

**UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA
Chlorella sp. TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina***

SKRIPSI

oleh:

**ANIK KHOLIFATUZ ZAHRO'
NIM. 10630079**



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

**UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.*
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina***

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:
ANIK KHOLIFATUZ ZAHRO'
NIM. 10630079**

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

UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.*
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina*.

SKRIPSI

Oleh:

ANIK KHOLIFATUZ ZAHRO'

NIM. 10630079

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 5 September 2014

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag
NIP. 19720420 200212 1 003

Mengetahui,
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

**UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.*
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina.***

SKRIPSI

Oleh:

ANIK KHOLIFATUZ ZAHRO'

NIM. 10630079

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 5 September 2014

Pembimbing I

A. Ghanaim Fasya, M.Si
Abidin. M.Ag
NIP. 19820616 200604 1 002
200212 1 003

Pembimbing II

Dr. H. Munirul
NIP. 19720420

Mengetahui,
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

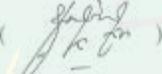
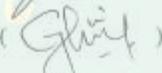
**UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.*
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina.***

SKRIPSI

Oleh:
ANIK KHOLIFATUZ ZAHRO'
NIM. 10630079

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

Malang, 5 September 2014

Susunan Dewan Penguji		Tanda Tangan
1. Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	()
2. Ketua Penguji	: Anik Maunatin, M.P NIK. 2014 0201 2412	()
3. Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	()
4. Anggota Penguji	: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag NIP. 19720420 200212 1 003	()

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

**UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.*
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina.***

SKRIPSI

**Oleh:
ANIK KHOLIFATUZ ZAHRO'
NIM. 10630079**

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

Malang, 5 September 2014

Susunan Dewan Penguji		Tanda Tangan
1. Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	()
2. Ketua Penguji	: Anik Maunatin, M.P NIK. 2014 0201 2412	()
3. Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	()
4. Anggota Penguji	: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag NIP. 19720420 200212 1 003	()

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

Lembar persembahan

Dengan rasa syukur yang mendalam saya persembahkan karya sederhana ini kepada:

Kedua orang tuaku bapak Ali Masrur dan ibu' Rodiyah yang telah melahirkan, membesarkan, membimbing dan mendidiku hingga menjadi lebih baik, (ma'e, pa'e anik lulus,,,,). Matur Sembah Nuwun kupersembahkan atas kasih sayang dan dukungan yang bapak dan ibu' berikan padaku selama ini.

*Semoga Allah selalu melimpahkan kasih sayang-Nya kepada kalian.
Amien...*

Seluruh dosen yang telah memberikan ilmu2 yang sangat bermanfaat, terutama kepada pak Naim, pak tri dan pak Munir yang selalu membimbingku dalam pengerjaan skripsi ini.

Trio asam lemak Chlorella sp. (Diah and Vera) terimakasih atas kerjasamanya selama penelitian ini, semoga semua yang telah kita lakukan ini bisa bermanfaat di dunia dan akhirat kelak.

So lucky to be your friend.

Teman-teman kimia B'10 dan A'10, santri sunan ampel g.3 no.6 terimakasih ya atas saran, bantuan dan dukungannya. Buat geng kopers (unni fetty, ony, putri, mbk desi??, dkk. 2014) akhirnya wisuda bareng juga, harus ya? kan "we are one",he

MOTTO

إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا بِأَنفُسِهِمْ

Sesungguhnya Allah tidak mengubah suatu kaum sampai mereka mengubah diri mereka sendiri (Q.S ar Ra'd: 11)

So,

If there is a will there is a way

And

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ﴿٦﴾

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan (QS. al Insyirah:6)

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anik Kholifatuz Zahro'

NIM : 10630079

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Minyak dan Asam Lemak

Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Larva Udang *Artemia Salina*

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 mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 5 September 2014

Yang Membuat Pernyataan,

Anik Kholifatuz Zahro'

NIM. 10630079

KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya atas terselesaikan skripsi dengan judul **“Uji Toksisitas Minyak dan Asam Lemak Mikroalga *Chlorella sp.* Terhadap Larva Udang *Artemia Salina.*”** ini tepat pada waktunya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhoi oleh Allah SWT. Skripsi ini merupakan salah satu syarat menyelesaikan program S-1 (Strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

1. Kedua orang tuaku yaitu bapak Ali Masrur dan Ibu Rodiyah serta keluarga besarku di Banyuwangi.
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku Pembimbing Utama yang selalu memberikan bimbingan dan banyak pengetahuan bagi saya mengenai ilmu kimia terutama setiap konsultasi skripsi.
3. Bapak Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag, selaku Pembimbing Agama.
4. Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc, selaku Konsultan.
5. Ibu Eny Yulianti, M.Si, M.P, selaku Penguji Utama.
6. Ibu Anik Maunatin, M.P, selaku Ketua Penguji.

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

Penulisan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung memperoleh bantuan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, Penulis mengucapkan terima kasih sedalam-dalamnya kepada semua pihak, khususnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen wali yang telah banyak memberikan bantuan, motivasi, dan dukungan dari awal saya masuk jurusan kimia.
5. Seluruh Dosen pengajar khususnya di Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmunya kepada penulis selama kuliah di UIN Maulana Maliki Malang.
6. Seluruh staf Laboratorium (Mas Abi, Mas Taufik, Mbak Rika, Mbak Susi, dan Mbak Mei) dan staf administrasi (Mbak Ana dan mbk Is) Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Terimakasih atas bantuannya.
7. Teman-teman “Trio asam lemak *Chlorella sp*” Diah dan Vera yang selalu semangat dan bersama-sama dalam suka duka menyelesaikan penelitian ini.
8. Teman-teman kimia 2010 terutama kelas B, terima kasih atas dukungan, motivasi, kebersamaan, kekompakannya dan canda tawa selama kuliah.
9. Semua pihak yang tidak tertulis, terima kasih atas bantuan dan dukungannya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena keberadaannya masih sangat terbatas dalam segala hal. Oleh karena itu, saya mengharapkan saran dan kritik yang bersifat konstruktif kedepannya. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat diterima dan hasilnya dapat bermanfaat.

Malang, 5 September 2014

Penulis

3.5.1	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	38
3.5.1.1	Pembuatan Medium Ekstrak Tauge	38
3.5.1.2	Kutivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge	39
3.5.1.3	Penghitungan jumlah sel	39
3.5.1.4	Pemanenan <i>Chlorella sp.</i>	40
3.5.2	Preparasi Sampel	40
3.5.3	Analisis Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	40
3.5.4	Ekstraksi Minyak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	41
3.5.5	Hidrolisis Minyak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	42
3.5.6	Uji Toksisitas.....	43
3.5.6.1	Penetasan Larva Udang	42
3.5.6.2	Uji Toksisitas	43
3.5.7	Analisis Asam Lemak dengan KG-SM.	44
3.6	Analisis Data	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	46
4.1.1	Pembuatan Medium Ekstrak Tauge	46
4.1.2	Kultivasi mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge	47
4.1.3	Penghitungan Jumlah Sel Mikroalga	48
4.2	Preparasi Sampel	52
4.3	Analisis Kadar Air	52
4.4	Ekstraksi Soxhlet minyak mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	53
4.5	Hidrolisis Minyak	56
4.6	Uji Toksisitas	59
4.6.1	Penetasan Larva Udang	59
4.6.2	Uji Toksisitas Minyak dan Asam Lemak	60
4.7	Identifikasi golongan asam lemak <i>Chlorella sp.</i> dengan KG-SM	65
4.8	Mikroalga Dalam Perspektif Islam	68
BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	71
5.2	Saran	71
DAFTAR PUSTAKA		72

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi dan nilai gizi biji kacang hijau dan kecambah.....	18
Tabel 2.2 Asam lemak tak jenuh.....	22
Tabel 2.3 Kriteria toksisitas	33
Tabel 4.1 Rendemen minyak mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	55
Tabel 4.2 Data pengamatan mortalitas <i>artemia salina</i>	62
Tabel 4.3 Data nilai LC ₅₀ minyak dan asam lemak	62
Tabel 4.4 Asam Lemak Tak Jenuh Hasil Kromatogram KG	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Bentuk sel <i>Chlorella sp.</i>	11
Gambar 2.2	Fase pertumbuhan sel alga	13
Gambar 2.3	Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
Gambar 2.4	Pertumbuhan mikroalga <i>P. Cruentum</i>	16
Gambar 2.5	Proses pembentukan trigliserida	20
Gambar 2.6	Struktur umum asam lemak	21
Gambar 2.7	Reaksi hidrolisis trigliserida	25
Gambar 2.8	Reaksi penyabunan asam lemak	26
Gambar 2.9	Diagram skematik kromatografi gas	29
Gambar 2.10	Injektor	30
Gambar 2.11	<i>Artemia salina</i>	34
Gambar 4.1	Kultivasi mikroalga pada a. hari ke 1, b. hari ke 4, c. hari ke 8 ...	48
Gambar 4.2	<i>Chlorella sp.</i> dalam <i>Haemocytometer</i>	49
Gambar 4.3	Fase eksponensial mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	50
Gambar 4.4	Proses sentrifugasi	51
Gambar 4.5	Minyak hasil ekstraksi	55
Gambar 4.6	Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis trigliseril linoleat	59
Gambar 4.7	Kurva mortalitas pada minyak	63
Gambar 4.8	Kurva mortalitas pada asam lemak	64
Gambar 4.9	Kromatogram KG asam lemak mikroalga <i>chlorella sp.</i>	66
Gambar 4.10	Spektra metil ester asam lemak hasil hidrolisis	67
Gambar 4.11	Spektra massa asam 9,12-oktadekadienoat	67
Gambar 4.12	Struktur asam 9,12-oktadekadienoat	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian	78
Lampiran 2. Skema Kerja	79
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen Larutan Ekstrak	86
Lampiran 4. Data Kematian Larva dan Perhitungan Nilai LC ₅₀	93
Lampiran 5. Perhitungan Nilai LC ₅₀ Minyak dan Asam Lemak secara Manual	101
Lampiran 6. Kromatogram KG-SM	106
Lampiran 7. Dokumentasi	112



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PEREMBAHAN	iv
MOTTO	v
SURAT ORISINIL PENELITIAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	8
2.2 Kultivasi Mikroalga	12
2.2.1 Fase Pertumbuhan Mikroalga	12
2.2.2 Media Ekstrak Tauge	16
2.3 Manfaat dan Kandungan Mikroalga	18
2.4 Lemak	20
2.5 Asam Lemak	21
2.4.1. Sifat Fisika	23
2.4.2. Sifat Kimia	23
2.4.3. Metode Ekstraksi Soklet	23
2.4.4. Hidrolisis Minyak	24
2.6 Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa (KG-SM)	26
2.6.1 Komponen-komponen KG-SM	28
2.7 Uji Toksisitas	32
2.8 Analisis Probit	35
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2 Alat dan Bahan	36
3.2.1 Alat	36
3.2.2 Bahan	36
3.3 Rancangan Penelitian	37
3.4 Tahapan Penelitian	38
3.5 Pelaksanaan Penelitian	38

ABSTRAK

Zahro', A. K., 2014, **Uji Toksisitas Minyak dan Asam Lemak Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Larva Udang *Artemia Salina*.**

Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag; Konsultan: Tri Kustono Adi, M.Sc.

Kata kunci: Uji toksisitas, Minyak, Asam lemak, *Chlorella sp.*, KG-SM

Mikroalga banyak tumbuh dan berkembang di Indonesia. Salah satu jenis mikroalga *Chloropyceae* yang sering ditemui adalah *Chlorella sp.* yang mengandung senyawa yang berpotensi memberikan efek toksik. Allah menyebutkan dalam al Qur'an surat as Syu'ara ayat 7 bahwa telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang baik salah satu manfaatnya adalah sebagai obat. *Chlorella sp.* pada fase eksponensial menghasilkan metabolit primer, salah satunya adalah minyak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas minyak dan asam lemak *Chlorella sp.* hasil ekstraksi soxhlet dengan pelarut n-heksana terhadap hewan coba larva udang *Artemia Salina*.

Penelitian ini diawali dengan kultivasi mikroalga dalam medium ekstrak tauge (MET). Ekstraksi minyak dilakukan dengan metode *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana. Minyak yang diperoleh selanjutnya dihidrolisis menggunakan katalis basa KOH 12 %. Minyak dan asam lemak yang diperoleh selanjutnya diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Letality Test*), dan diidentifikasi menggunakan KG-SM.

Hasil penelitian diperoleh rendemen ekstraksi minyak mikroalga *chlorella sp.* adalah 5,24 % dan rendemen asam lemak hasil hidrolisis adalah 80 %. Uji toksisitas minyak dan asam lemak diperoleh nilai LC_{50} masing-masing adalah 415 dan 267 ppm. Hasil dari identifikasi menggunakan KG-SM diperoleh 35 puncak dan 12 diantaranya merupakan asam lemak tak jenuh yaitu asam linoleat, asam linolenat, asam 6-Oktadekenoat, dan asam heksadekenoat. Asam linoleat merupakan kandungan tertinggi dalam asam lemak *Chlorella sp.* dengan prosentase 26,04 %.

ABSTRACT

Zahro', A. K., 2014, **Test of Oil Toxicity and Fatty Acid Microalga of *Chlorella sp.* to Larvae Shrimp of *Artemia Salina***. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag; Consultant: Tri Kustono Adi, M.Sc.

Keywords : Toxicity Test, Oil, Fatty acid, *Chlorella sp.*, KG-SM

One kind of microalgae from *chloropyceae* group is *chlorella sp.* it contains compounds that have potential toxicity effects. God mention in al qur'an, if god has created many kind of good plants. It can be used as medicine. In exponential phase, *chlorella sp.* produced primary metabolite, which one is oil. This research aims to determine the toxicity effect of oil and fatty acid *chlorella sp.* oil can be extracted from *chlorella sp.* use soxhlet method with n-hexane as solvent.

Microalgae was cultivated in extracts of bean sprouts medium. Oil was extracted by soxhlet method with n-hexane as solvent. And then oil was hidrolized by KOH 12 %. Oil and fatty acids were further tested toxicity effect used BSLT method, then identified fatty acid of *chlorella sp.* used GC-MS.

The result showed that yield of extraction of oil is 5,24 % and yield of hydrolysis process is 80 %. Toxicity test of oil and fatty acids provide toxicity effect with LC₅₀ values. The LC₅₀ values of oil is 415 ppm and fatty acid values 267 ppm. Identification kinds of fatty acids use GC-MS give 35 peaks. So, in fatty acids *chlorella sp.* have 35 compound, there are 12 of them is unsaturated fatty acids. The biggest precentage of fatty acid is linoleic acid, there are 26,04 %.

مستخلص البحث

زهراء. أنيك. خليفة. ٢٠١٤. اختبار سمية النفط والأحماض الدهنية الطحالب الدقيقة *Chlorella sp.* مع يرقات الروبيان *Artemia Salina*
 المشرف الأول: أحمد غنائم فشى الماجستير. المشرف الثاني: الدكتور الحاج منير العابدين الماجستير. المستشار: تري كوسطانا عدي الماجستير

الكلمة الرئيسية: اختبار السمية و النفط و الأحماض الدهنية الطحالب الدقيقة و *Chlorella sp.* و KG-SM

تنمو وتتطور الطحالب الدقيقة كثير في إندونيسيا. من نوع الطحالب الدقيقة *Chloropyceae* الذي وجد كثيرا هو *Chlorella sp.* وهو يتكون على المركبات تحمل أن تكون الآثار السمية. ذكر الله تعالى في سورة الشعراء الآية السابعة بأنه قد خلق النبات إلا للدواء. ينتاج *Chlorella sp.* في مرحلة الأسي الأبيض الأولية و منها النفط. وأهداف هذا البحث لمعرفة مستوى سمية الزيوت والأحماض الدهنية *Chlorella sp.* نتيجة من استخراج *soxhlet* و مذيب n-heksana على حيوانات التجارب يرقات الروبيان *Artemia Salina*. يبدأ هذا البحث بزراعة الطحالب الدقيقة في (MET) medium ekstrak tauge. استخراج النفط من قبل طريقة *Soxhletasi* باستعمال مذيب n-heksana. ثم تحلل النفط المحتصل بمحفز قاعدة KOH ١٢%. النفط و الأحماض الدهنية المحتصل عليها يختبر سميتها بأسلوب (Brine Shrimp Letality Test) BSLT و يحلل ب KG-SM. نتائج هذا البحث هو منقح استخراج النفط الطحالب الدقيقة *chlorella sp.* ٥,٢٤ % و منقح الأحماض الدهنية من التحلل المائي هو ٨٠%. اختبار سمية النفط والأحماض الدهنية يحصل على نتيجة LC_{50} منها ٤١٥ و ٢٦٧ ppm. نتائج التحليل باستعمال KG-SM هو ٣٥ ذروة و ١٢ منها الأحماض الدهنية غير المشبعة يعنى الأحماض linoleat و الأحماض linolenat و الأحماض 6-Oktadekenoat و الأحماض heksadekenoat. الأحماض linoleat هو أعلى محتوى في الأحماض الدهنية *Chlorella sp.* بالنسبة ٢٦.04%

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam al Quran 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?”

Surat asy Syu'ara ayat 7 menjelaskan bahwa di bumi ini telah ditumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang dapat bermanfaat bagi manusia. Quthb (2004), dalam bukunya menjelaskan bahwa tumbuh-tumbuhan itu mulia dengan segala kehidupan yang ada di dalamnya yang bersumber dari Allah SWT Yang Maha Mulia. Ungkapan ini mengisyaratkan kepada jiwa untuk menerima dan merespon ciptaan Allah SWT dengan sikap yang memuliakan, memperhatikan dan memperhitungkannya. Sehingga ayat ini menjelaskan bahwa manusia dianjurkan untuk memperhatikan bumi dan isinya, karena di bumi telah ditumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat. Salah satu tumbuhan yang diciptakan Allah SWT tersebut adalah mikroalga.

Mikroalga banyak tumbuh dan berkembang di Indonesia. Indonesia merupakan negara dengan wilayah pesisir terpanjang kedua setelah Kanada yaitu sepanjang 81 ribu Kilometer. Indonesia merupakan ladang pembibitan mikroalga air laut yang cukup luas. Mikroalga juga mampu tumbuh dan berkembang di air tawar. Mikroalga merupakan tumbuhan tingkat rendah yang mempunyai beberapa

keunggulan dibandingkan tumbuhan tingkat tinggi. Keunggulannya antara lain adalah hidupnya tidak bergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988). Menurut Kawaroe (2012), mikroalga dapat dipanen pada hari ke-8 karena pada hari ke-8 mikroalga memiliki kepadatan sel tertinggi.

Mikroalga merupakan biota perairan yang potensial untuk dikembangkan karena dapat menghasilkan produk komersial di bidang pangan, farmasi, kosmetika, pertanian, pakan dan sebagainya (Becker, 1994). Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), terdapat empat kelompok mikroalga yaitu: diatom (*Bacillariophyceae*), alga emas (*Chrysophyceae*), alga biru (*Cyanophyceae*), dan alga hijau (*Chlorophyceae*).

Chlorophyceae merupakan famili ganggang halus yang mampu menghasilkan asam lemak tak jenuh omega-3, 6, dan 9, serat, vitamin, protein, dan mineral. Kandungan betakaroten 900 lebih banyak dibandingkan dengan wortel. Sedangkan kandungan omega-3 mikroalga lebih banyak dibandingkan minyak ikan, biji rami, dan kedelai, yaitu 50 – 60 persen (Sukoso, 2002). Salah satu jenis *Chlorophyceae* yang sering ditemui adalah *Chlorella* sp.

Chlorella sp. merupakan mikroalga yang hidup di perairan air tawar, laut maupun payau, juga ditemukan di tanah dan di tempat lembab. Menurut Watanabe (1978) dalam Rostini (2007), *Chlorella* mengandung protein 42,2 %, nitrogen dalam bentuk ekstrak, kadar air 5,7 %, serat 0,4 %, dan lemak kasar 15,3 %.

Asam lemak merupakan salah satu senyawa metabolit primer yang terkandung di dalam *Chlorella* sp. Asam lemak adalah asam organik yang terdapat sebagai ester trigliserida atau lemak, baik yang berasal dari hewan atau tumbuhan. Asam lemak ini adalah asam karboksilat yang mempunyai rantai karbon panjang dengan rumus RCOOH (Poedjiadi, 2006). Menurut Becker (1994) dalam Kawaroe (2010), asam lemak yang terkandung dalam *Chlorella* terdiri dari asam linoleat sebanyak 45,068 % dan 29,495 % asam stearat. *Chlorella* sp. juga mengandung minyak squalen yang merupakan minyak yang sangat penting untuk kosmetik.

Menurut Rachmaniah (2010) mikroalga mampu menghasilkan minyak 200 kali lebih banyak dibandingkan dengan tumbuh-tumbuhan penghasil minyak (kelapa sawit, jarak pagar) pada kondisi terbaiknya. Mikroalga kering memiliki jumlah minyak yang lebih banyak dibandingkan dengan mikroalga basah.

Asam lemak di dalam *Chlorella* sp. dapat diekstrak melalui metode ekstraksi Soxhlet dengan beberapa pelarut nonpolar yang merujuk dari penelitian terdahulu. Rachmaniah, dkk. (2010) dalam penelitiannya melakukan pemilihan metode ekstraksi minyak alga dari *Chlorella* sp. dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa metode yang efektif dalam mengekstraksi minyak mikroalga *Chlorella* sp. adalah metode soxhletasi dengan pelarut n-heksana pada *Chlorella* sp. kondisi kering. Persentase minyak alga yang dihasilkan dari metode tersebut sebesar 16,57 %. Jenis asam lemak yang teridentifikasi dalam *Chlorella* sp. yakni asam miristat (29,06 %), asam palmitat

(4,70 %), asam stearat (2,43 %), asam oleat (3,21 %), asam linoleat (8,24 %), dan asam linolenat (16,59 %).

Kawaroe (2012), melakukan ekstraksi asam lemak dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut n-heksana. Mikroalga yang digunakan yaitu *Spirulina platensis*, *Isochrysis sp.* dan *Porphyridium cruentum* yang di panen pada hari ke-8 (fase awal stasioner) sehingga metabolit yang dihasilkan adalah metabolit primer. Rendemen yang dihasilkan dari ekstraksi menggunakan n-heksana yaitu sebesar 10,17 %. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan pelarut n-heksana untuk mengekstrak minyak yang terdapat di dalam mikroalga *Chlorella sp.*

Asam lemak dapat diperoleh dari minyak dengan cara hidrolisis, sehingga untuk memperoleh asam lemak dari minyak hasil ekstraksi soxhlet, perlu dilakukan hidrolisis. Fasya (2011), menyebutkan bahwa rendemen asam lemak yang diperoleh dari hasil hidrolisis minyak biji selasih adalah sebesar 75,01 %. Hidrolisis terhadap minyak biji selasih dilakukan dengan menggunakan katalis basa KOH 12 % dalam metanol.

Menurut penelitian terdahulu, asam lemak mempunyai efek toksik yang cukup besar pada hewan coba. Penelitian Wibawa (2006), menyebutkan bahwa ekstrak minyak ikan kembung yang di dalamnya terdapat lima jenis asam lemak yaitu asam stearat (22,19 %), asam oleat (21,99 %), asam palmitat (20,16 %), asam palmitoleat (19,96 %) dan asam miristat (17,86 %), memiliki nilai LC_{50} sebesar 5,97 ppm. Hal ini berarti kelima jenis asam lemak ini dapat bekerja secara sinergis untuk memberikan

sifat toksik (sitotoksik) terhadap sel larva *Artemia salina* Leach. Marliyana (2012), juga menyebutkan bahwa fraksi aktif dari ekstrak buah merah yang terdiri dari asam palmitat, asam oleat dan asam miristat mempunyai nilai LC_{50} 138,05 ppm. Menurut evaluasi Mayer *et al* (1982) suatu ekstrak bahan alam yang memiliki LC_{50} pada uji toksisitas menggunakan metode BSLT berpotensi sebagai antikanker.

Marliyana (2012), menyebutkan bahwa beberapa penelitian mengindikasikan bahwa asam lemak yang memiliki ikatan terkonjugasi dapat berperan sebagai senyawa aktif antikanker. Dari hasil penelitian Mu'nim dkk., (2006) bahwa sari buah merah mampu menghambat pertumbuhan kanker pada paru-paru tikus. Kandungan asam lemak yang cukup dominan dari ekstrak buah merah juga berpotensi untuk menghambat pertumbuhan kanker.

Uji toksisitas tahap awal menggunakan BSLT (*Brine Shrimp Lethality test*) dilakukan untuk mengetahui LC_{50} yang biasanya diujikan terhadap organisme yang sesuai untuk mengetahui bioaktivitasnya. Organisme uji tersebut biasanya menggunakan *Brine shrimp* (udang laut) dari jenis *Artemia salina* Leach. Metode pengujian BSLT, menggunakan *A. salina* dianggap dapat memprediksikan adanya daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga sering digunakan untuk skrining awal pencarian senyawa antikanker (Indrayani *et al.*, 2006).

Suryono dan Yudiati (2011), menyebutkan bahwa nilai LC_{50} dari *Spirulina sp.* adalah 113,2 ppm. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mikroalga *Spirulina sp.* berpotensi sebagai antikanker dan ini bisa dianalogkan dengan potensi *Chlorella*

sp. yang keduanya merupakan mikroalga yang mengandung zat hijau daun (klorofil) karena termasuk golongan tumbuhan tingkat rendah.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan sampel ekstrak asam lemak *Chlorella sp.* yang diperoleh dari hasil ekstraksi mikroalga *chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). Medium Ekstrak Tauge (MET) merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga yang berasal dari kacang hijau yang aman dan mudah diperoleh. Ekstrak asam lemak tersebut diujikan terhadap hewan coba larva udang *A. salina* untuk mengetahui potensinya sebagai obat yang dapat dilihat dari nilai LC_{50} yang menunjukkan tingkat ketoksitasannya. Dan untuk mengetahui jenis asam lemak yang terkandung di dalam asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* Dilakukan identifikasi dengan menggunakan instrument KG-SM (Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa).

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa rendemen hasil ekstraksi minyak dan bagaimana profil spektrum massa asam lemak yang muncul pada identifikasi menggunakan KG-SM?
2. Berapa nilai LC_{50} minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui rendemen hasil ekstraksi minyak dan untuk mengetahui profil asam lemak yang muncul pada identifikasi menggunakan KG-SM.
2. Untuk mengetahui nilai LC_{50} minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*

1.4 Batasan Masalah

Penelitian ini diperlukan batasan masalah agar tidak terjadi pelebaran masalah yang sedang diteliti yaitu:

1. Sampel yang digunakan adalah mikroalga *Chlorella sp.* yang ditumbuhkan pada media Medium Ekstrak Tauge (MET).
2. Ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi soxhlet dengan menggunakan pelarut n-heksana.
3. Metode uji toksisitas yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi bahwa minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* yang ditumbuhkan pada media Medium Ekstrak Tauge (MET) mempunyai efek toksisitas yang sistematis sehingga mampu dimanfaatkan dalam bidang farmakologi (pengobatan).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella* sp.

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. Di dunia mikrobial, mikroalga termasuk eukariotik, umumnya bersifat fotosintetik dengan pigmen fotosintetik hijau (klorofil), coklat (fikosantin), biru kehijauan (fikobilin), dan merah (fikoeritrin). Morfologi mikroalga berbentuk uniseluler atau multiseluler tetapi belum ada pembagian tugas yang jelas pada sel-sel komponennya. Hal itulah yang membedakan mikroalga dari tumbuhan tingkat tinggi (Romimohtarto, 2004).

Sebagaimana yang disebutkan dalam surat al An'am ayat 95:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۖ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ
 اللَّهُ ۖ فَأَنَّىٰ تُؤْفَكُونَ ﴿٩٥﴾

“*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka mengapa kamu masih berpaling? (95)*”

Quran surat al An'am ayat 95 tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT telah menumbuhkan biji dan benih tumbuh-tumbuhan. Allah SWT membelahnya di dalam tanah (yang lembab), sehingga dari biji dan benih tersebut tumbuhlah berbagai

macam jenis tumbuhan yang memiliki warna, bentuk dan rasa yang berbeda. Dan salah satu kebesaran Allah SWT adalah mampu menumbuhkan yang hidup dari yang mati yaitu Allah SWT menumbuhkan tumuh-tumbuhan yang hidup dari biji dan benih yang merupakan benda mati (Abdullah, 2003). Dari berbagai macam tumbuhan yang ditumbuhkan tersebut, mikroalga merupakan salah satu diantaranya.

Tumbuhan banyak diciptakan dimuka bumi ini dengan berbagai macam jenis dari yang sangat kecil hingga yang sangat besar yang memiliki manfaat yang berbeda-beda pula. Allah SWT berfirman dalam surat Shaad ayat 27 :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ
كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

“dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka. (27)“

Quran surat Shaad ayat 27 tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada diantara langit dan bumi ini memiliki manfaat yang dapat diambil oleh semua mahluknya. Namun ketika orang-orang yang tidak mau beriman kepada Allah SWT dan ayat-ayat-Nya tidak mau memperhatikan kejadian alam yang indah. mereka justru mengingkari nikmat Allah SWT sehingga kerugian yang besar bagi orang-orang kafir. Mereka akan dilemparkan ke dalam neraka yang sudah disediakan sebagai pembalasan bagi orang yang mempersekutukan Allah SWT dan mengingkari hari akhirat (Shiddieqy, 2000). Diantara ciptaan Allah

SWT yang diciptakan diantara langit dan bumi tersebut adalah mikroalga yang memiliki berbagai macam jenis dan manfaat yang berbeda-beda.

Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), menyatakan bahwa terdapat empat kelompok mikroalga antara lain: diatom (*Bacillariophyceae*), alga hijau (*Chlorophyceae*), alga emas (*Chrysophyceae*) dan alga biru (*Cyanophyceae*). Penyebaran habitat mikroalga biasanya di air tawar (limnoplankton) dan air laut (haloplankton), sedangkan sebaran berdasarkan distribusi vertikal di perairan meliputi : plankton yang hidup di zona euphotik (epiplankton), hidup di zona disphotik (mesoplankton), hidup di zona aphotik (bathylankton) dan yang hidup di dasar perairan / bentik (hypoplankton) alga hijau (*Chlorophyta*).

Alga hijau adalah kelompok alga yang paling maju dan memiliki banyak sifat-sifat tanaman tingkat tinggi. Kelompok ini adalah organisme prokaryotik dan memiliki struktur-struktur sel khusus yang dimiliki sebagian besar alga. Mereka memiliki kloroplas, DNA-nya berada dalam sebuah nukleus, dan beberapa jenisnya memiliki flagella. Dinding sel alga hijau sebagian besar berupa selulosa, meskipun ada beberapa yang tidak mempunyai dinding sel. Mereka mempunyai klorofil dan beberapa karotenoid, dan biasanya mereka berwarna hijau rumput. Pada saat kondisi budidaya menjadi padat dan cahaya terbatas, sel akan memproduksi lebih banyak klorofil dan menjadi hijau gelap. Kebanyakan alga hijau menyimpan zat tepung sebagai cadangan makanan meskipun ada diantaranya menyimpan minyak atau lemak. Pada umumnya unisel merupakan sumber makanan dalam budidaya dan filamen-filamennya merupakan organisme pengganggu.

