

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:

DIAH KUMALASARI

NIM. 10630056



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

2014

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK MIKROALGA *Chlorella sp.***

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:

DIAH KUMALASARI

NIM. 10630056

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

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:

DIAH KUMALASARI

NIM. 10630056

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 12 September 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Tri Kustono Adi, M.Sc
NIP. 19710311 200312 1 002

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 AKTIVITAS ANTIBAKTERI ASAM LEMAK HASIL HIDROLISIS
MINYAK MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

**Oleh:
DIAH KUMALASARI
NIM. 10630056**

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

Malang, 12 September 2014

Susunan Dewan Penguji		Tanda Tangan
1. Penguji Utama	: Suci Amalia, M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	()
2. Ketua Penguji	: Akyunul Jannah, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	()
3. Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	()
4. Anggota Penguji	: Tri Kustono Adi, M.Sc NIP. 19710311 200312 1 002	()

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

Persembahan

- ♥ Alhamdulillahirabbil'amin..., Segala Puji bagiMu Ya Allah...berkat Rahmat dan kasih sayangMu hamba bisa sampai ke tahap ini, Semoga Allah selalu memberi Rahmat kepada Rasulullah Muhammad SAW, Rasul panutan umat sepanjang masa.
- ♥ Terimakasih ya Allah.. Engkau telah menitipkan hamba pada kedua orang tua yang luar biasa sabar.. karya ini ingin aku persembahkan untuk mereka, Bapak Ma'sum dan Ibu Anik Mahayu, perjuangan kalian dalam mendidik anak-anaknya sungguh membutku haru, terimakasih... do'a dan bekal ilmu yang kalian berikan adalah harta paling berharga dalam hidupku, semoga Allah mengangkat derajat Bapak Ibu kelak di surga.
- ♥ Kepada saudara-saudara kandungku mbak Pipi, Alfin, dan Rizal, terimakasih sudah hadir dan mengajarku arti kebersamaan dalam hidup ini. Nenekku mak Mun, terimakasih atas nasehat, dukungan, dan motivasinya serta tak melupakan namaku dalam setiap doanya.. Aku menyayangi kalian... :D
- ♥ Buat sumber keceriaanku selama merantau di Malang yakni sahabat terbaikku Oci dan Ninis, kebersamaan kita selama ini akan menjadi cerita tersendiri dalam kehidupan mendatangku^^, teman2 kontrakan Summersari (Maya, Kis, Daus, Sulis, Fida (bukan penghuni tetap)hehe, Dina, Ima, Hikma, dan Shi). Bwat teman2 seperjuangan Vera dan Anik, makasih ilmu yang uda disalurkan dan membangkitkan semangatku lagi saat aq takut, lelah, dan hampir menyerah. Bwat mbak Desi, Orny terimakasih bantuan ilmu dan tenaganya, serta teman2 kimia angkatan 2010 calon ilmuwan muslim khususnya Chemist B. ^^
- ♥ Terimakasih kepada semua inspirasiQ yang tak dapat aku sebutkan satu-persatu namun dibenakku kalian teristimewaaa.
- ♥ Semoga Allah merahmati kita semua..

Diah Kumalasari

MOTTO

مَنْ خَرَجَ فِي سَبِيلِ اللَّهِ

Barang siapa keluar untuk mencari ilmu maka dia berada di jalan Allah (HR.Turmudzi)

Man Jadda Wa Jadda

Barang siapa yang bersungguh - sungguh akan mendapatkannya.

فَاَسْتَبِقُوا الْخَيْرَاتِ

Berlomba-lombalah dalam berbuat kebaikan.

Selalu sabar dan semangat,

Allah selalu bersama kita dan bukankah semua akan menjadi indah pada waktunya?

**SURAT PERNYATAAN
ORSINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diah Kumalasari

NIM : 10630056

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis
Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

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, 12 September 2014

Yang Membuat Pernyataan,

Diah Kumalasari

NIM. 10630056

KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul: “**Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.***” dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhoi Allah SWT. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk 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. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si, selaku pembimbing utama yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan demi terselesaikannya skripsi ini;
2. Ibu Anik Maunatin, M.P, selaku konsultan yang banyak memberikan masukan dalam menyelesaikan naskah skripsi ini;
3. Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc, selaku Pembimbing Agama;
4. Ibu Suci Amalia, M.Sc, selaku Penguji Utama;
5. Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P, selaku Ketua Penguji.

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

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

1. Kedua orang tua dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa, semangat dan motivasi kepada saya untuk menuntut ilmu;

2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang;
3. Ibu Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maliki Malang;
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang;
5. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku dosen wali yang telah banyak memberikan bantuan, motivasi dan dukungan dari awal saya masuk jurusan Kimia;
6. Seluruh Dosen pengajar di Jurusan Kimia yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis selama kuliah di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang;
7. Seluruh staf Laboratorium (Mas Abi, Mas Taufik, Mbak Rika, Mbak Susi, dan Mbak Mei) dan staf administrasi (Mbak Ana dan Mbak Is) Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, terimakasih atas bantuannya;
8. Teman-teman kimia angkatan 2010 khususnya Kimia B, terimakasih atas dukungan, motivasi, kebersamaan, kekompakannya dan canda tawa selama kuliah;
9. Semua pihak yang tidak tertulis, terimakasih atas bantuan dan dukungannya.

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

Malang, 12 September 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN MOTTO	v
SURAT PERNYATAAN ORSINALITAS PENELITIAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mikroalga	9
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	10
2.2.1 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i>	12
2.2.1.1 Faktor-faktor Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	12
2.2.1.2 Medium Ekstrak Tauge (MET)	14
2.2.1.3 Fase-fase Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	15
2.2.2 Kandungan dan Manfaat <i>Chlorella sp.</i>	16
2.3 Minyak dan Lemak	16
2.4 Asam Lemak	18
2.4.1. Asam Lemak dalam Mikroalga	19
2.4.2. Asam Lemak Sebagai Antibakteri	21
2.5 Ekstraksi Lemak dengan Soxhletasi	23
2.6 Hidrolisis Minyak	24
2.7 Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa (KG-SM)	26
2.8 Aktivitas Antibakteri	28
2.8.1 Bakteri	28
2.8.1.1 <i>Escherichia coli</i>	29
2.8.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.8.2 Antibakteri	32
2.8.3 Mekanisme Senyawa Antibakteri	33
2.8.4 Uji Aktivitas Antibakteri	34

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	39
3.5.1 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i>	39
3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	39
3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge	39
3.5.1.3 Perhitungan Jumlah Sel <i>Chlorella sp.</i>	39
3.5.1.4 Pemanenan <i>Chlorella sp.</i>	40
3.5.2 Preparasi Sampel	40
3.5.3 Analisis Kadar Air <i>Chlorella sp.</i>	40
3.5.4 Ekstraksi Minyak <i>Chlorella sp.</i>	41
3.5.5 Hidrolisis Minyak <i>Chlorella sp.</i>	42
3.5.6 Uji Aktivitas Antibakteri	42
3.5.6.1 Sterilisasi Alat	42
3.5.6.2 Pembuatan Media	43
3.5.6.3 Peremajaan Biakan Murni Bakteri	43
3.5.6.4 Pembuatan Suspensi Bakteri	44
3.5.6.5 Uji Aktivitas Antibakteri	44
3.5.7 Analisis Asam Lemak dengan KG-SM	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i>	48
4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	48
4.1.2 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge	49
4.1.3 Pemanenan <i>Chlorella sp.</i>	50
4.2 Preparasi Sampel	52
4.3 Analisis Kadar Air <i>Chlorella sp.</i>	53
4.4 Ekstraksi Soxhlet <i>Chlorella sp.</i> dengan Pelarut n-Heksana	54
4.5 Hidrolisis Minyak <i>Chlorella sp.</i>	57
4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak <i>Chlorella sp.</i>	60
4.7 Analisis Asam Lemak <i>Chlorella sp.</i> dengan KG-SM	65
4.8 Pemanfaatan <i>Chlorella sp.</i> dalam Perspektif Islam	75
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	78
5.2 Saran	78
DAFTAR PUSTAKA	79

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Nutrisi Mikroalga	9
Tabel 2.2 Komposisi Kimia <i>Chlorella sp.</i>	11
Tabel 2.3 Penamaan asam lemak jenuh berdasarkan ikatan karbonnya	19
Tabel 2.4 Asam lemak jenuh	19
Tabel 2.5 Kandungan minyak dari beberapa jenis mikroalga	20
Tabel 2.6 Komposisi lemak <i>Chlorella sp.</i>	20
Tabel 2.7 Kandungan asam lemak dalam <i>Chlorella sp.</i>	21
Tabel 4.1 Jumlah sel <i>Chlorella sp.</i> hari ke 7, 8, 9	51
Tabel 4.2 Hasil uji aktivitas antibakteri asam lemak <i>Chlorella sp.</i>	61
Tabel 4.3 Asam-asam lemak dominan pada <i>Chlorella sp.</i>	65



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur sel <i>Chlorella sp.</i>	10
Gambar 2.2	Bentuk <i>Chlorella sp.</i>	11
Gambar 2.3	Kurva pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	15
Gambar 2.4	Proses pembentukan trigliserida	17
Gambar 2.5	Struktur umum asam lemak	18
Gambar 2.6	Reaksi hidrolisis trigliserida	25
Gambar 2.7	Reaksi saponifikasi asam lemak	25
Gambar 2.8	Diagram skematik kromatografi gas	27
Gambar 2.9	Bentuk koloni <i>Escherichia coli</i>	29
Gambar 2.10	Bentuk koloni <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Gambar 4.1	Biomassa <i>Chlorella sp.</i>	52
Gambar 4.2	Minyak <i>Chlorella sp.</i>	57
Gambar 4.3	Reaksi hidrolisis trigliserida	58
Gambar 4.4	Garam sabun yang terbentuk pada reaksi hidrolisis	59
Gambar 4.5	Reaksi pembentukan asam lemak	59
Gambar 4.6	Zona hambat pada bakteri <i>S. aureus</i>	61
Gambar 4.7	Kromatogram KG metil ester asam lemak hasil hidrolisis	65
Gambar 4.8	Spektra metil asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)	66
Gambar 4.9	Spektra library metil asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)	66
Gambar 4.10	Struktur asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)	67
Gambar 4.11	Perkiraan pola fragmentasi asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)	67
Gambar 4.12	Spektra metil asam heksadekanoat (asam palmitat).....	68
Gambar 4.13	Spektra library metil asam heksadekanoat (asam palmitat)	68
Gambar 4.14	Struktur asam heksadekanoat (asam palmitat)	68
Gambar 4.15	Perkiraan pola fragmentasi asam heksadekanoat (asam palmitat)	69
Gambar 4.16	Spektra metil asam dodekanoat (asam laurat)	70
Gambar 4.17	Spektra library metil asam dodekanoat (asam laurat)	70
Gambar 4.18	Struktur asam dodekanoat (asam laurat)	70
Gambar 4.19	Perkiraan pola fragmentasi asam dodekanoat (asam laurat)	71
Gambar 4.20	Spektra metil asam 7,10-heksadekadienoat	72
Gambar 4.21	Spektra library metil asam 7,10-heksadekadienoat	72
Gambar 4.22	Struktur asam 7,10-heksadekadienoat	72
Gambar 4.23	Perkiraan pola fragmentasi asam 7,10-heksadekadienoat	73
Gambar 4.24	Spektra metil asam 10,13-oktadadienoat	74
Gambar 4.25	Spektra library metil asam 10,13-oktadadienoat	74
Gambar 4.26	Struktur asam 10,13-oktadadienoat	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian	86
Lampiran 2. Skema Kerja	87
Lampiran 3. Perhitungan Kelimpahan Sel <i>Chlorella sp.</i> Hari 7, 8, dan 9	94
Lampiran 4. Perhitungan Kadar Air	95
Lampiran 5. Perhitungan Rendemen Ekstrak	96
Lampiran 6. Perhitungan dan Pembuatan Reagen Larutan Ekstrak	97
Lampiran 7. Data Uji Aktivitas Antibakteri	101
Lampiran 8. Kromatogram Kromatografi Gas Asam Lemak <i>Chlorella sp.</i> ...	102
Lampiran 9. Spektra SM Asam Lemak <i>Chlorella sp.</i>	103
Lampiran 10. Perkiraan Pola Fragmentasi	105
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian	109



ABSTRAK

Kumalasari, Diah. 2014. **Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.***

Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si.; Pembimbing II: Tri Kustono Adi, M.Sc. Konsultan: Anik Maunatin, M.P.

Kata kunci: Mikroalga *Chlorella sp.*, asam lemak, ekstraksi Soxhlet, aktivitas antibakteri.

Chlorella sp. merupakan mikroalga uniselular berukuran mikroskopis yang banyak mengandung minyak organik yang dapat dihidrolisis menjadi asam lemak. Asam lemak merupakan salah satu komponen aktif dalam mikroalga yang diduga berperan sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Isolasi minyak *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode Soxhletasi dengan pelarut n-heksana. Minyak *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan KOH 12 % dalam pelarut metanol untuk mendapatkan asam lemak. Asam lemak yang dihasilkan diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* menggunakan metode difusi cakram.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen Soxhletasi minyak *Chlorella sp.* adalah sebesar 6,28 %. Hidrolisis minyak *Chlorella sp.* menghasilkan rendemen sebesar 69,57 %. Asam lemak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, tetapi tidak terhadap bakteri *E. coli*. Zona hambat asam lemak *Chlorella sp.* terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 % secara berturut-turut adalah 1,8; 1,9; 3,2; 3,5; dan 3 mm.

ABSTRACT

Kumalasari, Diah. 2014. **The Antibacterial Activity Test Oil Fatty Acids Hydrolysis results Microalgae *Chlorella sp.***

Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si.; Advisor II: Tri KustonoAdi, M.Sc.; Consultant: Anik Maunatin, M.P.

Keywords: Microalgae *Chlorella sp.*, Fatty acids, Soxhlet extraction, antibacterial activity.

The *Chlorella sp.* is a microscopic unicellular microalgae that contains organic oils which can be hydrolyzed into fatty acids. Fatty acids is one of the active components in microalgae which allegedly acted as an antibacterial. The aim of this study is to determine the antibacterial activity of fatty acids from the hydrolysis process of microalgae *Chlorella sp.* oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Insulating oil *Chlorella sp.* performed by the Soxhlet method with n-hexane. *Chlorella sp.* oil was hydrolyzed with 12 % KOH in methanol to obtain fatty acids. The antibacterial activity of these fatty acids was tested against *E. coli* and *S. aureus* using the disc diffusion method.

The result showed that the yield of oil Soxhlet *Chlorella sp.* was equal to 6,28 %. Hydrolysis of *Chlorella sp.* oil produced a yield of 69,57 %. Fatty acids have antibacterial activity against *S. aureus* bacteria, but not against the bacteria *E. coli*. Fatty acids inhibition zone from *Chlorella sp.* against the bacteria *S. aureus* at the concentration 0,5; 1; 1,5; 2; and 2,5% respectively are 1,8; 1,9; 3,2; 3,5; and 3 mm.

مستخلص البحث

كوملاساوي ، ديا. ٢٠١٤. النشاط مضاد للبكتيريا اختبار النفط الأحماض الدهنية التحلل النتائج الطحالب طحلب .

المشرف الأول : أحمد غنايم فشا الماجستير ؛ المشرف الثاني: تري كوسطنوعدي، الماجستير ؛ المشرف المستشار: أنيكمعوناتين الماجستير

الكلمات الرئيسية: الطحالب طحلب، والأحماض الدهنية، واستخراج سوكليت، النشاط المضاد للبكتيريا، كولا.ي.

الطحلب. هي الطحالب وحيدة الخلية المجهرية التي تحتوي على الزيوت العضوية التي يمكن أن تحلل إلى أحماض الدهنية. الأحماض الدهنية هي واحدة من المكونات النشطة في الطحالب الدقيقة التي يزعم أنها تصرفت باعتبارها مضاد للجراثيم. وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد النشاط المضاد للبكتيريا التحلل من الأحماض الدهنية من زيت الطحالب طحلب. ضد كولا.ي والمكورات العنقودية الذهبية .

العازلة شلوريا النفط ليرة سورية. يؤديها على طريقة سوكليتاسمع n-الهكسان. شلوريا النفط ليرة سورية. تحلل مع ١٢٪ كا ليوم هيدروكسدا في الميثانول للحصول على الأحماض الدهنية. تم اختبار الأحماض الدهنية الناتجة عن النشاط المضاد للبكتيريا ضد الإشريكية القولونية والعنقودية س-الذهبية باستخدام طريقة الانتشار القرصي.

النتائج أظهرت أن العائد من النفط سوكليتاسطحلب. تساوي ٦٠،٢٨٪. التحلل من النفط طحلب. إنتاج محصول ٦٩،٥٧٪. الأحماض الدهنية لها نشاط مضاد للجراثيم ضد البكتيريا العنقودية س-الذهبية، ولكن ليس ضد البكتيريا الإشريكية القولونية. تثبيط الدهنية حمض شلوريا منطقة س. ضد البكتيريا العنقودية س-الذهبية بتركيز ١،٥؛ ١،٥؛ ٢،٥؛ ٢،٥٪ على التوالي هو ١،٨؛ ١،٩؛ ٣،٥؛ ٣،٥؛ ٣،٥ مم.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam al Qur'an surat asy Syu'ara ayat 7:

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

"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik" (QS. asy Syu'ara:7).

Kata (إِلَى) *ila/ ke* pada firman Nya di awal ayat (أَلَا رَأَيْتُمْ إِلَى الْأَرْضِ) *awalam yara ila al-ard/ apakah mereka tidak melihat ke bumi*, merupakan kata yang mengandung makna batas akhir. Ia berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas akhir, dengan demikian ayat ini mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya (Shihab, 2002).

QS. asy Syu'ara ayat 7 tersebut menyeru kepada manusia agar memperhatikan seluruh isi bumi ciptaan Allah, yang di dalamnya terdapat tumbuh-tumbuhan yang baik dengan berbagai jenis, bentuk, dan warna. Ayat tersebut juga memerintahkan kepada manusia agar mau mencari dan berpikir tentang manfaat tumbuhan yang telah disediakan oleh Allah SWT yang ada di dalamnya berupa rahasia dan keajaiban, agar diambil manfaatnya dalam kehidupan misalnya sebagai obat-obatan.

Jenis tanaman yang bermanfaat dalam bidang kesehatan tidak hanya berasal dari tanaman tingkat tinggi, tanaman tingkat rendah yang berukuran mikroskopis pun mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat, salah satunya yakni mikroalga. Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik dengan morfologi sel yang bervariasi, baik uniseluler maupun multiseluler. Mikroalga merupakan produsen alami dari ekosistem perairan yang dapat menghasilkan energi sehingga keberadaannya sebagai organisme hidup yang berukuran mikroskopis sudah mulai banyak diteliti (Damianus, 2011).

Pemanfaatan mikroalga terutama di bidang kesehatan adalah potensinya sebagai antibakteri. Kellam dan Walker (1989) menyebutkan bahwa ekstrak metanol dan heksana dari 132 jenis mikroalga laut mempunyai aktivitas antibakteri terhadap 6 bakteri uji. Salah satunya adalah mikroalga *Chlorella sp.* *Chlorella sp.* merupakan mikroalga uniselular berukuran mikroskopis yang tergolong dalam kelompok Chlorophyta (Steenblock, 1996).

Chlorella sp. dalam tubuhnya banyak mengandung lipid atau minyak organik sebesar 28 – 32 % (Chisti, 2007). Hal tersebut juga didukung dengan penelitian Saadudin, dkk. (2011) yang menyebutkan bahwa *Chlorella sp.* mempunyai kandungan lipid yang tertinggi dibandingkan dengan spesies lainnya yaitu *Nannochloropsis sp.*, *Spirulina sp.*, *Dunaliella sp.*, *Tetraselmis sp.*. Kandungan minyak nabati yang tinggi mengindikasikan tingginya kandungan asam lemak (Rachmaniah, dkk., 2010). Asam lemak *Chlorella sp.* sering kali dimanfaatkan sebagai bahan bakar biodiesel. Berdasarkan data tersebut, peneliti ingin memanfaatkan kelimpahan minyak *Chlorella sp.* sebagai suatu senyawa

antibakteri dengan terlebih dahulu dihidrolisis menjadi asam lemak, dikarenakan asam lemak merupakan salah satu komponen aktif dalam mikroalga yang diduga berperan sebagai antibakteri.

Menurut Weldy dan Huesemann (2007) dalam Agustini dan Kusmiati (2002) senyawa antimikroba dari mikroalga umumnya belum teridentifikasi, namun beberapa telah diketahui komponen penyusunnya, satu diantaranya merupakan asam lemak. Di samping itu, hasil Kromatografi Gas Spektrometri Massa (KG-SM) ekstrak etanol *Dunaliella salina* sebagai antibakteri dari penelitian Agustini dan Kusmiyati (2010) diperoleh senyawa-senyawa golongan asam lemak. Asam-asam lemak tersebut antara lain asam heksadekanoat (asam palmitat), asam heksadekanoat, asam 8,11-oktadekadienoat, asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat). Kusmiyati dan Agustini (2007) dalam penelitiannya juga menghasilkan kesimpulan bahwa hasil identifikasi senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum* pada fase awal stasioner dengan KG-SM menunjukkan senyawa dominan yaitu asam lemak heksadekanoat (asam palmitat). Menurut Zheng, dkk. (2005) asam lemak tidak jenuh seperti asam palmitoleat, asam oleat, asam linolenat dan asam arakhidonat, serta asam lemak jenuh stearat memiliki aktivitas antibakteri.

Berbagai metode telah diujicobakan agar minyak dan lemak dalam *Chlorella sp.* dapat terekstrak dalam jumlah maksimal. Pemilihan metode untuk mengekstrak minyak *Chlorella sp.* telah dilakukan Rachmaniah, dkk. (2010) dimana *Chlorella sp.* kondisi kering dan basah diekstrak melalui beberapa metode yakni Bligh Dyer, Bligh Dyer modifikasi, Soxhletasi, dan osmotik shock.

Berdasarkan penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa metode yang efektif untuk mengekstraksi minyak mikroalga *Chlorella sp.* kondisi kering adalah metode Soxhletasi dengan pelarut n-heksana. Minyak *Chlorella sp.* yang dihasilkan dari metode tersebut adalah sebesar 16,57 % serta asam lemak yang teridentifikasi antara lain 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 dkk. (2012) juga menerapkan metode Soxhletasi dengan pelarut n-heksana untuk mengetahui kandungan asam lemak dari 3 jenis mikroalga yaitu *Isochrysis sp.* (Crysophyceae), *S. platensis* (Cyanophyceae), dan *P. cruentum* (Rhodophyceae).

Minyak dapat dihidrolisis menjadi asam lemak dengan menggunakan katalis asam, basa, maupun secara enzimatik. Beberapa peneliti memilih katalis basa untuk menghidrolisis minyak nabati karena reaksi hidrolisis berlangsung secara *irreversible*. Fasya (2011) melakukan penelitian untuk menghidrolisis minyak biji selasih. Penelitian tersebut menggunakan katalis KOH 12 % dalam metanol dan menghasilkan campuran asam-asam lemak dengan rendemen sebanyak 77,90 %. Penelitian Insani (2012) juga menggunakan KOH sebagai katalis untuk menghidrolisis trigliserida minyak kelapa sawit.

Asam lemak yang dihasilkan diharapkan mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen yang keberadaannya merugikan manusia. Bakteri yang sering menginfeksi manusia diantaranya bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) dan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Gejala penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* pada sebagian kasus berupa kram dan diare (Nuriyani, 2011). Gejala penyakit

lainnya adalah saluran kemih, pneumonia, bakteremia, meningitis neonatal, dan cholangitis (Putri, 2013). Sedangkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. *S. aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Ryan, dkk., 1994; Warsa, 1994).

Penggunaan asam lemak *Chlorella sp.* sebagai senyawa antibakteri alami lebih diutamakan karena lebih aman penggunaannya dibandingkan antibakteri sintetik. Menurut Lohner dan Austria (2001) pemakaian antibakteri sintetik seperti penisilin, glikopeptida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan lain-lain diketahui cukup berbahaya karena dapat meningkatkan resistensi bakteri terhadap zat antibakteri tersebut.

Pengujian asam lemak sebagai antibakteri dapat dilakukan salah satunya dengan metode difusi cakram. Prinsip dari metode ini adalah kertas cakram yang dijenuhkan dalam larutan ekstrak ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, akan terbentuk diameter zona hambat sekitar cakram. Penelitian Khamidah (2013) mengenai antibakteri dari mikroalga *Chlorella sp.* juga menerapkan metode difusi cakram dan menghasilkan zona hambat terhadap bakteri *E. coli* sebesar 12,1 mm dan *S. aureus* 13,1 mm untuk ekstrak metanol pada konsentrasi 25 %.

Perbanyakkan biomassa *Chlorella sp.* sebagai sampel dalam penelitian ini dilakukan menggunakan teknik kultur. Kultur mikroalga membutuhkan faktor pendukung hidup agar diperoleh biomassa dalam jumlah maksimal sehingga diharapkan kandungan minyak atau lemak dalam mikroalga juga maksimal.

Menurut Prabowo (2009) penambahan nutrisi pertumbuhan ke dalam medium kultur mikroalga dinilai merupakan aspek yang paling berpengaruh terhadap kuantitas biomassa hasil kultivasi mikroalga.

Salah satu media alami yang dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). Hasil penelitian Prihantini dkk. (2005) memperlihatkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) konsentrasi 4 % dapat menghasilkan kerapatan sel yang cukup tinggi yaitu sebesar 5.677.625 sel/mL pada hari ke-10 yakni memasuki fase stasioner. Oleh karena itu, dalam penelitian ini *Chlorella sp.* dikultivasi dalam MET 4 %.

Chlorella sp. mampu menghasilkan sejumlah minyak dan lemak ketika berada pada fase-fase tertentu. Oleh karena itu, pemanenan *Chlorella sp.* harus disesuaikan dengan fase dimana *Chlorella sp.* menghasilkan minyak dan lemak dalam jumlah yang maksimal. Penelitian Sobari, dkk. (2013) menghasilkan kesimpulan bahwa kandungan lemak tertinggi dalam mikroalga adalah ketika berada pada fase eksponensial. Selain itu, Kawaroe (2012) juga menerapkan waktu pemanenan disaat mikroalga mengalami fase eksponensial (hari ke-8) untuk memperoleh asam lemak. Menurut Khamidah (2013) pada saat memasuki fase eksponensial, *Chlorella sp.* mengalami pembelahan sel yang cukup aktif sehingga menghasilkan metabolit primer yang cukup banyak. Berdasarkan penelitian Khamidah (2013) *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam MET 4 % mengalami fase eksponensial pada hari ke-0 – 8. Namun kepadatan sel tertinggi

terjadi pada hari ke-8. Oleh karena itu, pada penelitian ini *Chlorella sp.* dipanen pada hari ke-8.

Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya dapat diketahui bahwa kelimpahan minyak dalam *Chlorella sp.* berpotensi sebagai senyawa antibakteri. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan mikroalga *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % dan dipanen ketika umurnya mencapai 8 hari agar diperoleh minyak dalam jumlah yang melimpah. Minyak *Chlorella sp.* diekstrak dengan n-heksana yang selanjutnya dihidrolisis menggunakan KOH agar diperoleh asam lemak. Asam lemak yang diperoleh kemudian diujikan aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap bakteri uji yaitu *E. coli* dan *S. aureus* menggunakan metode difusi cakram. Selanjutnya diidentifikasi golongan asam lemak dominan menggunakan instrument Kromatografi Gas Spektrometri Massa (KG-SM).

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana aktivitas antibakteri asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui aktivitas antibakteri asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah isolat mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % kacang hijau. Kultivasi dikondisikan pada pH 7, suhu ruang (25 – 30 °C) dan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux.
3. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi Soxhletasi dengan pelarut yaitu n-heksana.
4. Hidrolisis minyak *Chlorella sp.* menggunakan KOH 12 % dalam metanol.
5. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram terhadap bakteri *S. aureus* (gram positif) dan *E. coli* (gram negatif).
6. Karakterisasi asam lemak *Chlorella sp.* menggunakan instrument KG-SM.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan bagi lembaga akademis mengenai aktivitas antibakteri asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan bagi masyarakat mengenai manfaat asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* terutama di bidang farmakologi.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mikroalga

Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik dengan morfologi sel yang bervariasi, baik uniseluler maupun multiseluler (membentuk koloni kecil). Sebagian besar mikroalga tumbuh secara fototrofik, meskipun tidak sedikit jenis yang mampu tumbuh secara heterotrofik. Ganggang hijau-biru prokariotik (*Cyanobacteria*) juga termasuk dalam kelompok mikroalga (Becker, 1994).

Mikroalga banyak ditemukan pada perairan darat maupun laut, ukuran diameter antara 3 – 30 μm , tanpa akar, batang, dan daun. Biasanya ditemukan hidup secara individual ataupun berkelompok. Mikroalga bergerak secara pasif dengan mengikuti arus air. Morfologi selnya sangat bervariasi, baik bersel tunggal maupun bersel banyak. Mikroalga juga memiliki bentuk yang bervariasi seperti filamen atau lembaran, spiral, dan bulat (Borowitzka dan Lesley, 1988).

Mikroalga menghasilkan beberapa vitamin penting, seperti vitamin A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, nikotinamida, biotin, asam folat, dan asam pantotenat. Pigmen yang dihasilkan meliputi klorofil (0,5 sampai 1 % dari berat kering), karotenoid (0,1 sampai 14 % dari berat kering), dan fikobiliprotein (Becker, 1994).

Tabel 2.1 Komposisi Nutrisi Mikroalga.

Komposisi Kimia	Jumlah (%)
Protein	30 – 55
Karbohidrat	10 – 30
Lemak	10 – 25
Mineral	10 – 40
Asam Nukleat	4 – 6

Sumber : Pranayogi, D. (2003)

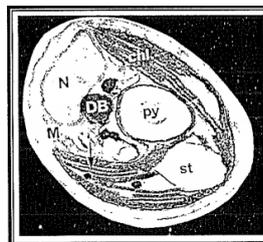
2.2. Mikroalga *Chlorella sp.*

Klasifikasi *Chlorella sp.* (Kumar dan Singh, 1979) adalah sebagai berikut:

Divisio	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Sub-ordo	: Autosporeanaceae
Familia	: Chlorellaceae
Genus	: Chlorella
Spesies	: <i>Chlorella sp.</i>

Istilah *Chlorella* berasal dari bahasa Latin yang terdiri dari kata “chloros” yang berarti hijau dan “ella” yang berarti kecil. Sel *Chlorella sp.* berukuran kecil yaitu antara 2 sampai 12 μm , yang berbentuk bulat dan elips. *Chlorella sp.* mempunyai kloroplas dan dinding sel yang tipis (Bold dan Wyne, 1985).

Chlorella sp. adalah alga uniselular berwarna hijau dengan ukuran mikroskopis. Diameter selnya berukuran 3 – 8 μm , berbentuk bulat seperti bola atau bulat telur, tidak mempunyai flagella sehingga tidak dapat bergerak aktif. Dinding selnya terdiri dari selulosa dan pektin, tiap-tiap selnya terdapat satu buah inti sel dan satu kloroplas (Kumar dan Singh, 1979). Struktur sel *Chlorella sp.* terdiri dari sebuah nukleus (inti), *dense body* (badan golgi), kloroplas, pirenoid, mitokondria dan *starch* (pati). Struktur sel *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Keterangan :

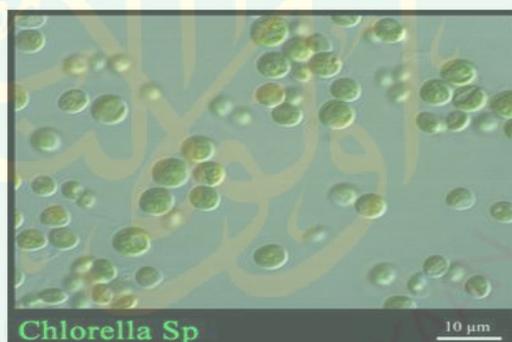
- N = Nukleus (inti)
- DB= Dense Body
- Chl= Kloroplas
- Py = Pirenoid
- M = Mitokondria
- St = Starch (pati)

Gambar 2.1 Struktur sel *Chlorella sp.*

(Bold dan Wynne, 1985 dalam Sriwardani, 2000)

Chlorella sp. bersifat non motil, hidup menyendiri atau berkelompok. *Chlorella sp.* dapat hidup di tanah sebagai kontaminan umum pada air yang tergenang dalam waktu yang lama. Sebagian besar *Chlorella sp.* hidup di air tawar, sebagian hidup di laut dan tempat-tempat yang lembab. *Chlorella sp.* berkembang biak secara aseksual, yaitu dengan pembentukan autospora (Bold dan Wyne, 1985).

Komposisi kimia *Chlorella sp.* terdiri dari protein, karbohidrat, lipid, dan senyawa-senyawa lain yang belum diketahui (Ben-Amotz, dkk., 1987). Renaud, dkk. (1994) melaporkan bahwa *Chlorella sp.* mengandung klorofil *a* sebesar 1,30 % dari berat kering. Komposisi kimia *Chlorella sp.* ditunjukkan dalam Tabel 2.2.



Gambar 2.2 Bentuk *Chlorella sp.*

Tabel 2.2 Komposisi kimia *Chlorella sp.*

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

Sumber : Ben-Amotz, dkk. (1987)

2.2.1 Kultivasi *Chlorella sp.*

2.2.1.1 Faktor-faktor Pertumbuhan *Chlorella sp.*

Proses kultivasi mikroalga dibutuhkan faktor-faktor utama yang dapat mempengaruhi pertumbuhannya, yaitu cahaya, suhu, pH, nutrien dan agitasi (De La Noue dan De Pauw, 1988 dalam Sriwardani, 2000). Kultur murni *Chlorella sp.* perlu dilakukan secara intensif untuk menyediakan makan alami dalam jumlah cukup. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kegiatan kultur adalah kualitas air yang meliputi salinitas, suhu, kekuatan cahaya, dan pH (Rostini, 2007).

1. Cahaya

Penyinaran dengan lampu neon selama kultur digunakan sebagai pengganti cahaya matahari yang dimaksudkan untuk memberikan cahaya pada sel *Chlorella sp.* agar dapat melakukan proses fotosintesis (Sriwardani, 2000). Intensitas cahaya yang baik bagi mikroalga untuk melakukan fotosintesis berkisar antara 2 – 3 kilo lux. Cahaya matahari yang diperlukan oleh mikroalga dapat diganti dengan lampu TL atau tungsten (Myers, 1962).

2. Suhu

Suhu merupakan salah satu variabel lingkungan yang mempengaruhi laju fotosintesis dan pertumbuhan mikroalga. Tingkat percepatan proses-proses dalam sel akan meningkat sejalan dengan meningkatnya suhu (Fogg, 1975). Suhu juga merupakan faktor yang penting dalam pertumbuhan mikroalga. Suhu optimal untuk pertumbuhan mikroalga berkisar antara 15 °C dan 30 °C (De La Noue dan

De Pauw, 1988 dalam Sriwardani, 2000). Pertumbuhan optimum untuk strain *Chlorella sp.* adalah pada suhu 25 °C.

3. pH (derajat keasaman)

Mikroalga dapat melakukan fotosintesis maksimum pada pH 7,0 – 8,0. Namun mikroalga dapat tumbuh dengan baik pada kisaran pH optimum 8,0 – 8,5 (BBL, 2002). *Chlorella* sangat tahan terhadap lingkungan asam dan masih hidup pada pH 2 (Fogg, 1975).

4. Nutrien

Nutrien terdiri atas unsur-unsur hara makro (*macronutrients*) dan unsur hara mikro (*micronutrients*). Contoh unsur hara makro yang diperlukan untuk pertumbuhan *Chlorella* adalah senyawa organik seperti N, K, Mg, S, P, dan Cl. Unsur hara mikro adalah Fe, Cu, Zn, Mn, B, dan Mo (Prabowo, 2009). Unsur N, P, dan S berperan penting dalam proses pembentukan protein. Unsur K berfungsi dalam metabolisme karbohidrat. Besi (Fe) dan natrium (Na) berperan untuk pembentukan klorofil, sedangkan unsur Si dan Ca merupakan bahan untuk pembentukan dinding sel atau cangkang pada mikroalga. Vitamin B₁₂ banyak digunakan untuk memacu pertumbuhan melalui rangsangan fotosintetik (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

5. Karbondioksida (CO₂) Bebas

Karbondioksida di dalam kultivasi merupakan faktor penting untuk mikroalga, karena secara langsung digunakan sebagai bahan untuk membentuk molekul-molekul organik melalui proses fotosintesis. Suplai CO₂ bebas ke dalam media kultivasi biasanya dilakukan dengan pemberian aerasi (BBL, 2002).

2.2.1.2 Medium Ekstrak Tauge (MET)

Ekstrak tauge merupakan media alami yang umum digunakan bagi pertumbuhan mikroalga. Media tersebut mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral, asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Kisaran pH media kultur yang sesuai bagi *Chlorella sp.* bergantung pada jenis media (Prihantini, dkk., 2005).

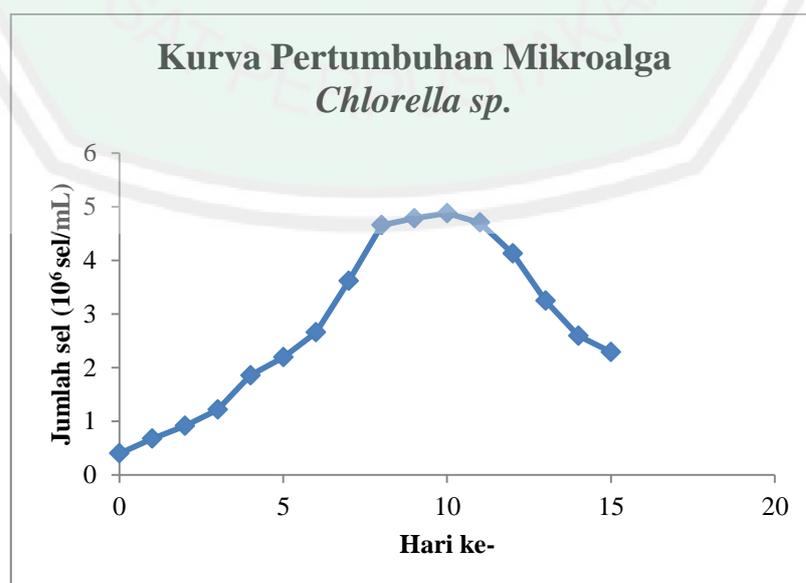
Tauge kacang hijau merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Media perlakuan MET mengandung nutrisi anorganik seperti K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Cu (Wulandari, dkk., 2010). Hasil penelitian Wulandari, dkk. (2010) menunjukkan bahwa penggunaan Medium Ekstrak Tauge (MET) menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya yaitu Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG).

Pada saat perkecambahan, terjadi hidrolisis karbohidrat, protein, dan lemak menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga mudah dicerna tubuh. Walaupun 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. Vitamin yang ditemukan dalam tauge adalah vitamin C, tiamin, riboflavin, niasin, asam pantotenik, folat, vitamin B₆, kolin, β -karoten, vitamin A, vitamin E (α -tokoferol), dan vitamin K sebagai *growth factor* dalam pertumbuhan alga (Anggrahini, 2009; Astawan, 2005 dalam Maulana, 2010).

Prihantini, dkk. (2005) menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan konsentrasi 4 % dapat menghasilkan kerapatan sel yang cukup tinggi yaitu sebesar 5.677.625 sel/mL pada hari ke-10. Dalam penelitian lainnya namun menggunakan mikroalga marga *Scenedesmus Meyen* isolat Subang, Prihantini, dkk. (2007) menyebutkan bahwa konsentrasi MET optimum bagi kerapatan sel mikroalga marga *Scenedesmus* selama 10 hari pengamatan adalah MET 4 % (v/v). Media perlakuan tersebut menghasilkan kerapatan sel tertinggi (3.981.071 sel/mL).

2.2.1.3 Fase-fase Pertumbuhan *Chlorella sp.*

Penelitian Khamidah (2013) memperlihatkan kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET 4 % (Gambar 2.3). Kurva tersebut 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.



Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* (Khamidah, 2013)

2.2.2 Kandungan dan Manfaat *Chlorella sp.*

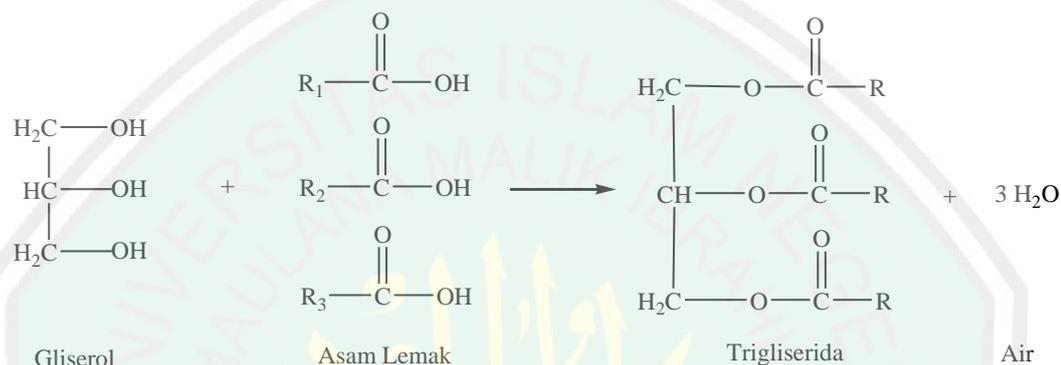
Chlorella sp. memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran. Hal tersebut dikarenakan *Chlorella sp.* mengandung berbagai nutrisi seperti karbohidrat, protein, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi (Kawaroe, 2010).

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). Menurut Byung Hwan Um dan Young-Soo Kim (2009) *Chlorella vulgaris* memiliki kandungan (dalam % berat bahan kering) protein 51 – 58 %, karbohidrat 12 – 17 %, lemak 14 – 22 %, dan asam nukleat 4 – 5 %. Selain itu, *Chlorella sp.* juga memiliki daya biosorpsi yang kuat terhadap logam berat sehingga dapat dimanfaatkan untuk menetralkan limbah industri.

2.3 Minyak dan Lemak

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). 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). Gambar 2.4 memperlihatkan reaksi pembentukan trigliserida:

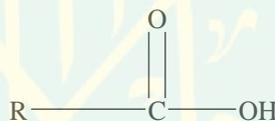


Gambar 2.4 Proses pembentukan trigliserida

Perbedaan lemak dan minyak tergantung dari sifat fisiknya pada suhu ruang. Istilah lemak (*fat*) umumnya digunakan untuk ester gliserol berbentuk padat pada suhu ruang, sedangkan minyak merupakan istilah untuk gliserol berbentuk cair. Perbedaan sifat fisik ini disebabkan oleh komposisi asam lemak penyusunnya. Lemak lebih banyak mengandung asam lemak jenuh, sedangkan minyak lebih banyak mengandung asam lemak tidak jenuh (Kusnandar, 2011). 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).

2.4 Asam Lemak

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. Rumus umum asam lemak adalah sebagai berikut:



Gambar 2.5 Struktur umum asam lemak

R merupakan rantai karbon jenuh atau tidak jenuh yang terdiri atas 4 sampai 24 atom karbon (Poedjiadi, 1994).

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).

Tabel 2.3 Penamaan asam lemak jenuh berdasarkan ikatan karbonnya

Nama Kimia	Formula	Nama Umum
Metanoat	CHOOH	Format
Etanoat	CH ₃ -COOH	Asetat
Propanoat	CH ₃ (CH ₂)-COOH	Propionat
Butanoat	CH ₃ (CH ₂) ₂ -COOH	Butirat
Pentanoat	CH ₃ (CH ₂) ₃ -COOH	Valerat
Heksanoat	CH ₃ (CH ₂) ₄ -COOH	Kaproat
Heptanoat	CH ₃ (CH ₂) ₅ -COOH	Enantat
Oktanoat	CH ₃ (CH ₂) ₆ -COOH	Kaprilat
Nonanoat	CH ₃ (CH ₂) ₇ -COOH	Pelargonat
Dekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₈ -COOH	Kaprat
Undekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₉ -COOH	-
Dodekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ -COOH	Laurat
Tridekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -COOH	-
Tetradekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ -COOH	Miristat
Pentadekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ -COOH	-
Heksadekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ -COOH	Palmitat
Heptadekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ -COOH	Margarat
Oktadekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ -COOH	Sterat
Nonadekanoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ -COOH	-
Eikosoat	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ -COOH	Arakhidat
Dokosoat	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ -COOH	Behanat
Tetrakosoat	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ -COOH	Linoserat

Sumber: Chouw (1992)

Tabel 2.4 Asam lemak jenuh

Struktur	Nama umum
CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Palmitoleat
CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Oleat
CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Linoleat
CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Linolenat
CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	Arakhidonat

Sumber: Lehninger (1982)

2.4.1 Asam Lemak dalam Mikroalga

Mikroalga memiliki jumlah minyak dan lemak (lipid) dengan komposisi yang sama dengan minyak tumbuhan. Kandungan minyak dan lemak pada

mikroalga cenderung memiliki proporsi yang berbanding terbalik pada laju pertumbuhan dan kondisi lingkungan yang bervariasi, sehingga mempengaruhi proporsi kedua komponen tersebut secara relatif (Borowitzka, 1988). Jumlah kandungan lipid pada mikroalga berkisar kira-kira 1 – 70 % dari berat kering (Borowitzka, 1988). Kandungan minyak dari beberapa jenis mikroalga diberikan pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5 Kandungan minyak dari beberapa jenis mikroalga

Mikroalga	Kandungan minyak (%)
<i>Botryococcus Braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella sp.</i>	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20 – 35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31 – 68
<i>Nitzschia sp.</i>	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

Sumber: Chisti (2007)

Tabel 2.6 Komposisi lemak *Chlorella sp.*

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

Sumber : Makareviciene, dkk. (2011).

Chlorella sp. memiliki berbagai jenis asam lemak bebas termasuk rantai-sedang asam lemak (C10 – C14), rantai panjang asam lemak (C16 – C18), dan rantai asam lemak yang lebih panjang (> C20). Akan tetapi pada kondisi tertentu, misalnya stress, beberapa jenis mikroalga akan mengubah jalur biosintetik lipidnya menjadi lemak-lemak netral (20 – 50 %) dan TGs. Pada mikroalga, jenis glikolipid tersimpan di dalam membran sedangkan TGs tersimpan di dalam sitoplasma dan terdapat beberapa jenis alga yang menyimpan lemak-lemaknya di dalam ruang-ruang tilakoid dalam kloroplastnya (Rachmaniah, dkk., 2010). Kandungan asam lemak dalam mikroalga *Chlorella sp.* dapat diberikan pada Tabel 2.7.

Tabel 2.7 Kandungan asam lemak dalam mikroalga *Chlorella sp.*

Nama Senyawa	Kandungan (%)
Asam kaproat	-
Asam laurat	0,02
Asam miristat	-
Asam stearate	29,50
Asam palmitat	8,09
Asam oleat	2,41
Asam valerat	10,06
Asam margarat	-
Asam palmitoleat	2,15
Asam palmitolineat	-
Asam linoleat	45,07
Asam linolenat	11,49
Gliserol trilaurat	-
Vinil laurat	-

Sumber: Prartono, dkk. (2010).

2.4.2 Asam Lemak Sebagai Antibakteri

Menurut Murhadi (2009) beberapa jenis asam lemak bebas telah terbukti memiliki daya antibakteri sangat kuat terhadap *Clostridium welchii*, diantaranya

adalah asam linoleat, arakidonat, dan linolenat dengan nilai konsentrasi penghambatan minimum (MIC) antara 0,06 – 0,28 mg/mL. Selanjutnya asam lemak seperti miristoleat, palmitoleat, linolenat, kaprat, laurat, dan miristat juga terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, masing-masing dengan nilai MIC rata-rata di bawah 1,0 mg/mL.

Menurut Weldy dan Huesemann M. (2007) dalam Agustini dan Kusmiati (2002) senyawa antimikroba dari mikroalga umumnya belum teridentifikasi, namun beberapa telah diketahui komponen penyusunnya, ada yang terdiri dari asam lemak, fenol, dan asam organik. Agustini dan Kusmiati (2002) telah mengidentifikasi senyawa aktif sebagai antibakteri dari mikroalga *Dunaliella salina* terhadap bakteri *Staphylococcus* dan *E. coli*. Hasil Kromatografi Gas Spektrometri Massa (KG-SM) ekstrak etanol *Dunaliella salina* secara maserasi didapatkan senyawa asam heksadekanoat (asam palmitat), asam metil heksadekanoat, asam 8,11-oktadekadienoat, asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat) yang merupakan senyawa golongan asam lemak yang bersifat sebagai antibakteri. Menurut M. Herrero, dkk. (2006) dalam Agustini dan Kusmiati (2010) asam heksadekanoat (asam palmitat), asam 9, 12-oktadekadienoat (asam linoleat) merupakan senyawa yang bersifat sebagai antibakteri. Sementara itu, Kusmiati (2007) dalam penelitiannya menghasilkan kesimpulan bahwa hasil identifikasi senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum* dengan KG-SM menunjukkan senyawa dominan yaitu asam lemak heksadekanoat (asam palmitat). Selain itu, Lempe, dkk. (1998) dalam Setyaningsih (2012) juga melaporkan

bahwa jenis asam lemak yang bersifat antimikroba adalah jenis asam palmitat dan asam oleat.

2.5 Ekstraksi Lemak dengan Soxhletasi

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

Penentuan kadar minyak atau lemak suatu bahan dapat dilakukan dengan metode Soxhletasi. Soxhletasi merupakan penyarian bahan secara berkesinambungan, pelarut dipanaskan sehingga menguap, uap pelarut terkondensasi menjadi molekul-molekul cair oleh pendingin balik dan turun mengekstrak sampel dalam timbal dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon (Guenther, 1987). Ekstraksi dengan alat Soxhlet merupakan cara ekstraksi yang efisien, karena pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali. Dalam penentuan kadar minyak atau lemak, bahan yang diuji harus cukup kering, karena jika masih basah selain memperlambat proses ekstraksi, air dapat turun ke dalam labu dan akan mempengaruhi dalam perhitungan (Ketaren, 1986). Keuntungan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan

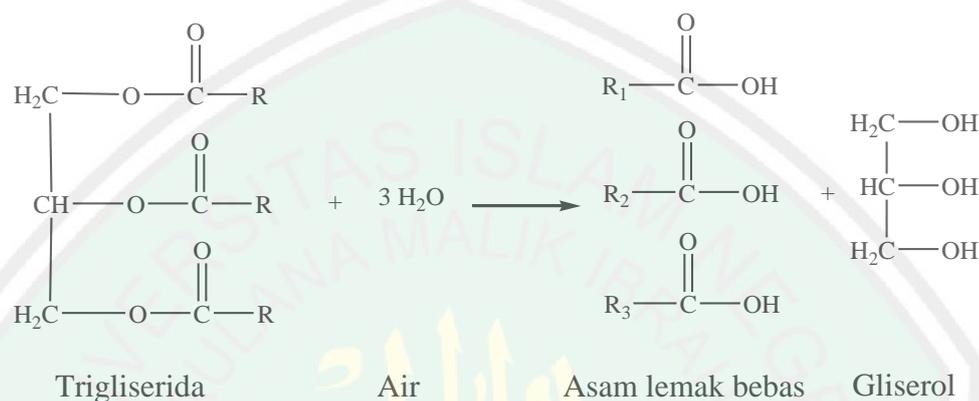
secara langsung, digunakan pelarut yang lebih sedikit, dan pemanasannya dapat diatur (Guenther, 1987).

Penelitian ini digunakan n-heksana sebagai pelarut untuk mengekstrak lemak. Heksana adalah senyawa hidrokarbon golongan alkana dengan rumus C_6H_{14} merupakan fraksi petroleum eter dengan kisaran titik didih $65 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$. Keuntungan dari pelarut ini adalah bersifat selektif dalam melarutkan zat, menghasilkan jumlah kecil lilin, albumin, dan zat warna, namun dapat mengekstrak zat pewangi dalam jumlah besar (Guenther, 1987).

