutein ini merupakan karotenoid alami yang berfungsi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dari mikroalga lain diantaranya, Miranda, dkk. (1998) melakukan penelitian pada *Spirulina maxima* yang memiliki kandungan senyawa fenolik, β -karoten dan α -tokoferol dalam *Spirulina maxima* yang memberikan perlindungan antioksidan

dalam sistem *in vivo* maupun *in vitro*. Benedetti, *dkk.*, (2004) meneliti sifat antioksidan phycocyanin dari *Aphanizomenon flos-aquae* salah satu spesies alga uniseluler dari alga hijau-biru yang hidup di air tawar. Menurut Arlyza (2005), phycocyanin memberikan pigmen berwarna biru dengan struktur mirip α -karoten dan diketahui mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, sebagai penanda fluorescent dalam tes medis dan sebagai antioksidan, *anti-inflammatory* dan *neuroprotective*. Arlyza (2005) dan Mohammad (2007), melaporkan keberhasilannya dalam ekstraksi pigmen *Phycocyanin*, salah satu pigmen dari *Spirulina platensis* yang merupakan pewarna alami dan mempunyai aktivitas antioksidan tinggi.

Alga hijau uniseluler, *Haematococcus pluvialis* dalam keadaan stres akan berada dalam fase sporulasi mampu mengakumulasi pigmen astaxanthin dari alam dalam level yang tinggi. Astaxanthin ini berguna bagi alga untuk melindungi dirinya dari perubahan lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti intensitas UV yang berlebihan, evaporasi yang berlebihan, dan lain-lain. Astaxanthin masuk dalam golongan β -karoten akan tetapi memiliki aktifitas antioksidan lebih kuat daripada β -karoten, mampu mencegah oksidasi lemak tak jenuh, melindungi efek sinar matahari yang berlebihan, dan sebagai pro-vitamin A (Suseela dan Toppo, 2006). Yudiati, *dkk.* (2011) melakukan penelitian aktivitas antioksidan terhadap mikroalga *Spirulina sp.* dimana mikroalga ini mengandung senyawa aktif yang dapat bertindak sebagai antioksidan, diantaranya β -karoten, klorofil α , flavonoid, dan sterol.

2.4 Kultur Mikroalga *Chlorella sp.*

Menurut Bold dan Wynne (1985) dalam Prabowo (2009), pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: medium, nutrisi atau unsur hara, cahaya, temperatur serta salinitas. Medium merupakan tempat hidup bagi kultur *Chlorella* yang pemilihannya ditentukan pada jenis *Chlorella* yang akan dibudidayakan.

Nutrien terdiri atas unsur-unsur hara makro (*macronutrients*) dan unsur hara mikro (*micronutrients*). Contoh unsur hara makro untuk pertumbuhan *Chlorella* adalah senyawa organik seperti N, K, Mg, S, P, dan Cl. Unsur hara mikro adalah Fe, Cu, Zn, Mn, B, dan Mo (Prabowo, 2009). Unsur hara tersebut diperoleh dalam bentuk persenyawaan dengan unsur lain (Bold, 1980 dalam Prabowo, 2009). Tiap unsur hara memiliki fungsi-fungsi khusus yang tercermin pada pertumbuhan dan kepadatan yang dicapai oleh organisme yang dikultur tanpa mengesampingkan pengaruh dari lingkungan (Prabowo, 2009).

Kebutuhan nutrisi untuk tujuan kultur mikroalga harus tetap terpenuhi melalui penambahan media pemupukan guna menunjang pertumbuhan mikroalga. Unsur N, P, dan S sangat penting untuk sintesa protein. Unsur K berfungsi dalam metabolisme karbohidrat. Unsur Cl dimanfaatkan untuk aktivitas kloroplas, unsur Fe dan Na berperan dalam pembentukan klorofil, sementara Si dan Ca diperlukan dalam jumlah banyak untuk pembentukan cangkang beberapa jenis fitoplankton (Isnanty dan Kurniastuty, 1995).

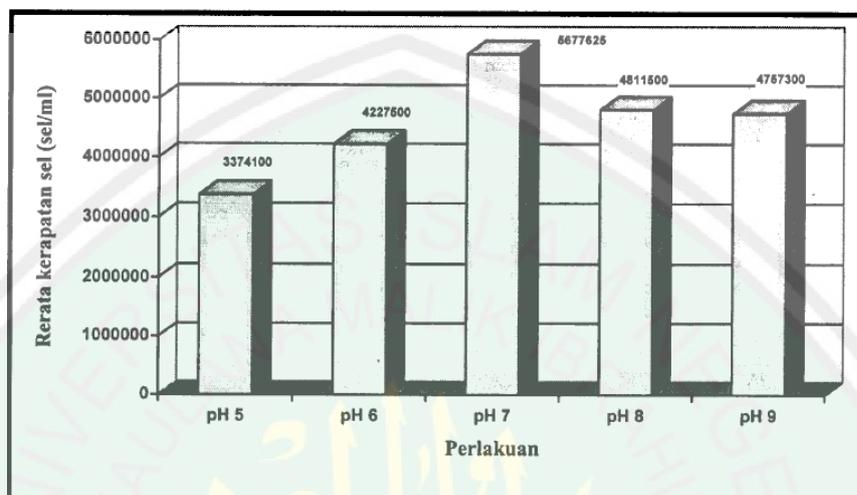
Beberapa faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga di kultur terbuka antara lain: cahaya, temperatur, tekanan osmosis, pH,

air, salinitas, kandungan O₂, dan aerasi (Isnantyo dan Kurniastuty, 1995). Cahaya merupakan sumber energi untuk melakukan fotosintesis. Cahaya matahari yang diperlukan oleh mikroalga dapat digantikan dengan lampu TL atau tungsten. Oh-hama dan Miyachi (1988) menyatakan bahwa intensitas cahaya saturasi untuk *Chlorella* berada pada intensitas 4000 lux. Hal ini menunjukkan bahwa setelah titik intensitas tersebut dicapai, maka fotosintesis tidak lagi meningkat sehubungan dengan peningkatan porsi intensitas cahaya (Prabowo, 2009).

Kisaran temperatur optimal bagi pertumbuhan *Chlorella* adalah antara 25 – 30 °C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Menurut Prabowo (2009) untuk kultur *Chlorella* diperlukan temperatur antara 25 – 35 °C. Temperatur mempengaruhi proses-proses fisika, kimia, biologi yang berlangsung dalam sel mikroalga. Peningkatan temperatur hingga batas tertentu akan merangsang aktifitas molekul meningkatnya laju difusi dan juga laju fotosintesis (Sachlan, 1982).

Nilai pH medium kultur merupakan faktor pengontrol yang menentukan kemampuan biologis mikroalga dalam memanfaatkan unsur hara. Nilai pH yang terlalu tinggi misalnya, akan mempengaruhi aktifitas fotosintesis mikroalga (Prabowo, 2009). Namun menurut Oh-hama dan Miyachi (1988) pada umumnya *strain Chlorella* mampu bertoleransi terhadap kisaran salinitas dan pH yang cukup lebar. pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella* berkisar antara 4,5 – 9,3 (Prihantini, dkk., 2005). pH yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pH 7. Prihantini, dkk. (2005) melakukan penelitian tentang pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET dengan variasi pH dan didapatkan kerapatan sel tertinggi (5.677.625 sel/mL) pada media perlakuan pH awal 7. Diagram rerata kerapatan sel *Chlorella*

sp dalam MET dengan variasi pH dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Prihantini, dkk., 2005).



Gambar 2.4 Rerata kerapatan sel mikroalga *Chlorella sp.* pada saat *peak* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan nilai pH awal berbeda

Chlorella sp. memiliki toleransi kisaran salinitas yang tinggi dan dapat hidup pada kisaran salinitas 0 – 35 ppt (dari air tawar sampai air laut). *Chlorella* air laut dapat tumbuh baik pada salinitas 15 – 35 ppt (Prabowo, 2009). Salinitas yang paling optimal bagi pertumbuhan *Chlorella* air tawar adalah 10 – 20 ppt, sementara untuk *Chlorella* air laut adalah 25 – 28 ppt (Inansetyo dan Kurniatuty, 1995).

Teknik kultur *Chlorella sp.* pada penelitian ini dilakukan pada Medium Ekstrak Tauge (MET). Menurut Prihantini, dkk. (2005), Media Ekstrak Tauge merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga. Media tersebut mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga.

Perbandingan nilai gizi antara biji kacang hijau dan kecambah dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Perbandingan komposisi dan nilai gizi antara biji kacang hijau dan setelah dikecambahkan dalam 100 gr.

Komposisi Gizi	Nilai Gizi	
	Dalam Biji	Dalam Kecambah
Kalori (kal)	345	23
Protein (gr)	22,2	2,9
Lemak (gr)	1,2	0,2
Kalsium (mg)	125	29
Fosfor (mg)	320	69
Besi (mg)	6,7	0,8
Vitamin A (IU)	57	10
Vitamin B1 (mg)	0,64	0,07
Vitamin C (mg)	6	15
Air (gr)	10	92,4

(Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan dalam Amilah dan Astuti, 2006)

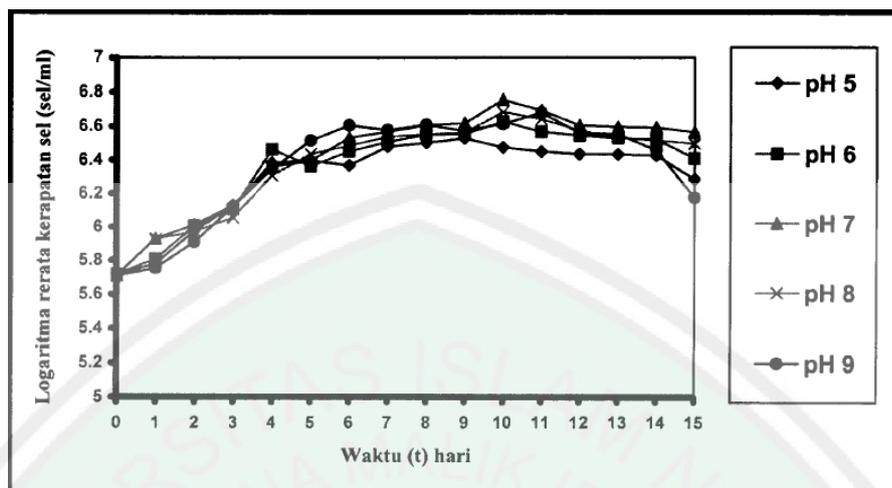
Tauge kacang hijau merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Media perlakuan MET mengandung nutrisi anorganik seperti K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Cu. Nutrisi anorganik yang tergolong makronutrisi yaitu K, P, Ca, Mg, dan Na dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel. Mikronutrisi seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil. Mn, Zn, Cu, Mo, B, Ti, Cr, dan Co yang terdapat dalam media kultur akan mengaktifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Wulandari, dkk., 2010).

Kandungan zat gizi pada biji sebelum dikecambahkan berada dalam bentuk tidak aktif atau terikat. Setelah perkecambahan, bentuk tersebut diaktifkan sehingga meningkatkan daya cerna bagi manusia. Peningkatan zat-zat gizi pada

tauge mulai tampak sekitar 24 – 48 jam saat perkecambahan. Pada saat perkecambahan, terjadi hidrolisis karbohidrat, protein, dan lemak menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga mudah dicerna tubuh. Walaupun beberapa kandungan gizi dalam kecambah memiliki kadar lebih rendah dibandingkan biji kacang hijau, tetapi kandungan gizi tersebut dalam bentuk senyawa terlarut yang lebih mudah diserap tubuh (Maulana, 2010).

Medium Ekstrak Tauge (MET) yang digunakan dalam penelitian ini yaitu MET dengan konsentrasi 4 %. Prihantini, dkk. (2007) melakukan penelitian tentang pengaruh konsentrasi MET terhadap pertumbuhan *Scenedesmus*, dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi MET mempengaruhi kerapatan sel *Scenedesmus* dan didapatkan rerata kerapatan sel tertinggi (3.981.071 sel/mL) pada saat peak terjadi dalam media perlakuan MET 4 %.

Pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* dalam media kultur dapat diamati dengan melihat pertambahan besar ukuran sel mikroalga atau dengan mengamati pertambahan jumlah sel dalam satuan tertentu. Cara kedua lebih sering digunakan untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga dalam media kultur, yaitu dengan menghitung kelimpahan atau kepadatan sel mikroalga dari waktu ke waktu (Prabowo, 2009). Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge dengan variasi pH diberikan pada Gambar 2.4 (Prihantini, dkk., 2005).

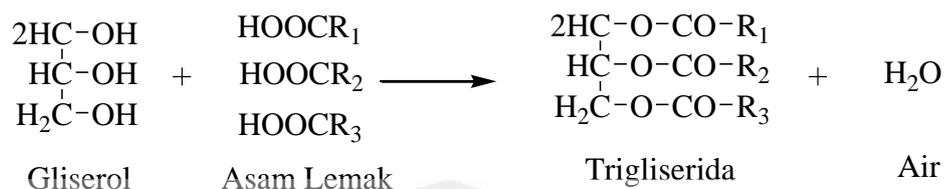


Gambar 2.5 Grafik logaritma rerata kerapatan sel mikroalga *Chlorella* dalam Medium Ekstrak Tauge dengan variasi pH

Kurva pertumbuhan (Gambar 2.5) *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dilakukan selama 15 hari pengamatan, menunjukkan bahwa sel *Chlorella sp.* tidak mengalami fase adaptasi. Fase adaptasi kemungkinan terjadi sangat singkat yaitu sebelum 24 jam (pengamatan hari ke-1). Sel-sel pada kelima media perlakuan tidak mencapai waktu *peak* pada saat yang sama. Media perlakuan pH awal 5 mencapai *peak* pada hari ke-9, media perlakuan pH awal 6,7,8, mencapai *peak* pada hari ke-10, sedangkan media perlakuan pH awal 9 mencapai *peak* pada hari ke-11. Waktu pencapaian *peak* yang berbeda-beda disebabkan perbedaan nilai pH awal dari masing-masing media perlakuan.

2.5 Ekstraksi Minyak Metode Soxhletasi

Minyak dengan nama umum gliserida merupakan triasilgliserol, yaitu trimer dari gliserol dan asam lemak. Dalam lemak dan minyak terdapat tiga gugus hidroksil molekul gliserol yang berada dalam ikatan ester dengan rumus yang terlihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Proses pembentukan trigliserida

Ekstraksi adalah suatu cara untuk memisahkan campuran beberapa zat menjadi komponen-komponen yang terpisah (Winarno, dkk. 1973). Harbone (1987) menambahkan bahwa ekstraksi adalah proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif.

Ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueous phase* dilakukan dengan menggunakan pelarut air, sedangkan *organic phase* menggunakan pelarut organik (Winarno, dkk., 1973). Prinsip metode ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu kemudian diikuti dengan pemisahan dari bahan yang telah diekstrak (Houghton dan Raman, 1998).

Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Derajat polaritas tergantung pada tahapan dielektrik, makin besar tahapan dielektrik semakin polar pelarut tersebut (Nur dan Adijuwana, 1989). Hasil ekstrak yang diperoleh akan tergantung pada beberapa faktor antara lain kondisi alamiah senyawa tersebut, metode ekstraksi yang digunakan, ukuran

partikel sampel, kondisi dan waktu penyimpanan, lama waktu ekstraksi, dan perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel (Darusman, dkk., 1995).

Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkannya, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik, dan mudah terbakar (Ketaren, 1986). Selain itu, keberhasilan ekstraksi juga tergantung pada banyaknya ekstraksi yang dilakukan. Hasil yang baik diperoleh jika ekstraksi dilakukan berulang-ulang dengan jumlah pelarut yang sedikit-sedikit. Efisiensi ekstraksi dapat ditingkatkan dengan menggunakan luas kontak yang besar (Khopkar, 2003).

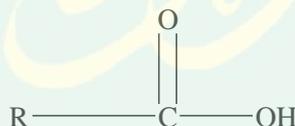
Ekstraksi minyak dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Sokhletasi*. Prinsip ekstraksi *Soxhlet* ialah pengambilan suatu komponen tertentu menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi yang bersifat kontinyu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor). *Soxhlet* terdiri dari pengaduk atau *granul antibumping*, *still pot* (wadah penyuling), *bypass sidearm*, *thimble selulosa*, *extraction liquid*, *syphon arm inlet*, *syphon arm outlet*, *expansion adapter*, *condenser* (pendingin), *cooling water in*, dan *cooling water out* (Darmasih, 1997).

(Fasya,2011) melakukan ekstraksi minyak biji selasih dengan menggunakan metode ekstraksi *Soxhlet* dengan menggunakan pelarut n-heksana yang dilakukan selama 12 siklus. Rendemen yang didapatkan dari proses ekstraksi tersebut adalah sebesar 23,46 %.

2.6 Asam Lemak

Asam lemak merupakan komponen pembangun yang sifatnya khas untuk setiap lipid. Asam lemak adalah asam organik berantai panjang yang mempunyai 4-24 atom. Asam lemak memiliki gugus karboksil tunggal dan ujung hidrokarbon non polar yang panjang, sehingga hampir semua lipid bersifat tidak larut di dalam air dan tampak berminyak atau berlemak. Asam lemak tidak secara bebas atau berbentuk tunggal di dalam sel atau jaringan, tetapi terdapat dalam bentuk terikat secara kovalen pada berbagai kelas lipid berbeda, yang dapat dibebaskan dari ikatan tersebut melalui hidrolisis kimia atau enzimatis (Institut Pertanian Bogor).

Poedjiadji (1994) menyatakan bahwa asam lemak merupakan asam organik yang terdapat dalam bentuk ester trigliserida atau lemak. Asam ini adalah asam karboksilat yang mempunyai rantai karbon panjang dengan rumus umum seperti yang terlihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Struktur Umum Asam Lemak

R merupakan rantai karbon jenuh atau tidak jenuh yang terdiri atas 4 sampai 24 atom karbon. Diungkapkan oleh (Winarno, 1993) bahwa, asam lemak yang paling banyak terdapat dalam makanan adalah asam lemak dengan struktur lurus dengan jumlah atom karbon genap dengan satu gugus asam karboksilat.

Asam-asam lemak yang menyusun lemak juga dapat dibedakan berdasarkan jumlah atom hidrogen yang terikat kepada atom karbon. Berdasarkan

jumlah atom hidrogen yang terikat kepada atom karbon, maka asam lemak dapat dibedakan atas (Poedjiadi, 1994) :

1. Asam lemak jenuh

Asam lemak jenuh merupakan asam lemak dimana dua atom hidrogen terikat pada satu atom karbon. Dikatakan jenuh karena atom karbon telah mengikat hidrogen secara maksimal.

2. Asam lemak tak jenuh

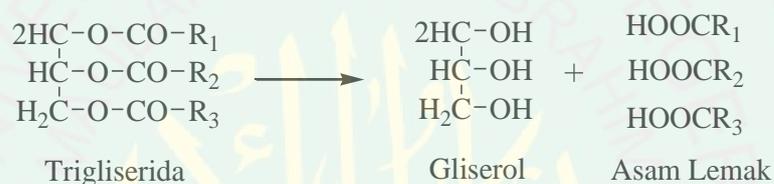
Asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang memiliki ikatan rangkap. Dalam hal ini atom karbon belum mengikat atom hidrogen secara maksimal.

Ditambahkan oleh Winarno (1986) bahwa asam lemak jenuh merupakan asam lemak yang semua ikatan antar atom karbonnya adalah ikatan tunggal, sedangkan asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang mempunyai satu atau lebih ikatan rangkap antar dua atom C. Asam-asam lemak yang ditemukan di alam biasanya merupakan asam-asam monokarboksilat dengan rantai lurus dengan atom karbon genap dari C-2 sampai C-30. Asam lemak jenuh yang banyak ditemukan dalam bahan pangan adalah asam palmitat yaitu 15-50 % dari seluruh asam-asam lemak yang ada.