Menurut Vashista (1979) dalam Rostini (2007), *Chlorella sp.* termasuk dalam:

Filum : Chlorophyta

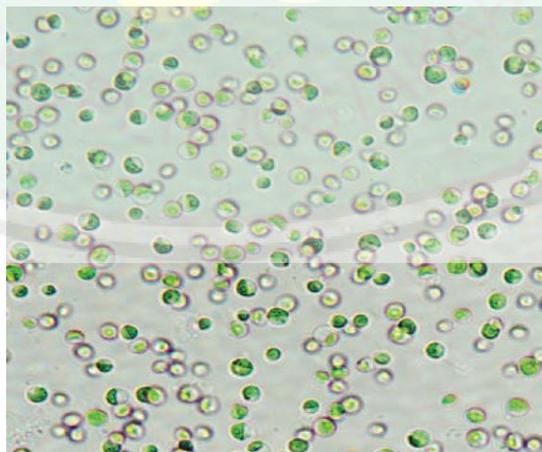
Kelas : Chlorophyce

Ordo : Chlorococcales

Famili : Chlorellaceae

Genus : *Chlorella sp.*

Sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat, hidup soliter, berukuran 2-8 μ m. Sel *Chlorella sp.* di dalamnya mengandung 50 % 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 dalam Rostini, 2007). Setiap berat kering yang sama, *Chlorella sp.* mengandung vitamin A, B, D, E, dan K, yaitu 30 kali lebih banyak dibandingkan yang terdapat dalam hati anak sapi, serta empat kali vitamin yang terkandung dalam sayur bayam (Watanabe, 1978 dalam Rostini, 2007).



Gambar 2.1 Bentuk sel *Chlorella sp.* (Bellinger dan Sigeo, 2010 dalam Amaliah, 2013)

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). *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). Protoplas sel dikelilingi oleh membran yang selektif, sedangkan di luar membran sel terdapat dinding yang tebal terdiri dari selulosa dan pektin. Di dalam sel terdapat suatu protoplas yang tipis berbentuk seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas. Pineroid-pineroid stigma dan vakuola kontraktil tidak ada (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007).

Chlorella sp. dapat tumbuh pada salinitas 25 ‰. Alga tumbuh lambat pada salinitas 15 ‰, dan hampir tidak tumbuh pada salinitas 0 ‰ dan 60 ‰. *Chlorella sp.* tumbuh baik pada suhu 20 °C, tetapi tumbuh lambat pada suhu 32 °C. Tumbuh sangat baik sekitar 20-23 °C (Hirata, 1981 dalam Rostini, 2007).

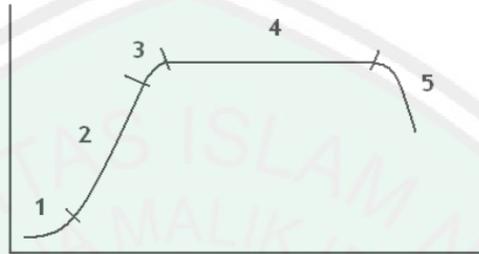
2.2 Kultivasi Mikroalga

2.2.1. Fase Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dalam media kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Kepadatan sel dalam kultur *Nannochloropsis sp.* dan *Chlorella sp.* digunakan untuk mengetahui pertumbuhan jenis mikroalga hijau tersebut. Kecepatan tumbuh dalam kultur

ditentukan dari media yang digunakan dan dapat dilihat dari hasil pengamatan kepadatan *Nannochloropsis sp.* dan *Chlorella sp.* yang dilakukan setiap 24 jam.

Pertumbuhan mikroalga secara umum dapat dilihat pada gambar 2.2



Gambar 2.2 : Fase pertumbuhan sel alga (Fogg, 1975)
(1: fase lag; 2: fase eksponensial; 3: fase deklinasi; 4: fase stasioner; dan :5 fase kematian)

1. Fase tunda (*lag phase*)

Setelah pemberian inokulum kedalam media kultur, terjadi fase tunda yang disebabkan oleh penyesuaian lingkungan yang baru sebelum memulai pembiakan (pembelahan sel). Penyesuaian dalam hal ini berarti suatu masa ketika sel-sel kekurangan metabolit dan enzim akibat keadaan yang tidak menguntungkan dalam pembiakan sebelumnya.

2. Fase pertumbuhan logaritmik (*log phase*)

Selama fase ini sel membelah dengan cepat, sel-sel berada dalam keadaan stabil dan jumlah sel bertambah dengan kecepatan konstan. Bahan sel baru terbentuk dengan laju tetap, akan tetapi bahan-bahan tersebut bersifat katalitik dan massa bertambah secara eksponensial. Hal ini tergantung pada satu dari dua hal yang terjadi, yaitu kalau tidak satu atau lebih zat makanan dalam pembenihan habis, maka tentu hasil metabolisme beracun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.

3. Fase penurunan laju pertumbuhan

Pada fase ini, laju pertumbuhan sel menurun akibat adanya kompetisi yang tinggi dalam media hidup, dan zat makanan yang tersedia dalam media tidak mencukupi kebutuhan populasi yang bertambah dengan cepat pada fase eksponensial. Akibatnya hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan cukup nutrisi untuk tumbuh dan membelah.

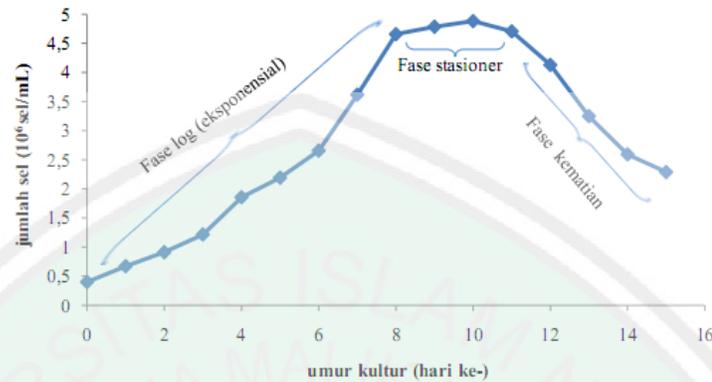
4. Fase stasioner

Selama fase ini jumlah sel cenderung konstan. Hal ini disebabkan oleh habisnya nutrisi dalam medium atau karena menumpuknya hasil metabolisme yang beracun sehingga mengakibatkan pertumbuhan berhenti. Dalam kebanyakan kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner, dimana adanya kehilangan sel yang lambat karena kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel yang baru melalui pembelahan. Bila hal ini terjadi maka jumlah sel akan bertambah secara lambat meskipun jumlah sel hidup tetap.

5. Fase kematian (*death phase*)

Pada fase ini jumlah populasi menurun. Jumlah sel yang mati per satuan waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Amaliah (2013), mikrolaga *Chlorella sp.* mengalami fase eksponensial (hari ke-0 sampai hari ke-8), fase stasioner (hari ke-8 sampai hari ke-11) dan fase kematian (hari ke-11 sampai seterusnya). Kurva pertumbuhan mikrolaga *Chlorella sp.* adalah sebagai berikut:

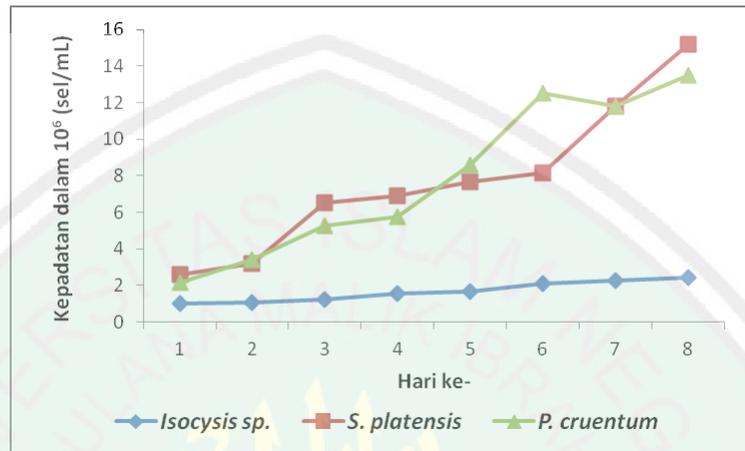


Gambar 2.3: Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*

Kultivasi *P. cruentum* mengalami peningkatan kepadatan selama kultivasi, namun menurun pada hari ke-tujuh dan meningkat lagi pada hari terakhir kultivasi senilai $13,50 \times 10^6$ sel/ml (Gambar 2.4). Hari pertama hingga hari terakhir kultivasi menunjukkan mikroalga ini termasuk dalam fase eksponensial. Pada fase eksponensial ini mikroalga mengalami penambahan kepadatan sel. Pembelahan sel terjadi pada fase ini dikarenakan nutrisi, cahaya serta ruang untuk pertumbuhan mikroalga masih mencukupi (Kawaroe, 2012).

Kurva pertumbuhan *P. cruentum* (Gambar 2.4) menunjukkan peningkatan hingga hari ke-enam kultivasi, hari ke tujuh turun dan naik kembali di hari ke-8. Peningkatan pertumbuhan tersebut merupakan ciri fase eksponensial, dimana pada fase ini mikroalga terus membelah diri dan kematian sel sangat kecil. Hari ketujuh kultivasi mengalami penurunan kepadatan. Pada fase ini pertumbuhan mulai berkurang yang mungkin diakibatkan berkurangnya nutrisi (Kawaroe. 2012). Hal ini

menunjukkan bahwa kepadatan sel tertinggi terjadi pada hari ke 8 (fase eksponensial).



Gambar 2.4. pertumbuhan mikroalga *P. Cruentum*

2.2.2 Media Ekstrak Tauge

Kultur *Chlorella sp.* pada umumnya menggunakan pupuk teknis yaitu pupuk Walne dimana konsentrasi unsur makro nutrisi pupuk teknis belum mencukupi batas optimal kebutuhan *Chlorella sp.* Kandungan nitrogen dan fosfor pupuk Walne adalah 0,016 g/L dan 0,004 g/L sedangkan kebutuhan nitrogen dan fosfor *Chlorella sp.* adalah 0,7 – 0,14 g/L dan 0,62 – 0,015 g/L (Eyster, 1978 dalam Tryastuti, dkk., 2011).

Salah satu media untuk pertumbuhan mikroalga adalah Media Ekstrak Tauge (MET). Penelitian ini menggunakan Media Ekstrak Tauge (MET) dalam kultivasi *Chlorella sp.* 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. Kisaran pH media kultur yang sesuai bagi *Chlorella* bergantung pada jenis media. Nielsen (1955) dalam Yuniati (2005) menyatakan bahwa pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella* berkisar antara 4,5-9,3.

Tauge kacang hijau merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Media perlakuan MET mengandung nutrient anorganik seperti K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Cu. Nutrient anorganik yang tergolong makronutrien yaitu K, P, Ca, Mg, dan Na dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel. Mikronutrien 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 mengefektifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Wulandari, dkk., 2010).

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 (Anggrahini, 2009; Astawan, 2005 dalam Maulana, 2010).

Adapun perbandingan komposisi nilai gizi kacang hijau dan kecambah kacang hijau terdapat dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi dan nilai gizi biji kacang hijau dan kecambah kacang hijau (tauge) dalam 100 gram contoh.

Komposisi Gizi	Nilai Gizi	
	Dalam Biji	Dalam Kecambah
Kalori (kal)	382	354
Karbohidrat (g)	67,22	44,79
Protein (g)	27,10	38,54
Lemak (g)	1,78	12,50
Kalsium (mg)	263,91	1729,17
Fosfor (mg)	377,51	770,83
Besi (mg)	8,88	8,33
Natrium (mg)	-	-
Kalium (mg)	-	-
Karoten (mg)	263,91	208,33
Tiamin (mg)	0,54	0,94
Riboflavin (mg)	0,18	1,56
Niasin (mg)	1,78	11,46
Vitamin C (mg)	11,83	52,08

Sumber: PERSAGI (2009) dalam Fahriyani (2011)

Menurut Wulandari, dkk. (2010) di dalam MET juga terdapat beberapa vitamin (tiamin, riboflavin, piridoksin, niasin, triptofan, asam pantotenat, folasin, vitamin C dan K). Vitamin berperan sebagai *growth factor* dalam pertumbuhan alga. Vitamin yang dibutuhkan bagi pertumbuhan alga antara lain yaitu tiamin, kobalamin, dan biotin. Tiamin berfungsi dalam reaksi α -dekarboksilasi dan transketolase. Kobalamin berfungsi untuk sintesis deoksiribosa. Biotin berfungsi dalam sintesis asam lemak, β -dekarboksilasi, dan fiksasi karbon dioksida.

2.3 Manfaat dan kandungan Mikroalga

Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran. Hal tersebut dikarenakan *Chlorella sp.* mengandung berbagai nutrisi seperti karbohidrat, protein,

asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi (Kawaroe, 2010).

Mikroalga protein, lemak, asam lemak tak jenuh, pigmen dan vitamin. Kandungan lemak (*lipid*) dan asam lemak (*fatty acid*) yang ada dalam mikroalga merupakan sumber energi. Kandungan ini dihasilkan dari proses fotosintesis yang merupakan hidrokarbon (prince dan Harun, 2005 dalam Kawaroe, 2012).

Menurut Chisti (2008) dalam katili (2011), mikroalga lebih memiliki potensi untuk dijadikan biodiesel dibandingkan biofuel. Minyak dari mikroalga mengandung lipid yang cocok untuk esterifikasi atau transesterifikasi sehingga lebih berpotensi menjadi biodiesel.

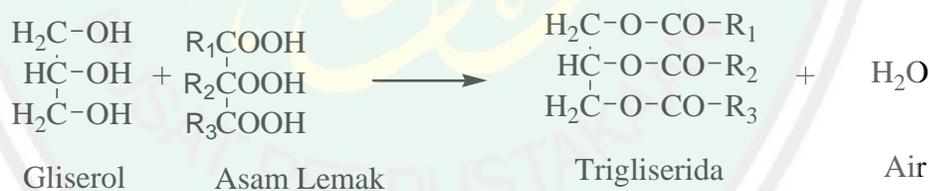
Ekstrak pigmen karotenoid luthein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* mempunyai aktivitas antioksidan dan berkaitan dengan peristiwa katarak pada mata (Kusmiati, 2010). ekstrak intraseluler kasar *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* serta mempunyai potensi hambatan terhadap *Streptomycin*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas sebagai antimikroba (Setyaningsih, 2005). Amaliah (2013) menyebutkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* berpotensi sebagai antikanker sedangkan ekstrak etil asetat berpotensi sebagai antimikroba.

Chlorella sp. mengandung asam lemak tak jenuh omega-3, 6, dan 9, serat, vitamin, protein, dan mineral. Kandungan beta karoten 900 lebih banyak

dibandingkan dengan wortel. Sedangkan kandungan omega-3 mikroalga lebih banyak dibandingkan minyak ikan, biji rami, dan kedelai, yaitu 50 – 60 % (Sukoso, 2002).

2.4 Lemak

Lemak dan minyak tidak membentuk struktur molekul yang panjang sebagaimana pada struktur polisakarida. Panjang struktur molekul lemak dan minyak tergantung pada jenis asam lemak yang terikat pada gliserin (Kusnandar, 2011). Lemak tergolong dalam kelompok senyawa organik yang larut dalam pelarut organik tetapi tidak larut dalam air. Lemak merupakan ester asam lemak dengan gliserol. Gliserol merupakan suatu trihidroksi alkohol yang terdiri atas tiga atom karbon yang masing-masing karbon mempunyai gugus –OH. Satu molekul gliserol dapat mengikat satu, dua, atau tiga molekul asam lemak dalam bentuk ester yang disebut monogliserida, digliserida, dan trigliserida. Pada lemak, satu molekul gliserol mengikat tiga molekul asam lemak (Poedjiadi, 1994).



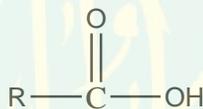
Gambar 2.5 Proses terbentuknya trigliserida

Lemak merupakan bahan padat pada suhu kamar disebabkan tidak mengandung ikatan rangkap sehingga mempunyai titik lebur yang lebih tinggi. Sedangkan minyak merupakan bahan cair disebabkan memiliki satu atau lebih ikatan rangkap di antara atom-atom karbonnya sehingga mempunyai titik lebur yang rendah (Winarno, 2004). Minyak dan lemak tidak larut dalam air, kecuali minyak jarak

(*castor oil*). Minyak dan lemak hanya sedikit larut dalam alkohol, tetapi akan melarut sempurna dalam etil eter, karbon disulfida dan pelarut-pelarut halogen. Ketiga jenis pelarut ini memiliki sifat nonpolar sebagaimana halnya minyak dan lemak netral.

2.5 Asam Lemak

Asam lemak adalah asam organik yang terdapat sebagai ester trigliserida atau lemak, baik yang berasal dari tumbuhan atau hewan. Asam ini adalah asam karboksilat yang mempunyai rantai karbon panjang dengan rumus umum (Poedjiadi, 2006):



Gambar 2.6 Struktur umum asam lemak

Dimana R adalah rantai karbon jenuh atau yang tidak jenuh dan terdiri atas 4 sampai 24 buah atom karbon. Rantai karbon yang jenuh ialah rantai karbon yang tidak mengandung ikatan rangkap, sedangkan yang mengandung ikatan rangkap disebut rantai karbon tidak jenuh. Pada umumnya asam lemak memiliki jumlah atom karbon genap (Poedjiadi, 2006).

Asam lemak terdiri dari asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh. Asam lemak jenuh adalah asam lemak yang semua ikatan antar karbonnya dihubungkan dengan ikatan tunggal kecuali pada gugus karboksilnya, sedangkan posisi lainnya ditempati oleh atom hidrogen. Pada asam lemak tidak jenuh terdapat ikatan rangkap antar dua atom karbonnya. Semakin panjang rantai karbon dari asam lemak maka

semakin tinggi titik leburnya. Asam lemak tidak jenuh mempunyai titik lebur lebih rendah dibandingkan dengan asam lemak jenuh (Poedjiadi, 1994).

Asam lemak adalah komponen unit pembangunan yang sifatnya khas untuk tiap lipid. Asam lemak adalah asam organik berantai panjang yang mempunyai atom karbon 4 – 24, memiliki gugus karboksil tunggal dan ujung hidrokarbon nonpolar yang panjang. Kondisi ini menyebabkan hampir semua lipid bersifat tidak larut di dalam air dan tampak berminyak atau berlemak. Asam lemak tidak terdapat secara bebas atau berbentuk tunggal di dalam sel atau jaringan, tetapi terdapat dalam bentuk yang terikat secara kovalen dari berbagai kelas lipid yang berbeda, sehingga dapat dibebaskan dari ikatan tersebut melalui hidrolisis kimia atau enzimatik. Hampir semua asam lemak di alam memiliki jumlah atom karbon yang genap, tetapi asam lemak dengan jumlah karbon 16 dan 18 adalah yang paling dominan. Asam lemak jenuh yang paling umum dijumpai adalah laurat, miristat, palmitat, dan stearat (Muchtadi, dkk., 1993).

Tabel 2.2 asam lemak tak jenuh (Sumber: Lehninger (1982))

Atom C	Struktur	Nama umum
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Palmitoleat
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Oleat
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Linoleat
18	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Linolenat
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Arakhidonat

2.5.1 Sifat Fisika

Asam lemak jenuh yang mempunyai rantai karbon pendek, yaitu asam butirat dan kaproat mempunyai titik lebur yang rendah, menunjukkan bahwa pada suhu kamar berupa zat cair. Makin panjang rantai karbon, makin tinggi titik leburnya. Asam palmitat dan stearat berupa zat padat pada suhu kamar. Kelarutan asam lemak dalam air berkurang dengan bertambah panjangnya rantai karbon. Asam lemak tak jenuh mempunyai titik lebur lebih rendah dibandingkan dengan asam lemak jenuh (Poedjiadi, 2006).

2.5.2 Sifat Kimia

Asam lemak adalah asam yang lemah. Apabila dapat larut dalam air molekul asam lemak akan terionisasi sebagian dan melepaskan ion H^+ . Dalam hal ini pH larutan tergantung pada konstanta keasaman dan derajat ionisasi masing-masing asam lemak. Garam natrium atau kalium yang dihasilkan oleh asam lemak dapat larut dalam air dan dikenal sebagai sabun. Sabun kalium disebut sabun lunak dan digunakan sebagai sabun bayi (Poedjiadi, 2006).

2.5.3 Metode Ekstraksi Soxhlet

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

Prinsip ekstraksi adalah zat yang akan diekstrak hanya dapat larut dalam pelarut yang digunakan, sedangkan zat lainnya tidak akan larut. Oleh karena itu, pemilihan pelarut yang sesuai akan sangat penting. Gaya yang bekerja dalam proses ekstraksi adalah perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi diluar sel. Bahan pelarut mengalir ke dalam ruang sel sehingga menyebabkan kandungan sel akan berdifusi ke luar sel (Achmadi, 1992). 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).

Ekstraksi soxhlet merupakan salah satu metode ekstraksi berdasarkan jenis sampelnya yaitu ekstraksi padat cair. Ekstraksi soxhlet sering digunakan untuk mengekstrak minyak nabati atau hewani tanpa harus melarutkan sampel menjadi cair. Instrumentasinya meliputi labu alas bulat sebagai tempat hasil ekstraksi, timbel sebagai tempat sampel padat dan kondensor (Dewi, 2005). Prinsip ekstraksi *Soxhlet* ialah pengambilan suatu komponen tertentu menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi yang bersifat kontinu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor) (Darmasih, 1997).

2.5.4 Hidrolisis Minyak

Hidrolisis dalam pengertian luasnya, adalah pemecahan ikatan kimia akibat reaksi air. Hidrolisis ester dan amida terjadi sebagai hasil serangan nukleofilik pada karbon gugus karbonil dan pemecahan lebih lanjut ikatan tunggal karbon-oksigen atau karbon-nitrogen. Karbon pada gugus karbonil lebih positif daripada yang

diperkirakan akibat tingginya elektronegativitas oksigen yang didekatnya (Chairns, 2004).

Reaksi hidrolisis berjalan cukup lambat, tetapi dengan adanya asam atau basa, laju reaksi meningkat dan dapat terjadi dekomposisi yang signifikan (Chairns, 2004).

Gambar 2.7 menunjukkan reaksi hidrolisis trigliserida:

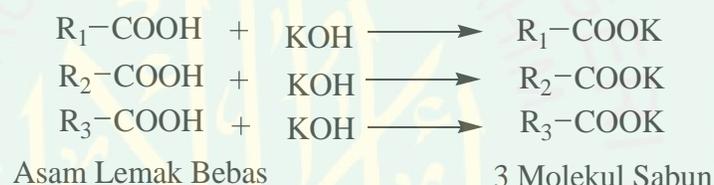


Gambar 2.7 Reaksi hidrolisis trigliserida

Dalam reaksi hidrolisis, minyak akan diubah menjadi asam-asam lemak bebas dan gliserol (Ketaren, 2005). Reaksi hidrolisis dapat terjadi pada lemak yang mengandung asam lemak jenuh dan tidak jenuh. Reaksi hidrolisis dapat dipicu oleh adanya aktivitas enzim lipase atau pemanasan yang menyebabkan pemutusan ikatan ester dan pelepasan asam lemak bebas (Kusnandar, 2010).

Hidrolisis dapat dilakukan menggunakan katalis asam, katalis basa, maupun enzim. Hidrolisis menggunakan basa encer merupakan cara yang lazim digunakan untuk menghidrolisis ester. Ester dipanaskan di bawah refluks dengan basa encer. Ada dua kelebihan utama menggunakan basa encer dibandingkan asam encer yaitu reaksinya berlangsung satu arah dan tidak reversibel dan produknya lebih mudah dipisahkan (Clark, 2007).

Reaksi hidrolisis dilakukan dengan penambahan sejumlah basa seperti KOH atau NaOH. Proses ini dikenal sebagai reaksi penyabunan. Proses penyabunan ini banyak dipergunakan dalam industri (Ketaren, 2005). Pada proses penyabunan (Gambar 2.8), pemberian KOH atau NaOH yang berlebih akan menyebabkan terjadinya penyabunan yang sempurna atau hidrolisis total (Fessenden dan Fessenden 1989, Ketaren 2005). Tetapi apabila jumlah KOH atau NaOH yang digunakan lebih sedikit dari jumlah minyak yang akan dihidrolisis maka tidak semua minyak akan tersabunkan atau disebut juga hidrolisis parsial (Darmoyuwono, 2006).



Gambar 2.8 Reaksi penyabunan asam lemak

Pada proses penyabunan, minyak dipanaskan dan diaduk kemudian basa (alkali) ditambahkan secara perlahan-lahan. Setelah seluruh basa tercampur, pemanasan dilanjutkan pada periode tertentu hingga proses penyabunan (saponifikasi) berlangsung sempurna. Selanjutnya dilakukan pemisahan sabun dengan menambahkan natrium klorida dan produk sabun yang diperoleh dikeringkan. Untuk memperoleh kembali asam lemak, sabun yang terbentuk direaksikan dengan HCl (Tambun, 2006).

2.6 Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa (KG-SM)

Kromatografi gas adalah suatu proses pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya oleh fase gas yang bergerak melalui suatu lapisan serapan sorben dan stasioner (Gritter, 1991). Prinsip kromatografi gas didasarkan atas partisi zat yang hendak dianalisis antara dua fase yang saling kontak tetapi tidak bercampur. Partisi tercapai melalui adsorpsi atau absorpsi atau proses keduanya. Sebagai fase gerak digunakan gas pembawa. Bagian pokok alat kromatografi gas adalah injektor, kolom pemisah, dan detektor (Roth dan Blaschke, 1991).

Dalam kromatografi gas, campuran terpisah dalam bentuk uap dan kemudian dibawa melalui kolom dengan aliran gas inert seperti nitrogen atau helium (gas pembawa). Fase gerak dapat juga berupa campuran gas. Kolom berisi suatu padatan halus, akan memisahkan bahan, yang berupa cairan dan mempunyai volatilitas yang rendah. Cairan atau zat cair ini bertindak sebagai fase diam, yang di dalam kolom akan diperkolasikan pada padatan pendukung. Karena distribusi fase yang selektif dari komponen-komponen campuran diantara fase gerak dan fase diam, komponen-komponen ini bisa bergerak melalui kolom pada kecepatankecepatan yang berbeda dan kemudian terpisah. Proses fisik yang termasuk dalam pemisahan komponen campuran dalam kromatografi gas adalah memisahkan komponen-komponen diantara fase gas dan fase cair (Robert, *et.al*, 1974 dalam Yusniati, 2006).

Sistem kromatografi gas memerlukan sistem tertutup sempurna kecuali pada tempat keluarnya gas. Gas pembawa dari tangki bertekanan, mengalir melalui pengatur tekanan yang mengatur kecepatan alir gas dalam alat tersebut. Cuplikan

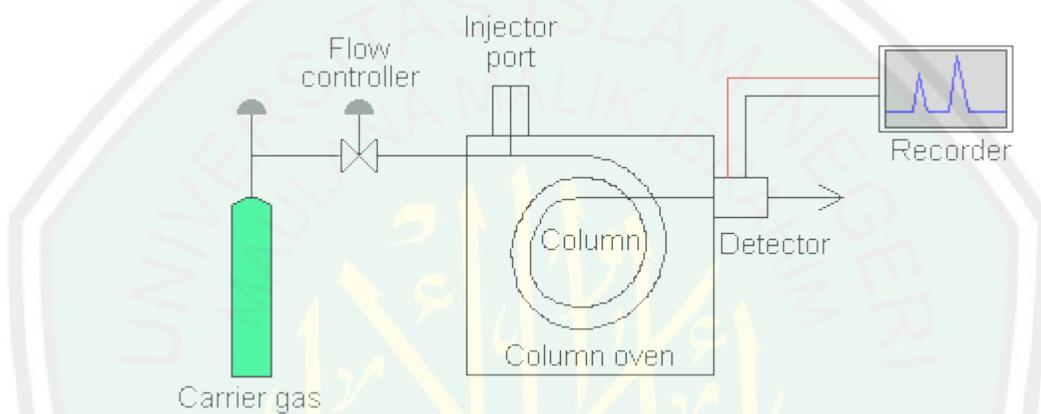
dimasukkan ke dalam suatu kamar pemanas melalui sekat karet silikon dengan “syringe” jika cuplikan berupa cairan, atau jika cuplikan berupa gas digunakan katup khusus untuk cuplikan. Dari sini gas pembawa membawa cuplikan melalui kolom, dimana mereka dipisahkan, dan kemudian melalui detektor dikirimkan isyarat ke pencatat. Kolom perlu dipanasi pada suhu tertentu, demikian juga tempat injeksi dan detektor (Sudjadi, 1988).

Kromatografi gas memiliki beberapa keuntungan, diantaranya memiliki daya resolusi yang tinggi atau dapat memisahkan komponen-komponen yang hampir sama titik didihnya melalui pemilihan fase cairan yang tepat, kepekaan yang tinggi, dan waktu analisis yang singkat. Selain itu, kromatografi gas mudah dioperasikan dengan kemampuan analisis yang tinggi dan mudah mendapatkan data dari rekorder (Fardiaz, 1989).

Spektroskopi masa yaitu metode yang meliputi produksi ion-ion dalam fase gas dari suatu sampel dan hasil pemisahan ion-ion tersebut menurut massanya untuk menghitung rasio (m/e), suatu proses yang analog dengan dispersi (penguraian) cahaya oleh prisma menurut panjang gelombang. Dalam spektroskopi masa, molekul-molekul organik ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion bermuatan positif bertenaga tinggi (ion-ion molekuler / ion-ion induk), yang dapat pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil (ion-ion pecahan / ion-ion anak). Lepasnya elektron dari molekul menghasilkan radikal kation yang dinyatakan sebagai $M M^+$. Ion molekuler M^+ biasanya terurai menjadi sepasang pecahan / fragmen, yang dapat berupa radikal dan ion, atau molekul yang kecil dan radikal kation (fikri, 2010).

2.6.1 Komponen-komponen instrumentasi KG-SM

Suatu kromatograf gas tersusun dari berbagai komponen dalam suatu bingkai khusus. Komponen-komponen ini mencakup injektor, kolom, dan detektor, yang dihubungkan dengan suatu *oven* yang dikontrol secara termostatik yang membuat kolom mampu mencapai suhu tinggi (Gambar. 2.9) (Gandjar, 2012)



Gambar. 2.9 Diagram skematik kromatografi gas (Anonim, 2014)

A. Fase Gerak pada KG dan Pengaturan Aliran

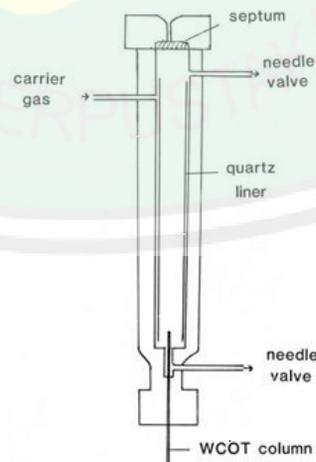
Fase gerak pada KG juga disebut dengan gas pembawa karena tujuan awalnya adalah untuk membawa solut ke kolom, karenanya gas pembawa tidak berpengaruh pada selektifitas. Syarat gas pembawa adalah tidak reaktif, murni/ kering karena kalau tidak murni akan berpengaruh pada detektor, dan dapat disimpan dalam tangki tekanan tinggi (biasanya merah untuk hidrogen dan abu-abu untuk nitrogen) (Gandjar, 2012).

