



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI KOMPARASI TEKNIK PEMECAHAN DINDING SEL
PADA EKSTRAKSI LIPID MIKROALGA *Chlorella vulgaris*
*Buitenzorg***

SKRIPSI

CYNTHIA HERDIANA

0706269666

FAKULTAS TEKNIK

PROGRAM SARJANA

DEPOK

JANUARI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI KOMPARASI TEKNIK PEMECAHAN DINDING SEL
PADA EKSTRAKSI LIPID MIKROALGA *Chlorella vulgaris*
*Buitenzorg***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

CYNTHIA HERDIANA

0706269666

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JANUARI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Cynthia Herdiana

NPM : 0706269666

Tanda Tangan :

Tanggal : 29 Desember 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Cynthia Herdiana
NPM : 0706269666
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : STUDI KOMPARASI TEKNIK PEMECAHAN
DINDING SEL PADA EKSTRAKSI LIPID MIKROALGA *Chlorella vulgaris*
Buitenzorg

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima
sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik,
Universitas Indonesia**

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Ir. Dianursanti, M.T. ()
Penguji : Ir. Tania Surya Utami, M.T. ()
Penguji : Ir. Rita Arbianti, M.Si ()
Penguji : Dr. Eny Kusriani ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 4 Januari 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “STUDI KOMPARASI TEKNIK PEMECAHAN DINDING SEL PADA EKSTRAKSI LIPID MIKROALGA *Chlorella vulgaris* Buitenzorg”. Penulisan makalah skripsi ini ditujukan untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis dalam meraih gelar Sarjana Teknik di Departemen Teknik Kimia FTUI.

Di dalam makalah skripsi ini penulis akan membandingkan berbagai metode pemecahan dinding sel dalam ekstraksi lipid mikroalga untuk mendapatkan kondisi yang optimal sehingga didapatkan jumlah lipid secara maksimal.

Penulis mengucapkan kepada terima kasih kepada:

1. Tuhan Yesus Kristus, Juruselamat dan teladan yang telah memberikan hikmat dan motivasi untuk tidak menyerah dan terus bertahan dalam segala kondisi
2. Ibu Dianursanti, selaku dosen pembimbing, atas segala instruksi, arahan dan dukungannya secara penuh, mulai dari seminar, proses penelitian hingga akhir
3. Para penguji (Bu Nana, Bu Rita dan Bu Eny) atas segala masukan, kritik dan saran yang diberikan dalam proses persidangan
4. Bapak Yuliusman, selaku Pembimbing Akademis dan Koordinator Mata Kuliah Spesial, atas segala instruksi, masukan dan dukungannya selama proses perkuliahan
5. Orang tua dan adik penulis yang telah memberikan dukungan moril dan materil dalam pembuatan skripsi ini
6. Sahabat dan orang terdekat penulis (Angela Jessica Stephanie, Erica Sanjaya, Valentina, David Karunia, Kevin Wiranata, Hendro, Rudy Wijaya, Humala Paulus Halim, dan Daniel Wijaya) yang ikut memberikan kontribusi dalam pembuatan makalah ini, baik berupa saran, dukungan moril dan doa.
7. Teman seperjuangan (Maudhi Septian dan Canggih R. Reza) yang sudah bersama-sama melewati segala kesulitan sepanjang proses penelitian

8. Teman-teman tim alga (Irfan Pratama, Tangguh Wijoseno dan Faris Najmuddin) atas bantuan dan dukungannya selama proses penelitian
9. Teman-teman Teknik Kimia Angkatan 2007 atas kebersamaan selama 3.5 tahun ini
10. Semua pihak yang telah membantu mulai dari proses pembuatan makalah hingga makalah skripsi ini selesai dibuat.

Penulis menyadari bahwa makalah skripsi ini masih memiliki kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang konstruktif dari pembaca untuk perbaikan pada pembuatan makalah skripsi selanjutnya.

Depok, Desember 2010

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Cynthia Herdiana
NPM : 070626969666
Program Studi : Teknik Kimia
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Fakultas Teknik
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**STUDI KOMPARASI TEKNIK PEMECAHAN DINDING SEL PADA
EKSTRAKSI LIPID MIKROALGA *Chlorella vulgaris* Buitenzorg**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 11 Januari 2011

Yang menyatakan

(Cynthia Herdiana)

ABSTRAK

Nama : Cynthia Herdiana
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : Studi Komparasi Teknik Pemecahan Dinding Sel Pada Ekstraksi Lipid Mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Biodiesel berbasis mikroalga merupakan alternatif sumber energi yang cukup berpotensi karena sel mikroalga memiliki lipid yang dapat diproses lebih lanjut menjadi bahan bakar biodiesel. Penelitian mengenai ekstraksi lipid dari beberapa mikroalga telah dilakukan, namun hingga saat ini belum ada penelitian yang membahas mengenai perbandingan metode pemecahan dinding sel mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan tujuan mengoptimisasi produksi lipid. Beberapa metode pemecahan dinding sel yang akan diujikan adalah metode sonikasi, MAE (*Microwave Assisted Extraction*) dan tanpa pemecahan dinding sel. Setelah itu, lipid akan diekstraksi menggunakan metode *Bligh and Drier*. Hasil penelitian menunjukkan metode MAE merupakan metode yang paling optimum untuk memperoleh *yield* lipid terbanyak.

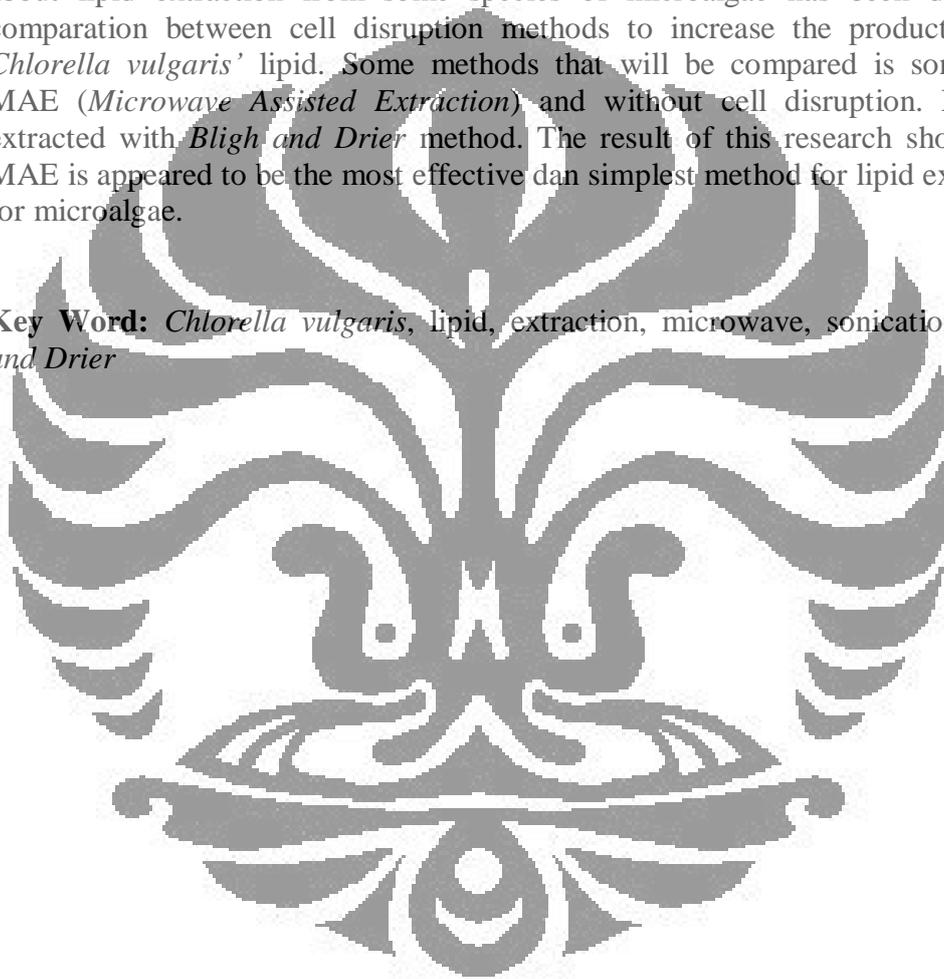
Kata Kunci: *Chlorella vulgaris*, lipid, ekstraksi, *microwave*, sonikasi, *Bligh and Drier*

ABSTRACT

Name : Cynthia Herdiana
Study Program : Chemical Engineering
Title : Comparison Study of Cell Disruption Methods of
Chlorella vulgaris Buitenzorg's Lipid Extraction

Biodiesel based from microalgae is one of potentially alternative for energi resources because its cell has lipid which can be processed into biofuel. Research about lipid extraction from some species of microalgae has been done but comparison between cell disruption methods to increase the productivity of *Chlorella vulgaris*' lipid. Some methods that will be compared is sonication, MAE (*Microwave Assisted Extraction*) and without cell disruption. Lipid is extracted with *Bligh and Drier* method. The result of this research shown that MAE is appeared to be the most effective dan simplest method for lipid extraction for microalgae.

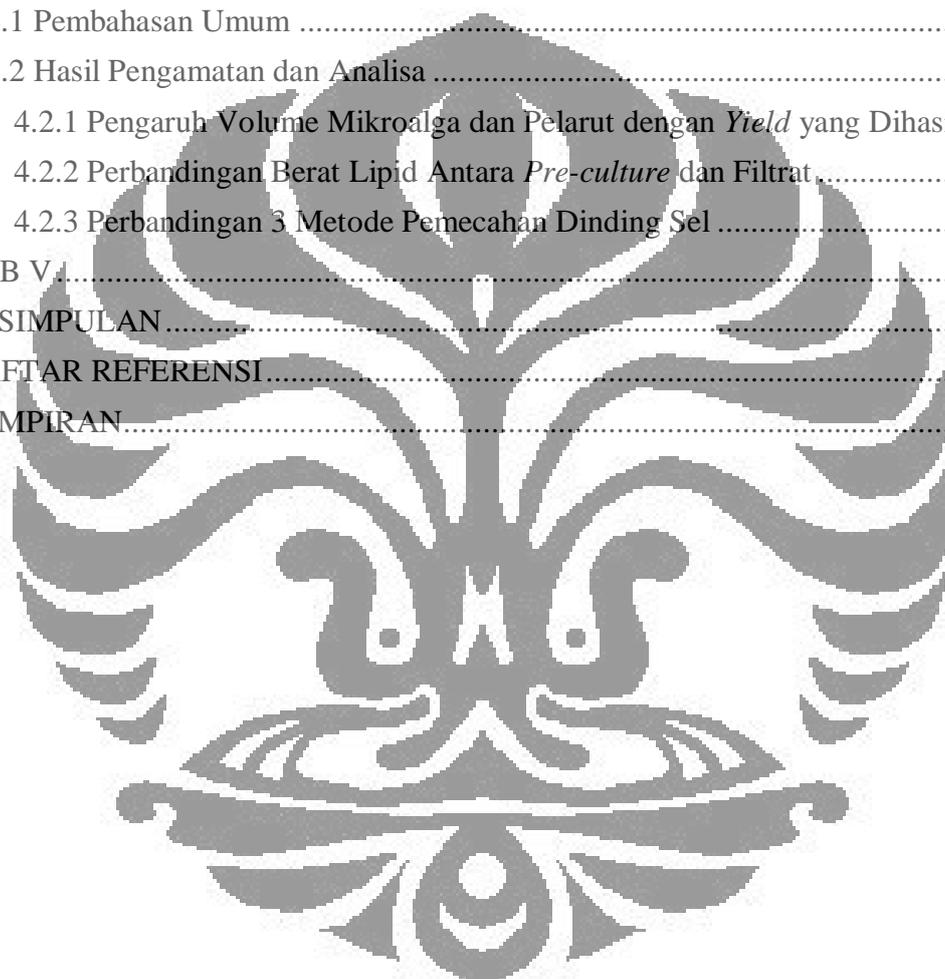
Key Word: *Chlorella vulgaris*, lipid, extraction, microwave, sonication, *Bligh and Drier*



DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
BAB I	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Sistematika Penulisan	5
BAB II.....	6
TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mikroalga	6
2.1.1 <i>Chlorella</i> sp.....	8
2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Sel <i>Chlorella vulgaris</i>	12
2.1.3 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i>	14
2.2 Ekstraksi.....	17
2.2.1 <i>Microwave</i>	20
2.2.2 Sonikasi.....	21
2.3 Lipid	23
2.4 Biodiesel.....	28
BAB III.....	32
METODE PENELITIAN	32
3.1 Diagram Alir Penelitian	32
3.2 Alat dan Bahan	34
3.3 Variabel dalam Penelitian	35
3.3.1 Variabel bebas	35

3.3.2 Variabel terikat	35
3.4 Prosedur Penelitian	35
3.4.1 Studi Literatur	35
3.4.2 Tahap Persiapan	36
3.4.3 Tahap Pengujian	40
3.4.4 Tahap Analisa dan Evaluasi	41
BAB IV	42
HASIL DAN PEMBAHASAN	42
4.1 Pembahasan Umum	42
4.2 Hasil Pengamatan dan Analisa	45
4.2.1 Pengaruh Volume Mikroalga dan Pelarut dengan <i>Yield</i> yang Dihasilkan	46
4.2.2 Perbandingan Berat Lipid Antara <i>Pre-culture</i> dan Filtrat	49
4.2.3 Perbandingan 3 Metode Pemecahan Dinding Sel	50
BAB V	57
KESIMPULAN	57
DAFTAR REFERENSI	58
LAMPIRAN	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 <i>Electron micrograph</i> sel <i>Chlorella vulgaris</i>	9
Gambar 2. 2 <i>Chlorella sp.</i>	10
Gambar 2. 3 Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella vulgaris</i>	12
Gambar 2. 4 Beberapa metode perusakan dinding sel	20
Gambar 2. 5 Struktur beberapa jenis asam lemak.....	26
Gambar 2. 6 Reaksi Transesterifikasi	31
Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian.....	33
Gambar 3. 2 Rangkaian Peralatan Fotobioreaktor Tunggal	38
Gambar 4. 1 Grafik Perbandingan Volume Mikroalga dengan Berat Lipid	46
Gambar 4. 2 Grafik Berat Lipid dengan Variasi OD	48
Gambar 4. 3 Grafik <i>Yield</i> Lipid dengan Massa Kering (X).....	48
Gambar 4. 4 Grafik Perbandingan Jumlah Lipid Filtrat dan <i>Pre-culture</i>	50
Gambar 4. 5 Grafik % Lipid vs Massa Kering (X) dengan <i>microwave</i> 100 ⁰ C selama 5 menit.....	51
Gambar 4. 6 Grafik % Lipid vs Massa Kering (X) dengan sonikasi 53MHz 10 menit	52
Gambar 4. 7 Grafik % Lipid vs Massa Kering (X) tanpa pemecahan dinding sel	53
Gambar 4. 8 Diagram Perbandingan % Lipid dengan Teknik yang Berbeda	54
Gambar 4. 9 Diagram Perbandingan Berat Lipid dengan Teknik yang Berbeda	55

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Komposisi Biomassa <i>Chlorella vulgaris</i>	11
Tabel 2. 2 Perbandingan Komposisi Nutrisi Medium Pembiakan <i>Chlorella vulgaris</i>	15
Tabel 2. 3 Macam-macam asam lemak	25
Tabel 3. 1 Bahan Medium Benneck	37
Tabel 4. 1 Perbandingan Volume Alga dengan Berat Lipid.....	46
Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Berat Lipid dengan Variasi OD	47
Tabel 4. 3 Tabel Perbandingan Lipid <i>Pre-culture</i> dan Filtrat	49
Tabel 4. 4 <i>Yield</i> Lipid dengan <i>Microwave</i> 100°C 5 menit	51
Tabel 4. 5 <i>Yield</i> Lipid dengan Sonikasi 53 MHz 10 menit.....	52
Tabel 4. 6 <i>Yield</i> Lipid Tanpa Pemecahan Dinding Sel	52
Tabel 4. 7 Tabel Perbandingan % Lipid dari 3 Metode Pemecahan Dinding Sel	53
Tabel 4. 8 Tabel Perbandingan Berat Lipid dengan 3 Metode yang Berbeda	54



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Tidak dapat dipungkiri bahwa isu pemanasan global telah menjadi pendorong bagi perkembangan sains saat ini. Khususnya penelitian dalam bidang energi terbarukan. Selain itu, masalah dunia juga menjadi pendorong perkembangan teknologi dalam bidang tersebut adalah ketersediaan bahan bakar fosil yang semakin terbatas jumlahnya. Hingga saat ini bahan bakar fosil seperti minyak dan gas bumi merupakan tulang punggung dari berbagai industri yang ada saat ini. Sementara bahan bakar fosil merupakan bahan bakar yang tidak dapat diperbaharui. Isu-isu tersebut mendorong banyak penelitian dilakukan untuk mencari sumber bahan bakar alternatif yang dapat diperbaharui dan aman terhadap lingkungan. Salah satunya adalah pengembangan *biofuel* yaitu bahan bakar yang berbasis nabati, khususnya biodiesel.