2.7 Isolasi Asam Lemak

Isolasi asam lemak dari ekstrak lemak dapat dilakukan dengan menggunakan metode hidrolisis dengan menggunakan penambahan NaOH, BF_3 dalam metanol dan Na_2SO_4 (Katili, 2012). Nurhasanah (2003) mengimbuahkan

bahwa asam lemak dapat diperoleh dari hidrolisis lemak/minyak sampel yang dilakukan dengan penambahan NaOH 2M, metanol, dan NaCl yang selanjutnya dipisahkan padatan sabunya dan dinetralkan dengan menggunakan HCl 1M hingga pH 1. Kemudian diekstrak kembali dengan menggunakan n-heksana dan diambil filtratnya. Selanjutnya ditambahkan dengan Na₂SO₄ anhidrat serta diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan asam lemak dari sampel. Reaksi dalam proses hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Reaksi hidrolisis minyak

(Fasya, 2011) dalam penelitiannya menyatakan bahwa isolasi/ hidrolisis minyak menjadi asam lemak dapat dilakukan dengan menggunakan katalis basa KOH 12 % dengan pelarut metanol disertai penambahan H₂SO₄ 1M hingga pH = 1 untuk membentuk asam lemak. Rendemen yang didapatkan cukup tinggi, yaitu sebesar 75,01 %. Asam lemak mampu berperan sebagai antioksidan.

2.8 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang

sangat reaktif (Winarsih, 2007). Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker. Selain itu antioksidan juga membantu menekan proses penuaan/*antiaging* (Tapan, 2005).

Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) dan antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia). Senyawa-senyawa yang umumnya terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, flavonon), turunan asam sinamat, tokoferol, dan asam organik polifungsi. Saat ini tokoferol sudah diproduksi secara sintetik untuk tujuan komersil (Pratt dan Hudson, 1990).

Antioksidan sintetik ditambahkan ke dalam bahan pangan untuk mencegah ketengikan. Antioksidan sintetik yang banyak digunakan sekarang adalah senyawa-senyawa fenol yang biasanya agak beracun. Oleh karena itu, penambahan antioksidan ini harus memenuhi beberapa persyaratan, misalnya tidak berbahaya bagi kesehatan, tidak menimbulkan warna yang tidak diinginkan, efektif pada konsentrasi rendah, larut dalam lemak, mudah didapat, dan ekonomis. Empat macam antioksidan sintetik yang sering digunakan adalah *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG), dan *Nordihidroguaiaretic* (NDGA) (Winarno, 1997).

Mikroalga *Chlorella sp.* mampu berperan sebagai antioksidan. Hal tersebut dilihat dari persen (%) aktivitas antioksidan dan nilai EC₅₀ dari ekstrak *Chlorella sp.* dengan pembanding vitamin C dan BHT, data seperti yang

ditunjukkan dalam Tabel 2.4 dan 2.5 (Bariyyah,2013). (Fasya, 2011) dalam penelitiannya mendapatkan nilai EC_{50} dari asam lemak biji selasih seperti yang dapat dilihat pada tabel 2.4.

Tabel 2.4 Persen aktivitas antioksidan ekstrak *Chlorella sp.* dan pembanding

No	Konsentrasi sampel (ppm)	% aktivitas antioksidan			
		Ekstrak Metanol	Ekstrak Etil Asetat	Vitamin C	BHT
1	5	5,784	5,927	67,260	39,460
2	10	6,041	7,373	92,744	66,247
3	15	9,590	7,404	95,056	77,674
4	20	69,690	8,218	96,190	86,498
5	25	85,383	15,358	96,744	89,823
6	30	90,139	85,580	96,795	89,879

Tabel 2.5 Nilai EC_{50} pada ekstrak *Chlorella sp.* dan pembanding asam askorbat dan BHT

No	Sampel	EC_{50} (ppm)
1	Ekstrak metanol	18,610
2	Ekstrak etil asetat	27,320
3	Asam askorbat	3,527
4	BHT	6,552

Tabel 2.6 Nilai EC_{50} Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

No.	Asam lemak	EC_{50} (ppm)	% Kemurnian
1.	Asam 9,12,15-oktadekatrienoat hasil inklusi	595,93	88,57
2.	Metil 9,12,15-oktadekatrienoat hasil inklusi	770,34	88,51
3.	Metil 9,12,15-oktadekatrienoat hasil kolom	667,29	99,50
4.	Metil 10,12,14-oktadekatrienoat hasil isomerisasi	510,23	82,39

2.8.1 Antioksidan Alami

Antioksidan alami merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil ekstrak bahan alami. Antioksidan alami dalam makanan dapat berasal dari (a) senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, (b) senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, (c) senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik. Senyawa antioksidan alami polifenolik adalah multifungsional dan dapat bereaksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, (d) peredam terbentuknya singlet oksigen. Senyawa fenolik mencakup sejumlah senyawa yang umumnya mempunyai sebuah cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil (OHO), karboksil (COOH), metolenil (-O-CH₃) dan sering juga struktur cincin bukan aromatik. Senyawa fenol cenderung larut dalam air, karena paling sering terdapat dalam bentuk senyawa glukosida dan biasanya terdapat dalam rongga sel. Adanya ion logam, terutama besi dan tembaga, dapat mendorong terjadinya oksidasi lemak. Ion-ion logam ini seringkali diinaktivasi dengan penambahan senyawa pengkelat dapat juga disebut bersifat sinergistik dengan antioksidan karena menaikkan efektivitas antioksidan utamanya (Pratt dan Hudson, 1990).

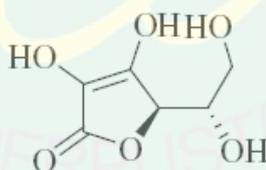
- **Vitamin C (Asam Askorbat)**

Vitamin C sebagai antioksidan berfungsi untuk mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Namun vitamin C bersifat tidak stabil, bila

terkena cahaya dan pada suhu tinggi mudah mengalami kerusakan. Vitamin C selain sebagai senyawa antioksidan tetapi juga bersifat prooksidan (Cahyadi, 2006).

Vitamin C adalah kristal padat, berwarna putih, tidak berbau, mencair pada suhu 190 – 192 °C. Asam askorbat berbentuk kristal stabil di udara sampai bertahun-tahun, tetapi dalam bentuk larutan mudah teroksidasi dan ketidakstabilannya meningkat dengan kenaikan pH larutan. Asam askorbat mudah larut dalam air (1 g dalam 3 mL air), etil alkohol (1 g dalam 50 mL etil alkohol) dan gliserol (1 g dalam 1000 mL gliserol), tidak larut dalam benzene, eter, petroleum eter dan senyawa organik lainnya. Larutan asam askorbat pada pH kurang dari 4,5 mempunyai absorpsi maksimum pada panjang gelombang 265 nm dan sedikit pada panjang gelombang 350 nm dan 400 nm (Cahyadi, 2006).

Adapun struktur kimia asam askorbat (Cahyadi, 2006):



Gambar 2.9 Struktur kimia asam askorbat

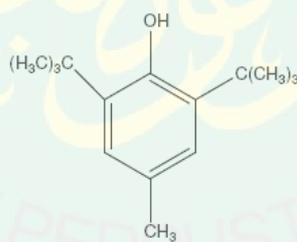
Vitamin C merupakan sumber antioksidan yang memiliki manfaat bagi tubuh antara lain membantu menjaga pembuluh-pembuluh kapiler, meningkatkan penyerapan asupan zat besi, menghambat produksi nitrosamin, zat pemicu kanker dan memperbaiki sistem kekebalan tubuh. Senyawa yang digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) dalam uji aktivitas penangkapan radikal hidroksil dalam penelitian ini adalah vitamin C (Cahyadi, 2006).

2.8.2 Antioksidan Sintetik

Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diizinkan penggunaannya untuk makanan dan penggunaannya telah sering digunakan, yaitu BHA, BHT, PG, TBHQ dan tokoferol. Antioksidan-antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Ardiansyah, 2007 dalam Husnah, 2009).

- **BHT (*Butylated hydroxytoluene*)**

BHT sebagai salah satu antioksidan sintetik. Adapun sifat-sifat antioksidan BHT : mempunyai rumus kimia $C_{15}H_{24}O$, berat molekul 220,36, titik lebur 69 – 70 °C, sinergis dengan BHA dan galat (Hamilton dan Allen, 1994). Adapun struktur dari BHT dapat dilihat pada gambar 2.9 (Cahyadi, 2006) :



Gambar 2.10 Struktur BHT (*Butylated hydroxytoluene*) (Cahyadi, 2006).

Menurut Bennion (1980), senyawa fenolat berfungsi sebagai sumber hidrogen dari group-group OH dalam posisi orto/para yang dapat menghentikan reaksi berantai yang terjadi dalam autooksidasi. Reaksi berantai dari autooksidasi dimulai saat mulai terbentuk radikal bebas. Antioksidan dari tipe fenolik mensuplai H untuk bereaksi dengan radikal bebas sewaktu terbentuk pertama kali dan memutuskan reaksi berantai yang terjadi sebelum produk akhir terbentuk.

Senyawa yang terbentuk pada struktur anti fenolik setelah pelepasan dari H adalah stabil, tidak berbau dan tak berbahaya dalam jumlah yang tidak terlalu banyak.

2.9 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan. Radikal ini akan merebut elektron dari molekul lain yang ada disekitarnya untuk menstabilkan diri, sehingga senyawa kimia ini sering dihubungkan dengan terjadinya kerusakan sel, kerusakan jaringan, dan proses penuaan (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron. Dampak dari kerja radikal bebas akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya. Bila dua senyawa radikal bertemu, elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Sebaliknya, bila senyawa radikal bebas bertemu dengan senyawa yang bukan radikal bebas akan terjadi tiga kemungkinan, yaitu (1) radikal bebas akan memberikan elektron yang tidak berpasangan (reduktor) kepada senyawa bukan radikal bebas, (2) radikal bebas menerima elektron (oksidator) dari senyawa bukan radikal bebas, (3) radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal bebas (Winarsih, 2007).

Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara, yaitu secara endogen (sebagai respon normal proses biokimia internal maupun eksternal) dan secara

eksogen (berasal dari polusi, makanan, serta injeksi ataupun absorpsi melalui injeksi) (Winarsih, 2007). Radikal bebas juga dapat terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas. Sumber-sumber radikal bebas yang berasal dari faktor endogen maupun eksogen dapat dilihat pada Tabel 2.7.

Tabel 2.7 Sumber-sumber radikal bebas

Sumber endogen	Sumber eksogen
Mitokondria	Rokok
Fagosit	Polutan lingkungan
Xantin oksidase	Radiasi
Reaksi yang melibatkan logam transisi	Obat-obatan tertentu, pestisida dan anestesi dan larutan industri
Jalur arakhidonat	Ozon
Peroksisom	
Olahraga	
Peradangan	
Iskemia/ reperfusi	

Sumber: Tuminah, (2000)

Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak. Radikal bebas terbentuk di dalam tubuh akibat produk sampingan proses metabolisme ataupun karena terdapat radikal bebas dalam tubuh melalui pernapasan (Dalimarta dan Soediby, 1998 dalam Pratiwi, *dkk.*, 2006). Akan tetapi, radikal bebas tidak selalu merugikan. Misalnya, radikal bebas berperan dalam pencegahan penyakit yang disebabkan karena mikrobia melalui sel-sel darah khusus yang disebut fagosit (Tuminah, 2000).

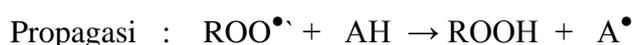
2.10 Mekanisme Antioksidatif

Menurut Gordon (1990), antioksidan mempunyai dua fungsi berdasarkan mekanisme kerjanya adalah sebagai berikut:

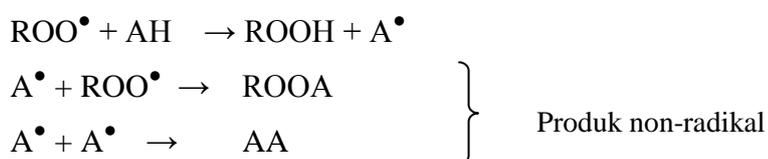
Pertama, fungsi utama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang memiliki fungsi tersebut disebut juga sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid (R^\bullet , ROO^\bullet) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara hasil reaksi radikal antioksidan (A^\bullet) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding dengan radikal lipid.

Kedua, fungsi kedua antioksidan merupakan antioksidan sekunder, yaitu berfungsi untuk memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme pemutusan rantai oksidasi di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi, dimana hal itu melalui perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi (Gambar 2.11). Radikal-radikal antioksidan (A^\bullet) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru seperti Gambar 2.12 (Gordon, 1990).



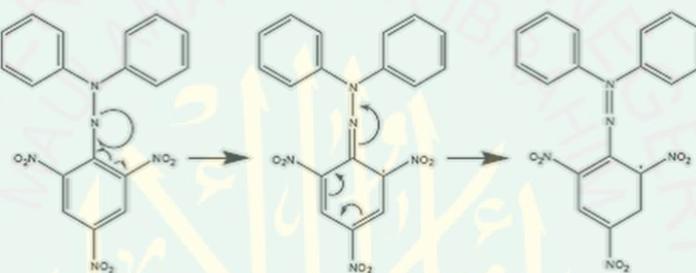
Gambar 2.11 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida



Gambar 2.12 Reaksi penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan.

Autooksidasi dapat dihambat dengan menambahkan antioksidan (AH) dalam konsentrasi rendah yang dapat berasal dari penginterferensian rantai propagasi atau inisiasi. Radikal-radikal antioksidan dapat saling bereaksi membentuk produk non-radikal (Hamilton, *et al.*, 1994).

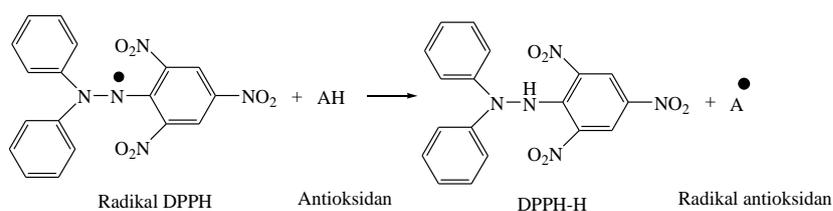
2.11 Uji Aktivitas Antioksidan



Gambar 2.13 Resonansi DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk uji aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Molyneux, 2003). Kestabilan DPPH diperoleh dari adanya resonansi ikatan rangkap pada struktur DPPH dapat dilihat pada Gambar 2.13 (Manik, 2011).

DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan menghasilkan bentuk tereduksi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* dan radikal antioksidan (Prakash, dkk., 2001).



Gambar 2.14 Reaksi DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dengan antioksidan

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH. Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkapan radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, 2005 dalam Kunchahyo dan Sunardi, 2007).

Panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas antioksidan sampel uji sangat bervariasi. Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengukuran absorbansi yaitu 515 nm (Kuntorini dan Astuti, 2010; Hanani, dkk., 2005), 516 nm (Julyasih, dkk., 2009), 517 nm (Yudiati, dkk., 2011), 518 nm (Bariyyah, 2013). Pada prakteknya, hasil pengukuran panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum yaitu sekitar panjang gelombang yang disebutkan di atas. Nilai absorbansi yang beragam dari penelitian satu dengan penelitian lainnya adalah dikarenakan panjang gelombang dapat diatur untuk memberikan absorbansi maksimum sesuai dengan alat yang digunakan (Molyneux, 2003).

Dalam metode DPPH terdapat parameter EC_{50} . Parameter EC_{50} menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50 % yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil EC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman, dkk., 2005). Menurut Armala (2009) dalam Putra (2012), menyatakan tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji menggunakan metode

DPPH dapat digolongkan menurut nilai IC_{50}/EC_{50} , seperti yang nampak pada Tabel 2.8.

Tabel 2.8 Ketentuan kekuatan antioksidan

Intensitas	Nilai IC_{50}/EC_{50}
Sangat kuat	< 50 mg/L
Kuat	50 – 100 mg/L
Sedang	100 – 150 mg/L
Lemah	>150 mg/L

Sumber : Putra, (2012).

Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan persamaan sebagai berikut (Molyneux, 2003):

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Nilai 0 % berarti sampel tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila presentase aktivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 % (Parwata, dkk., 2009).

Pengujian aktivitas antioksidan minyak dapat dilakukan dengan menggunakan metode radikal DPPH. (Orhan, 2009) melakukan pengujian aktivitas antioksidan pada minyak *Coryllus avellana*, *Juglans regia*, *Arachis hypogea*, dan *Pinus pinea* menggunakan metode radikal DPPH dengan konsentrasi sampel sebesar 0,1; 1,0; 10; dan 100 mg mL⁻¹. Hasil pengukuran % aktivitas penghambatan terhadap radikal DPPH tertinggi didapatkan ketika konsentrasi sampel 100 mg mL⁻¹. (Ismail, dkk., 2010) melakukan pengujian

aktivitas antioksidan pada minyak biji belawah (Rock Melon (RMO) dan Golden Langkawi (GLO)) yang diekstraksi menggunakan pelarut petroleum eter. Hasil pengukuran memberikan hasil IC_{50} GLO sebesar 6,5 ppm pada fraksi 3, 7,1 ppm pada fraksi 2 dan 21,6 ppm pada fraksi 1. Sedangkan hasil IC_{50} RMO adalah sebesar 8,5 ppm pada fraksi 3, 10,7 ppm pada fraksi 1 dan 21,3 ppm pada fraksi 2, sedangkan nilai IC_{50} pembanding BHT sebesar 0,29 ppm.

Penelitian lain tentang pengujian aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH dilakukan terhadap minyak pisang Kluai Khai (KK), Kluai Namwa (KN), Kluai Hom (KH). Larutan sampel dibuat dengan konsentrasi stok sampel sebesar 100 ppm dan diencerkan menjadi 7 macam konsentrasi dengan kelipatan 2. Hasil yang diperoleh berupa nilai IC_{50} pada KK sebesar 90 ppm, KN sebesar 73 ppm dan KH sebesar 81 ppm. Data tersebut menunjukkan bahwa minyak pisang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Meechaona, dkk., 2007). Penelitian lain pengujian aktivitas antioksidan dilakukan oleh (Wang, dkk., 2011) dengan menggunakan sampel berupa minyak teh menggunakan konsentrasi sampel 10, 20, 40, 80, dan 160 ppm. Pada minyak teh yang diekstraksi menggunakan SC-CO₂ didapatkan % penghambatan terhadap radikal DPPH sebesar 17,2 – 93,4 dan % penghambatan pada minyak teh yang diekstraksi menggunakan *soxhlet* sebesar 12,1 – 67,8. Nilai IC_{50} minyak teh dengan metode SC-CO₂ adalah sebesar 35,8 ppm.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia, Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari 2013 – Juni 2014.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *beaker glass* 50 mL, 100 mL, 500 mL dan 1000 mL, pipet ukur 1 mL, 5 mL dan 10 mL, gelas ukur 25 mL, 100 mL, 500 mL, erlenmeyer 250 mL, 500 mL dan 1000 mL, gelas arloji, corong gelas, labu takar 25 mL, 50 mL, dan 100 mL, bola hisap, spatula, pengaduk gelas, rak kultivasi, *sentrifuge*, oven, desikator, *rotary evaporator vacum*, kuvet, pipet tetes, aluminium foil, neraca analitik, pemanas air, seperangkat ekstraktor *Soxhlet*, spektrofotometer spektronik 20+, spektrofotometer UV-Vis, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, botol semprot.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dan penelitian ini yaitu biomassa mikroalga jenis *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.

Bahan-bahan lain yang digunakan adalah tauge (kacang hijau), aquades, KOH 12 %, metanol *p.a.*, larutan DPPH, etanol *p.a.*, n-heksana, H₂SO₄ 1 M, gas N₂, BHT, vitamin C.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental di laboratorium. Sampel yang digunakan adalah isolat *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Isolat *Chlorella sp.* dikultivasi pada Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % sebagai media perlakuan. (Prihantini, dkk., 2005). Kultivasi pada MET dilakukan selama 8 hari sehingga pemanenan biomassa *Chlorella sp.* adalah pada fase awal stasioner (Kawaroe dkk., 2012). Proses pemanenan dilakukan dengan melakukan sentrifius selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 30 °C. Selanjutnya dilakukan analisis kadar air terhadap biomassa *Chlorella sp.* sesudah dikeringkan.

Terhadap biomassa kering yang didapatkan dari proses pengeringan, dilakukan ekstraksi terhadap minyak mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana. Selanjutnya dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan ekstrak pekat n-heksana

dengan dialiri gas N₂. Proses selanjutnya adalah hidrolisis ekstrak pekat n-heksana (minyak) dari mikroalga *Chlorella sp.* dengan katalis basa KOH 12 %. Dilakukan refluks selama 90 menit pada suhu 60 °C. Kemudian ditambahkan aquades dan pelarut n-heksana, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan (fase air dan fase organik). Fase air ditambahkan dengan asam sulfat 1M hingga pH = 1 lalu ditambahkan dengan n-heksana. Selanjutnya dipisahkan kedua fase tersebut menggunakan corong pisah dan diambil fase organiknya. Fase organik dipekatkan dengan dialiri gas N₂ (Fasya, 2011)

Minyak hasil ekstraksi dan asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* selanjutnya diuji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan menggunakan variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm, kemudian dihitung persen aktivitas antioksidannya dan dihitung nilai EC₅₀ (*effective concentration*) menggunakan persamaan regresi.