Fase gerak adalah suatu gas yang tersedia di pasaran dengan kemurnian yang sangat tinggi. Gas pembawa harus terbebas dari semua sekelumit hidrokarbon, uap, air,

atau oksigen, karena kesemuanya ini akan merusak fase diam polar atau mengurangi sensitifitasnya. Karena alasan inilah, sistem sistem gas pembawa meliputi suatu penyaring (*filter*) yang mengandung ayakan molekuler untuk menghilangkan air dan sebagai agen untuk mengurangi pengotor-pengotor yang lain (Gandjar, 2012).

B. Injektor (tempat pemasukan sampel)

Komponen KG yang utama selanjutnya adalah ruang suntik untuk pemasukan sampel. Fungsi ruang suntik ini adalah untuk mengantarkan sampel ke dalam aliran gas pembawa. Berbagai macam jenis injektor dan teknik pengantar sampel telah tersedia, sampel yang akan dikromatografi dimasukkan ke dalam ruang suntik melalui gerbang suntik yang biasanya berupa lubang yang ditutupi dengan septum atau pemisah karet. Ruang suntik harus dipanaskan tersendiri (terpisah dari kolom). Suhu ruang suntik diatur 10-15 °C lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum. Jadi seluruh sampel akan menguap segera setelah sampel disuntikkan ke injektor. (Gandjar, 2012).



Gambar 2.10 Injektor (Anonim, 2014)

C. Kolom dan Fase Diam

Kromatografi gas tersusun atas *oven* dengan volume yang mencukupi untuk ditempati satu atau dua kolom secara mudah dan yang dapat memanaskan sampai 400 °C. Suhu harus dikontrol dalam 0,1 °C dengan tujuan untuk memperoleh pemisahan yang reproduibel, baik pada suhu tetap atau pada suhu terprogram (Gandjar, 2012).

Ada 2 jenis kolom yang berbeda dalam kinerjanya, yaitu kolom kemas atau *packed column* dan kolom kapiler atau *capillary column*. Pada kolom kemas, fase diam terdeposit atau terikat dengan reaksi kimia pada pendukung porus. Pada kolom kapiler, suatu lapisan tipis fase diam terdeposit pada permukaan kolom atau terikat pada permukaan bagian dalam kolom (Gandjar, 2012).

D. Detektor

Komponen utama selanjutnya dalam kromatografi gas adalah detektor. Detektor merupakan perangkat yang diletakkan pada ujung kolom tempat keluar fase gerak yang membawa komponen hasil pemisahan. Detektor pada kromatografi adalah suatu sensor elektronik yang berfungsi mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen di dalamnya menjadi sinyal elektron. Pada kromatografi gas-spektroskopi massa, spektrofotometer massa digunakan sebagai detektor. Pada teknik ini, eluen yang keluar dari kolom KG selanjutnya akan masuk ke SM untuk menghasilkan profil spektrum massa untuk tiap komponen. Teknik ini memberikan keuntungan diperolehnya berat molekul komponen yang keluar (Gandjar, 2012).

2.8 Uji Toksisitas

Toksisitas (*toxicity*) merupakan ukuran relatif derajat racun antara satu bahan kimia terhadap bahan kimia lain pada organisme yang sama kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005: 13). Depnaker (1988) dalam Cahyono (2004) menyatakan bahwa toksisitas adalah kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup.

Kadar racun suatu zat kimia salah satunya dinyatakan dengan istilah LC_{50} (*Lethal Concentration-50*). LC_{50} adalah kadar atau konsentrasi suatu zat, yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji (part per million atau ppm), yang dapat menyebabkan 50 % kematian pada binatang percobaan dari suatu kelompok spesies setelah binatang percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004).

Senyawa bioaktif hampir selalu toksik pada dosis tinggi. Daya bunuh *in vivo* dari senyawa terhadap organisme hewan sehingga dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dan untuk memonitor fraksi bioaktif selama fraksinasi dan pemurnian. Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk hewan uji tersebut adalah brine shrimp (Lenny, 2006).

Brine shrimp test (BST) merupakan pengujian senyawa secara umum yang dapat mendeteksi beberapa bioaktivitas dalam suatu ekstrak. Korelasi positif ditemukan antara toksisitas BST dan sitotoksik terhadap 9 kB sel karsinoma nasofaring manusia maupun untuk sel P-388 leukemia secara *in vivo*. Bioaktivitas

yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode BST diantaranya adalah antikanker, antitumor, antimalaria, antimikroba, immunosuppressive, antifeedant dan residu pestisida (Colegate dan Molyneux, 2007).

Tabel 2.4 Kriteria Toksisitas (Meyer *et al.*, 1982)

Nilai LC ₅₀	Kriteria
Lebih dari 1000 ppm	tidak toksik
200 – 1000 ppm	pestisida
30 – 200 ppm	antimikroba
0 – 30 ppm	antikanker

Artemia salina sering digunakan sebagai hewan uji toksisitas. Telur *Artemia salina* dapat bertahan dalam kondisi kering dan dapat disimpan cukup lama. Telur ini bila diberi air laut pada suhu 23° C maka ia akan menetas dalam 1-2 hari dan dapat langsung digunakan dalam uji toksisitas. Uji toksisitas pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji yang dapat dilihat hanya berupa immobilisasi ke dalam tiap tabung berisi konsentrasi toksikan yang berbeda dimasukkan 10 ekor hewan uji, disertai dengan tabung kontrol. Immobilisasi ini sudah dianggap sebagai kematian untuk hewan uji seperti *Artemia salina*. LC₅₀ diperoleh dengan ekstrapolasi kurva (Soemirat, 2005).

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) adalah salah satu metode skrining untuk menentukan sifat toksik suatu senyawa atau ekstrak secara akut dengan menggunakan hewan coba *Artemia salina* L (Hendrawati, 2009). *Artemia salina* L. termasuk *crustaceae* yang ukurannya mencapai 1 – 2 cm. Dapat ditemukan pada air yang

slinitasnya tinggi, seperti danau asin, air laut, tidak dapat hidup di air tawar. Daur hidup *Artemia salina* L. memerlukan waktu sekitar 25 hari (Kristanti, dkk., 2008).



Gambar 2.11 *Artemia salina* (Beel, 2009)

Penetasan telur *Artemia salina* L. yang baik perlu memperhatikan beberapa faktor yaitu: hidrasi dari kista-kista, aerasi, penyinaran, suhu, derajat keasaman (pH), dan kepadatan telur dalam media penetasan. Klasifikasi *Artemia salina* adalah sebagai berikut (Hendrawati, 2009):

Filum : Arthropoda

Kelas : Crustacea

Bangsa : Anostraca

Suku : Artemidae

Marga : Artemia

Jenis : *Artemia salina*

Artemia salina diperjualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Kista ini apabila dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulatan-

bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter berkisar antara 200-350 mikron. Satu gram kista *Artemia* kering rata-rata terdiri atas 200.000-300.000 butir kista. Kista yang berkualitas baik akan menetas antara 18-24 jam apabila diinkubasikan dalam air bersalinitas 5-70 permil. Ada beberapa tahapan proses penetasan *Artemia* ini yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap *paying* atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga air kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul dengan tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang (Setiawan, 2010).

2.9 Analisis Probit

Toksisitas serta sifat bioaktif dari larva udang *Artemia salina* digambarkan melalui nilai Lethal Concentration 50 % (LC_{50}), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi suatu zat yang dapat menyebabkan kematian pada populasi hewan uji sampai 50 %. LC_{50} merupakan bentuk statistik yang didesain untuk menggambarkan respon yang mematikan komponen dalam beberapa populasi dari suatu percobaan. Salah satu metode statistika yang digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} adalah dengan menggunakan analisis probit. Analisis yang dikemukakan oleh Finney pada tahun 1971 ini dilakukan dengan menguji respon suatu organisme terhadap senyawa kimia dalam konsentrasi yang bervariasi. Hubungan antara respon dan variasi konsentrasi senyawa kimia berbentuk sigmoid. Analisis probit berfungsi untuk mengubah hubungan yang sigmoid menjadi linear (Kanwar, 2007).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah labu kultur 1000 mL, lampu TL 36 Watt, timer, kuvet, hot plate, sentrifuse, neraca analitik, seperangkat alat gelas, *rotary evaporator vacumm*, termometer, penangas air dan minyak, seperangkat ekstraktor Soxhlet, seperangkat alat refluks, desikator, pendingin (*freezer*), oven, lemari asam, *magnetic stirrer*, tabung gas N₂, Instrumen Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM), desikator, pengaduk, gelas arloji, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet mikro.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi. Bahan yang digunakan untuk kultivasi *Chlorella sp.* adalah taugé kacang hijau dan aquades. Bahan-bahan kimia yang

digunakan untuk ekstraksi minyak *Chlorella sp.* adalah n-heksana. Sedangkan untuk hidrolisis minyak *Chlorella sp.* adalah KOH 12 %, metanol, H₂SO₄ 1 M, aquades dan n-heksana.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji toksisitas diantaranya adalah air laut, ragi roti, dimetil sulfooksida (DMSO), hewan uji *Artemia salina* yang berasal dari telur *Artemia salina*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 2 tahapan, tahap pertama adalah ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dan tahap kedua adalah uji toksistas minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*. Langkah awal yang dilakukan adalah kultivasi. Selanjutnya isolasi minyak *Chlorella sp.* dengan metode Soxhlet menggunakan pelarut n-heksana. Minyak yang diperoleh dihidrolisis menggunakan katalis basa KOH 12 % dalam pelarut metanol. Pemisahan asam lemak dilakukan dengan corong pisah dan diambil fase organik. Fase organik yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan pengurangan tekanan. Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂. Selanjutnya minyak dan asam lemak yang diperoleh diuji toksisitasnya dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* yaitu dengan menggunakan larva udang *Artemia Salina* L. dengan variasi konsentrasi 50, 100, 200, 500 dan 1000 ppm. Setelah itu dihitung nilai LC₅₀ menggunakan analisis probit dan diidentifikasi asam lemak *Chlorella sp.* menggunakan KG-SM untuk mengetahui jenis asam lemak apa saja yang terkandung dalam *Chlorella sp.*

3.4 Tahapan Penelitian

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
 - a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET).
 - b. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge.
 - c. Penghitungan jumlah sel mikroalga *Chlorella sp.*
 - d. Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* pada fase awal stasioner.
2. Preparasi sampel biomassa *Chlorella sp.*
3. Analisis kadar air mikroalga *Chlorella sp.* fase awal stasioner.
4. Ekstraksi Soxhlet mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut n-heksana
5. Hidrolisis minyak *Chlorella sp.* dengan KOH 12 %.
6. Uji toksisitas minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*
 - a. Penetasan larva udang *A. salina*.
 - b. Uji toksisitas.
7. Identifikasi golongan asam lemak *Chlorella sp.* dengan KG-SM.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (Prihantini, dkk., 2005).

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET (b/v) yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL aquades yang mendidih selama 1 jam. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam aquades dengan masing-masing konsentrasi 4 % (v/v) dengan pH 7.

3.5.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (Prihantini, dkk., 2005).

Sebanyak 100 mL kultur *Chlorella sp.* diinokulasikan ke dalam 600 mL medium ekstrak tauge. Labu kultur 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.

3.5.1.3 Penghitungan Jumlah Sel Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikultivasi diambil menggunakan mikro pipet dan diteteskan pada alat *Haemocytometer*. Jumlah sel *Chlorella sp.* yang ada dalam kotak hitung *Haemocytometer* dihitung kemudian Jumlah sel yang diperoleh selanjutnya dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Eaton, *et al.*, 2005 dalam Merizawati, 2008) :

$$N = n \times \frac{16}{\sum_{i=1}^{16} Kbi} \times \frac{1}{10^{-4}} \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan : N = Kelimpahan individu (sel/mL)

n = Jumlah sel

16 = Jumlah kotak kecil

$\sum_{i=1}^{16} Kbi$ = Jumlah kotak kecil yang diamati pada *Haemocytometer*

10^{-4} = Volume air sampel yang menutupi 1 kotak besar pada

Haemocytometer.

3.5.1.4 Pemanenan *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikultivasi dan mencapai fase awal stasioner dipanen dengan cara disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga terpisah antara biomassa dengan filtrat. Bagian biomassa *Chlorella sp.* diambil untuk selanjutnya dianalisis kadar air dan diekstraksi secara Soxhletasi.

3.5.2 Preparasi Sampel

Biomassa *Chlorella sp.* ditempatkan pada cawan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 30 – 35 °C selama 24 jam kemudian ditimbang biomassa *Chlorella sp.* kering.

3.5.3 Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.* (AOAC, 1984).

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. Serbuk mikroalga *Chlorella sp.* diambil 5 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 ± 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):

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.2)$$

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:

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots (3.3)$$

% Kadar air terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

3.5.4 Ekstraksi Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode ekstraksi Soxhlet menggunakan pelarut n-heksana 400 mL untuk isolat mikroalga sebanyak 50 gram (Wati dan Sylvia, 2010). Isolat dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor soxhlet. Kemudian dirangkai tabung ekstraktor soxhlet dengan labu alas bulat. Selanjutnya diletakkan labu alas bulat pada pemanas. Ditambahkan pelarut n-heksana melalui tabung ekstraktor hingga mengalir masuk ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya dipasangkan kondensor pada tabung ekstraktor dan dilakukan proses Soxhletasi hingga mengalami 12 kali siklus sehingga didapatkan ekstrak kasar n-heksana (Fasya, 2011). Kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut selama proses ekstraksi minyak mikroalga. Tahap selanjutnya dilakukan pengeringan terhadap ekstrak pekat minyak mikroalga *Chlorella sp.* dengan aliran gas N₂ dan dilakukan penimbangan untuk mengetahui berat minyak yang didapatkan.

3.5.5 Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.* (Fasya, 2011).

Asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* dapat diperoleh dari minyak mikroalga *Chlorella sp.* melalui proses penyabunan. Sebanyak 15 gram minyak hasil isolasi dengan pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan 30 mL metanol dan KOH 12 %. Direfluks pada suhu 60 °C selama 90 menit. Selanjutnya ditambahkan 45 mL aquades dan 18,75 mL n-heksana, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan (fase organik dan fase air). Fase air diambil dan ditambahkan dengan H₂SO₄ 1 M hingga pH-nya menjadi 1. Setelah itu ditambahkan n-heksana sebanyak 50 mL, kemudian dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah. Fase organik yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan pengurangan tekanan. Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂.

3.5.6 Uji Toksisitas

3.5.6.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* L. (Halimah, 2010).

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *A. salina* kemudian diaerasi dan telur akan menetas dalam waktu ± 48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas.

3.5.6.2 Uji Toksisitas (Rita *et al.*, 2008)

Uji toksisitas dilakukan pada minyak, asam lemak *Chlorella sp.* dan kontrol yang digunakan adalah kontrol DMSO, ragi roti dan pelarut n-heksana. Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Minyak dan Asam lemak masing-masing ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut n-

heksana sebanyak 10 mL sehingga diperoleh larutan stok 10000 ppm. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet sebanyak 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L, 1000 μ L kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering.

Selanjutnya ditambahkan 100 μ L dimetil sulfooksida (DMSO), setetes larutan ragi roti (3 mg ragi roti dalam 5 mL akuades), dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 50, 100, 200, 500 dan 1000 ppm.

Kontrol pelarut n-heksana dibuat dengan 1000 μ L pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Ditambahkan 100 μ L dimetil sulfo oksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol DMSO dibuat dengan 100 μ L DMSO dimasukkan ke dalam botol vial. Ditambahkan setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol larutan ragi roti dibuat dengan setetes larutan ragi roti dimasukkan ke dalam botol vial. Ditambahkan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut

dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Selanjutnya semua labu ukur diletakkan dibawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang (Meyer, *et al.*, 1982). Kemudian di hitung jumlah larva udang yang mati. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai LC_{50} dengan analisis probit. Bila ada kematian pada kontrol dikoreksi dengan rumus sebagai berikut (Meyer, *et al.*, 1982):

$$\% \text{ kematian} = \frac{Tes-Kontrol}{Kontrol} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.5)$$

3.5.7 Analisis Asam Lemak dengan KG-SM

Analisis asam lemak *Chlorella sp.* menggunakan KG-SM QP2010S SHIMADZU. Sampel asam lemak yang telah diesterifikasi yaitu asam lemak hasil hidrolisis. Metil ester *Chlorella sp.* yang telah pekat tersebut diambil sebanyak 1 μ L kemudian diinjeksikan dalam instrument KG-SM yang telah dikondisikan sebagai berikut:

Jenis kolom	: Rastek RXi-5MS
Panjang kolom	: 30 meter
ID	: 0,25 mm
Gas Pembawa	: Helium
Sistem ionisasi	: Electron impact (EI)
Energi ionisasi	: 70 ev
Suhu kolom	: 80 °C
Suhu injector	: 310 °C
Injection mode	: Split
Tekanan gas pembawa	: 16,5 kPa
Kec. aliran gas	: 0,5 mL/Menit
Suhu detektor	: 250 °C

Hasil rekorder berupa kromatogram KG digunakan untuk menentukan analit komponen utama asam lemak *Chlorella sp.* dan spektra SM digunakan untuk menentukan struktur senyawa analit komponen utama asam lemak *Chlorella sp.*

3.6 Analisis Data

Data hasil uji toksisitas yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat toksisitas larva udang *Artemia salina L.* dapat diketahui dengan melakukan uji LC_{50} menggunakan analisis probit dengan program MINITAB 16 yang memiliki selang kepercayaan 95 %. Identifikasi jenis asam lemak yang terdapat dalam asam lemak hasil hidrolisis dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan KG-SM.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Medium ekstrak tauge (MET) dibuat dengan melakukan perebusan tauge kacang hijau dalam air mendidih selama ± 1 jam atau hingga volume air menjadi setengahnya. MET yang diperoleh dari hasil perebusan tauge kacang hijau berupa cairan agak kental berwarna kuning kecoklatan. MET yang digunakan dalam kultivasi mikroalga *chlorella sp* ini adalah MET 4 %. MET 4 % diperoleh dengan mengencerkan air hasil rebusan tauge kacang hijau tersebut dengan akuades. Hasil dari pengenceran diperoleh cairan yang berwarna kuning-bening dan tidak kental.

Prihantini, *et al.*, (2007) menyebutkan bahwa MET merupakan media alami yang digunakan untuk menumbuhkan mikroalga *chlorella sp.* yang memiliki banyak keunggulan yaitu mudah diperoleh, aman digunakan dan ekonomis. Selain itu, MET juga mengandung banyak nutrisi penting yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* MET mengandung nutrisi anorganik yang terdiri dari makronutrien dan mikronutrien yang dibutuhkan oleh sel *Chlorella sp.* sebagai komponen penyusun sel, sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil serta membantu mengefektifkan fotosintesis pada mikroalga (Wulandari, *et al.*, 2010).

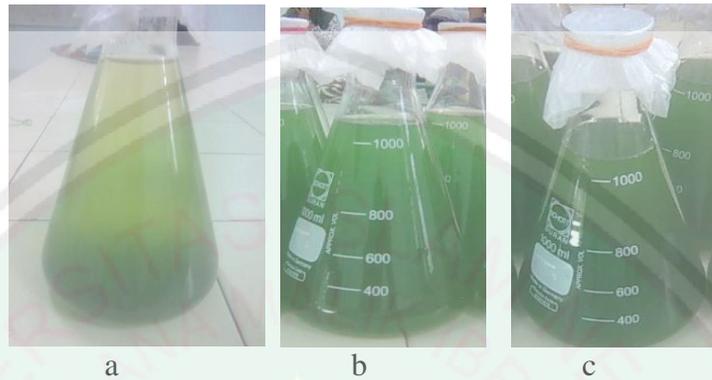
4.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* Dalam Medium Ekstrak Tauge

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan untuk menumbuhkan *Chlorella sp.* di dalam medium ekstrak tauge. Tujuan utamanya adalah untuk menumbuhkan *chlorella sp.*, sehingga diperoleh metabolit primer yang terkandung di dalam biomassa *chlorella sp.*.

Langkah awal yang harus dilakukan adalah melakukan sterilisasi alat-alat yang akan digunakan dalam kultivasi. Sterilisasi disini dilakukan untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi baik dari bakteri maupun dari bahan-bahan lain, agar yang tumbuh dalam proses kultivasi ini merupakan *chlorella sp.* bukan bakteri atau jamur. Selanjutnya setelah dilakukan sterilisasi, sebanyak 100 mL isolat *Chlorella sp.* diinokulasikan ke dalam 600 mL Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % dalam labu kultur. Diletakkan labu kultur tersebut dalam rak kultur dengan pencahayaan lampu 36 Watt. Pencahayaan ini dimaksudkan untuk menunjang pertumbuhan *Chlorella sp.* karena cahaya merupakan faktor penting yang dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Pencahayaannya diberikan dengan intensitas 10 jam gelap dan 14 jam terang dimaksudkan agar reaksi gelap dan reaksi terang dalam proses fotosintesis dapat berlangsung maksimal.

Kultivasi dilakukan selama 8 hari. Selama kultivasi, mikroalga *chlorella sp.* mengalami perubahan warna dari hijau muda menjadi hijau tua atau semakin hari semakin pekat warna hijaunya. Perubahan warna ini juga menunjukkan meningkatnya jumlah sel *chlorella sp.* yang semakin hari semakin padat jumlahnya. Meningkatnya jumlah sel juga ditandai dengan semakin banyaknya endapan hijau

pekat yang muncul didasar botol kultur. Gambar 4.1 menunjukkan perubahan yang terjadi pada hari ke 1, 4 dan 8.

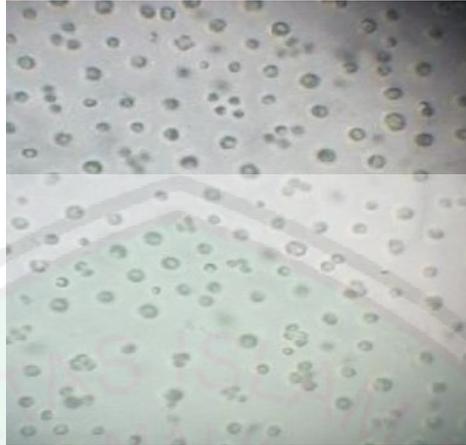


Gambar 4.1 Kultivasi mikroalga pada a. hari ke-1, b. hari ke-4, c. hari ke-8

Dari Gambar 4.1 tersebut dapat dilihat bahwa dengan bertambahnya hari, warna mikroalga *Chlorella sp.* semakin pekat. Endapan yang muncul juga semakin banyak. Warna hijau pada *Chlorella sp.* tersebut ditimbulkan oleh pigmen yang terkandung di dalam sel *Chlorella sp.* Sel *Chlorella sp.* mengandung pigmen berupa karoten, xanthofil, serta klorofil a dan b dalam jumlah yang besar (Volesky, 1970 dalam Rostini, 2007).

4.1.3 Penghitungan Jumlah Sel Mikroalga *Chlorella sp.*

Penghitungan jumlah sel ini dilakukan untuk mengetahui kepadatan jumlah sel yang terjadi pada hari ke-7, 8, 9 atau yang terjadi pada akhir fase eksponensial. Penghitungan ini dilakukan pada hari ke-7, 8, dan 9 menggunakan *haemocytometer*. Penghitungan jumlah sel dapat dilihat pada Gambar 4.2.

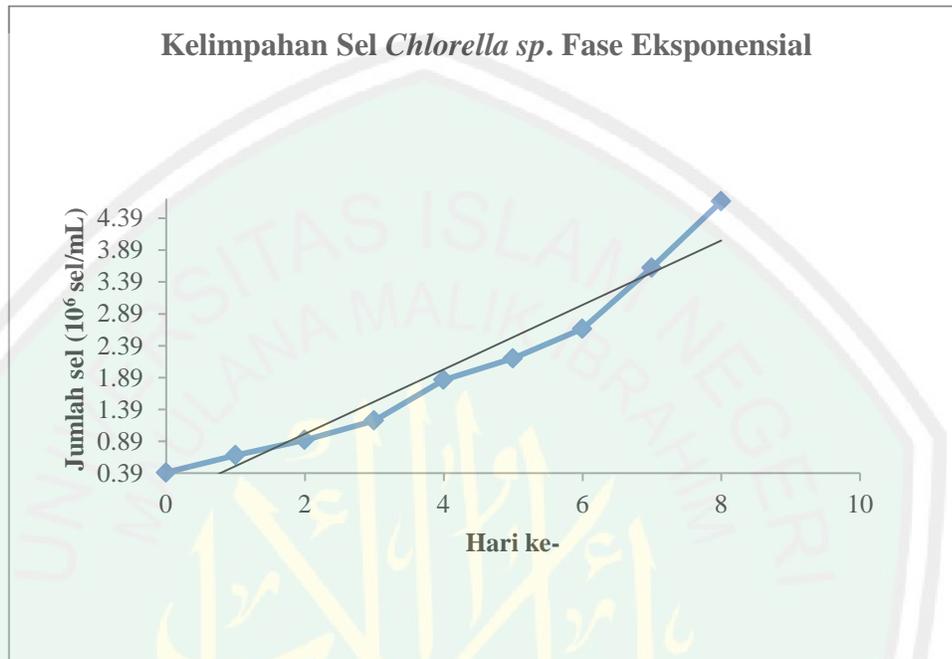


Gambar 4.2 Sel *Chlorella sp.*.

Khamidah (2013), menyebutkan bahwa kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET menunjukkan bahwa fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8. Fase stasioner dimulai pada hari ke-8 sampai hari ke-11, sedangkan pada hari ke-11 dan seterusnya merupakan fase kematian. Fase eksponensial yang terjadi pada hari ke-0 sampai hari ke-8 ditandai dengan naiknya laju pertumbuhan *Chlorella sp.* yaitu kelimpahan sel yang semakin meningkat dari hari ke-0 sampai hari ke-8. Penghitungan ini dilakukan untuk mengetahui apakah kelimpahan sel pada fase eksponensial itu terjadi pada hari ke-8.

Hasil dari penghitungan jumlah sel menggunakan *haemocytometer* diperoleh jumlah sel pada hari ke-7, 8 dan 9 berturut-turut adalah 42.240.000 sel/mL, 47.840.000 sel/mL, 48.160.000 sel/mL. Hasil dari penghitungan ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Khamidah (2013), yang mana jumlah sel mikroalga *chlorella sp.* mengalami peningkatan pada hari ke-7, 8 dan 9. Hasil penelitian yang dilakukan oleh

Khamidah (2013) adalah 3.616.000 sel/mL pada hari ke-7, pada hari ke-8 adalah 4.656.000 sel/mL, dan pada hari ke-9 adalah 4.784.000 sel/mL.



Gambar 4.3 Fase eksponensial mikroalga *Chlorella sp.* (Khamidah 2013)

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa kelimpahan sel pada hari ke-7 menjadi hari ke-8 mengalami peningkatan yang cukup tinggi hal ini dikarenakan pada hari ke-7 dan 8 mikroalga *chlorella sp.* berada dalam fase eksponensial. Hal ini menunjukkan bahwa pada fase eksponensial, sel *Chlorella sp.* mengalami pembelahan aktif karena tersedianya nutrisi dan pencahayaan yang cukup baik sehingga proses pertumbuhannya maksimal. Namun pada hari ke-9 atau memasuki pada fase stasioner, peningkatan jumlah sel mikroalga *chlorella sp.* tidak terlalu banyak hal ini disebabkan oleh berkurangnya nutrisi yang tersedia, sehingga pada penelitian ini pemanenan dilakukan pada hari ke-8.

Pemanenan dilakukan pada fase eksponensial karena senyawa yang akan di ekstrak merupakan senyawa metabolit primer. Metabolit primer terbentuk pada fase eksponensial. Dan dilakukan diakhir fase karena diharapkan senyawa metabolit primer telah terbentuk secara maksimal pada akhir fase eksponensial.

Pemanenan dilakukan dengan mengambil bagian biomassa *Chlorella sp.* yaitu dengan cara disentrifuse pada 3000 rpm selama 15 menit dengan suhu 25 °C. Bagian hasil kultivasi yang diambil adalah endapan yang muncul di dasar botol kultur. Hasil yang diperoleh dari proses sentrifugasi berupa pelet berwarna hijau tua dengan tekstur yang masih cukup berair. Total biomassa yang diperoleh dari 5 L kultur *Chlorella sp.* adalah 240,7925 gram biomassa basah. Hasil pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Proses sentrifugasi a. Mikroalga sebelum disentrifugasi, b. Mikroalga setelah disentrifugasi

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa setelah di lakukan sentrifugasi diperoleh biomassa yang lebih kental. Warna dari biomassa juga tampak lebih hijau pekat

karena kumpulan dari sel-sel mikroalga yang mengendap di dasar botol kultur telah terkumpul menjadi satu.

4.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan pengeringan biomassa *Chlorella sp.* menggunakan oven pada suhu 35 °C selama ± 24 jam. Proses pengeringan dilakukan untuk mengurangi kandungan air dalam sampel biomassa *Chlorella sp.*, sehingga selanjutnya tidak akan mengganggu proses ekstraksi. Selain itu, pengeringan ini juga bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jamur saat penyimpanan sampel sehingga komposisi kimia dalam sampel tetap terjaga. Sampel biomassa *Chlorella sp.* yang telah kering sudah berbentuk serbuk halus sehingga pada saat ekstraksi Soxhletasi, kontak antara sampel dengan pelarut sudah cukup maksimal. Hasil rendemen pengeringan biomassa basah *Chlorella sp.* adalah 4,812 % yaitu dari ± 834 gram biomassa basah, setelah dikeringkan diperoleh $\pm 40,13$ gram biomassa kering yang telah berbentuk serbuk halus.

4.3 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air dilakukan untuk mengetahui banyaknya air yang terkandung di dalam suatu bahan atau sampel. Prinsipnya yaitu menghilangkan air yang terkandung dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu di atas titik didih air yaitu 100 – 105 °C hingga diperoleh berat konstan (Winarno, 2002). Perbedaan berat sampel yang diperoleh sebelum dan sesudah pengovenan menunjukkan banyaknya air yang telah diuapkan.

Analisis kadar air ini dilakukan pada sampel kering. Hal ini dilakukan karena yang diekstraksi merupakan sampel kering sehingga yang dianalisis kadar airnya adalah sampel kering. Kandungan air dalam sampel yang akan diekstraksi akan mempengaruhi proses ekstraksi, karena semakin rendah kadar air suatu sampel maka komponen aktif yang ada dalam sampel akan mudah terekstrak oleh pelarut.

Hasil perhitungan kadar air mikroalga *chlorella sp.* kering adalah 9,457 %. Persen kadar air mikroalga *chlorella sp.* kering ini sudah cukup bagus karena kategori jumlah kadar air yang bagus adalah di bawah 10 %. Kadar air di bawah 10 % akan membantu dalam proses penyimpanan sampel. Komposisi kimia dalam sampel tetap terjaga dan tidak mudah ditumbuhi jamur. Kadar air biomassa kering ini juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya. Khamidah (2013) juga menyebutkan bahwa kadar air sampel kering *Chlorella sp.* adalah sebesar 10,899 %.