Mikroalga merupakan salah satu penghasil *biofuel* yang sangat baik. Hal ini dikarenakan sel mikroalga memiliki lipid yang dapat diproses lebih lanjut menjadi bahan bakar biodiesel. Penggunaan biodiesel memiliki beberapa keuntungan antara lain pengurangan karbon dioksida dan sebagai pengganti minyak bumi (Chisti, 2008). Mikroalga merupakan sumber lipid yang baik karena produktivitasnya yang jauh lebih besar dibandingkan dengan vegetasi terestrial yang digunakan sebagai bahan baku *biofuel* dan kandungan lipid mikroalga dapat melampaui 70% dari berat kering, meskipun kebanyakan alga memiliki kandungan lipid 30% (Chisti, 2007). Produktivitas yang tinggi dikombinasikan dengan kandungan lipid yang tinggi dapat menghasilkan sejumlah besar lipid yang dapat dipanen untuk produksi biodiesel.

Dalam biomassa mikroalga terkandung bahan-bahan penting yang sangat bermanfaat, misalnya protein, karbohidrat, lemak dan asam nukleat. Persentase keempat komponen tersebut bervariasi tergantung jenis alga.

Sebagai contoh, mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki kandungan protein sebesar 51 – 58%, karbohidrat 12 - 17%, lemak 14 – 22% dan asam nukleat 4 – 5%. *Spirulina platensis* memiliki kandungan protein sebesar 46 – 43%, karbohidrat 8 – 14%, lemak 4 – 9%, dan asam nukleat 2 – 5% (Becker, 1994). Lemak mikroalga pada umumnya terdiri dari asam lemak tidak jenuh, seperti linoleat, *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) (Skjak-Braek, 1992).

Mikroalga yang digunakan untuk menghasilkan lipid pada penelitian kali ini adalah *Chlorella vulgaris*. Mikroalga ini termasuk jenis chlorophyta (alga hijau) yaitu jenis alga berwarna hijau akibat kandungan klorofil di dalamnya. *Chlorella vulgaris* memiliki kandungan klorofil yang relatif besar jika dibandingkan dengan jenis alga hijau lainnya, yaitu sebesar 3%. Mikroalga jenis ini merupakan mikroalga bersel tunggal yang banyak diteliti dan diproduksi sebagai penghasil biomassa dalam skala besar. *Chlorella* termasuk cepat berkembang biak, mengandung gizi yang cukup tinggi yaitu protein 42.2 %, lemak kasar 15.3 %, nitrogen dalam bentuk ekstrak, kadar air 5.7 % dan serat 0.4 %. *Chlorella* juga menghasilkan suatu antibiotik yang disebut Chlorellin yang dapat melawan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Vashista, 1979).

Proses yang penting sehubungan dengan produksi biodiesel menggunakan mikroalga adalah kultivasi, pemanenan (*harvesting*), ekstraksi lipid dan transesterifikasi lipid (Lee, 2010). Seluruh proses ini penting, namun yang perlu diperhatikan adalah bagaimana mengekstraksi lipid yang terdapat pada sel mikroalga sehingga nantinya dihasilkan lipid yang berkualitas baik yang dapat diproses menjadi biodiesel.

Besarnya manfaat mikroalga dan dampaknya yang positif terhadap permasalahan lingkungan yang ada membuat penelitian mengenai mikroalga ini menjadi perlu dilakukan. Apalagi melihat masalah pemanasan global dan penipisan cadangan bahan bakar fosil yang semakin *urgent*, maka perlu dikembangkan alternative bahan bakar yang ramah terhadap lingkungan yaitu biodiesel yang berbasis lipid yang diekstraksi dari mikroalga.

Dalam mengembangkan mikroalga, terdapat beberapa hambatan yang perlu diatasi, diantaranya adalah sebagai berikut:

- Teknik pemanenan yang ekonomis
- Teknik ekstraksi lipid yang ekonomis dan ramah lingkungan
- Stabilitas kultur dan mitigasi kontaminan dalam kolam (atau tempat pengembangbiakan) yang terbuka

Kendala yang cukup besar datang dari teknik pemanenan dan teknik ekstraksi lipid. Bagaimana biomassa yang dihasilkan oleh mikroalga dapat dipanen dalam jumlah yang efektif dan bagaimana teknik mengekstraksi kandungan, dalam hal ini lipid, yang terdapat dalam mikroalga. Hal ini cukup menjadi kendala dalam pengembangan biofuel berbasis mikroalga karena lipid yang terdapat pada sel mikroalga belum dimanfaatkan secara maksimal akibat dinding sel mikroalga yang *rigid* mengandung *glucosamine* (Yamamoto M, et al., 2005). *Glucosamine* ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan bagian dari struktur polysaccharides chitosan dan kitin. *Glucosamine* adalah salah satu monosakarid yang paling banyak. Dari penelitian sebelumnya, belum pernah dilakukan teknik pemecahan dinding sel mikroalga untuk mendapatkan lipid yang optimum dari mikroalga *Chlorella vulgaris*.

Beberapa peneliti telah membahas mengenai metode ekstraksi lipid dari mikroalga. Beberapa metode ekstraksi yang dapat mengekstrak lipid dari mikroalga adalah dengan metode *rendering*, *pressing*, dan *solvent* (Elahe Enssani, 2010). Penelitian yang telah dilakukan menggunakan campuran kloroform-metanol dengan variasi perbandingan solven dengan berat kering mikroalga (Zhu et al, 2002). Selain menggunakan solven, beberapa metode perusakan dinding sel seperti *microwave assisted extraction* (MAE) yang dapat memecahkan sel menggunakan gelombang berfrekuensi tinggi, merupakan metode paling efisien untuk ekstraksi minyak sayur (Cravotto et al., 2008; Virot et al., 2008), sonikasi dapat memecahkan dinding sel dan membran akibat efek kavitasi telah banyak digunakan untuk mengganggu sel microbial (Engler, 1985; Lee et al., 1998), belum pernah diujikan untuk mengekstraksi lipid mikroalga *Chlorella vulgaris Buitenzorg*. Maka, pada penelitian kali ini, akan dibandingkan keefektifan metode-metode perusakan dinding sel tersebut

dengan harapan dapat diperoleh metode ekstraksi lipid yang paling efektif, sehingga nantinya biofuel berbasis lipid mikroalga dapat dikembangkan lebih lanjut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana teknik pemecahan dinding sel yang paling efektif untuk mendapatkan lipid dalam jumlah yang optimal dari mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk menentukan berapa perbandingan volume sampel dan tingkat kerapatan sel berapa yang optimum pada metode *Bligh and Drier* tanpa pemecahan dinding sel
2. Untuk menentukan metode pemecahan dinding sel mikroalga yang paling efektif untuk mendapatkan lipid dalam jumlah yang optimal dari mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

1.4 Batasan Masalah

1. Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Bioproses Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.
2. Mikroalga yang digunakan adalah *Chlorella vulgaris* Buitenzorg yang berasal dari koleksi kultur Sub Balai Penelitian Perikanan Air Tawar Depok Dinas Kelautan dan Perikanan. Mikroalga dibiakkan dalam medium Benneck dan fotobioreaktor 18 L.
3. Pengujian kandungan nutrisi dalam biomassa hanya dibatasi oleh pengujian kandungan lipid.
4. Variasi operasi yang akan dibandingkan adalah:
 - a. Berat dan *yield* lipid yang dihasilkan dari metode pemecahan dinding sel menggunakan *microwave* (MAE)

- b. Berat dan *yield* lipid yang dihasilkan dari metode pemecahan dinding sel menggunakan sonikator

I.5 Sistematika Penulisan

Sistematika yang akan digunakan dalam penulisan makalah skripsi ini adalah sebagai berikut:

BAB I PENDAHULUAN

Bab ini berisi penjelasan mengenai latar belakang diadakannya penelitian, rumusan masalah yang akan dibahas, tujuan penelitian yang ingin dicapai, batasan masalah dari penelitian yang akan dilakukan serta penjelasan mengenai sistematika penulisan makalah skripsi.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisi mengenai penjelasan dan *state of the art* dari beberapa istilah dan variabel yang digunakan dalam penelitian ini, seperti apa itu mikroalga dan morfologinya, bagaimana teknik pemecahan dinding sel, definisi lipid dan biodiesel.

BAB III METODE PENELITIAN

Bab ini berisi penjelasan tentang diagram alir penelitian, variabel penelitian, prosedur penelitian serta alat dan bahan yang nantinya akan digunakan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menyajikan data-data hasil pengamatan dan pengolahannya beserta pembahasannya.

BAB V KESIMPULAN

Bab terakhir ini menyajikan kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan berdasarkan hasil yang telah didapat pada bab sebelumnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1 Mikroalga

Mikroalga terdiri dari sejumlah kelompok organisme yang fotosintetik dan heterotrof yang memiliki potensi besar untuk dikelola sebagai sumber energi. Organisme ini dapat dikultivasi pada kondisi iklim agro yang sulit dan dapat menghasilkan produk samping yang berguna seperti lemak, minyak, gula dan senyawa bioaktif lainnya. Beberapa mikroalga secara efektif digunakan dalam produksi hidrogen dan oksigen melalui proses *biophotolysis*. Beberapa lainnya dapat menghasilkan hidrokarbon yang dapat digunakan secara langsung sebagai bahan bakar cair.

Sekali tumbuh, biaya pemanenan dan transportasi spesies alga ini lebih rendah dibandingkan dengan benih konvensional dikarenakan ukurannya yang sangat kecil. Mereka juga dapat dengan mudah dibawa ke laboratorium untuk diteliti dan diregenerasikan dalam jangka waktu yang lebih pendek dibandingkan dengan tanaman tingkat tinggi.

Mikroalga mewakili sejumlah besar keanekaragaman genetik dan dapat eksis sebagai uniseluler, koloni dan filamen. Mereka terdistribusi ke berbagai tempat di biosfer dan tumbuh pada kondisi yang bervariasi. Mikroalga dapat dikultivasi di bawah kondisi cair dari air murni hingga air dengan tingkat salinitas yang ekstrim. Mereka juga dapat hidup dalam kondisi basah dan pasir. Mikroalga telah lama diketahui sebagai komponen penting pada terumbu karang. Kondisi ekologi memiliki bagian yang signifikan dalam menentukan produk metabolisme yang dihasilkan.

Mikroalga dapat tumbuh pada kultur yang terbuka seperti kolam dan danau atau pada sistem kultur yang dijaga tertutup, seperti halnya pada proses fermentasi. Beberapa mikroalga sangat cocok dikembangkan pada kultur terbuka dimana kondisi lingkungannya sangat spesifik, seperti tingkat garam yang tinggi atau kolam dengan kandungan alkalin yang tinggi. Kondisi ekstrim pada lingkungan ini membatasi kompetisi pertumbuhan spesies, walaupun jenis

organisme yang lain mungkin mengkontaminasi kultur. Keuntungan sistem seperti ini adalah investasi yang rendah, sangat efektif dan mudah diatur. Lain halnya dengan sistem kultur tertutup yang membutuhkan investasi yang lebih tinggi dan biaya operasi, namun bebas dari variasi kondisi iklim agro dan sangat lekat dikontrol untuk performa dan kualitas yang optimal. Kultur yang terbuka bergantung pada sinar matahari dan cuaca lingkungan. Sementara sistem tertutup menggunakan fotobioreaktor untuk kultur fototrofi dan fermenter konvensional untuk pertumbuhan heterotrof.

Terdapat empat kelompok mikroalga antara lain: diatom (*Bacillariophyceae*), alga hijau (*Chlorophyceae*), alga emas (*Chrysophyceae*) dan alga biru (*Cyanophyceae*). Penyebaran habitat mikroalga biasanya di air tawar (*limnoplankton*) dan air laut (*haloplankton*), sedangkan sebaran berdasarkan distribusi vertikal di perairan meliputi plankton yang hidup di zona *euphotik* (*ephiplankton*), hidup di zona *disphotik* (*mesoplankton*), hidup di zona *aphotik* (*bathoplankton*) dan yang hidup di dasar perairan / bentik (*hypoplankton*) (Eryanto et.al, 2003). Dalam biomassa mikroalga terkandung bahan-bahan penting yang sangat bermanfaat, misalnya protein, karbohidrat, lemak dan asam nukleat. Persentase keempat komponen tersebut bervariasi tergantung jenis alga. Sebagai contoh, mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki kandungan protein sebesar 51 – 58%, karbohidrat 12 - 17%, lemak 14 – 22% dan asam nukleat 4 – 5%. *Spirulina platensis* memiliki kandungan protein sebesar 46 – 43%, karbohidrat 8 – 14%, lemak 4 – 9%, dan asam nukleat 2 – 5% (Becker, 1994). Mikroalga lainnya seperti, *Botryococcus braunii*, *Dunaliella salina*, *Monalanthus salina* mempunyai kandungan lemak berkisar 40 – 85% (Borowitzka, 1998). Kandungan lemak mikroalga tergantung dari jenis mikroalga, rata-rata pertumbuhan dan kondisi kultur mikroalga (Chisti, 2007).

Lemak mikroalga pada umumnya terdiri dari asam lemak tidak jenuh, seperti linoleat, *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) (Skjak-Braek, 1992). Mikroalga mengandung lemak dalam jumlah yang besar terutama asam arachidonat (AA, 20:4 ω 6) (yang mencapai 36% dari total asam lemak) dan sejumlah asam eikosapentaenoat (EPA, 20:5 ω 3) (Fuentes, et al., 2000). Selain itu, lemak mikroalga juga kaya akan asam lemak politudakjenuh

(PUFA) dengan 4 atau lebih ikatan rangkap. Sebagai contoh, yang sering dijumpai yaitu *eicosapentaenoic acid* (EPA, C20:5) dan *docosahexaenoic acid* (DHA, C22:6) (Chisti, 2007). Biomassa mikroalga adalah sumber yang kaya akan beberapa nutrien, seperti asam lemak ω 3 dan ω 6, asam amino esensial (leusin, isoleusin, valin, dan lain-lain) serta karoten (Becker, 1994). Beberapa mikroalga menyajikan spektrum asam lemak yang lebih besar, ketika dibandingkan dengan tanaman yang mengandung minyak, selain itu juga mengandung struktur molekul dengan lebih dari 18 atom karbon (Belarbi et al., 2000).

2.1.1 *Chlorella* sp.

Mikroalga yang akan dijadikan bahan baku penelitian adalah *Chlorella vulgaris*. Berikut merupakan spesifikasinya:

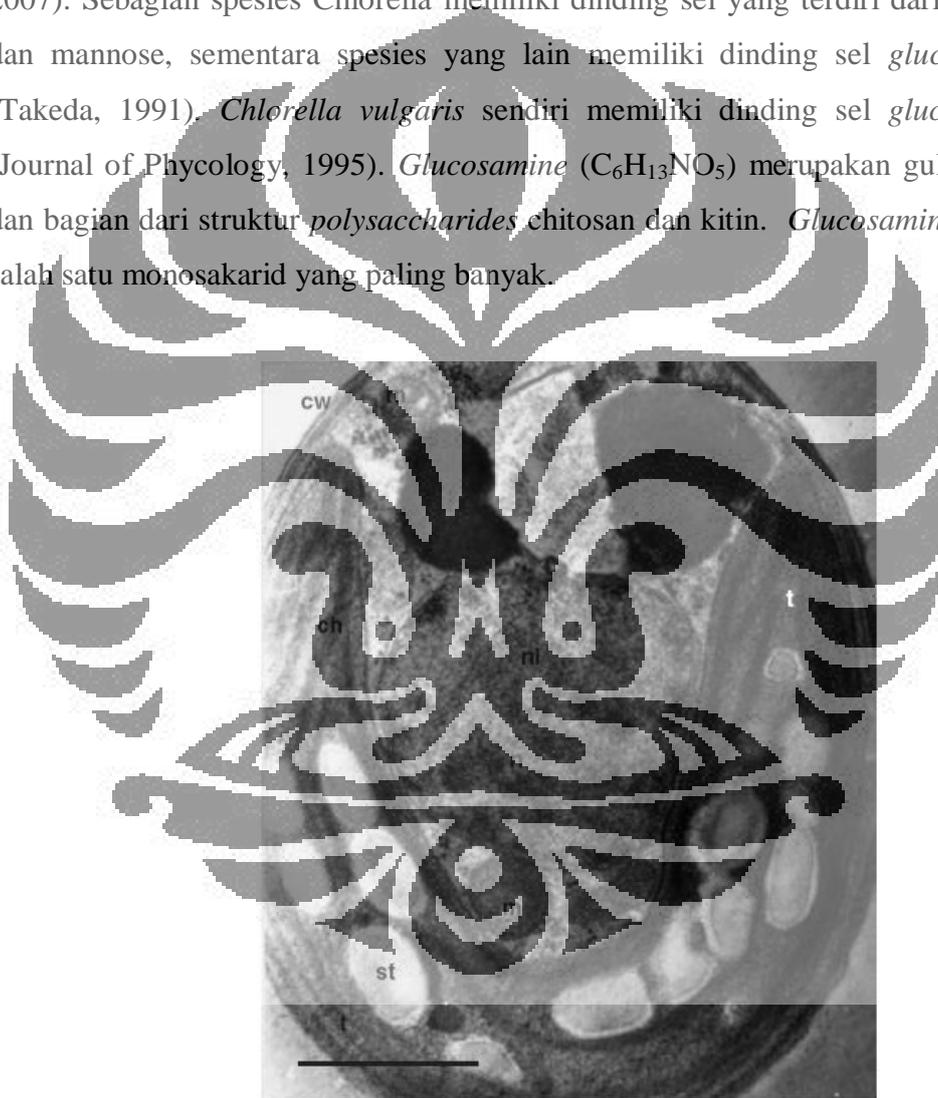
Filum : Chlorophyta
 Kelas : Chlorophyceae
 Ordo : Chlorococcales
 Famili : Chlorellaceae
 Genus : *Chlorella*
 Spesies : *Chlorella* sp.