3.4 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

- 1) Sterilisasi alat;
- 2) Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET);
- 3) Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*;
- 4) Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.*;
- 5) Preparasi sampel;
- 6) Analisa kadar air *Chlorella sp.*;

- 7) Ekstraksi minyak Mikroalga *Chlorella sp.*;
- 8) Hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode saponifikasi;
- 9) Uji aktivitas antioksidan minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode DPPH pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm;

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan disterilkan ditutup dengan aluminium foil, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan diatur pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inch*). Sterilisasi dilakukan selama 30 menit (Hidayati, 2009).

3.5.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET (b/v) yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih selama 1 jam. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam akuades dengan konsentrasi 4% (v/v) (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.3 Kultivasi *Chlorella sp.*

Isolat *Chlorella sp.* yang digunakan dalam penelitian berasal dari Laboratorium Ekologi Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang. Kultivasi *Chlorella sp.* yaitu dengan kondisi rak kultur pada suhu 25-27 °C dan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux. Media yang digunakan adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) 4% sebagai media perlakuan.

Isolat mikroalga *Chlorella sp.* sebanyak 100 mL disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Endapan sel *Chlorella sp.* diinokulasikan ke

dalam masing-masing 600 mL media perlakuan (MET). Labu kultur secara acak diletakkan ke dalam rak kultur dengan pencahayaan 2 buah lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari.

3.5.4 Pemanenan *Chlorella sp.*

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* hasil kultivasi hingga fase awal stasioner disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga dapat memisahkan biomassa dari filtratnya. Biomassa *Chlorella sp.* selanjutnya dianalisis kadar airnya dan diekstraksi kandungan minyaknya.

3.5.5 Preparasi Sampel

Sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* basah diambil seluruhnya kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 30 °C selama 15 jam. Selanjutnya dilakukan analisis kadar air dan ekstraksi minyak pada sampel biomassa kering yang diperoleh.

3.5.6 Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*

Cawan porselen dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Mikroalga *Chlorella sp.* hasil preparasi diambil sebanyak 1 gram dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar air dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.*, kemudian sampel disimpan dalam desikator selama ± 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali

dalam oven \pm 15 menit, disimpan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dalam mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan persamaan (AOAC, 1984):

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \%$$

Keterangan : a = Berat konstan cawan kosong

b = Berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = Berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

berikut perhitungan kadar air terkoreksi menggunakan persamaan:

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

% Kadar air terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

3.5.7 Ekstraksi Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana 148 mL untuk isolat mikroalga sebanyak 18,5 gram. Biomassa kering dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam timbal. Kemudian dirangkai timbal dengan labu alas bulat. Selanjutnya diletakkan labu alas bulat pada pemanas. Ditambahkan pelarut n-heksana melalui timbal hingga mengalir masuk ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya dipasangkan kondensor pada mulut timbal dan dilakukan proses *Soxhletasi* selama 13 jam, sehingga didapatkan ekstrak kasar n-heksana. Kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.*, selanjutnya dilakukan pengeringan terhadap ekstrak pekat minyak

mikroalga *Chlorella sp.* dengan dialiri gas N₂. Minyak yang didapatkan diuji aktivitas antioksidannya.

3.5.8 Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Asam lemak dapat diperoleh dari minyak mikroalga *Chlorella sp.* melalui proses penyabunan/ saponifikasi. Tahap tersebut dilakukan dengan mengambil sebanyak 1,2502 gram minyak ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 5 mL metanol dan KOH 12 % (1,4 gram KOH dalam 3,33 mL aquades). Dilakukan refluks pada suhu 60 °C selama 90 menit. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 40 ml aquades dan 20 ml n-heksana, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan (fase organik dan fase air). Fase air diambil dan ditambahkan dengan asam sulfat 1M hingga pH = 1 dan ditambahkan dengan n-heksana sebanyak 20 mL. Kemudian dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah dan diambil fase organik. Selanjutnya fase organik tersebut dipekatkan dengan menggunakan gas N₂. Asam lemak yang didapatkan diuji aktivitas antioksidannya.

3.5.9 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

3.5.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dimasukkan etanol sebanyak 6,75 mL ke dalam kuvet, kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL dan dimasukkan dalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari λ_{maks} larutan dan dicatat hasil pengukuran λ_{maks} untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, 2005 dalam Manik, 2011).

3.5.9.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Dibuat larutan ekstrak minyak dan asam lemak 30 ppm sebanyak 50 mL, kemudian diambil sebanyak 6,75 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 0,2 mM larutan DPPH sebanyak 2,25 mL, kemudian dicari waktu kestabilan tanpa inkubasi dan setelah inkubasi pada suhu 37 °C pada rentangan waktu 5 – 100 menit dengan interval 5 menit. Sampel diukur menggunakan spektrometri UV-Vis pada λ_{maks} yang telah diketahui pada tahap sebelumnya (Bariyyah, 2013).

3.5.9.3 Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

- a) Cara pembuatan kontrol: Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,2 mM diambil sebanyak 9 mL, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan tissue, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya dengan menggunakan UV-Vis pada λ_{maks} yang didapatkan pada tahap sebelumnya.
- b) Sampel minyak dan asam lemak dilarutkan dalam etanol dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Kemudian disiapkan tiga tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi diisi dengan 6,75 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL (perbandingan larutan DPPH : ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu 1:3). Setelah itu larutan ditutup dengan tissue dan diinkubasi dengan suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang diperoleh pada proses sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan

diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} yang telah didapatkan sebelumnya. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya. Nilai tersebut diperoleh dengan persamaan (Arindah, 2010) :

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Setelah didapatkan persen (%) aktivitas antioksidannya, selanjutnya masing-masing ekstrak dihitung nilai EC_{50} nya dengan memperoleh persamaan regresi.

- c) Pembanding BHT dan asam askorbat (Vitamin C): diperlakukan seperti sampel akan tetapi sampel diganti dengan larutan BHT dan asam askorbat (vitamin C).

3.6 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan cara menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi minyak dan asam lemak *Chlorella sp.* dan dilakukan perhitungan nilai EC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi asam lemak (x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (y). Dibandingkan nilai EC_{50} pada masing-masing sampel. Selanjutnya, membandingkan nilai EC_{50} pada sampel dengan pembanding. Apabila sampel memiliki nilai EC_{50} rendah, maka menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi. Selanjutnya, membandingkan nilai EC_{50} pada masing-masing sampel dengan pembanding untuk mengetahui aktivitas antioksidan alami dengan antioksidan sintetik (Bariyyah, 2013).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian harus dalam keadaan bersih dan steril dari kontaminan-kontaminan yang ada di lingkungan. Oleh karena itu, sebelum memulai kultivasi dilakukan sterilisasi alat dengan menggunakan metode *stoom*, yaitu metode sterilisasi dengan memanfaatkan uap panas di dalam autoklaf pada waktu, suhu dan tekanan tertentu. Proses sterilisasi alat dilakukan pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 30 menit (Hidayati, 2009). Karena apabila sejumlah mikroba dipanaskan pada suhu konstan tertentu, sebagian mikroba akan mengalami kematian. Semakin lama pemanasan, maka semakin banyak mikroba yang mengalami kematian. Setiap mikroba memiliki tingkat ketahanan panas yang berbeda-beda sesuai dengan nilai D (waktu pemanasan pada suhu konstan tertentu yang akan menyebabkan pengurangan jumlah mikroba sebanyak 1 desimal atau 90% populasi). Acuan suhu yang digunakan untuk sterilisasi adalah 121,11 °C (Hariyadi, dkk., 2010).

4.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Hasil ekstrak tauge sebelum diencerkan dan setelah pengenceran hingga konsentrasi 4% dapat dilihat pada Gambar 4.1. Terlihat bahwa warna ekstrak tauge sebelum diencerkan berwarna kuning pekat dan tidak berwarna ketika diencerkan menjadi konsentrasi 4%.



a) Medium ekstrak taube sebelum diencerkan

b) Medium ekstrak taube 4%

Gambar 4.1 MET sebelum dan sesudah diencerkan

Menurut Prihantini, dkk., (2005) medium ekstrak taube (MET) merupakan salah satu media alami yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan mikroalga. Proses pembuatan (MET) dilakukan dengan menggunakan taube kacang hijau yang direbus dalam air mendidih selama 1 jam. Proses perebusan taube dilakukan untuk memecah senyawa yang terkandung dalam taube menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga mudah diserap oleh mikroalga. Taube kacang hijau dipilih karena mudah didapatkan, ekonomis, tidak memiliki efek toksik dan memiliki kandungan gizi yang dibutuhkan oleh pertumbuhan mikroalga. Selain itu gizi pada biji kacang hijau berada dalam bentuk tidak aktif atau terikat sehingga akan sulit dicerna atau dimanfaatkan nutriennya oleh mikroalga. Setelah didapatkan ekstrak taube, kemudian dilakukan pengenceran hingga konsentrasi 4% karena menurut Prihantini, dkk. (2007) kultivasi yang dilakukan pada MET 4% memiliki kerapatan sel yang tinggi.

MET mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Selain itu, ada berbagai macam unsur hara yang terkandung dalam MET seperti K, P, Ca, Mg, dan Na yang sangat dibutuhkan oleh mikroalga sebagai komponen penyusun sel. Selain itu, MET juga mengandung mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil. Kandungan Mn, Zn, Cu, Mo, B, Ti, Cr, dan Co yang terdapat dalam media kultur akan mengefektifkan fotosintesis, fotosintesis yang berlangsung dengan baik akan memaksimalkan produk (biomassa) yang dihasilkan dalam kultivasi (Wulandari, dkk., 2010). Selain adanya unsur hara, baik makro ataupun mikro, MET juga mengandung berbagai macam vitamin yang terkandung dalam media tersebut diantaranya adalah karoten, thiamin, riboflavin, niasin, dan vitamin C (Persagi, 2009).

4.3 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan perubahan warna pada media perlakuan yang semula berwarna hijau kekuningan menjadi hijau pekat. Perubahan warna kultur tersebut diasumsikan sebanding dengan peningkatan kerapatan atau jumlah sel *Chlorella sp.* Peningkatan kepadatan sel *Chlorella sp.* pada media. Semakin pekat warna yang dihasilkan, maka semakin tinggi jumlah sel mikroalga yang ada di dalam media kultivasi. Perubahan warna media perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Keterangan :
 A = umur kultur 0 hari
 B = umur kultur 5 hari
 C = umur kultur 8 hari

Gambar 4.2 Warna kultur *Chlorella sp.* pada hari berbeda

Kultivasi merupakan suatu cara kultur atau perbanyakan sel mikroalga yang dilakukan dalam suatu medium tertentu. Kultivasi *Chlorella sp.* dilakukan dalam medium ekstrak taube (MET) dengan menggunakan erlenmeyer 1000 mL. *Chlorella sp.* dikultur dalam selama 8 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Selain media, faktor-faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* diantaranya cahaya, temperatur, dan pH.

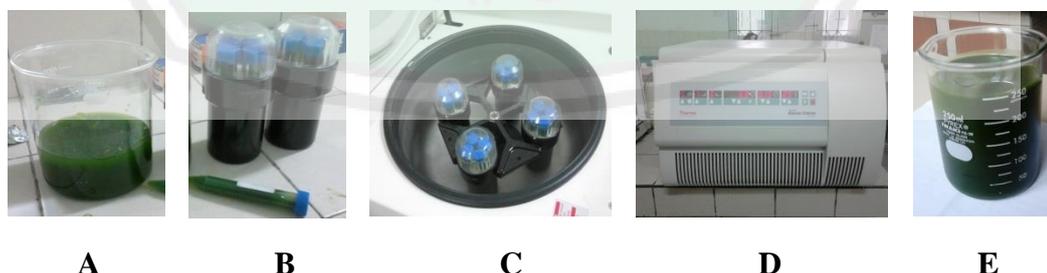
Cahaya mempunyai peranan yang penting untuk pertumbuhan mikroalga sebagai salah satu faktor pendukung dalam proses fotosintesis. Karena ketika proses fotosintesis berlangsung baik, maka pertumbuhan mikroalga juga akan baik sehingga biomassa mikroalga yang diperoleh dapat maksimal. Faktor cahaya yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari penyinaran oleh lampu TL 36 Watt dengan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux.

Selain cahaya, temperatur juga sangat mempengaruhi berlangsungnya proses kultivasi karena pertumbuhan mikroalga dapat optimal pada kisaran temperatur antara 15 – 30 °C (De La Noue dan De Pauw, 1988). Sriwardani

(2000) melakukan kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam medium PHM-1 dengan temperatur ruangan yaitu berkisar antara 27 – 29 °C, Rostini (2007) mengimbuhkan bahwa *Chlorella sp.* Yang ditumbuhkan menggunakan medium air laut dapat dilakukan dengan temperatur berkisar antara 20 – 27 °C. Oleh karena itu temperatur kultivasi *Chlorella sp.* Kultivasi dalam penelitian ini dilakukan pada temperatur ruang (berkisar antara 25 – 30 °C). Kondisi temperatur tersebut merupakan kisaran temperatur yang baik untuk pertumbuhan mikroalga, tidak terkecuali mikroalga *Chlorella sp.* Peningkatan kepadatan sel *Chlorella sp.* pada media menandakan terjadinya pemanfaatan nutrisi (unsur hara) yang terkandung dalam MET oleh sel-sel *Chlorella sp.* Begitu juga dengan adanya kesesuaian berbagai faktor pendukung kultur lainnya, yaitu faktor cahaya, temperatur, dan pH.

4.4 Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*

Proses pemanenan biomassa Mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.3.

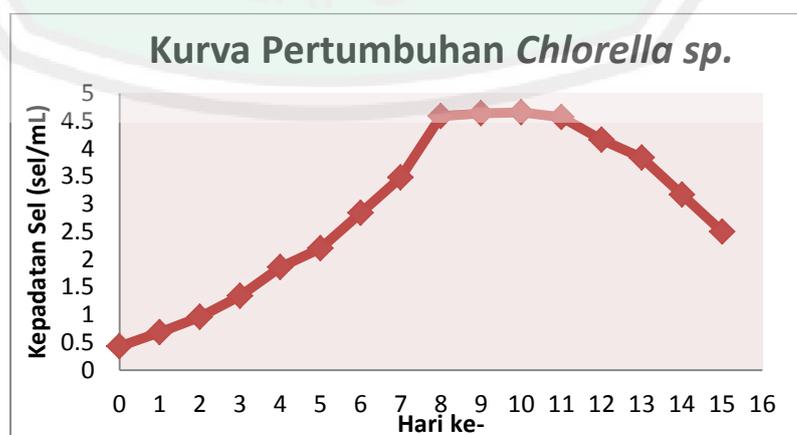


Keterangan : A = Biomassa yang masih bercampur dengan filtrat
 B = Biomassa dan filtrat dalam tabung sentrifuse
 C = Persiapan sentrifuse
 D = Sentrifuse
 E = Biomassa basah

Gambar 4.3 Proses pemisahan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan sampel dilakukan dengan cara mengumpulkan biomassa dan filtrat dalam wadah botol kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Sampel setelah disentrifuse nampak lebih kental dan berwarna hijau pekat. Menurut Vonshak (1990), teknik pemisahan biomassa dan filtrat dengan menggunakan sentrifuse merupakan salah satu cara yang efisien.

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk memperoleh biomassa yang akan digunakan untuk ekstraksi senyawa aktif sebagai antioksidan. Penentuan hari panen dilakukan berdasarkan fase pertumbuhan *Chlorella sp.* pada saat kultivasi. Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada fase awal stasioner atau akhir eksponensial karena jenis metabolit yang ingin diambil (diekstrak) adalah minyak yang termasuk ke dalam jenis metabolit primer. Pada fase awal stasioner atau akhir eksponensial, belum terjadi degradasi metabolit primer menjadi metabolit sekunder namun kerapatan selnya adalah yang tertinggi. Penentuan waktu pemanenan didasarkan pada penelitian Barriyah (2013), yang menyatakan bahwa fase awal stasioner adalah pada hari ke-8, seperti yang nampak pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp.* (Barriyah, 2013)

Pemanenan mikroalga dilakukan pada fase awal stasioner atau akhir eksponensial, karena pada fase tersebut terjadi peningkatan kepadatan populasi secara maksimal. Selain itu metabolit yang diproduksi pada fase eksponensial adalah golongan metabolit primer, seperti lemak, karbohidrat dan protein. Menurut Herbert (1995) pada fase stasioner terjadi metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer.

4.5 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan cara pengeringan. Sampel basah dan sampel kering mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Keterangan : A = Biomassa basah
B = Biomassa kering

Gambar 4.5 Proses preparasi biomassa mikroalga *Chlorella sp.*

sampel sebelum dikeringkan berbentuk cairan kental yang berwarna hijau pekat. Setelah pengeringan, sampel berbentuk padatan berwarna hijau kehitaman (hijau yang sangat pekat). Biomassa basah mikroalga *Chlorella sp.* sebanyak 809,60 gram menghasilkan biomassa kering sebanyak 19,53 gram. Sehingga dari

perhitungan diketahui bahwa rendemen proses preparasi dengan cara mengeringkan sampel adalah sebesar 2,41 %.

Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 30 °C selama 15 jam. pemilihan oven sebagai alat untuk mengeringkan biomassa basah mikroalga *Chlorella sp.* adalah karena senyawa aktif yang akan diambil tidak rentan terhadap suhu tinggi, sehingga penggunaan oven sangat efisien dalam hal ini. Preparasi sampel dengan pengeringan dilakukan karena biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang didapatkan pada saat pemanenan tidak langsung dapat diekstraksi. Hal tersebut terjadi karena proses pengumpulan biomassa terus berlangsung hingga biomassa yang akan digunakan dalam jumlah yang memadai untuk diekstraksi. Pencegahan terjadinya pembusukan atau kerusakan komponen aktif pada biomassa basah mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan proses pengeringan hingga diperoleh biomassa kering mikroalga. Pada dasarnya pengeringan sampel dapat mencegah kerusakan sampel karena rendahnya kadar air dalam sampel tersebut, sehingga dapat mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri dalam jangka waktu yang lebih lama.

4.6 Analisis Kadar Air

Data perhitungan kadar air pada cuplikan sampel *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Lampiran 3. Kadar air dari cuplikan biomassa *Chlorella sp.* kering adalah sebesar 8,23 %. Penentuan kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel. Penentuan kadar air dilakukan dengan memanaskan cuplikan sampel dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit dan

ditimbang, proses tersebut dilakukan secara berulang-ulang hingga didapatkan berat konstan. Banyaknya kandungan air yang menguap ketika proses pemanasan di dalam oven dinyatakan dengan selisih berat sampel sebelum dan setelah dikeringkan. Penentuan kadar air pada mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan biomassa kering hasil preparasi. Digunakan pengujian kadar air terhadap cuplikan biomassa kering (setelah proses preparasi sampel) untuk mengetahui seberapa besar tingkat keamanan sampel ketika berada dalam tahap penyimpanan. Selain itu, kadar air juga sangat mempengaruhi proses ekstraksi.

Setyowati (2009) menyatakan bahwa kadar air maksimum yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan maksimal yaitu sebesar 11 %, karena semakin rendah nilai kadar air maka semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan. Kadar air yang berlebihan akan mempengaruhi hasil ekstraksi karena dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi minyak, maka pelarut yang sesuai adalah yang bersifat non polar, sehingga ketika terjadi penambahan air berlebih tentunya akan turut mampu mengekstrak senyawa-senyawa yang memiliki sifat kepolaran sama dengan air. Sehingga akan mempengaruhi rendemen dan kemurnian hasil ekstraksi yang didapatkan.

4.7 Ekstraksi Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Hasil ekstraksi *soxhlet* sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* Dapat dilihat pada Gambar 4.6. Terlihat bahwa minyak yang dihasilkan berbentuk cairan kental berwarna kuning kecoklatan.