2.6 Hidrolisis Minyak

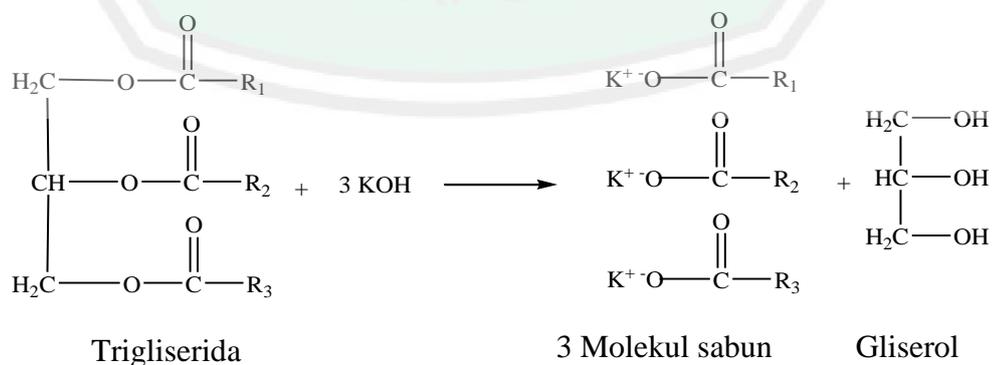
Hidrolisis adalah suatu proses kimia yang menggunakan aquades sebagai pemecah suatu persenyawaan termasuk inversi gula, saponifikasi lemak dan ester, pemecahan protein dan reaksi Grignard (Fasya, 2011). Dalam reaksi hidrolisis, minyak akan diubah menjadi asam-asam lemak bebas dan gliserol (Ketaren, 2008). 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, 2011). Gambar 2.6 menunjukkan reaksi hidrolisis trigliserida. 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 dalam Fasya, 2011). Biasanya

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, 2008).



Gambar 2.6 Reaksi hidrolisis trigliserida

Pada proses penyabunan (Gambar 2.7), pemberian KOH atau NaOH yang berlebih akan menyebabkan terjadinya penyabunan yang sempurna atau hidrolisis total (Ketaren, 2008). 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 2.7 Reaksi saponifikasi asam lemak

Pada proses saponifikasi, minyak dipanaskan dan diaduk kemudian basa (alkali) ditambahkan secara perlahan-lahan. Setelah seluruh basa tercampur, pemanasan dilanjutkan pada periode tertentu hingga proses 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).

2.7 Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa (KG-SM)

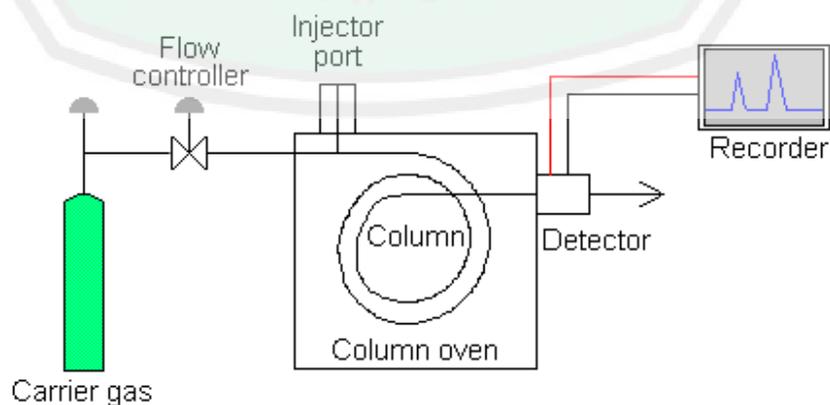
Kromatografi gas adalah suatu proses pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya oleh fase gas yang bergerak melalui suatu lapisan serapan sorben dan stasioner (Gritter, 1991).

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 injector, kolom pemisah, dan detektor (Roth dan Blaschke, 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 massa 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 massa, 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^+ . Ion molekuler M^+ biasanya terurai menjadi sepasang pecahan /fragmen, yang dapat berupa radikal dan ion, atau molekul yang kecil dan radikal kation (Fikri, 2010).

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. 2.8) (Gandjar, 2012)



Gambar. 2.8 Diagram skematik kromatografi gas (Anonim, 2014)

2.8 Aktivitas Antibakteri

2.8.1 Bakteri

Bakteri adalah sel prokariot yang khas dan bersifat uniseluler. Sel bakteri ada yang berbentuk seperti bola, batang atau spiral. Umumnya bakteri berdiameter antara 0,5 sampai 1,0 μm , dengan panjang antara 1,5 sampai 2,5 μm (Pelczar dan Chan 2005). Bakteri berkembang biak dengan membelah diri, karena begitu kecil maka akan hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop. Bakteri walaupun bersel satu tetapi mempunyai beberapa organel yang dapat melaksanakan beberapa fungsi hidup (Waluyo, 2004).

Sel bakteri dikelilingi oleh membran sitoplasma yang bagian luarnya diselubungi oleh dinding sel yang mengandung peptidoglikan. Membran sitoplasma memegang peranan penting dalam kesinambungan fungsi sel, yaitu mengendalikan laju perpindahan bahan dari dalam dan dari luar sel yang bersifat permeabel. Peptidoglikan memberikan bentuk dan menyebabkan kakunya dinding sel. Susunan kimiawi dan struktur peptidoglikan khas untuk masing-masing bakteri (Madigan, dkk., 2003).

Peptidoglikan adalah suatu polimer yang terdiri dari tiga macam bahan pembangun utama yaitu asam N-asetil muramat (AAM), asam N-asetil glukosamin (AGA) dan suatu peptida yang terdiri dari empat sampai lima asam amino yaitu L-alanin, D-alanin, asam D-glutamat, dan lisin atau diaminopimelat. Peptidoglikan ini memberikan bentuk dan menyebabkan kakunya dinding sel. Perbedaan pada dinding sel inilah yang dimanfaatkan dalam mengelompokkan bakteri berdasarkan teknik pewarnaan gram. Berdasarkan teknik tersebut bakteri

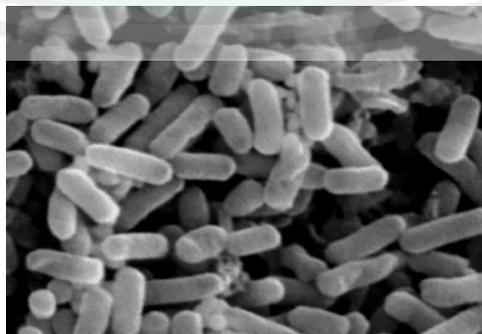
dibagi dua kelompok, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Pelczar dan Chan, 2005).

Bakteri gram positif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram tetap mengikat warna cat pertama (gram A) karena tahan terhadap alkohol dan tidak mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna ungu. Bakteri gram negatif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram warna cat yang pertama (gram A) dilunturkan karena tidak tahan terhadap alkohol dan mengikat warna yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna merah (Pelczar dan Chan, 2005).

2.8.1.1 *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* adalah menurut Fardiaz (1993) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Eubacteria
Divisio	: Proteobacteria
Classis	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 2.9 Bentuk koloni *Escherichia coli* (Fardiaz, 1993)

E. coli (Gambar 2.9) adalah kuman oportunitis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak dan *travelers diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh yang lain diluar usus (Karsinah, dkk., 1994).

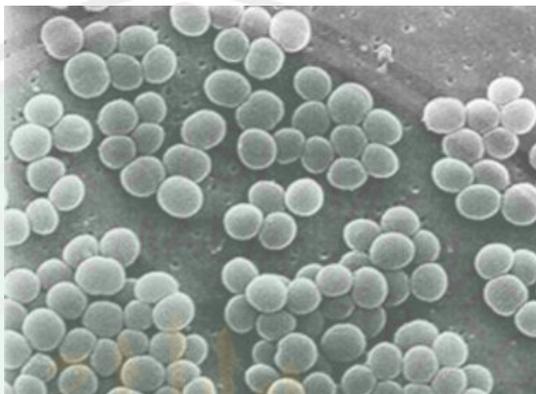
E. coli merupakan kuman berbentuk batang pendek (koko basil) gram negatif, ukuran $0,4 - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$, sebagian gerak positif dan beberapa strain mempunyai kapsul. Sebagian besar strain *E. coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *E. coli* bersifat *mikroaerofilik*. Beberapa strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe beta (Karsinah, dkk., 1994). Koloni yang berwarna merah pada agar Mac Conkey menunjukkan bahwa basil memfermentasi laktosa dan bersifat non patogen di dalam intestine (Gibson dan Roberfroid, 1995).

Tempat yang paling sering terkena infeksi *E. coli* adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat-tempat lain di rongga perut. *E. coli* memproduksi enterotoksin yang tahan panas dapat menyebabkan diare yang ringan, sedangkan enterotoksin yang tidak tahan panas dapat menyebabkan sekresi air dan klorida ke dalam lumen usus, menghambat reabsorpsi natrium (Jawetz, dkk., 2005).

2.8.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif yang memiliki hanya satu dinding sel sehingga senyawa yang bersifat sebagai antibakteri akan lebih mudah untuk merusak dinding sel bakteri ini (Gambar 2.10). *S. aureus* dapat menyebabkan beberapa macam kerugian yaitu menyebabkan makanan menjadi

beracun, sindrom racun, infeksi kulit dan luka sehingga perlu diketahui senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ini (Nurfadilah, 2013).



Gambar 2.10 Bentuk koloni *Staphylococcus aureus* (Fardiaz, 1993)

Klasifikasi *S. aureus* menurut Salle (1961) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: Protophyta
Subdivisio	: Schizomycetea
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

S. aureus termasuk bakteri gram positif, berbentuk bulat, berdiameter 0,1 – 1,5 mikrometer. *S. aureus* susunan selnya ada yang tunggal atau berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombol yang tidak teratur (Pelczar dan Chan, 2005).

Infeksi *Staphylococcus* lokal tampak sebagai jerawat, infeksi folikel rambut atau abses. *Staphylococcus* menyebabkan reaksi infeksi yang kuat, terlokalisir dan nyeri yang mengalami supurasi sentral dan sembuh dengan cepat jika dikeluarkan.

Dinding fibrin dan sel sekitar bagian tengah abses cenderung mencegah penyebaran organisme dan hendaknya tidak dirusak oleh manipulasi atau trauma (Jawetz, dkk., 2005).

2.8.2 Antibakteri

Senyawa antimikroba adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan dapat digunakan untuk kepentingan pengobatan infeksi pada manusia, hewan, dan tumbuhan. Antimikroba meliputi antibakterial, antifungal, antiprotozoal, dan antivirus (Schunack, dkk., 1990). Antibakteri adalah antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Gan, dkk., 1980). Antibakteri dapat mengganggu pertumbuhan bahkan dapat mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolismenya (Pelczar dan Chan, 2005).

Ditinjau dari cara kerjanya, antibakteri dapat dibedakan menjadi bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik bekerja dengan cara menghambat perbanyakan populasi bakteri namun tidak memamatkannya, sedangkan bakterisidal bekerja dengan membunuh bakteri (Atlas, 1997). Beberapa zat antibakteri bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi (Wattimena, dkk., 1991).

Ketentuan kekuatan senyawa antibakteri adalah sebagai berikut: bila memiliki daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti memiliki kekuatan antibakteri sangat kuat; bila daerah hambatan yang dimilikinya berkisar antara 10 – 20 mm berarti kuat; bila daerah hambatan 5 – 10 mm berarti sedang; bila daerah hambatannya 5 mm atau kurang dari 5 mm maka dikatakan lemah (Davis dan Stout, 1971 dalam Yudha, 2008).

2.8.3 Mekanisme Senyawa Antibakteri

Menurut Jawetz, dkk. (2005) mekanisme kerja senyawa antibakteri dapat terjadi melalui penghambatan sintesis dinding sel bakteri, penghambatan ketuhan permeabilitas dinding sel bakteri, penghambatan sintesis protein sel bakteri, dan penghambatan sintesis asam nukleat.

1. Penghambatan sintesis dinding sel bakteri

Antibakteri terikat pada reseptor sel (beberapa diantaranya adalah enzim transpeptidase), kemudian terjadi reaksi transpeptidase sehingga sintesis peptidoglikan terhambat. Mekanisme diakhiri dengan penghentian aktivitas penghambat enzim autolisis pada dinding sel.

2. Penghambatan ketuhan permeabilitas dinding sel bakteri

Zat yang bersifat surfaktan dapat mengganggu membran sitoplasma menyebabkan permeabilitas dinding sel berubah dan menjadi rusak. Komponen-komponen penting yang berada di dalam sel seperti protein, asam nukleat, nukleotida keluar dari sel dan berangsur-angsur sel akan mati.

3. Penghambatan sintesis protein sel bakteri

Suhu dan konsentrasi tinggi zat kimia dapat mendenaturasi protein yang merupakan komponen esensial bagi berlangsungnya kehidupan sel. Senyawa penghambat sintesis protein juga dapat menyebabkan kesalahan dalam pembacaan kode pada mRNA sehingga protein tidak terbentuk sehingga sel akan mati.

4. Penghambatan sintesis asam nukleat

Senyawa penghambat akan berikatan dengan enzim atau salah satu komponen yang berperan dalam tahapan sintesis asam nukleat yang pada akhirnya reaksi terhenti karena substrat yang direaksikan dan asam nukleat tidak terbentuk.

Kriteria zat ideal yang digunakan sebagai zat antimikroba adalah aktivitasnya yang luas, tidak bersifat racun, ekonomis, sebaiknya bersifat membunuh daripada hanya menghambat pertumbuhan mikroba (Pelczar dan Chan, 2005).

2.8.4 Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yakni dilusi atau difusi. Penting sekali untuk menggunakan metode standar untuk mengendalikan semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba (Jawetz, dkk., 2005).

a. Metode dilusi

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Tahap akhir antimikroba dilarutkan dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja. Uji kepekaan cara dilusi air dengan menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai, namun kini ada cara yang lebih sederhana dan banyak dipakai, yakni menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini

memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz, dkk., 2005).

b. Metode difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram yang dipergunakan mengukur kekuatan hambat obat terhadap organisme uji. Metode ini dipengaruhi beberapa faktor fisik dan kimia, selain faktor antara obat dan organisme (misalnya medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik (Jawetz, dkk., 2005).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

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

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), *laminar air flow*, pengaduk, gelas arloji, cawan petri, tabung reaksi, kertas whatman no. 42, jarum ose, inkubator, alumunium foil, tissue, kertas saring, kapas, pinset, autoklaf, bunsen burner, pipet mikro, dan penggaris. Semua peralatan gelas untuk proses kultivasi disterilisasi menggunakan air panas.

3.2.2 Bahan

Bahan utama 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 ekstrak 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 aktivitas antibakteri diantaranya adalah aquades, biakan murni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, spirtus, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), penisilin dan streptomisin.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahapan, tahap pertama adalah ekstraksi minyak *Chlorella sp.* dengan metode Soxhletasi selama 6 – 8 jam dengan suhu 80 °C dengan pelarut n-heksana. Selanjutnya dilakukan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan ekstrak pekat n-heksana dengan dialiri gas N₂. Tahap kedua yaitu hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* dari masing-masing pelarut menggunakan katalis basa KOH 12 % dalam pelarut metanol dengan merefluks pada suhu 60 °C selama 90 menit. Selanjutnya ditambahkan aquades dan n-heksana untuk memisahkan fase air dan fase organik, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Fase air diambil dan ditambahkan dengan H₂SO₄ 1 M hingga pH 1. Kemudian ditambahkan n-heksana untuk memisahkan fase air dan fase organik menggunakan corong pisah. Fase organik yang diperoleh merupakan asam lemak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂. Tahap ketiga adalah asam lemak yang diperoleh dari masing-masing pelarut diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *E. coli* (gram negatif) dan *S. aureus* (gram positif).

Percobaan dilakukan secara deskriptif kualitatif untuk mengetahui pengaruh asam lemak *Chlorella sp.* pada konsentrasi 0,5 %; 1 %; 1,5 %; 2 %; dan 2,5 % terhadap zona hambat bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Kontrol positif yang digunakan adalah penisilin untuk bakteri *S. aureus* dan streptomisin untuk bakteri *E. coli*, sedangkan kontrol negatifnya adalah pelarut (Hidayati, 2009). Kontrol media yaitu Medium Ekstrak Tauge (MET) juga diuji aktivitasnya terhadap kedua bakteri tersebut. Selanjutnya dilakukan karakterisasi asam lemak dalam *Chlorella sp.* dengan KG-SM untuk mengetahui jenis asam lemak apa saja yang terkandung dalam *Chlorella sp.*

3.4 Tahapan Penelitian

1. Kultivasi *Chlorella sp.*
 - a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET).
 - b. Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge.
 - c. Perhitungan jumlah sel *Chlorella sp.*.
 - d. Pemanenan *Chlorella sp.* pada fase awal stasioner.
2. Preparasi sampel.
3. Analisis kadar air *Chlorella sp.* fase awal stasioner.
4. Ekstraksi Soxhlet *Chlorella sp.* dengan pelarut n-heksana
5. Hidrolisis minyak *Chlorella sp.* dengan KOH 12 %.
6. Uji aktivitas antibakteri asam lemak mikroalga *Chlorella sp.*
 - a. Sterilisasi alat dan bahan.
 - b. Pembuatan media agar.
 - c. Peremajaan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
 - d. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

- e. Uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram.
7. Identifikasi golongan asam lemak *Chlorella sp.* dengan KG-SM.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Kultivasi *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET (b/v) yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL aquades yang mendidih sampai volume larutan menjadi setengahnya. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam aquades dengan konsentrasi 4 % (v/v) yakni 24 mL ekstrak tauge dalam 576 mL aquades (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge

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 (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.1.3 Perhitungan Jumlah Sel *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikultivasi diambil menggunakan mikropipet 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, dkk., 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 (hari ke-8) 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 °C sampai diperoleh biomassa *Chlorella sp.* kering dengan kadar air kurang dari 10 %.

3.5.3 Analisis Kadar Air *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 \pm 15 menit untuk menghilangkan kadar air dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.*, kemudian sampel disimpan dalam desikator selama \pm 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven \pm 15 menit, disimpan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dalam mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan persamaan (AOAC, 1984):

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

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 *Chlorella sp.*

28,33 g biomassa kering *Chlorella sp.* diekstraksi Soxhlet dengan n-heksana 227 mL. Biomassa dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam timbal. Kemudian dirangkai timbal dengan labu alas bulat. Selanjutnya diletakkan labu alas bulat pada pemanas. Ditambahkan pelarut n-heksana melalui timbal hingga mengalir masuk ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya dipasang kondensor pada timbal dan dilakukan proses Soxhletasi selama 6 – 8 jam dengan suhu 80 °C sehingga didapatkan ekstrak kasar n-heksana. 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 *Chlorella sp.*

Sebanyak 1,38 g minyak hasil ekstraksi dengan pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan 5 mL metanol dan KOH 12 %. Direfluks pada suhu 60 °C selama 90 menit. Selanjutnya ditambahkan 15 mL aquades dan 15 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 15 mL, kemudian dilakukan pemisahan dengan menggunakan corong pisah. Fase organik yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂.

3.5.6 Uji Aktivitas Antibakteri

3.5.6.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara semua alat dibungkus menggunakan kertas dan disterilkan dalam autoklaf pada 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inci*) selama 15 menit (Muhibah, 2013).

3.5.6.2 Pembuatan Media

Pembuatan media NB (*Nutrient Broth*) dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,9 gram NB kemudian dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil. Suspensi dipanaskan hingga mendidih lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas. Proses ini dilakukan secara aseptik, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit (Muhibah, 2013).

Pembuatan media NA (*Nutrient Agar*) dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 2,3 gram nutrisi agar dan dilarutkan dalam 100 mL aquades dalam *beaker glass* kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup aluminium foil. Suspensi dipanaskan hingga mendidih lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Proses ini dilakukan secara aseptik dengan cara bagian ujung alat dipanaskan serta ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media NA dalam tabung reaksi disterilkan dalam autoklaf dan diatur pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit, kemudian tabung diletakkan dalam posisi miring dan dibiarkan membeku selama 1 x 24 jam pada suhu ruang (Muhibah, 2013).

3.5.6.3 Peremajaan Biakan Murni Bakteri

Biakan murni *E. coli* dan *S. aureus* diremajakan pada media nutrisi agar dengan cara diambil 1 jarum ose, digoreskan secara aseptik pada media NA miring dengan mendekatkan pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Ditutup kembali tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C di dalam inkubator.

3.5.6.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Satu ose bakteri hasil peremajaan biakan murni *E. coli* dan *S. aureus* dibiakkan dalam 10 mL media cair (NB) steril dan dihomogenkan. Larutan ini berfungsi sebagai biakan aktif. Kemudian dilakukan OD (*Optic Density*) dengan panjang gelombang 600 nm (Muhibah, 2013).

Konsentrasi suspensi bakteri diketahui dengan menggunakan metode *total plate count* (TPC). Larutan biakan aktif diambil 1 mL dengan pipet, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades untuk memperoleh pengenceran 10^{-1} . Demikian seterusnya sampai diperoleh pengenceran 10^{-10} . Kemudian dari pengenceran 10^{-5} sampai 10^{-10} diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam cawan petri. Kemudian ditambahkan 10 mL media NA, lalu cawan petri digoyang-goyang supaya NA merata, dibiarkan beberapa menit sampai membeku. Lalu cawan petri disimpan dalam posisi terbalik di dalam inkubator pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (Muhibah, 2013).

Cara perhitungan dipilih cawan petri yang mempunyai koloni antara 30 – 300. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut < 2 , maka nilai yang diambil adalah rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhatikan pengencerannya. Jika hasil perbandingannya > 2 , maka diambil hasil pengenceran yang terendah atau terkecil.

$$\text{Perhitungan jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times 1/\text{fp cfu} \dots\dots\dots (3.4)$$

3.5.6.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Media padat 10 mL yang telah dipanaskan hingga mencair, didinginkan sampai suhu $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, dan dituang dalam cawan petri steril. Ditambahkan 0,1 mL

larutan biakan aktif bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dihomogenkan. Dibiarkan hingga memadat. Kertas cakram (diameter 5 mm) diresapkan dalam ekstrak *Chlorella sp.* dan kontrol. Proses peresapan dilakukan dengan cara meneteskan 20 µL kontrol positif (penisilin dan streptomisin), kontrol negatif (pelarut) dan larutan ekstrak. Kertas cakram tersebut diletakkan di atas permukaan media bakteri menggunakan pinset dan ditekan sedikit. Media bakteri yang sudah diberi bahan antibakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dalam inkubator. Diameter zona hambatan yang terbentuk diukur menggunakan penggaris untuk menentukan aktivitas antibakteri (Volk dan Wheeler, 1993). Uji antibakteri dilakukan tiga kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. Luas zona hambat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Zona hambat} = a - b \dots\dots\dots (3.5)$$

Dimana a merupakan diameter keseluruhan (zona hambat + zona hambat), b merupakan diameter cakram.

3.5.7 Analisis Asam Lemak *Chlorella sp.* 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 1µL kemudian diinjeksikan dalam instrument KG-SM yang telah dikondisikan sebagai berikut:

Jenis kolom	: AGILENTJ%W DB-1
Panjang kolom	: 30 meter
ID	: 0,25 mm
Gas Pembawa	: Helium
Sistem ionisasi	: Electron impact (EI)
Energi ionisasi	: 70 ev

Suhu kolom	: 50 °C
Suhu injector	: 300 °C
Injection mode	: Split
Tekanan gas pembawa	: 12,0 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.*



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian uji aktivitas antibakteri asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* hasil ekstraksi Soxhlet dengan pelarut n-heksana ini didasarkan atas perintah Allah SWT kepada manusia agar memperhatikan dan selalu mengkaji keragaman tumbuhan karena pada dasarnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu bukan tanpa alasan melainkan pasti terdapat manfaat yang tersimpan di dalamnya. Atas dasar perintah Allah SWT tersebut peneliti ingin memanfaatkan kelimpahan minyak yang terdapat di dalam *Chlorella sp.*. Selama ini kelimpahan minyak *Chlorella sp.* dimanfaatkan sebagai bahan bakar biodiesel. Namun pada penelitian kali ini kelimpahan minyak dihidrolisis menjadi asam lemak dan diujicobakan dalam bidang farmakologi khususnya antibakteri sebagai alternatif baru.

Asam lemak sebagai antibakteri dapat diperoleh dengan melakukan tujuh tahapan. Pertama, kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %. Kedua, pemanenan *Chlorella sp.* pada fase awal stasioner. Ketiga, preparasi sampel. Keempat, analisis kadar air *Chlorella sp.* fase awal stasioner. Kelima, ekstraksi Soxhlet *Chlorella sp.* dengan pelarut n-heksana. Keenam, hidrolisis minyak *Chlorella sp.* dengan KOH 12 %. Ketujuh, uji aktivitas antibakteri asam lemak *Chlorella sp.* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ketujuh, analisis asam lemak *Chlorella sp.* menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM).

4.1 Kultivasi *Chlorella sp.*

4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Selama masa pertumbuhan, *Chlorella sp.* membutuhkan nutrisi yang cukup untuk pembentukan sel-selnya sehingga dihasilkan biomassa yang melimpah. Nutrisi juga berperan penting dalam pembentukan unsur-unsur kimia penyusun *Chlorella sp.*. Penambahan media yang digunakan perlu diperhatikan dari berbagai aspek seperti efektivitas, efisiensi, nilai keekonomisan, serta kandungan nutrisi. Pemilihan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % sebagai media pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam penelitian ini telah memenuhi aspek penting untuk menghasilkan biomassa *Chlorella sp.* yang tinggi. Menurut Prihantini, dkk. (2007) MET mengandung nutrisi organik seperti karbohidrat, protein dan lemak yang berperan sebagai sumber energi bagi *Chlorella sp.*. Selain itu, MET juga mengandung nutrisi anorganik, dan beberapa vitamin.

Medium Ekstrak Tauge (MET) dibuat dari air hasil perebusan tauge kacang hijau kemudian diencerkan sampai konsentrasi 4 % yang merujuk dari penelitian Prihantini, dkk. (2007). Dalam penelitian Prihantini (2005) diperoleh hasil bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan konsentrasi 4 % dapat menghasilkan kerapatan sel yang cukup tinggi yaitu sebesar 5.677.625 sel/mL pada hari ke-10.

Kelebihan Medium Ekstrak Tauge (MET) adalah tidak menimbulkan efek toksik karena merupakan media alami, keberadaannya mudah diperoleh, ekonomis, mengandung unsur makro yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan *Chlorella sp.* serta unsur mikro. Menurut Taw (2010) unsur mikro

merupakan kombinasi dari beberapa vitamin yang digunakan untuk proses fotosintesis. Selain itu gizi di dalam MET juga lebih mudah diserap oleh *Chlorella sp.* dikarenakan pada saat perkecambahan kacang hijau, terjadi hidrolisis karbohidrat, lemak, dan protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Kelebihan MET dibandingkan dengan media lain juga diungkapkan oleh Wulandari, dkk. (2010) yang menjelaskan bahwa penggunaan Medium Ekstrak Tauge (MET) mampu menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan dua medium lainnya seperti Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG).