(Vashista, 1979)

Sel *Chlorella* berbentuk bulat, hidup soliter, berukuran 2-8 μ m. Dalam sel *Chlorella* mengandung 50% protein, lemak serta vitamin A, B, D, E dan K, disamping banyak terdapat pigmen hijau (klorofil) yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis. *Chlorella* tumbuh pada salinitas 225 ppt. Alga tumbuh dengan lambat pada salinitas 15 ppm, dan hampir tidak tumbuh pada salinitas 0 ppm dan 60 ppm. *Chlorella* tumbuh baik pada suhu 20°C, tetapi tumbuh lambat pada suhu 32°C. Tumbuh sangat baik pada suhu 20°-23° C. Penelitian Antara et al., (2008) menumbuhkan *Chlorella* sp dengan menggunakan medium *walne* untuk mengetahui terjadinya perubahan nutrisi dan kondisi sel dari *Chlorella* sp selama masa penyimpanan. Dapat diketahui bahwa pada penyimpanan biomasa *Chlorella* dalam bentuk pasta selama 4 minggu, masih terdapat sel hidup sebanyak 46 %. Penurunan sel yang hidup diikuti dengan penurunan isi sel selama penyimpanan. Kadar protein pasta mikroalga dan juga mikroalga kering tidak mengalami perubahan yang nyata selama penyimpanan,

namun kandungan β -karoten mengalami penurunan demikian pula kapasitas antioksidannya.

Chlorella vulgaris termasuk cepat berkembang biak, mengandung gizi yang cukup tinggi yaitu kandungan protein sebesar 51 – 58%, karbohidrat 12 – 17%, lemak 14 – 22% dan asam nukleat 4 – 5% (Becker, 1994). *Chlorella* juga menghasilkan suatu antibiotik yang disebut Chlorellin yang dapat melawan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007). Sebagian spesies *Chlorella* memiliki dinding sel yang terdiri dari glucose dan mannose, sementara spesies yang lain memiliki dinding sel *glucosamine* (Takeda, 1991). *Chlorella vulgaris* sendiri memiliki dinding sel *glucosamine* (Journal of Phycology, 1995). *Glucosamine* ($C_6H_{13}NO_5$) merupakan gula amino dan bagian dari struktur *polysaccharides* chitosan dan kitin. *Glucosamine* adalah salah satu monosakarid yang paling banyak.



Gambar 2. 1 Electron micrograph sel *Chlorella vulgaris*

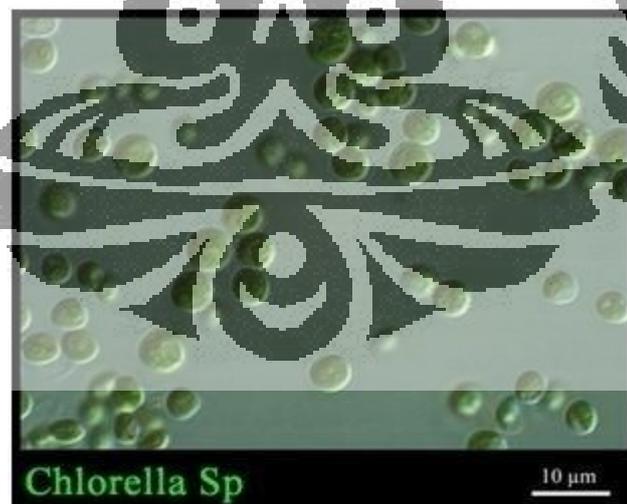
(Sumber: Algae, 2000)

Keterangan: cw – cell wall, ch – cup shaped chloroplast, t – thylakoids, st – starch grains (leucoplasts), n – nucleus, nl – nucleolus, m – mitochondria. Skala = 1 μ m (Courtesy of M.A. Favali).

Sutoma (2005) melaporkan bahwa *Chlorella sp* memiliki laju pertumbuhan spesifik (k) sebesar 0.6486 dan mencapai puncak kepadatan pada hari ke-10 dan hari ke-16. Laju pertumbuhan tertinggi dicapai oleh perlakuan dengan kepadatan awal terendah dan diikuti dengan kepadatan awal yang lebih tinggi.

Komposisi dari asam lemak marine *Chlorella sp* yang dikulturkan pada 15 ppt salinitas, menunjukkan jumlah asam C18:3n-3, C18:2n-6, C16:0, C18:1n-9 dalam skala medium sampai tinggi, ini mirip dengan komposisi asam lemak yang terdapat pada *Chlorella sp* yang hidup pada air tawar. Pada penelitian ini juga ditemukan kalau kandungan *High Unsaturated Fatty acids* (HUFAs) pada *Chlorella sp* sangat kecil (Pratoomyot, 2005).

Mikroalga dapat menyediakan beberapa jenis biofuel yang berbeda. Termasuk metana yang diproduksi secara anaerob oleh biomassa alga (Spolaore et al., 2006); biodiesel turunan dari minyak mikroalga (Roessler et al., 1994; Sawayama et al., 1995; Dunahay et al., 1996; Sheehan et al., 1998; Banerjee et al., 2002; Gavrilescu and Chisti, 2005); dan fotobiologi menghasilkan biohidrogen (Ghirardi et al., 2000; Akkerman et al., 2002; Melis, 2002; Fedorov et al., 2005; Kapdan and Kargi, 2006).



Gambar 2. 2 *Chlorella sp*.

(Sumber: www.wikipedia.com)

Tabel 2. 1 Komposisi Biomassa *Chlorella vulgaris*

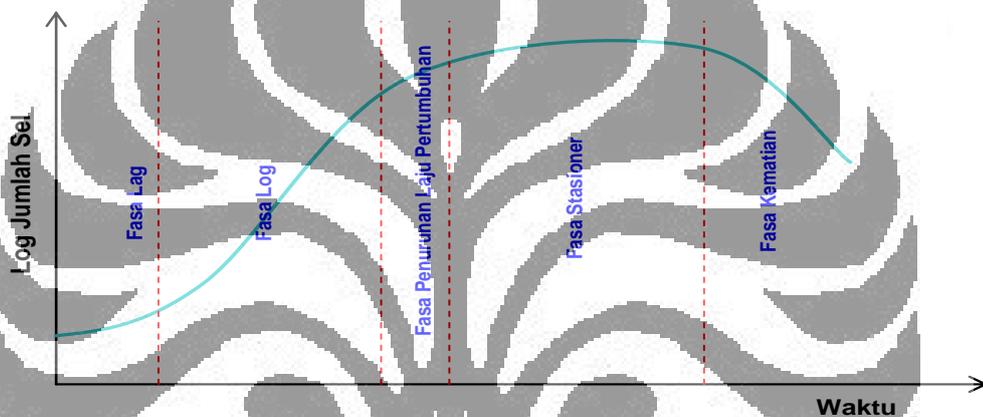
Komponen		
Protein	g/100g	33-45
Lemak	g/100g	6.9-16.1
Air	g/100g	04-Mei
Klorofil	g/100g	0.7-2.7
Sumber Mineral	g/100g	6.5-10.5
Lipid	g/100g	6.5-12.5
Rohfaser	g/100g	6.6-7.5
Ballaststoffe	g/100g	27.1-32.5
Karbohidrat	g/100g	0.9-2
Mineral		
Kalsium	mg/100g	321-604
Magnesium	mg/100g	273-325
Seng	mg/100g	04-Jun
Besi	mg/100g	40-70
Kalium	mg/100g	1000-2900
Iodium	mg/100g	<0.0005
Selenium	µg/100g	02-Okt
Vitamin		
Betakaroten	mg/100g	3.3-11.2
Vitamin B1	mg/100g	0.5-1.0
Vitamin B2	mg/100g	3.2-3.8
Vitamin B6	mg/100g	0.3-3.7
Vitamin B12	mg/100g	0.2-1.0
Vitamin E	mg/100g	3.6-10.0
Vitamin C	mg/100g	13-20
Vitamin K1	mg/100g	0.2-0.8

(Sumber : http://www.gtamart.com/mart/products/chlorella_vulgaris/)

2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Sel *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris mempunyai waktu generasi yang sangat cepat. Oleh karena itu dalam waktu yang relatif singkat, perbanyakan sel akan terjadi secara cepat, terutama jika tersedianya cahaya dan sumber energi yang cukup. Pola pertumbuhan berdasarkan jumlah sel dapat dikelompokkan menjadi lima fasa yaitu, fasa tunda (*lag phase*), fasa pertumbuhan logaritmik (*log phase*), fasa penurunan laju pertumbuhan, fasa stationer dan fasa kematian.

Kelima fasa tersebut dapat ditunjukkan dengan kurva jumlah sel vs waktu.



Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan *Chlorella vulgaris*

(Sumber : Wirosaputro, 2002)

a) Fasa Tunda (*lag phase*)

Lag phase adalah suatu tahap setelah pemberian inokulum ke dalam media kultur dimana terjadi penundaan pertumbuhan yang dikarenakan *Chlorella vulgaris* memerlukan pembelahan. Dalam fasa ini tidak terjadi penambahan jumlah sel. Fasa ini adalah fasa penyesuaian yaitu suatu masa ketika sel-sel kekurangan metabolit dan enzim akibat dari keadaan tidak menguntungkan dalam pembiakan terdahulu, menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Enzim-enzim dan zat antara terbentuk dan terkumpul sampai konsentrasi yang cukup untuk kelanjutan pertumbuhan.

b) Fasa Pertumbuhan Logaritmik (*log phase*)

Pada fasa ini, sel-sel membelah dengan cepat dan terjadi pertambahan dalam jumlah sel. Selama fasa ini, sel-sel berada dalam keadaan yang stabil. Bahan sel baru terbentuk dengan konstan tetapi bahan-bahan baru itu bersifat katalitik dan massa bertambah secara eksponensial. Hal ini bergantung dari satu atau dua hal yang terjadi, yaitu apabila tidak atau lebih zat makanan dalam pembenihan habis maka hasil metabolisme yang beracun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan. Kultur dalam fasa pertumbuhan eksponensial tidak hanya berada dalam keseimbangan pertumbuhan tetapi jumlah dari sel-sel dalam kultur ini bertambah dengan kecepatan yang konstan. Dalam penggunaan mikroorganisme pada dunia perindustrian, dibutuhkan bibit atau *starter* untuk proses fermentasi suatu bahan makanan, biasanya digunakan mikroorganisme yang sedang berada dalam fasa eksponensial. Hal ini dikarenakan mikroorganisme tersebut tidak akan mengalami fasa pertumbuhan sebelum fasa eksponensial dalam media yang baru.

c) Fasa Penurunan Laju Pertumbuhan

Pada fasa ini, tetap terjadi pertambahan sel namun laju pertumbuhannya menurun. Hal ini dikarenakan terjadinya kompetisi yang sangat tinggi di dalam media hidup karena zat makanan yang tersedia tidak sebanding dengan jumlah populasi akibat dari pertambahan yang sangat cepat pada fasa eksponensial sehingga hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan makanan yang cukup dan dapat tumbuh serta membelah.

d) Fasa Stasioner

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

e) Fasa Kematian

Dalam fasa ini, jumlah populasi ini menurun. Selama fasa ini, jumlah sel yang mati per satuan waktu secara perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan sel-sel yang mati menjadi konstan.

2.1.3 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan *Chlorella vulgaris*

Organisme autotrofik seperti *Chlorella* membutuhkan cahaya, CO₂, H₂O, nutrient, dan *trace element* untuk pertumbuhannya (www.nhm.ac.uk). Berikut akan diuraikan beberapa faktor lain yang berhubungan dengan hal-hal tersebut yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikroalga hijau *Chlorella* pada medium terbatas.

a) Jenis Medium

Medium pembiakan sangat berpengaruh dalam pertumbuhan *Chlorella*. Apabila asupan nutrisi dan medium tidak cukup, maka laju pertumbuhannya akan terhambat. Oleh karena itu, medium pembiakannya harus memiliki berbagai nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangannya sehingga komposisi dari medium yang diberikan harus sesuai.

Medium yang diperlukan untuk perkembangan *Chlorella* relatif lebih sederhana dan hanya memerlukan jenis nutrisi yang lebih sedikit dibandingkan dengan medium untuk jenis alga lainnya. Ada beberapa medium yang biasanya digunakan untuk pembiakan *Chlorella* yaitu Benneck, Detmer, Pupuk komersial dan Walne. Komposisi untuk masing-masing medium ditunjukkan pada tabel 2.2.

Tabel 2. 2 Perbandingan Komposisi Nutrisi Medium Pemiakan *Chlorella vulgaris*

Nutrisi	Benneck	Detmer	Pupuk Komersial	Walne
MgSO ₄	100 mg/L	550 mg/L	-	-
KH ₂ PO ₄	200 mg/L	250 mg/L	-	-
NaNO ₃	500 mg/L	-	-	100 mg/L
FeCl ₃	3-5 mg/L	-	-	1,3 mg/L
KCl	-	250 mg/L	40 mg/L	-
Cu(NO ₃) ₂	-	1000 mg/L	-	-
CO(NH ₂) ₂	-	-	800 mg/L	-
Na ₂ EDTA	-	-	-	45 mg/L
H ₃ BO ₃	-	-	-	33,6 mg/L
TSP	-	-	15 mg/L	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	20 mg/L
MnCl ₂	-	-	-	0,36 mg/L

(Sumber: Wirosaputro, 2002)

b) Pencahayaan

Cahaya merupakan faktor utama yang mempunyai peranan penting untuk pertumbuhan mikroalga sebagai sumber energi untuk pertumbuhan mikroalga dan fotosintesis. Intensitas yang baik bagi mikroalga untuk melakukan fotosintesis berkisar antara 2-3 kilolux. Cahaya matahari yang diperlukan oleh mikroalga dapat diganti oleh lampu TL. Penggunaan cahaya yang berasal dari lampu TL karena didasari oleh kebutuhan intensitas cahaya pada penelitian ini dimana jika cahaya pada lampu TL dapat diatur sesuai dengan intensitas yang dibutuhkan. Selain itu lampu TL mempunyai kestabilan intensitas cahaya jika dibandingkan dengan cahaya yang bersumber dari cahaya matahari.

Faktor pencahayaan terbagi menjadi tiga bagian, yaitu pencahayaan kontinyu, pencahayaan alterasi dan pencahayaan gelap-terang (fotoperiodesitas). Pada penelitian ini biakan mikroalga diberi pencahayaan alterasi, yaitu intensitas cahaya disesuaikan dengan kerapatan sel mikroalga.

c) Kondisi Operasi

Dalam proses kultivasi *Chlorella vulgaris* digunakan beberapa kondisi operasi yaitu konsentrasi CO₂, temperatur operasi, pH dan laju alir baik untuk udara ataupun CO₂.

1. Konsentrasi

Dalam proses fotosintesis, CO₂ merupakan unsur paling penting. Tersedianya CO₂ yang cukup dalam media akan memperlancar proses fotosintesis yang akan berimbas pada pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. itu sendiri. Konsentrasi CO₂ yang optimal untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. adalah sekitar 3-5% (Wirosaputro, 2002).