Gambar 4.6 Minyak mikrolaga *Chlorella sp.* hasil ekstraksi Soxhlet

Ekstraksi dilakukan selama 13 jam dengan 12 menit di tiap siklusnya, sehingga ekstraksi dilakukan sekitar 65 siklus. Dari proses ekstraksi tersebut didapatkan berat minyak sebesar 1,5543 gram. Sehingga rendemen hasil ekstraksi adalah sebesar 8,39 %. Awal proses ekstraksi terlihat bahwa ekstrak yang turun ke dalam labu alas bulat berwarna kuning kecoklatan, semakin lama warna yang dihasilkan semakin pudar yaitu kuning jernih (mendekati bening). Ketika warna ekstrak yang dihasilkan telah semakin jernih, maka proses ekstraksi dihentikan karena diasumsikan bahwa seluruh minyak pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* telah terekstrak semua.

Sebelum dilakukan proses ekstraksi terhadap mikroalga *Chlorella sp.*, terlebih dulu dilakukan penggerusan menggunakan mortar dan pistil untuk mendapatkan ukuran partikel yang lebih kecil. Hal tersebut dilakukan untuk mempermudah dan memaksimalkan interaksi antara sampel dengan pelarut. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan 18,5 gram biomassa kering mikroalga *Chlorella sp.* yang dibungkus dengan kertas saring. Kemudian dimasukkan kertas saring berisi sampel ke dalam tabung timbal dan diekstraksi menggunakan pelarut n-heksana sebanyak 148 mL.

Pemilihan pelarut berupa n-heksana adalah karena senyawa aktif dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang akan diekstrak adalah minyak (trigliserida) yang bersifat non polar, sehingga dapat larut dengan baik pada pelarut non polar. Ekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode *soxhletasi*. Menurut Fasya (2010) menyatakan bahwa ekstraktor *soxhlet* merupakan cara ekstraksi minyak yang efisien karena pelarut dapat digunakan secara berulang-ulang, sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut selama proses ekstraksi. Cara kerja dari ekstraktor *soxhlet* adalah dengan menempatkan pelarut (yang mudah menguap) ke dalam labu alas bulat dan dilakukan pemanasan terhadapnya sehingga pelarut menguap dan mengembun pada tabung timbal (tempat sampel). Dalam tabung timbal tersebut akan terjadi interaksi antara sampel dengan pelarut, selanjutnya minyak yang terekstrak akan turun ke dalam labu alas bulat bersama dengan pelarutnya. Proses tersebut akan berlangsung secara terus-menerus selama masih terjadi pemanasan terhadap pelarut.

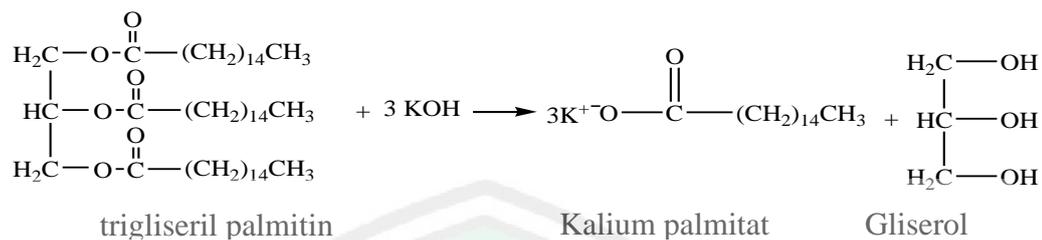
Rachmaniah, dkk. (2010) menyatakan bahwa ekstraksi minyak terhadap mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode ekstraksi *soxhlet* menggunakan pelarut n-heksana mendapatkan rendemen minyak sebesar 16,57 %. Rendemen yang dihasilkan dalam penelitian ini lebih kecil daripada yang dihasilkan oleh Rachmaniah, dkk. (2010). Hal tersebut terjadi mungkin dikarenakan sampel yang digunakan berbeda, karena pada penelitian Racmaniah, dkk. (2010) digunakan sampel yang berasal dari Balai Budidaya Air Payau, Situbondo sedangkan dalam penelitian ini digunakan sampel yang dikultivasi dalam medium ekstrak tauge,

sehingga dimungkinkan kandungan dalam sampel juga berbeda yang akhirnya mempengaruhi hasil ekstraksi.

4.8 Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Minyak hasil ekstraksi dirubah menjadi asam lemak melalui hidrolisis. Hidrolisis terhadap minyak mikroalga *Chlorella sp.* Yang telah dilakukan, menghasilkan campuran asam-asam lemak yang berwujud kental pada suhu ruang dan berwarna kuning kecoklatan. Rendemen hidrolisis minyak menjadi asam lemak adalah sebesar 47,30 (b/b).

Proses hidrolisis diawali dengan penimbangan minyak hasil ekstraksi dan didapatkan berat minyak sebesar 1,2502 gram. Kemudian minyak dimasukkan dalam labu alas bulat leher tiga dan ditambahkan dengan 5 mL metanol. selanjutnya ditambahkan dengan KOH 12 % (0,4 gram KOH dilarutkan dalam 3,33 mL air). Selanjutnya dilakukan refluks pada campuran larutan tersebut dengan disertai proses pemanasan menggunakan suhu 60 °C selama 90 menit. Refluks pada dasarnya adalah proses pencampuran suatu larutan dengan disertai pemanasan dan pengadukan yang ditujukan untuk mempercepat campuran larutan untuk homogen. Proses pengadukan sangat penting untuk dilakukan karena menurut Syaiful, dkk. (2009) menyatakan bahwa hidrolisis yang dilakukan disertai pengadukan dengan kecepatan 300 rpm memiliki % hidrolisis yang lebih besar daripada ketika menggunakan kecepatan pengadukan 100 rpm. Warna larutan yang dihasilkan adalah kuning kecoklatan. Reaksi yang terjadi dalam proses hidrolisis gliseril palmitin ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Reaksi hidrolisis trigliseril palmitin (Fasya, 2011)

Reaksi pada Gambar 4.7 menunjukkan bahwa ada pembentukan garam kalium (sabun) yang larut dalam air. Pembentukan sabun ditandai dengan terbentuknya busa pada saat dilakukan pengocokan. Pembentukan busa dapat dilihat pada Gambar 4.8.



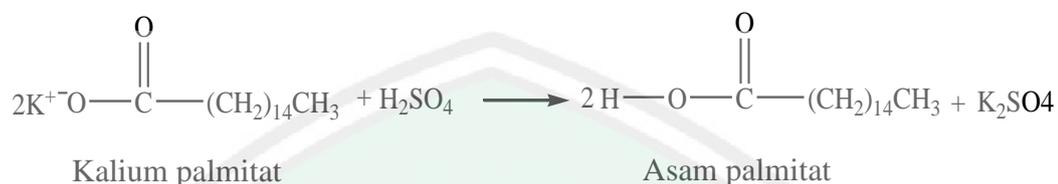
Gambar 4.8 Pembentukan sabun pada proses saponifikasi

Hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan larutan KOH dan menggunakan pelarut metanol. Hidrolisis dengan basa menghasilkan reaksi yang bersifat *irreversible*. Terjadinya reaksi yang bersifat *irreversible* adalah karena ketika trigliserida telah habis, maka reaksi pembentukan produk berupa sabun dan gliserol akan berhenti. Produk yang terbentuk tidak dapat lagi kembali menjadi reaktan, sehingga proses pembentukan produk dapat maksimal. Penggunaan alkali berupa basa KOH dikarenakan garam

sabun kalium yang dihasilkan lebih mudah larut dalam air daripada garam natrium atau alkali lainnya (Yuvitasari, 2013). Pada proses tersebut, KOH dibuat berlebih sesuai dengan perhitungan trigliserida terbesar. Menurut Rachmaniah (2010) menyatakan bahwa kandungan asam lemak terbesar dalam mikroalga *Chlorella sp.* adalah asam palmitat, yaitu sebesar 76,83 %. Sehingga perhitungan untuk menentukan berat KOH yang dibutuhkan didasarkan pada berat molekul gliseril tripalmitat. KOH dibuat berlebih karena menurut Darmoyuwono (2006) apabila KOH yang digunakan dalam proses hidrolisis lebih kecil daripada jumlah komponen minyak, maka tidak semua minyak dapat tersabunkan (hidrolisis parsial) sehingga hal tersebut tentu akan mempengaruhi kuantitas produk yang dihasilkan atau dapat disebut bahwa proses penyabunan tidak maksimal. Selain itu, pemilihan metanol sebagai pelarut adalah karena metanol memiliki gugus polar dan non polar, sehingga dapat mencampurkan KOH yang bersifat polar dan minyak yang bersifat non polar. Lain dari hal tersebut karena metanol tidak lebih toksik daripada etanol yang juga mampu berperan sebagai emulsifier.

Hasil saponifikasi (garam kalium) yang larut dalam air tersebut kemudian dipisahkan dari pengotornya menggunakan corong pisah. Dalam proses pemisahan tersebut terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan organik dan lapisan air. Lapisan organik berada pada bagian atas dan lapisan air berada pada bagian bawah. Hal tersebut terjadi karena massa jenis air dengan n-heksana adalah lebih besar massa jenis air. Kemudian diambil fase air dan ditambahkan dengan H_2SO_4 1M untuk merubah garam menjadi asam lemak. Penambahan H_2SO_4 dilakukan hingga pH = 1 untuk memastikan bahwa seluruh garam yang terbentuk telah

berubah menjadi asam lemak. Reaksi yang terjadi pada saat penambahan H_2SO_4 nampak pada Gambar 4.9.



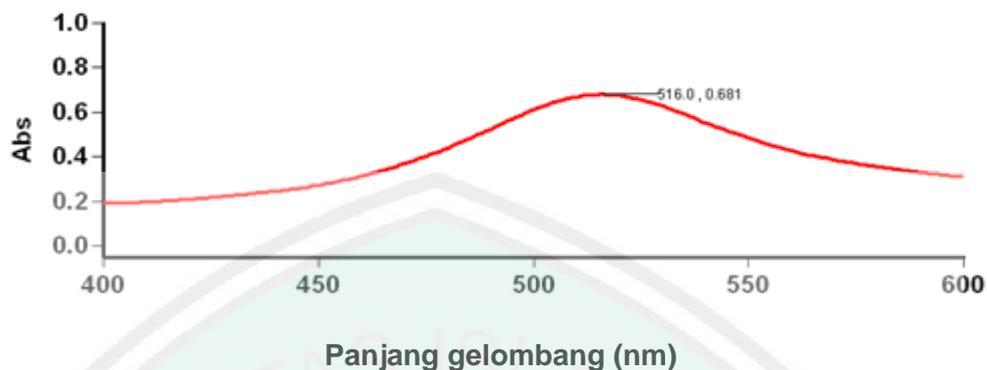
Gambar 4.9 Reaksi pembentukan asam lemak

Untuk mengekstrak atau memisahkan asam lemak dari larutan campuran, maka dilakukan pemisahan dengan penambahan n-heksana dan air sehingga terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan organik. Asam lemak bersifat non polar sehingga terlarut pada fase organik. Oleh karena itu, fase organik (bagian atas) diambil dan dilakukan penguapan n-heksana serta dilakukan pemekatan dengan dialiri gas N_2 . Menurut Silalahi (2006) menyatakan bahwa asam lemak hasil hidrolisis akan berwujud cair pada suhu kamar apabila komposisi utama asam lemak memiliki rantai karbon pendek dan medium (atom $C \leq 12$) atau yang komposisi utamanya asam lemak tidak jenuh tetapi akan berwujud padat di suhu kamar apabila komponen utamanya adalah asam lemak dengan atom $C \geq 14$ atau asam lemak jenuh.

4.9 Uji aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

4.9.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,2 mM ditunjukkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap ekstrak pekat n-heksana (minyak) dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks) larutan DPPH 0,2 mM. Tujuan dilakukannya pengukuran panjang gelombang maksimum adalah untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi sehingga diasumsikan memiliki tingkat kepekaan tertinggi dan mampu menghasilkan perubahan absorbansi terbesar pada setiap satuan konsentrasi sampel. Gambar 4.11 menunjukkan bahwa pengukuran panjang gelombang maksimum memiliki serapan tertinggi pada 516 nm dengan absorbansi sebesar 0,681. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan akan digunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

Menurut Mardiyah (2012) DPPH memiliki warna komplementer ungu karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515 – 520 nm. Ditambahkan oleh Wulansari (2011) bahwa panjang gelombang maksimum larutan DPPH adalah sebesar 516 nm. Suyoso (2011) juga menambahkan bahwa larutan DPPH memiliki serapan pada panjang

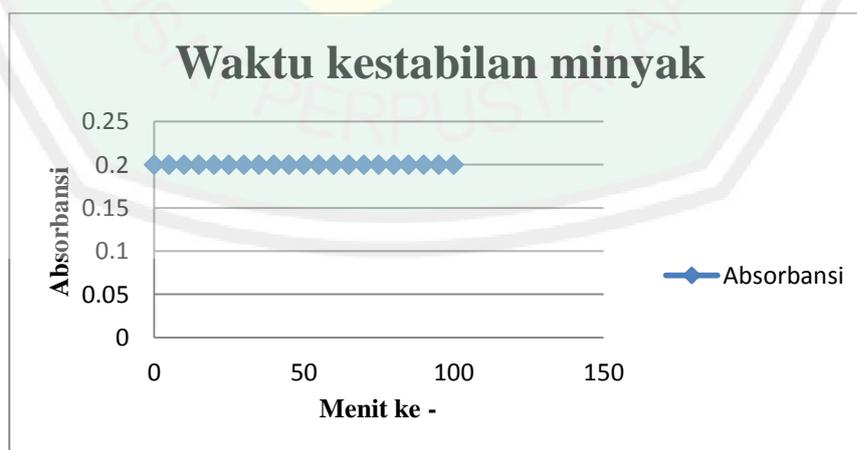
gelombang 518 nm, sama halnya dengan pengukuran panjang gelombang maksimum yang dilakukan oleh Suroso (2011). Beda halnya dengan yang dilakukan oleh Kuntorini (2010) dan Soebagio (2007), dengan panjang gelombang maksimum berturut-turut 515 dan 519 nm.

4.9.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

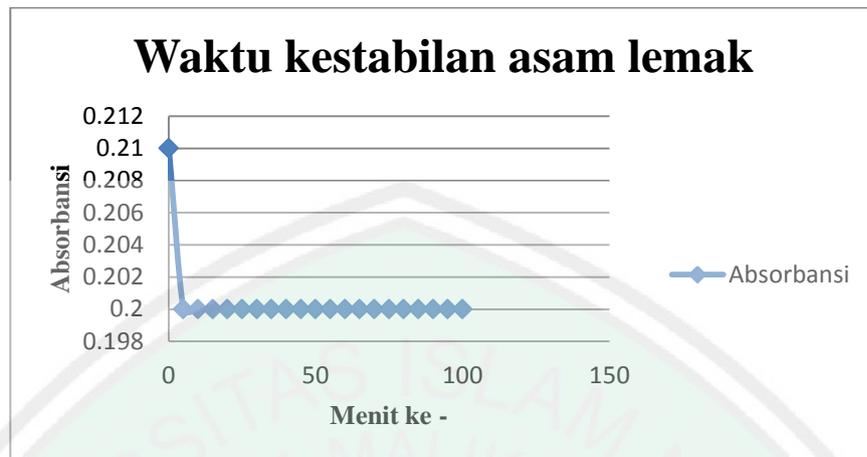
Hasil dari tahap ini berupa penentuan waktu kestabilan dari masing-masing sampel (minyak, asam lemak, BHT dan asam askorbat) ditampilkan pada Tabel 4.1 dan gambar grafik waktu kestabilan masing-masing sampel disajikan pada Gambar 4.11, Gambar 4.12, Gambar 4.13, dan Gambar 4.14.

Tabel 4.1 Waktu kestabilan masing-masing ekstrak

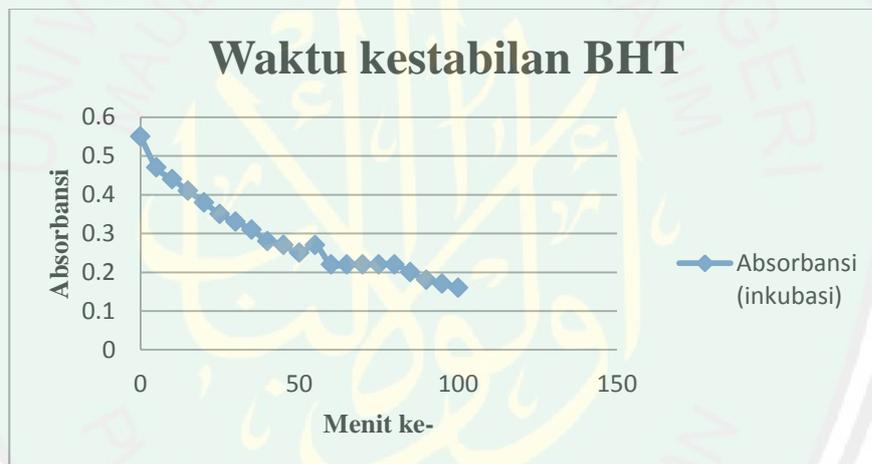
Sampel	Waktu kestabilan (Menit)
Vitamin C	0 – 100
BHT	60 – 80
Ekstrak pekat n-heksana (minyak)	0 – 100
Ekstrak asam lemak	5 – 100



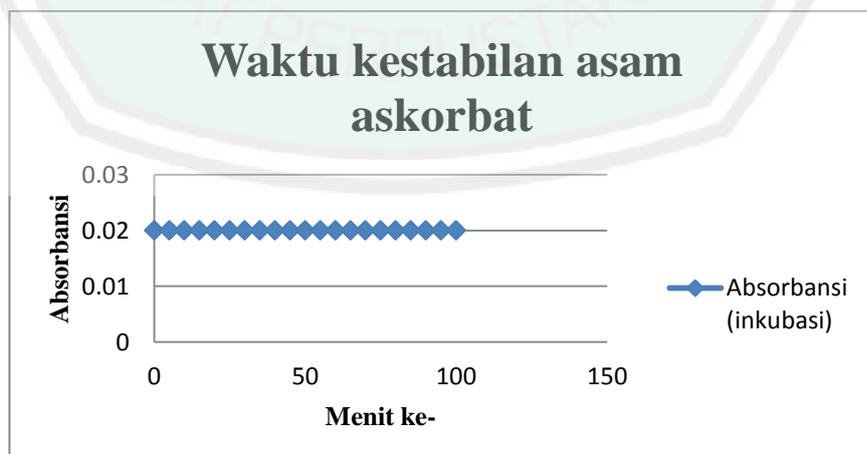
Gambar 4.11 Waktu kestabilan minyak (inkubasi 37 °C)



Gambar 4.12 Waktu kestabilan asam lemak (inkubasi 37 °C)



Gambar 4.13 Waktu kestabilan BHT (inkubasi 37 °C)



Gambar 4.14 Waktu kestabilan asam askorbat (inkubasi 37 °C)

Berdasarkan Tabel 4.1 dan Gambar 4.11 – Gambar 4.14 dapat disimpulkan bahwa waktu kestabilan setiap sampel adalah berbeda-beda, hal tersebut terjadi karena cara kerja setiap sampel terhadap radikal DPPH juga berbeda-beda. Gambar 4.11, Gambar 4.12 dan Gambar 4.14 memiliki waktu kestabilan yang relatif stabil dari awal hingga akhir pengukuran, sehingga memudahkan untuk melakukan pengujian aktivitas antioksidannya. Sedangkan pada Gambar 4.13 terus mengalami perubahan absorbansi dari waktu ke waktu, sehingga diperoleh waktu kestabilan yang relatif singkat, yaitu 20 menit. Sehingga ketika melakukan pengujian aktivitas antioksidan pada BHT harus dilakukan dengan cepat agar hasil pengukuran maksimal.