4.4 Ekstraksi Soxhlet Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi merupakan metode pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutan terhadap dua cairan yang tidak saling larut (Khopkar, 2008). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi soxhlet.

Ekstraksi pertama mikroalga *chlorella sp.* menggunakan metode ekstraksi soxhlet. Adapun prinsip utama dalam soxhletasi adalah pengambilan suatu komponen tertentu menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi yang bersifat kontinu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor) (Darmasih, 1997).

Minyak merupakan senyawa trigliserida yang larut dalam pelarut non polar, karenanya dalam ekstraksi soxhlet digunakan pelarut n-heksana (non polar). Metode ekstraksi soxhlet merupakan metode ekstraksi minyak yang sangat efisien karena pelarut dapat digunakan secara berulang-ulang, sehingga tidak membutuhkan pelarut dalam jumlah yang banyak. Pelarut yang dimasukkan dalam labu alas bulat akan menguap dan akan mengembun membasahi sampel yang berada pada ekstraktor soxhlet. Sampel dibungkus menggunakan kertas saring sehingga akan terjadi ekstraksi. Pelarut akan berinteraksi dengan sampel selama beberapa waktu hingga campuran pelarut dan minyak yang terekstrak turun ke dalam labu alas bulat dan mengalami pemanasan kembali.

Proses ekstraksi akan terjadi berkali-kali, dalam penelitian ini proses ekstraksi dilakukan selama ± 6 jam dengan 1 kali siklus 13 menit. Selama proses ekstraksi terjadi, ekstrak yang turun ke labu alas bulat semakin jernih sehingga ekstrak yang berada dalam labu alas bulat semakin pekat. Kepekatan warna ekstrak ini menunjukkan bahwa minyak yang telah terekstrak dalam pelarut semakin banyak.

Mikroalga *chlorella sp.* diekstraksi soxhlet menggunakan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:8. Penggunaan pelarut n-heksana berdasarkan penelitian Rachmaniah, dkk (2010), yang melakukan penelitian mengenai pemilihan metode ekstraksi minyak alga dari *Chlorella sp.*. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa metode yang efektif dalam mengekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.* adalah metode soxhletasi dengan pelarut n-heksana pada *Chlorella sp.* kondisi kering.

Ekstrak yang diperoleh dari proses soxhletasi berupa campuran minyak dan pelarut n-heksana. Untuk menghilangkan pelarut dalam penelitian ini cukup diletakkan di dalam lemari asam selama ± 10 jam karena volume pelarutnya yang tidak terlalu banyak. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya dialiri gas N_2 untuk menguapkan sisa pelarut yang masih ada. Hasil ekstraksi minyak mikroalga *chlorella sp.* ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Minyak hasil ekstraksi

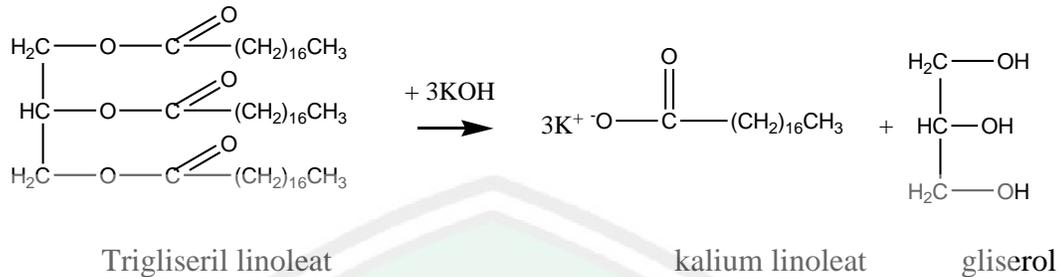
Gambar 4.5 menunjukkan rendemen hasil ekstraksi minyak mikroalga *chlorella sp.* menggunakan ekstraktor soxhlet dengan pelarut n-heksana. Hasil dari ekstraksi diperoleh minyak dengan rendemen 5,2407 %, dengan kata lain dari 38,2 gram sampel mikroalga *chlorella sp.* kering diperoleh minyak sebanyak 1,9987 gram. Minyak yang diperoleh berwarna coklat kekuningan.

Hasil rendemen menunjukkan bahwa rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rachmaniah, (2010) yaitu 16,57 %. Hal ini dimungkinkan karena kurang lamanya waktu sirkulasi yang terjadi. Satu siklus dalam penelitian ini terjadi dalam waktu 13 menit, sehingga pelarut tidak dapat mengikat minyak secara maksimal sehingga rendemen yang dihasilkan kurang maksimal.

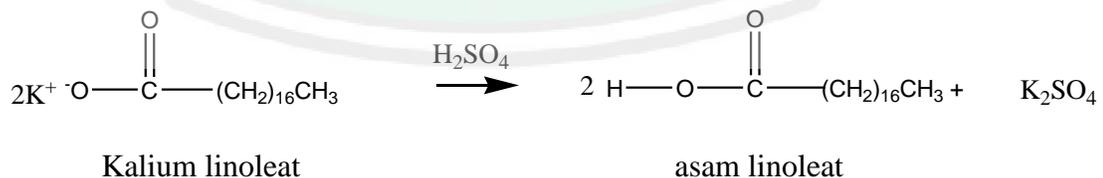
4.5 Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

Minyak mikroalga *chlorella sp.* merupakan trigliserida yang akan terhidrolisis menjadi asam-asam lemak bebas dan gliserol. Prinsip dari hidrolisis adalah peruraian suatu senyawa dengan cara memutus ikatan glikosida menggunakan air dan katalis basa atau asam. Hidrolisis minyak mikroalga *chlorella sp.* ini dilakukan dengan menggunakan katalis basa (KOH) dan pelarut metanol. Kawaroe, dkk. (2010) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa kandungan terbesar yang dimiliki oleh mikroalga *chlorella sp.* adalah asam linoleat sehingga untuk menentukan volume KOH yang digunakan dibuat dengan perhitungan trigliserida yang bereaksi adalah gliseril trilinoleat.

Sebanyak 1,5 gram minyak mikroalga *chlorella sp.* dimasukkan ke dalam labu alas bulat kemudian ditambahkan 3,33 ml KOH 12 %. Kemudian ditambahkan metanol sebanyak 5 mL. Campuran direfluks pada suhu 60 °C selama 90 menit disertai pengadukan menggunakan *stirer*. Penambahan metanol dilakukan karena adanya perbedaan sifat kepolaran antara KOH dengan trigliserida. KOH bersifat polar dan trigliserida bersifat non polar. Sehingga dibutuhkan medium perantara untuk menurunkan perbedaan sifat kepolaran tersebut. KOH memiliki kelarutan yang baik dalam metanol selain itu metanol juga memiliki kepolaran diantara KOH dan trigliserida karena tingginya perbedaan kepolaran menyebabkan kontak dengan asam lemak sangat sedikit sehingga produk yang diperoleh juga sedikit (Insani, 2010). Reaksi yang terjadi pada saat penambahan KOH yaitu:



Hasil dari hidrolisis adalah kalium asam lemak yang dapat larut dalam air. Busa akan muncul pada saat ekstraksi dengan corong pisah, hal ini menunjukkan bahwa kalium (sabun) telah terbentuk atau telah terjadi hidrolisis. Kalium linoleat dalam penelitian ini berbentuk cair karena adanya penambahan KOH 12 % yang berlebih. Pada penelitian ini penambahan KOH 12 % dilakukan tidak secara bertahap sehingga ketika KOH 12 % di masukkan ke dalam labu alas bulat yang di dalamnya telah terdapat minyak sebanyak 1,2 g terbentuk 2 lapisan dan tidak saling bercampur. Lapisan ini bercampur ketika *stirer* dinyalakan dan dilakukan pemanasan. Ketika pengadukan dengan *stirer* dihentikan, lapisan kembali terbentuk. Asam lemak dapat diperoleh dengan melakukan penambahan asam sulfat. Penambahan asam sulfat ini dilakukan hingga pH 1 untuk memastikan semua garam telah berubah menjadi asam lemak (Fasya, 2011). Reaksi yang terjadi pada saat penambahan asam sulfat yaitu:

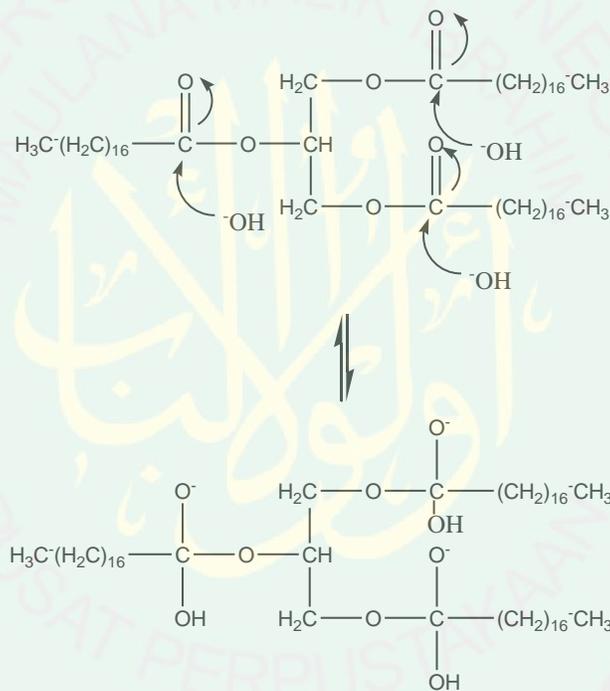


Reaksi hidrolisis minyak berkatalis basa berlangsung melalui mekanisme serangan nukleofilik yang terdiri dari 2 tahap. Tahap pertama, yang berjalan lambat

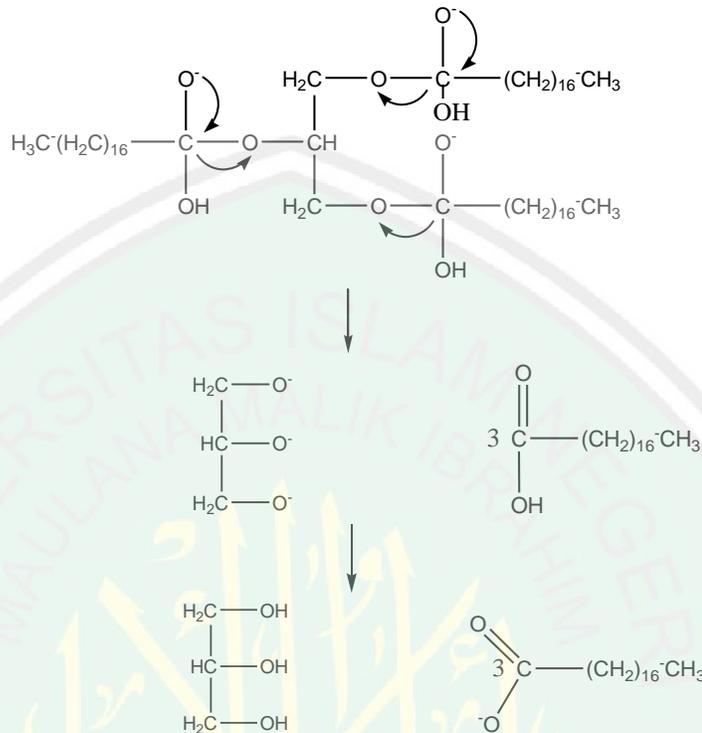
yaitu adisi OH^- pada gugus karbonil. Sedangkan tahap kedua yaitu eliminasi gugus OR' dan transfer proton yang berjalan cepat (Fasya, 2011).

Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis yang terjadi pada trigliseril linoleat dapat dilihat pada Gambar 4.6. dari gambar tersebut terdapat dua tahapan reaksi yang terjadi pada saat hidrolisis.

Tahap 1



Tahap 2



Gambar 4.6 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis trigliseril linoleat

Dari Gambar 4.6 dapat dilihat bahwa pada tahap 1 terjadi reaksi adisi nukleofilik dimana terdapat asam lewis yaitu gugus karbonil. Atom oksigen yang terikat mempunyai muatan negatif sebagian (δ^-) dan karbon yang bermuatan positif sebagian (δ^+) hal ini terjadi karena adanya gugus karbonil yang terpolarisasi secara kuat. Atom karbon adalah elektrofilik yang dapat diserang oleh nukleofil yang bermuatan negatif (OH^-), sehingga dipol karbonil ($\delta^+\text{C}$) dapat menerima pasangan elektron hidroksida dan membentuk intermediet.

Hidrolisis minyak dilakukan dengan katalis basa KOH 12 %. Hasil dari proses hidrolisis ini, rendemen yang diperoleh adalah sebesar 80 % atau dengan kata lain

dari 1,5 g minyak hasil ekstraksi diperoleh 1,2 g asam lemak. Fasya (2011), menyebutkan bahwa rendemen asam lemak yang diperoleh dari hasil hidrolisis minyak biji selasih adalah sebesar 75,01 %, sehingga dapat dikatakan bahwa proses hidrolisis dalam penelitian ini telah berhasil karena rendemen yang diperoleh cukup tinggi.

4.6 Uji Toksisitas

4.6.1 Penetasan Larva Udang

Penetasan larva udang *artemia salina* merupakan langkah awal yang dilakuakn sebelum melakukan uji toksisitas. Telura *artemia salina* ditetaskan dalam air laut selama 48 jam sambil diaerasi dan diberi pencahayaan. Proses penetasan telur *artemia salina* terjadi melalui beberapa tahapan. Tahapan-tahapan yang terjadi yaitu tahap hidrasi, pecahnya cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Pada tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga telur yang sudah diawetkan dan kering akan menjadi bulat dan metabolismenya kembali aktif. Tahap selanjutnya yaitu pecahnya cangkang yang disusul dengan tahap pecahnya payung yang terjadi beberapa saat sebelum larva yang disebut dengan naupli keluar dari cangkang (Isnansetyo dan Kurniastuty 1995, dalam Putri 2013). Proses penetasan dilakukan dalam waktu 48 jam. Hasil dari penetasan berupa larva yang berwarna merah.

4.6.2 Uji Toksisitas Minyak Dan Asam Lemak

Uji toksisitas dilakuakn terhadap ekstrak minyak yang diperoleh dari proses ekstraksi soxhlet dan asam lemak yang diperoleh dari hasil hidrolisis. Minyak dan

asam lemak masing-masing dilarutkan dalam pelarut n-heksana hingga diperoleh larutan stok 10000 ppm. Konsentrasi ekstrak minyak dan asam lemak dibuat dengan variasi 1000, 500, 200, 100, dan 50 ppm. Variasi konsentrasi digunakan untuk menentukan konsentrasi mana yang mampu memberikan efek toksik. Kontrol dibuat dengan menggunakan pelarut, DMSO dan ragi roti. Konsentrasi kontrol sesuai dengan konsentrasi tertinggi yang digunakan pada ekstrak.

Larutan uji dibuat dari larutan stok 10000 ppm dengan mengambil 1000, 500, 200, 100, dan 50 μL lalu dimasukkan ke dalam botol uji. Setelah di masukkan dalam botol uji, pelarut diuapkan dengan cara membiarkannya selama 24 jam atau hingga pelarutnya kering. Selanjutnya di tambahkan 3 mL air laut, 1 tetes ragi roti dan 100 μL DMSO ke dalam botol uji dan kemudian dikocok hingga larut sempurna. Setelah semua ekstrak larut dipindahkan ke dalam labu takar dan diencerkan hingga volume 10 ml menggunakan air laut. Selanjutnya larva udang dimasukkan sebanyak 10 ekor dan dibiarkan selama 24 jam. Kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama tanpa penambahan ekstrak.

Minyak dan asam lemak merupakan senyawa non polar yang cenderung tidak larut dan air laut yang bersifat polar. Agar minyak dan asam lemak dapat larut dalam air laut, ditambahkan DMSO sebagai surfaktan. Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan sampel dengan air laut. Data pengamatan mortalitas *artemia salina* dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data pengamatan mortalitas *artemia salina*

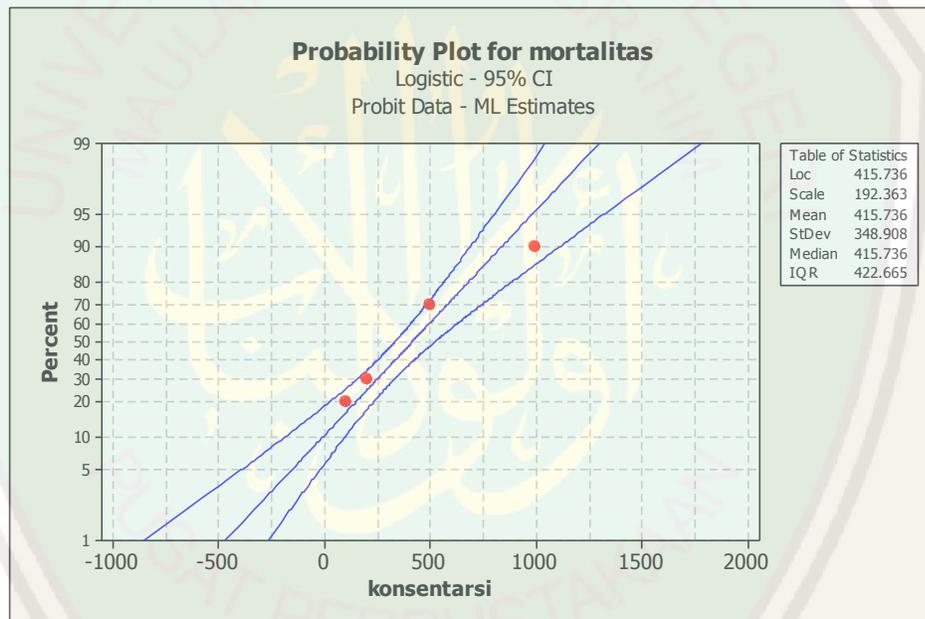
Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati					
	Minyak			Asam lemak		
	I	II	III	I	II	III
50	1	1	0	1	1	0
100	3	3	4	5	5	3
200	4	4	3	6	6	4
500	8	8	9	10	10	10
1000	10	10	10	10	10	10
n-heksana	1	1	0	1	1	1
DMSO	0	0	0	0	0	0
Ragi roti	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan Tabel 4.2, untuk mencari nilai LC_{50} dilakukan dengan analisis probit menggunakan minitab 14 dengan kepercayaan 95 %. Hasil analisis menggunakan minitab disajikan dalam bentuk kurva mortalitas. Kurva mortalitas merupakan persentase mortalitas (sumbu Y) dan konsentrasi larutan uji (sumbu X). Kurva mortalitas terdiri atas tiga garis, yaitu *lower*, *percentile*, dan *upper*. *Lower* (batas bawah) menunjukkan konsentrasi terendah pada setiap persentase mortalitas, *percentile* berarti konsentrasi pada setiap persentase mortalitas dan *upper* (batas atas) yang menunjukkan konsentrasi tertinggi pada setiap persentase mortalitas (Putri, 2013). Hasil nilai LC_{50} dapat dilihat pada Tabel 4.3.

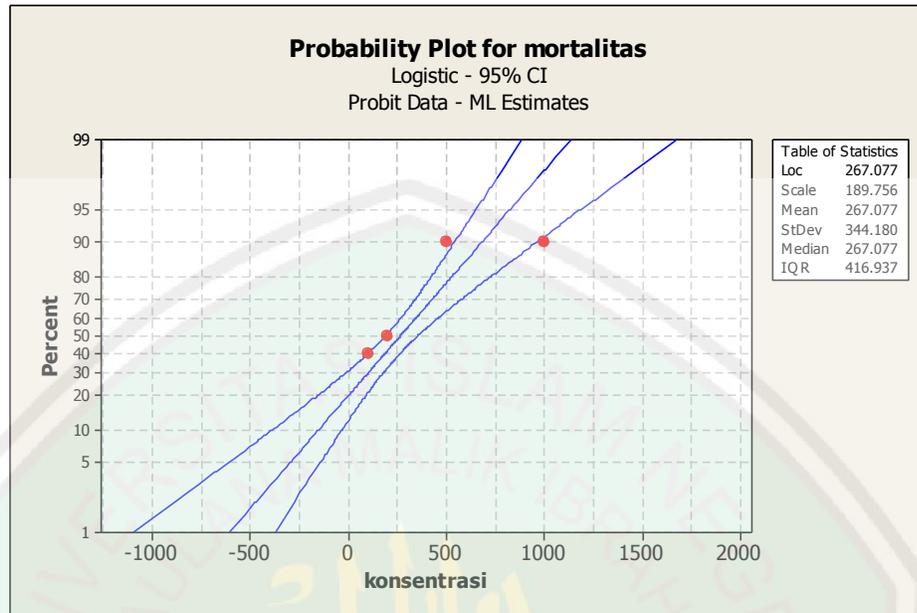
Tabel 4.3 Data nilai LC_{50} minyak dan asam lemak

Ekstrak	Nilai LC_{50} (ppm)
Minyak	415
Asam lemak	267

Dari hasil nilai LC_{50} menunjukkan bahwa minyak dan asam lemak memiliki aktivitas ketoksikan dalam BSLT jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50 % hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm. sehingga kedua senyawa tersebut bersifat toksik karena memiliki nilai LC_{50} dibawah 1000 ppm. Dari kedua sampel dapat dilihat bahwa asam lemak memiliki efek toksik yang lebih tinggi karena mempunyai nilai LC_{50} lebih rendah dari pada minyak yaitu 267 ppm sedangkan minyak yaitu 415 ppm. Kurva mortalitas ditunjukkan pada Gambar 4.7 dan 4.8.



Gambar 4.7 Kurva mortalitas pada minyak



Gambar 4.8 Kurva mortalitas pada asam lemak

Gambar 4.7 dan 4.8 menunjukkan kurva mortalitas *artemia salina* ekstrak minyak dan asam lemak mikroalga *chlorella sp.* berdasarkan Gambar 4.7 dan 4.8, terlihat bahwa ada 4 titik konsentrasi yang muncul. Hal ini terjadi karena data yang dimasukkan pada program ini diharapkan memiliki hubungan regresi linear. Artinya adanya peningkatan konsentrasi, menyebabkan persen mortalitasnya juga meningkat. Pada konsentrasi 50 ppm tidak ada larva yang mati (0 larva yang mati), sedangkan pada konsentrasi tertentu semua larva yang diuji mati. Pada keadaan seperti ini titik pada kurva tidak akan muncul. Karena pada analisis probit, nilai probit (nilai kemungkinan dari suatu kejadian) adalah 1–99, sedangkan 0 dan 100 tidak ada. Apabila pada konsentrasi tertentu semua larva yang diuji mati, artinya pada konsentrasi tersebut persen kematiannya telah mencapai 100 %.

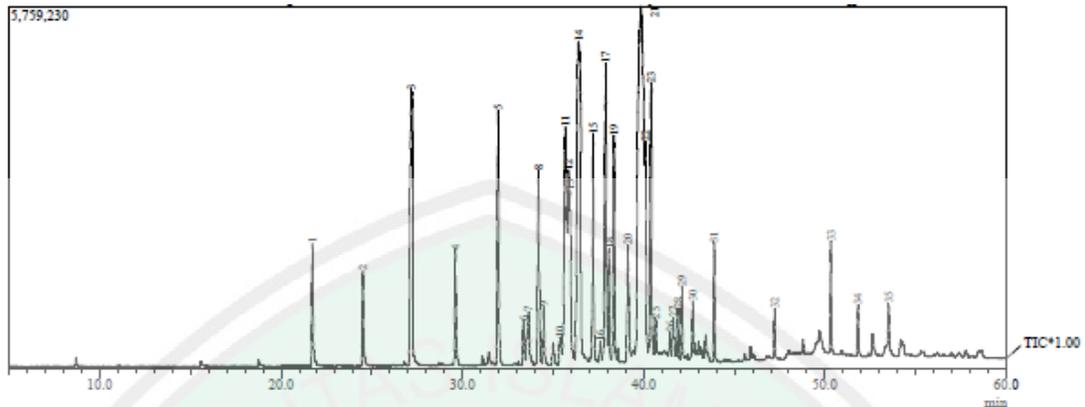
Adapun sebaran data % kematian (*Cumulative Failure*) *Artemia* pada kedua sampel menunjukkan hasil yang sama, yakni dengan meningkatnya konsentrasi sampel, % kematian *Artemia* juga semakin meningkat. Daya ketahanan hidup (*Survival*) *Artemia* juga menunjukkan hasil yang sama pada kedua sampel, yaitu dengan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak, daya tahan hidup *Artemia* semakin menurun.

Nilai LC_{50} yang menggambarkan toksisitas berhubungan dengan struktur senyawa yang terkandung di dalamnya. Jika dibandingkan toksisitas minyak dengan asam lemak, perubahan gugus dari trigliserida menjadi asam lemak bebas menyebabkan naiknya toksisitas. Hal ini berkaitan dengan kemudahan penetrasi ke dalam membran sel *artemia salina* dan adanya asam lemak tak jenuh yang muncul.

4.7 Identifikasi Golongan Asam Lemak *Chlorella sp.* Dengan KG-SM.

Identifikasi menggunakan KG-SM dilakukan untuk mengetahui golongan asam lemak yang terdapat dalam asam lemak mikroalga *chlorella sp.*. Identifikasi menggunakan KG-SM dibutuhkan sampel yang mudah menguap (volatil) sehingga perlu dilakukan esterifikasi untuk sampel asam lemak. Hal ini dilakukan karena fase gerak dari instrumen ini berupa gas.

Adapun hasil dari identifikasi menggunakan KG-SM adalah berupa kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 4.9.



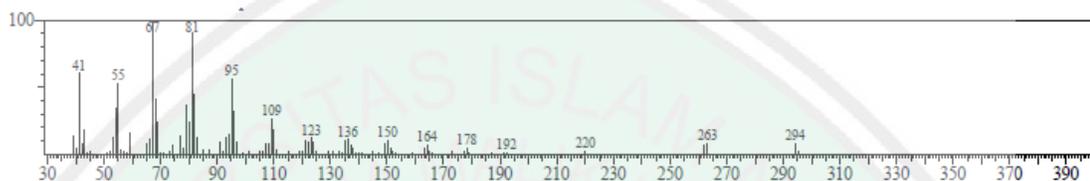
Gambar 4.9 Kromatogram KG asam lemak mikroalga *chlorella sp.*

Dari Gambar 4.9 dapat dilihat bahwa terdapat 35 puncak yang muncul dari asam lemak mikroalga *chlorella sp.* yang diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Sebanyak 35 puncak yang muncul terdapat 12 puncak yang menunjukkan asam lemak tak jenuh di tunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Asam Lemak Tak Jenuh Hasil Kromatogram KG

No	Puncak	T _r (menit)	Luas puncak (%)	Senyawa
1	7	33,656	1,19	Asam 6-Oktadekenoat
2	11	35,685	6,20	Asam 7,10-heksadekadienoat
3	12	35,856	3,91	Asam 7-heksadekenoat
4	13	35,942	1,92	Asam 9-heksadekenoat
5	17	37,908	5,72	Asam 10,13-oktadekadienoat
6	18	38,096	1,46	Asam 9-heksadekenoat
7	21	39,848	19,95	Asam 9,12-oktadekadienoat/ asam linoleat
8	22	40,092	3,72	Asam 9,12,15- oktadekatrienoat/ asam linolenat
9	25	40,663	0,37	Asam 9,11-oktadekadienoat
10	27	41,622	0,65	Asam 10-nonadekenoat
11	28	41,888	0,59	Asam 10-nonadekenoat
12	30	42,710	0,58	Asam 5,8,11,14- eikosatetraenoat

Dari Tabel 4.4 senyawa yang memiliki luas puncak paling tinggi adalah puncak ke 21 yang diduga merupakan asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat). Hal ini dibuktikan dengan spektra massa dari senyawa yang mempunyai luas area sebesar 19,95 % yang disajikan dalam Gambar 4.10.



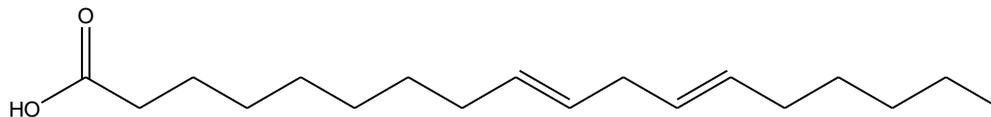
Gambar 4.10 Spektra metil ester asam lemak hasil hidrolisis dengan $Tr = 39,848$

Spektra massa komponen utama dari metil ester asam lemak hasil hidrolisis ($Tr = 39,848$) menghasilkan puncak ion fragmen pada m/z 41, 55, 67, 81, 95, 109, 123, 136, 150, 164, 178, 192, 220, 263, dan 294. Spektra ini memiliki kesamaan dengan spektra massa asam 9,12-oktadekadienoat (Z,Z) dari NIST62.LIB dengan nomor *entry* 41849 dengan tingkat kesamaan 94 %. Kedua spektra ini memiliki kesamaan pada pola fragmentasi.



Gambar 4.11 Spektra massa asam 9,12-oktadekadienoat

Fragmen dengan m/z 294 merupakan metil linoleat yang memiliki rumus molekul $C_{19}H_{34}O_2$. Pola fragmentasi yang diusulkan disajikan pada lampiran 6. Hal ini menunjukkan bahwa asam lemak yang paling banyak terkandung dalam mikroalga *chlorella sp.* adalah asam 9,12-oktadekadienoat atau asam linoleat.



Gambar 4.12 Struktur asam 9,12-oktadekadienoat

Kandungan asam lemak yang tertinggi dari penelitian ini adalah asam linoleat yang merupakan asam lemak tak jenuh. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh kawaroe (2010), bahwa kandungan asam lemak terbesar dari *Chlorella sp.* adalah asam linoleat sebanyak 45,068 %. Berdasarkan penelitian terdahulu ikatan terkonjugasi dari asam lemak tak jenuh berperan sebagai senyawa aktif anti kanker. Marliyana (2012), menyebutkan bahwa fraksi aktif dari ekstrak buah merah yang terdiri dari asam oleat, asam palmitat dan asam miristat mampu meberikan efek toksik pada larva udang *artemia salina*. Nilai LC_{50} yang diperoleh adalah 138,05 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa asam lemak mampu memberikan efek toksik pada larva udang *artemia salina*.

Dibandingkan dengan penelitian Marliyana (2012), nilai LC_{50} dari penelitian ini lebih besar (lebih tidak toksik). Hal ini dimungkinkan karena perbedaan dari komposisi asam lemak tersebut. pada penelitian Marliyana (2012) komposisi dari asam lemak tak jenuhnya sebanyak 66,11 % sedangkan dalam penelitian ini adalah 46,26 % sehingga dimungkinkan hal inilah yang menyebabkan nilai LC_{50} nya lebih tinggi. Nilai LC_{50} dari hasil penelitian ini tergolong dalam kriteria pestisida menurut Meyer *et al.*, 1982. Dan juga tidak masuk dalam kriteria sebagai anti kanker karena asam linoleat yang dihasilkan bukan merupakan asam lemak terkonjugasi yaitu asam

lemak linoleat dimana ikatan rangkapnya yang berjumlah dua tidak dipisahkan oleh dua ikatan tunggal namun hanya dipisahkan oleh satu ikatan tunggal (Cahanar, 2006). Sedangkan dalam penelitian ini asam linoleat yang diperoleh adalah Asam 9,12-oktadekadienoat.