2. Temperatur

Kondisi lingkungan dimana pembiakan diletakan akan mempengaruhi proses metabolisme sel yang ada di dalamnya. Semakin tinggi suhu maka laju reaksi akan semakin besar. Berdasarkan prinsip tersebut sel akan tumbuh lebih cepat pada temperatur yang lebih tinggi. Namun temperatur yang terlalu tinggi akan menyebabkan denaturasi protein dan asam nukleat, kehilangan enzim yang penting dan metabolisme sel. Temperatur optimum bagi perkembangan *Chlorella vulgaris* adalah 23°C - 30°C.

3. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) akan mempengaruhi kinerja kerja suatu enzim. Menurut Round (1973), pH media berkisar antara 7.0 – 8.0 cukup baik digunakan dalam kultur alga di laboratorium. *Chlorella vulgaris* sendiri tahan terhadap lingkungan yang asam dengan pH mencapai 2. Untuk mencegah terjadinya perubahan pH dalam media kultur alga, perlu ditambahkan EDTA (*Ethyl Diamine Tetra Acetate*) ke dalam media, karena EDTA berfungsi sebagai *buffer* sehingga pH media akan tetap stabil.

4. Laju Alir dan CO₂

Laju alir udara perlu dipertimbangkan jika jenis reaktor yang digunakan adalah reaktor kolom gelembung. Sedangkan laju CO₂ diatur sesuai dengan model reaktor yang digunakan, luas permukaan kontak dan volume kultur. Hal ini ditujukan untuk pemerataan suplai CO₂ yang dibutuhkan oleh *Chlorella vulgaris* pada medium terbatas.

5. *Pre – Culture*

Tahapan ini sangat penting dalam pembiakan *Chlorella vulgaris* pada tahap ini mikroalga dikenalkan pada medium baru agar lebih terbiasa hingga dapat melewati fasa lag-nya. Setelah itu *Chlorella* siap untuk dibiakkan pada fasa log. Tahap ini juga bertujuan untuk mengetahui apakah medium yang digunakan sesuai.

6. Kontaminasi

Sedikit kontaminan yang ada akan mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella vulgaris* kontaminan dapat berebut makanan dengan *Chlorella* itu sendiri dan yang lebih berbahaya jika kontaminan yang ada menjadi predator bagi mikroalga itu sendiri. Oleh karena itu, seluruh kegiatan kultivasi *Chlorella vulgaris* harus dilakukan secara steril untuk mencegah adanya kontaminan.

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan suatu zat dari campurannya dengan pembagian sebuah zat terlarut antara dua pelarut yang tidak dapat tercampur untuk mengambil zat terlarut tersebut dari satu pelarut ke pelarut yang lain. Seringkali campuran bahan padat dan cair (misalnya bahan alami) tidak dapat atau sukar sekali dipisahkan dengan metode pemisahan mekanis atau termis. Misalnya, karena komponennya saling bercampur secara sangat erat, peka terhadap panas, beda sifat-sifat fisiknya terlalu kecil, atau tersedia dalam konsentrasi yang terlalu rendah.

Dalam hal semacam itu, seringkali ekstraksi adalah satu-satunya proses yang dapat digunakan atau yang mungkin paling ekonomis. Sebagai contoh pembuatan ester (*essence*) untuk bau-bauan dalam pembuatan sirup atau minyak wangi, pengambilan kafein dari daun teh, biji kopi atau biji coklat dan yang dapat dilihat sehari-hari ialah pelarutan komponen-komponen kopi dengan menggunakan air panas dari biji kopi yang telah dibakar atau digiling.

Berikut beberapa kondisi yang perlu dipersiapkan dalam proses ekstraksi:

- **Selektivitas**

Pelarut hanya boleh melarutkan ekstrak yang diinginkan, bukan komponen-komponen lain dari bahan ekstraksi. Dalam praktek, terutama pada ekstraksi bahan-bahan alami, sering juga bahan lain (misalnya lemak,

resin) ikut dibebaskan bersama-sama dengan ekstrak yang diinginkan. Dalam hal itu larutan ekstrak tercemar yang diperoleh harus dibersihkan, yaitu misalnya diekstraksi lagi dengan menggunakan pelarut kedua.

- **Kelarutan**

Pelarut sedapat mungkin memiliki kemampuan melarutkan ekstrak yang besar (kebutuhan pelarut lebih sedikit).

- **Kemampuan tidak saling bercampur**

Pada ekstraksi cair-cair, pelarut tidak boleh (atau hanya secara terbatas) larut dalam bahan ekstraksi.

- **Kerapatan**

Terutama pada ekstraksi cair-cair, sedapat mungkin terdapat perbedaan kerapatan yang besar antara pelarut dan bahan ekstraksi. Hal ini dimaksudkan agar kedua fasa dapat dengan mudah dipisahkan kembali setelah pencampuran (pemisahan dengan gaya berat). Bila beda kerapatannya kecil, seringkali pemisahan harus dilakukan dengan menggunakan gaya sentrifugal (misalnya dalam ekstraktor sentrifugal).

- **Reaktivitas**

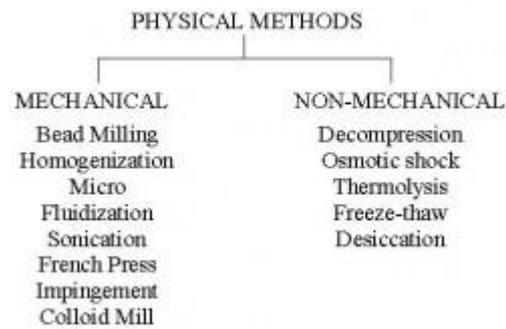
Pada umumnya pelarut tidak boleh menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen-komponen bahan ekstraksi. Sebaliknya, dalam hal-hal tertentu diperlukan adanya reaksi kimia (misalnya pembentukan garam) untuk mendapatkan selektivitas yang tinggi. Seringkali Ekstraksi juga disertai dengan reaksi kimia. Dalam hal ini bahan yang akan dipisahkan mutlak harus berada dalam bentuk larutan.

- **Titik didih**

Karena ekstrak dan pelarut biasanya harus dipisahkan dengan cara penguapan, destilasi atau rektifikasi, maka titik didih kedua bahan itu tidak boleh terlalu dekat, dan keduanya tidak membentuk azeotrop. Ditinjau dari segi ekonomi, akan menguntungkan jika pada proses ekstraksi titik didih pelarut tidak terlalu tinggi (seperti juga halnya dengan panas penguapan yang rendah).

Zhu et al. (2002) telah mengekstraksi lipid dari mikroalga *Mortierella alina* dan membuat perbandingan antara biomassa basah dan biomassa yang dikeringkan pada suhu 80 C. *Wet biomass* diekstraksi sesuai dengan prosedur *Bligh and Dryer* (1959) dan biomassa kering diekstraksi menggunakan kloroform-metanol (2:1, rasio v/v). Mereka menemukan bahwa ekstraksi kering lebih efektif dibandingkan dengan ekstraksi basah. Ekstraksi dengan pelarut masih menjadi metode ekstraksi yang paling sering digunakan oleh peneliti karena sederhana dan relatif murah karena tidak menggunakan alat (Letellier and Budzinski, 1999). Sekalipun banyak metode ekstraksi yang dikembangkan termasuk *supercritical* atau *subcritical fluid extraction*, *microwave* dan *ultrasound assisted extraction*, hasil dari ekstraksi lipid biomassa menggunakan pelarut organik masih ditemukan lebih baik dibandingkan dengan *supercritical fluid extraction* (Mendes et al., 2006). Perbandingan antara beberapa metode untuk mengekstrak senyawa dengan kepentingan farmasi dari mikroalga termasuk *Chlorella vulgaris* telah dilaporkan (Mendes et al., 2003) namun tidak ada perbandingan yang dibuat untuk melawan ekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform/metanol.

Perusakan dinding sel diperlukan untuk mengekstraksi kandungan esensial yang terdapat dalam jaringan intraseluler. Metode yang digunakan bervariasi bergantung pada tipe sel dan komposisi dinding sel. Tujuan utamanya adalah agar perusakan berlangsung secara efektif dan metode yang digunakan tidak boleh merusak kandungan yang ada di dalam sel. Terdapat beberapa metode perusakan dinding sel yang ditunjukkan pada bagan berikut. Sonikasi merupakan metode pemecahan dinding sel secara fisik (mekanikal), sementara *microwave* merupakan metode yang menggunakan gelombang elektromagnetik yang dapat menghasilkan panas.



Gambar 2. 4 Beberapa metode perusakan dinding sel

(Sumber: www.desmech.com)

2.2.1 Microwave

Microwave merupakan gelombang elektromagnetik *non-ionizing* yang memiliki frekuensi antara 300 MHz hingga 300 GHz dan terletak di antara X-ray dan sinar infra merah pada spektrum elektromagnetik. Pada jaman sekarang, *microwave* memiliki 2 kegunaan yaitu komunikasi dan energi vektor. Aplikasi *microwave* belakangan ini adalah gelombang ditembakkan secara langsung pada material, gelombang tersebut dapat mengkonversi bagian dari energi elektromagnetik yang diabsorp menjadi energi panas. *Microwave* terbuat dari 2 bagian yang berorientasi tegak lurus, yaitu *electric field* dan *magnetic field*. Tidak seperti pemanasan konvensional yang bergantung pada fenomena konduksi-konveksi yang menyebabkan energi panas hilang ke lingkungan, pada *Microwave Assisted Extraction (MAE)* panas terjadi secara selektif pada sampel yang dituju sehingga tidak ada panas yang dibuang ke lingkungan karena proses pemanasan ini terjadi pada sistem tertutup.

Prinsip pemanasan menggunakan *microwave* berdasarkan pada interaksi *electrical field* dengan senyawa material. Transformasi energi elektromagnetik menjadi energi panas terjadi oleh 2 mekanisme yaitu konduksi ionik dan rotasi dipol, yang dalam kebanyakan kasus terjadi secara simultan. Konduksi ionik menghasilkan panas karena resistansi medium terhadap laju ion. Migrasi ion terlarut menyebabkan tumbukan antara molekul karena arah ion berubah setiap tanda *field* berubah. Rotasi dipol berhubungan dengan pergerakan alternatif molekul polar yang mencoba untuk mengikuti *electric field*. Tumbukan *multiple*

dari agitasi molekul ini menghasilkan energi sehingga menaikkan temperatur. Panas terjadi pada frekuensi 2450 MHz. Komponen elektrik gelombang berubah 4.9×10^4 kali per sekon.

Keuntungan MAE dibandingkan dengan teknik ekstraksi konvensional adalah konsumsi pelarut yang lebih sedikit, waktu operasional yang lebih cepat, reproduktivitas yang baik, dan manipulasi sampel yang minimal untuk proses ekstraksi (Garcia-Ayuso et al., 1999).

MAE adalah metode berkecepatan tinggi untuk mengekstrak suatu senyawa secara selektif dari suatu material. MAE menggunakan energi radiasi *microwave* untuk memanaskan pelarut dengan cepat dan efisien. Dengan sistem tertutup, ekstraksi dapat dilakukan pada temperatur yang tinggi dan waktu ekstraksi dapat dikurangi secara drastis.

Penggunaan radiasi *microwave* ini mengurangi waktu proses dan menghemat energi karena energi disampaikan langsung pada material melalui interaksi molekul dengan gelombang elektromagnetik, sehingga panas digenerasi melalui volume bahan dan dapat memberikan panas yang cepat dan seragam pada bahan yang relatif tebal (Decareau, 1985; Ayappa, Davis, Davis, & Gordon, 1991; Thostenson & Chou, 1999; Venkatesh & Raghavan, 2004). Penelitian Widjaja, dkk (2010) menunjukkan bahwa *microwave* oven merupakan teknik ekstraksi lipid dari mikroalga yang paling sederhana, mudah dan efisien.

2.2.2 Sonikasi

Sonikasi adalah proses pengkonversian sinyal elektrik menjadi vibrasi fisik yang dapat ditembakkan langsung melalui suatu substansi. Pada skala lab, sonikasi digunakan bersama *ultrasonic bath* atau *ultrasonic probe*, rangkaian alat ini yang dikenal sebagai sonikator. Sonikasi dapat digunakan untuk meningkatkan kecepatan pemutusan dengan merusak interaksi intermolekuler. Selain itu, sonikasi juga dapat menghilangkan gas dari *liquid* (*degassing*) dengan mensonikasi *liquid* dalam keadaan vakum.

Pada aplikasi di bidang biologi, sonikasi dapat merusak atau mendeaktivasi material biologi. Sonikasi digunakan untuk merusak membran sel sehingga kandungan dalam sel dapat diambil. Proses ini disebut *sonoporation*. Vibrasi yang dihasilkan memiliki efek yang besar yaitu menyebabkan molekul

terpisah dan sel pecah. Metode ini banyak digunakan pada uji DNA, dimana sel yang mengandung DNA disonikasi untuk dipisahkan sehingga DNA protein yang terdapat didalamnya data diambil dan diuji. Sonikasi dapat memecahkan dinding sel dan membran akibat efek kavitasi telah banyak digunakan untuk merusak sel mikrobial (Engler, 1985; Lee et al., 1998).

Bagian utama pada sonikasi adalah generator elektrik ultrasonik. Alat ini menghasilkan sinyal (sekitar 20-50 MHz) yang memberikan energi pada *transducer*. *Transducer* ini mengkonversi sinyal elektrik dengan menggunakan kristal *piezoelectric*, atau kristal yang memberikan respon terhadap energi listrik yaitu dengan menghasilkan getaran (vibrasi) mekanis. Vibrasi secara molekuler ini, dipertahankan dan diperbesar oleh sonikator, hingga vibrasi ini melalui *probe*.

Probe mentransmisi vibrasi ke larutan yang disonikasi. *Probe* ini dikonstruksi sedemikian rupa untuk bergerak bersamaan dengan vibrasi dan mentransmisikannya ke larutan sampel. *Probe* bergerak ke atas dan ke bawah dengan kecepatan tinggi, walaupun amplitudonya diatur oleh operator dan dipilih bergantung pada larutan yang disonikasi.

Kecepatan gerak yang tinggi pada *probe* menyebabkan efek yang disebut kavitasi. Kavitasi terjadi ketika vibrasi menghasilkan serangkaian gelembung mikroskopik pada larutan, mendesak ruang kosong antara molekul kemudian pecah dan mengirim *shockwave* kecil pada substansi sekelilingnya. Sejumlah besar gelembung terbentuk dan pecah secara konstan menghasilkan gelombang vibrasi kuat yang mengitari larutan dan menghancurkan sel. Kavitasi yang dihasilkan oleh sonikasi dapat menghasilkan energi yang besar seperti energi panas, tekanan dan regangan mekanis (Chemat F, et al., 2004).

Terdapat banyak ukuran *probe* tip yang dapat dipilih berdasarkan jenis sonikasi yang akan dilakukan. Jenis tip yang kecil akan menghasilkan efek kavitasi yang baik dan dengan mudah dapat merusak dinding sel, namun memiliki area yang terbatas pada sekeliling *probe* saja. Tip yang lebih besar dapat mencapai kuantitas yang lebih besar namun tidak menghasilkan reaksi yang intens.

Energi ultrasonik telah terbukti dapat meningkatkan hasil ekstraksi dari jaringan vegetal melalui akselerasi rehidrasi atau mengembangkan sel tumbuhan dan diikuti dengan fragmentasi matriks jaringan (M. Toma, et al., 2001).

2.3 Lipid

Lipid mengacu pada golongan senyawa hidrokarbon alifatik nonpolar dan hidrofobik. Karena nonpolar, lipid tidak larut dalam pelarut polar seperti air, tetapi larut dalam pelarut nonpolar, seperti alkohol, eter atau kloroform. Fungsi biologis terpenting lipid di antaranya untuk menyimpan energi, sebagai komponen struktural membran sel, dan sebagai pensinyalan molekul.

Lipid adalah senyawa organik yang diperoleh dari proses dehidrogenasi endotermal rangkaian hidrokarbon. Lipid bersifat amfifilik, artinya lipid mampu membentuk struktur seperti vesikel, liposom, atau membran lain dalam lingkungan basah. Lipid biologis seluruhnya atau sebagiannya berasal dari dua jenis subsatuan atau "blok bangunan" biokimia: gugus ketoasil dan gugus isoprena. Dengan menggunakan pendekatan ini, lipid dapat dibagi ke dalam delapan kategori: asam lemak, gliserolipid, gliserofosfolipid, sfingolipid, sakarolipid, dan poliketida (diturunkan dari kondensasi subsatuan ketoasil); serta lipid sterol dan lipid prenol (diturunkan dari kondensasi subsatuan isoprena). Suatu molekul dikategorikan dalam lipid apabila :

- ✓ Mempunyai kelarutan yg rendah di dalam air
- ✓ Larut dalam pelarut organik (eter, kloroform)
- ✓ Terdiri dari C, H, O

Meskipun istilah *lipid* terkadang digunakan sebagai sinonim dari lemak, lipid juga meliputi molekul-molekul seperti asam lemak dan turunan-turunannya (termasuk tri-, di-) dan monogliserida dan fosfolipid, juga metabolit yang mengandung sterol, seperti kolesterol. Meskipun manusia dan mamalia memiliki metabolisme untuk memecah dan membentuk lipid, beberapa lipid tidak dapat dihasilkan melalui cara ini dan harus diperoleh melalui makanan.