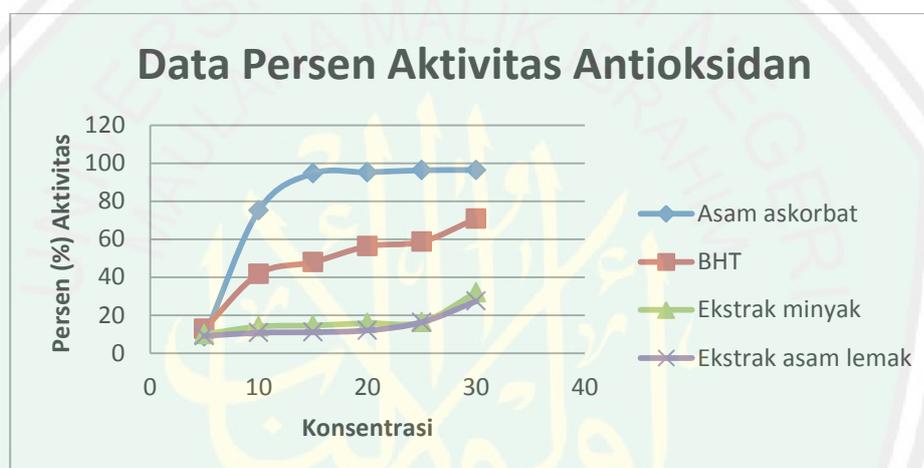
Pengukuran waktu kestabilan dilakukan untuk mengetahui waktu dimana sampel dan DPPH sudah bereaksi secara stabil yakni sepenuhnya reaksi antara sampel dan DPPH yang ditunjukkan dengan tidak adanya lagi penurunan absorbansi (Lu, dkk., 2001). Menurut Brand-William, dkk., (2001) dinyatakan bahwa setiap senyawa memiliki waktu kestabilan yang berbeda untuk dapat bereaksi secara sempurna. Sehingga penentuan waktu kestabilan masing-masing sampel sangat penting untuk dilakukan. Pengukuran ini dilakukan dengan proses inkubasi dan non inkubasi pada rentang waktu 0 – 100 menit. Pengukuran waktu kestabilan dilakukan dengan menggunakan konsentrasi tertinggi dari variasi konsentrasi yang akan dilakukan yaitu 30 ppm.

Penentuan waktu kestabilan dilakukan dengan proses inkubasi karena merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Suroso (2011), bahwa sampel yang diinkubasi akan lebih stabil dan memiliki penurunan absorbansi yang lebih

signifikan dibanding sampel yang tidak diinkubasi. Sehingga waktu kestabilan untuk masing-masing ekstrak berbeda-beda dan pengukuran aktivitas antioksidan diukur berdasarkan waktu kestabilan yang didapatkan.

4.9.3 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel

Data persen (%) aktivitas antioksidan pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditampilkan pada Gambar 4.15.



Gambar 4.15 Persen (%) aktivitas antioksidan ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

Gambar 4.15 menjelaskan bahwa % aktivitas yang tertinggi dimiliki oleh asam askorbat, kemudian disusul dengan nilai % aktivitas dari BHT, selanjutnya % aktivitas minyak dan yang terendah adalah % aktivitas asam lemak. Persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan persamaan regresi non linear dengan *GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*, sehingga didapatkan nilai EC_{50} dari masing-masing ekstrak. Nilai EC_{50} masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai EC₅₀ masing-masing ekstrak

Ekstrak	Nilai EC ₅₀ (mg/L)
Asam askorbat	8,005
BHT	16,19
Ekstrak minyak	123,8
Ekstrak asam lemak	122,4

Aktivitas antioksidan yang tersaji pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa asam lemak memiliki aktivitas antioksidan sebesar 122,4 ppm sedangkan ekstrak pekat n-heksana (diduga sebagai minyak) sebesar 123,8 ppm. EC₅₀ (*Effective concentration*) merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal sebanyak 50 %. Semakin kecil nilai EC₅₀ suatu senyawa uji maka aktivitas antioksidan senyawa tersebut adalah semakin tinggi. Dengan kata lain EC₅₀ merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menurunkan sebesar 50 % dari konsentrasi substrat (radikal DPPH), sehingga semakin kecil konsentrasi yang dibutuhkan untuk menangkai sebesar 50 % radikal DPPH, maka senyawa dinilai memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.

Perbedaan nilai EC₅₀ antara ekstrak minyak dan asam lemak tidak terlalu signifikan dan bahkan hampir sama. Hal tersebut terjadi dikarenakan masih dimungkinkan pada ekstrak pekat n-heksana masih bercampur dengan senyawa-senyawa non polar lain yang menghambat kerja minyak sebagai antioksidan. Selain itu, nilai aktivitas asam lemak yang lebih tinggi juga bisa disebabkan oleh tingginya kandungan asam lemak jenuh, seperti asam palmitat. Hal tersebut dinyatakan oleh Rachmaniah (2010) bahwa kandungan asam lemak terbesar dalam mikroalga *Chlorella sp.* adalah asam palmitat yaitu sebesar 76,83 %.

Namun nilai aktivitas asam lemak sebagai antioksidan adalah berada pada golongan sedang, karena EC_{50} berada pada kisaran 100 – 150 ppm. Pada dasarnya yang berperan sebagai antioksidan adalah asam lemak tak jenuh karena memiliki ikatan rangkap, sehingga bersifat lebih reaktif dari pada asam lemak jenuh. Sehingga dimungkinkan bahwa aktivitas asam lemak mikroalga tidak masuk dalam golongan aktivitas kuat sebagai antioksidan karena senyawa mayor dalam asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* adalah asam palmitat (asam lemak jenuh).

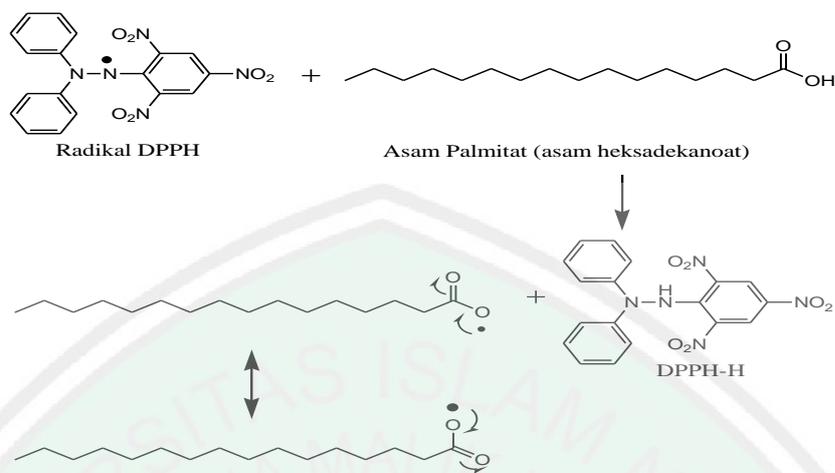
Pengukuran aktivitas antioksidan terhadap ekstrak minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dalam berbagai variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Pengukuran aktivitas dilakukan pada panjang gelombang maksimum, yaitu pada 516 nm dan pada waktu kestabilan masing-masing sampel yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya. Dalam tahap ini, digunakan kontrol untuk memberikan kestabilan pada saat pengukuran absorbansi sampel. Diimbuhkan oleh Molyneux (2003) bahwa nilai absorbansi kontrol dapat berkurang (tidak stabil) dari hari ke hari dikarenakan kehilangan aktivitasnya saat dalam stok larutan DPPH, namun nilai absorbansi kontrol tetap dapat memberikan *baseline* untuk pengukuran saat itu. Untuk menghindari terjadinya perubahan nilai yang signifikan maka dalam hal ini larutan DPPH yang digunakan selalu dalam keadaan baru (*fresh*). Kontrol yang digunakan adalah larutan DPPH 0,2 mM.

Absorbansi kontrol maupun absorbansi sampel yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan. Persen (%) aktivitas antioksidan merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Semakin tinggi

persen (%) aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen yang diberikan senyawa aktif kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) (Rahayu, dkk., 2010). Secara kualitatif, banyaknya atom hidrogen yang didonorkan oleh senyawa aktif dapat diketahui dengan terjadinya perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan terhadap sampel (minyak dan asam lemak) tidak memberikan perubahan warna DPPH menjadi kuning dan hanya memudar menjadi pink keunguan. Reaksi antara DPPH dengan asam lemak terjadi karena pada asam palmitat terdapat gugus karboksilat sehingga memiliki proton (atom H) untuk didonorkan kepada radikal DPPH.

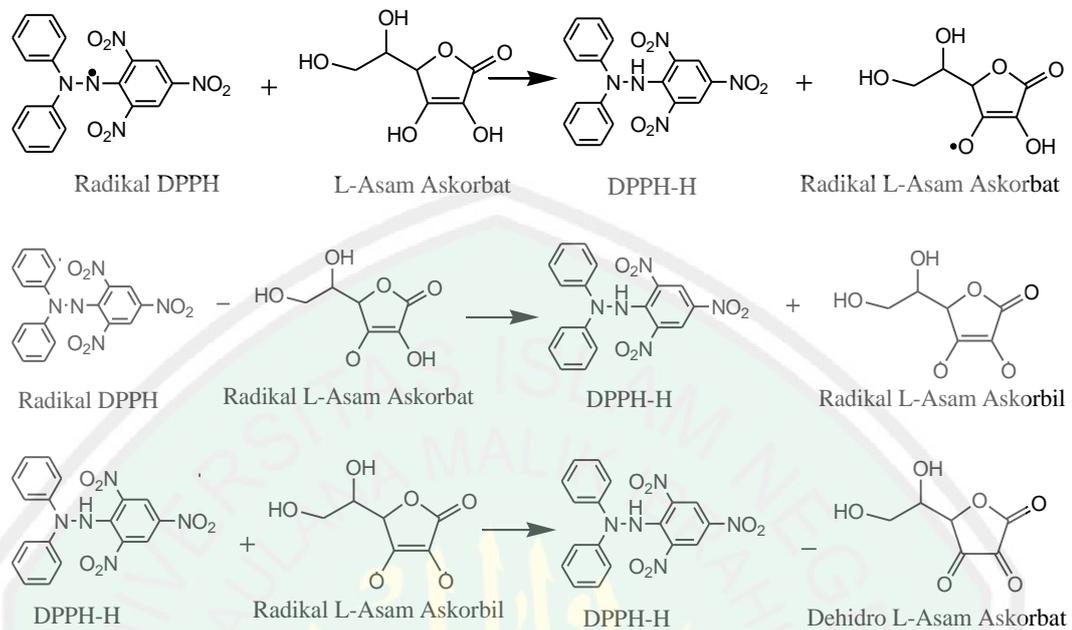
Aktivitas ekstrak minyak dan asam lemak dibandingkan dengan asam askorbat dan BHT yang merupakan jenis antioksidan dengan aktivitas yang tinggi. Dilakukan perbandingan tersebut untuk mengetahui seberapa besar potensi antioksidan dalam ekstrak jika dibandingkan dengan antioksidan sintetis yang sering digunakan. Menurut Yuliani (2010) mengenai aktivitas antioksidan, yaitu apabila % aktivitas antioksidan sampel sama atau mendekati nilai aktivitas antioksidan pembanding maka dapat dikatakan bahwa sampel berpotensi sebagai salah satu alternatif antioksidan.

Reaksi DPPH dengan asam palmitat, asam askorbat dan BHT ditunjukkan oleh Gambar 4.16, Gambar 4.17 dan Gambar 4.18.

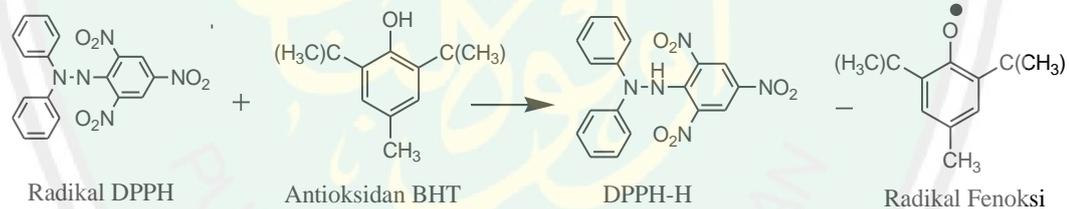


Gambar 4.16 Reaksi DPPH dengan asam palmitat

Berdasarkan Gambar 4.16 dapat terlihat bahwa atom H pada asam palmitat didonorkan kepada radikal DPPH sehingga DPPH berubah menjadi DPPH-H dan juga menghasilkan bentuk tereduksi dari asam palmitat. Prinsipnya adalah radikal yang terbentuk tidak lebih reaktif daripada radikal DPPH, sehingga mampu meredam aktivitas oksidatif dari DPPH. Sedangkan pada Gambar 4.17 dapat diketahui bahwa asam askorbat memiliki 2 atom H yang dapat didonorkan, ketika kedua atom H tersebut didonorkan, radikal asam askorbil mampu menstabilkan dirinya menjadi bentuk dehidro asam askorbat dengan cara merubah radikal pada O ikatan tunggal menjadi O ikatan rangkap. Sama halnya dengan asam askorbat, BHT juga mampu mendonorkan atom H nya untuk meredam aktivitas oksidatif. Selain itu struktur BHT juga sangat memungkinkan untuk melakukan resonansi sehingga radikal pada BHT akan cenderung lebih stabil daripada radikal DPPH.



Gambar 4.17 Reaksi asam askorbat dengan DPPH (Nishizawa, 2005 dalam Arindah, 2010)



Gambar 4.18 Reaksi BHT dengan DPPH (Brand dan William 1995 dalam Husnah 2004)

4.10 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* sebagai Antioksidan dalam Perspektif Islam

Al-Quran menyebutkan bahwa tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah Swt yang memberikan manfaat kepada manusia. Menurut ilmu pengetahuan modern, sejumlah buah-buahan dan bahkan tanaman yang dianggap liar ternyata memiliki khasiat dalam bidang farmakologi, sehingga dapat digunakan untuk mencegah berbagai macam penyakit (Mahran dan Mubasyir, 2006). Karena pada

dasarnya tidak ada kesia-siaan atas semua yang Allah ciptakan di muka bumi ini, baik itu penciptaan, manusia, hewan ataupun tumbuhan. Allah berfirman dalam surat Luqman ayat 10 :

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۚ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (Qs. Luqman:10).

Berdasarkan ayat tersebut terdapat kata “kariim” yang digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik untuk setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Menurut Savitri (2008) tumbuhan yang baik dalam hal ini adalah tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup termasuk tumbuhan yang dapat digunakan dalam pengobatan. Tumbuhan yang bermacam jenis dapat digunakan sebagai berbagai penyakit dan ini merupakan anugerah Allah Swt. yang harus dipelajari dan dimanfaatkan.

Allah menciptakan semua yang ada di dunia ini tidaklah sia-sia dari segala sesuatu yang kecil hingga yang berukuran besar dan seluruhnya yakini memiliki manfaat jika manusia mau untuk berpikir. Kurangnya rasa syukur dan keterbatasan manusia dalam berpikir dan memahami setiap penciptaan Allah di muka bumi ini menjadikan manusia menganggap bahwa segala sesuatu hanya menjadi hiasan atau bahkan dianggap sebagai pengganggu. Tidak ada nilai yang

lebih berharga yang bisa diambil dan dimanfaatkan untuk kemaslahatan kehidupan manusia di dunia ini. Al Qur'an memang tidak menjelaskan secara detail manfaat dari setiap penciptaan Allah karena Allah menginginkan makhluk-Nya untuk berfikir. Manusia yang diciptakan sebagai khalifah di bumi ini mempunyai tugas untuk berfikir, mengkaji, dan mengembangkan penelitian agar mendapatkan manfaat dari hasil penciptaan-Nya tersebut.

Dari Ibnu Mas'ud , bahwa Rasulullah bersabda:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمُهُ وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ

“Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa mengetahuinya.” (HR. Ahmad, Ibnu Majah, dan Al-Hakim, beliau menshahihkannya dan disepakati oleh Adz-Dzahabi. Al-Bushiri menshahihkan hadits ini dalam Zawa'id-nya).

Hadits tersebut menunjukkan bahwa Allah Maha Adil dengan cara menurunkan suatu penyakit beserta obatnya, namun hal tersebut dapat diketahui manusia dengan adanya ilmu pengetahuan. Ilmu pengetahuan akan menuntun manusia untuk menemukan obat-obatan dari segala sesuatu yang telah diciptakan Allah di bumi. Jika manusia tidak berfikir dan mengembangkan ilmu pengetahuan maka manusia tidak akan pernah tahu bahwa Allah telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat alami (herbal), salah satunya adalah antioksidan, karena antioksidan mampu menangkal radikal bebas yang dapat menimbulkan berbagai macam penyakit degeneratif.

Allah berfirman dalam surat Al Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”.(Qs. *al Qamar: 49*).

Berdasarkan kepada ayat tersebut, diketahui bahwa segala sesuatu yang telah diciptakan oleh-Nya memiliki kapasitas/ukuran dalam hal-hal tertentu. Hal tersebut tentunya sejalan dengan ungkapan bahwa ”setiap yang dicipta memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing”. Berdasar pada penjelasan dari surat Al Qamar ayat 49 tersebut, didapatkan ukuran/kapasitas antioksidan minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* yaitu dengan nilai EC₅₀ secara berturut-turut sebesar 123,8 dan 122,4 ppm. Pengertiannya bahwa minyak dan asam lemak *Chlorella sp.* mampu berperan sebagai antioksidan dengan kapasitas sedang. Dikatakan aktivitasnya bernilai sedang sebagai antioksidan karena memiliki nilai EC₅₀ antara 100 – 150 ppm.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Aktivitas antioksidan dari ekstrak minyak dan asam lemak terhadap radikal DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) tergolong sedang karena nilai EC₅₀ berada di kisaran 100 – 150 ppm.

1. Aktivitas antioksidan ekstrak minyak hasil ekstraksi *Soxhlet* memiliki nilai EC₅₀ sebesar 123,8 ppm.
2. Aktivitas antioksidan asam lemak hasil hidrolisis dari minyak mikroalga *Chlorella sp.* memiliki nilai EC₅₀ sebesar 122,4 ppm.

5.2 Saran

Adapun saran dari peneliti yaitu agar pada penelitian selanjutnya digunakan pelarut non polar lainnya, seperti petroleum eter dalam proses ekstraksi. Selain itu agar dilakukan pemisahan asam-asam lemak dengan KLT-P dan diujikan aktivitas antioksidan masing-masing asam lemaknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, SS. 1992. *Teknik Kimia Organik*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Agustini, N.W.S., Dwi S., dan I.N.K Kabinawa. 2008. *Produksi Biomassa Mikroalga dalam Skala Rumah Kaca*. Penelitian Teknologi Kultur Mikroalga.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum Muricatum aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Arlyza, I.S. 2005. Phycocianin dari Mikroalga Bernilai Ekonomis Tinggi sebagai Produk Industri. *Oseana*, XXX (3): 27-36.
- Bariyyah, S. Khairul. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ben-Amotz; Fishler dan Schneller. 1987. Chemical Composition of Dietary Species of Marine Unicellular Algae and Rotifers with Emphasis on Fatty Acid. *Marine Biology*, 95: 31-36.
- Benedetti, S., F. Benvenuti, S. Paglianari, S. Francogli, S. Scoglio and F. Canestrari. 2004. *Antioxidant Properties of a Novel Phycocianin Extract from the Blue-Green Alga Aphanizomenon flosaquae*. *Life Sciences*, LXXV: 2353-2362.
- Bennion. 1980. *The Science of Food*. New York: John Willey & Sons.
- Brand-Williams, W. 2001. *Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity*. *Lebensmettel – Wissenschaft and Technologie*. Dalam Ratmo. 2007. Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocotum*) sebagai Antioksidan. www.kimiabrawijaya.ac.id.
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai Khasiat dan Teknologi*. Bandung : Bumi Aksara.
- Chalid, S.Y., Sri A., dan Suci D.L. 2012. Kultivasi *Chlorella sp.* pada Media Tumbuh yang Diperkaya dengan Pupuk Anorganik dan *Soil Extract*. *Valensi*, I (6): 298-304.