4.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk meningkatkan jumlah biomassa *Chlorella sp.*. Selama kultivasi berlangsung warna kultur dalam labu berubah secara berangsur-angsur dari hijau muda menjadi semakin tua disertai terbentuknya endapan hijau. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *Chlorella sp.* mengalami pertumbuhan dan kepadatan populasi. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-10. Gambar perubahan warna kultur *Chlorella sp.* disajikan pada Lampiran 11. Warna hijau yang dihasilkan disebabkan adanya pigmen klorofil yang dikandung *Chlorella sp.*

Keberhasilan pertumbuhan *Chlorella sp.* didukung oleh beberapa faktor penunjang diantaranya intensitas cahaya, suhu, pH, dan ketersediaan nutrisi. Kultivasi *Chlorella sp.* dalam penelitian ini dikultur dalam labu *Erlenmeyer* dan ditempatkan pada rak kultur. Pencahayaan kultur menggunakan lampu TL 36 Watt (intensitas cahaya sebesar 1000 – 4000 lux) sebagai pengganti sinar matahari

dengan fotoperiodisitas 14 jam terang 10 jam gelap. Intensitas cahaya harus terpenuhi selama kultivasi karena berpengaruh terhadap proses fotosintesis *Chlorella sp.*. Selain adanya intensitas cahaya, proses fotosintesis juga dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi. Pemenuhan nutrisi *Chlorella sp.* selama kultivasi diperoleh dari Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % yaitu dengan menginokulasikan sebanyak 10 mL isolat ke dalam 60 mL medium ekstrak tauge 4 %. Di dalam MET terkandung unsur-unsur makronutrien dan mikronutrien yang dibutuhkan selama proses fotosintesis.

4.1.3 Pemanenan *Chlorella sp.*

Pemanenan *Chlorella sp.* pada penelitian ini dilakukan pada fase akhir eksponensial atau memasuki fase stasioner. Hal ini dikarenakan senyawa yang ingin diekstrak adalah minyak yang merupakan produk metabolit primer. Pada saat *Chlorella sp.* mencapai fase eksponensial terjadi proses metabolisme primer dimana produk yang dihasilkan merupakan senyawa penyusun utama makhluk hidup seperti karbohidrat, lemak, protein asam nukleat, asam amino, asetil koenzim, asam mevalonat. Komponen-komponen tersebut dinamakan sebagai metabolit primer. Sedangkan apabila memasuki fase stasioner sel mikroalga *Chlorella sp.* sudah tidak mengalami pembelahan sel karena berkurangnya nutrisi dalam labu kultur.

Pada penelitian ini, pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada fase akhir eksponensial atau memasuki hari ke-8. Hal tersebut didasarkan pada penelitian Khamidah (2013) yang menyebutkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam MET 4 % mengalami fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8.

Namun, kelimpahan sel *Chlorella sp.* dalam MET 4 % mengalami peningkatan secara signifikan ketika memasuki hari ke-8. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kandungan lemak tertinggi dalam *Chlorella sp.* terjadi pada hari ke-8 atau fase akhir eksponensial. Jumlah sel *Chlorella sp.* pada hari ke-8 pada penelitian ini adalah sebanyak 48.160.000 sel/mL. Tabel 4.1 memperlihatkan jumlah sel *Chlorella sp.* ketika berumur 7, 8, dan 9 hari.

Tabel 4.1 Jumlah sel *Chlorella sp.* hari ke 7, 8, dan 9

Hari	Jumlah Sel (sel/mL)
Hari ke 7	42.720.000
Hari ke 8	48.160.000
Hari ke 9	48.640.000

Apabila dibandingkan dengan hari ke-7, jumlah sel *Chlorella sp.* pada hari ke-8 mengalami peningkatan yang cukup signifikan yakni dari 42.720.000 sel/mL naik menjadi 48.160.000 sel/mL. Hal tersebut dikarenakan pada hari ke-8 *Chlorella sp.* mengalami kepadatan populasi. Jumlah sel *Chlorella sp.* pada hari ke-9 juga masih mengalami peningkatan namun pada hari ke-9 tersebut pertumbuhan *Chlorella sp.* sudah memasuki fase stasioner dimana metabolit primer telah diubah menjadi metabolit sekunder. Sobari, dkk. (2013) dalam penelitiannya juga menyebutkan bahwa kandungan lemak mikroalga yang mencapai puncak tertinggi terjadi pada fase eksponensial. Karbohidrat berlebih yang dihasilkan mikroalga saat proses fotosintesis akan disimpan dalam bentuk lipid. Dalam penelitiannya juga menunjukkan bahwa berat lipid rata-rata semakin meningkat seiring dengan massa pertumbuhan.

Pemanenan dilakukan dengan cara memisahkan bagian biomassa *Chlorella sp.* dengan filtratnya melalui metode sentrifugasi berkecepatan 3000

rpm selama 15 menit. Sentrifus merupakan salah satu teknik pemisahan yang efisien, karena dapat memisahkan biomassa *Chlorella sp.* dengan filtratnya secara sempurna dan waktu yang relatif cepat. Hasil penelitian Kawaroe (2012) menghasilkan bahwa dengan menggunakan alat panen sentrifus, biomassa *Chlorella sp.* yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan hanya menggunakan metode kimia yakni flokulasi ataupun filtrasi.

Biomassa *Chlorella sp.* yang diperoleh saat pemanenan berupa pasta berwarna hijau pekat yang masih mengandung air. Berat basah mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh yaitu sebesar 1.452 g. Hasil pemisahan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Biomassa *Chlorella sp.*

4.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan pengeringan biomassa *Chlorella sp.* menggunakan oven pada suhu 30 °C selama 24 jam. Pengeringan dilakukan pada suhu di bawah titik didih minyak supaya tidak merusak komponen-komponen asam lemak. Proses pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kandungan air dalam sampel biomassa *Chlorella sp.* supaya tidak mengganggu saat proses ekstraksi. Selain itu, pengeringan ini juga bertujuan untuk mencegah tumbuhnya

mikroba dan jamur saat penyimpanan sampel sehingga komposisi kimia dalam sampel tidak berubah. Sampel biomassa *Chlorella sp.* yang telah kering berupa serbuk halus sehingga pada saat ekstraksi Soxhlet kontak antara sampel dengan pelarut sudah cukup maksimal dan semakin banyak pula ekstrak yang didapatkan. Hasil rendemen pengeringan biomassa basah *Chlorella sp.* adalah 2,069 %. Artinya, dari $\pm 1.452,0095$ g biomassa basah, setelah dikeringkan diperoleh ± 30 g biomassa kering yang telah berbentuk serbuk halus.

4.3 Analisis Kadar Air *Chlorella sp.*

Sampel yang digunakan untuk analisis kadar air adalah *Chlorella sp.* yang sudah berupa serbuk kering. Penentuan kadar air ini dilakukan dengan proses pemanasan terhadap sampel dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sehingga kandungan air dalam sampel teruapkan. Proses penguapan ini dilakukan hingga diperoleh berat konstan pada sampel. Selisih berat sampel sebelum dan sesudah dikeringkan menunjukkan banyaknya air yang telah diuapkan. Pada penelitian ini, kadar air yang diperoleh adalah sebesar 8,89 %. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Khamidah (2013), dimana kadar air pada *Chlorella sp.* adalah sebesar 10,899 %.

Analisis kadar air penting dilakukan karena apabila kadar air dalam *Chlorella sp.* tinggi maka efektivitas pelarut saat proses ekstraksi Soxhlet menjadi berkurang. Hal tersebut dikarenakan pelarut n-heksana bersifat nonpolar, sedangkan air dalam *Chlorella sp.* bersifat polar sehingga mengurangi kemampuan n-heksana dalam mengekstrak minyak dan senyawa nonpolar lainnya. Selain itu, senyawa-senyawa polar dalam *Chlorella sp.* juga dapat

terekstrak oleh air dan mempengaruhi besarnya rendemen ekstrak. Kandungan air dalam sampel juga dapat mempengaruhi proses penyimpanan dan ketahanan sampel. Apabila kadar air sampel masih di atas 10 % maka akan rentan ditumbuhi mikroba dan jamur karena mikroba mudah tumbuh pada kondisi lembab. Puspita (2009) menyebutkan bahwa apabila kandungan air dalam suatu sampel kurang dari 10 %, maka kestabilan optimum akan tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dikurangi.

4.4 Ekstraksi Soxhlet *Chlorella sp.* dengan Pelarut n-Heksana

Kelebihan mengekstrak minyak dari mikroalga *Chlorella sp.* dibandingkan dengan bahan alam lainnya adalah serbuk keringnya dapat langsung diekstrak dengan pelarut nonpolar tanpa perlu proses penggilingan. Ekstraksi menurut Harborne (1978) merupakan isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan atau campuran padat dengan menggunakan pelarut yang cocok. Proses ekstraksi Soxhlet ini bertujuan untuk mengisolasi minyak dalam *Chlorella sp.*. Minyak atau trigliserida merupakan senyawa yang sifatnya nonpolar sehingga diperlukan pelarut yang sifatnya nonpolar. Khopkar (1984), menyatakan bahwa proses ekstraksi adalah sesuai dengan hukum “*like dissolves like*” yakni senyawa yang bersifat polar hanya dapat larut dalam pelarut polar dan semipolar, dan sebaliknya, senyawa yang bersifat non polar hanya dapat larut dalam pelarut non polar dan semi polar.

Beberapa pelarut nonpolar sering digunakan dalam mengekstrak minyak, namun pelarut nonpolar yang cocok untuk mengekstrak minyak dalam *Chlorella sp.* kondisi kering adalah n-heksana yang merujuk pada penelitian Rachmaniah

(2010). Penelitian ini menerapkan metode ekstraksi Soxhlet karena memiliki beberapa keuntungan diantaranya jumlah pelarut yang digunakan cenderung tetap karena dapat digunakan secara berulang-ulang sehingga lebih efektif dan efisien. Pelarut n-heksana dalam labu alas bulat saat proses pemanasan akan menguap kemudian mengenai kondensor yang menyebabkan uap dari pelarut terkondensasi sehingga turun ke bawah mengenai sampel. Sampel akan berinteraksi dengan pelarut hingga minyak dan senyawa nonpolar lainnya larut atau terekstrak oleh pelarut n-heksana. Campuran pelarut dan minyak yang terekstrak pada volume tertentu akan turun ke dalam labu alas bulat kemudian mengalami pemanasan kembali. Suhu yang digunakan disesuaikan dengan titik didih pelarut n-heksana yakni sekitar 80 °C supaya yang teruapkan hanya pelarutnya. Pelarut yang menguap akan mengembun dan kembali mengenai sampel. Proses tersebut dinamakan dengan satu sirkulasi. Ekstraksi tersebut terjadi secara berulang-ulang hingga ekstrak yang berada dalam labu alas bulat warnanya menjadi semakin hijau pekat. Hal tersebut mengindikasikan bahwa semua minyak dalam sampel telah terekstrak dalam pelarut n-heksana.

Ekstraksi minyak *Chlorella sp.* dilakukan dengan mengekstrak serbuk *Chlorella sp.* sebanyak 28,33 g dengan pelarut n-heksana sebanyak 227 mL (1:8). Dalam penelitian ini, minyak telah terekstrak secara maksimal terjadi selama 855 menit dimana setiap satu sirkulasi berlangsung selama kurang lebih 20 menit. Pemilihan metode Soxhletasi untuk mengekstrak minyak dalam *Chlorella sp.* didasari oleh sifat dari minyak yang tahan terhadap proses pemanasan karena titik didihnya yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pelarutnya.

Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 60 °C dan untuk memaksimalkan penguapan pelarut maka ekstrak dialiri gas N₂ hingga beratnya konstan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi minyak *Chlorella sp.* umur panen hari ke-8 menggunakan ekstraktor Soxhlet dengan pelarut n-heksana diperoleh rendemen sebesar 6,28 %. Artinya, dari 28,33 g sampel serbuk *Chlorella sp.* diperoleh minyak *Chlorella sp.* sekitar 1,78 g.

Berbeda dengan hasil penelitian Rachmaniah (2010), rendemen minyak *Chlorella sp.* kering yang diperoleh secara Soxhletasi adalah sebesar 16,57 %. Sedangkan menurut Chisti (2007) kandungan minyak dalam *Chlorella sp.* berkisar antara 28 – 32 %. Nilai rendemen minyak atau lemak pada penelitian ini di bawah persen rata-rata dari penelitian-penelitian sebelumnya sebab besarnya kadar air di dalam sampel *Chlorella sp.* dapat mengurangi kereaktifan pelarut n-heksana. Selain karena faktor efektivitas pelarut, lamanya waktu sirkulasi juga mempengaruhi rendemen minyak yang dihasilkan. Menurut Wati waktu ekstraksi yang diperlukan untuk mengekstrak minyak *Chlorella sp.* secara Soxhletasi adalah selama 5400 menit. Sedangkan dalam penelitian ini lamanya waktu yang digunakan untuk mengekstrak *Chlorella sp.* hanya 855 menit. Artinya, tidak semua minyak dalam *Chlorella sp.* terekstrak oleh pelarut n-heksana.

Minyak yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan. Warna yang dihasilkan diduga berasal dari pigmen karotenoid yang terkandung di dalam *Chlorella sp.*. Menurut Volesky (1970) selain mengandung klorofil a dan b dalam jumlah yang besar, *Chlorella sp.* juga mengandung karotin dan xantofil. Karotenoid merupakan kelompok pigmen yang berwarna kuning, jingga, merah

jingga serta larut dalam minyak (Winarno, 2004). Menurut Ranganna (1979) karotenoid termasuk senyawa lipida yang tidak tersabunkan, larut dengan baik dalam pelarut organik tetapi tidak larut dalam air.



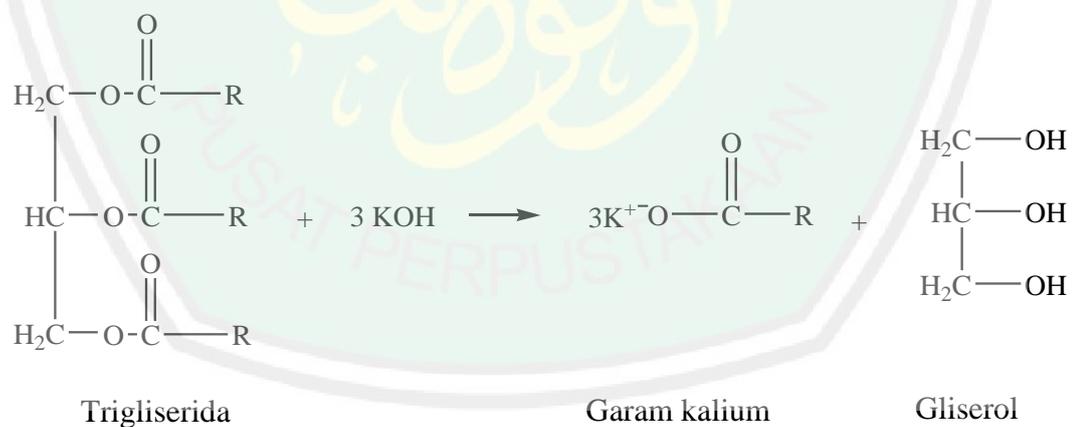
Gambar 4.2 Minyak *Chlorella sp.*

4.5 Hidrolisis Minyak *Chlorella sp.*

Minyak *Chlorella sp.* merupakan satu molekul gliserol yang mengikat tiga molekul asam lemak atau dinamakan sebagai trigliserida. Asam lemak dapat dipisahkan dari gliserolnya melalui reaksi hidrolisis. Dalam penelitian ini sebanyak 1,38 g minyak *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan katalis basa KOH 12 % dalam 5 mL pelarut metanol. Beberapa keuntungan apabila menggunakan katalis basa adalah reaksi berjalan secara *irreversible* sehingga produk yang dihasilkan lebih banyak. Pemilihan KOH sebagai katalis basa dibandingkan NaOH pada reaksi hidrolisis disebabkan karena kalium sifatnya reaktif dibandingkan natrium sehingga kalium lebih mudah membentuk garam asam lemak. Dalam hal ini KOH yang digunakan dibuat berlebih supaya proses penyabunan berjalan secara sempurna atau disebutkan juga dengan hidrolisis total. Darmoyuwono (2006) menerangkan bahwa apabila jumlah KOH yang digunakan lebih sedikit dari

jumlah minyak yang akan dihidrolisis maka tidak semua minyak akan tersabunkan atau disebut juga hidrolisis parsial.

Pelarut metanol dibutuhkan selama proses hidrolisis dikarenakan adanya perbedaan sifat kepolaran antara trigliserida dengan KOH. Dimana trigliserida merupakan senyawa nonpolar sedangkan KOH bersifat polar. Kedua senyawa tersebut dapat dipertemukan dengan suatu media perantara yang dapat melarutkan keduanya yakni metanol. Hal tersebut dikarenakan metanol memiliki sisi polar maupun nonpolar dalam struktur senyawanya. Campuran direfluks ke dalam labu alas bulat leher tiga dengan pemanasan pada suhu 60 °C disertai proses pengadukan menggunakan magnetik stirer selama 90 menit untuk mempercepat reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan KOH ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Reaksi hidrolisis trigliserida

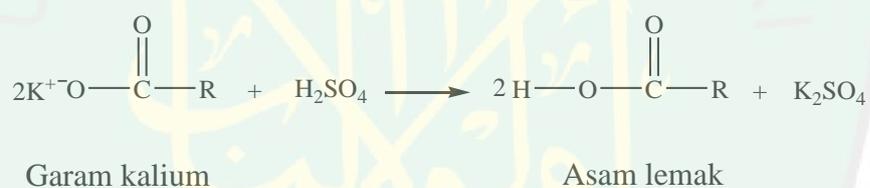
Pemisahan garam kalium (sabun) dengan senyawa nonpolar lain atau pengotor dilakukan dengan pengocokan dalam corong pisah. Garam kalium yang terbentuk larut dalam air ditandai dengan terbentuknya busa (Gambar 4.4) pada saat pengocokan. Sedangkan senyawa nonpolar lainnya atau pengotor berada pada

fase organik. Untuk memperoleh asam lemak maka dilakukan penambahan H_2SO_4 1 M pada lapisan air hingga nilai pH menjadi 1 agar semua garam berubah menjadi asam lemak.



Gambar 4.4 Garam sabun yang terbentuk pada reaksi hidrolisis

Reaksi penambahan H_2SO_4 pada garam kalium diperlihatkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Reaksi pembentukan asam lemak

Asam lemak yang diperoleh dipisahkan dari senyawa-senyawa lain dengan penambahan n-heksana dan dikocok menggunakan corong pisah. lapisan atas merupakan asam lemak yang terlarut dalam n-heksana dengan warna coklat tua pekat sedangkan lapisan bawah berwarna coklat bening merupakan senyawa polar yang terdiri dari metanol, K_2SO_4 , gliserol, serta senyawa polar lainnya yang terlarut dalam air. Fase organik selanjutnya dipekatkan dengan mengalirkan gas N_2 untuk menghilangkan sisa pelarut n-heksana. Warna ekstrak yang diperoleh adalah coklat kekuningan kental berupa campuran-campuran asam lemak dan senyawa lain dengan rendemen hidrolisis sebesar 69,57 % (Lampiran 5). Nilai

rendemen hidrolisis minyak cukup tinggi karena menurut Clark (2007) dalam Fasya, 2011 reaksi hidrolisis minyak dengan katalis basa bersifat *irreversible* atau berjalan satu arah sehingga produk yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan katalis asam.

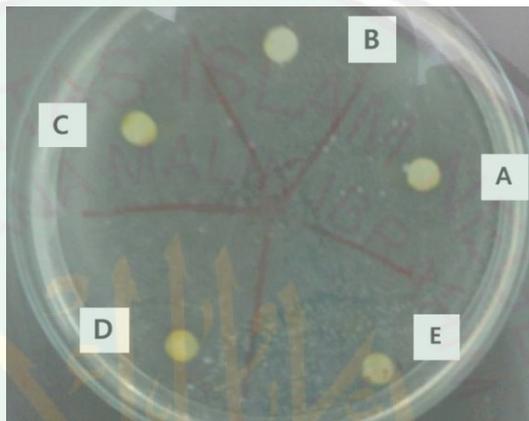
4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak *Chlorella sp.*

Pengujian aktivitas antibakteri asam lemak *Chlorella sp.* dilakukan secara *in vitro* terhadap dua jenis bakteri uji yaitu bakteri *E. coli* yang mewakili bakteri gram negatif dan *S. aureus* yang mewakili bakteri gram positif. Adanya perbedaan jenis bakteri tersebut dikarenakan kedua bakteri tersebut memiliki perbedaan pada struktur dinding selnya.

Metode yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri asam lemak *Chlorella sp.* adalah metode difusi cakram. Kertas cakram berdiameter 5 mm yang telah dijenuhkan dalam ekstrak ditempatkan pada media padat yang sudah diinokulasikan bakteri uji pada permukaannya dengan konsentrasi tertentu. Ekstrak dalam kertas cakram akan terdistribusi pada media yang berisi bakteri. Apabila ekstrak memiliki aktivitas akan membentuk zona hambat di sekitar kertas cakram setelah melewati masa inkubasi selama 24 jam. Hasil uji aktivitas antibakteri asam lemak *Chlorella sp.* dengan variasi konsentrasi dapat diamati pada Tabel 4.2.

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat dikatakan bahwa asam *Chlorella sp.* pada konsentrasi 0,5 – 2,5 % sudah menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* walaupun tergolong lemah (Gambar 4.6) namun tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*. Penggunaan

variasi konsentrasi dimaksudkan untuk mengetahui pada rentang konsentrasi mana asam lemak dapat bekerja secara efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan menghitung selisih daerah yang tidak ditumbuhi bakteri (zona bening) dengan diameter kertas cakram.



Gambar 4.6 Zona hambat pada bakteri *S. aureus*
Keterangan: A. konsentrasi 0,5 %, B. konsentrasi 1 %, C. konsentrasi 1,5 %, D. konsentrasi 2,5 %, E. konsentrasi 2,5 %.

Tabel 4.2 Hasil uji aktivitas antibakteri asam lemak *Chlorella sp.*

Konsentrasi (% b/v)	Zona Hambat (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0,5	-	1,8
1,0	-	1,9
1,5	-	3,2
2,0	-	3,5
2,5	-	3
Kontrol n-Heksana	-	-
Kontrol Media	-	-
Penisilin 0,6	-	24
Streptomisin 2,5	12	-
TPC (CFU/mL)	$2,96 \times 10^{-8}$	$2,88 \times 10^{-8}$

Besarnya zona hambat asam lemak *Chlorella sp.* terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 0,5 – 2 % berturut-turut adalah sebesar 1,8 mm, 1,9 mm, 3,2 mm, dan 3,5 mm. Zona hambat semakin meningkat seiring dengan naiknya konsentrasi ekstrak minyak *Chlorella sp.*. Namun pada konsentrasi 2,5 % zona

hambat mengalami penurunan yaitu sebesar 3 mm. Data tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi optimum asam lemak *Chlorella sp.* untuk menghambat bakteri *S.aureus* adalah 2 %.

Penelitian Kusmiyati dan Agustini (2007) diperoleh hasil bahwa senyawa aktif sebagai antibakteri mikroalga *Porphyridium cruentum* secara KG-SM adalah senyawa-senyawa asam lemak. Penelitian ini juga tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* pada ekstrak diklorometan setelah penambahan NaOH. sedangkan zona hambat tertinggi terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 6000; 7500; 8000; dan 10.000 ppm secara berturut-turut adalah 6,70; 8,30; 9,40; dan 10,10 mm.

Asam lemak *Chlorella sp.* sebagai senyawa antibakteri pada penelitian ini tergolong lemah karena besarnya zona hambat < 5 mm. Hal tersebut disebabkan asam-asam lemak *Chlorella sp.* yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis masih berupa campuran dari asam lemak jenuh dan tak jenuh. Asam lemak jenuh dan tak jenuh yang belum terpisah menyebabkan efektivitas asam lemak menjadi berkurang. Menurut Zheng, dkk. (2005) asam lemak tidak jenuh menunjukkan aktivitas penghambatan lebih besar dibanding asam lemak jenuh.

Asam lemak *Chlorella sp.* memiliki daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* tetapi tidak dapat menghambat bakteri *E. coli*. Hal tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi dan struktur dinding sel pada kedua bakteri tersebut. Menurut Jawetz dkk. (2005) bakteri *S. aureus* yang tergolong bakteri gram positif memiliki dinding sel tersusun atas peptidoglikan 90 %, lapisan tipis asam teikoat dan teikuronat, serta dindingnya berlapis tunggal (*monolayer*)

dengan kandungan lipid rendah (1 – 4 %), sehingga memudahkan asam lemak dalam menembus dinding sel bakteri *S. aureus*. Menurut Kim (1995) zat antimikroba dapat merusak membran sitoplasma dan mempengaruhi integritasnya. Kerusakan pada membran dapat menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas dan terjadi kebocoran sel, yang diikuti dengan keluarnya materi intraselular. Sedangkan bakteri *E. coli* yang tergolong bakteri gram negatif struktur selnya lebih kompleks dan mempunyai tiga lapisan pada dinding selnya. Lapisan luar merupakan lipoprotein, lapisan tengah merupakan lipopolisakarida yang berfungsi untuk menghalangi masuknya senyawa bioaktif antibakteri, lapisan dalam merupakan peptidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (11 – 12 %) (Jawetz dkk., 2005). Struktur dinding sel bakteri *E. coli* yang lebih kompleks menyebabkan asam lemak sulit menembus dinding sel sehingga tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Pada umumnya, asam lemak berfungsi sebagai surfaktan anionik yang masuk ke dalam membran plasma bakteri dan mengubah permeabilitas membran sehingga terjadi disintegrasi membran. Asam lemak rantai pendek dan sedang berdifusi ke dalam sel dalam bentuk tidak terdisosiasi dan kemudian akan terdisosiasi di dalam sitoplasma sehingga membuat kondisi intraselular menjadi asam. Nilai pH intraselular yang lebih rendah mengakibatkan enzim-enzim intraselular menjadi tidak aktif serta mengganggu transpor asam amino (Nair dkk., 2005).