Lipid diklasifikasikan berdasarkan struktur dan fungsinya. Berdasarkan strukturnya, lipid dibagi 2 menjadi:

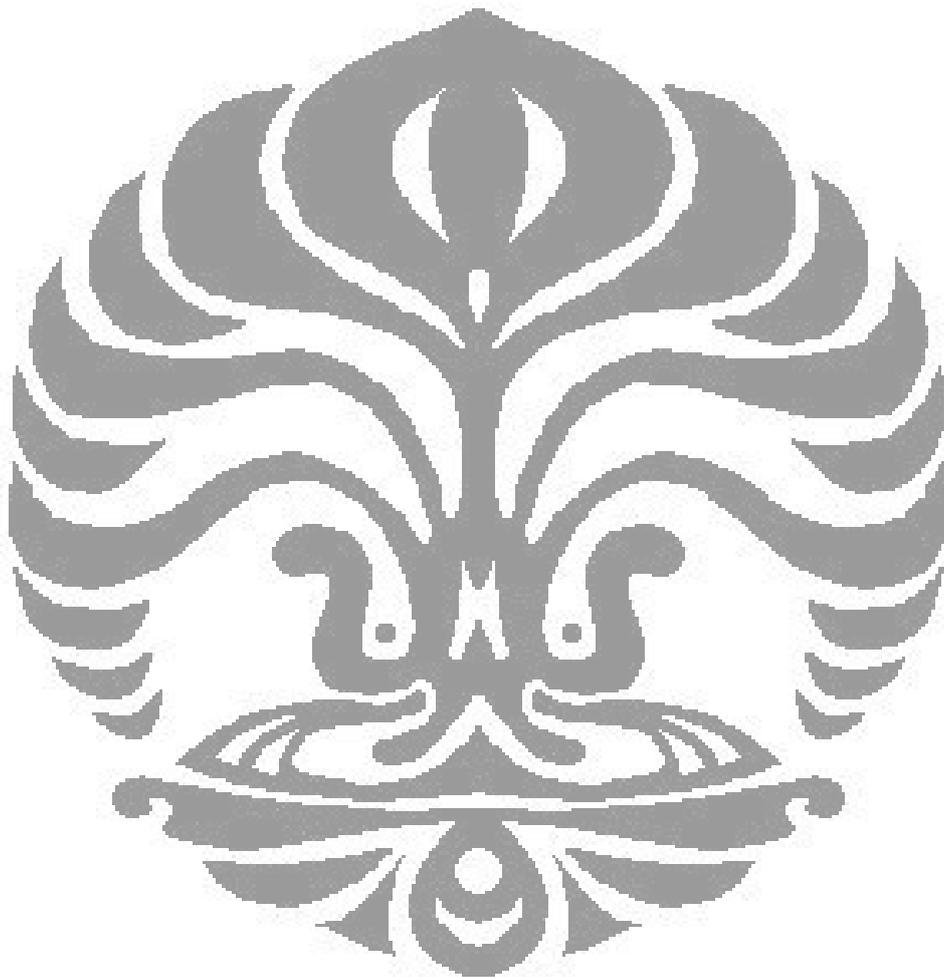
1. Lipid dengan rantai hidrokarbon yang terbuka (asam lemak, TAG, spingolipid, fosfoasilgliserol, dan glikolipid)
2. Lipid dengan rantai hidrokarbon siklis (steroid)

Sementara berdasarkan fungsinya:

- ✓ Lipid simpanan (*storage lipid*)

- ✓ Lipid struktural (penyusun membran)
- ✓ Lipid fungsional (sebagai kofaktor, pigmen)

Berikut merupakan jenis-jenis asam lemak yang terdapat pada hewan dan tumbuh-tumbuhan.



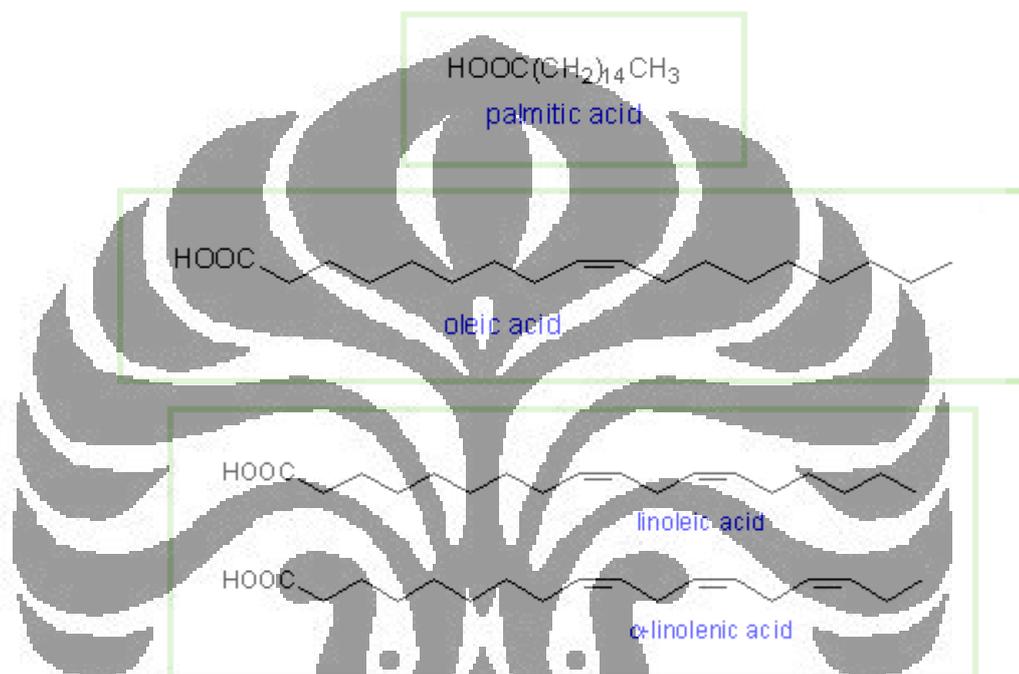
Tabel 2. 3 Macam-macam asam lemak

NAMA SISTEMATIK	NAMA TRIVIAL	SINGKATAN
Asam lemak jenuh		
ethanoic	Acetic	2:0
butanoic	butyric	4:0
hexanoic	caproic	6:0
octanoic	caprylic	8:0
decanoic	capric	10:0
dodecanoic	lauric	12:0
tetradecanoic	myristic	14:0
hexadecanoic	palmitic	16:0
octadecanoic	stearic	18:0
eicosanoic	arachidic	21:0
docosanoic	behenic	22:0
Asam Lemak Monoenoic		
cis-9-hexadecenoic	palmitoleic	16:1 (n-7)
cis-6-octadecenoic	petroselinic	18:1 (n-12)
cis-9-octadecenoic	oleic	18:1 (n-9)
cis-11-octadecenoic	cis-vaccenic	18:1 (n-7)
cis-13-docosenoic	erucic	22:1 (n-9)
cis-15-tetracosenoic	nervonic	24:1 (n-9)
Asam Lemak Poli-takjenuh		
9,12-octadecadienoic	linoleic	18:2 (n-6)
6,9,12-octadecatrienoic	γ -linolenic	18:3 (n-6)
9,12,15-octadecatrienoic	α -linolenic	18:3 (n-3)
5,8,11,14-eicosatetraenoic	arachidonic	20:4 (n-6)
5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA	20:5 (n-3)
4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	DHA	22:6(n-3)

Sumber: The AOCs Lipid Library
(<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip/index.htm>)

Pada penelitian Knothe (2008), jenis asam lemak yang biasanya terdapat pada biodiesel adalah *palmitic*, *stearic*, *oleic* dan *linolenic acid*. Asam lemak jenuh yang paling banyak terdapat di alam adalah hexadecanoic atau asam palmitat. Asam palmitat ini dikenal dengan asam lemak “16:0”, angka pertama mengindikasikan jumlah atom karbon pada ikatan alifatik, sementara angka kedua mengindikasikan jumlah ikatan rangkap. *Oleic* atau *cis-9-octadecenoic acid*, merupakan asam lemak *monoenoic* yang paling banyak terdapat di alam. Asam

lemak ini menunjuk sebagai "18:1" atau "18:1(*n*-9)", untuk mengindikasikan bahwa ikatan rangkap yang terakhir adalah 9 atom karbon dari terminal metil grup. Asam lemak *polyunsaturated* C18, linoleat atau *cis*-9,*cis*-12-*octadecadienoic acid* (18:2(*n*-6)) dan α -linolenic or *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-*octadecatrienoic acid* (18:3(*n*-3)), adalah komponen utama pada sebagian besar lipid tanaman, termasuk pada minyak tumbuh-tumbuhan yang penting secara komersial.



Gambar 2. 5 Struktur beberapa jenis asam lemak

(Sumber: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip>)

Lipid terakumulasi pada biji-bijian seperti pada bunga matahari, minyak lobak, biji pohon rami, kacang kedelai, kacang, minyak zaitun dan pada alga. Lipid memiliki energi *value* yang tinggi dan dapat digunakan untuk memanaskan boiler atau digunakan sebagai bahan bakar diesel. Namun, minyak ini tidak dapat langsung diinjeksikan ke dalam mesin karena viskositasnya yang tinggi.

Banyak penelitian yang menyatakan bahwa kandungan lipid dapat meningkat akibat keadaan lingkungan yang kurang baik (*stress*). Hal ini terjadi apabila kekurangan nitrogen pada medium sehingga meningkatkan akumulasi lipid (Evans and Ratledge, 1984b; Yoon and Rhee, 1983a). Sheehan et al (1998) juga melaporkan bahwa alasan peningkatan produksi lipid adalah karena pada

kondisi kekurangan nitrogen, laju produksi semua komponen sel rendah, namun produksi minyak tetap tinggi yang akhirnya akan meningkatkan akumulasi minyak pada sel. Kondisi lingkungan yang sulit seperti kekurangan nitrogen akan mencegah pembelahan sel tanpa mengurangi laju produksi minyak. Mereka juga menyarankan pengendalian waktu pada pengurangan nitrogen dan waktu pemanenan dapat meningkatkan produktivitas minyak.

Berdasarkan laporan *Department of Energi's Aquatic Species Program* Amerika Serikat, mikroalga yang memiliki 20% lipid dapat memproduksi sekitar 2,000 galon minyak per *acre* per tahun. Beberapa alga lain yang memiliki kandungan lipid sebesar 60% dapat menghasilkan minyak sebanyak 6,000 galon per *acre* per tahun.

Analisis konversi bahan bakar dari biomassa mikroalga telah didemonstrasikan bahwa mikroalga cukup menjanjikan pada produksi bahan bakar melalui proses konversi berbasis pada lipid seluler. Dua konversi fuel yang paling menjanjikan adalah transesterifikasi untuk memproduksi bahan bakar diesel dan konversi katalitik untuk memproduksi *gasoline*. Meskipun lipid mikroalga mewakili produk energi premium, energi yang terdapat pada konstituen biomassa yang lain juga dapat digunakan, seperti residu sel setelah ekstraksi lipid dapat diolah secara anaerob untuk produksi metana dan CO₂ (Donna A. Johnson, 1987).

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 stres, beberapa jenis mikroalga akan mengubah jalur biosintetik lipidnya menjadi lemak-lemak netral (20- 50%) dan TGs. Umumnya komposisi asam lemak dari mikroalga merupakan campuran dari asam lemak tak jenuh (*unsaturated fatty acids*) seperti: Asam Palmitoleat (C16:1), Asam Oleat (C18:1), Asam Linoleat (C18:2) and Asam Linolenat (C18:3). Asam lemak-asam lemak jenuh seperti Asam Palmitat (C16:0) dan Asam Stearat (C18:0) juga ditemukan dalam jumlah kecil. Akan tetapi proses *freeze drying* yang umum dilakukan pada proses ekstraksi minyak dari mikroalga dapat merusak 5,8,11,14-*Eicosatetraenoic* (*Arachidonic Acid* C20:4) (Orchidea, 2010). Menurut penelitian Lee (2010),

persentase *fatty acid* terbesar yang dimiliki oleh *Chlorella* sp. yaitu C18:2 sebesar 79.4% dan C18:1 sebesar 16.3%.

2.4 Biodiesel

Biodiesel adalah biofuel yang paling sering umum di Eropa. Biodiesel diproduksi dari minyak atau lemak jenis trigliserida melalui proses transesterifikasi. Nama kimianya adalah *fatty acid methyl* (atau *ethyl*) *ester* (FAME). Minyak dicampur dengan sodium hidroksi dan metanol (atau etanol) dan reaksi kimianya membentuk produk berupa biodiesel (FAME) dan gliserol. Bahan baku biodiesel adalah lemak hewan, minyak sayur, kacang kedelai, *rapeseed*, *jatropha oil* (Barnwal and Sharma, 2005), *mahua*, *mustard*, *flax*, bunga matahari, minyak palem dan alga. Biodiesel murni (B100) memiliki emisi bahan bakar yang paling rendah.

Biodiesel dapat di produksi dari 100% biodiesel (B100) atau campuran dengan bahan bakar disel yang berasal dari minyak bumi. Biodiesel dapat bercampur dengan solar dan berdaya lumas lebih baik. Selain itu mempunyai kadar belerang hampir nihil. Jenis biodiesel ditentukan oleh kandungan biodiesel dalam bahan bakar tersebut.

Terdapat 4 cara utama untuk membuat biodiesel yaitu *direct use* and *blending*, *microemulsion*, *thermal cracking (pyrolysis)* dan transesterifikasi (Ma dan Hanna, 1999). Cara yang paling sering dilakukan adalah transesterifikasi karena biodiesel hasil transesterifikasi dapat digunakan secara langsung atau dicampur dengan bahan bakar diesel dalam mesin diesel (Peterson et al., 1991, Zhang et al., 2003).

Adapun beberapa keunggulan biodiesel adalah sebagai berikut :

1. Biodiesel dapat digunakan pada semua motor diesel tanpa diperlukan modifikasi.
2. Biodiesel dapat digunakan sebagai pengganti solar, campuran antara biodiesel dan solar maupun sebagai aditif untuk solar. Sebagai aditif 0,4-5% biodiesel dicampur dengan solar dapat meningkatkan pelumasan dari solar. Biodiesel dapat dicampur pada segala perbandingan dengan solar. Campuran 20% biodiesel dan 80% solar biasa disebut dengan B20. B20

menjadi bahan bakar alternatif yang populer karena menurunkan emisi dan mempunyai harga yang terjangkau.

3. Biodiesel mengurangi emisi tanpa mengorbankan unjuk kerja dan efisiensi. Biodiesel B20 dapat mengurangi partikel sebanyak 30%, CO₂ sebanyak 21%, dan hidrokarbon total sebanyak 47%.
4. Biodiesel murni (100%) memiliki beberapa keunggulan yaitu :
 - Menurunkan emisi CO₂ sampai 100%.
 - Menurunkan emisi SO₃ sampai 100%.
 - Menurunkan emisi CO antara 10-50%.
 - Menurunkan emisi HC antara 10-50%.
 - Menurunkan emisi hidrokarbon aromatik polisiklik (PAHs) sampai 75%.
5. Biodiesel terdiri hampir 10% oksigen, sehingga biodiesel dapat melakukan pembakaran yang lebih sempurna.
6. Biodiesel dapat memperpanjang umur mesin motor diesel karena efek pelumasannya yang sangat baik.
7. Biodiesel mempunyai angka setana 10-15 lebih tinggi dari solar, menyebabkan pembakaran yang cepat, motor bekerja lebih halus dan tidak berisik. Angka setana yang tinggi juga mengurangi terjadinya detonasi pada motor diesel.
8. Biodiesel memiliki *flash point* yang lebih tinggi daripada solar sehingga mudah dalam penyimpanan.
9. Biodiesel tidak mudah terbakar.
10. Biodiesel tidak beracun karena terbuat dari bahan alami.
11. Biodiesel juga mudah diserap oleh alam dalam waktu 21 hari, sehingga tidak berpotensi pada pemanasan global.

Kebutuhan biodiesel yang besar otomatis akan membutuhkan bahan baku yang besar pula. Kriteria bahan baku yang dibutuhkan adalah mudah tumbuh, mudah dikembangkan secara luas, dan mengandung minyak nabati yang cukup besar. Berikut adalah pemaparan kelebihan alga sebagai bahan baku biodiesel.