- Darusman L.K., Sajuthi D., Sutriah K., dan Pamungkas D. 1995. Ekstraksi Komponen Bioaktif sebagai Bahan Obat dari Karang-karangan, Bunga Karang, dan Ganggang di Perairan P. Pari Kepulauan Seribu. *Laporan Penelitian*. Bogor: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Darusman L.K., Sajuthi D., Sutriah K., Pamungkas D. 1995. Ekstraksi Komponen Bioaktif sebagai Bahan Obat dari Karang-karangan, Bunga Karang, dan Ganggang di Perairan P. Pari Kepulauan Seribu. *Laporan Penelitian*. Bogor: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Dehpour A.A., Ebrahimzadeh M.A., Fazel N.S., dan Mohammad N.S. 2009. Antioxidant Activity of Methanol Extract of Ferula Assafoetida and Its Essential Oil Composition. *Grasas Aceites*, 60(4) : 405-412.
- Destiana, M., Zandi A.N., dan Puspasari, S. 2007. *Fisiologi Lingkungan Tanaman*. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada.
- De La Noue dan De Pauw. 1988. *The Potential of Microalgal Biotechnology : A Review of Production and Uses of Microalgae*. *Journal of Biotechnology Advances*, VI.
- Fachrullah, M.R.. 2011. Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis *Chlorella sp.* dan *Nannochloropsis sp.* yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil Penambangan Timah di Pulau Bangka. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor
- Fasya, A.Ghanaim. 2011. Sintesis Metil 10, 12, 14-oktadekatrienoat Dari (Asam α -linoleat) Biji Selasih (*Ocimum basilicum*) dan Uji Bioaktifitasnya. *Thesis*: Universitas Brawijaya: Malang.
- Fessenden, RJ, dan Fessenden JS. 1986. *Kimia Organik Cetakan Ketiga*. Pudjaatmaka AH, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Organic chemistry, Third Edition*.
- Gordon, M.H 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro*. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. London: Elsevier Applied Science.
- Hamilton, R.J and J.C. Allen. 1994. *Rancidity in Foods*. London: Blackie Academic and Professional.
- Harborne, JB.. 1987. *Metode fitokimia Edisi Kedua*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

- Hariyadi, Purwiyanto., Saptawati, B., Rachmat, S., dan Made, A. 2010. *Sterilisasi UHT dan Pengemasan Aseptik*. Yayasan Penerbitan Ikatan Dokter Indonesia (IDI). ISBN 978-979-1209-14-4.
- Herbert RB. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder*. Bambang Srigandono, penerjemah. Edisi kedua. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Houghton P.J., Raman A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman and Hall.
- Husnah, M.. 2009. Identifikasi dan Uji Aktivitas Golongan Senyawa Antioksidan Ekstrak Kasar Buah Pepino (*Solanum muricatum aiton*) Berdasarkan Variasi Pelarut. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Malang.
- Ismail, M., Abdalbasit, M., Gururaj, B., dan Hoe, S.L. 2010. Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of Oils From Two Cultivars of Cantaloupe Extracted by Supercritical Fluid Extraction. University Putra-Malaysia. ISSN 0017-3495.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuti. 1995. *Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Julyasih, S.M, I.G.P Wirawan, W.S. Harijani, W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (*Seaweeds*) Komersial di Bali. *Seminar Nasional*. Fakultas Pertanian dan LPPM UPN "Veteran" Jawa Timur.
- Kartika, Unoviana. 2013. Penderita Kanker Di Indonesia Meningkat. *Harian Kompas* 21 Maret.
- Katili, dan Vicky Rizky Affandi. 2012. Komposisi Asam Lemak Mikroalga Jenis *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira sp.*, dan *Chaetoceros gracilis*. *Skripsi*: Institut Pertanian Bogor.
- Kawaroe, M., Ayi R., dan Abdul H. 2010. Laju Pertumbuhan Spesifik *Chlorella sp.* dan *Dunaliella sp.* Berdasarkan Perbedaan Nutrien Dan Fotoperiode. *Jilid 16, Nomor 1*: 73-77.
- Kawaroe, M., Tri P., Ayi R., Dahlia W.S., dan Dina A 2012. Optimalisasi Seleksi Spesies Mikroalga Potensial Penghasil Minyak Mikroalga Untuk Menunjang Kelayakan Ekonomi Produksi Biodiesel. Bogor : Pusat Penelitian Surfaktan dan Bioenergi LPPM IPB. EN-7.
- Khopkar, S.M.. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

- Kuncahyo, I dan Sunardi. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*, L.) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH). Seminar Nasional Teknologi : E-1 - E-9.
- Kuntorini, E.M. dan M.D. Astuti. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine americana* Merr.). *Sains dan Terapan Kimia*, IV (1): 15-22.
- Kusmiati, N.W.S., S.R. Agustini, Tamat, dan I. Mellia. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyreniodosa* Galur Lokal Ink. *Kimia Indonesia*, V (1): 30-34.
- Manik, Juwita. 2011. Karakterisasi Simplisia dan Skrining Fitokimia serta Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *n*-Heksan Etilasetat dan Etanol Rumpun Laut *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Makareviciene, V., Andruleviciute, V., Skoruskaite, V., dan Kasperoviciene, J. 2011. *Cultivation of Microalgae Chlorella sp. and Scenedesmus sp. as a Potential Biofuel Feedstock. Environmental Research, Engineering and Management*. LVII (3): 21-27.
- Maulana, A.I. 2010. Pengaruh Ekstrak Tauge (*Phaseolus Radiatus*) terhadap Kerusakan Sel Ginjal Mencit (*Mus Musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Semarang : Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret.
- Miranda, M.S., R.G. Cintra, S.B.M. Barros and J. Mancini-Filho. 1998. *Antioxidant Activity of the Microalga Spirulina maxima. Brazilian Medical and Biological Research*, XXXI: 1075-1079.
- Mohammad, J. 2007. Produksi dan Karakterisasi Biopigmen Fikosianin dari *Spirulina fusiformis* serta Aplikasinya sebagai Pewarna Minuman. *Thesis* Tidak Diterbitkan. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Institut Pertanian Bogor
- Molyneux, P.. 2003. *The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for Estimating Antioxidant Activity. Science and Technology*, XXVI (2) : 211-219.
- Nur M.A, dan Adijuwana H.A. 1989. *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor.
- Nurhasanah. 2003. *Skripsi* Hidrolisis dan Rekonstruksi Triglicerida. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

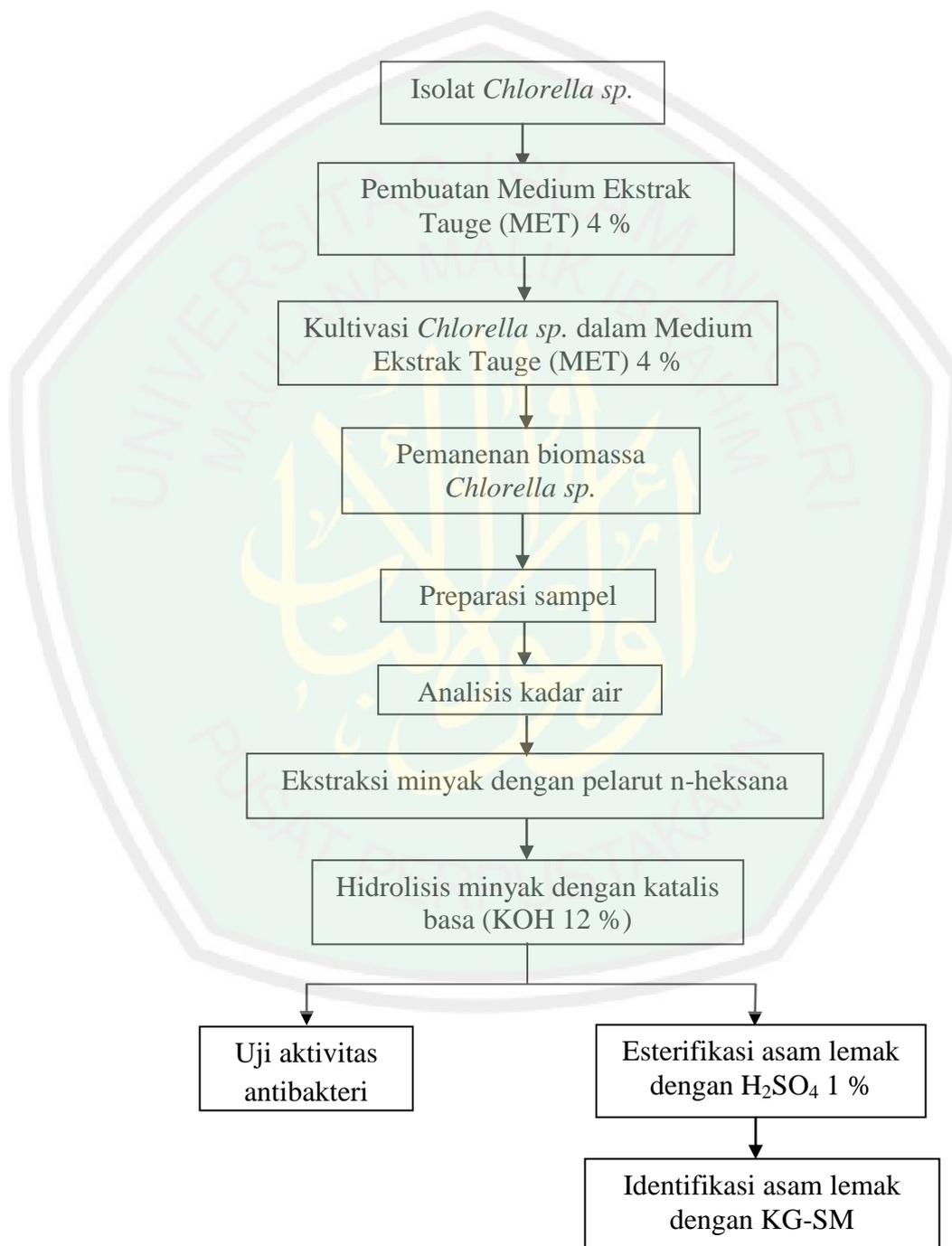
- Orhan, I., Berrin O., dan Bilge S. 2009. Evaluation Of Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Antioxidant Potentials of Some Edible Oils and Fatty Acid Profiles. Turkey: Department of Pharmacognosy - Gazi University.
- Parwata, I.M.O.A., Wiwik, S.R. dan Raditya, Y. 2009. Isolasi dan Uji Anti Radikal Bebas Minyak Atsiri pada Daun Sirih (*Piper betle*, Linn) secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak. *Jurnal Kimia*. III (1): 7-13.
- Persagi (Persatuan Ahli Gizi Indonesia). 2009. *Tabel Komposisi Pangan Indonesia*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Poedjiadi, Anna. 1994. Dasar-dasar Biokimia. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Prabowo, D.A. 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella sp.* pada Skala Laboratorium. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pranayogi, D. 2003. *Studi Potensi Pigmen Klorofil dan Karotenoid dari Mikroalga Jenis Chlophyceae*. Lampung: Universitas Lampung.
- Pratiwi, D.P., dan Harapini M.. 2006. Nilai Peroksida dan Aktivitas Anti Radikal Bebas *Diphenyl Picril Hydrazil Hydrate* (DPPH) Ekstrak Methanol *Knema laurina*. *Majalah Farmasi Indonesia*, XVII (1): 32-36.
- Pratt, D.E. 1992. *Natural Antioxidants From Plant Material*. Di dalam: M.T. Huang, C.T. Ho, dan C.Y. Lee, editor. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health H. American Society: Washington DC.
- Pratt D.E., dan Hudson B.J.F.. 1990. *Natural Antioxidant not Exploited Comercially. Food Antioxidant*. London: Elvisier Applied Science.
- Prihantini, N.H, Putri B., dan Yuliati R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains*, IX (1): 1-6.
- Putra, D.A.D. 2012. Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Bunga Tahi Ayam (*Tagetes Erecta* L.) serta Uji Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Universitas Sumatera Utara.
- Rachmaniah, O., Reni D.S., dan Lailatul M. 2010. *Seminar Pemilihan Metod Ekstraksi Minyak Alga Dari Chlorella sp. dan Prediksinya Sebagai Biodiesel*. Surabaya : Institut Teknologi Sepuluh November.

- Rahayu, D.S, dkk. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) dengan Metode 1,1 difenil 2 Pikrilhidrazil (DPPH). Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.
- Renaud, S.M., Thinh, L., dan Parry, L.D. 1994. *Microalgae for Use in Tropical Aquaculture I: Gross Chemical and Fatty Acid Composition of Twelve of Microalgae from The Northern Territory, Australia. Journal of Applied Phycology*. Volume 6:337-345.
- Rohman, A., Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). *Agritech*, XXV (3): 131-136.
- Romimohtarto, K.. 2004. *Meroplankton Laut*. Jakarta : Penerbit Djambatan.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. *Karya Ilmiah*. UNPAD.
- Saadudin, E., Fitri, S., dan Wargadalam, V. 2011. Karakteristik Asam Lemak Mikroalga untuk Produksi Biodiesel. *Ketenagalistrikan dan Energi Terbarukan*, X (2): 131-140.
- Sachlan, M.. 1982. *Planktonologi*. Semarang: UNDP FAO.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Malang Press.
- Setyowati, S. 2009. *Unit Corn Mill*. http://www.chem-is-try.org/materi_kimia/kimia-industri/teknologi-proses/unit-corn-mill/. Diakses tanggal 10 Januari 2014.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Quran Volume 7*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sidabutar, E.A.. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor.
- Suroso, B.C.H. 2007. Uji Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Aktif pada Ekstrak Tanaman Ating-anting (*Achalypha indica* L.). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Suseela, M.R. and Toppo. 2006. *Haematococcus pluvialis – A Green Alga, Richest Natural Source of Astaxantin*. *Current Science*, XC (12).
- Tapan E.. 2005. *Kanker, Antioksidan, dan Terapi Komplementer*. Jakarta: PT Gramedia.
- Tuminah S. 2000. Radikal Bebas dan Antioksidan Kaitannya dengan Nutrisi dan Penyakit Kronik. *Cermin Dunia Kedokteran*, 128: 49-51.
- Vonshak, A. 1990. *Recent Advances in Microalgal Biotechnology*. *Biotechnology adv*, VIII.
- Wang, Y., Da Sun, Hao C., Lisheng, Q., dan Ping X. 2011. Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of Tea (*Camellia sinensis* L.) Seed Oil Extracted by Optimized Supercritical Carbon Dioxide. Hangzhou-China. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067.
- Winarno, F.G. 1986. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia.
- Winarno, F.G, Fardias D., dan Fardias S. 1973. *Ekstraksi, Kromatografi dan Elektroforesis*. Bogor : Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Winarsi, H.. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Wulandari, A.P., Frida N., Annisa E.P., dan Dilaekha R.P. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi*, V.
- Yudha, A.P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Yudiati, E., Sri S., Sunarsih dan Rani A.. 2011. Aktifitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina sp.* *Ilmu Kelautan*, XVI (4) : 187 – 192.
- Yuvitasari, Yova. 2013. Laporan Praktikum Saponifikasi. Diakses pada tanggal 10 juni 2014.

LAMPIRAN

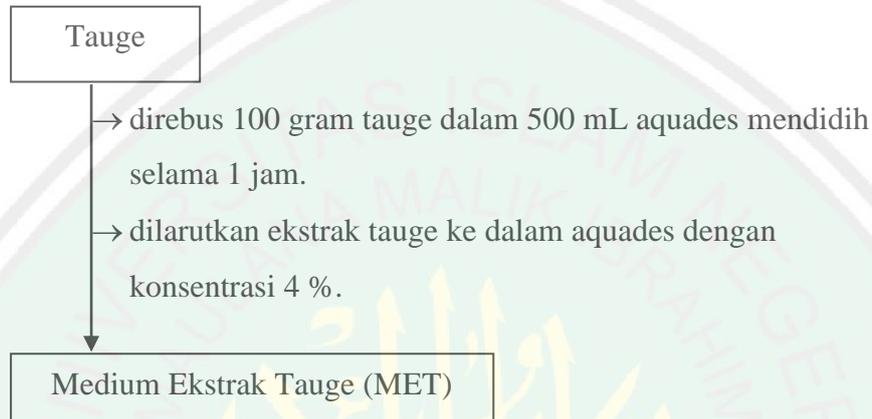
Lampiran 1. Tahapan Penelitian



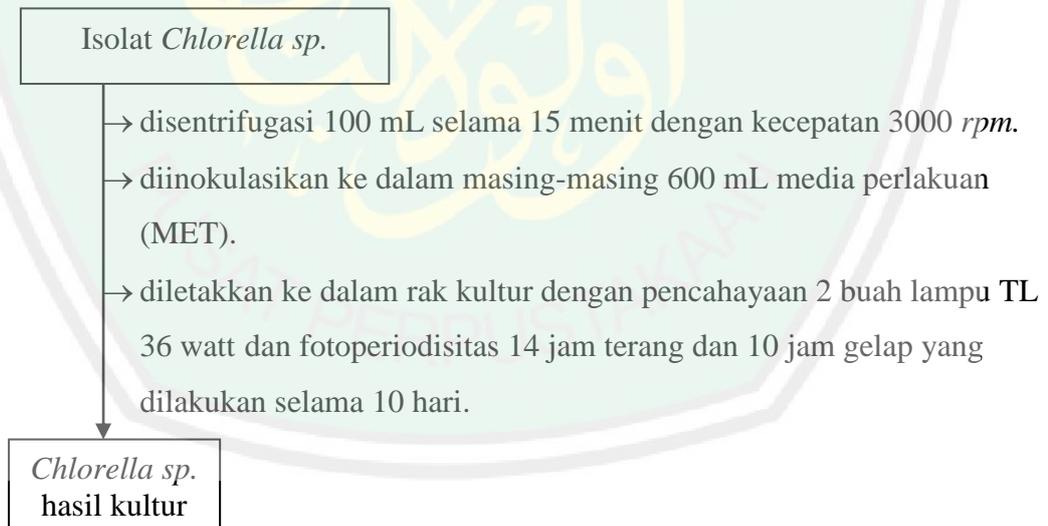
Lampiran 2. Skema Kerja

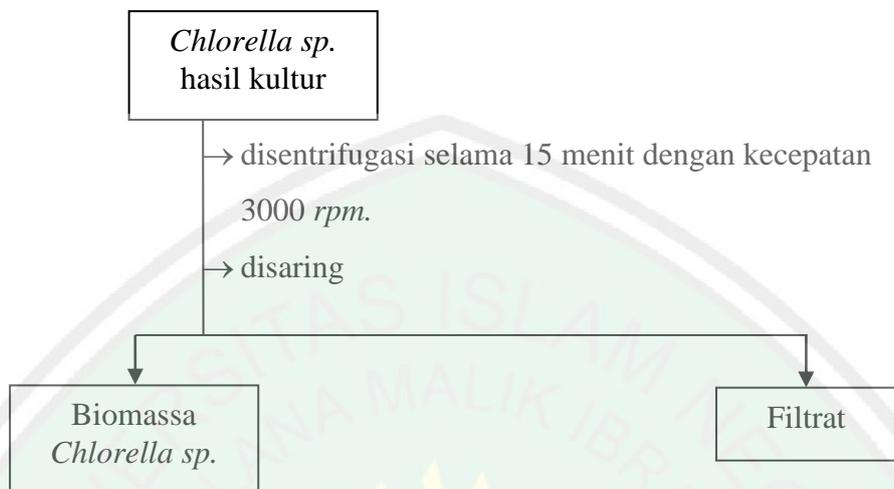
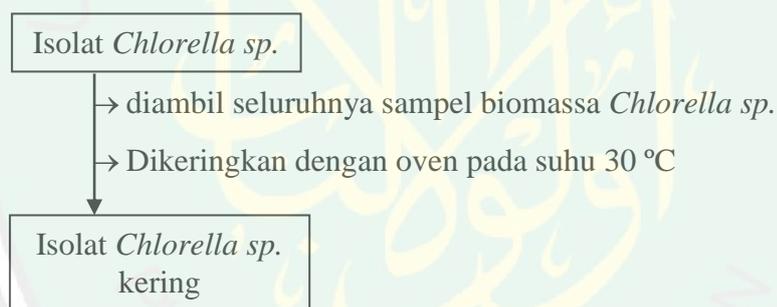
1. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

a. Pembuatan Medium Ekstraksi Tauge (MET)