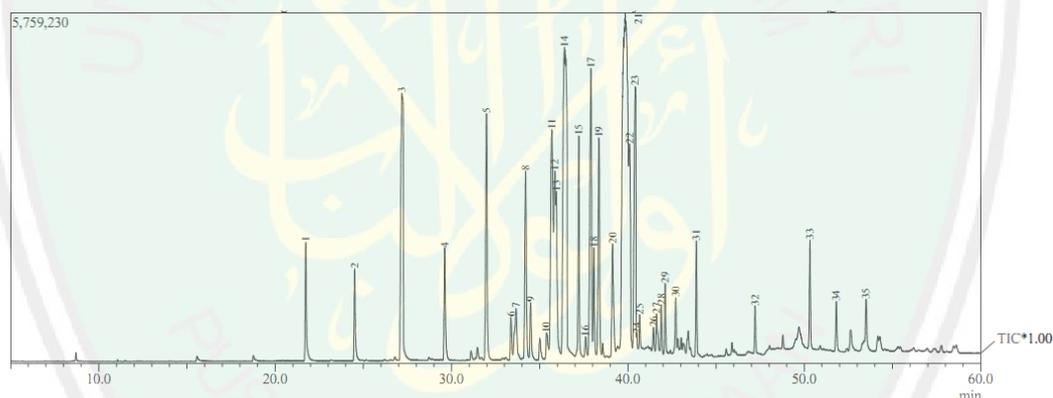
Keefektivan asam lemak *Chlorella sp.* sebagai antibakteri dibandingkan dengan kontrol positif streptomisin untuk bakteri *E. coli* dan penisilin untuk

bakteri *S. aureus*. Apabila nilai zona hambat kontrol lebih kecil daripada zona hambat asam lemak, maka asam lemak tersebut dikatakan efektif sebagai senyawa antibakteri, sebaliknya jika nilai zona hambat kontrol lebih besar daripada zona hambat asam lemak maka asam lemak tersebut dikatakan kurang efektif sebagai senyawa antibakteri. Berdasarkan Tabel 4.2 besarnya diameter zona hambat streptomisin adalah 12 mm terhadap bakteri *E. coli* sedangkan penisilin adalah 24 mm terhadap bakteri *S. aureus*. Jika dibandingkan dengan zona hambat asam lemak yang dihasilkan *Chlorella sp.*, zona hambat kontrol positif lebih besar. Walaupun demikian asam lemak *Chlorella sp.* masih dikatakan memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri gram positif. Sedangkan bakteri gram negatif tidak mampu dihambat oleh asam lemak *Chlorella sp.*

Kontrol negatif juga diujicobakan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* untuk membuktikan bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan murni berasal dari minyak dan asam lemak *Chlorella sp.* Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut n-heksana dan Medium Ekstrak Tauge (MET). Hasil uji aktivitas antibakteri dari kedua kontrol negatif tidak menunjukkan adanya pengaruh terhadap bakteri *E. coli* maupun *S. aureus* ditandai dengan tidak terbentuknya zona hambat di sekitar zona hambat. Hasil tersebut juga didukung dari penelitian Alfiyaturohmah (2013) yang menyebutkan bahwa pada kontrol negatif n-heksana tidak menghasilkan zona hambat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal tersebut menandakan bahwa kerja antibakteri asam lemak *Chlorella sp.* tidak dipengaruhi oleh n-heksana maupun MET.

4.7 Analisis Asam Lemak *Chlorella sp.* dengan KG-SM

Penelitian ini dilanjutkan dengan analisis KG-SM yang bertujuan untuk memastikan komponen yang dihasilkan adalah asam lemak serta mengetahui komponen-komponen asam lemak dalam *Chlorella sp.*. Berdasarkan hasil analisis KG-SM dapat diketahui komposisi asam lemak dominan yang terkandung dalam *Chlorella sp.* adalah asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat), asam heksadekanoat (asam palmitat), asam dodekanoat (asam laurat), asam 7,10-heksadekadienoat, dan asam 10,13-oktadakadienoat. Gambar 4.7 dan Tabel 4.2 menunjukkan kromatogram KG metil ester asam lemak hasil hidrolisis.



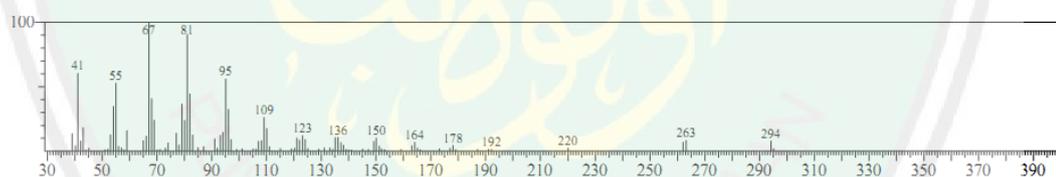
Gambar 4.7 Kromatogram KG metil ester asam lemak hasil hidrolisis

Tabel 4.3 Asam-asam lemak dominan pada *Chlorella sp.*

No.	Puncak	Waktu Retensi (menit)	Asam Lemak	% Area Relatif
1.	3	27,185	asam dodekanoat (asam laurat)	7,43
2.	11	35,685	asam 7,10-heksadekadienoat	6,20
3.	14	36,398	asam heksadekanoat (asam palmitat)	12,74
4.	17	37,908	asam 10,13-oktadakadienoat	5,72
5.	21	39,848	asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)	19,95

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa asam lemak dominan yang terkandung di dalam *Chlorella sp.* adalah pertama asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat) yang tergolong asam lemak tak jenuh, kedua yakni asam heksadekanoat (asam palmitat) yang tergolong asam lemak jenuh, ketiga yakni asam dodekanoat (asam laurat) yang tergolong asam lemak jenuh, keempat yakni asam 7,10-heksadekadienoat yang tergolong asam lemak tak jenuh, dan kelima yakni asam 10,13-oktadekadienoat yang tergolong asam lemak tak jenuh.

Asam lemak dominan pertama dengan waktu retensi 39,848 menit dan memiliki luas area 19,95 % diduga merupakan asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat) karena memiliki kemiripan dengan spektra SM asam 9,12-oktadekadienoat pada library NIST62.LIB dengan nomor entry 41849 serta tingkat kemiripan sebesar 94 %.



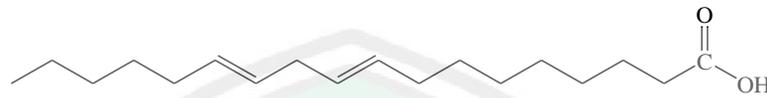
Gambar 4.8 Spektra metil asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)



Gambar 4.9 Spektra library metil asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)

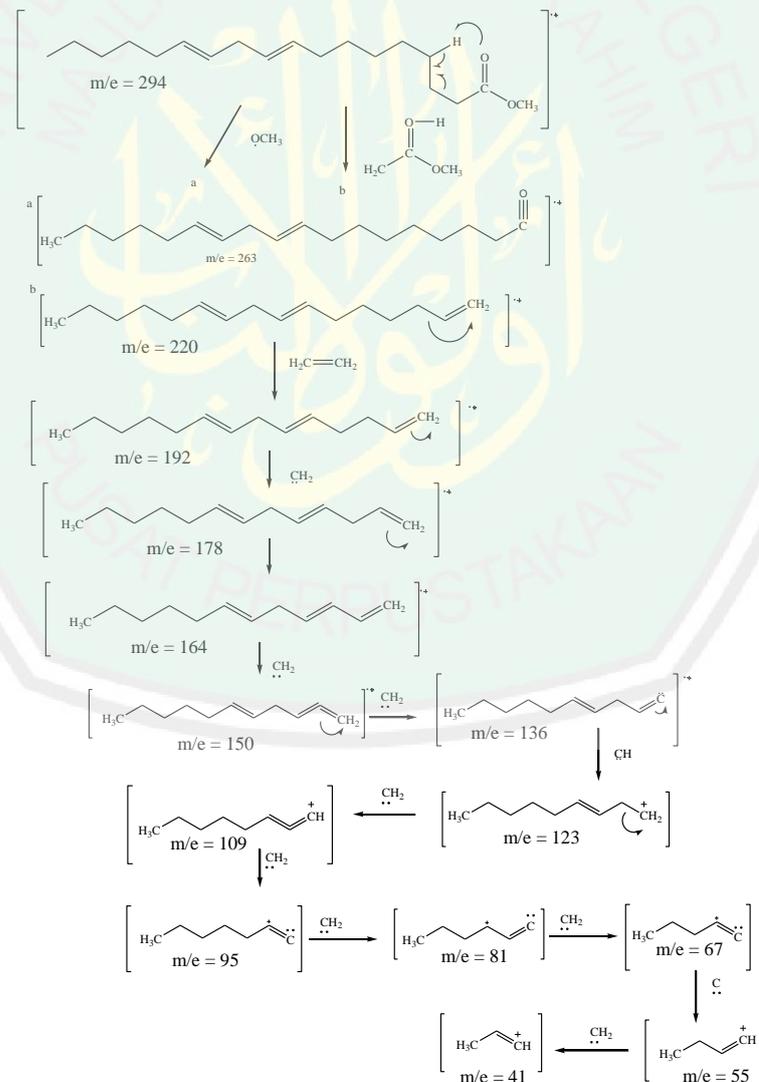
Spektra SM metil ester asam 9,12-oktadekadienoat (metil linoleat) yang muncul pada waktu retensi 39,848 menit menghasilkan puncak ion fragmen pada m/z 41, 55, 67, 81, 95, 109, 123, 136, 150, 164, 178, 192, 220, 263, dan 294.

Fragmen dengan m/z 294 merupakan ion molekul metil linoleat yang memiliki rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$.



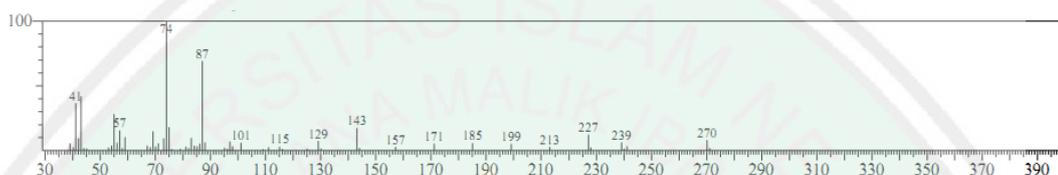
Gambar 4.10 Struktur asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat)

Perkiraan pola fragmentasi asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat) diberikan pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Perkiraan pola fragmentasi asam 9,12-oktadekadienoat

Kemudian asam lemak kedua dengan waktu retensi 36,398 menit dan memiliki luas area 12,74 % diduga merupakan asam heksadekanoat (asam palmitat) karena memiliki kemiripan dengan spektra SM asam heksadekanoat pada library NIST12.LIB dengan nomor entry 124619 serta tingkat kemiripan sebesar 94 %.

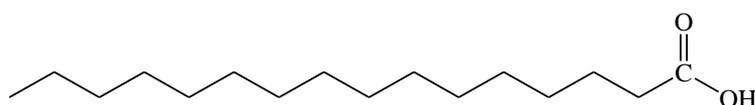


Gambar 4.12 Spektra metil asam heksadekanoat (asam palmitat)



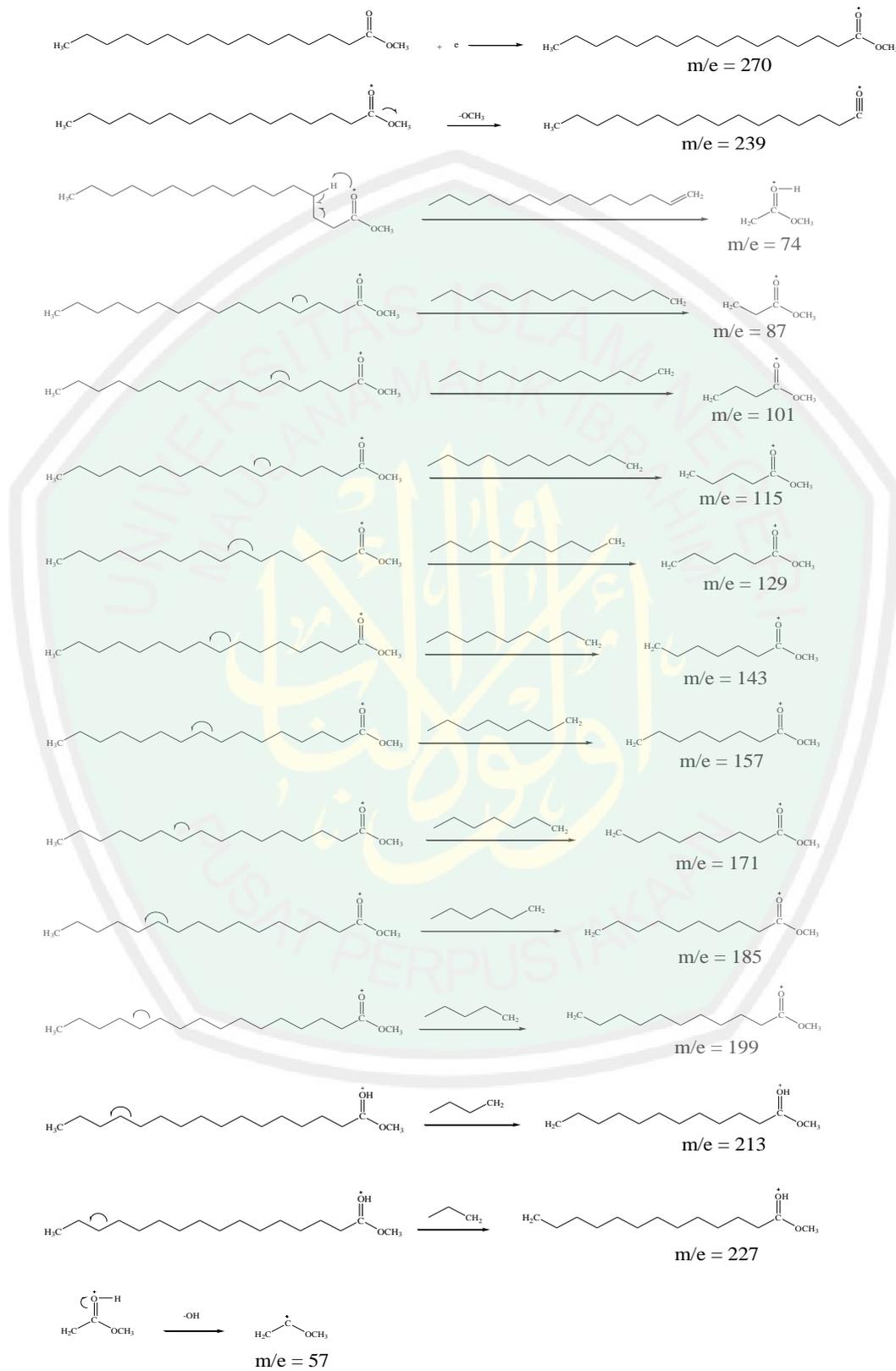
Gambar 4.13 Spektra library metil asam heksadekanoat (asam palmitat)

Spektra SM metil ester asam heksadekanoat (metil palmitat) yang muncul pada waktu retensi 36,398 menit menghasilkan puncak ion fragmen pada m/z 41, 57, 74, 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227, 239, dan 270. Fragmen dengan m/z 270 merupakan ion molekul metil palmitat yang memiliki rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$.



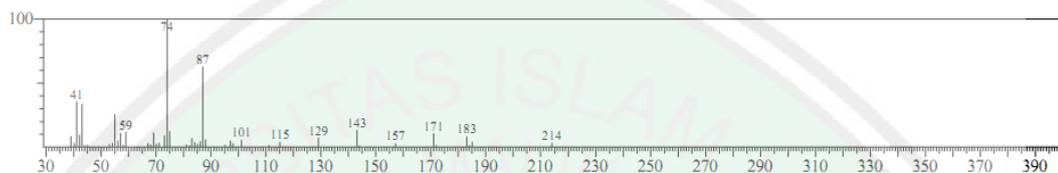
Gambar 4.14 Struktur asam heksadekanoat (asam palmitat)

Perkiraan pola fragmentasi asam heksadekanoat (asam palmitat) diberikan pada Gambar 4.15.

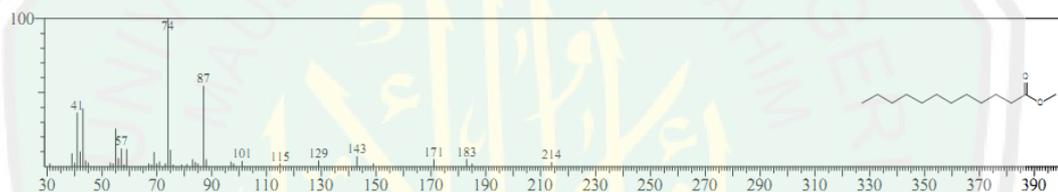


Gambar 4.15 Perkiraan pola fragmentasi asam heksadekanoat (asam palmitat)

Asam lemak ketiga dengan waktu retensi 27,185 menit dan memiliki luas area 7,43 % diduga merupakan asam dodekanoat (metil laurat) karena memiliki kemiripan dengan spektra SM asam dodekanoat pada library NIST12.LIB dengan nomor entry 8113 serta tingkat kemiripan sebesar 94 %.

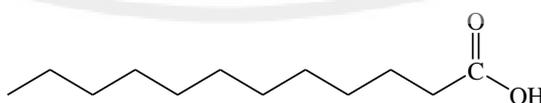


Gambar 4.16 Spektra metil asam dodekanoat (asam laurat)



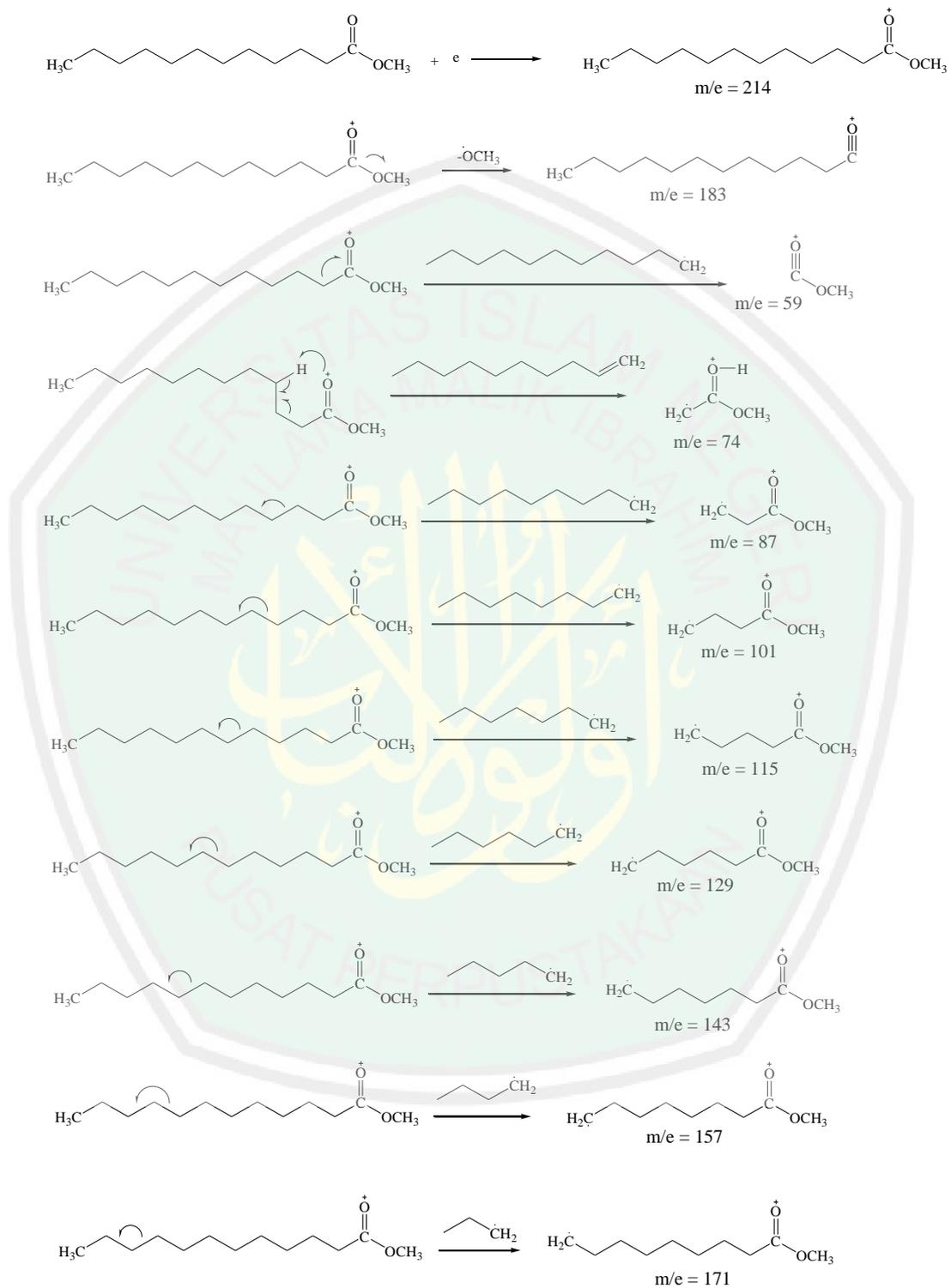
Gambar 4.17 Spektra library metil asam dodekanoat (asam laurat)

Spektra SM metil ester asam dodekanoat (metil laurat) yang muncul pada waktu retensi 27,185 menit menghasilkan puncak ion fragmen pada m/z 41, 59, 74, 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 183, dan 214. Fragmen dengan m/z 214 merupakan ion molekul metil laurat yang memiliki rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH})_{10}\text{COOH}$.



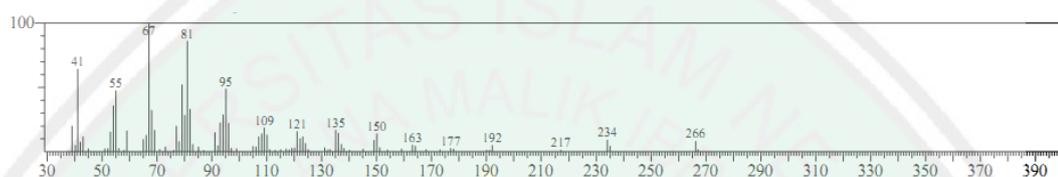
Gambar 4.18 Struktur asam dodekanoat (asam laurat)

Perkiraan pola fragmentasi asam dodekanoat (asam laurat) diberikan pada Gambar 4.19.

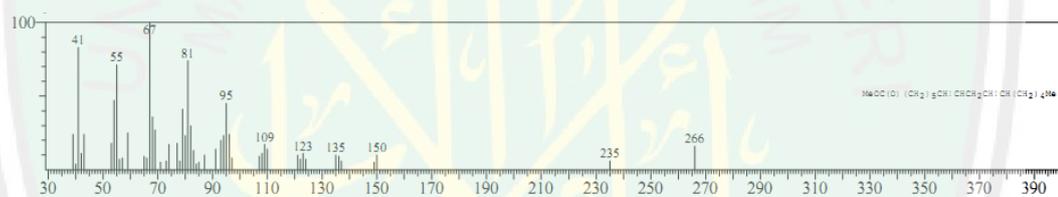


Gambar 4.19 Perkiraan pola fragmentasi asam dodekanoat (asam laurat)

Asam lemak keempat dengan waktu retensi 35,685 menit dan memiliki luas area 6,20 % diduga merupakan asam 7,10-heksadekadienoat karena memiliki kemiripan dengan spektra SM asam 7,10-heksadekadienoat pada library WILEY229.LIB dengan nomor entry 121635 serta tingkat kemiripan sebesar 90 %.

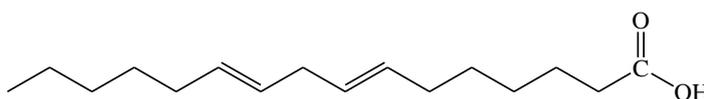


Gambar 4.20 Spektra metil asam 7,10-heksadekadienoat



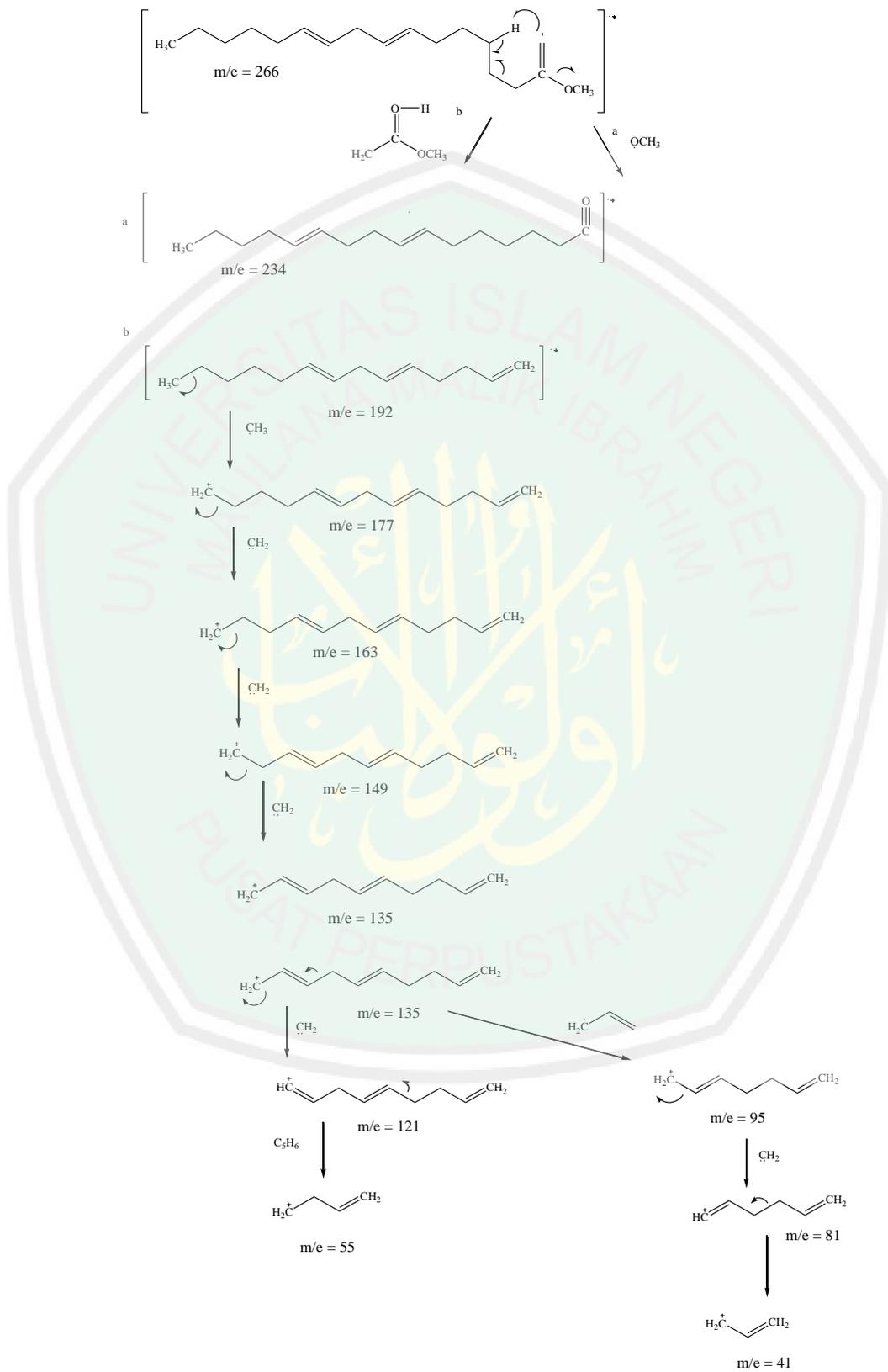
Gambar 4.21 Spektra library metil asam 7,10-heksadekadienoat

Spektra SM metil ester asam 7,10-heksadekadienoat yang muncul pada waktu retensi 35,683 menit menghasilkan puncak ion fragmen pada m/z 41, 55, 67, 81, 95, 109, 121, 135, 150, 163, 177, 192, 217, 234, dan 266. Fragmen dengan m/z 266 merupakan ion molekul metil ester asam 7,10-heksadekadienoat yang memiliki rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$.