- Alga mengandung minyak nabati hingga 75%

Salah satu alasan utama mengapa alga digunakan menjadi biodiesel adalah kandungan minyak nabati pada alga jauh lebih banyak jika dibandingkan dengan bahan baku biodiesel lain seperti kacang kedelai, kapas, jatropha dan lain-lain. Dengan lebih tingginya kandungan minyak nabati pada alga dibanding dengan tumbuhan lain maka kebutuhan lahan untuk produksi biodiesel dari alga juga lebih sedikit

- Alga merupakan jenis tumbuhan yang paling cepat tumbuh di alam

Jagung atau tanaman pertanian lain membutuhkan waktu hingga setahun untuk tumbuh, sementara alga dapat tumbuh dalam beberapa hari. Waktu panen alga yang cepat dapat menghasilkan yang lebih efisien dengan jangka waktu yang lebih singkat dalam area yang lebih kecil jika dibandingkan dengan tumbuhan lain.

- Alga mengkonsumsi karbon dioksida ketika tumbuh, sehingga dapat mengurangi pencemaran lingkungan

Ketergantungan akan BBM mengakibatkan peningkatan kandungan CO₂ di atmosfer. Dengan memanfaatkan alga yang mengkonsumsi CO₂ untuk menghasilkan minyak, biodiesel dapat diproduksi secara efisien sementara mengurangi penambahan CO₂ ke atmosfer.

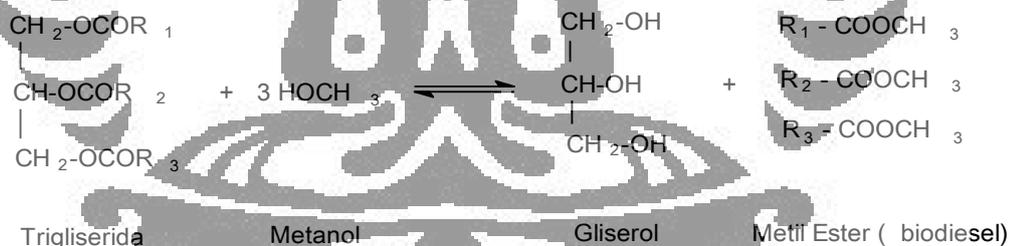
- Sumber pertumbuhan alga mudah diperoleh

Agar dapat tumbuh dengan baik alga hanya membutuhkan beberapa sumber dasar yaitu: CO₂, air, cahaya matahari dan nutrisi. Cahaya matahari dapat diperoleh hampir sepanjang tahun, ketika malam maka dapat digunakan lampu untuk menggantikan cahaya matahari. Karbon dioksida dapat diperoleh dalam konsentrasi tinggi dari *power plant* dan proses industri sebagai gas buangan. Alga dapat tumbuh di kebanyakan sumber air dengan variasi tingkat pH. Alasan ini menjadi salah satu kelebihan alga karena alga tidak perlu bersaing dengan manusia atau tumbuhan pertanian lain dalam mengkonsumsi air bersih.

Mikroalga dipercaya sebagai kandidat yang sangat baik untuk produksi bahan bakar karena kelebihan mereka pada efisiensi fotosintesis, produksi biomassa dan kecepatan tumbuh dibandingkan dengan sumber energi yang lain

(Dote et al., 1994; Ginzburg, 1993; Miao and Wu, 2006; Milne et al., 1990; Minowa et al., 1995). Sistem mikroalga juga menggunakan lebih sedikit air dibandingkan dengan sumber minyak tradisional lain. Oleh karena itu, mikroalga mampu memproduksi lebih banyak minyak per unit area, dibandingkan dengan bahan baku minyak terestrial yang lain. Mikroalga merupakan biomassa yang sangat efisien karena mampu memproses limbah CO₂ menjadi energi (*natural oil*).

Ratusan mikroalga yang dapat memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi dan metabolisme produksi lipid sudah dilakukan dan dikarakterisasi (Sheehan et al., 1998). Kebanyakan adalah mikroalga laut. Baru-baru ini, Miao dan Wu (Miao and Wu, 2004, 2006; Miao et al., 2004; Wu et al., 1992, 1994) melaporkan bahwa pertumbuhan mikroalga heterotopik *Chlorella protothecoides* dapat menghasilkan 55% kandungan lipid dan lipid dikonversi menjadi biodiesel. Produksi metil ester atau biodiesel dari minyak mikroalga telah didemonstrasikan (Belarbi et al., 2000) meskipun produk yang dihasilkan ditujukan untuk keperluan farmasi. Pada penelitian Knothe (2008), jenis asam lemak yang biasanya terdapat pada biodiesel adalah *palmitic, stearic, oleic* dan *linolenic acid*.



Gambar 2. 6 Reaksi Transesterifikasi

(Sumber: Chisti, 2007)

Kandungan minyak pada mikroalga dapat melampaui 80% dari berat kering biomassa (Metting, 1996; Spolaore et al., 2006). Produktivitas minyak bergantung pada laju pertumbuhan alga dan kandungan minyak pada biomassa. Mikroalga dengan produksi minyak yang cukup tinggi dapat digunakan untuk memproduksi biodiesel.

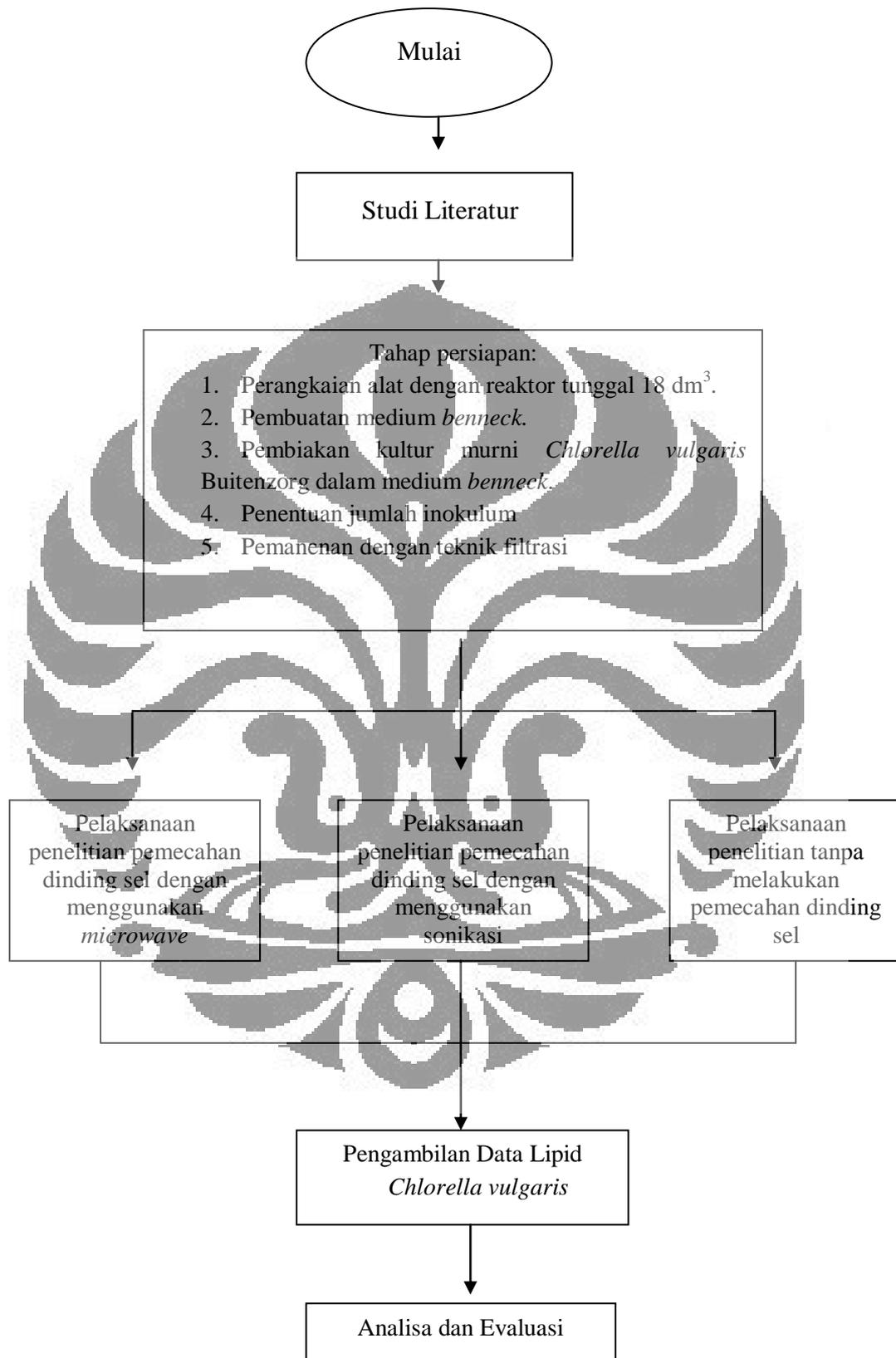
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Diagram Alir Penelitian

Penelitian akan dibagi dalam beberapa tahap, dimana tahap pra-penelitian adalah melakukan studi literatur mengenai hal-hal yang berhubungan dengan pemecahan dinding sel dan ekstraksi lipid dari mikroalga. Lalu, penelitian utamanya menyangkut tiga hal, yaitu persiapan, pemanenan, dan pengujian. Setelah itu, dilakukan analisa dan evaluasi hasil penelitian, dan terakhir, dibuat kesimpulan.





Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- Fotobioreaktor *flat* transparan berbentuk akuarium dengan kapasitas 18 dm³ yang dilengkapi dengan aliran *input* dan *output* gas CO₂ dan udara.
- Kompresor udara portabel.
- Tabung gas CO₂ yang dilengkapi dengan regulator.
- Flowmeter udara dan flowmeter CO₂.
- Lampu *Phillip Hallogen* 20W/12V/50Hz dan transformator 220V primer/12V sekunder dengan intensitas maksimum sebagai sumber iluminasi.
- T-septum yang terbuat dari bahan gelas sebagai titik indikator konsentrasi CO₂ yang masuk ke dalam fotobioreaktor.
- Peralatan *glassware* yang terdiri dari erlenmeyer 100 cm³ (sebagai *discharge* gas CO₂ dan udara *output* fotobioreaktor, pipet ukur 5 cm³, pipet pasteur, gelas ukur 10 cm³, 100 cm³ botol sampel sel, dan beaker glass 20 cm³ dan 100 cm³).
- Selang silikon dan selang plastik (sebagai rangkaian peralatan dan konektor rangkaian).
- Unit *Gas Chromatography* TCD Shimadzu GC-8A (untuk mengukur konsentrasi gas CO₂ *input* dan *output* fotobioreaktor), *Recorder* C-R6A *Chromatograph* (untuk mendapatkan printout dari hasil GC), serta tabung gas (*carrier gas*) Argon.
- *Syringe* 1001 RT *Hamilton* 1 cm³ (*inlet-outlet*) (untuk mengambil sampel dari *input* dan *output* CO₂).
- *Set Lightmeter* Lxtron LX-103 (sebagai penghitung kekuatan intensitas cahaya, dengan satuan Lx ataupun *Foot-Candle*).
- pH meter HANNA Model HI 8014 dengan larutan buffer 4 dan 7.
- Lemari kerja ultraviolet (sebagai *transfer box*).
- Oven (untuk sterilisasi alat dan mengeringkan sel *Chlorella*).

- *Spectro UV-VIS RS Spectrometre*, LaboMed. Inc (untuk menghitung OD/absorbansi) dan *Centrifuge* (untuk memisahkan sel *Chlorella vulgaris* dari mediumnya).
- *Sonicator* untuk memecah dinding sel *Chlorella sp.*
- *Microwave* untuk memecah dinding sel *Chlorella sp.*

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Starter mikroalga hijau *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.
- KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaNO_3 , dan FeCl_3 untuk membuat medium *Benneck*
- Gas CO_2 sebagai bahan untuk fotosintesis mikroalga.
- *Aquadest* untuk membuat medium *Benneck* dan mencuci peralatan.
- Alkohol 70% untuk sterilisasi peralatan.
- Kloroform dan Metanol sebagai pelarut dalam ekstraksi lipid.

3.3 Variabel dalam Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel yang akan divariasikan pada penelitian ini adalah berbagai teknik pemecahan dinding sel mikroalga *Chlorella vulgaris* yaitu *microwave* dan sonikasi. Dari alat-alat tersebut akan dicari keadaan yang paling optimum untuk didapatkan total lipid yang paling efektif baik secara jumlah, komposisi maupun efisiensi alat.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel yang akan diukur pada penelitian ini adalah: total berat lipid dan *yield* yang dihasilkan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Studi Literatur

Studi literatur dilakukan sebelum menjalankan persiapan, semua literatur yang berkaitan dengan penelitian dikumpulkan dan dipelajari.

3.4.2 Tahap Persiapan

- Sterilisasi peralatan

Peralatan yang digunakan pada penelitian harus disterilisasi terlebih dahulu agar tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme atau zat pengganggu yang dapat menghambat pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

Prosedur sterilisasi peralatan terbagi menjadi dua yaitu untuk peralatan yang terbuat dari gelas tahan panas dan untuk peralatan yang terbuat dari gelas tidak tahan panas. Untuk peralatan yang terbuat dari gelas tahan panas, prosedur sterilisasi peralatannya adalah mencuci peralatan dengan sabun dan dibilas dengan air sampai bersih, mengeringkan peralatan dengan tisu atau kompresor udara dan kemudian menutup peralatan yang berlubang atau berongga dengan *aluminium foil* agar tidak terkontaminasi setelah disterilisasi, memasukkan peralatan yang akan disterilisasi ke dalam *autoclave* dan disterilisasi pada suhu 120 °C selama $\pm 1,5$ jam untuk medium dan ± 45 menit untuk peralatan gelas, menyimpan peralatan yang sudah disterilisasi di dalam lemari penyimpanan yang dilengkapi dengan lampu UV.

Untuk peralatan yang terbuat dari gelas tidak tahan panas, prosedur sterilisasi peralatannya adalah sebagai berikut mencuci peralatan dengan sabun dan dibilas dengan air sampai bersih, mengeringkan peralatan dengan tisu atau kompresor udara dan kemudian menutup peralatan yang berlubang atau berongga dengan *aluminium foil* agar tidak terkontaminasi setelah disterilisasi, membilas peralatan dengan alkohol 70 % selama ± 5 menit dan kemudian dibilas dengan aquadest sebanyak 20 kali untuk memastikan tidak ada sisa alkohol pada alat, menyimpan peralatan yang sudah disterilisasi di dalam lemari penyimpanan yang dilengkapi dengan lampu UV selama ± 2 jam sebelum digunakan. Sterilisasi ini dilakukan sebelum alat tersebut dipakai, karena jika dibandingkan dengan peralatan yang dipanaskan, sterilisasi dengan prosedur ini lebih tidak tahan terhadap kontaminasi.

- Pembuatan medium *Benneck*

Penggunaan medium *Benneck* untuk kultivasi *Chlorella vulgaris* Buitenzorg didasarkan atas pertimbangan antara lain karena nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Buitenzorg terdapat pada medium ini dan juga medium *Benneck* ini mudah dibuat.

Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat medium *Benneck* yaitu :

Tabel 3. 1 Bahan Medium *Benneck*

Bahan	Aquadest (mg/dm ³)
KH₂PO₄	100
MgSO₄.7H₂O	200
NaNO₃	500
FeCl₃	3-5

Cara pembuatan 1 dm³ medium *Benneck* adalah menyiapkan bahan-bahan pada tabel 3.1 di atas, kemudian melarutkan bahan-bahan tersebut dalam 1 dm³ *aquadest* dan diaduk sampai semuanya larut, mensterilkan medium menggunakan *autoclave* selama ± 1,5 jam kemudian didinginkan, menyimpan medium tersebut dalam lemari pendingin bila tidak langsung digunakan. Apabila terdapat endapan di dasar medium maka endapan tersebut harus dipisahkan dahulu sebelum disimpan.

- Pembuatan rangkaian peralatan

Penelitian ini menggunakan fotobioreaktor *flat* berukuran 18 dm³ dan dirangkai seperti yang ditunjukkan gambar 3.2. Fotobioreaktor yang akan digunakan diletakkan dalam posisi sejajar dan menghadap ke lampu halogen sebagai sumber iluminasi.

Kalibrasi flowmeter dilakukan agar dapat diketahui dengan tepat skala dari masing-masing flowmeter. Hal ini penting karena gas yang mengandung CO₂ yang akan dialirkan harus selalu dijaga konstan. Pada tiap sambungan selang dilapisi dengan *pipe seal* untuk memastikan tidak ada sambungan yang bocor sekaligus mencegah kontaminan masuk

kedalam rangkaian. Sumber iluminasi yang digunakan adalah dua buah lampu halogen dengan kekuatan intensitas cahaya sampai 110,000 lx.