4.8 Mikroalga Dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan salah satu nikmat yang diberikan Allah SWT kepada manusia. Di dalam Al quran banyak disebutkan tentang penciptaan tumbuhan dari berbagai macam bentuk dan ukuran yang memiliki berbagai macam manfaat untuk manusia. Allah SWT berfirman dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۚ وَالْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ 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.”

Kata *كريم* yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 tersebut digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik, sesuai obyeknya. Rizqi yang *kariim* adalah yang banyak, halal dan bermanfaat. Pasangan tumbuhan yang *kariim* adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya (Shihab, 2002). Salah satu hasil yang diharapkan dari tanaman adalah pemanfaatannya yang dapat diaplikasikan dalam bidang kimia. Sebagaimana dalam penelitian ini yang

menggunakan tumbuhan tingkat rendah mikroalga *chlorella sp.* sebagai subjek penelitian.

Adapun *karrim* berdasarkan hasil dari penelitian ini dapat diartikan dengan terdapatnya daya sitotoksik yang diberikan oleh asam lemak yang diperoleh dari hasil ekstraksi mikroalga *chlorella sp.*. Dari hasil uji toksisitas diperoleh nilai LC_{50} minyak sebesar 415 ppm dan asam lemak sebesar 267 ppm. Menurut Meyer *et al.*, (1982), nilai LC_{50} antara 200 – 1000 ppm dapat diaplikasikan sebagai pestisida.

Dalam ayat lain menyebutkan bahwa Allah SWT tidak akan menciptakan sesuatu tanpa ada manfaatnya. Yang mana ayat tersebut adalah 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 keadan 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.”

Quran surat Ali ‘Imran ayat 191 tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT mewajibkan kepada umatnya untuk menuntut ilmu dan mempergunakan pikiran untuk merenungkan alam, langit, bumi beserta isinya. Bagi orang yang berfikir, semua itu tidaklah terjadi dengan sendirinya, pasti ada yang menciptakan yaitu Allah SWT. Melalui kegiatan befikir secara mendalam, manusia hendaknya merenungkan dan menganalisa semua yang ada di alam ini sehingga akan tercipta ilmu pengetahuan

disertai rasa kebesaran, kehebatan dan keagungan kepada Allah SWT (Shihab, 2002). Manusia dianjurkan untuk memikirkan segala sesuatu yang Allah SWT ciptakan baik itu penciptaan langit, bumi dan juga yang ada diantaranya bahwa penciptaan segala sesuatu itu tiada yang sia-sia.

Salah satu cara untuk mengamalkan isi dari surat Ali 'Imran ayat 191 ini adalah dengan melakukan penelitian ini. Dengan melakukan penelitian mengenai manfaat yang dapat dihasilkan dari tumbuhan yang Allah ciptakan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui manfaat mikroalga *Chlorella sp.* dalam bidang kimia. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak dan asam lemak dari tumbuhan mikroalga *chlorella sp.* memiliki sifat toksik yang dapat dimanfaatkan sebagai pestisida.

Hasil dari penelitian ini juga menunjukkan kasih sayang Allah SWT terhadap makhluk ciptaannya. Hal ini dapat dilihat bahwa pada mikroalga *chlorella sp.* yang merupakan tumbuhan tingkat rendah yang ukurannya cukup kecil ini Allah SWT juga membekalinya dengan senyawa yang bersifat racun yang dapat digunakan untuk bertahan hidup dari musuh-musuhnya. Wallahu'alam bi shawab.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Rendemen minyak hasil ekstraksi soxhlet menggunakan pelarut n-heksana adalah 5,2407 %, dan profil asam lemak yang muncul dari identifikasi menggunakan KG-SM adalah diperoleh 35 puncak kromatogram. 12 puncak merupakan asam lemak tak jenuh dengan komposisi terbanyak adalah asam linoleat.
2. Nilai LC_{50} minyak dan asam lemak masing-masing adalah 415 ppm dan 267 ppm.

5.2 Saran

Adapun saran yang diberikan oleh peneliti adalah agar dilakukan penelitian menggunakan pelarut non polar yang lain, seperti petroleum eter pada saat proses ekstraksi. Disarankan pula untuk memperpanjang waktu siklus ekstraksi, agar senyawa yang diinginkan dapat terekstrak secara maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir jilid I*. Bogor: Pustaka Imam Asy-syafi'i.
- Achmadi, SS. 1992. *Teknik Kimia Organik*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Amaliah, Suci. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella Sp.* Hasil Kultivasi Dalam Media Ekstrak Tauge (Met). *Skripsi*. UIN Malang
- Anonimous. 2014. *Gas Chromatography*. <http://Inglaboratory.blogspot.com>
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae*. Biotechnology and Microbiology: Cambride University Press. ISBN 978-0-521-06113
- Borowitzka, M. A. dan Lesley, J. B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Cahyono, A. B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Press.
- Cairns, Donald. 2004. *Intisari Kimia Farmasi edisi 2*. Jakarta: EGC
- Clark, Jim. 2007. *Pembuatan Ester*. <http://chem-is-try.org/>.
- Colegate, S. M. dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Darmasih. 1997. *Prinsip Soxhlet*. peternakan.litbang.deptan.go.id/user/ptek97-24.pdf.
- Darmoyuwono, W. 2006. *Gaya Hidup Sehat dengan Virgin Coconut Oil, cetakan pertama*. Jakarta: penerbit Indeks-kelompok Gramedia.
- Dewi, D.C. 2005. *Pemisahan Kimia*. Malang: Universitas Islam Negeri Malang. hal 41
- Eaton, A. D. *et al.* 1995. *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*. Washington DC: American Public Health Association.

- Fahriyani, I. 2011. Pemanfaatan kecambah kacang hijau dalam formulasi bubur susu instan sebagai alternatif makanan pendamping air susu ibu (MP-ASI). Bogor: IPB.
- Fardiaz, D. 1989. *Kromatografi Gas Dalam Analisis Pangan*. Penerbit IPB. Bandung.
- Fasya, A.G. 2011. Sintesis Metil 10,12,14-oktadekatrienoat dari Asam 9,12,15-oktadekatrienoat (Asam α -linolenat) Biji Selasih (*Ocimum basilicum*) dan Uji Bioaktivitasnya. *Tesis Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga.
- Fikri, I. 2010. Identifikasi Dan Uji Toksisitas Senyawa Sitronelal Dari Daun Sereh Wangi (*Cymbopogon Nardus* L.) Sebagai Anti Feedant Terhadap Hama Thrips Pada Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L.). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fogg, G. E. 1975. *Alga Culture ang Phytoplankton Ecology*. The university of Wisconsin Press. London.
- Gandjar, I. G dan Rohman, A. 2012. Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, Roy. 1991. *Pengantar Kromatografi terbitan ke dua*. Bandung. ITB.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Harborne, JB.. 1987. *Metode fitokimia Edisi Kedua*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hendrawati, A. R. E. 2009. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Houghton P.J., Raman A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman and Hall.
- Indrayani, L., Soetjipto, H. dan. Sihasale, L. 2006. *Skrinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl)*

Terhadap Larva Udang Artemia salina Leach. Jurnal Fakultas Sains dan Matematika. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.

Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut.* Yogyakarta: Kanisius.

Kanwar, A.S. 2007. Brine Shrimp (*Artemia salina*) a Marine Animal for Simple and Rappid Biological Assays. *Chinese Clinical Medicine.* 2 (4): 35-42.

Katili,V. 2012. Komposisi Asam Lemak Mikroalga Jenis *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira sp.*, dan *Chaetoceros gracilis*. Thesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Kawaroe, M., T. Prartono, Wulan Sari, Augustine. 2010. Fatty Acid Content of Indonesian Aquatic Microalgae. *HAYATI Journal of Biosciences.* Vol. 17(4): 196-200.

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.

Ketaren, S. 2005. *Minyak Dan Lemak Pangan.* Jakarta; Penerbit Universitas Indonesia.

Khamidah, U. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella Sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge Terhadap *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Khopkar, S.M.. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik.* Jakarta: UI Press.

Kristanti, A. N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia.* Surabaya: Airlangga University Press.

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.

Kusnandar, Feri. 2010. *Kimia Pangan: Komponen Makro.* Jakarta: Dian Rakyat.

Kuswuj. R. 2008. *Proses Hidrolisis dan Aplikasinya di Industri.* <URL : <http://www.risvank.com/proses-hidrolisis-dan-aplikasinya.html>>

Lehninger. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia.* Jilid 1. Jakarta : Erlangga

- Lenny, S dan Zuhra, C. F. 2006. Isolasi dan Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah (*Graptophyllum pictum* L. Griff) dengan Metode Brine Shrimp. *Jurnal Komunikasi Penelitian*, 17 (5): 56-59.
- Marliyana, S. D., Rakhman, W. F., Nestri, H., Rakhmawati, R., 2012. Uji Toksisitas Secara *Brine Shrimpe Lethality* Ekstrak Buah Merah (*Pandanus Conoideus Lamk*). *Jurnal Penelitian Kimia*, 8 (1): 24-33.
- Maulana, A. I. 2010. Pengaruh Ekstrak Tauge (*Phaseolus radiatus*) terhadap Kerusakan Sel Ginjal Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Merizawati. 2008. Analisis Sinar Merah, Hijau dan Biru (RGB) untuk Mengukur Kelimpahan Fitoplankton (*Chlorella sp.*) *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L.B. Nichols, D. E and McLaughlin, J. L. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. *Planta Medica*, 45: 31-34.
- Muchtadi D; Palupi NS; Astawan M. 1993. *Metabolisme Zat Gizi*. Pusat Antar Universitas, IPB. Bogor: Pustaka Sinar Harapan.
- Mudawamah, Umi. 2007. Isolasi Asam Lemak pada Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) dengan Variasi Pelarut dan Identifikasi Menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mu'nim, A., Retnosari, 2006, Uji Hambatan Tumorigenesis Sari Buah Merah (*Pandanus Conoideus Lam.*) terhadap Tikus Betina yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz (a)Antrasen (DMBA), *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vol. III(3), pp. 153-16.
- Putri, I. P. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Bunga Sirsak (*Annona Muricata Linn.*) Dengan Metode Bslt (*Brine Shrimp Lethality Test*) Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Poedjiadi, Ana. 2006. *Dasar – Dasar Biokimia*. Jakarta: UI press.
- Prihantini, N. B., Putri, B. dan Yuniati, R. 2005. *Pertumbuhan Chlorella sp. Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Dengan Variasi pH Awal*. *Makara, Sains*, Vol. 9(1) : 1-6.
- Quthb, Sayyid. 2004. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an jilid 8*. Jakarta: Gema Insani

- Rachmaniah, Orchidea, Setyarini Reni Dwi & Maulida Lailatul. 2010. *Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari Chlorella sp. dan Prediksinya sebagai Biodiesel*. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Rita W. S., Suirta I. W. dan Sabirin A. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa yang Berpotensi Sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica carantia* L). *Jurnal Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana*, 2(1), ISSN 1907-9850: 1-6.
- Romimohtarto, K.. 2004. *Meroplankton Laut*. Jakarta : Penerbit Djambatan.
- Rostini, I. 2007. Karya Ilmiah. *Kultur Fitoplankton (Chlorella sp. dan Tetraselmis sp.) pada Skala Laboratorium di Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Bojonegara*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Roth, H.J. dan Blaschke, G., 1991, *Analisis Farmasi*, Penerjemah: Kisman R. dan Ibrahim S., UGM Press, Yogyakarta
- Setyaningsih, I.; Desniar dan Sriwardani, T. 2005. Konsentrasi hambatan Minimum Ekstrak *Chlorella sp.* Terhadap Bakteri dan Kapang. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. Volume VIII, Nomor 1: 25-34.
- Shiddieqy, T. M. H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: PT. Pustaka Rizki Putra.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Quran Volume 7*. Jakarta: Lentera Hati.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sukoso. 2002. *Peranan Bioteknologi Molekuler dalam Pembangunan Bidang Perikanan dan Kelautan Indonesia*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Suryono dan Yudiati, E., 2011. Toksisitas Ekstrak Metanol *Spirulina sp.* terhadap naupli *Artemia sp.* *Buletin Oseanografi Marina*. (1): 1-6
- Tambun Rondang. 2006. *Teknologi Oleokimia*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Wati, A. dan Sylvia, A.M. Ekstraksi Minyak Dari Mikroalga Jenis *Chlorella sp.* Berbantuan Ultrasonik. *Jurnal*. Universitas Diponegoro.

- Wibawa Pratama J, Listyorini Dwi, fachriyah Enny. 2006. *Penentuan Komposisi Asam Lemak Ekstrak Minyak ikan Kembung (Rastrelliger kanagurta) dengan Gc-Ms dan Uji Toksisitasnya menggunakan Metode Bslt*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Diponegoro.
- Winarno; Fardias dan Fardias. 1973. *Ekstraksi, Kromatografi dan Elektroforesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wulandari, A. P.; Naderia, F.; Pattalia, A. E. dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalgae di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010*. Jatinangor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran. 535-542.
- Yuniastuti, Katria. 2006. Ekstraksi dan Identifikasi Komponen Sulfida Pada Bawang Putih (*allium sativum*). *Tugas Akhir* Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

**UJI TOKSISITAS MINYAK DAN ASAM LEMAK MIKROALGA *Chlorella sp.*
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia Salina***

Anik Kholifatuz Zahro¹, A. Ghanaim Fasya², Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag³,
Tri Kustono Adi, M.Sc.⁴

Program Studi Kimia Fak.SAINTEK Universitas Islam Negeri (UIN) MALIKI Malang
Gedung Sains dan Teknologi UIN MALIKI Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang
Telp./Fax +62341558933
Email : k.zanik@yahoo.co.id

ABSTRAK

Mikroalga banyak tumbuh dan berkembang di Indonesia. Salah satu jenis mikroalga *Chloropyceae* yang sering ditemui adalah *Chlorella sp.* yang mengandung senyawa yang berpotensi memberikan efek toksik. Allah menyebutkan dalam al Qur'an surat as Syu'ara ayat 7 bahwa telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang baik salah satu manfaatnya adalah sebagai obat. *Chlorella sp.* pada fase eksponensial menghasilkan metabolit primer, salah satunya adalah minyak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas minyak dan asam lemak *Chlorella sp.* hasil ekstraksi soxhlet dengan pelarut n-heksana terhadap hewan coba larva udang *Artemia Salina*.

Penelitian ini diawali dengan kultivasi mikroalga dalam medium ekstrak tauge (MET). Ekstraksi minyak dilakukan dengan metode *Soxhletasi* menggunakan pelarut n-heksana. Minyak yang diperoleh selanjutnya dihidrolisis menggunakan katalis basa KOH 12 %. Minyak dan asam lemak yang diperoleh selanjutnya diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), dan diidentifikasi menggunakan KG-SM.

Hasil penelitian diperoleh rendemen ekstraksi minyak mikroalga *chlorella sp.* adalah 5,24 % dan rendemen asam lemak hasil hidrolisis adalah 80 %. Uji toksisitas minyak dan asam lemak diperoleh nilai LC₅₀ masing-masing adalah 415 dan 267 ppm. Hasil dari identifikasi menggunakan KG-SM diperoleh 35 puncak dan 12 diantaranya merupakan asam lemak tak jenuh yaitu asam linoleat, asam linolenat, asam 6-Oktadekenoat, dan asam heksadodekenoat. Asam linoleat merupakan kandungan tertinggi dalam asam lemak *Chlorella sp.* dengan prosentase 26,04 %.

Kata kunci: Uji toksisitas, Minyak, Asam lemak, *Chlorella sp.*, KG-SM

ABSTRACT

One kind of microalgae from *chloropyceae* group is *chlorella sp.* it contains compounds that have potential toxicity effects. God mention in al qur'an, if god has created many kind of good plants. It can be used as medicine. In exponential phase, *chlorella sp.* produced primary metabolite, which one is oil. This research aims to determine the toxicity effect of oil and fatty acid *chlorella sp.* oil can be extracted from *chlorella sp.* use soxhlet method with n-hexane as solvent.

Microalgae was cultivated in extracts of bean sprouts medium. Oil was extracted by soxhlet method with n-hexane as solvent. And then oil was hidrolized by KOH 12 %. Oil and fatty acids were further tested toxicity effect used BSLT method, then identified fatty acid of *chlorella sp.* used GC-MS.

The result showed that yield of extraction of oil is 5,24 % and yield of hydrolysis process is 80 %. Toxicity test of oil and fatty acids provide toxicity effect with LC₅₀ values. The

LC₅₀ values of oil is 415 ppm and fatty acid values 267 ppm. Identification kinds of fatty acids use GC-MS give 35 peaks. So, in fatty acids *Chlorella sp.* have 35 compound, there are 12 of them is unsaturated fatty acids. The biggest percentage of fatty acid is linoleic acid, there are 26,04 %.

Keywords : Toxicity Test, Oil, Fatty acid, *Chlorella sp.*, GC-MS

ملخص البحث

تنمو وتتطور الطحالب الدقيقة كثير في إندونيسيا. من نوع الطحالب الدقيقة *Chloropyceae* الذي وجد كثيرا هو *Chlorella sp.* وهو يتكون على المركبات تحمل أن تكون الآثار السمية. ذكر الله تعالى في سورة الشعراء الآية السابعة بأنه قد خلق النبات إلا للدواء. ينتاج *Chlorella sp.* في مرحلة الأسى الأبيض الأولية و منها النفط. وأهداف هذا البحث لمعرفة مستوى سمية الزيوت والأحماض الدهنية *Chlorella sp.* نتيجة من استخراج *soxhlet* و مذيب n-heksana على حيوانات التجارب يرقات الروبيان *Artemia Salina*. يبدأ هذا البحث بزراعة الطحالب الدقيقة في *medium ekstrak tauge (MET)*. استخراج النفط من قبل طريقة *Soxhletasi* باستعمال مذيب n-heksana. ثم تحلل النفط المختصل بمحفز قاعدة 12% KOH. النفط و الأحماض الدهنية المختصل عليها يختبر سميته بأسلوب (Brine Shrimp Letality Test) BSLT و يحلل بـ KG-SM. نتائج هذا البحث هو منقح استخراج النفط الطحالب الدقيقة *Chlorella sp.* 5,24 % و منقح الأحماض الدهنية من التحلل المائي هو 80%. اختبار سمية النفط والأحماض الدهنية يحصل على نتيجة LC₅₀ منها 415 و 267 ppm. نتائج التحليل باستعمال KG-SM هو 35 ذرة و 12 منها الأحماض الدهنية غير المشبعة يعنى الأحماض linoleat و الأحماض 6-Oktadekenoat و الأحماض heksadekenoat. الأحماض linoleat هو أعلى محتوى في الأحماض الدهنية *Chlorella sp.* بالنسبة 26.04%

الكلمة الرئيسية: اختبار السمية و النفط و الأحماض الدهنية الطحالب الدقيقة و *Chlorella sp.* و KG-SM

I. PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan biota perairan yang potensial untuk dikembangkan karena dapat menghasilkan produk komersial di bidang pangan, farmasi, kosmetika, pertanian, pakan dan sebagainya (Becker, 1994). Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), terdapat empat kelompok mikroalga yaitu: diatom, alga emas (*Chrysophyceae*), alga biru (*Cyanophyceae*), dan alga hijau (*Chlorophyceae*). Salah satu jenis alga hijau adalah *Chlorella sp.*

Chlorella sp. merupakan mikroalga yang hidup di perairan air tawar, laut maupun payau, juga ditemukan di tanah dan di tempat lembab. Menurut Watanabe (1978) dalam Rostini (2007), *Chlorella* mengandung protein 42,2 %, nitrogen dalam bentuk ekstrak, kadar air 5,7 %, serat 0,4 %, dan lemak kasar 15,3 %.

Asam lemak merupakan salah satu senyawa metabolit primer yang terkandung di dalam *Chlorella sp.* Menurut Kawaroe (2010), asam lemak yang terkandung dalam *Chlorella* terdiri dari asam linoleat sebanyak 45,068 % dan 29,495 % asam stearat. Menurut Rachmaniah (2010) mikroalga mampu menghasilkan minyak 200 kali lebih banyak dibandingkan dengan tumbuh-tumbuhan penghasil minyak (kelapa sawit, jarak pagar) pada kondisi terbaiknya.

Asam lemak di dalam *Chlorella sp.* dapat diekstrak melalui metode ekstraksi Soxhlet dengan beberapa pelarut nonpolar yang merujuk dari penelitian terdahulu. Rachmaniah, dkk. (2010) dalam penelitiannya melakukan pemilihan metode ekstraksi minyak alga dari *Chlorella sp.* dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa metode yang efektif dalam mengekstraksi minyak mikroalga *Chlorella*

sp. adalah metode soxhletasi dengan pelarut n-heksana pada *Chlorella sp.* kondisi kering. Persentase minyak alga yang dihasilkan dari metode tersebut sebesar 16,57 %. Jenis asam lemak yang teridentifikasi dalam *Chlorella sp.* yakni asam miristat (29,06 %), asam palmitat (4,70 %), asam stearat (2,43 %), asam oleat (3,21 %), asam linoleat (8,24 %), dan asam linolenat (16,59 %).

Asam lemak dapat diperoleh dari minyak dengan cara hidrolisis, sehingga untuk memperoleh asam lemak dari minyak hasil ekstraksi soxhlet, perlu dilakukan hidrolisis. Fasya (2011), menyebutkan bahwa rendemen asam lemak yang diperoleh dari hasil hidrolisis minyak biji selasih adalah sebesar 75,01 %. Hidrolisis terhadap minyak biji selasih dilakukan dengan menggunakan katalis basa KOH 12 % dalam metanol.

Menurut penelitian terdahulu, asam lemak mempunyai efek toksik yang cukup besar pada hewan coba. Penelitian Wibawa (2006), menyebutkan bahwa ekstrak minyak ikan kembung yang di dalamnya terdapat lima jenis asam lemak yaitu asam stearat (22,19 %), asam oleat (21,99 %), asam palmitat (20,16 %), asam palmitoleat (19,96 %) dan asam miristat (17,86 %), memiliki nilai LC_{50} sebesar 5,97 ppm. Marliyana (2012), juga menyebutkan bahwa fraksi aktif dari ekstrak buah merah yang terdiri dari asam palmitat, asam oleat dan asam miristat mempunyai nilai LC_{50} 138,05 ppm.

Marliyana (2012), juga menyebutkan beberapa penelitian mengindikasikan bahwa asam lemak yang memiliki ikatan terkonjugasi dapat berperan sebagai senyawa aktif antikanker.

Uji toksisitas tahap awal menggunakan BSLT (*Brine Shrimp Lethality test*) dilakukan untuk mengetahui LC_{50} yang biasanya diujikan terhadap organisme yang sesuai untuk mengetahui bioaktivitasnya. Organisme uji tersebut biasanya menggunakan *Brine shrimp* (udang laut) dari jenis *Artemia salina* Leach. Metode pengujian BSLT, menggunakan *A. salina* dianggap dapat memprediksikan adanya daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga

sering digunakan untuk skrining awal pencarian senyawa antikanker (Indrayani *et al.*, 2006).

Penelitian dilakukan dengan menggunakan sampel ekstrak asam lemak *Chlorella sp.* yang diperoleh dari hasil ekstraksi mikroalga *chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). Medium Ekstrak Tauge (MET) merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga yang berasal dari kacang hijau yang aman dan mudah diperoleh. Ekstrak asam lemak tersebut diujikan terhadap hewan coba larva udang *A. salina* untuk mengetahui potensinya sebagai obat yang dapat dilihat dari nilai LC_{50} yang menunjukkan tingkat ketoksitasannya. Dan untuk mengetahui jenis asam lemak yang terkandung di dalam asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* Dilakukan identifikasi dengan menggunakan instrument KG-SM (Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa).

II. METODE PENELITIAN

1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah labu kultur 1000 mL, lampu TL 36 Watt, timer, kuvet, hot plate, sentrifuse, neraca analitik, seperangkat alat gelas, *rotary evaporator vacumm*, termometer, penangas air dan minyak, seperangkat ekstraktor Soxhlet, seperangkat alat refluks, desikator, pendingin (*freezer*), oven, lemari asam, *magnetic stirrer*, tabung gas N_2 , Instrumen Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM), desikator, pengaduk, gelas arloji, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet mikro.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi. Bahan yang digunakan untuk kultivasi *Chlorella sp.* adalah tauge kacang hijau dan aquades. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi minyak *Chlorella sp.* adalah n-heksana. Sedangkan untuk hidrolisis minyak *Chlorella sp.* adalah KOH 12 %,

metanol, H₂SO₄ 1 M, aquades dan n-heksana.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji toksisitas diantaranya adalah air laut, ragi roti, dimetil sulfooksida (DMSO), hewan uji *Artemia salina* yang berasal dari telur *Artemia salina*.

2. Kultivasi *Chlorella sp.*

a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (Prihantini, dkk., 2005).

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET (b/v) yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL aquades yang mendidih selama 1 jam. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam aquades dengan masing-masing konsentrasi 4 % (v/v) dengan pH 7.

b. Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (Prihantini, dkk., 2005).

c. Sebanyak 100 mL kultur *Chlorella sp.* diinokulasikan ke dalam 600 mL medium ekstrak tauge. Labu kultur 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.

d. Penghitungan jumlah sel *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikultivasi diambil menggunakan mikro pipet dan diteteskan pada alat *Haemocytometer*. Jumlah sel *Chlorella sp.* yang ada dalam kotak hitung *Haemocytometer* dihitung kemudian Jumlah sel yang diperoleh selanjutnya dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Eaton, *et al.*, 2005 dalam Merizawati, 2008):

$$N = nx \frac{16}{\sum_{i=1}^{16} Kbi} \times \frac{1}{10^{-4}}$$

Keterangan :

N= Kelimpahanindividu (sel/mL)

n = Jumlah sel

16 = Jumlah kotak kecil

$\sum_{i=1}^{16} Kbi$ = Jumlah kotak kecil yang diamati pada *Haemocytometer*

10⁻⁴ = Volume air sampel yang menutupi 1 kotak besar pada *Haemocytometer*.

e. Pemanenan *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikultivasi dan mencapai fase awal stasioner dipanen dengan cara disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga terpisah antara biomassa dengan filtrat. Bagian biomassa *Chlorella sp.* diambil untuk selanjutnya dianalisis kadar air dan diekstraksi secara Soxhletasi.

3. 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. Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang masih basah diambil 5 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 ±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

Perhitungan kadar air terkoreksi menggunakan persamaan:

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

% Kadar air terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

4. Preparasi sampel

Biomassa *Chlorella sp.* ditempatkan pada cawan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 30 – 35 °C selama 24 jam kemudian ditimbang biomassa *Chlorella sp.* kering.

5. Ekstraksi *Chlorella sp.*

Ekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode ekstraksi Soxhlet menggunakan pelarut n-heksana 400 mL untuk isolat mikroalga sebanyak 50 gram (Wati dan Sylvia, 2010). Isolat dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor soxhlet. Kemudian dirangkai tabung ekstraktor soxhlet dengan labu alas bulat. Selanjutnya diletakkan labu alas bulat pada pemanas. Ditambahkan pelarut n-heksana melalui tabung ekstraktor hingga mengalir masuk ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya dipasangkan kondensor pada tabung ekstraktor dan dilakukan proses Soxhletasi hingga mengalami 12 kali siklus sehingga didapatkan ekstrak kasar n-heksana (Fasya, 2011). Kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut selama proses ekstraksi minyak mikroalga. Tahap selanjutnya dilakukan pengeringan terhadap ekstrak pekat minyak mikroalga *Chlorella sp.* dengan aliran gas N₂ dan dilakukan penimbangan untuk mengetahui berat minyak yang didapatkan.

6. Hidrolisis minyak *chlorella sp.*

Asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* dapat diperoleh dari minyak mikroalga *Chlorella sp.* melalui proses penyabunan. Sebanyak 15 gram minyak hasil isolasi dengan pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan 30 mL metanol dan KOH 12 %. Direfluks pada suhu 60 °C selama 90 menit. Selanjutnya ditambahkan 45 mL aquades dan 18,75 mL n-heksana, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan (fase organik dan fase air). Fase air diambil dan ditambahkan dengan H₂SO₄ 1 M hingga

pH-nya menjadi 1. Setelah itu ditambahkan n-heksana sebanyak 50 mL, kemudian dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah. Fase organik yang diperoleh dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dengan pengurangan tekanan. Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂ (Fasya, 2011).

7. Uji aktivitas antibakteri

a. Penetasan larva udang

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *A. salina* kemudian diaerasi dan telur akan menetas dalam waktu ± 48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas (Halimah, 2010).

b. Uji toksisitas (Rita *et al.*, 2008)

Uji toksisitas dilakukan pada minyak, asam lemak *Chlorella sp.* dan kontrol yang digunakan adalah kontrol DMSO, ragi roti dan pelarut n-heksana. Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Minyak dan Asam lemak masing-masing ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut n-heksana sebanyak 10 mL sehingga diperoleh larutan stok 10000 ppm. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet sebanyak 50 µL, 100 µL, 200 µL, 500 µL, 1000 µL kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering.

Selanjutnya ditambahkan 100 µL dimetil sulfooksida (DMSO), setetes larutan ragi roti (3 mg ragi roti dalam 5 mL akuades), dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 50, 100, 200, 500 dan 1000 ppm.

Kontrol pelarut n-heksana dibuat dengan 1000 µL pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Ditambahkan 100 µL dimetil sulfo oksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan

dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol DMSO dibuat dengan 100 μ L DMSO dimasukkan ke dalam botol vial. Ditambahkan setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol larutan ragi roti dibuat dengan setetes larutan ragi roti dimasukkan ke dalam botol vial. Ditambahkan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *A. salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Selanjutnya semua labu ukur diletakkan dibawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang (Meyer, *et al.*, 1982). Kemudian di hitung jumlah larva udang yang mati. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai LC_{50} dengan analisis probit. Bila ada kematian pada kontrol dikoreksi dengan rumus sebagai berikut (Meyer, *et al.*, 1982):

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes} - \text{Kontrol}}{\text{Kontrol}} \times 100 \%$$

8. Identifikasi menggunakan KG-SM

Analisis asam lemak *Chlorella sp.* menggunakan KG-SM QP2010S SHIMADZU. Sampel asam lemak yang telah diesterifikasi yaitu asam lemak hasil hidrolisis. Metil ester *Chlorella sp.* yang telah pekat tersebut diambil sebanyak 1 μ L kemudian diinjeksikan dalam instrument KG-SM.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

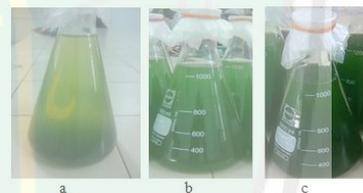
1. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Medium ekstrak tauge (MET) dibuat dengan melakukan perebusan tauge kacang hijau dalam air mendidih selama ± 1 jam atau hingga volume air menjadi setengahnya. MET yang diperoleh dari hasil perebusan tauge kacang hijau berupa cairan agak kental berwarna kuning kecoklatan. MET yang digunakan dalam

kultivasi mikroalga *chlorella sp* ini adalah MET 4 %. MET 4 % diperoleh dengan mengencerkan air hasil rebusan tauge kacang hijau tersebut dengan akuades. Hasil dari pengenceran diperoleh cairan yang berwarna kuning-bening dan tidak kental.