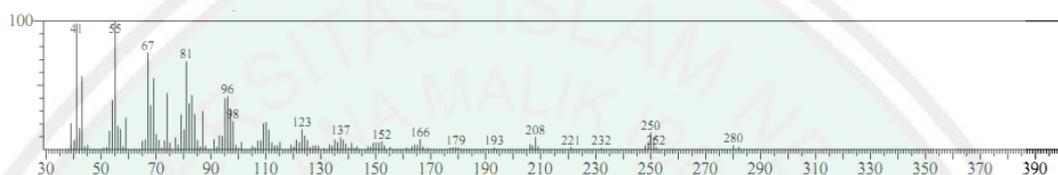
Gambar 4.22 Struktur asam 7,10-heksadekadienoat

Perkiraan pola fragmentasi asam 7,10-heksadekadienoat diberikan pada Gambar 4.23.

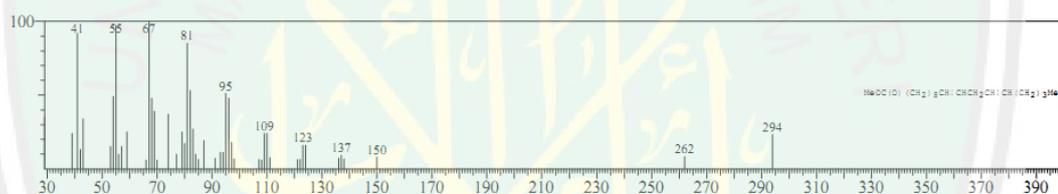


Gambar 4.23 Perkiraan pola fragmentasi asam dodekanoat 7,10-heksadekadienoat

Asam lemak kelima dengan waktu retensi 37,908 menit dan memiliki luas area 5,72 % diduga merupakan asam 10,13-oktadakadienoat karena memiliki kemiripan dengan spektra SM asam 10,13-oktadakadienoat pada library WILEY229.LIB dengan nomor entry 141523 serta tingkat kemiripan sebesar 89 %.

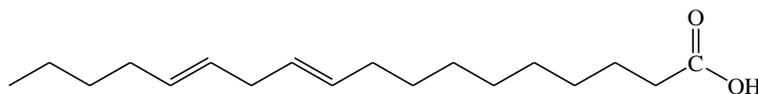


Gambar 4.24 Spektra metil asam 10,13-oktadakadienoat



Gambar 4.25 Spektra library metil asam 10,13-oktadakadienoat

Spektra SM metil ester asam 10,13-oktadakadienoat yang muncul pada waktu retensi 37,908 menit menghasilkan puncak ion fragmen pada m/z 41, 55, 67, 81, 96, 123, 137, 152, 166, 179, 193, 208, 221, 232, 250, 262 dan 280. Fragmen dengan m/z 280 merupakan ion molekul metil ester asam 10,13-oktadakadienoat yang memiliki rumus molekul $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$.



Gambar 4.26 Struktur asam 10,13-oktadekadienoat

Asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat), asam heksanoat (asam palmitat), dan asam dodekanoat (asam laurat) hasil hidrolisis minyak *Chlorella sp.* merupakan senyawa yang aktif menghambat bakteri *S. aureus*. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Agustini dan Kusmiati (2010) yang menyebutkan bahwa asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat) merupakan senyawa yang bersifat sebagai antibakteri. Hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Kusmiyati (2007) menghasilkan kesimpulan bahwa hasil identifikasi senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum* dengan KG-SM menunjukkan senyawa dominan yaitu asam lemak metil heksadekanoat (asam palmitat). Sementara itu, menurut Murhadi (2009) asam lemak seperti miristoleat, palmitoleat, linolenat, kaprat, laurat, dan miristat juga terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*.

4.8 Pemanfaatan *Chlorella sp.* dalam perspektif Islam

Allah SWT berfirman dalam surat an-Nahl ayat 13:

وَمَا ذَرَأَّا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

“dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran” (Q.S an-Nahl: 13).

Al-Qur'an surat an-Nahl ayat 13 menerangkan bahwa Allah SWT menundukkan apa yang Dia ciptakan bagi manusia di muka bumi ini dari berbagai perkara yang menakjubkan, seperti barang tambang, tumbuh-tumbuhan dan hewan dengan berbagai jenis bentuk, manfaat, dan ciri khasnya. Sesungguhnya

pada yang demikian itu terdapat tanda bagi kaum yang mengingat karunia dan nikmat Allah, lalu mereka bersyukur dan menundukkan diri kepada-Nya atas karunia dan kebaikan yang Dia limpahkan (Al-Maraghi, 1993).

Berbagai kenikmatan di bumi telah disediakan Allah SWT agar dimanfaatkan oleh manusia dengan sebaik-baiknya. Salah satu ciptaan Allah yang bermanfaat dan membawa berkah bagi manusia adalah tumbuh-tumbuhan. Apabila manusia mau berfikir dan mengkaji rahasia di balik tumbuhan maka akan diketahui betapa banyaknya fungsi tumbuhan berdasarkan jenis-jenisnya. Mikroalga *Chlorella sp.* yang merupakan tumbuhan tingkat rendah dan dianggap sebagai tumbuhan pengganggu ternyata memiliki manfaat salah satunya di bidang kesehatan. Terbukti melalui penelitian ini, *Chlorella sp.* dapat menghasilkan senyawa asam lemak yang memiliki potensi sebagai antibakteri.

Manfaat tumbuhan sebagai obat juga telah diterangkan melalui Hadits Rasulullah SAW. Ahmad meriwayatkan dari Usamah bin Syuraik (Qardhawi, 1998):

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يُنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ، وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ
(رواه أحمد)

"Sesungguhnya Allah tidak menurunkan suatu penyakit kecuali Dia menurunkan obatnya juga. Orang yang tahu obatnya, berarti dia mengetahui. Sedangkan orang yang tidak tahu obatnya, maka dia tidak mengetahui" (HR Ahmad).

Sebagai makhluk yang dibekali akhlak, manusia diperintahkan Allah SWT untuk berikhtiar mencari jawaban dari suatu perkara karena setiap persoalan pasti disertai dengan solusinya. Begitu juga suatu penyakit, Allah SWT menurunkan penyakit pasti disertai dengan penawarnya juga. Tergantung bagaimana manusia

tersebut mau berikhtiar dan mencari misalnya melalui sebuah riset. Pemanfaatan *Chlorella sp.* sebagai antibakteri dalam penelitian ini contohnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam lemak *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* yang diketahui sering menimbulkan penyakit diare bahkan meningitis, serta bakteri *S. aureus* yang juga sering menimbulkan penyakit terutama masalah kulit. Dengan demikian, mikroalga *Chlorella sp.* merupakan jenis tumbuhan yang diciptakan Allah SWT bukan tanpa alasan melainkan sebagai pembawa manfaat khususnya dalam bidang kesehatan.

Melalui sebuah riset ilmiah, manusia akan sadar betapa luasnya ilmu Allah. Hal tersebut menjadikan manusia semakin rendah hati dan tunduk kepada Allah SWT dan selalu mendekatkan diri kepada-Nya, bukan menjadikan manusia sebagai makhluk yang angkuh dan sombong seperti orang-orang kafir. Sebagaimana firman Allah SWT dalam QS. Shaad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ
كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

“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.” (QS Shaad : 27).

Firman Allah وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا berarti bahwa Allah menciptakan alam semesta ini untuk sebuah perkara yang benar agar menjadi bukti atas kekuasaan-Nya (*qudratullah*) (Qurthubi, 2009).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, tetapi tidak terhadap bakteri *E. coli*. Zona hambat asam lemak *Chlorella sp.* terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 % secara berturut-turut adalah 1,8; 1,9; 3,2; 3,5; dan 3 mm.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan asam lemak jenuh dan tak jenuh *Chlorella sp.* agar diperoleh keefektifan antibakteri yang lebih besar.
2. Perlu dilakukan pengujian asam lemak sebagai antibakteri terhadap beberapa jenis bakteri gram positif lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N. W. S. dan Kusmiati. 2010. Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Secara Maserasi dan Digesti dalam Berbagai Pelarut dari Mikroalga *Dulaniella salina*. *Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS*: 544-551.
- Alfiyaturohmah. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Kloroform dan *n*-heksana Alga Coklat Jenis *S. vulgare* Asal Pantai Kapong Pamekasan terhadap Bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Anonim. 2014. Inglaboratory.blogspot.com/2010/03/gas-chromatography.html. (Diakses pada tanggal 15 Agustus 2014).
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Atlas, R. M. 1997. *Principles of Microbiology Edisi ke-2*. Iowa: WNC Brown.
- [BBL] Balai Budaya Laut. 2002. *Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton*. Balai Budaya Laut Lampung. Ditjen Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan. hlm 13 – 15.
- Becker. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. London: Cambridge University Press.
- Ben-Amotz; Fishler dan Schneller. 1987. Chemical Composition of Dietary Species of Marine Unicellular Algae and Rotifers with Emphasis on Fatty Acid. *Marine Biology*. Volume 95: 31-36.
- Bold dan Wyne. 1985. *Introduction to The Algae Structure And Reproduction Pentice –Hall, Inc*. Englewood Cliff.
- Borowitzka dan Borowitzka. 1988. *Micro-algal Biotechnology*. New York: Cambridge University Press.
- Borowitzka, M. dan Lesley. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Byung-Hwan Um, Young-Soo Kim, Review: *A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology*, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, doi: 10.1016/j.jiec. 2008.08.002, 2009.

- Chouw Ck. 1992. *Fatty Acids in Food and Their Health Implications*. New York: Universty of Kentucky, Lexington, Kentucky.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biomass*, 25, pp. 294-306.
- Damianus, M. 2011. Aktivitas Ekstrak Mikroalga sebagai Inhibitor Helikase Virus Japanese Encephalitis. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Darmoyuwono, W. 2006. *Gaya Hidup Sehat dengan Virgin Coconut Oil*. Jakarta: Gramedia.
- Fardiaz S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT. Raja Grafindo Persada: Jakarta.
- 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.
- Fasya, A.G. 2013. Uji Bioaktivitas Ekstrak Metanol dan Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge. *Laporan Penelitian Penguatan Program Studi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fogg GE. 1975. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. London: The University of Wisconsin Press.
- Gan S dkk. 1980. *Farmakologi dan Terapi Edisi ke-2*. Jakarta: Farmakologi FKUI, Universitas Indonesia
- Gibson dan Roberfroid. 1995. Dietary Modulation of The Human Colonic Microbiota: Introducing The Concept of Prebiotics. *Journal of Nutrition*. Volume 125: 1401–1412.
- Gritter, R. J; J. M. Bobbit; dan A. E. Sbhwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi, Edisi kedua*, Penerjemah: Padmawinata K. Bandung: ITB.
- Guenther. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I*. Jakarta: UI Press.
- Harborne. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.

- Hidayati, N. 2009. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun The (*Camellia sinensis* L, v. *assamica*) Tua Hasil Ekstraksi Menggunakan Pelarut Akuades dan Etanol. *Skripsi* Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Houghton, P.J. dan A. Raman. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractination of Natural Extracts*. London: Chapman & Hall.
- Insani, D.N. 2012. Studi Esterifikasi Antara Asam Lemak Hasil Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Termobilisasi Pada Matriks Silika Gel 60. *Skripsi* Diterbitkan. Depok: Program Studi Kimia Universitas Indonesia.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Jawetz; Edward; Geo; Janet dan Nicholas. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi I. Edi Nugroho dan R., F., Maulana*. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Karsinah; Lucky; Suharti dan Mardiasuti. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Kawaroe dkk. 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- Kawaroe, M.; Ayi, R.; Abdul, H. 2012. Optimalisasi Seleksi Spesies Mikroalga Potensial Penghasil Minyak Mikroalga untuk Menunjang Kelayakan Ekonomi Produksi Biodiesel. *Prosiding InSINas*, Volume 0009: 8-11.
- Kawaroe, M.; Tri, P.; Ayi, R.; Dahlia, Y. 2012. Laju Pertumbuhan Spesifik dan Kandungan Asam Lemak pada Mikroalga *Spirulina platensis*, *Isochrysis sp.* dan *Porphyridium cruentum*. *Ilmu Kelautan*, Volume 17, Nomor 3: 125 – 131.
- Kellam, S. dan Walker, J. 1989. Antibacterial Activity from Marine Microalgae in Laboratory Culture. *Br. Phycol. J.* Volume 24: 191-194.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI-Press.
- Ketaren, S. 2008. *Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI-Press.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Terjemahan A. Saptorahardjo. Jakarta: UI Press.
- Kumar dan Singh. 1979. *A Text Book on Algae*. London: Macmilan and Co Ltd.
- Kusmiyati; Ni Wayan S. A. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. Volume 8, Nomor 1: 48-53.
- Kusnandar, F. 2011. *Kimia Pangan: Komponen Makro*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Lehninger. 1982. *Dasar-dasar Biokimia. Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Lohner K, Austria G. 2001. *Development of Novel Antimicrobial Agent: Emerging Strategies*. England: Horizon Scientific Press.
- Maulana, A. I. 2010. Pengaruh Ekstrak Tauge (*Phaseolus radiatus*) terhadap Kerusakan Sel Ginjal Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Mardigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. *Brock's Biology of Microorganisms*. Ed ke-10. New York: Prentice Hall.
- Makareviciene, V.; Andruleviciute, V.; Skorускаite, V. dan Kasperoviciene, J. 2011. Cultivation of Microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* as a Potential Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management*. Volume 57, Nomor 3: 21-27.
- Al Maraghi, A.M. 1992. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Merizawati. 2008. Analisis Sinar Merah, Hijau dan Biru (RGB) untuk Mengukur Kelimpahan Fitoplankton (*Chlorella sp.*). *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.
- Muhibah, S. R. N. 2013. Uji Golongan Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Merah *Eucheuma Cottonii* dari Petani Lobuk Madura. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Murhadi. 2009. Senyawa dan Aktivitas Antimikroba Golongan Asam Lemak dan Esternya dari Tanaman. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Volume 14, No. 1: 97-105.
- Myers. 1962. *Physiology and Biochemistry of Algae*. New York: Academic Press.
- Pandji, 1989. *Industria Mikrobial*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.

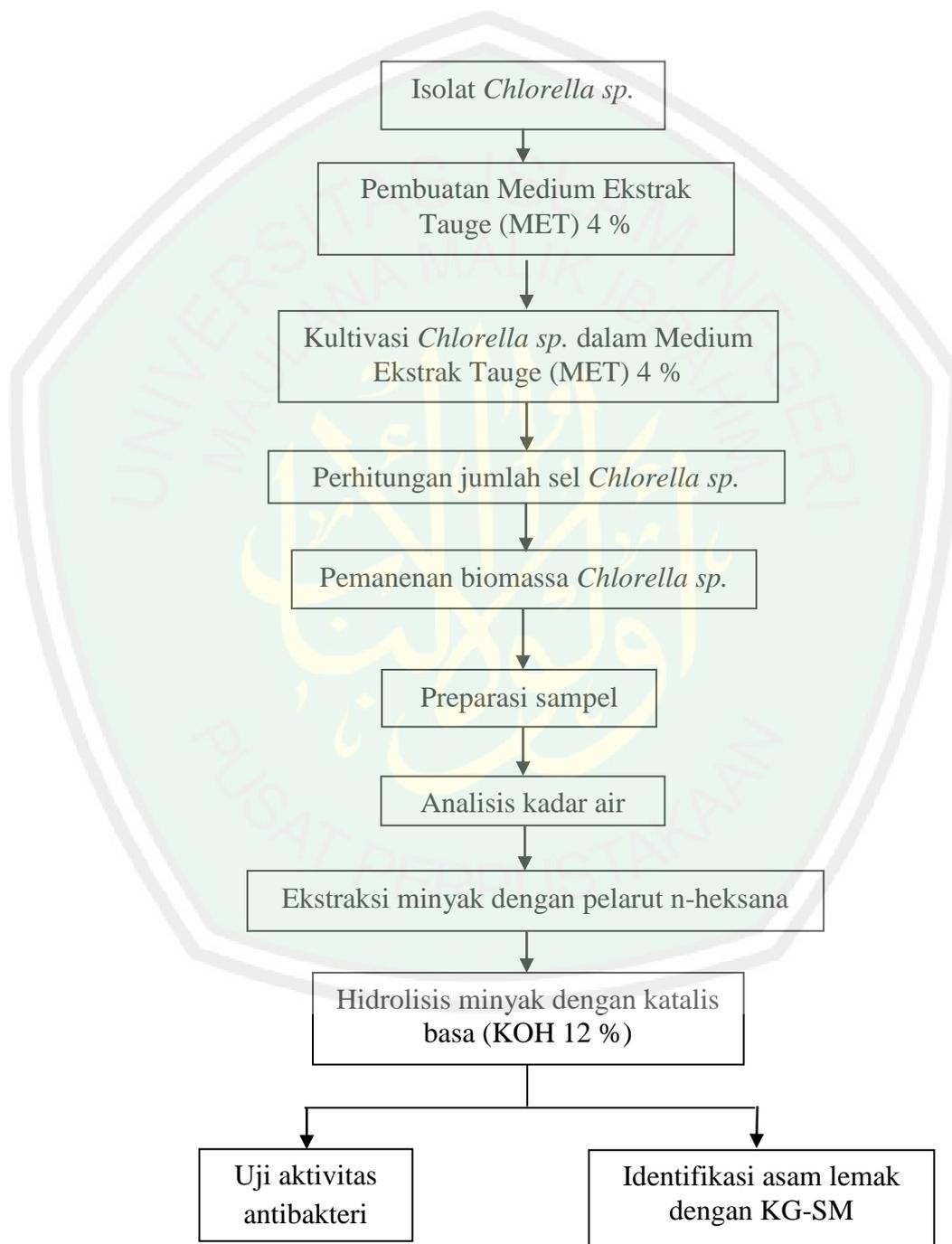
- Nair, M. K. M., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckey, L., Hoagland, T. A., dan Venkitanarayanan, K. S. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal Dairy Sci.* 88: 3488 – 3495.
- Nurfadilah. 2013. Uji Bioaktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Lamun dari Kepulauan Spermonde Kota Makassar. *Skripsi* Diterbitkan. Makassar: Jurusan Ilmu Kelautan Universitas Hasanuddin Makassar.
- Nuriyani. 2011. <http://nationalgeographic.co.id/forum/topic.php?id=1135>. (Diakses pada tanggal 15 September 2013).
- Pelczar dan Chan. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi, Alih Bahasa: Hadioetomo, R.S.* Jakarta: UI Press.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia.* Jakarta: UI Press.
- Prabowo, D. A. 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella sp.* pada Skala Laboratorium. *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pranayogi, D. 2003. Studi Potensi Pigmen Klorofil dan Karotenoid dari Mikroalga Jenis *Chlophyceae*. *Skripsi* Diterbitkan. Lampung: Universitas Lampung.
- Prartono, T.; Mujizat, K.; Dahlia W. S.; Dina A. 2010. Fatty Acid Content of Indonesian Aquatic Microalgae. *Hayati Journal of Biosciences*, Volume 17 Nomor 4: 196 – 200.
- 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.
- Prihantini, N.B., Damayanti, D. dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Jurnal Makara Sains* Volume 11, Nomor 1, Halaman 1 – 9.
- Puspita, M.D.A. 2009. Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Departemen Kimia Fakultas MIPA. IPB.
- Putri, A.L. 2013. Waspada Bakteri *E. Coli* pada Kolam Renang. <http://www.tempo.co/read/news/2013/05/18/061481295/Waspada-Bakteri-E-Coli-pada-Kolam-Renang/1/1>. (Diakses pada tanggal 15 September 2013).
- Qardhawi, Y. 1998. *Sunnah Rasul Sumber Ilmu Pengetahuan dan Peradaban.* Jakarta: Gema Insani Press.

- Qurthubi, S. I. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Rachmaniah, O.; Setyarini R. D.; Maulida, L. 2010. Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari *Chlorella sp.* dan Prediksinya sebagai Biodiesel. *Seminar Teknik Kimia Soehadi Reksowardojo*.
- Ranganna, S. 1979. *Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products*. New York: Tata Mc. Graw Hill Publ. Co., Limited.
- Renaud, S. M.; Parry, D. I. dan Thinh, L. V. 1994. Microalgae for Use in Tropical Aquaculture I: Gross Chemical and Fatty Acid Composition of Twelve of Microalgae from The Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology*. Volume 6: 337-345.
- Rostini, I. 2007. *Kultur Fitoplankton (Chlorella sp. dan Tetraselmis chuii) pada Skala Laboratorium*. Jatinangor: Universitas Padjajaran.
- Roth, H. J. dan Blaschke, G. 1988. *Analisis Farmasi*, Penerjemah: Kisman R dan Ibrahim S. Yogyakarta: UGM Press.
- Ryan, K.J., J.J. Champoux, S. Falkow, J.J. Plonde, W.L. Drew, F.C. Neidhardt, and C.G. Roy. 1994. *Medical Microbiology An Introduction to Infectious Diseases*. 3rd ed. Connecticut: Appleton & Lange.
- Saadudin, E.; Fitri, S. dan Wargadalam, V. 2011. Karakteristik Asam Lemak Mikroalga untuk Produksi Biodiesel. *Ketenagalistrikan dan Energi Terbarukan*. Volume 10, Nomor 2: 131-140.
- Salle. 1961. *Fundamental Principle of Bacteriologi 5th Edition*, MC Graw Hill Book Company Inc. New York, 414-418: 719-739.
- Setyaningsih, I.; Desniar dan Evi P. 2012. Antimikroba dari *Chaetoceros gracilis* yang Dikultivasi dengan Lama Penyinaran Berbeda. *Jurnal Akuatika*. Volume 3, Nomor 2: 180-189.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sobari, R.; A.B. Susanto; Dwi, S.; Delicia, Y. 2013. Kandungan Lipid Beberapa Jenis Sianobakteria Laut Sebagai Bahan Sumber Penghasil Biodiesel. *Journal of Marine Research*. Volume 2, Nomor 1: 112 – 119.
- Sriwardani, T. 2000. Pemisahan Ekstrak Intraseluler dari Mikroalga *Chlorella sp.* dan Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum Terhadap Bakteri dan Kapang Patogen. *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Steenblock. 1996. *Chlorella Makanan Sehat Alami*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

- Sukoso. 2002. *Peranan Bioteknologi Molekuler dalam Pembangunan Bidang Perikanan dan Kelautan Indonesia*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Schunack W, Mayer K, Haake M. 1990. *Senyawa Obat*. Wattimena JR, Subino, penerjemah; Yogyakarta: UGM Press.
- Tambun, R. 2006. *Buku Ajar Teknologi Oleokimia (TKK – 322)*. Textbook. Medan: Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Sumatera Utara.
- Taw, Nyan. 1990. Petunjuk Pemeliharaan Kultur Murni dan Massal Mikroalga. *Proyek Pengembangan Budidaya Udang: United Nations Development Programme Food dan Agriculture Organization of The United Nations*. US. (diterjemahkan oleh Budiono M dan Indah W).
- Volesky, G. 1970. *Algal Product*. New Delhi: In Properties of Algal (Ed) Penum Press.
- Volk. W.A dan M.F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar, Alih Bahasa: Markham*. Jakarta: PT. Glora Aksara Pratama.
- Waluyo. 2004. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wati, A. dan Motto. S. A. _____. *Ekstraksi Minyak dari Mikroalga Jenis Chlorella sp. Berbantuan Ultrasonik*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Wattimena JR dkk. 1991. *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*. Yogyakarta: UGM Press.
- Winarno; Fardias dan Fardias. 1973. *Ekstraksi, Kromatografi dan Elektroforesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Winarno, F. G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wulandari, A. P.; Naderia, F.; Pattalia, A. E. dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalga 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.
- Yudha, A. P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