Berikut adalah ilustrasi rangkaian alat penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini, yaitu:



Gambar 3. 2 Rangkaian Peralatan Fotobioreaktor Tunggal

(Sumber : Fadli Yusandi, 2010)

- Pemiakan kultur murni *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dalam medium *Benneck*

Prosedur pemiakan kultur murni adalah menyiapkan medium *Benneck* dan peralatan pemiakan (wadah, selang udara, tutup wadah) yang telah disterilkan terlebih dahulu, stok murni *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dimasukkan ke dalam wadah steril dan dicampur dengan medium *Benneck* yang telah steril. Perbandingan antara jumlah stok *Chlorella* dengan medium dapat diatur sesuai kebutuhan riset. Peminahan ini harus dijaga steril, dilakukan dalam *transfer box*, setelah lingkungan disterilkan dengan alkohol 70% dan menggunakan api bunsen.

Lalu medium kultur tersebut dipindahkan ke dalam fotobioreaktor pembiakkan dan di-*bubbling* dengan menggunakan kompresor udara. Pada tahap ini juga harus diberikan cahaya namun cukup dengan intensitas kecil $\pm 3,000$ lx.

Pembiakan dapat dilakukan selama satu minggu atau lebih bila bertujuan untuk memperbanyak stok yang ada, tetapi jika hanya untuk melewati *lag time* dapat dilakukan selama 2-3 hari atau ± 60 jam, tergantung pertumbuhan jumlah selnya.

- Pembuatan kurva kalibrasi OD₆₀₀ vs X (berat kering biomassa)

Pembuatan kurva kalibrasi OD₆₀₀ vs X (berat kering biomassa) penting dalam penelitian ini, karena berkaitan langsung dengan jumlah sel *Chlorella sp.* yang terdapat dalam kultur. Berat kering biomassa perlu diketahui agar dapat dilihat perubahan jumlahnya dan hal ini berkaitan dengan besar intensitas cahaya yang dibutuhkan.

Langkah-langkah penghitungan adalah kultur yang akan diukur berat kering biomasanya diaduk sampai semua endapan *Chlorella vulgaris* Buitenzorg merata dalam medium, kemudian mengambil 5 mL sampel untuk diukur *optical density*nya.

Spektrofotometer di-set pada panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang 600 nm didapat dari *peak* yang keluar selama kalibrasi panjang gelombang dengan menggunakan *Spektrofotometer Double Beam*. Untuk melihat nilai OD pada penelitian ini digunakan *spektrofotometer single beam*, dan cahaya tampak (VIS) sebagai sumber cahaya yang akan diabsorpsi oleh *Chlorella sp.*, kalibrasi spektrofotometer dengan menggunakan kuvet berisi aquades/medium pada panjang gelombang yang sama, kemudian mengatur agar absorbansinya menunjukkan angka 0.000 (nol), masukkan sampel ke dalam kuvet, kemudian uji dalam spektrofotometer. Data yang diambil adalah nilai absorbansi pada range 0.2-0.4, jika melebihi dari range tersebut maka sampel harus diencerkan sampai nilai absorbansinya mencapai *range* tersebut. Jika dilakukan

pengenceran maka jumlah selnya dikalikan jumlah pengenceran yang dilakukan.

Untuk pengukuran berat kering biomasnya, sampel yang telah diukur *optical density*nya disentrifuge untuk dipadatkan biomasnya. Setelah itu, biomassa yang telah padat dipisahkan dari mediumnya dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk dikeringkan. Setelah dikeringkan di dalam *oven*, sampel ditimbang beratnya. Berat kering biomassa yang dihasilkan merupakan pengurangan dari berat cawan petri yang berisi biomassa dengan berat cawan petri kosong. Selanjutnya membuat kurva antara OD₆₀₀ dengan berat kering biomassa sehingga didapatkan suatu persamaan linear yaitu $y = 0.57016x - 0.019478$.

3.4.3 Tahap Pengujian

Pada tahap ini, dinding sel mikroalga yang dipanen akan dirusak menggunakan beberapa alat:

1. *Microwave*

Pada tahap ini akan digunakan *microwave oven* pada temperatur 100°C dan 2450 MHz selama 5 menit (Lee, 2010)

2. Sonikasi

Pada tahap ini akan digunakan sonikator pada resonansi 53 kHz selama 10 menit (Lee, 2010, dengan modifikasi)

Setelah dinding sel dirusak, lipid yang terdapat pada sel mikroalga dapat kita pisahkan dari kandungan sel mikroalga lain dengan cara ekstraksi. Metode ekstraksi lipid yang digunakan adalah metode *Bligh and Dryer*, yaitu sebagai berikut:

1. Mikroalga yang telah dipecah dinding selnya di-sentrifuge selama 10 menit sehingga terjadi pemisahan antara alga dengan medium
2. Mengukur volume cake yang telah dipisahkan dengan supernatannya
3. Mencampurkan cake dengan 2 mL metanol dan 1 mL kloroform menggunakan vortex
4. Setelah tercampur sempurna, cake tersebut ditambahkan 1 mL kloroform dan 1 mL air RO, vortex hingga tercampur

5. Setelah itu, campuran di-sentrifuge kembali selama 10 menit
6. Terjadi pemisahan pada campuran, ambil bagian bawah yang berwarna kuning (lipid) dengan pipet tetes
7. Lipid tersebut diletakkan dalam cawan petri untuk mengeringkan pelarut kloroform
8. Berat lipid didapatkan dari selisih antara berat cawan kosong dan berat cawan dengan lipid kering

3.4.4 Tahap Analisa dan Evaluasi

Pada penelitian ini, ada beberapa hal yang akan dianalisa yaitu:

1. Volume yang paling optimal untuk mengekstrak lipid dengan metode *Bligh and Drier* yang memiliki perbandingan volume kloroform-metanol 1:1.
2. Perbedaan antara hasil kultivasi berupa refresh dan filtrat
3. Metode pemecahan dinding sel yang paling baik untuk mendapatkan lipid dalam jumlah optimal

Parameter yang diukur adalah total lipid (*yield*) yang dihasilkan. Kandungan lipid yang telah diekstraksi dengan menggunakan 2 metode pemecahan dinding sel yang berbeda dan tanpa pemecahan dinding sel kemudian dibandingkan. Setelah dilakukan analisis tersebut, maka kita dapat mengevaluasi dan menentukan metode pemecahan dinding sel yang paling efektif untuk mendapatkan lipid dan komposisi asam lemak yang dihasilkan dari mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

Sementara kandungan *fatty acid* nantinya akan dapat dianalisa menggunakan kromatografi gas. Komponen diidentifikasi dengan membandingkan waktu retensi dan pola fragmentasi dengan standar (Xu et al, 2001). Enam *fatty acid* (C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, dan C18:3) digunakan sebagai material standard.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dijelaskan mengenai pelaksanaan penelitian, pengamatan yang dilakukan selama penelitian, data yang diambil dalam penelitian ini, dan analisa dari data yang didapatkan.

4.1 Pembahasan Umum

Lipid merupakan hal yang esensial yang terdapat dalam mikroalga. Mikroalga *Chlorella vulgaris* sendiri memiliki kandungan lemak sebesar 14 – 22%. Lipid dapat digunakan lebih lanjut untuk berbagai kebutuhan. Salah satunya sebagai bahan baku biodiesel melalui proses transesterifikasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemecahan dinding sel mikroalga untuk meningkatkan produksi lipid dan kandungan esensial lain pada mikroalga *Chlorella vulgaris*. *Chlorella vulgaris* sendiri memiliki dinding sel *glucosamine* yang dapat terbilang cukup tebal sehingga dengan memecah dinding sel diharapkan akan kita dapatkan jumlah lipid yang lebih banyak.

Pada penelitian ini akan dibandingkan 2 jenis teknik pemecahan dinding sel yang telah sering diaplikasikan untuk memecah dinding sel substansi lain, yaitu MAE (*Microwave Assisted Extraction*) dan sonikasi. Kedua metode ini sering digunakan untuk memecah dinding sel pada tumbuh-tumbuhan dan pada uji DNA. Kedua metode ini belum pernah diujicobakan untuk memecah dinding sel *Chlorella sp.* Oleh karena itu, hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah metode pemecahan dinding sel mana yang memberikan jumlah lipid yang paling optimal pada tingkat kerapatan sel tertentu.

Pada tahap awal penelitian, medium yang akan digunakan dipersiapkan terlebih dahulu. Medium yang digunakan adalah medium *Benneck* dengan menggunakan senyawa $MgSO_4$, KH_2PO_4 , $FeCl_3$, dan $NaNO_3$ sebagai sumber nutrisi. Komposisi dalam medium *Benneck* dipilih karena senyawa yang digunakan tersebut mempunyai nutrisi mikro maupun makro yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroalga.

Setelah medium selesai dibuat, langkah selanjutnya adalah merangkai peralatan yang akan digunakan. Peralatan yang dirangkai pertama kali adalah fotobioreaktor. Jenis fotobioreaktor yang digunakan pada penelitian ini adalah fotobioreaktor *flat* atau datar. Kapasitas dan dimensi fotobioreaktor yang digunakan adalah 18 dm³. Desain fotobioreaktor tersebut dipilih karena berdasarkan penelitian sebelumnya mampu mengurangi terjadinya *self shading*, peristiwa bertumpuknya sel *Chlorella* akibat pertumbuhan biomassa yang semakin padat sehingga cahaya sulit mencapai seluruh sel biomassa. Selain itu, fotobioreaktor *flat* juga lebih sederhana untuk skala laboratorium. Bahkan, penelitian-penelitian di Italia, Jerman, dan Israel yang menggunakan fotobioreaktor *flat* menunjukkan betapa menjanjikannya peralatan kultur tersebut.

Salah satu rangkaian yang tidak kalah pentingnya adalah cahaya. Cahaya merupakan salah satu bagian terpenting bagi proses fotosintesis mikroalga. Tanpa adanya cahaya, ATP dan NADPH yang dibutuhkan untuk membentuk senyawa kimia organik tidak akan terbentuk. Namun, cahaya tersebut ada kondisi optimumnya. Pada penelitian ini, jenis pencahayaan yang digunakan adalah kontinyu. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya oleh Sang Made Kresna dan telah divalidasi oleh Ponco Widodo mengenai intensitas cahaya optimum, diketahui bahwa intensitas cahaya optimum untuk pencahayaan kontinyu sebesar 4000 lux. Jika lebih kecil dari kondisi optimum tersebut, proses fotosintesis mikroalga sulit untuk terjadi sehingga pertumbuhannya menjadi rendah. Namun, apabila lebih dari kondisi optimumnya tersebut akan berakibat fotoinhibisi, cahaya menjadi pencegah terjadinya proses fotosintesis dan akan merusak struktur sel mikroalga, terutama kloroplas.

Setelah rangkaian fotobioreaktor dan pencahayaan dipersiapkan, langkah selanjutnya adalah melakukan *pre-culture*. Kondisi operasi yang dilakukan pada proses *pre-culture* hampir sama dengan proses kultivasi. Hanya saja, sumber karbon dioksida yang digunakan berbeda, dimana pada proses kultivasi digunakan gas karbon dioksida sedangkan *pre-culture* menggunakan NaHCO₃. Selain itu, pencahayaan yang dilakukan tidak terlalu tinggi intensitasnya yaitu hanya 2000-3000 lux tergantung jumlah biomassa yang ada pada awal *pre-culture*. Waktu yang dibutuhkan pada proses *pre-culture* cukup singkat, 2-3 hari, karena proses

ini hanya bertujuan untuk mengadaptasikan mikroalga pada kondisi operasi yang akan digunakan pada penelitian.

Tahap selanjutnya adalah membuat kurva kalibrasi antara *optical density* pada panjang gelombang 600 nm dengan X atau berat kering biomassa. Panjang gelombang tersebut digunakan karena absorbansi dari mikroalga berada paling tinggi dibandingkan pada panjang gelombang sinar tampak lainnya. Sementara itu, kurva kalibrasi OD₆₀₀ vs Nsel, dimana Nsel merupakan jumlah sel menggunakan data Putu (2005). Namun, kurva jumlah sel tersebut kurang akurat untuk menentukan besarnya biomassa yang ada. Kondisi setiap sel berbeda-beda, dimana terdapat kondisi sel yang kecil dan kondisi sel yang besar. Pada saat melakukan penghitungan jumlah sel pada ukuran sel kecil, hasil yang diberikan pasti berbeda dengan jumlah sel yang berukuran besar walaupun *optical density*nya sama.

Setelah semua persiapan selesai dilakukan, tahap selanjutnya adalah tahap kultivasi. Pada tahap ini, mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dan medium yang telah divariasikan dimasukkan ke dalam fotobioreaktor dimana perbandingan antara mikroalga dengan medium yang dimasukan adalah 1:2. Selanjutnya, aliran gas karbon dioksida dijaga konstan pada konsentrasi 5% dari aliran udara yang dimasukan. Sedangkan kecepatan superfisial yang digunakan untuk kecepatan aliran udara masuk dalam reaktor adalah kecepatan superfisial optimum, yaitu sekitar 5 – 6 L/menit.

Setelah semua kondisi operasi disesuaikan, kondisi tersebut dijaga untuk tetap konstan dan seragam agar variasi yang dilakukan dapat dibandingkan satu sama lain. Cara menjaga agar kondisi operasi tetap konstan adalah dengan pengambilan data setiap empat jam sekali. Data yang diambil adalah ODsel, pH, I₀, I_{back}, dan konsentrasi CO₂. Data yang paling penting digunakan adalah OD sel untuk mengetahui profil pertumbuhan sel mikroalga. Sedangkan data yang lain hanya sebagai data pendukung untuk menjaga kondisi operasi dalam keadaan konstan. Data pH digunakan untuk mengetahui kondisi keasaman fotobioreaktor. Pada pH 6-7, karbon dioksida dan air akan lebih membentuk asam bikarbonat dibandingkan asam karbonat. Sel mikroalga akan lebih mudah berasimilasi dengan asam bikarbonat dibandingkan asam karbonat. Data I₀ digunakan untuk

menjaga cahaya yang masuk ke dalam fotobioreaktor dalam keadaan konstan dan data I_{back} untuk memastikan terjadinya pertumbuhan di dalam fotobioreaktor. Data terakhir yang diambil adalah data konsentrasi gas CO_2 input. Data tersebut dianalisa dengan *Gas Chromatography* yang bertujuan untuk menjaga gas CO_2 input agar konstan pada angka 5% dari aliran udara masuk.

Pengambilan data selanjutnya adalah pengujian kandungan essensial yang ada. Pengujian kandungan lipid menggunakan metode *Bligh-Dyer*. Sebelum dilakukan metode *Bligh and Drier*, dilakukan beberapa perlakuan untuk memecahkan dinding sel mikroalga, yaitu dengan menggunakan *microwave* oven dan sonikasi. Untuk teknik pemecahan sel menggunakan *microwave*, sel mikroalga yang akan diuji kandungan lipidnya dimasukkan ke dalam *microwave* oven dengan suhu 100°C selama 5 menit. Setelah 5 menit, barulah mikroalga tersebut dapat diekstrak lipidnya menggunakan *Bligh and Drier*. Sementara, untuk teknik pemecahan dinding sel dengan menggunakan sonikasi, sampel mikroalga terlebih dahulu perlu dicampurkan dengan pelarut methanol - kloroform (2:1, v/v), barulah kemudian di-sonikasi dengan frekuensi 53 MHz selama 10 menit. Setelah 10 menit, barulah campuran ditambahkan lagi dengan kloroform dan air (1:1, v/v).

Metode *Bligh and Drier* ini sudah cukup lama digunakan dan sangat sederhana karena tidak membutuhkan peralatan khusus. Prinsip yang digunakan pada metode ini hanya gravimetri dimana terdapat dua lapisan yang akan terbentuk dan terpisah berdasarkan berat molekulnya. Pelarut yang digunakan adalah metanol untuk mengikat air yang polar dan kloroform untuk mengikat lipid yang non polar. Hasil akhir yang didapatkan dari pengujian lipid adalah produk lipid yang bercampur dengan kloroform. Pemisahan lipid dari kloroform cukup dengan menguapkan kloroform yang bersifat sangat *volatile*.