2. Kultivasi *Chlorella sp.*

Kultivasi dilakukan selama 8 hari. Selama kultivasi, mikroalga *chlorella sp.* mengalami perubahan warna dari hijau muda menjadi hijau tua atau semakin hari semakin pekat warna hijaunya. Perubahan warna ini juga menunjukkan meningkatnya jumlah sel *chlorella sp.* yang semakin hari semakin padat jumlahnya. Meningkatnya jumlah sel juga ditandai dengan semakin banyaknya endapan hijau pekat yang muncul didasar botol kultur. Gambar 2.1 menunjukkan perubahan yang terjadi pada hari ke 1, 4 dan 8.



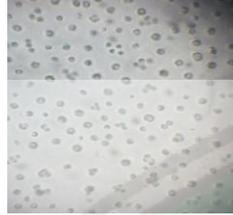
Gambar 2.1 Perubahan warna chloerlla sp. pada hari ke 1, 4, 8

Dari Gambar 4.1 tersebut dapat dilihat bahwa dengan bertambahnya hari, warna mikroalga *chlorella sp.* semakin pekat. Endapan yang muncul juga semakin banyak. Warna hijau pada *Chlorella sp.* tersebut ditimbulkan oleh pigmen yang terkandung di dalam sel *Chlorella sp.* Sel *Chlorella sp.* mengandung pigmen berupa karoten, xanthofil, serta kolorofil a dan b dalam jumlah yang besar (Volesky, 1970 dalam Rostini, 2007).

3. Penghitungan jumlah sel *Chlorella sp.*

Hasil dari penghitungan jumlah sel menggunakan *haemocytometer* diperoleh jumlah sel pada hari ke-7, 8 dan 9 berturut-turut adalah 42.240.000 sel/mL, 47.840.000 sel/mL, 48.160.000 sel/mL. Hasil dari penghitungan ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Khamidah (2013), yang mana jumlah sel mikroalga *chlorella sp.* mengalami peningkatan pada hari ke-7, 8

dan 9. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Khamidah (2013) adalah 3.616.000 sel/mL pada hari ke-7, pada hari ke-8 adalah 4.656.000 sel/mL, dan pada hari ke-9 adalah 4.784.000 sel/mL.



Gambar 3. Sel *Chlorella sp.*

4. Analisis Kadar Air

Hasil perhitungan kadar air mikroalga *chlorella sp.* kering adalah 9,457 %. Persen kadar air mikroalga *chlorella sp.* kering ini sudah cukup bagus karena kategori jumlah kadar air yang bagus adalah di bawah 10 %. Kadar air di bawah 10 % akan membantu dalam proses penyimpanan sampel. Komposisi kimia dalam sampel tetap terjaga dan tidak mudah ditumbuhi jamur. Kadar air biomassa kering ini juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya. Khamidah (2013) juga menyebutkan bahwa kadar air sampel kering *Chlorella sp.* adalah sebesar 10,899 %.

5. Preparasi Sampel

Hasil rendemen pengeringan biomassa basah *Chlorella sp.* adalah 4,812 % yaitu dari ± 834 gram biomassa basah, setelah dikeringkan diperoleh $\pm 40,13$ gram biomassa kering yang telah berbentuk serbuk halus.

6. Ekstraksi *Chlorella sp.*

Ekstraksi mikroalga *chlorella sp.* menggunakan metode ekstraksi soxhlet. Adapun prinsip utama dalam soxhletasi adalah pengambilan suatu komponen tertentu menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi yang bersifat kontinu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor) (Darmasih, 1997).

Proses ekstraksi akan terjadi berkali-kali, dalam penelitian ini proses ekstraksi dilakukan selama ± 6 jam dengan 1 kali siklus 13 menit. Selama proses ekstraksi terjadi, ekstrak yang turun ke labu alas bulat semakin jernih sehingga ekstrak yang berada dalam labu alas bulat semakin pekat.

Hasil dari ekstraksi diperoleh minyak dengan rendemen 5,2407 %, dengan kata lain dari 38,2 gram sampel mikroalga *chlorella sp.* kering diperoleh minyak sebanyak 1,9987 gram. Minyak yang diperoleh berwarna coklat kekuningan.

Hasil rendemen menunjukkan bahwa rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rachmaniah, (2010) yaitu 16,57 %. Hal ini dimungkinkan karena kurang lamanya waktu sirkulasi yang terjadi. Satu siklus dalam penelitian ini terjadi dalam waktu 13 menit, sehingga pelarut tidak dapat mengikat minyak secara maksimal sehingga rendemen yang dihasilkan kurang maksimal.

7. Hidrolisis minyak *chlorella sp.*

Hidrolisis minyak mikroalga *chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan katalis basa (KOH) dan pelarut metanol. Kawaroe, dkk. (2010) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa kandungan terbesar yang dimiliki oleh mikroalga *chlorella sp.* adalah asam linoleat sehingga untuk menentukan volume KOH yang digunakan dibuat dengan perhitungan trigliserida yang bereaksi adalah gliseril trilinoleat.

Sebanyak 1,5 gram minyak mikroalga *chlorella sp.* dimasukkan ke dalam labu alas bulat kemudian ditambahkan 3,33 ml KOH 12 %. Kemudian ditambahkan metanol sebanyak 5 mL. Campuran direfluks pada suhu 60 °C selama 90 menit disertai pengadukan menggunakan *stirer*. Penambahan metanol dilakukan karena adanya perbedaan sifat kepolaran antara KOH dengan trigliserida. KOH bersifat polar dan trigliserida bersifat non polar. Sehingga dibutuhkan medium perantara untuk menurunkan perbedaan sifat kepolaran tersebut. KOH memiliki

kelarutan yang baik dalam metanol selain itu metanol juga memiliki kepolaran diantara KOH dan trigliserida karena tingginya perbedaan kepolaran menyebabkan kontak dengan asam lemak sangat sedikit sehingga produk yang diperoleh juga sedikit (Insani, 2012).

Hidrolisis minyak dilakukan dengan katalis basa KOH 12 %. Hasil dari proses hidrolisis ini, rendemen yang diperoleh adalah sebesar 80 % atau dengan kata lain dari 1,5 g minyak hasil ekstraksi diperoleh 1,2 g asam lemak.

8. Uji toksisitas minyak dan asam lemak

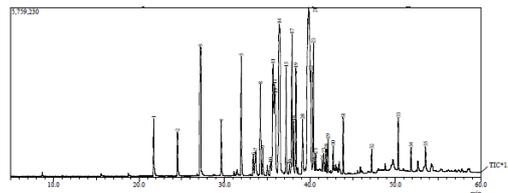
hasil nilai LC₅₀ menunjukkan bahwa minyak dan asam lemak memiliki aktivitas ketoksikan dalam BSLT jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50 % hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm. sehingga kedua senyawa tersebut bersifat toksik karena memiliki nilai LC₅₀ dibawah 1000 ppm. Dari kedua sampel dapat dilihat bahwa asam lemak memiliki efek toksik yang lebih tinggi karena mempunyai nilai LC₅₀ lebih rendah dari pada minyak yaitu 267 ppm sedangkan minyak yaitu 415 ppm.

Nilai LC₅₀ yang menggambarkan toksisitas berhubungan dengan struktur senyawa yang terkandung di dalamnya. Jika dibandingkan toksisitas minyak dengan asam lemak, perubahan gugus dari trigliserida menjadi asam lemak bebas menyebabkan naiknya toksisitas. Hal ini berkaitan dengan kemudahan penetrasi ke dalam membran sel *artemia salina* dan adanya asam lemak tak jenuh yang muncul.

9. Identifikasi menggunakan KG-SM

Identifikasi menggunakan KG-SM dilakukan untuk mengetahui golongan asam lemak yang terdapat dalam asam lemak mikroalga *chlorella sp.*. Identifikasi menggunakan KG-SM dibutuhkan sampel yang mudah menguap (volatil) sehingga perlu dilakukan esterifikasi untuk sampel asam lemak. Hal ini dilakukan karena fase gerak dari instrumen ini berupa gas.

Adapun hasil dari identifikasi menggunakan KG-SM adalah berupa kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 9.1.



Dari Gambar 9.1 dapat dilihat bahwa terdapat 35 puncak yang muncul dari asam lemak mikroalga *chlorella sp.* yang diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Sebanyak 35 puncak yang muncul terdapat 12 puncak yang menunjukkan asam lemak tak jenuh di tunjukkan pada Tabel 9.1.

Tabel 9.1 Asam Lemak Tak Jenuh Hasil Kromatogram KG

No	Puncak	T _r menit	Luas puncak (%)	Senyawa
1	7	33,656	1,19	Asam 6-Oktadekenoat
2	11	35,685	6,20	Asam 7,10-heksadekadienoat
3	12	35,856	3,91	Asam 7-heksadekenoat
4	13	35,942	1,92	Asam 9-heksadekenoat
5	17	37,908	5,72	Asam 10,13-oktadekadienoat
6	18	38,096	1,46	Asam 9-heksadekenoat
7	21	39,848	19,95	Asam 9,12-oktadekadienoat/ asam linoleat
8	22	40,092	3,72	Asam 9,12,15-oktadekatrienoat/ asam linolenat
9	25	40,663	0,37	Asam 9,11-oktadekadienoat

10	27	41,622	0,65	Asam 10-nonadekenoat
11	28	41,888	0,59	Asam 10-nonadekenoat
12	30	42,710	0,58	Asam 5,8,11,14-eikosatetraenoat

Kandungan asam lemak yang tertinggi dari penelitian ini adalah asam linoleat yang merupakan asam lemak tak jenuh. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Kawaroe (2010), bahwa kandungan asam lemak terbesar dari *Chlorella sp.* adalah asam linoleat sebanyak 45,068 %. Berdasarkan penelitian terdahulu ikatan terkonjugasi dari asam lemak tak jenuh berperan sebagai senyawa aktif anti kanker. Marliyana (2012), menyebutkan bahwa fraksi aktif dari ekstrak buah merah yang terdiri dari asam oleat, asam palmitat dan asam miristat mampu memberikan efek toksik pada larva udang *artemia salina*. Nilai LC_{50} yang diperoleh adalah 138,05 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa asam lemak mampu memberikan efek toksik pada larva udang *artemia salina*.

Dibandingkan dengan penelitian Marliyana (2012), nilai LC_{50} dari penelitian ini lebih besar (lebih tidak toksik). Hal ini dimungkinkan karena perbedaan dari komposisi asam lemak tersebut. Pada penelitian Marliyana (2012) komposisi dari asam lemak tak jenuhnya sebanyak 66,11 % sedangkan dalam penelitian ini adalah 46,26 % sehingga dimungkinkan hal inilah yang menyebabkan nilai LC_{50} nya lebih tinggi. Nilai LC_{50} dari hasil penelitian ini tergolong dalam kriteria pestisida menurut Meyer *et al.*, 1982. Dan juga tidak masuk dalam kriteria sebagai anti kanker karena asam linoleat yang dihasilkan bukan merupakan asam lemak terkonjugasi yaitu asam lemak linoleat dimana ikatan rangkapnya yang berjumlah dua tidak dipisahkan oleh dua ikatan tunggal namun hanya dipisahkan oleh satu ikatan tunggal (Cahanar, 2006). Sedangkan dalam

penelitian ini asam linoleat yang diperoleh adalah Asam 9,12-oktadekadienoat.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

1. Rendemen minyak hasil ekstraksi soxhlet menggunakan pelarut n-heksana adalah 5,2407 %, dan profil asam lemak yang muncul dari identifikasi menggunakan KG-SM adalah diperoleh 35 puncak kromatogram. 12 puncak merupakan asam lemak tak jenuh dengan komposisi terbanyak adalah asam linoleat.
2. Nilai LC_{50} minyak dan asam lemak masing-masing adalah 415 ppm dan 267 ppm.

2. Saran

Adapun saran yang diberikan oleh peneliti adalah agar dilakukan penelitian menggunakan pelarut non polar yang lain, seperti petroleum eter pada saat proses ekstraksi. Disarankan pula untuk memperpanjang waktu siklus ekstraksi, agar senyawa yang diinginkan dapat terekstrak secara maksimal.

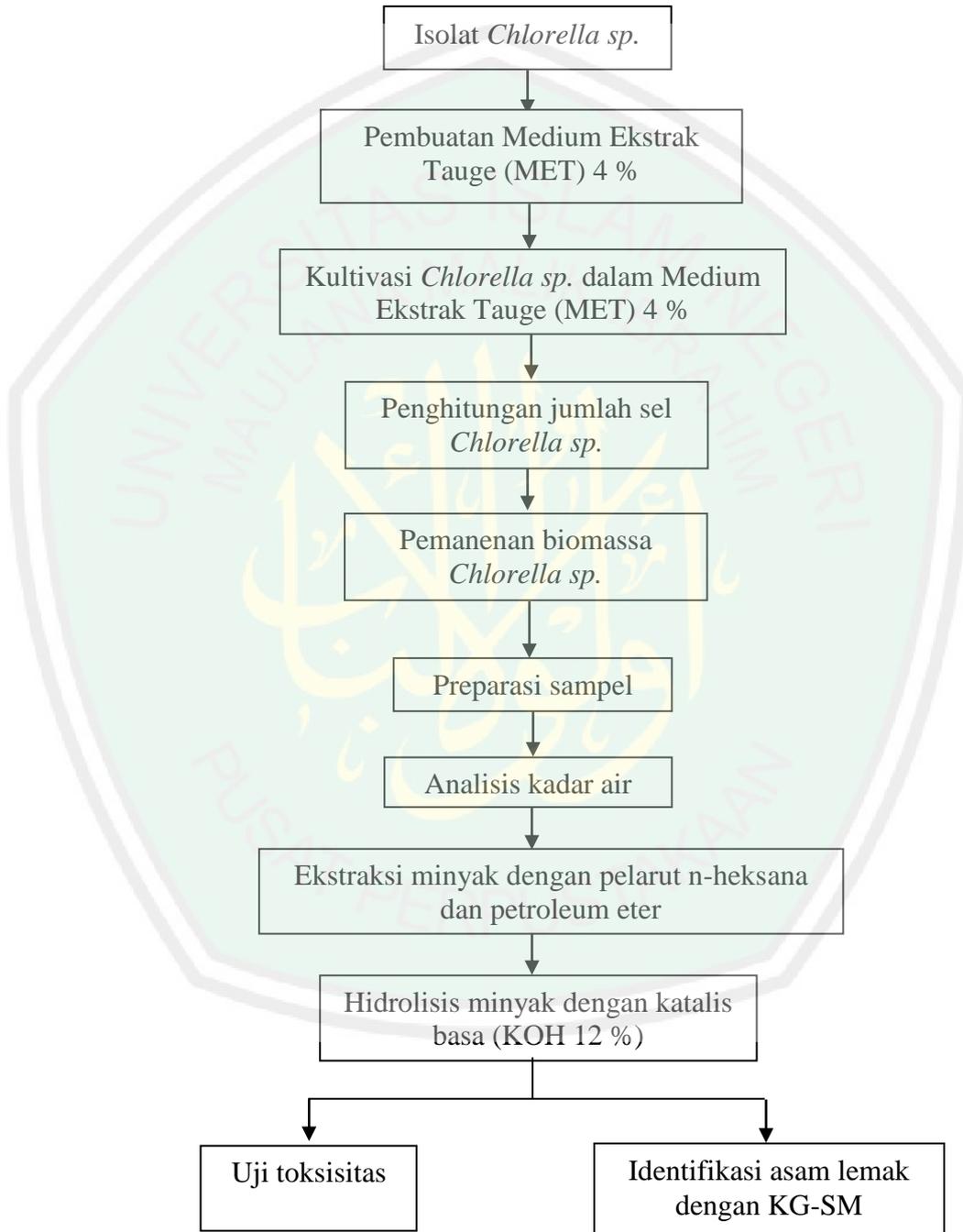
DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Becker. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. London: Cambridge University Press.
- Darmasih. 1997. *Prinsip Soxhlet*. peternakan.litbang.deptan.go.id/user/ptek97-24.pdf.
- Fasya, A.G. 2011. Sintesis Metil 10,12,14-oktadekatrienoat dari Asam 9,12,15-oktadekatrienoat (Asam α -linolenat) Biji Selasih (*Ocimum basilicum*) dan Uji Bioaktivitasnya. *Tesis Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-

- Anting (*Acalypha indica* Linn.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Indrayani, L.; Soetjipto, H. dan Sihasale, L. 2006. Skinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Insani, D. N. 2012. Studi Esterifikasi Antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit Dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida Rugosa* EC 3.1.1.3 Termobilisasi Pada Matriks Silika Gel 60. *Skripsi*. FMIPA UI. Depok
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Kawaroe, M., T. Prartono, Wulan Sari, Augustine. 2010. Fatty Acid Content of Indonesian Aquatic Microalgae. *HAYATI Journal of Biosciences*. Vol. 17(4): 196-200.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella Sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge Terhadap *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Marliyana, S. D., Rakhman, W. F., Nestri, H., Rakhmawati, R., 2012. Uji Toksisitas Secara *Brine Shrimpe Lethality* Ekstrak Buah Merah (*Pandanus Conoideus Lamk*). *Jurnal Penelitian Kimia*, 8 (1): 24-33.
- Merizawati. 2008. Analisis Sinar Merah, Hijau dan Biru (RGB) untuk Mengukur Kelimpahan Fitoplankton (*Chlorella sp.*) *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L.B. Nichols, D. E and McLaughlin, J. L. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. *Planta Medica*, 45: 31-34.
- Prihantini, N. B; Putri, B. dan Yuniati, R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains*. Volume 9, Nomor 1: 1-6.
- Rachmaniah, Orchidea, Setyarini Reni Dwi & Maulida Lailatul. 2010. *Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari Chlorella sp. dan Prediksinya sebagai Biodiesel*. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Rita W. S., Suirta I. W. dan Sabirin A. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa yang Berpotensi Sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica carantia* L). *Jurnal Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana*, 2(1), ISSN 1907-9850: 1-6.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. *Skripsi* Diterbitkan. Jatinangor: Universitas Padjajaran.
- Wati, A. dan Sylvia, A.M. Ekstraksi Minyak Dari Mikroalga Jenis *Chlorella sp.* Berbantuan Ultrasonik. *Jurnal*. Universitas Diponegoro.
- Wibawa Pratama J, Listyorini Dwi, fachriyah Enny. 2006. *Penentuan Komposisi Asam Lemak Ekstrak Minyak ikan Kembung (Rastrelliger kanagurta) dengan Gc-Ms dan Uji Toksisitasnya menggunakan Metode Bslt*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Diponegoro.

LAMPIRAN

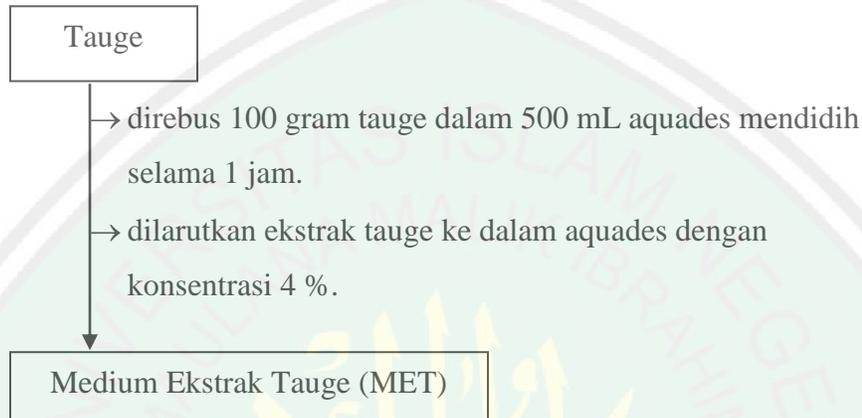
Lampiran 1. Tahapan Penelitian



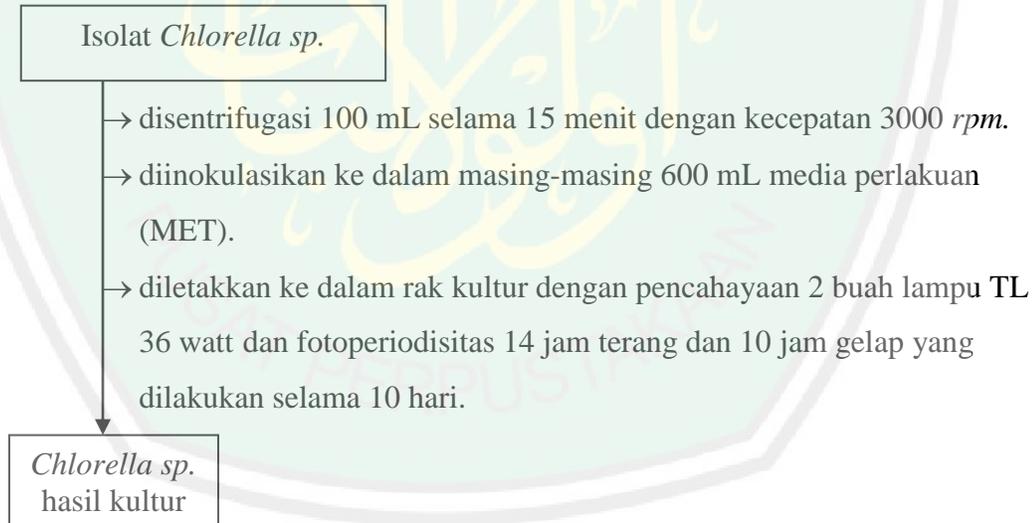
Lampiran 2. Skema Kerja

1. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

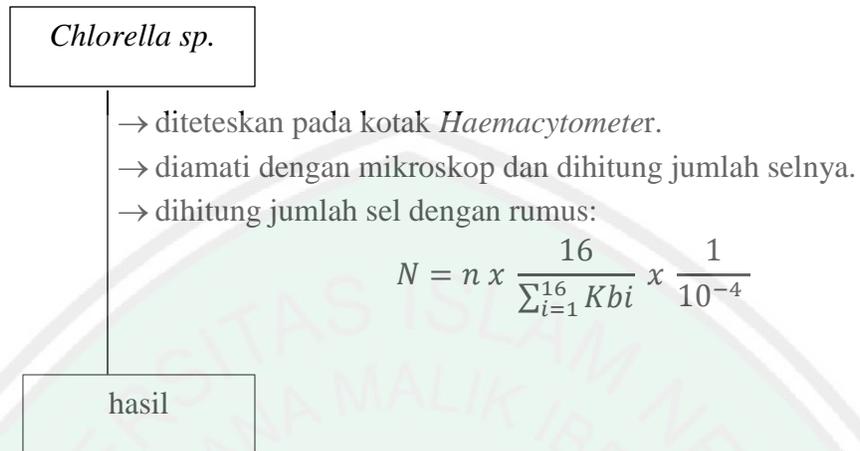
a. Pembuatan Medium Ekstraksi Tauge (MET)



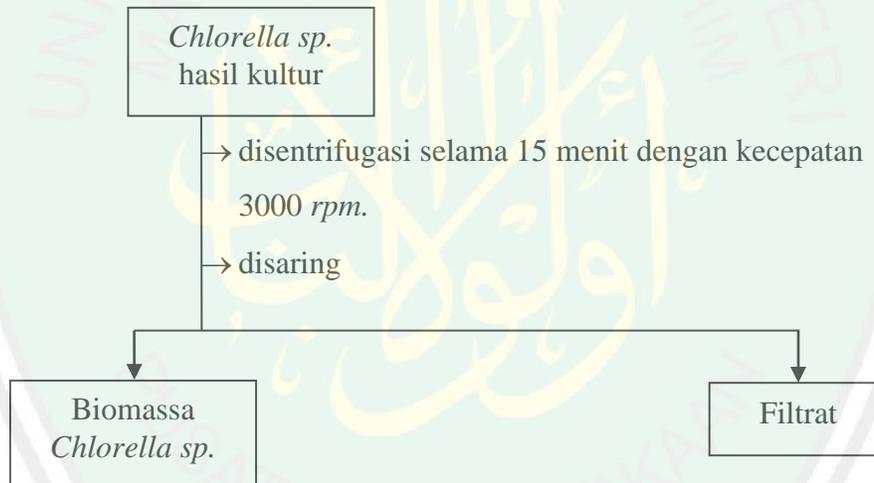
b. Kultivasi *Chlorella sp.* pada MET



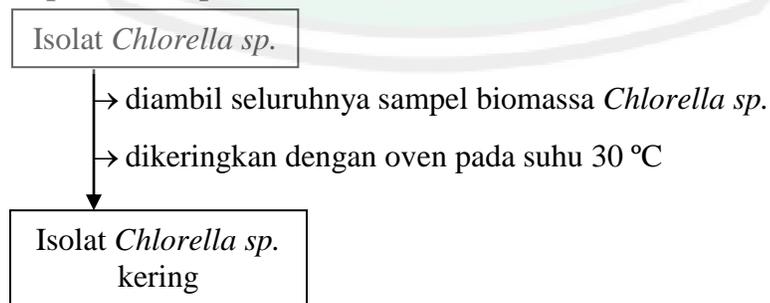
c. Penghitungan jumlah sel



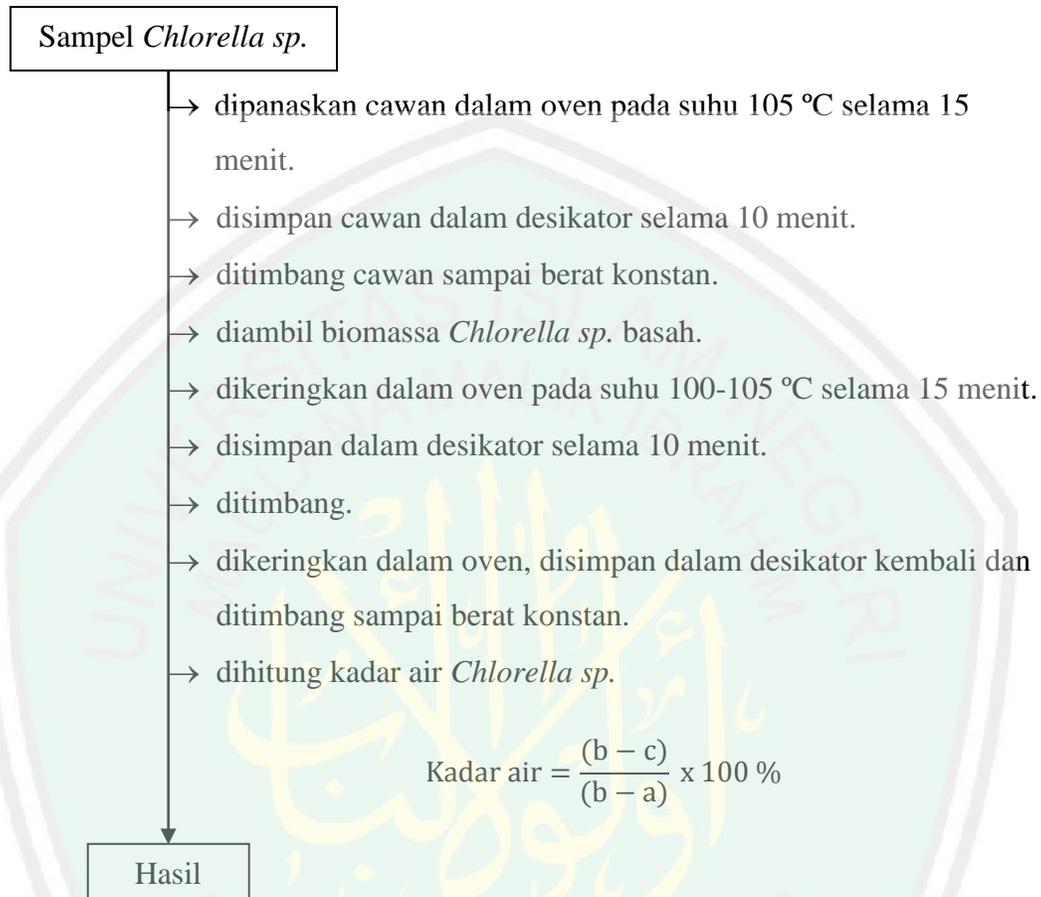
d. Pemanenan *Chlorella sp.*



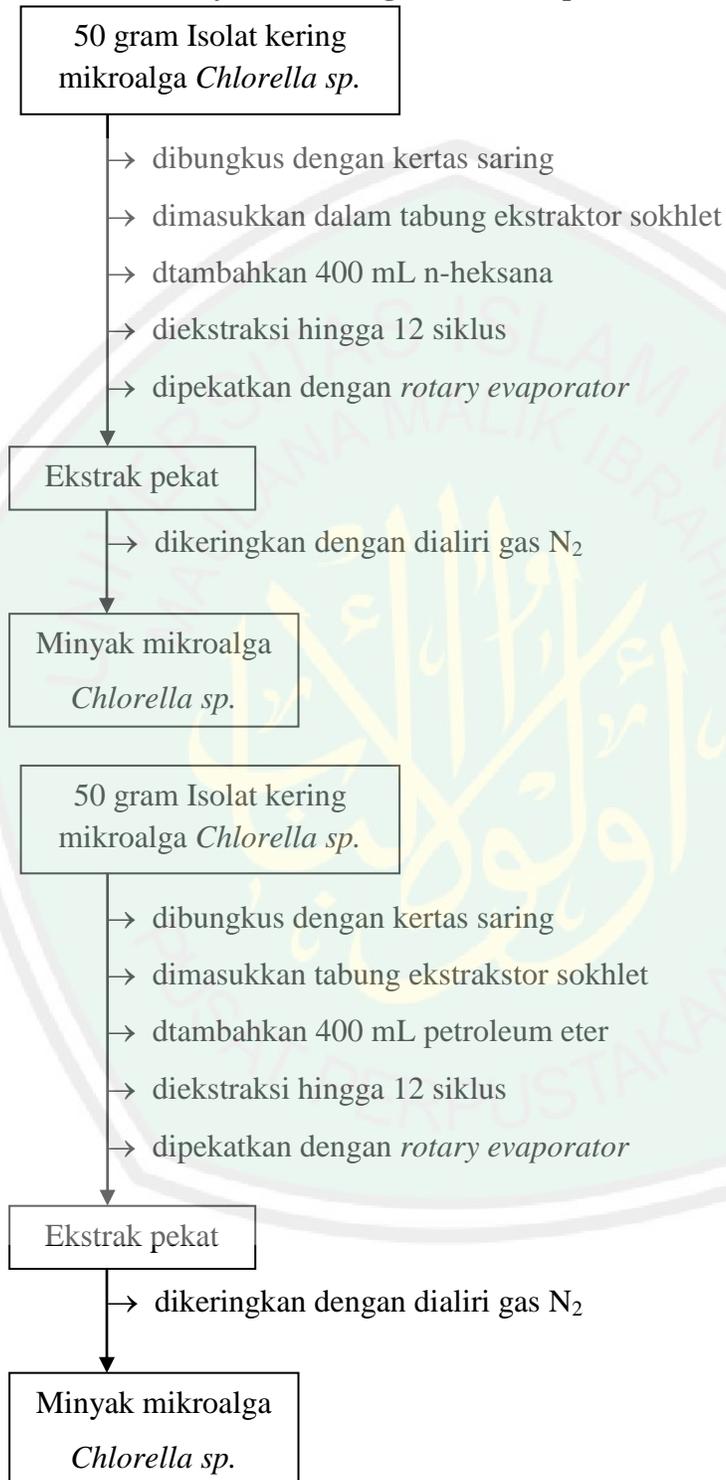
2. Preparasi Sampel



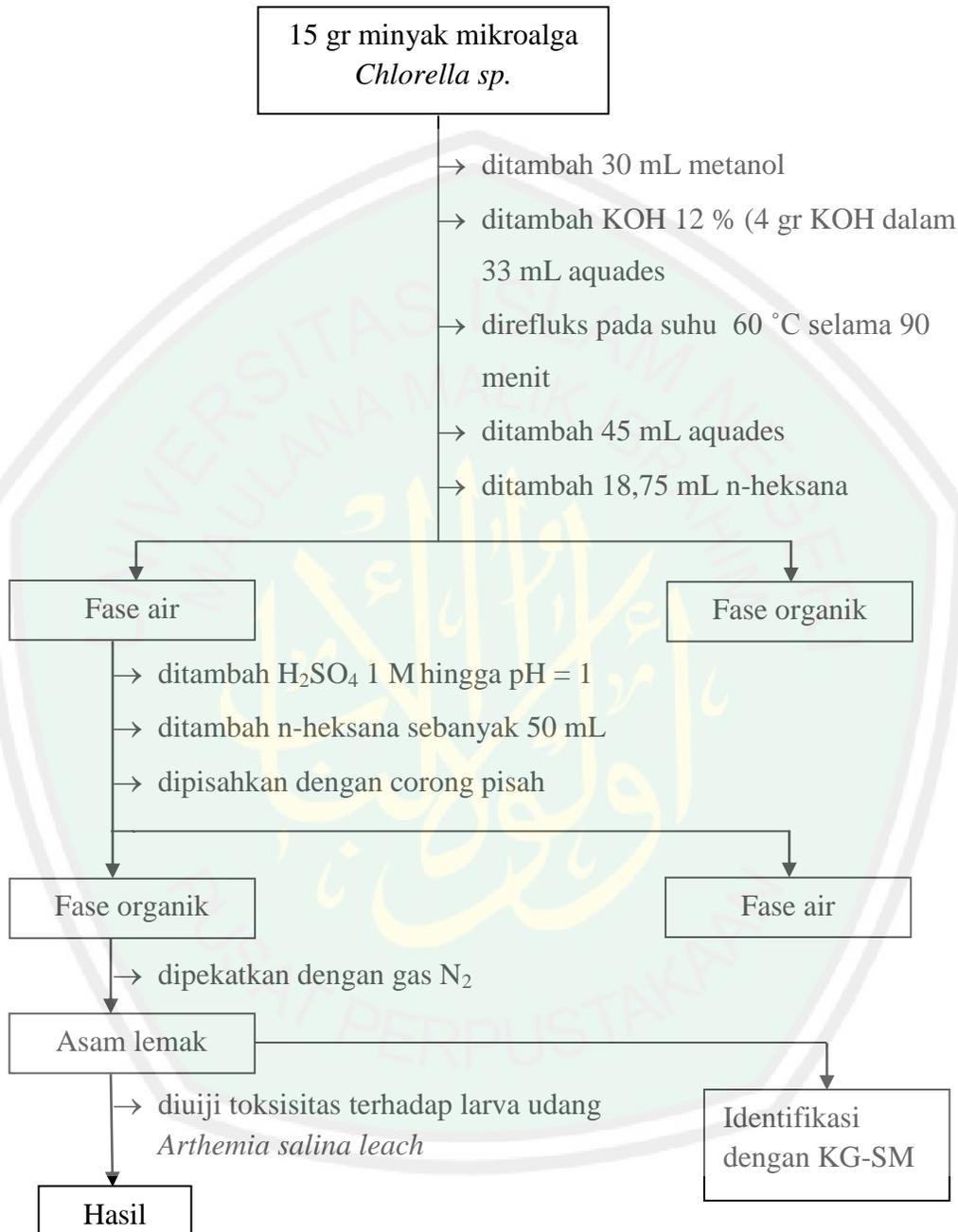
3. Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*