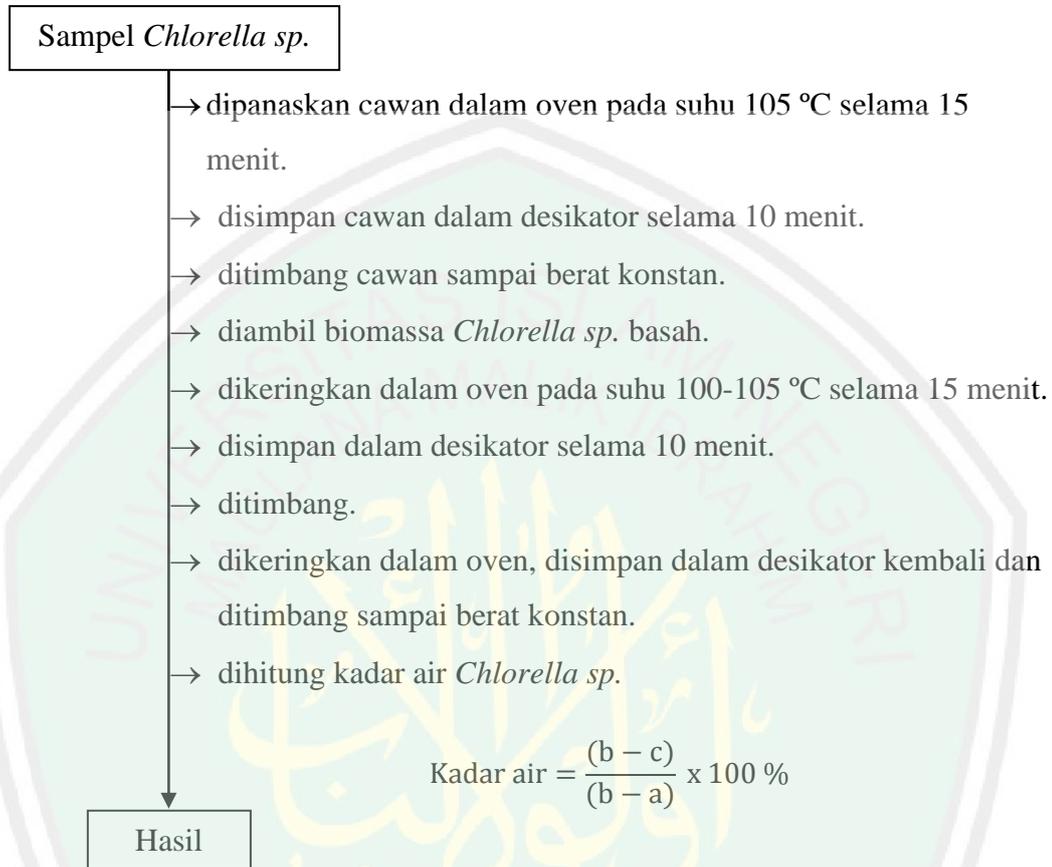


b. Kultivasi *Chlorella sp.* pada MET

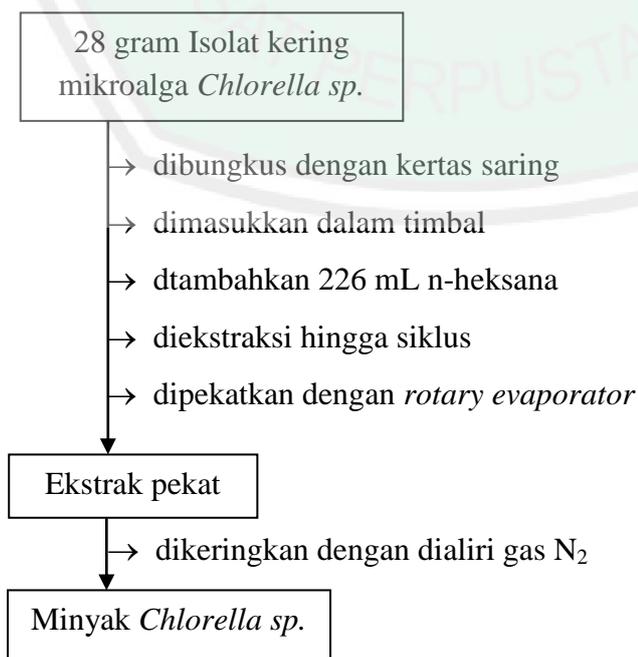


c. Pemanenan *Chlorella sp.***2. Preparasi Sampel**

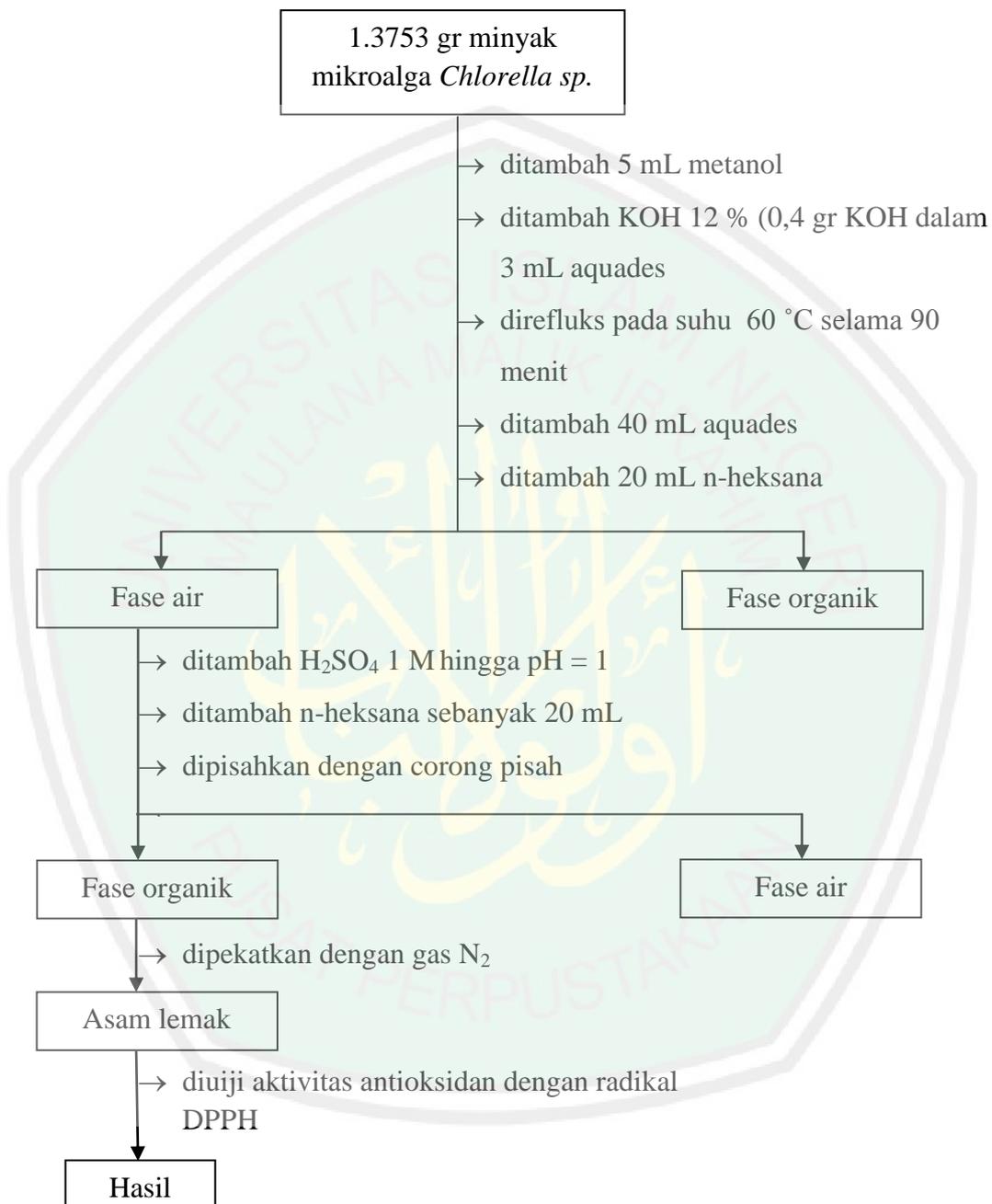
3. Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*



4. Ekstraksi Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*



5. Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*



6. Uji Aktivitas Antioksidan

A) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan DPPH 0,5 mM

- diambil sebanyak 2,25 mL
- ditambahkan etanol 6,75 mL
- dimasukkan dalam kuvet
- diukur panjang gelombang maksimum dengan spektrometer UV-Vis

Hasil

B) Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Larutan Ekstrak

- dibuat larutan ekstrak 30 ppm sebanyak 50 mL
- diambil sebanyak 6,75 mL
- ditambah larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL
- dicari waktu kestabilan setelah inkubasi dan sebelum inkubasi pada rentangan waktu 5 – 100 menit dengan interval 5 menit
- diukur pada λ_{maks} yang didapatkan

Hasil

C) Absorbansi Kontrol

Larutan DPPH 0,2 mL

- diambil 2,25 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan n-heksana 6,75 mL
- diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan
- dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh
- diukur pada λ_{maks} yang didapatkan dengan spektrofotometer UV-Vis

Hasil

D) Aktivitas antioksidan Asam Lemak *Chlorella sp.*

Asam lemak

- dilarutkan dalam etanol dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm
- disiapkan tiga tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi
- dimasukkan 6,75 ml larutan sampel ke dalam tiap tabung reaksi
- ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL
- diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan
- dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh
- diukur pada λ_{maks} yang didapatkan
- dilakukan cara yang sama untuk pembandingan BHT dan vitamin C
- dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya dengan persamaan :

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \left(\frac{\text{Absorbansi control} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi control}} \right) \times 100\%$$

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Kadar Air

- **Kadar Air Sampel Setelah Dioven**

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar Air} &= \frac{59,0767 \text{ gram} - 58,9944 \text{ gram}}{59,0767 \text{ gram} - 58,0765 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0823 \text{ gram}}{1 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 8,23 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Faktor Koreksi} &= \frac{100}{100 - 8,23} \\ &= 1,0896 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar Air Terkoreksi} &= 8,23 \% - 1,0896 \% \\ &= 7,1404 \%\end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Ekstrak

- Rendemen Minyak

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen Minyak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Awal Sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,5543 \text{ g}}{18,52 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 8,3896 \text{ b/b}\end{aligned}$$

- Rendemen Asam Lemak

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen Asam Lemak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Awal Sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,5914 \text{ g}}{1,2502 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 47,30 \text{ b/b}\end{aligned}$$

Lampiran 5. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

Perhitungan hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* didasarkan pada literatur (Rachmaniah, dkk., 2010) yang menyebutkan bahwa kandungan asam lemak terbesar dalam *Chlorella sp.* adalah asam palmitat sehingga diasumsikan bahwa minyak *Chlorella sp.* merupakan trigliseril palmitat.

1. Pembuatan KOH 12 %

$$\text{Sampel minyak} = 1,5543 \text{ g}$$

$$\text{Mol trigliseril palmitat} = \frac{1,5543 \text{ g}}{807,32 \text{ g/mol}} = 0,001925 \text{ mol}$$

- Mol KOH yang dibutuhkan untuk tepat bereaksi

$$\text{Mol KOH} = 3 \times 0,001925 \text{ mol}$$

$$= 0,005775 \text{ mol}$$

- KOH dibuat berlebih 1,25 x

$$\text{Mol KOH} = 1,25 \times 0,005775 \text{ mol}$$

$$= 0,007219 \text{ mol}$$

$$\text{Massa KOH} = 0,007219 \text{ mol} \times 55,97 \text{ g/mol}$$

$$= 0,404 \approx 0,4 \text{ g}$$

- 12 % KOH

$$\frac{12}{100} = \frac{0,4}{x}$$

$$12x = 40$$

$$x = 3,33 \text{ mL aquades}$$

Cara pembuatan larutan KOH 12 % adalah ditimbang KOH sebanyak 0,4 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 25 mL. Kemudian ditambahkan 3,33 mL aquades dengan pipet ukur 5. Diaduk hingga homogen (KOH larut sempurna dalam aquades).

2. Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1M

$$\text{Larutan stok H}_2\text{SO}_4 = 98 \%$$

$$\text{Densitas H}_2\text{SO}_4 = 1,8 \text{ Kg/L}$$

$$\text{Mr H}_2\text{SO}_4 = 98 \text{ g/mol}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Massa H}_2\text{SO}_4 &= \rho \times V \\
 &= 1,8 \text{ Kg/L} \times 98 \% \\
 &= 1,764 \text{ Kg} \\
 &= 1.764 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Mol H}_2\text{SO}_4 &= \frac{g \text{ H}_2\text{SO}_4}{mr \text{ H}_2\text{SO}_4} \\
 &= \frac{1.764 \text{ g}}{98 \text{ g/mol}} \\
 &= 18 \text{ mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{M H}_2\text{SO}_4 &= \frac{\text{mol}}{V} \\
 &= \frac{18 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \\
 &= 18 \text{ M}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{M}_1 \times \text{V}_1 &= \text{M}_2 \times \text{V}_2 \\
 18 \text{ M} \times \text{V}_1 &= 1 \text{ M} \times 0,025 \text{ L} \\
 \text{V}_1 &= 0,001 \text{ L} \\
 &= 1 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan H_2SO_4 1 M adalah dipipet larutan H_2SO_4 pekat 98 % sebanyak 1 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 25 mL yang berisi \pm 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

3. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Volume = 600 mL

$$\text{MET 4 \%} = \frac{24 \text{ mL ekstrak tauge}}{600 \text{ mL larutan}}$$

Cara pembuatannya yaitu ekstrak tauge sebanyak 24 mL dimasukkan dalam erlenmeyer 1000 mL, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 576 mL.

4. Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam 50 mL etanol (95 %)

$$\begin{aligned}\text{Mr DPPH} &= 394,33 \text{ g/mol} \\ &= 394,33 \text{ mg/mmol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol DPPH} &= 50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM} \\ &= 50 \text{ mL} \times \frac{0,2}{1000} \text{ M} \\ &= 0,01 \text{ mmol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{mg DPPH} &= 0,01 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH} \\ &= 0,01 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ mg/mmol} \\ &= 3,9433 \text{ mg}\end{aligned}$$

5. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak (% b/v)

➤ Pembuatan Larutan Stok 100 ppm sebanyak 50 mL

$$100 \text{ ppm (mg/L)} = \frac{\text{Berat Sampel (mg)}}{0,05 \text{ L}}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat sampel} &= 100 \text{ ppm} \times 0,05 \text{ L} \\ &= 5 \text{ mg}\end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 50 mL larutan sampel 100 ppm diperlukan ekstrak seberat 5 mg. Untuk membuat larutan stok 100 mL, dilakukan pelarutan sebanyak 5 mg ekstrak ke dalam labu ukur 50 mL dan ditanda bataskan dengan etanol.

➤ Pembuatan Larutan Sampel 30 ppm dari larutan stok

$$V_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ Pembuatan Larutan Sampel 25 ppm

$$V_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 6,25 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 25 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 6,25 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 20 ppm**

$$V_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 20 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 5 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 15 ppm**

$$V_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 15 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 3,75 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 15 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 3,75 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 10 ppm**

$$V_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 2,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 10 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 2,5 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 5 ppm**

$$V_2 = \frac{25 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 1,25 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 5 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 1,25 mL.

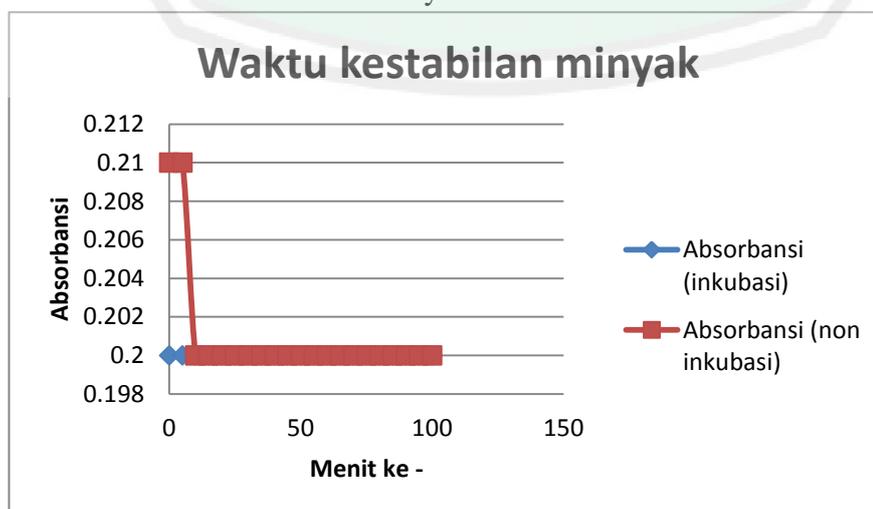
Lampiran 6. Data Uji Aktivitas Antioksidan

1. Penentuan waktu kestabilan

a) Waktu kestabilan Ekstrak n-heksana (minyak)

Menit	Absorbansi (inkubasi)	Absorbansi (non inkubasi)
0	0.2	0.21
5	0.2	0.21
10	0.2	0.2
15	0.2	0.2
20	0.2	0.2
25	0.2	0.2
30	0.2	0.2
35	0.2	0.2
40	0.2	0.2
45	0.2	0.2
50	0.2	0.2
55	0.2	0.2
60	0.2	0.2
65	0.2	0.2
70	0.2	0.2
75	0.2	0.2
80	0.2	0.2
85	0.2	0.2
90	0.2	0.2
95	0.2	0.2
100	0.2	0.2

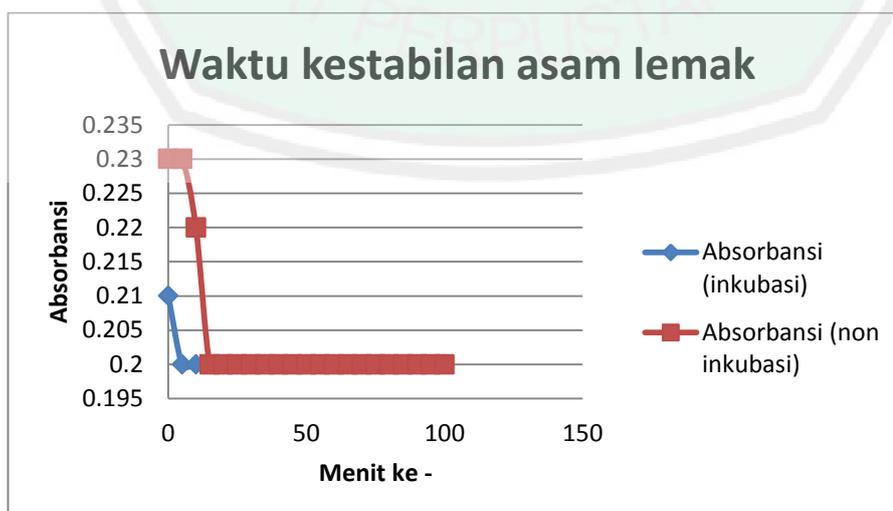
Grafik 1. Waktu kestabilan minyak dalam etanol



b) Waktu kestabilan ekstrak asam lemak

Menit	Absorbansi (inkubasi)	Absorbansi (non inkubasi)
0	0.21	0.23
5	0.2	0.23
10	0.2	0.22
15	0.2	0.2
20	0.2	0.2
25	0.2	0.2
30	0.2	0.2
35	0.2	0.2
40	0.2	0.2
45	0.2	0.2
50	0.2	0.2
55	0.2	0.2
60	0.2	0.2
65	0.2	0.2
70	0.2	0.2
75	0.2	0.2
80	0.2	0.2
85	0.2	0.2
90	0.2	0.2
95	0.2	0.2
100	0.2	0.2

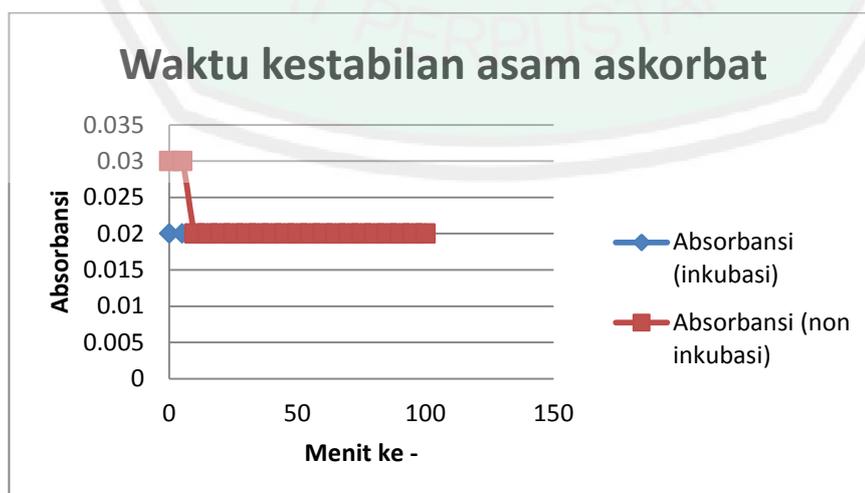
Grafik 2. Waktu kestabilan ekstrak asam lemak



c) Waktu kestabilan asam askorbat

Menit	Absorbansi (inkubasi)	Absorbansi (non inkubasi)
0	0.02	0.03
5	0.02	0.03
10	0.02	0.02
15	0.02	0.02
20	0.02	0.02
25	0.02	0.02
30	0.02	0.02
35	0.02	0.02
40	0.02	0.02
45	0.02	0.02
50	0.02	0.02
55	0.02	0.02
60	0.02	0.02
65	0.02	0.02
70	0.02	0.02
75	0.02	0.02
80	0.02	0.02
85	0.02	0.02
90	0.02	0.02
95	0.02	0.02
100	0.02	0.02