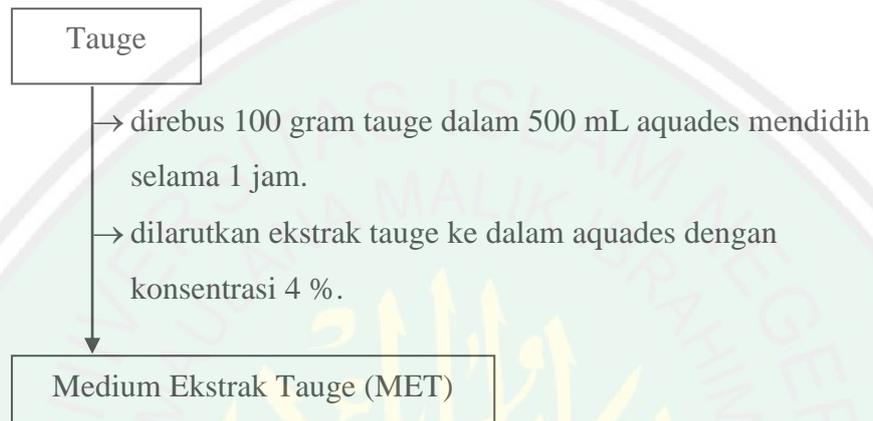
Lampiran 1. Tahapan Penelitian



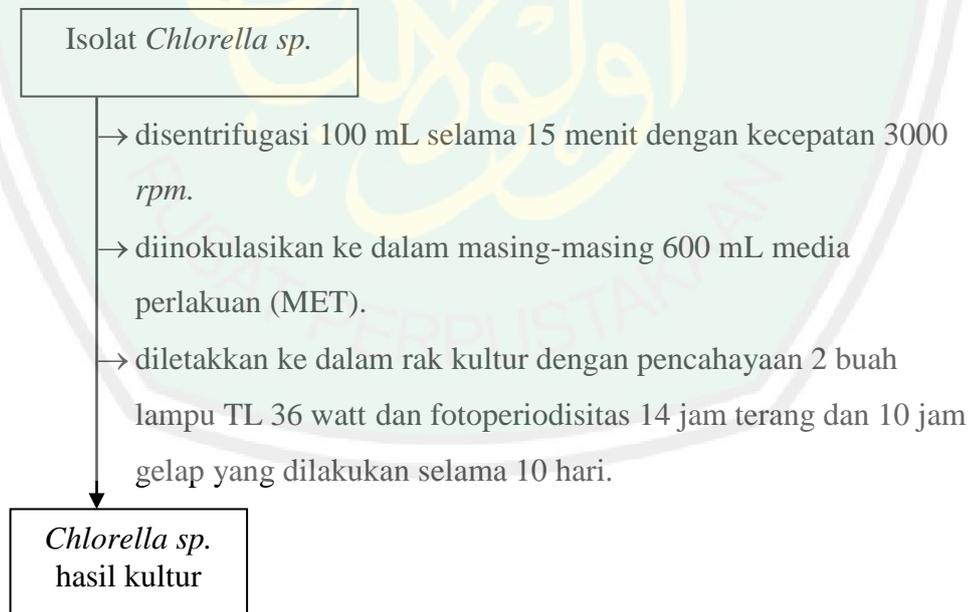
Lampiran 2. Skema Kerja

1. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

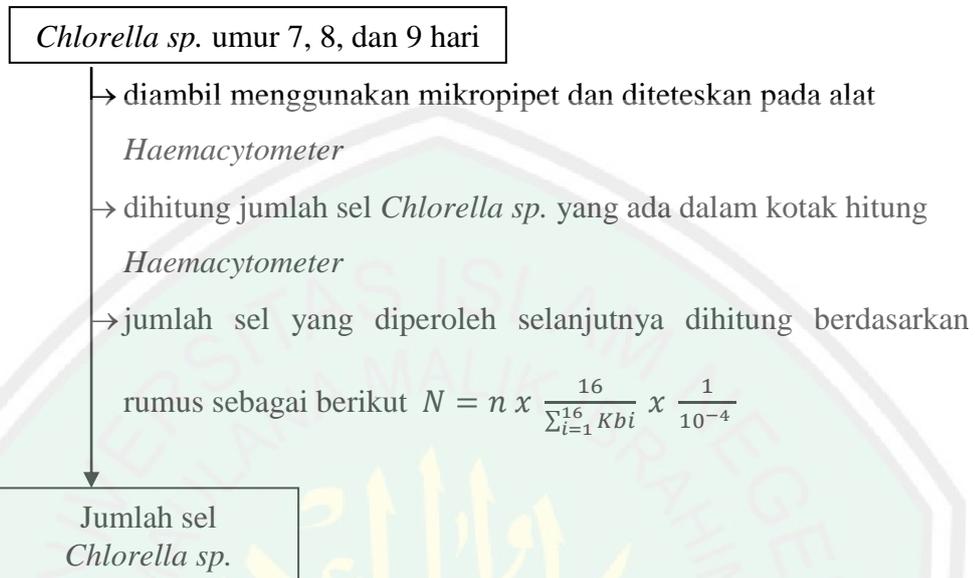
a. Pembuatan Medium Ekstraksi Tauge (MET)



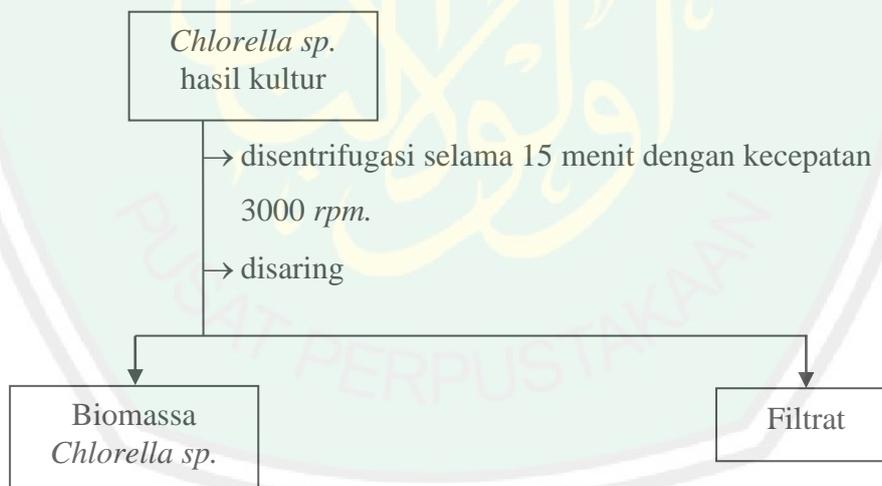
b. Kultivasi *Chlorella sp.* pada MET



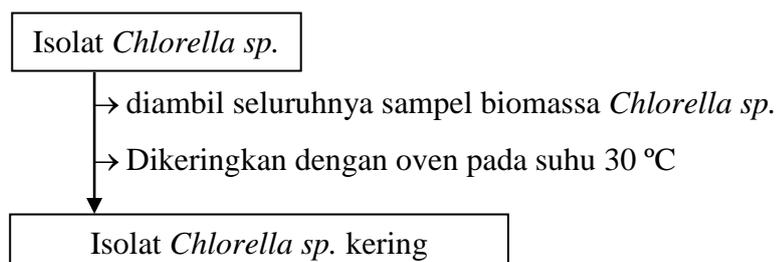
c. Perhitungan Jumlah Sel *Chlorella sp.*



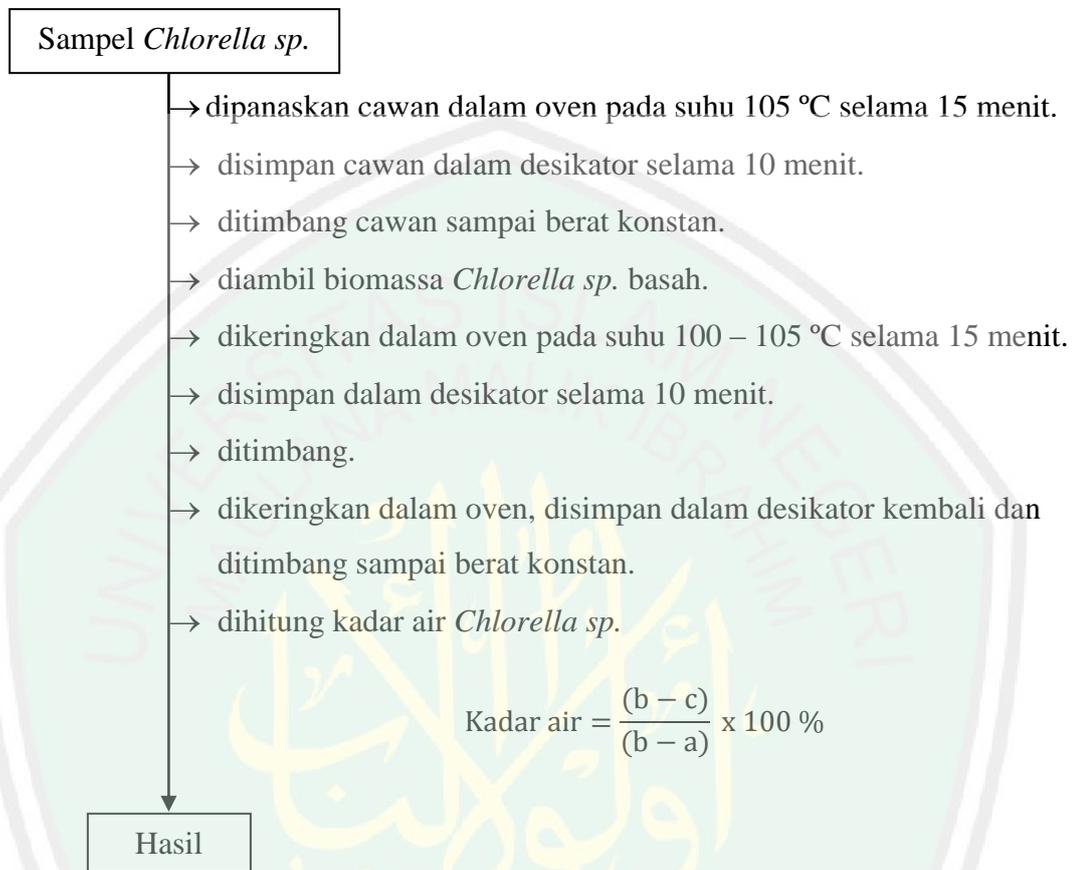
d. Pemanenan *Chlorella sp.*



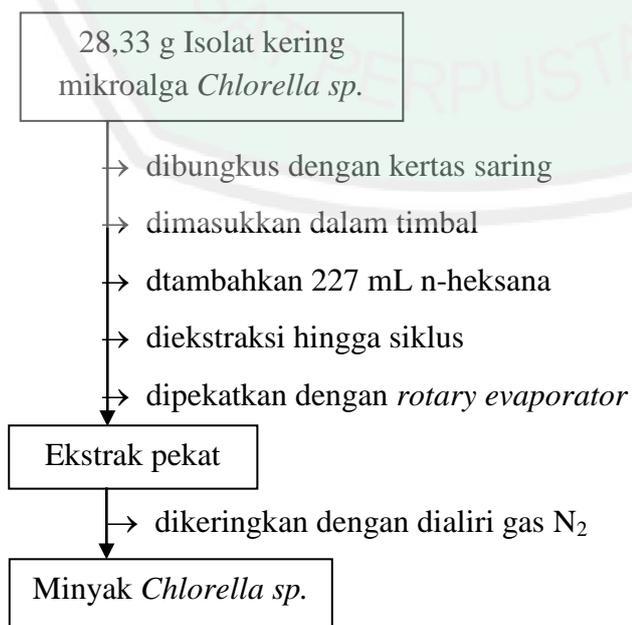
2. Preparasi Sampel



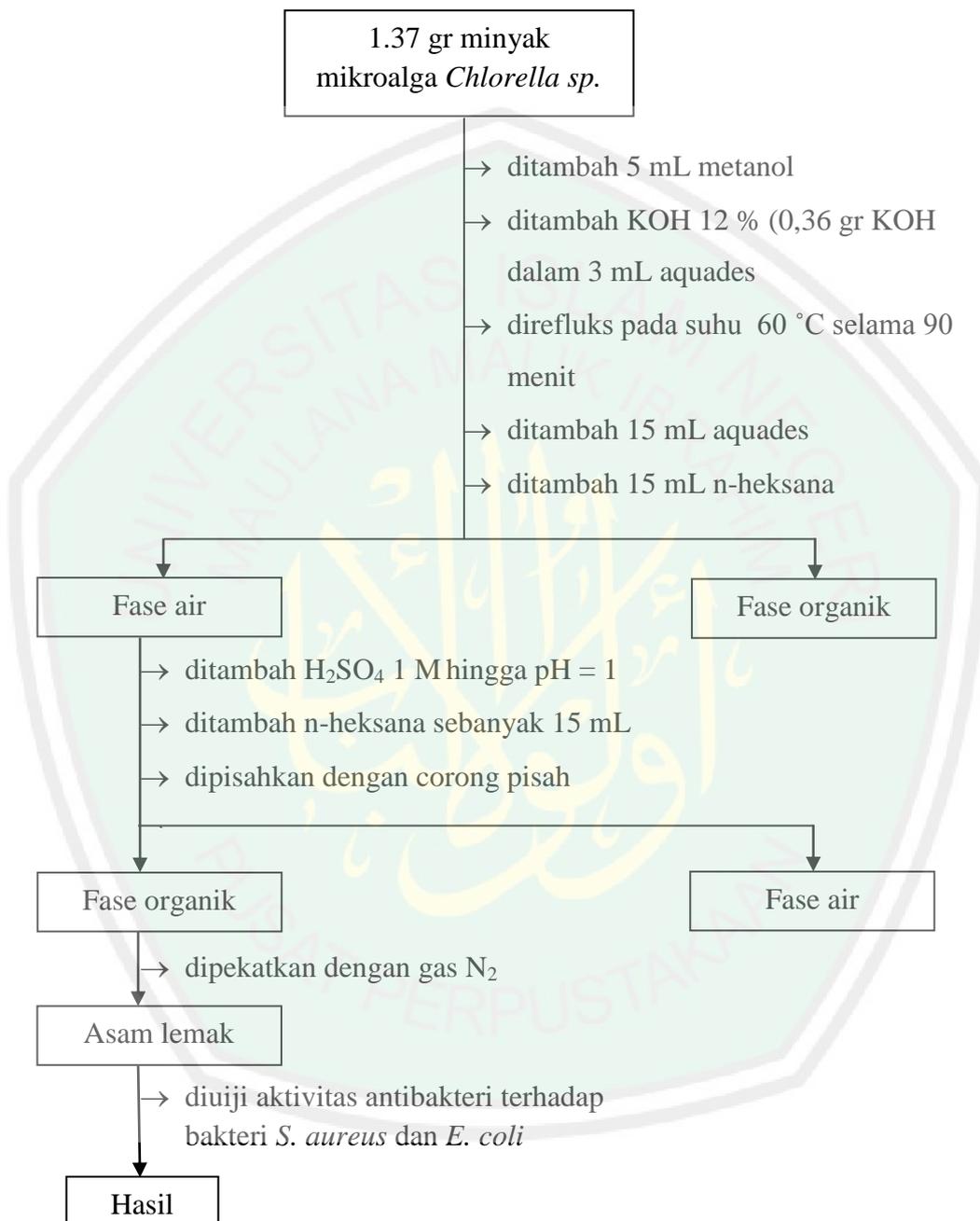
3. Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*



4. Ekstraksi Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

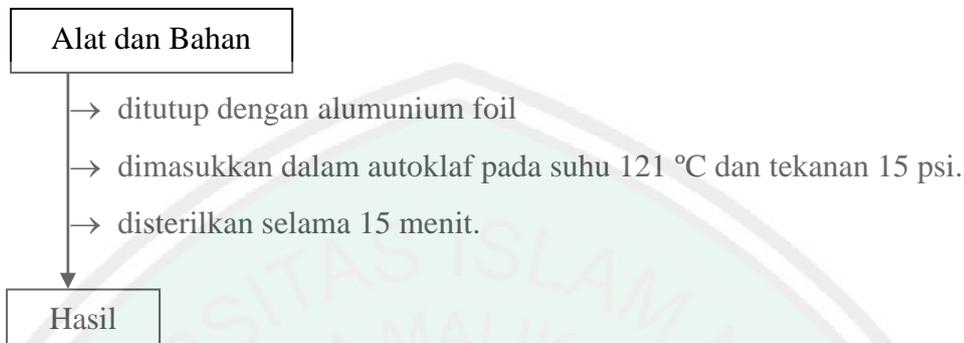


5. Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*

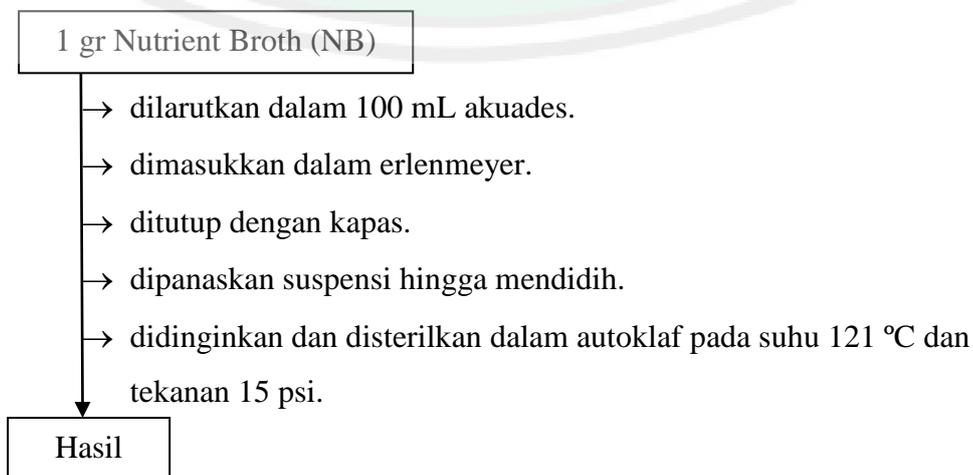
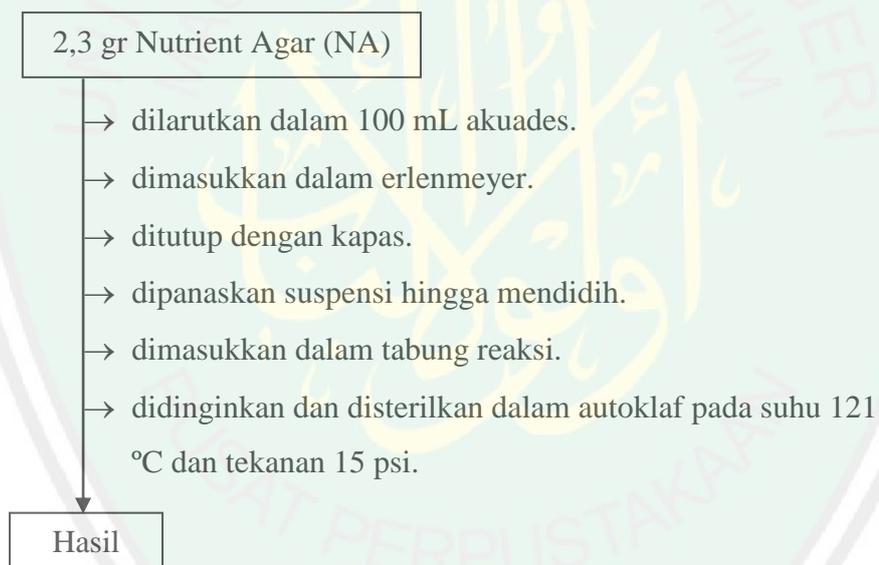


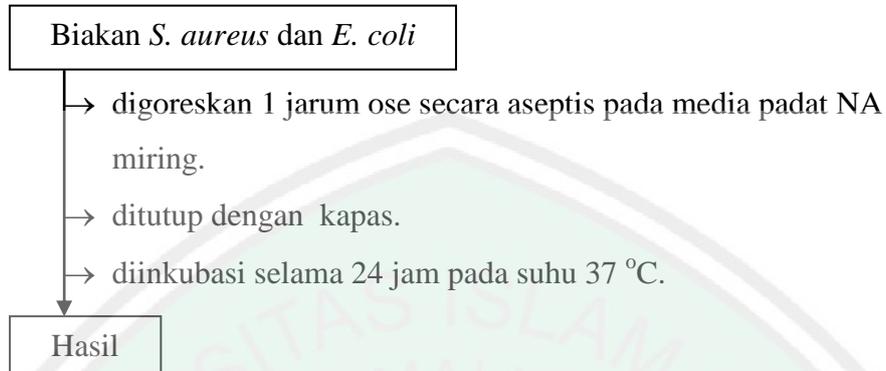
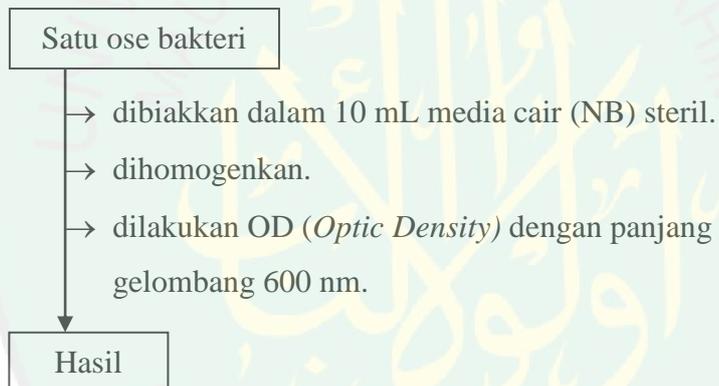
6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan



b. Pembuatan Media Agar



c. Peremajaan Bakteri *S. aureus* dan *E. coli***d. Pembuatan Larutan Biakan Murni Bakteri *S. aureus* dan *E. coli***

e. Uji Aktivitas Antibakteri

0,1 mL larutan biakan aktif bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

- ditambahkan dalam media padat yang telah didinginkan dalam cawan petri.
- dihomogenkan.
- dibiarkan hingga memadat.
- diresapkan kertas cakram dalam masing-masing ekstrak *Chlorella sp.* dan kontrol.
- diletakkan kertas cakram di atas permukaan media bakteri menggunakan pinset dan ditekan sedikit.
- diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.
- diukur diameter zona hambat menggunakan penggaris.

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Kelimpahan Sel *Chlorella sp.* Hari 7, 8, dan 9

Jumlah sel yang diperoleh selanjutnya dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Eaton, dkk., 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	$(266 + 262 + 264 + 276) \times \frac{16}{4} \times \frac{1}{10^{-4}} = 4.272 \times 10^4$	42.720.000
Hari ke 8	$(300 + 295 + 299 + 310) \times \frac{16}{4} \times \frac{1}{10^{-4}} = 4.816 \times 10^4$	48.160.000
Hari ke 9	$(304 + 303 + 307 + 302) \times \frac{16}{4} \times \frac{1}{10^{-4}} = 4.864 \times 10^4$	48.640.000

Lampiran 4. Perhitungan Kadar Air

- **Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.* Sampel Setelah Dioven**

$$\text{Berat konstan cawan kosong (a)} = 58,1524 \text{ g}$$

$$\text{Berat cawan + sampel sebelum dikeringkan (b)} = 59,1524 \text{ g}$$

$$\text{Berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan (c)} = 59,0635 \text{ g}$$

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

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{59,1524 \text{ gram} - 59,0635 \text{ gram}}{59,1524 \text{ gram} - 58,1524 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0889 \text{ gram}}{1 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 8,89 \%$$

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

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 - 8,89}$$

$$= 1,09 \%$$

$$\text{Kadar Air Terkoreksi} = 8,89 \% - 1,09 \%$$

$$= 7,80 \%$$

Lampiran 5. Perhitungan Rendemen Ekstrak

- **Rendemen Minyak**

Berat awal sampel = 28,33 g

Berat ekstrak = 1,78 g

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen Minyak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Awal Sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,78 \text{ g}}{28,33 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 6,28 \%\end{aligned}$$

- **Rendemen Asam Lemak**

Berat awal sampel = 1,38 g

Berat ekstrak = 0,96 g

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen Asam Lemak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Awal Sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,96 \text{ g}}{1,38 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 69,57 \%\end{aligned}$$

Lampiran 6. Perhitungan dan Pembuatan Reagen Larutan Ekstrak

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

1. Pembuatan KOH 12 %

$$\text{Sampel minyak} = 1,38 \text{ g}$$

$$\text{Mol trigliseril linoleat} = \frac{1,38 \text{ g}}{840 \text{ g/mol}} = 0,001642 \text{ mol}$$

- Mol KOH yang dibutuhkan untuk tepat bereaksi

$$\begin{aligned} \text{Mol KOH} &= 3 \times 0,001642 \text{ mol} \\ &= 0,004926 \text{ mol} \end{aligned}$$

- KOH dibuat berlebih 1,25 x

$$\begin{aligned} \text{Mol KOH} &= 1,25 \times 0,004926 \text{ mol} \\ &= 0,006158 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa KOH} &= 0,006158 \text{ mol} \times 55,97 \text{ g/mol} \\ &= 0,3446 \approx 0,34 \text{ g} \end{aligned}$$

- 12 % KOH

$$\frac{12}{100} = \frac{0,34}{x}$$

$$12x = 34$$

$$x = 2,8 \text{ mL} \approx 3 \text{ mL aquades}$$

Cara pembuatan larutan KOH 12 % adalah ditimbang KOH sebanyak 0,34 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker 25 mL. Selanjutnya dipipet 3 mL aquades dengan pipet ukur 5 mL kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker yang berisi KOH. Diaduk hingga KOH larut sempurna dalam aquades.

2. Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1M

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

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

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

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

$$= 1,764 \text{ Kg}$$

$$= 1.764 \text{ g}$$

$$\text{Mol H}_2\text{SO}_4 = \frac{g \text{ H}_2\text{SO}_4}{mr \text{ H}_2\text{SO}_4}$$

$$= \frac{1.764 \text{ g}}{98 \text{ g/mol}}$$

$$= 18 \text{ mol}$$

$$\text{M H}_2\text{SO}_4 = \frac{\text{mol}}{V}$$

$$= \frac{18 \text{ mol}}{1 \text{ L}}$$

$$= 18 \text{ M}$$

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

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

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

$$= 27 \text{ mL}$$

Cara pembuatan larutan H₂SO₄ 1 M adalah dipipet larutan H₂SO₄ pekat 98 % Sebanyak 27 mL. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 500 mL yang berisi ± 250 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

3. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak (% b/v)

- Larutan stok :

$$2,5 \%$$

$$2,5 \text{ g} / 100 \text{ mL} = X / 10 \text{ mL}$$

$$100 X = 25 \text{ g}$$

$$X = 25 / 100$$

$$= 0,25 \text{ g}$$

Jadi 0,25 g ekstrak dilarutkan sampai volume 10 mL.

- Konsentrasi 2 %

Diketahui: $M_1 = 2,5 \%$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

$$M_2 = 2 \%$$

Ditanya: V_1?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$2,5 V_1 = 2 \times 5$$

$$V_1 = 10/2,5$$

$$= 4 \text{ mL}$$

Jadi 4 mL larutan stok 2,5 % dilarutkan sampai volume 10 mL.

- Konsentrasi 1,5 %

Diketahui: $M_1 = 2 \%$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

$$M_2 = 1,5 \%$$

Ditanya: V_1?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$2 V_1 = 1,5 \times 5$$

$$V_1 = 7,5/2$$

$$= 3,75 \text{ mL}$$

Jadi 3,75 mL larutan 2 % dilarutkan sampai volume 5 mL.

- Konsentrasi 1 %

Diketahui: $M_1 = 1,5 \%$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

$$M_2 = 1 \%$$

Ditanya: V_1?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$1,5 V_1 = 1 \times 5$$

$$V_1 = 5/1,5$$

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

Jadi 3,33 mL larutan 1,5 % dilarutkan sampai volume 5 mL.

- Konsentrasi 0,5 %

Diketahui: $M_1 = 1 \%$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

$$M_2 = 0,5 \%$$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$1 V_1 = 0,5 \times 5$$

$$V_1 = 2,5/1$$

$$= 2,5 \text{ mL}$$

Jadi 2,5 mL larutan 1 % dilarutkan sampai volume 5 mL.

- Kontrol Positif *E. coli*

Streptomisin 0,6 %

$$0,6 \text{ g}/100 \text{ mL} = X/5 \text{ mL}$$

$$100 X = 3 \text{ g}$$

$$X = 3/100$$

$$= 0,03 \text{ g}$$

Jadi 0,03 g streptomisin dilarutkan dalam aquades sampai volume 5 mL.