4. Ekstraksi Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

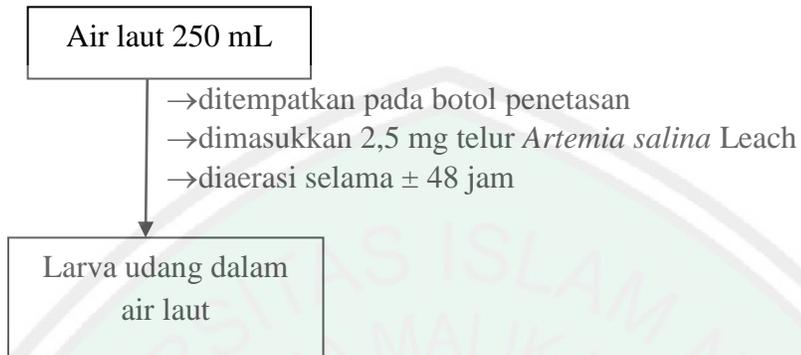


5. Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

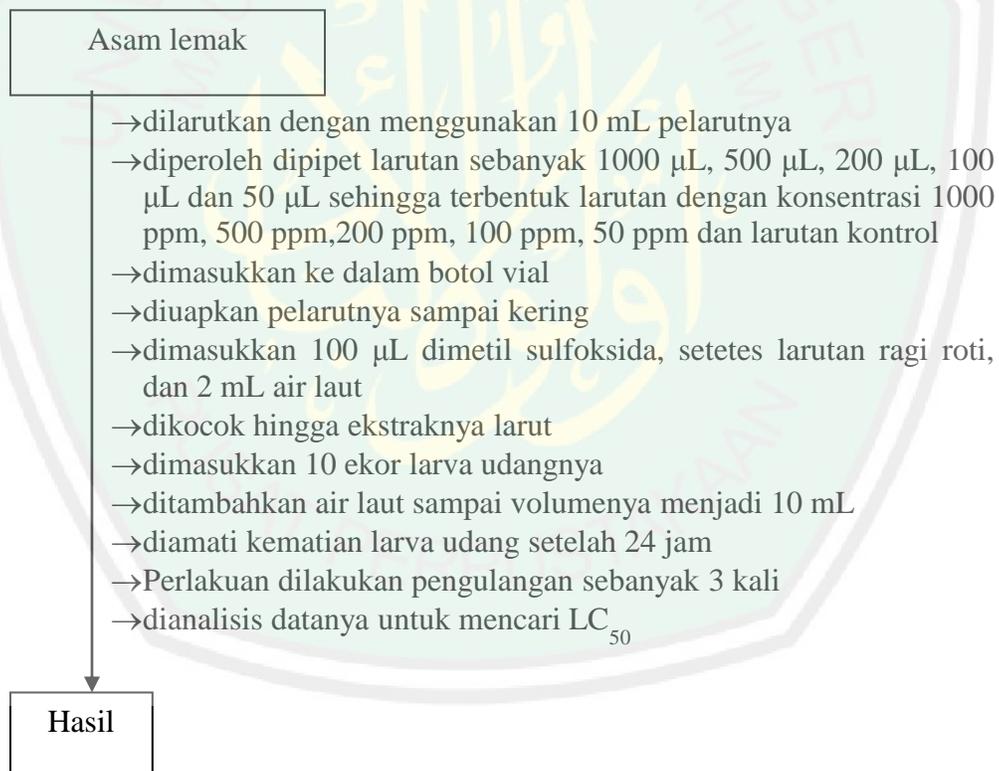


6. Uji toksisitas

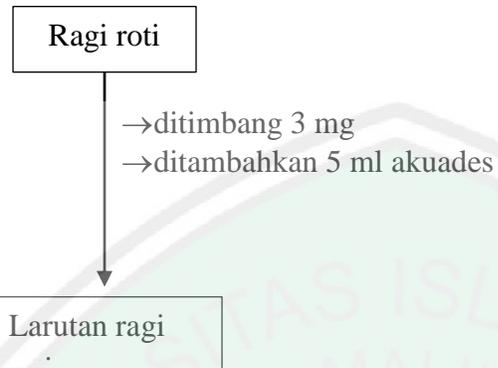
a. Penetasan Larva Udang



b. Uji Toksisitas



c. Pembuatan larutan ragi roti



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen Larutan Ekstrak

1. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %

$$\text{Volume} = 600 \text{ mL}$$

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

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

2. Pembuatan KOH 12 %

$$\text{Sampel minyak} = 1,5 \text{ g}$$

$$\text{Mol trigliseril trilinoleat} = \frac{1,5 \text{ g}}{840 \text{ g/mol}} = 0,001785 \text{ mol}$$

- Mol KOH yang dibutuhkan untuk tepat bereaksi

$$\begin{aligned} \text{Mol KOH} &= 3 \times 0,001785 \text{ mol} \\ &= 0,005357 \text{ mol} \end{aligned}$$

- KOH dibuat berlebih 1,25 x

$$\begin{aligned} \text{Mol KOH} &= 1,25 \times 0,005357 \text{ mol} \\ &= 0,0066964 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa KOH} &= 0,0066964 \text{ mol} \times 55,97 \text{ g/mol} \\ &= 0,37479 \approx 0,4 \text{ g} \end{aligned}$$

- 12 % KOH

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

$$12x = 40$$

$$x = 3,333 \text{ mL} \approx 3,3 \text{ mL aquades}$$

Cara pembuatan larutan KOH 12 % adalah ditimbang KOH sebanyak 0,4 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 25 ml. Selanjutnya dipipet 3,3 ml aquades dengan pipet ukur 5 ml kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker yang berisi KOH. Diaduk hingga KOH larut sempurna dalam aquades.

3. Perhitungan Metanol yang Dibutuhkan

$$\text{Sampel} = 1 \text{ gr asam linoleat}$$

$$\begin{aligned} \text{Mol asam linoleat} &= \frac{1 \text{ g}}{256,42 \text{ g/mol}} \\ &= 3,8998 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \end{aligned}$$

Metanol dibuat berlebih 6 x

$$\begin{aligned} \text{Mol MeOH} &= 6 \times 3,8998 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \\ &= 2,339 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa MeOH} &= 2,339 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \times 32 \text{ g/mol} \\ &= 0,748 \text{ g} \\ &= 0,748 \text{ g} \times 0,793 \text{ g/mL} \\ &= 0,593 \text{ mL} \approx 0,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

4. Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1M

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

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

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

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

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

$$= 18 \text{ mol}$$

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

$$= 18 \text{ M}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 0,5 \text{ L}$$

$$V_1 = 0,27 \text{ L}$$

$$= 27 \text{ mL}$$

Cara pembuatan larutan H_2SO_4 1 M adalah dipipet larutan H_2SO_4 pekat 98 %

Sebanyak 27 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 500 mL yang berisi \pm 250 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

5. Perhitungan Konsentrasi Larutan Asam Lemak Untuk Uji Toksisitas

a. Pembuatan larutan stok dari ekstrak asam lemak *Chlorella sp.* :

Larutan stok yang akan dibuat adalah 10 mL larutan ekstrak asam lemak

10000 ppm. Maka:

$$M = \text{mg/mL} = \text{mg}/10^{-3} \text{ L}$$

$$10000 \text{ ppm} = \text{mg}/10 \text{ mL} = \text{mg}/10^{-3} \text{ L}$$

$$\text{mg} = 10000 \text{ ppm} \times 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 100 \text{ mg}$$

Jadi, larutan stok 10000 ppm pada ekstrak asam lemak dibuat dengan dilarutkan 100 mg ekstrak sampel ke dalam 10 mL pelarutnya.

b. Pembuatan larutan ekstrak asam lemak 1000 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 1000 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak asam lemak 1000 ppm dibuat dengan 1000 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL larutan.

c. Pembuatan larutan ekstrak asam lemak 500 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 5 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 500 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak asam lemak 500 ppm dibuat dengan 500 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL larutan.

d. Pembuatan larutan ekstrak asam lemak 200 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 200 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 200 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak asam lemak 200 ppm dibuat dengan 200 μ L larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL larutan.

e. Pembuatan larutan ekstrak asam lemak 100 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \cdot \text{L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 100 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak asam lemak 100 ppm dibuat dengan 100 μ L larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL larutan.

f. Pembuatan larutan ekstrak asam lemak 50 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 50 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak asam lemak 50 ppm dibuat dengan 50 μ L larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL larutan.

6. Perhitungan analisa kadar air

Kadar Air Sampel Setelah Dioven

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{60,5893 \text{ gram} - 60,4947 \text{ gram}}{60,5893 \text{ gram} - 59,5890 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0946 \text{ gram}}{1,0003 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 9,4571 \%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 - 9,4571}$$

$$= 1,1044 \%$$

$$\text{Kadar Air Terkoreksi} = 9,4571 \% - 1,1044 \%$$

$$= 8,3527 \%$$

7. Perhitungan Rendemen Ekstrak

▪ Rendemen Minyak

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen Minyak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Awal Sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,9987g}{38,1374g} \times 100 \% \\ &= 5,2407 \% \end{aligned}$$

▪ Rendemen Hasil Hidrolisis

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen Hasil Hidrolisis} &= \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Awal Sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,2g}{1,5g} \times 100 \% \\ &= 80 \% \end{aligned}$$

8. Perhitungan Kelimpahan Sel *Chlorella sp.* Hari 7-9

Jumlah sel yang diperoleh selanjutnya dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Eaton, *et al.*, 2005 dalam Merizawati, 2008) :

$$N = n \times \frac{16}{\sum_{i=1}^{16} Kbi} \times \frac{1}{10^{-4}}$$

Keterangan : N = Kelimpahan individu (sel/mL)

n = Jumlah sel

16 = Jumlah kotak kecil

$\sum_{i=1}^{16} Kbi$ = Jumlah kotak kecil yang diamati pada *Haemocytometer*

10^{-4} = Volume air sampel yang menutupi 1 kotak besar pada

Haemocytometer

➤ Perhitungan Sel *Chlorella* sp.:

Hari	N	Jumlah sel
Hari ke 7	$(264+259+260+273) \times \frac{16}{4} \times \frac{1}{10^{-4}} = 4224 \times 10^4$	42.240.000
Hari ke 8	$(299+293+298+306+) \times \frac{16}{4} \times \frac{1}{10^{-4}} = 4784 \times 10^4$	47.840.000
Hari ke 9	$(301+299+302+301) \times \frac{16}{4} \times \frac{1}{10^{-4}} = 4816 \times 10^4$	48.160.000



Lampiran 4. Data Kematian Larva dan Perhitungan Nilai LC₅₀ minyak dan asam lemak mikroalga *chlorella sp.* menggunakan Program Minitab 16

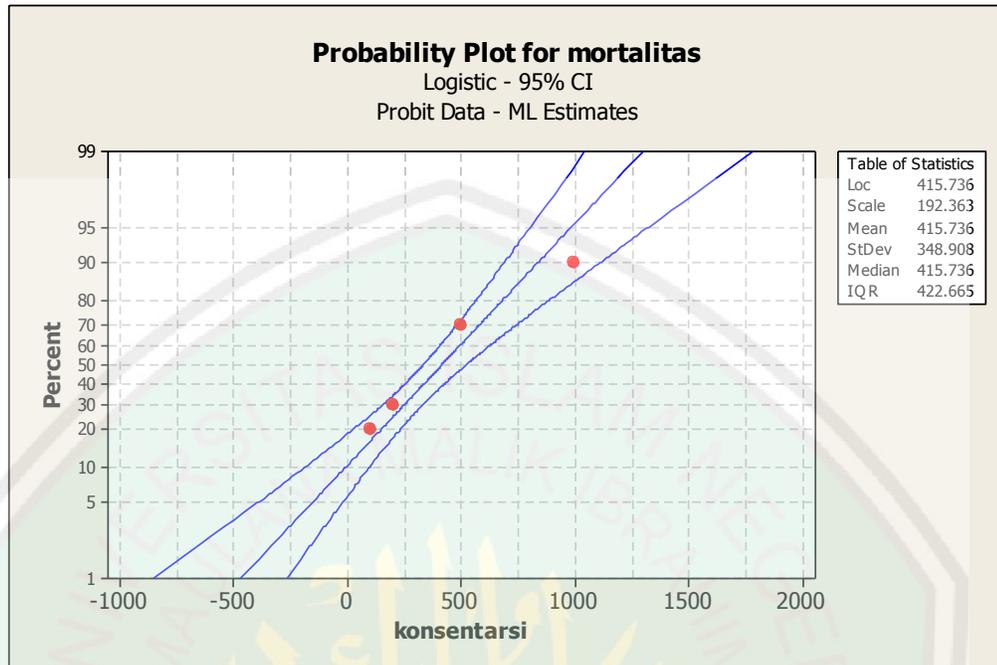
1. Minyak mikroalga *chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Artemia salina yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	1	1	0	1	10
0**	0	0	0	0	0
0***	0	0	0	0	0
50	1	0	1	1	0
100	3	3	4	3	20
200	4	4	3	4	30
500	8	8	9	8	70
1000	10	10	10	10	90

Mortalitas = %Mortalitas x Jumlah hewan uji

Mortalitas	Jumlah Hewan Uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
3	30	0*
0	30	0**
0	30	0***
0	30	50
6	30	100
9	30	200
21	30	500
27	30	1000

Keterangan : * kontrol n-heksana
 ** kontrol DMSO
 *** kontrol ragi roti



Gambar L.6.1 Kurva mortalitas *Artemia salina* L. Minyak mikroalga *chlorella* sp. dengan nilai $LC_{50} = 415$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentarsi

Distribution: Logistic

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	63
	Failure	87
jumlah larva	Total	150

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.16121	0.339778	-6.36	0.000
konsentarsi	0.0051985	0.0008581	6.06	0.000

Natural
Response 0

Log-Likelihood = -67.288

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	8.3621	3	0.039
Deviance	11.7433	3	0.008

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	415.736	45.2786	326.992	504.481
Scale	192.363	31.7529	139.193	265.844

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-468.195	134.353	-851.335	-266.057
2	-332.906	113.323	-653.919	-161.264
3	-252.937	101.154	-537.751	-98.7947
4	-195.604	92.6049	-454.817	-53.6578
5	-150.665	86.0375	-390.083	-18.0074
6	-113.557	80.7257	-336.855	11.6563
7	-81.8472	76.2832	-291.567	37.2032
8	-54.0811	72.4801	-252.091	59.7510
9	-29.3216	69.1687	-217.054	80.0220
10	-6.92855	66.2484	-185.520	98.5106
20	149.065	48.9106	27.7665	233.683
30	252.748	42.4120	158.458	334.600
40	337.740	41.8239	254.745	428.170
50	415.736	45.2786	333.909	523.235
60	493.733	51.7937	406.180	625.194
70	578.725	61.2307	479.837	741.394

80	682.408	74.7221	565.507	887.332
90	838.401	97.1941	689.921	1111.38
91	860.794	100.549	707.519	1143.80
92	885.554	104.286	726.922	1179.71
93	913.320	108.506	748.622	1220.03
94	945.030	113.360	773.334	1266.15
95	982.138	119.081	802.171	1320.21
96	1027.08	126.061	836.992	1385.77
97	1084.41	135.033	881.281	1469.55
98	1164.38	147.651	942.853	1586.62
99	1299.67	169.199	1046.62	1785.07

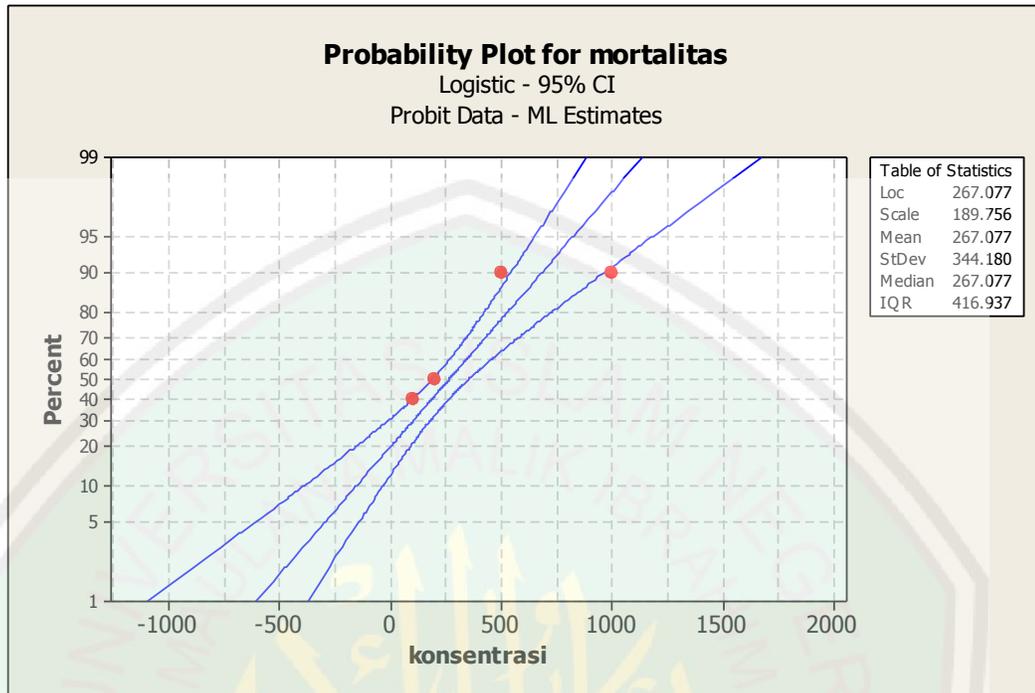
2. Asam lemak mikroalga *chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Artemia salina yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	1	1	1	1	10
0**	0	0	0	0	0
0***	0	0	0	0	0
50	1	1	0	1	0
100	3	5	5	5	40
200	4	6	6	6	50
500	10	10	10	10	90
1000	10	10	10	10	90

Mortalitas = %Mortalitas x Jumlah hewan uji

Mortalitas	Jumlah Hewan Uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
3	30	0*
0	30	0**
0	30	0***
0	30	50
12	30	100
15	30	200
27	30	500
27	30	1000

Keterangan : * kontrol n-heksana
 ** kontrol DMSO
 *** kontrol ragi roti



Gambar L.6.1 Kurva mortalitas *Artemia salina* L. Asam lemak mikroalga *chlorella* sp. dengan nilai LC₅₀ = 367 ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	81
	Failure	69
jumlah larva	Total	150

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.40747	0.298751	-4.71	0.000

konsentrasi 0.0052699 0.0009849 5.35 0.000
 Natural
 Response 0

Log-Likelihood = -74.131

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	24.2884	3	0.000
Deviance	27.2820	3	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	267.077	38.8819	190.870	343.284
Scale	189.756	35.4638	131.557	273.702

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-604.875	159.657	-1093.48	-373.410
2	-471.420	135.565	-884.557	-274.056
3	-392.534	121.486	-761.386	-215.006
4	-335.978	111.498	-673.291	-172.461
5	-291.649	103.749	-604.402	-138.950
6	-255.044	97.4176	-547.652	-111.146
7	-223.763	92.0647	-499.273	-87.2686
8	-196.374	87.4295	-457.017	-66.2559
9	-171.950	83.3441	-419.434	-47.4212
10	-149.860	79.6938	-385.534	-30.2951
20	4.01888	56.1355	-153.280	92.9014
30	106.297	44.0388	-6.62228	182.500
40	190.137	38.6151	103.258	266.286
50	267.077	38.8819	191.473	355.796
60	344.016	44.1136	267.758	457.237

70	427.857	53.7587	341.802	576.859
80	530.135	68.6037	425.402	729.515
90	684.014	93.8945	544.992	965.376
91	706.103	97.6826	561.838	999.556
92	730.527	101.902	580.401	1037.41
93	757.917	106.667	601.150	1079.93
94	789.198	112.148	624.770	1128.57
95	825.802	118.605	652.321	1185.57
96	870.132	126.480	685.578	1254.71
97	926.688	136.597	727.867	1343.06
98	1005.57	150.812	786.647	1466.51
99	1139.03	175.059	885.692	1675.73



Lampiran 5. Perhitungan Nilai LC₅₀ Minyak dan Asam Lemak secara Manual

1. Minyak mikroalga *chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Log konsentrasi (x)	Jumlah larva (ekor)	Jumlah larva yang mati (ekor) [#]	% Mortalitas	Mortalitas	Probit % mortalitas (y)*
0*	-	30	1	10	3	-
0**	-	30	0	0	0	-
0***	-	30	0	0	0	-
50	1,698	30	1	0	0	-
100	2	30	3	20	6	4,16
200	2,301	30	4	30	9	4,48
500	2,698	30	8	70	21	5,52
1000	3	30	10	90	27	6,28

Keterangan : * kontrol n-heksana

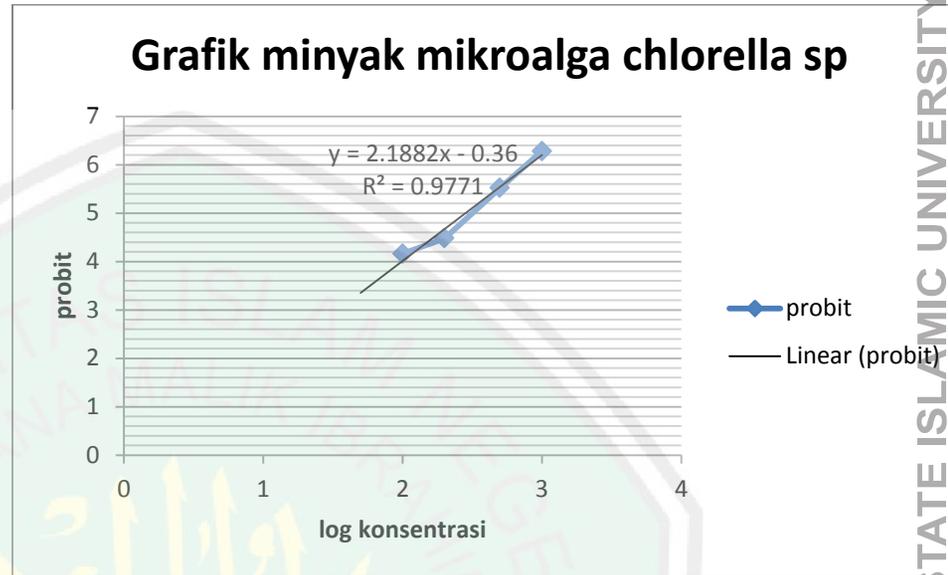
** kontrol DMSO

*** kontrol ragi roti

[#] diambil dari data modus (angka yang sering muncul) pada kematian larva

Keterangan *= data terlampir

Grafik hubungan antara Log Konsentrasi (x) dan Probit (y) pada minyak mikroalga *chlorella sp.*



•Dicari nilai x

$$y = 2,1882x - 0,36$$

$$5 = 2,1882x - 0,36$$

$$2,1882x = 5 + 0,36$$

$$1,3843x = 5,36$$

$$x = 2,449$$

Nilai LC_{50} = antilog x

$$= \text{antilog}(2,449)$$

$$= 281,190 \text{ ppm}$$

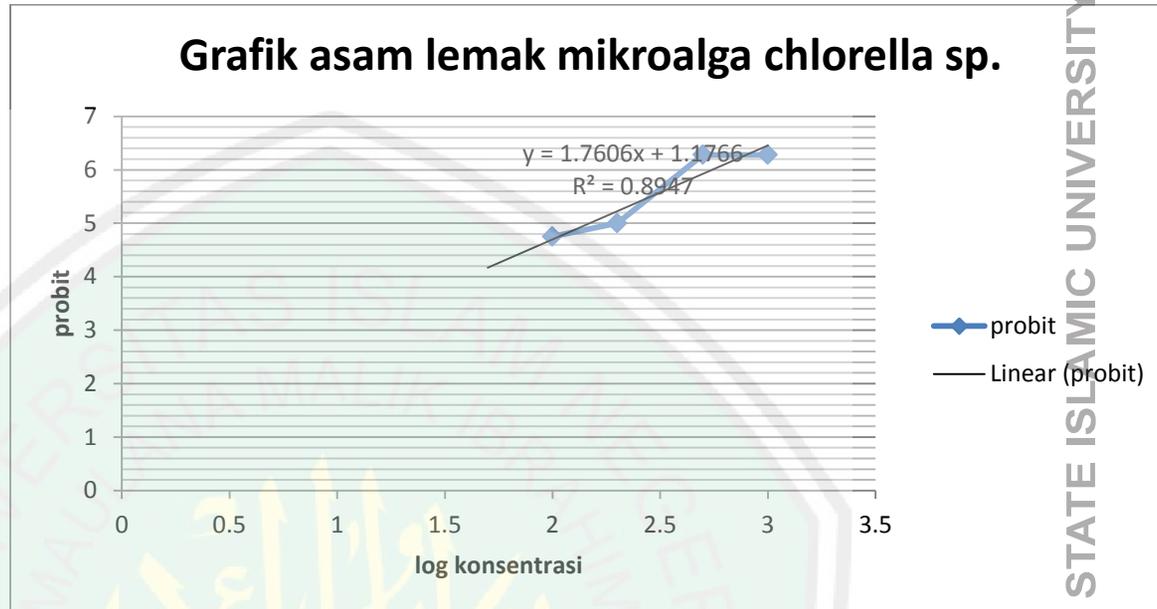
2. Asam Lemak mikroalga *chlorella* sp.