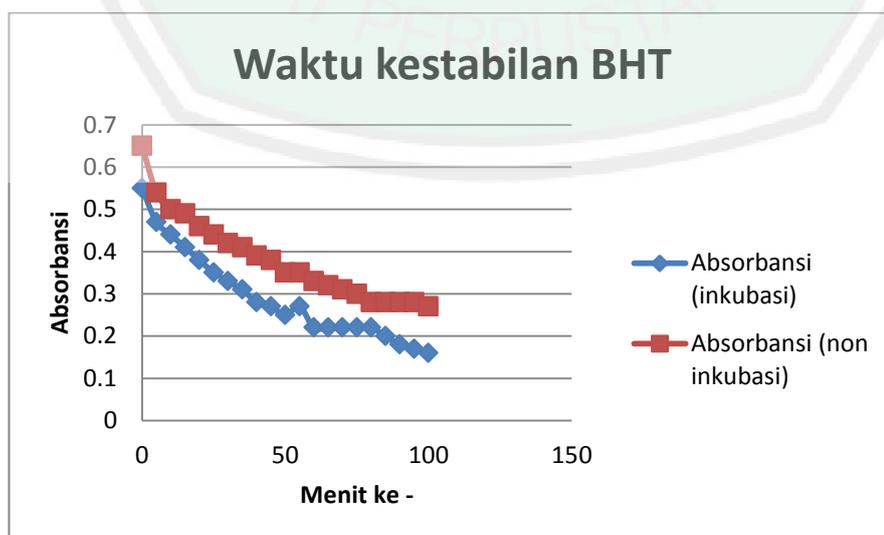
Grafik 3. Waktu kestabilan asam askorbat



d) Waktu kestabilan BHT

Menit	Absorbansi (inkubasi)	Absorbansi (non inkubasi)
0	0.55	0.65
5	0.47	0.54
10	0.44	0.5
15	0.41	0.49
20	0.38	0.46
25	0.35	0.44
30	0.33	0.42
35	0.31	0.41
40	0.28	0.39
45	0.27	0.38
50	0.25	0.35
55	0.27	0.35
60	0.22	0.33
65	0.22	0.32
70	0.22	0.31
75	0.22	0.3
80	0.22	0.28
85	0.2	0.28
90	0.18	0.28
95	0.17	0.28
100	0.16	0.27

Grafik 4. Waktu kestabilan BHT



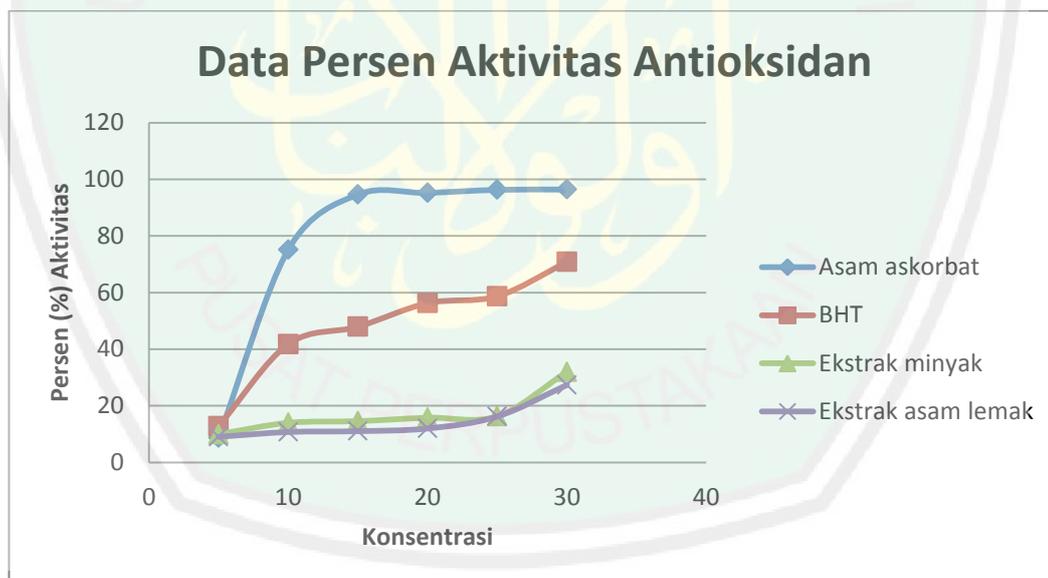
2. Persen (%) aktivitas ekstrak dan pembanding

Persen aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Konsentrasi	Asam askorbat	BHT	Ekstrak minyak	Ekstrak asam lemak
5	8.69	12.79	9.96	9.03
10	75.11	41.75	13.97	10.73
15	94.63	47.91	14.56	11.02
20	95.21	56.25	15.78	11.97
25	96.28	58.69	16.27	16.22
30	96.4	70.79	31.97	27.33

Grafik 5. Persen aktivitas ekstrak dan pembanding



3. Perhitungan EC₅₀

Nilai EC₅₀ dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

No.	Sampel	EC ₅₀ (mg/L)
1.	Ekstrak minyak	123,8
2.	Ekstrak asam lemak	122,4
3.	Asam askorbat	8,005
4.	BHT	16,19

a) Ekstrak n-heksana (minyak)

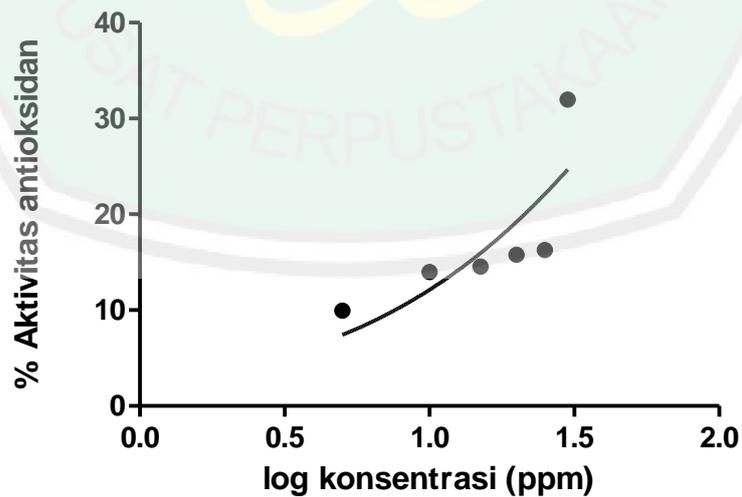
Comparison of Fits	Can't calculate
Null hypothesis	LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis	LogEC50 same for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF
Preferred model	LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)	
LogEC50 different for each data set	
Best-fit values	
Bottom	= 0.0
Top	= 100.0
LogEC50	2.093
HillSlope	0.7871
EC50	123.8
Span	= 100.0
Std. Error	
LogEC50	0.3568
HillSlope	0.3465
95% Confidence Intervals	
LogEC50	1.102 to 3.083
HillSlope	-0.1749 to 1.749
EC50	12.66 to 1211
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	4
R square	0.6181
Absolute Sum of Squares	111.1
Sy.x	5.269
Constraints	
Bottom	Bottom = 0.0
Top	Top = 100.0

LogEC50 same for all data sets

Best-fit values

Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.093	2.093
HillSlope	0.7871	
EC50	123.8	123.8
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.3568	0.3568
HillSlope	0.3465	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.102 to 3.083	1.102 to 3.083
HillSlope	-0.1749 to 1.749	
EC50	12.66 to 1211	12.66 to 1211
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.6181	0.6181
Absolute Sum of Squares	111.1	111.1
Sy.x		5.269
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points Analyzed		6

ekstrak minyak



b) Ekstrak asam lemak

Comparison of Fits	Can't calculate
Null hypothesis	2 parameters different for each data set
Alternative hypothesis	2 parameters same for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF
Preferred model	2 parameters different for each data set
F (DFn, DFd)	

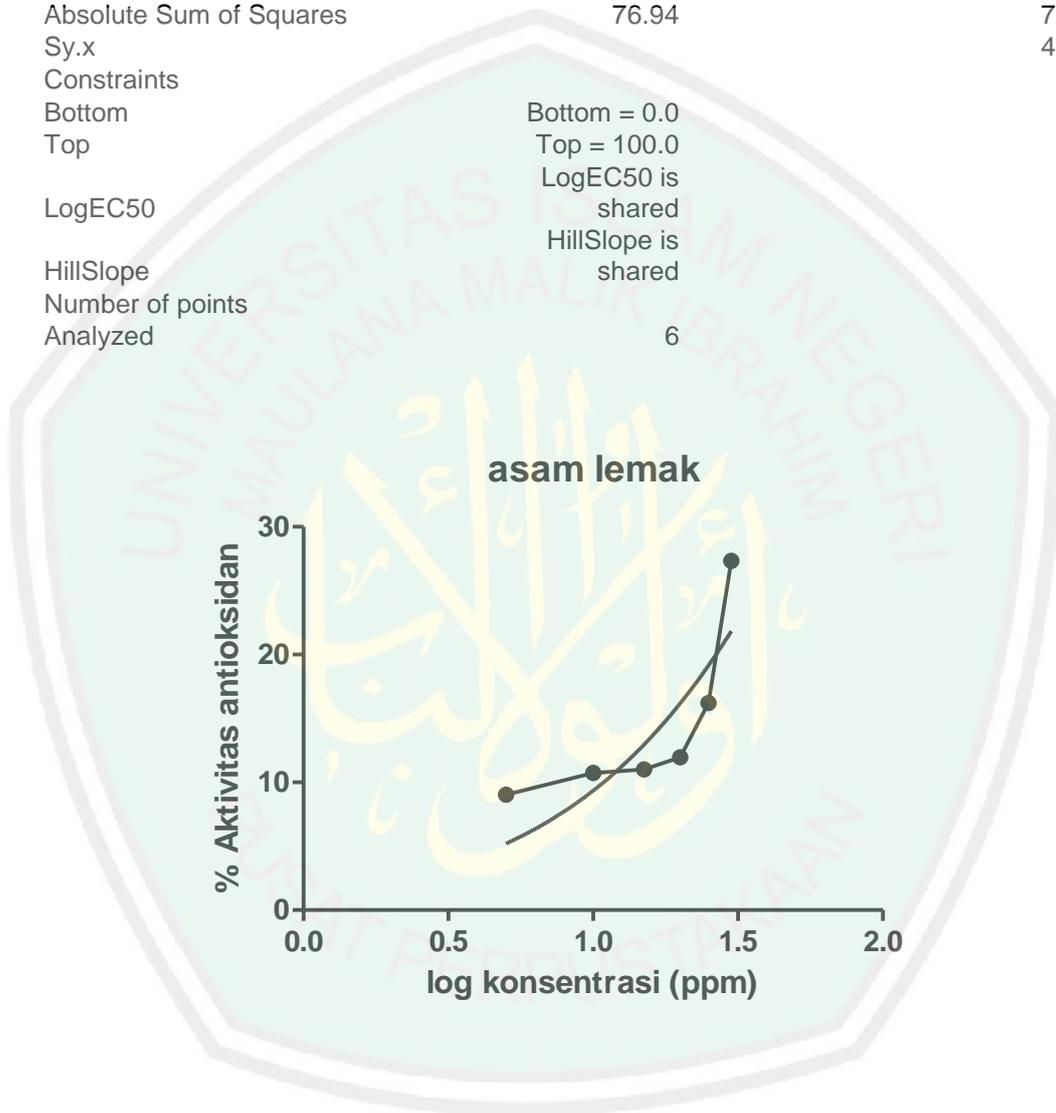
2 parameters different for each data set

Best-fit values	
Bottom	= 0.0
Top	= 100.0
LogEC50	2.088
HillSlope	0.9071
EC50	122.4
Span	= 100.0
Std. Error	
LogEC50	0.3101
HillSlope	0.3594
95% Confidence Intervals	
LogEC50	1.227 to 2.949
HillSlope	-0.09071 to 1.905
EC50	16.87 to 888.4
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	4
R square	0.6657
Absolute Sum of Squares	76.94
Sy.x	4.386
Constraints	
Bottom	Bottom = 0.0
Top	Top = 100.0

2 parameters same for all data sets

Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.088	2.088
HillSlope	0.9071	0.9071
EC50	122.4	122.4
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.3101	0.3101
HillSlope	0.3594	0.3594
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.227 to 2.949	1.227 to 2.949
HillSlope	-0.09071 to	-0.09071 to 1.905

EC50	1.905	16.87 to 888.4
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.6657	0.6657
Absolute Sum of Squares	76.94	76.94
Sy.x		4.386
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points Analyzed	6	

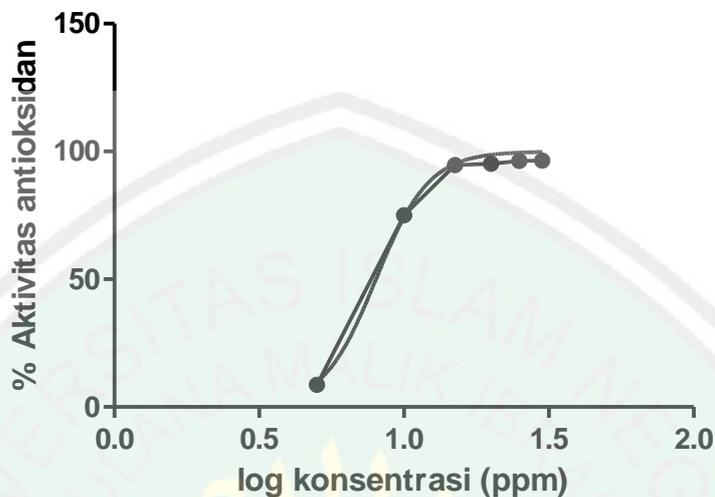


c) Asam askorbat

Comparison of Fits	Can't calculate
Null hypothesis	2 parameters different for each data set
Alternative hypothesis	2 parameters same for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF
Preferred model	2 parameters different for each data set
F (DFn, DFd)	
2 parameters different for each data set	
Best-fit values	

Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	0.9033	
HillSlope	4.742	
EC50	8.005	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.01415	
HillSlope	0.4963	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0.8641 to 0.9426	
HillSlope	3.364 to 6.119	
EC50	7.312 to 8.762	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	4	
R square	0.9939	
Absolute Sum of Squares	36.77	
Sy.x	3.032	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
2 parameters same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	0.9033	0.9033
HillSlope	4.742	4.742
EC50	8.005	8.005
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.01415	0.01415
HillSlope	0.4963	0.4963
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0.8641 to 0.9426	0.8641 to 0.9426
HillSlope	3.364 to 6.119	3.364 to 6.119
EC50	7.312 to 8.762	7.312 to 8.762
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9939	0.9939
Absolute Sum of Squares	36.77	36.77
Sy.x		3.032
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
Analyzed	6	

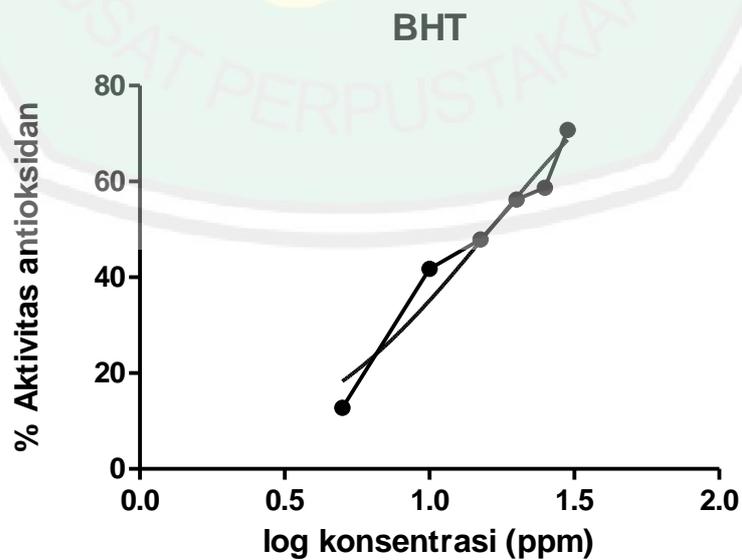
Asam askorbat



d) BHT

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		2 parameters different for each data set
Alternative hypothesis		2 parameters same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		2 parameters different for each data set
F (DFn, DFd)		
2 parameters different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.209	
HillSlope	1.274	
EC50	16.19	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.03163	
HillSlope	0.1863	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.121 to 1.297	
HillSlope	0.7572 to 1.792	
EC50	13.22 to 19.82	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	4	
R square	0.9485	
Absolute Sum of Squares	101.9	
Sy.x	5.048	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	

Top	Top = 100.0	
2 parameters same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.209	1.209
HillSlope	1.274	1.274
EC50	16.19	16.19
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.03163	0.03163
HillSlope	0.1863	0.1863
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.121 to 1.297	1.121 to 1.297
HillSlope	0.7572 to 1.792	0.7572 to 1.792
EC50	13.22 to 19.82	13.22 to 19.82
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9485	0.9485
Absolute Sum of Squares	101.9	101.9
Sy.x		5.048
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
Analyzed	6	



Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

1. Kultivasi *Chlorella sp.*

1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)



Gambar 1. Perebusan tauge



Gambar 2. Ekstrak tauge



Gambar 3. Medium ekstrak tauge 4%

1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET



Gambar 4. Hari ke - 1



Gambar 5. Hari ke - 2



Gambar 6. Hari ke - 3



Gambar 7. Hari ke - 4



Gambar 8. Hari ke - 5



Gambar 9. Hari ke - 6



Gambar 10. Hari ke - 7



Gambar 11. Hari ke - 8



Gambar 12. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*

1.3 Pemanenan *Chlorella sp.*



Gambar 13. Biomassa yang masih bercampur dengan filtrat



Gambar 14. Biomassa dan filtrat dalam tabung sentrifuse



Gambar 15. Persiapan sentrifuse



Gambar 16. Sentrifuse

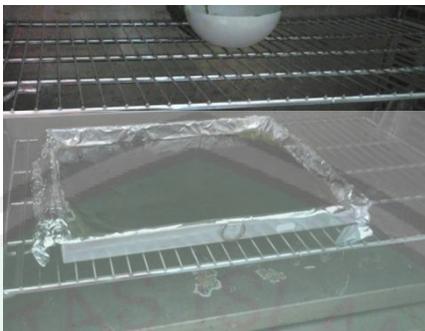


Gambar 17. Biomassa basah

2. Preparasi Sampel



Gambar 18. Biomassa basah



Gambar 19. Pengovenan



Gambar 20. Biomassa kering

3. Analisis Kadar Air *Chlorella sp.* Kering



Gambar 21. Desikator



Gambar 22. Penimbangan cawan



Gambar 23. Pengovenan sampel kering



Gambar 24. Sampel kering dalam desikator

4. Ekstraksi Soxhletasi Biomassa *Chlorella sp.*



Gambar 25. Ekstraktor soxhlet



Gambar 26. Ekstrak n-heksana



Gambar 27. Ekstrak pekat n-heksana

5. Hidrolisis Minyak *Chlorella sp.*



Gambar 28. Proses Refluks



Gambar 29. Pemisahan garam



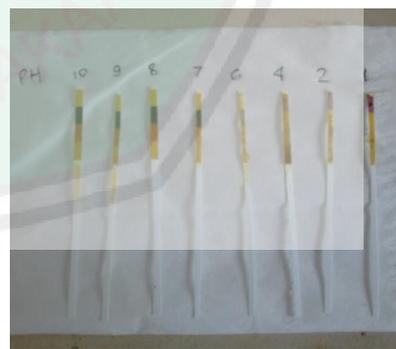
Gambar 30. Busa pada garam kalium



Gambar 31. Pemberian H_2SO_4 1M



Gambar 32. Kertas pH



Gambar 33. pH larutan sebelum dan sesudah ditetesi H_2SO_4 1M

6. Uji Aktivitas Antioksidan



Gambar 34. Pengukuran waktu kestabilan



Pengujian Asam Askorbat

Pengujian Minyak

Pengujian Minyak

Pengujian BHT

Pengujian Asam lemak

Pengujian Asam Lemak

Gambar 35. Pengukuran aktivitas antioksidan