- Kontrol Positif *S. aureus*

Penisilin 2,5 %

$$2,5 \text{ g}/100 \text{ mL} = X/5 \text{ mL}$$

$$100 X = 12,5 \text{ g}$$

$$X = 12,5/100$$

$$= 0,125 \text{ g}$$

Jadi 0,125 g penisilin dilarutkan dalam aquades sampai volume 5 mL.

4. 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.

Lampiran 7. Data Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas Antibakteri Asam Lemak *Chlorella sp.*

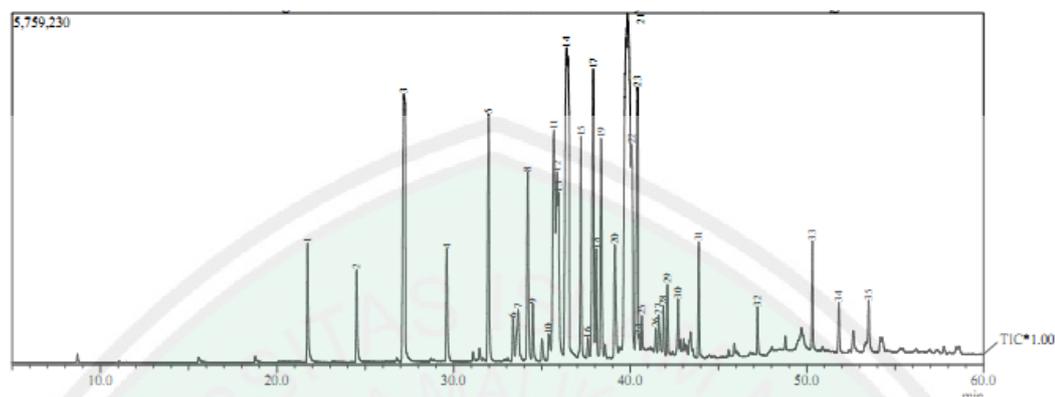
1. Bakteri *E. coli*

Minyak <i>Chlorella sp.</i>	Zona Hambat (mm)			Rata-rata
	<i>S. aureus</i>			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
0,5 %	0	0	0	0
1,0 %	0	0	0	0
1,5 %	0	0	0	0
2,0 %	0	0	0	0
2,5 %	0	0	0	0

2. Bakteri *S. aureus*

Asam Lemak <i>Chlorella sp.</i>	Zona Hambat (mm)			Rata-rata
	<i>S. aureus</i>			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
0,5 %	1,0	3,0	1,5	1,8
1,0 %	1,5	2,0	2,2	1,9
1,5 %	3,0	2,5	4,0	3,2
2,0 %	3,0	2,5	5,0	3,5
2,5 %	2,5	3,5	3,0	3,0

Lampiran 8. Kromatogram Kromatografi Gas Asam Lemak *Chlorella sp.*



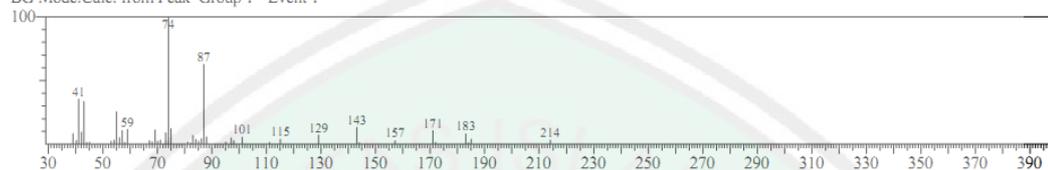
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Name
1	21.734	21.642	21.892	8597152	1.52	1911897	
2	24.507	24.417	24.658	6811062	1.21	1487097	
3	27.185	27.025	27.333	41987225	7.43	4309692	
4	29.611	29.508	29.783	9409881	1.67	1826486	
5	31.980	31.842	32.142	23091499	4.09	4025951	
6	33.361	33.275	33.475	3760650	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 9. Spektra SM Asam Lemak *Chlorella sp.*

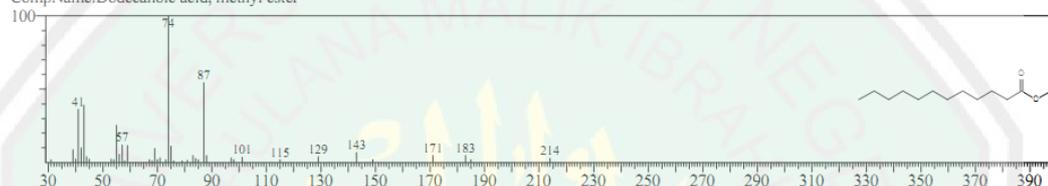
1. Asam Dodekanoat (Asam Laurat)

<< Target >>

Line#:3 R.Time:27.183(Scan#:2879) MassPeaks:46
RawMode:Averaged 27.175-27.192(2878-2880) BasePeak:74.00(846001)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



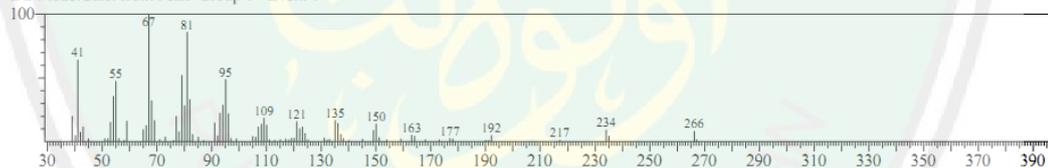
Hit#:1 Entry:8113 Library:NIST12.LIB
SI:94 Formula:C13H26O2 CAS:111-82-0 MolWeight:214 RetIndex:0
CompName:Dodecanoic acid, methyl ester



2. Asam 7,10-heksadekadienoat

<< Target >>

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



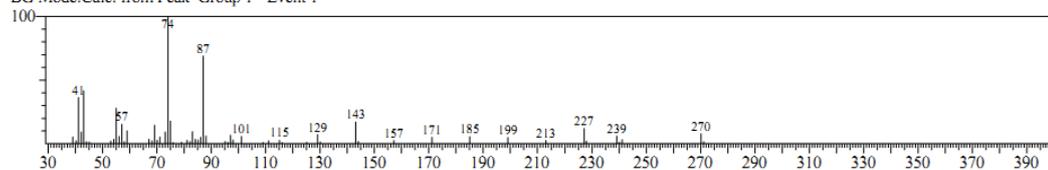
Hit#:1 Entry:121635 Library:WILEY229.LIB
SI:90 Formula:C17H30O2 CAS:16106-03-9 MolWeight:266 RetIndex:0
CompName:7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL 7,10-HEXADECADIENOATE SS



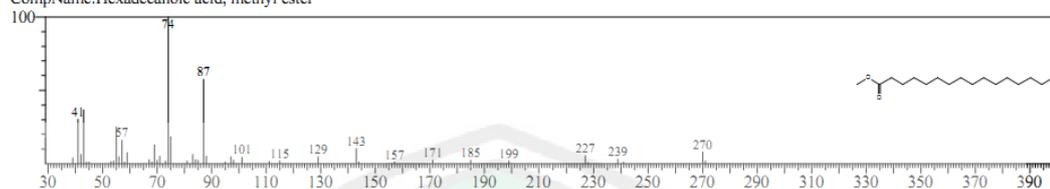
3. Asam Heksadekanoat (Asam Palmitat)

<< Target >>

Line#:14 R.Time:36.400(Scan#:3985) MassPeaks:58
RawMode:Averaged 36.392-36.408(3984-3986) BasePeak:74.00(848445)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



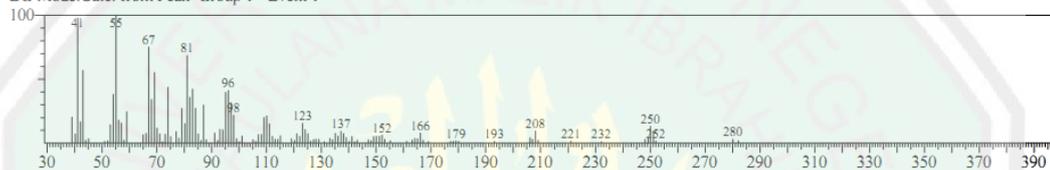
Hit#:2 Entry:9769 Library:NIST12.LIB
 SI:94 Formula:C17H34O2 CAS:112-39-0 MolWeight:270 RetIndex:0
 CompName:Hexadecanoic acid, methyl ester



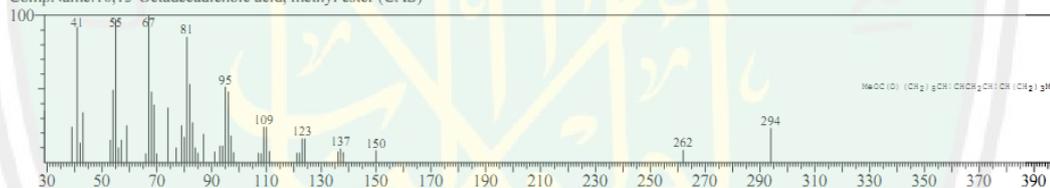
4. Asam 10,13-oktadekadienoat

<< Target >>

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



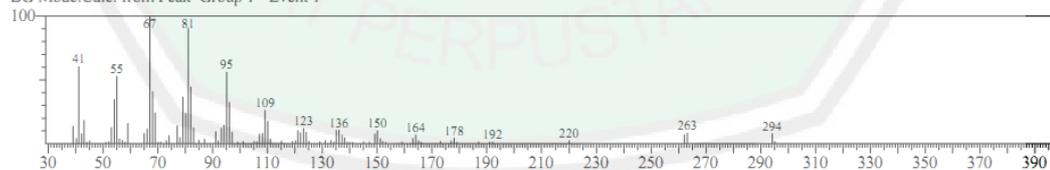
Hit#:1 Entry:141523 Library:WILEY229.LIB
 SI:89 Formula:C19H34O2 CAS:56554-62-2 MolWeight:294 RetIndex:0
 CompName:10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester (CAS)



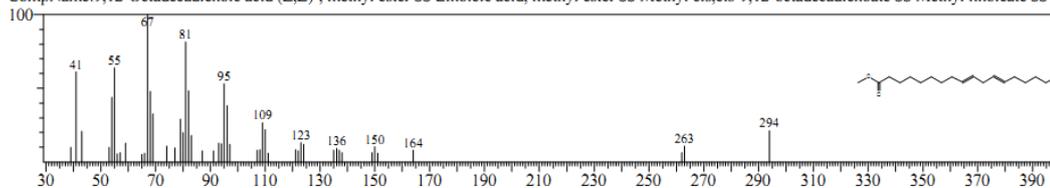
5. Asam 9,12-oktadekanoat (Asam Linoleat)

<< Target >>

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

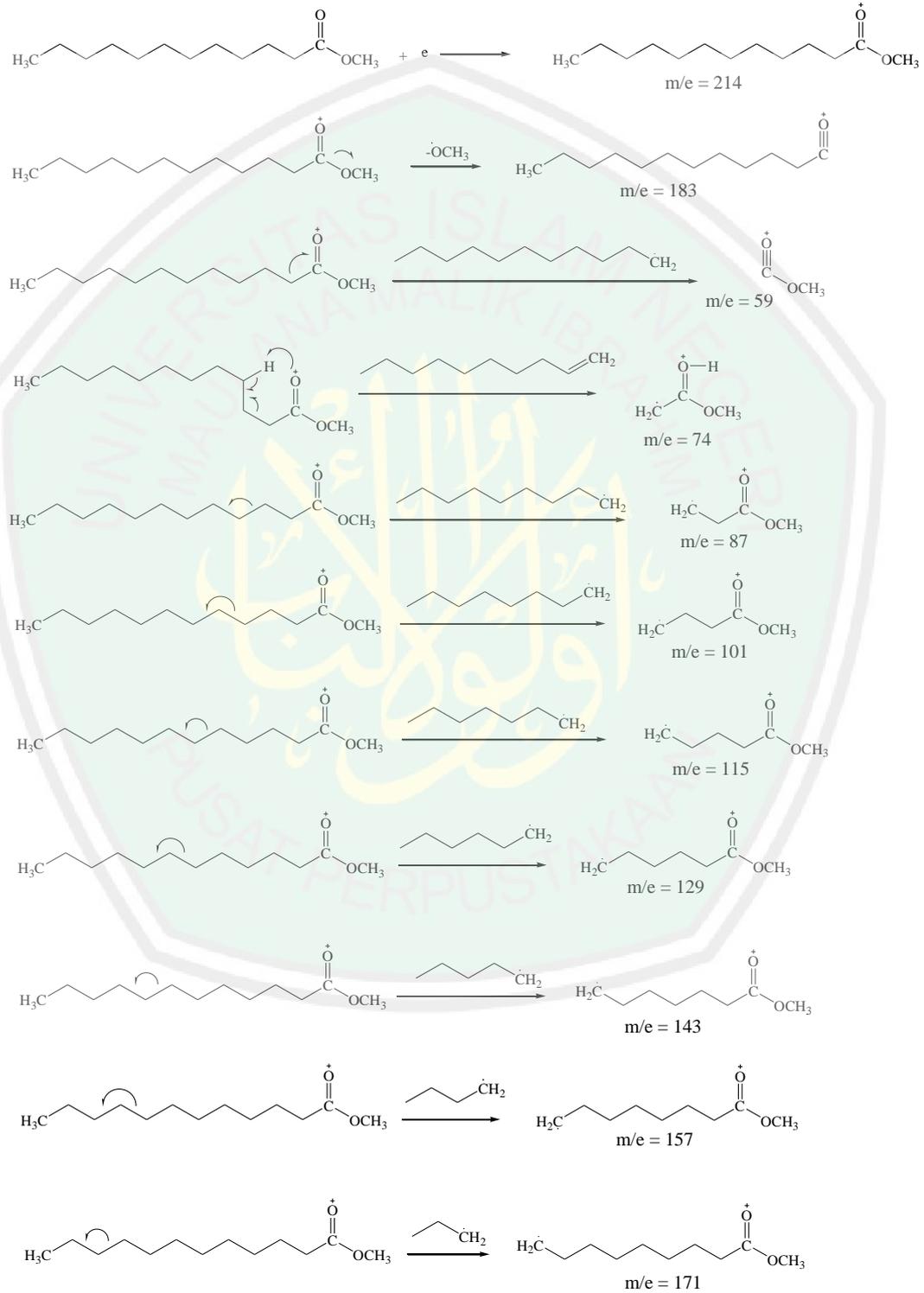


Hit#:1 Entry:41849 Library:NIST62.LIB
 SI:94 Formula:C19H34O2 CAS:112-63-0 MolWeight:294 RetIndex:0
 CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester SS Linoleic acid, methyl ester SS Methyl cis,cis-9,12-octadecadienoate SS Methyl linoleate SS N



Lampiran 10. Perkiraan Pola Fragmentasi

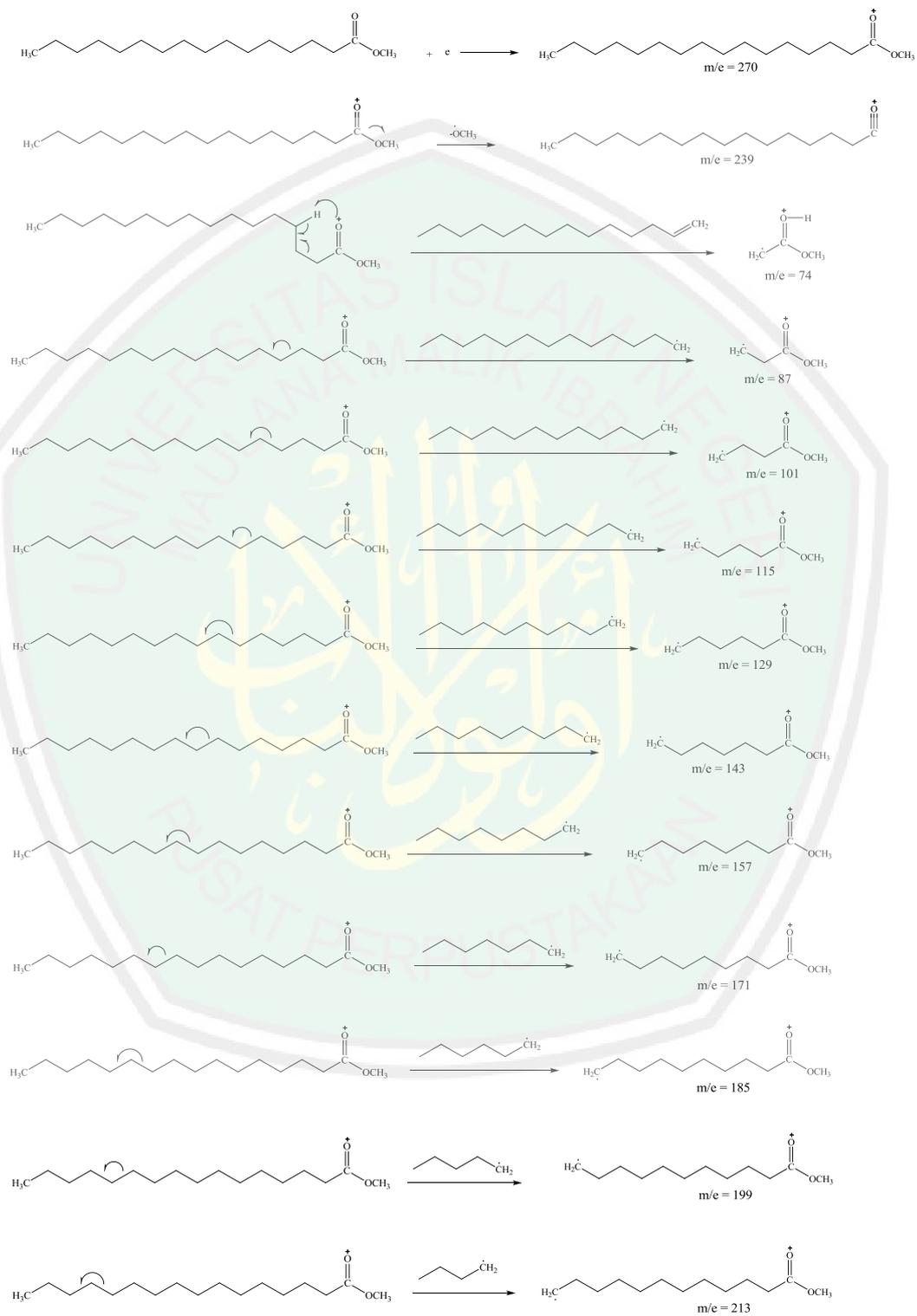
1. Asam Dodekanoat (Asam Laurat)

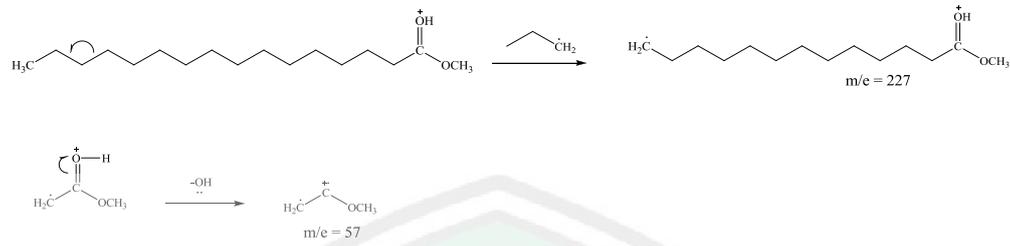


2. Asam 7,10-heksadekadienoat

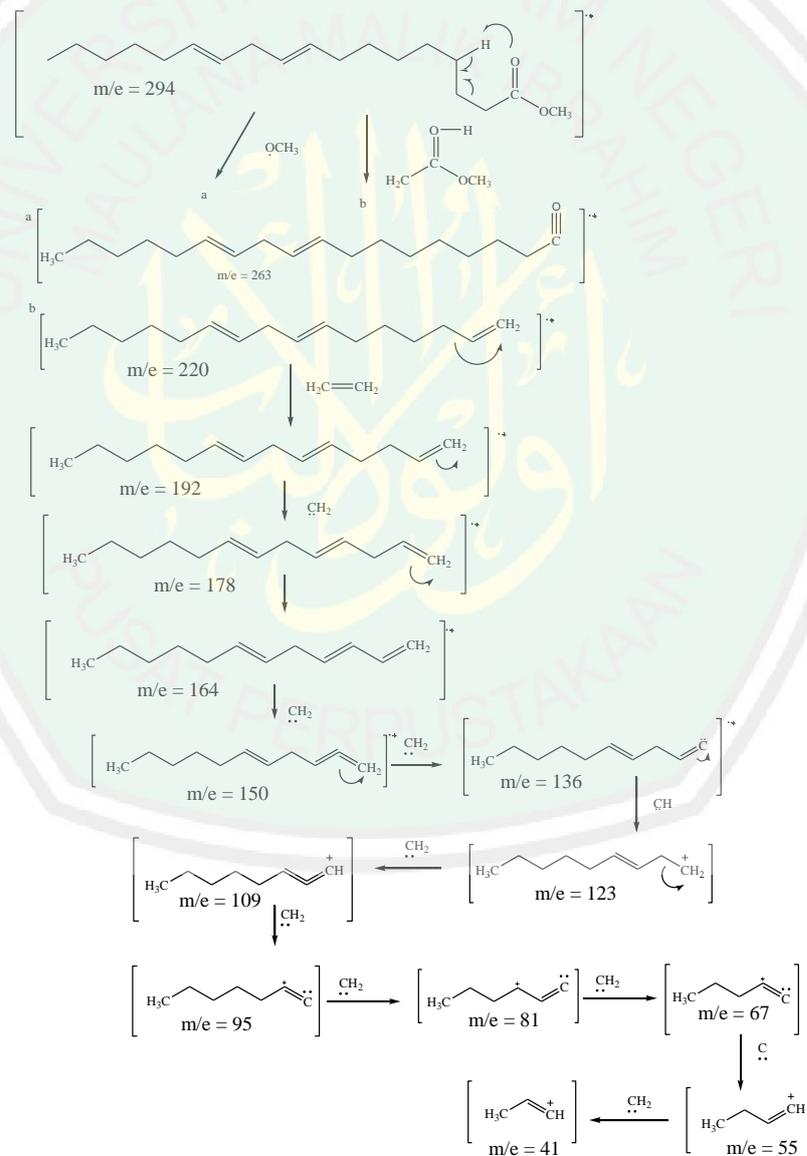


3. Asam Heksadekanoat (Asam Palmitat)





4. Asam 9,12-oktadekanoat (Asam Linoleat)



Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian

1. Kultivasi *Chlorella sp.*

1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)



Gambar 1. Medium Ekstrak Tauge



Gambar 2. MET 4 %

1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET



Gambar 3. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



Gambar 4. Hari ke-0



Gambar 5. Hari ke-1



Gambar 6. Hari ke-2



Gambar 7. Hari ke-3



Gambar 8. Hari ke-4



Gambar 9. Hari ke-5



Gambar 10. Hari ke-6



Gambar 11. Hari ke-7



Gambar 12. Hari ke-8



Gambar 13. Hari ke-9



Gambar 14. Hari ke-10

1.3 Pemanenan *Chlorella* sp.



Gambar 15. *Chlorella* sp. sebelum disentrifugasi



Gambar 16. Pemisahan *Chlorella* sp. dengan sentifuse



Gambar 17. Pengambilan biomassa *Chlorella* sp.

2. Preparasi Sampel



Gambar 18. Biomassa basah *Chlorella* sp.



Gambar 19. Biomassa kering *Chlorella* sp.

3. Analisis Kadar Air *Chlorella sp.* Kering



Gambar 20. Pengovenan *Chlorella sp.*

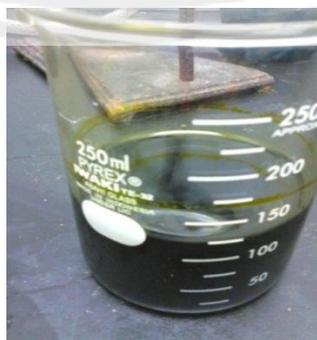


Gambar 21. *Chlorella sp.* kering dalam desikator

4. Ekstraksi Soxhletasi Biomassa *Chlorella sp.*



Gambar 22. Proses ekstraksi Soxhlet dengan pelarut n-heksana



Gambar 23. Filtrat hasil ekstraksi Soxlet dengan n-heksana



Gambar 24. Ekstrak pekat hasil ekstraksi Soxlet dengan n-heksana

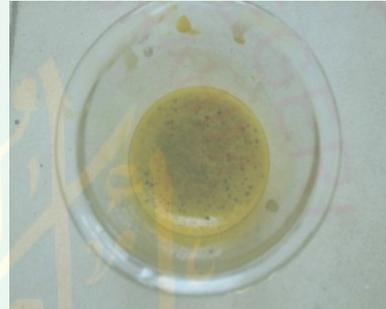
5. Hidrolisis Minyak *Chlorella sp.*



Gambar 25. Proses refluks minyak *Chlorella sp.*



Gambar 26. Pemisahan garam



Gambar 27. Busa garam kalium



Gambar 28. Kertas pH setelah penambahan H_2SO_4

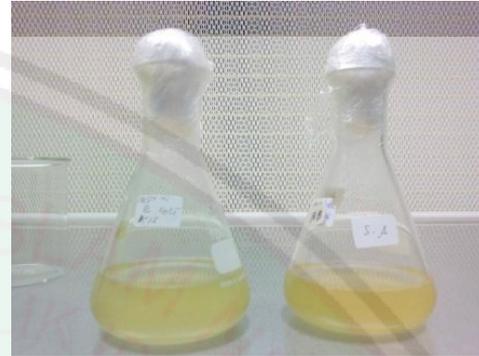


Gambar 29. pemisahan asam lemak

6. Uji Aktivitas Antibakteri



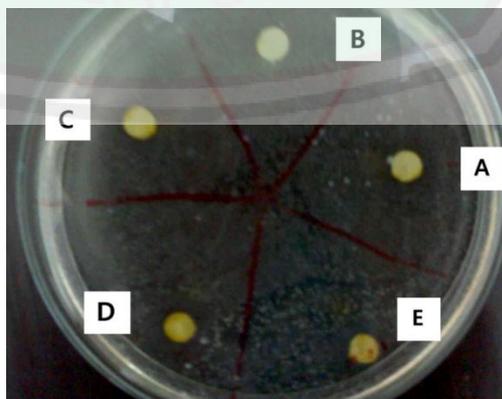
Gambar 30. Asam Lemak berbagai konsentrasi



Gambar 31. Inokulum bakteri *E. coli* dan *S. aureus*



Gambar 32. Biakan aktif bakteri *E. coli* dan *S. aureus*



Gambar 33. Zona hambat pada bakteri *S. aureus*

Keterangan: A. konsentrasi 0,5 %, B. konsentrasi 1 %, C. konsentrasi 1,5 %, D. konsentrasi 2,5 %, E. konsentrasi 2,5 %.