Konsentrasi (ppm)	Log konsentrasi (x)	Jumlah larva (ekor)	Jumlah larva yang mati (ekor) [#]	% Mortalitas	Mortalitas	Proit % mortalitas (y)*
0*	-	30	1	10	3	-
0**	-	30	0	0	0	-
0***	-	30	0	0	0	-
50	1,698	30	1	0	0	-
100	2	30	5	40	12	4,75
200	2,301	30	6	50	15	5,00
500	2,698	30	10	90	27	6,28
1000	3	30	10	90	27	6,28

Keterangan : * kontrol n-heksana
 ** kontrol DMSO
 *** kontrol ragi roti
[#] diambil dari data modus (angka yang sering muncul) pada kematian larva

Keterangan *= data terlampir

Grafik hubungan antara Log Konsentrasi (x) dan Probit (y) pada asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*



•Dicari nilai x

$$y = 1,7606x + 1,1766$$

$$5 = 1,7606x + 1,1766$$

$$1,7606x = 5 - 1,1766$$

$$1,7606x = 3,234$$

$$x = 1,8368$$

Nilai LC_{50} = antilog x

$$= \text{antilog}(1,8638)$$

$$= 68,675 \text{ ppm}$$

Tabel Probit (Finney, 1952):

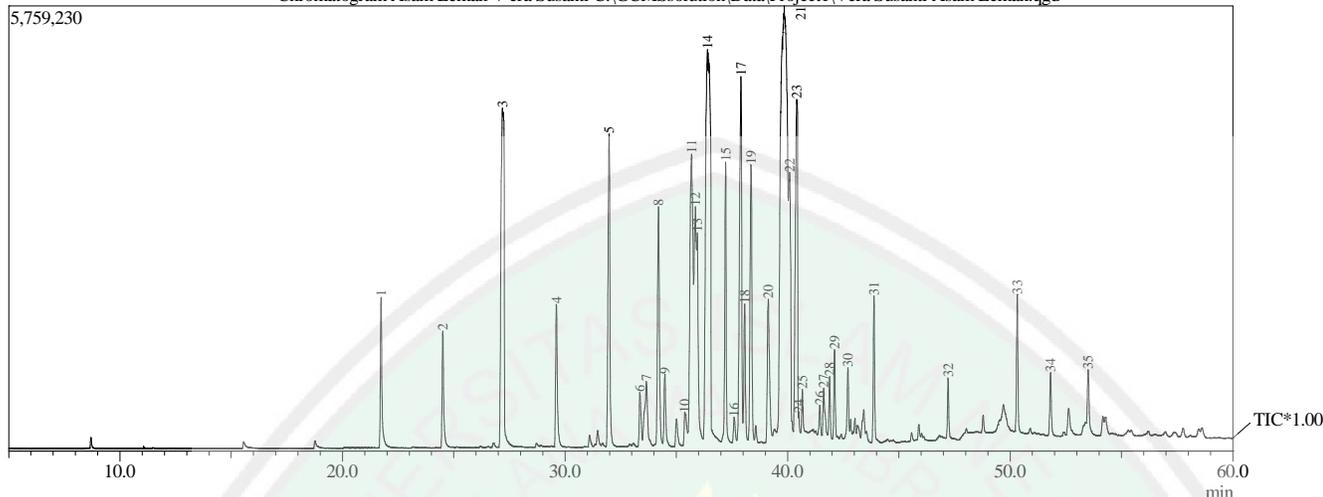
%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09



Sample Information

Analyzed by : Admin
 Sample Name : Asam Lemak Vera Susanti
 Sample ID : 6.14.35.1
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Vera Susanti Asam Lemak.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\biodisel jefry.qgm
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\MARET 27 2014 B.qgt

Chromatogram Asam Lemak Vera Susanti C:\GCMSsolution\Data\Project1\Vera Susanti Asam Lemak.qgd

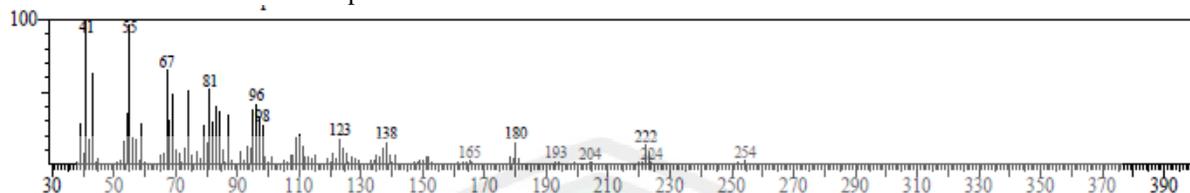


Peak Report TIC

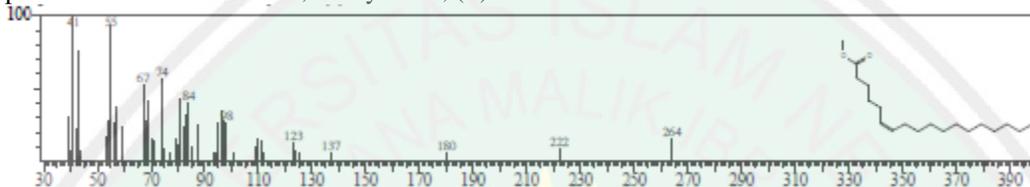
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Name
1	21.734	21.642	21.892	8597152	1.52	1911897	
2	24.507	24.417	24.658	6811062	1.21	1487097	
3	27.185	27.025	27.333	41987225	7.43	4309692	
4	29.611	29.508	29.783	9409881	1.67	1826486	
5	31.980	31.842	32.142	23091499	4.09	4025951	
6	33.361	33.275	33.475	3760650	0.67	683209	
7	33.656	33.475	33.783	6701191	1.19	775194	
8	34.199	34.067	34.358	18034601	3.19	3068557	
9	34.485	34.358	34.608	4436879	0.79	884316	
10	35.375	35.300	35.533	3274425	0.58	409328	
11	35.685	35.533	35.775	35014937	6.20	3711414	
12	35.856	35.775	35.917	22083680	3.91	3007533	
13	35.942	35.917	36.142	10822270	1.92	2659654	
14	36.398	36.208	36.600	71969795	12.74	4988880	
15	37.215	37.100	37.333	14960929	2.65	3549511	
16	37.592	37.525	37.742	1684737	0.30	313329	
17	37.908	37.742	37.992	32323844	5.72	4713787	
18	38.069	37.992	38.192	8268230	1.46	1765067	
19	38.354	38.192	38.500	20755998	3.67	3561487	
20	39.131	39.017	39.308	11984050	2.12	1815675	
21	39.848	39.542	40.033	112732778	19.95	5486267	
22	40.092	40.033	40.242	21013861	3.72	3343956	
23	40.410	40.242	40.483	30721937	5.44	4299940	
24	40.508	40.483	40.567	573738	0.10	242713	
25	40.663	40.583	40.758	2072619	0.37	549451	
26	41.446	41.367	41.525	1545455	0.27	376010	
27	41.622	41.525	41.767	3658062	0.65	620739	
28	41.888	41.767	41.983	3356700	0.59	793485	
29	42.110	42.017	42.208	4842399	0.86	1145014	
30	42.710	42.625	42.783	3300939	0.58	828310	
31	43.879	43.783	43.983	7540111	1.33	1874661	
32	47.211	47.125	47.317	3029789	0.54	775248	
33	50.321	50.217	50.425	7517424	1.33	1759669	
34	51.814	51.725	51.925	3706200	0.66	795586	
35	53.504	53.417	53.617	3443252	0.61	722882	

Lampiran 6. Kromatogram KG-SM

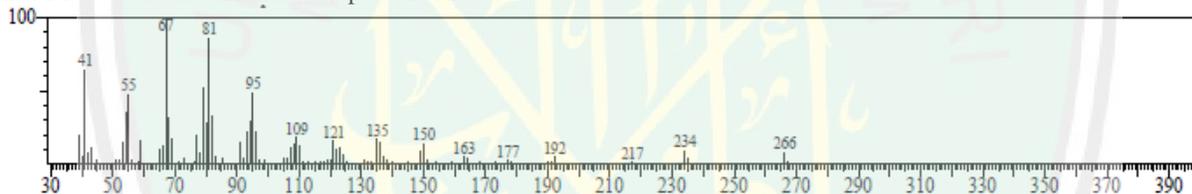
1. Line 7#: R.Time:33.658(Scan#:3656) MassPeaks:113
RawMode:Averaged 33.650-33.667(3655-3657) BasePeak:41.05(48581)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:10432 Library:NIST12.LIB
SI:90 Formula:C19H36O2 CAS:2777-58-4 MolWeight:296 RetIndex:0
CompName:6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-



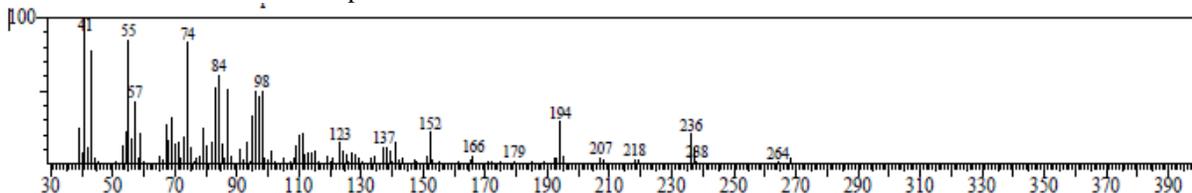
2. Line#:11 R.Time:35.683(Scan#:3899) MassPeaks:85
RawMode:Averaged 35.675-35.692(3898-3900) BasePeak:67.00(217901)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



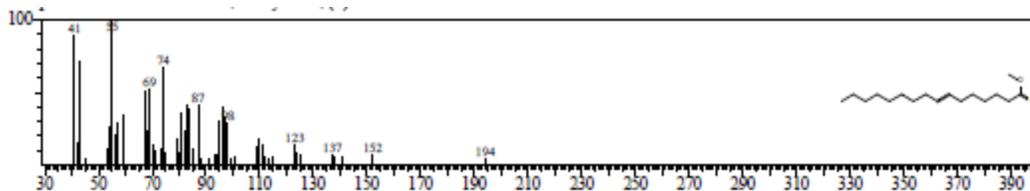
Hit#:1 Entry:121635 Library:WILEY229.LIB
SI:90 Formula:C17H30O2 CAS:16106-03-9 MolWeight:266 RetIndex:0
CompName:7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL 7,10-HEXADECADIENOATE \$\$



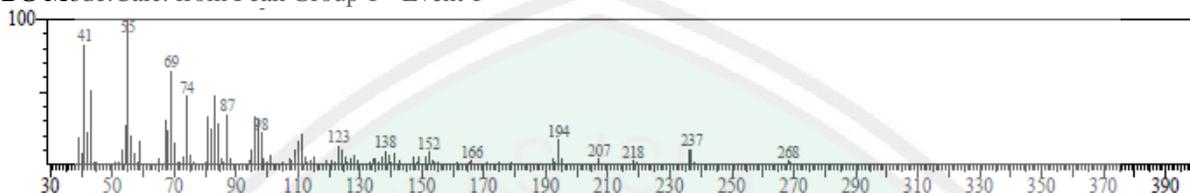
3. Line#:12 R.Time:35.858(Scan#:3920) MassPeaks:112
RawMode:Averaged 35.850-35.867(3919-3921) BasePeak:41.05(44585)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



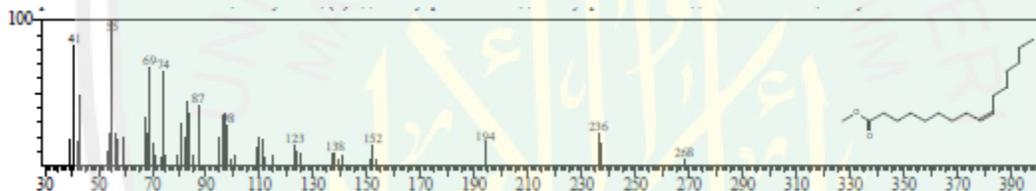
Hit#:3 Entry:37409 Library:NIST62.LIB
SI:87 Formula:C17H32O2 CAS:56875-67-3 MolWeight:268 RetIndex:0
CompName:7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-



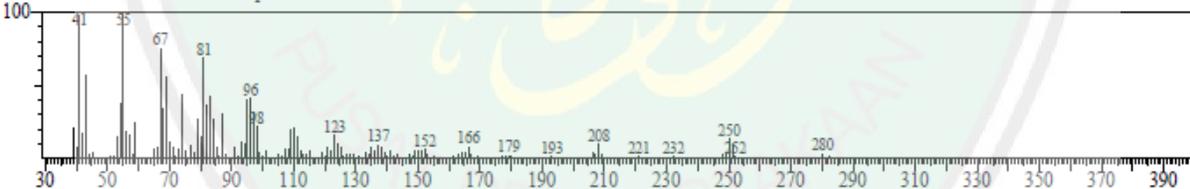
4. Line#:13 R.Time:35.942(Scan#:3930) MassPeaks:101
 RawMode:Averaged 35.933-35.950(3929-3931) BasePeak:55.00(36634)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



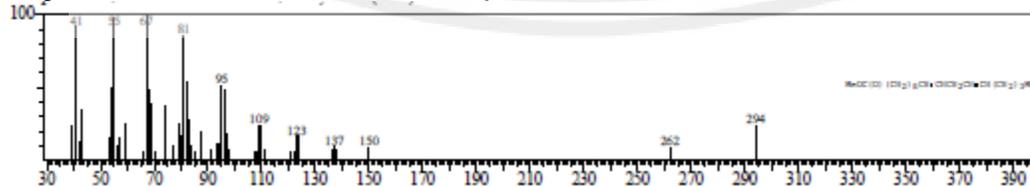
Hit#:1 Entry:37404 Library:NIST62.LIB
 SI:94 Formula:C17H32O2 CAS:1120-25-8 MolWeight:268 RetIndex:0
 CompName:9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- \$\$ Methyl palmitoleate \$\$ Methyl palmitoleinate \$\$
 Palmitoleic acid, methyl ester



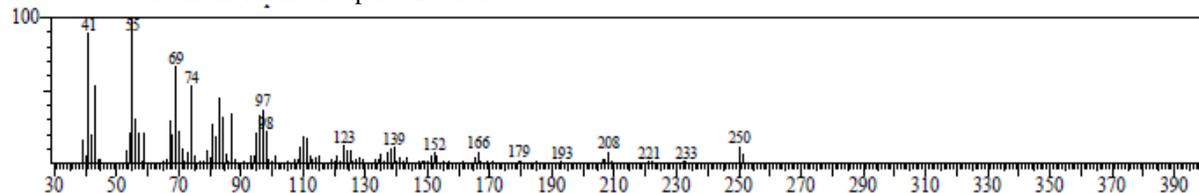
5. Line#:17 R.Time:37.908(Scan#:4166) MassPeaks:117
 RawMode:Averaged 37.900-37.917(4165-4167) BasePeak:55.05(289746)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



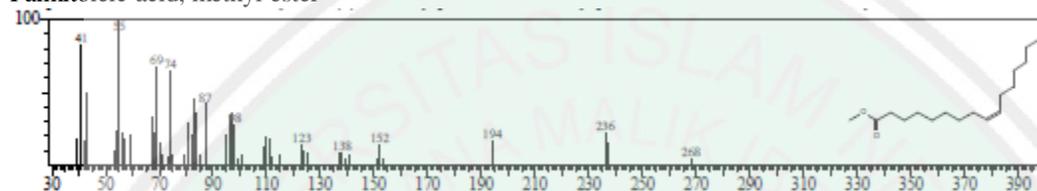
Hit#:1 Entry:141523 Library:WILEY229.LIB
 SI:89 Formula:C19H34O2 CAS:56554-62-2 MolWeight:294 RetIndex:0
 CompName:10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester (CAS)



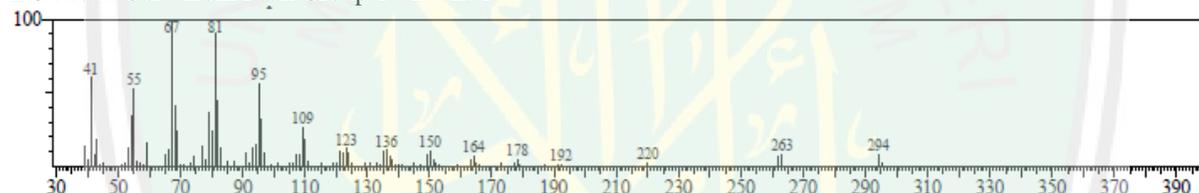
6. Line#:18 R.Time:38.067(Scan#:4185) MassPeaks:109
 RawMode:Averaged 38.058-38.075(4184-4186) BasePeak:55.05(122022)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



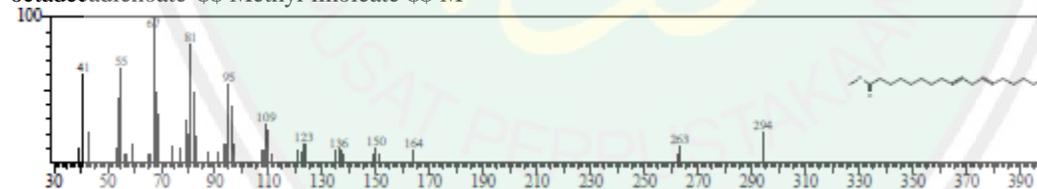
Hit#:4 Entry:37404 Library:NIST62.LIB
 SI:92 Formula:C17H32O2 CAS:1120-25-8 MolWeight:268 RetIndex:0
 CompName:9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- \$\$ Methyl palmitoleate \$\$ Methyl palmitoleinate \$\$
 Palmitoleic acid, methyl ester



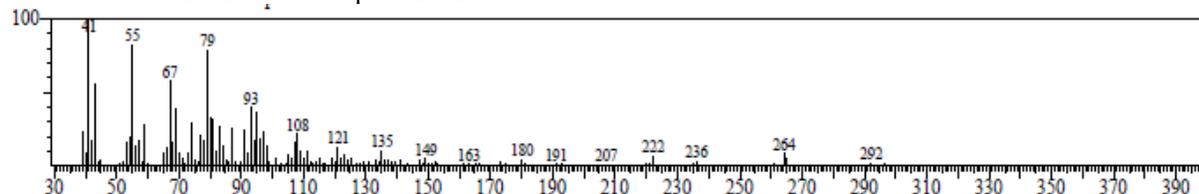
7. Line#:21 R.Time:39.850(Scan#:4399) MassPeaks:93
 RawMode:Averaged 39.842-39.858(4398-4400) BasePeak:67.00(321802)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:41849 Library:NIST62.LIB
 SI:94 Formula:C19H34O2 CAS:112-63-0 MolWeight:294 RetIndex:0
 CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester \$\$ Linoleic acid, methyl ester \$\$ Methyl cis,cis-9,12-
 octadecadienoate \$\$ Methyl linoleate \$\$ M

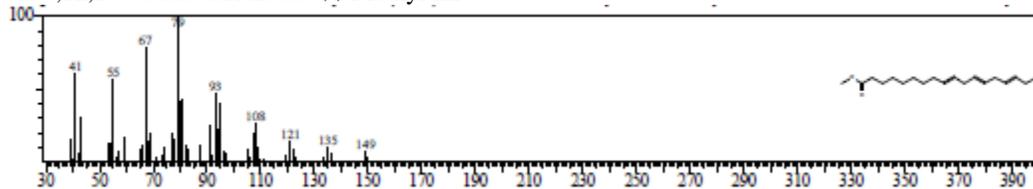


8. Line#:22 R.Time:40.092(Scan#:4428) MassPeaks:116
 RawMode:Averaged 40.083-40.100(4427-4429) BasePeak:41.05(81416)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

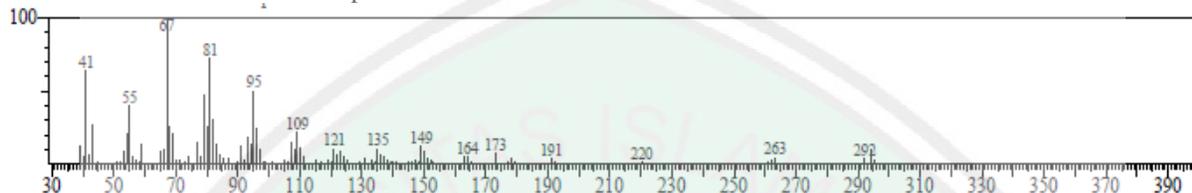


Hit#:1 Entry:41563 Library:NIST62.LIB
 SI:87 Formula:C19H32O2 CAS:301-00-8 MolWeight:292 RetIndex:0
 CompName:9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)- \$\$ Linolenic acid, methyl ester \$\$ Methyl all-

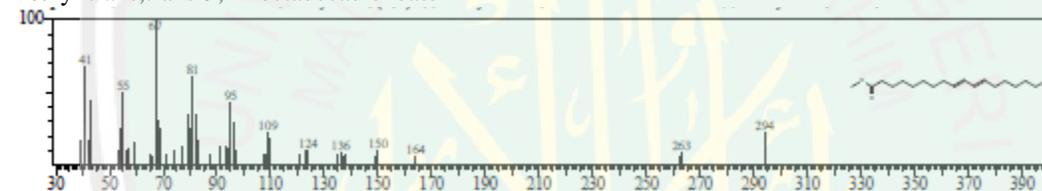
cis-9,12,15-octadecatrienoate \$\$ Methyl lin



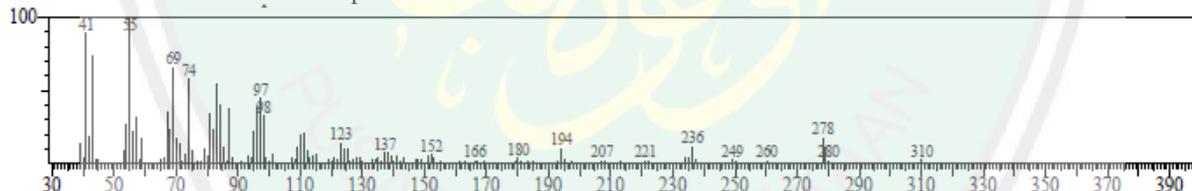
9. Line#:25 R.Time:40.667(Scan#:4497) MassPeaks:99
RawMode:Averaged 40.658-40.675(4496-4498) BasePeak:67.00(50410)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



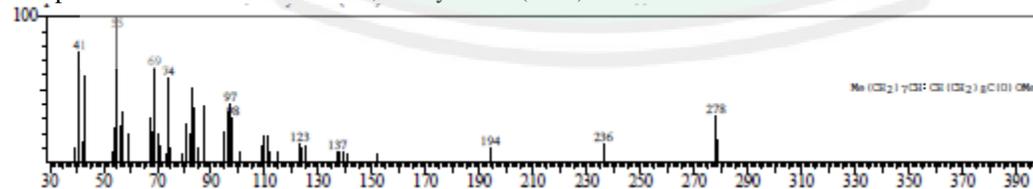
Hit#:1 Entry:41842 Library:NIST62.LIB
SI:90 Formula:C19H34O2 CAS:13038-47-6 MolWeight:294 RetIndex:0
CompName:9,11-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)- \$\$ Methyl trans-9,trans-11-octadecadienoate \$\$
Methyl trans,trans-9,11-octadecadienoate



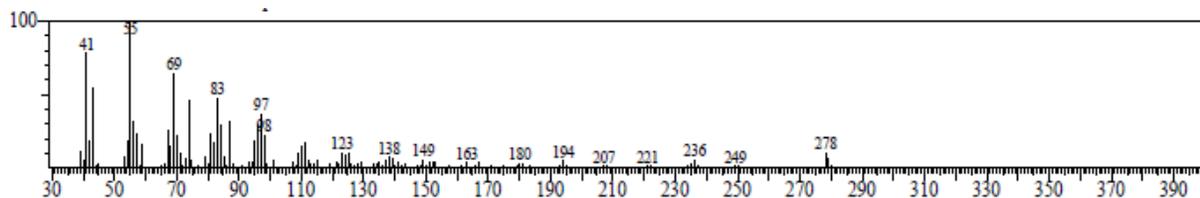
10. Line#:27 R.Time:41.625(Scan#:4612) MassPeaks:116
RawMode:Averaged 41.617-41.633(4611-4613) BasePeak:55.05(40588)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



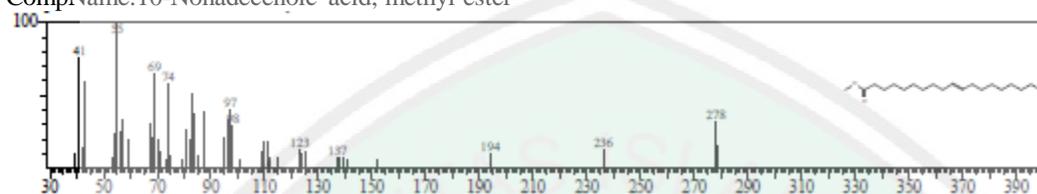
Hit#:1 Entry:151974 Library:WILEY229.LIB
SI:97 Formula:C20 H38 O2 CAS:56599-83-8 MolWeight:310 RetIndex:0
CompName:10-Nonadecenoic acid, methyl ester (CAS) METHYL 10-NONADECENOATE \$\$



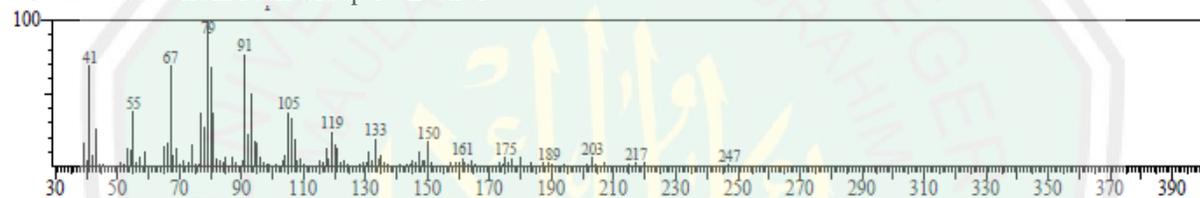
11. Line#:28 R.Time:41.892(Scan#:4644) MassPeaks:111
RawMode:Averaged 41.883-41.900(4643-4645) BasePeak:55.05(63137)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



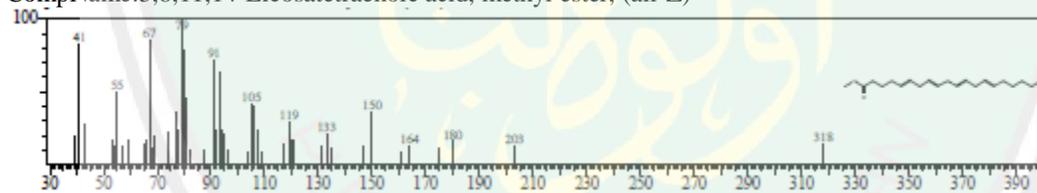
Hit#:1 Entry:44290 Library:NIST62.LIB
 SI:95 Formula:C20H38O2 CAS:56599-83-8 MolWeight:310 RetIndex:0
 CompName:10-Nonadecenoic acid, methyl ester



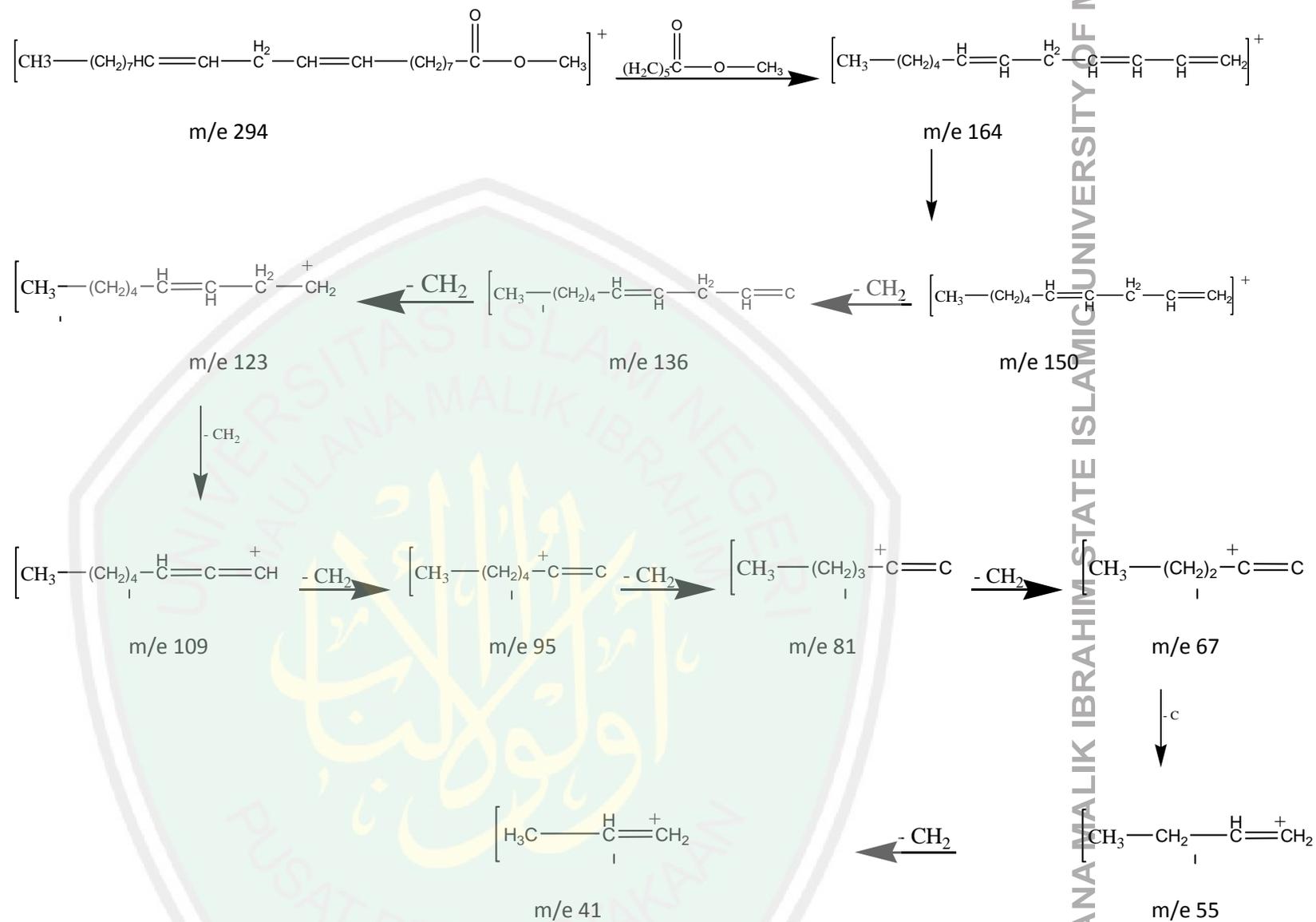
12. Line#:30 R.Time:42.708(Scan#:4742) MassPeaks:117
 RawMode:Averaged 42.700-42.717(4741-4743) BasePeak:79.05(60571)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:10996 Library:NIST12.LIB
 SI:93 Formula:C21H34O2 CAS:2566-89-4 MolWeight:318 RetIndex:0
 CompName:5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester, (all-Z)-



Kemungkinan pola fragmentasi yang muncul pada line 21 (asam linoleat)



Lampiran 7. Dokumentasi

1. Kultivasi mikroalga

a. Kultivasi mikroalga



Gambar 7.1 Kultivasi mikroalga

b. Penghitungan jumlah sel mikroalga



Gambar 7.2 Sel mikroalga pada hari ke 8

c. Pemanenan mikroalga



Gambar 7.3 Mikroalga sebelum di sentrifugasi Gambar 7.4 Mikroalga di dalam sentrifuse

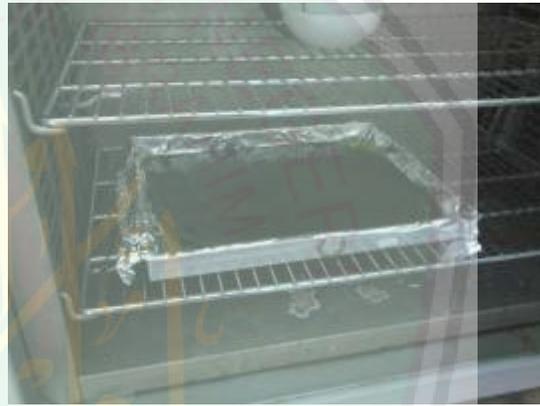


Gambar 7.4 Sentrifuse



Gambar 7.5 Mikroalga setelah sentrifugasi

2. Preparasi sampel

Gambar 7.6 Biomassa *chlorella sp.* basah

Gambar 7.7 Pengovenan mikroalga

Gambar 7.8 Biomassa *chlorella sp.* kering

3. Analisis kadar air



Gambar 7.8 Cawan

Gambar 7.9 Pengovenan sampel

Gambar 7.10 Sampel dalam desikator

4. Ekstraksi soxhlet



Gambar 7.11 Proses soxhletasi



Gambar 7.12 Ekstrak minyak + pelarut

Gambar 7.12 Ekstrak minyak setelah di gas N₂

5. Hidrolisis minyak



Gambar 7.13 Proses refluks



gambar 7.14 Pemisahan fase air + fase organik



Gambar 7.15 Busa garam kalium



Gambar 7.16 Penambahan asam sulfat 1M

6. Uji toksisitas



Gambar 7.17 Penetasan larva udang



Gambar 7.18 Uji toksisitas minyak



Gambar 7.19 Uji toksisitas asam lemak



Gambar 7.20 Penghitungan kematian larva