4.2 Hasil Pengamatan dan Analisa

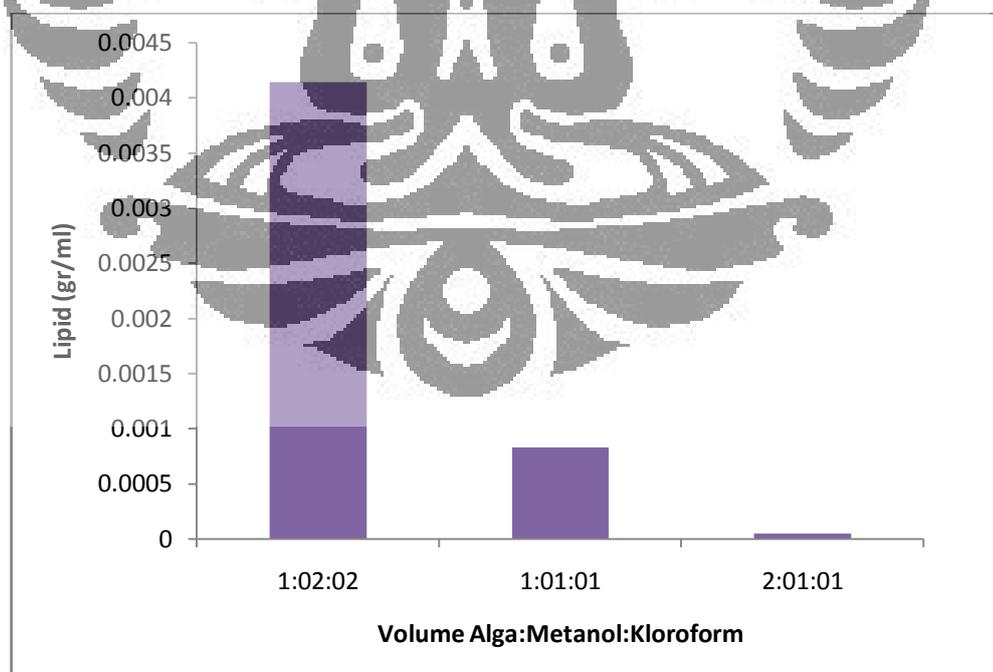
Analisa yang digunakan untuk mengukur jumlah lipid yang terdapat biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* menggunakan analisa gravimetri. Analisa gravimetri adalah analisa kuantitatif berdasarkan proses pemisahan dan penimbangan suatu unsur atau senyawa tertentu dalam bentuk yang semurni mungkin.

4.2.1 Pengaruh Volume Mikroalga dan Pelarut dengan *Yield* yang Dihasilkan

Untuk proses analisa yang pertama, bagian yang akan dianalisis adalah bagaimana pengaruh volume cake (alga) dengan volume pelarut (kloroform-metanol) terhadap jumlah lipid yang dihasilkan. Setelah mikroalga dipanen dengan menggunakan teknik sentrifugasi, cake diambil dengan variasi volume dengan perbandingan volume pelarut, secara berurut volume cake:metanol:kloroform yaitu: 1:2:2, 1:1:1, dan 2:1:1. Mikroalga yang dipanen memiliki tingkat kerapatan sel sebesar 0.524. Masing-masing cake diekstrak dengan menggunakan metode *Bligh and Drier* tanpa pemecahan dinding sel. Hasil lipid yang dihasilkan kemudian dibandingkan seperti yang nampak pada gambar 4.1.

Tabel 4. 1 Perbandingan Volume Alga dengan Berat Lipid

Perbandingan volume cake:MeOH:CHCl ₃	Lipid (gr/mL)
1:2:2	0.00414
1:1:1	0.000826
2:1:1	4.50E-05



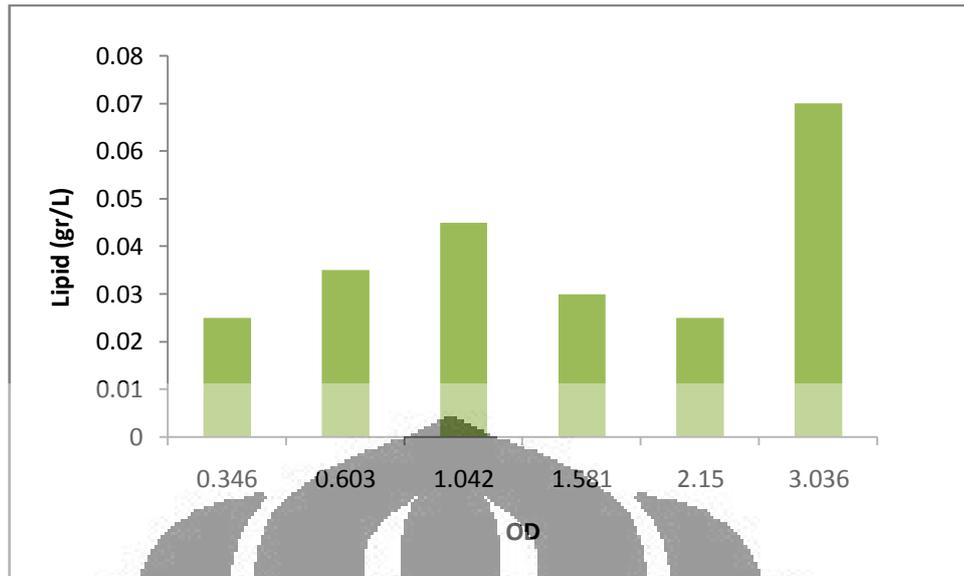
Gambar 4. 1 Grafik Perbandingan Volume Mikroalga dengan Berat Lipid

Pada grafik di atas, terlihat bahwa berat lipid yang tertinggi adalah pada saat perbandingan volume cake : pelarut sebesar 1:2:2. Dengan menggunakan perbandingan tersebut, berat lipid optimum sebesar 0.00414 gr/mL atau 4.14 gr/L. Semakin banyak volume alga yang dicampurkan dengan kloroform-metanol dengan volume tetap, maka jumlah lipid yang dapat terekstrak semakin kecil karena kemampuan pelarut yang semakin menurun seiring dengan kenaikan volume alga. Maka dapat disimpulkan bahwa kondisi terbaik untuk mengekstrak lipid dengan metode *Bligh and Drier* adalah dengan perbandingan cake-kloroform-metanol 1:2:2. Oleh karena itu, untuk bahan analisa dan penelitian berikutnya digunakan perbandingan volume tersebut.

Untuk meningkatkan efisiensi *yield* lipid dari mikroalga jenis ini, penelitian ini juga bervariasi tingkat kerapatan sel untuk mendapatkan nilai *optical density* (OD) yang dapat menghasilkan *yield* lipid yang optimum. Berikut merupakan hasil pengamatan *yield* lipid dengan metode *Bligh and Drier* tanpa pemecahan dinding sel. Nilai X (massa kering biomassa) didapatkan dari hasil kalibrasi antara OD vs X.

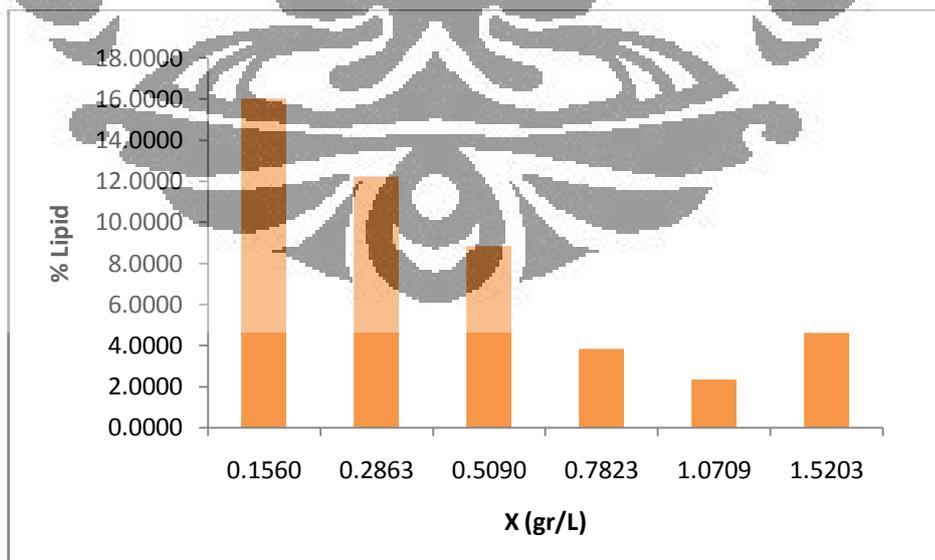
Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Berat Lipid dengan Variasi OD

OD	X (g/L)	Lipid (g/L)
0.346	0.1560	0.025
0.603	0.2863	0.035
1.042	0.5090	0.045
1.581	0.7823	0.03
2.15	1.0709	0.025
3.036	1.5203	0.07



Gambar 4. 2 Grafik Berat Lipid dengan Variasi OD

Pada gambar 4.2 terlihat bahwa jumlah lipid paling tinggi didapat pada OD yang juga cukup tinggi, yaitu dengan OD 3.036 didapatkan lipid sebanyak 0.07 g/L. Semakin tinggi tingkat kerapatan sel yang berarti semakin banyak jumlah sel mikroalga maka berat lipid yang dihasilkan dengan metode *Bligh and Drier* tanpa pemecahan dinding sel semakin besar karena semakin banyak sel yang lipidnya dapat terekstrak.



Gambar 4. 3 Grafik Yield Lipid dengan Massa Kering (X)

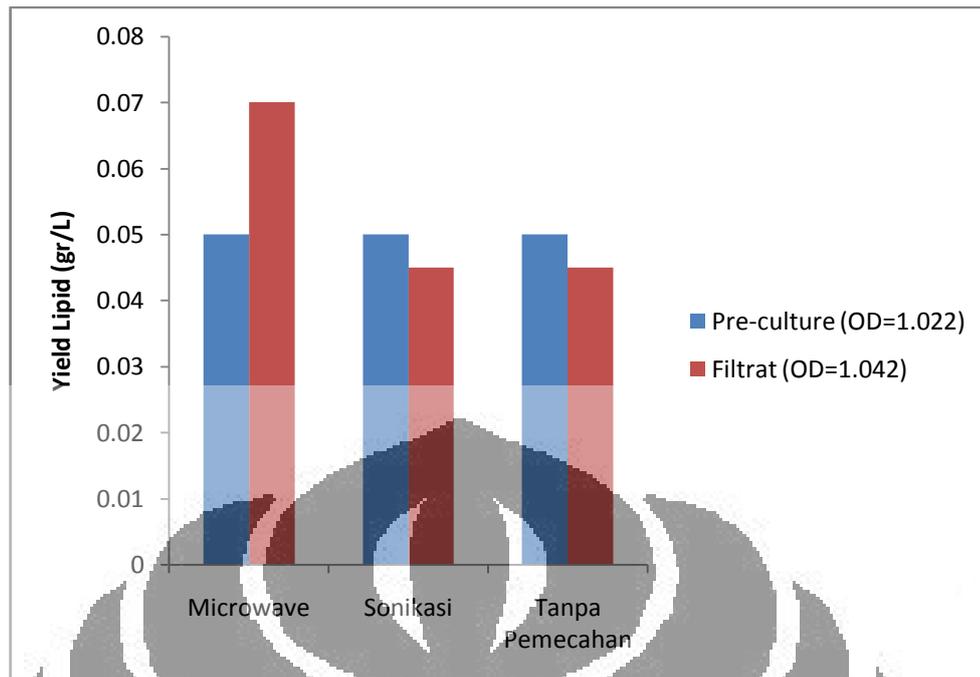
Hal yang berkebalikan dengan grafik 4.2 terjadi pada grafik 4.3 di atas. Dengan nilai X yang kecil didapatkan *yield* lipid yang besar. Hal ini dikarenakan karena kemampuan pelarut untuk mengekstrak lipid yang bekerja lebih baik pada OD kecil, sementara pada tingkat kerapatan sel yang besar menyebabkan pelarut tidak dapat mengekstrak lipid pada mikroalga secara optimum.

4.2.2 Perbandingan Berat Lipid Antara *Pre-culture* dan Filtrat

Pada tahap analisa dan evaluasi ini, digunakan mikroalga dengan OD yang sama untuk dibandingkan apakah *yield* lipid yang dihasilkan memiliki perbedaan yang signifikan antara *pre-culture* dengan hasil filtrasi. Didapatkan OD sebesar 1.042 untuk *pre-culture* dan 1.022 untuk filtrat. Setelah itu, kedua bahan ini diekstrak menggunakan 3 metode perlakuan yang berbeda. *Microwave* dengan suhu 100°C selama 5 menit, sonikasi 53 MHz selama 10 menit dan tanpa pemecahan dinding sel. Setelah itu dengan metode *Bligh and Drier* (perbandingan volume alga dan pelarut 1:2:2), sehingga didapatkan lipid seperti yang tertera pada Tabel 4.3 berikut.

Tabel 4.3 Tabel Perbandingan Lipid *Pre-culture* dan Filtrat

Berat Lipid (gr/L)	<i>Microwave</i>	Sonikasi	Tanpa Pemecahan
<i>Pre-culture</i> (OD=1.022)	0.05	0.05	0.05
Filtrat (OD=1.042)	0.07	0.045	0.045



Gambar 4. 4 Grafik Perbandingan Jumlah Lipid Filtrat dan *Pre-culture*

Pada tabel di atas, terlihat bahwa perbedaan jumlah lipid antara filtrat dan *pre-culture* dengan tingkat kerapatan sel yang hampir sama tidak terlalu signifikan untuk ketiga metode tersebut. Hal ini membuktikan bahwa proses kultivasi tidak mempengaruhi kandungan lipid. Fadli Yusandi (2010) membahas mengenai bagaimana kandungan esensial dipengaruhi oleh komposisi nitrogen pada medium. Oleh karena itu, kandungan lipid dalam alga lebih banyak dipengaruhi oleh nutrisi dari medium.

Lipid tersebut diambil tanpa melakukan pemecahan dinding sel, sehingga lipid tersebut merupakan lipid ekstraseluler mikroalga. Untuk mengambil lipid yang terdapat dalam area intraseluler, perlu dilakukan teknik pemecahan dinding sel sehingga *yield* lipid yang dihasilkan dapat mencapai nilai optimum.

4.2.3 Perbandingan 3 Metode Pemecahan Dinding Sel

Tahap analisa berikutnya adalah membandingkan 3 metode pemecahan dinding sel yaitu *microwave* 100°C selama 5 menit, sonikasi 53 MHz selama 10 menit dan tanpa pemecahan dinding sel dalam rangka menghasilkan *yield* lipid yang paling optimum. Penelitian ini dilakukan dengan memvariasikan kerapatan

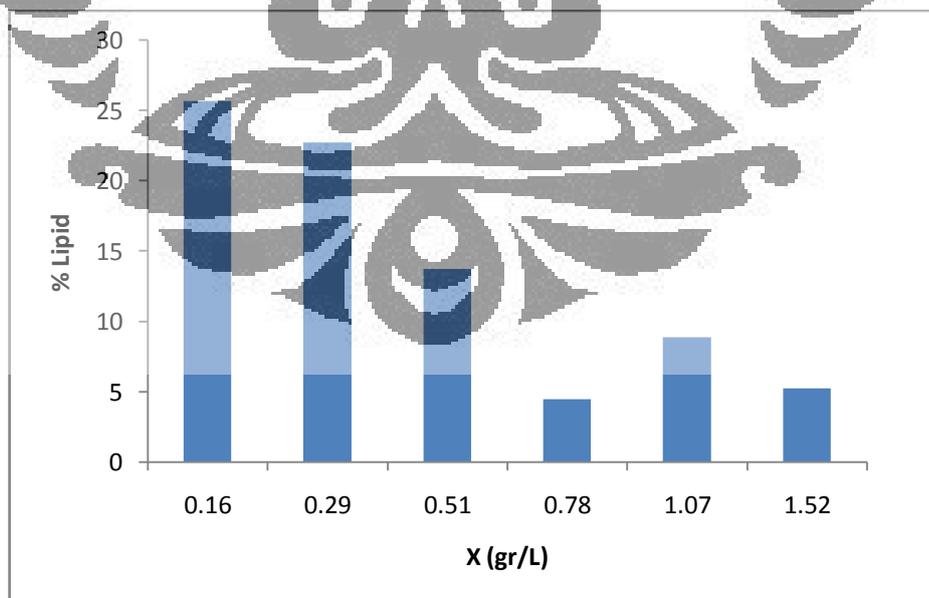
mikroalga sehingga selain didapatkan metode yang terbaik untuk menghasilkan lipid terbanyak, juga didapatkan tingkat kerapatan sel yang optimum untuk diberi perlakuan pemecahan dinding sel. Nilai massa kering (X) didapatkan dari hasil kalibrasi antara OD dan berat biomassa kering, sehingga didapatkan persamaan $y = 0.57016x - 0.019478$. Sementara % lipid dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ lipid} = \frac{\text{Berat lipid}}{X} \times 100\%$$

Tabel hasil pengamatan dapat terlihat pada tabel berikut.

Tabel 4.4 Yield Lipid dengan Microwave 100°C 5 menit

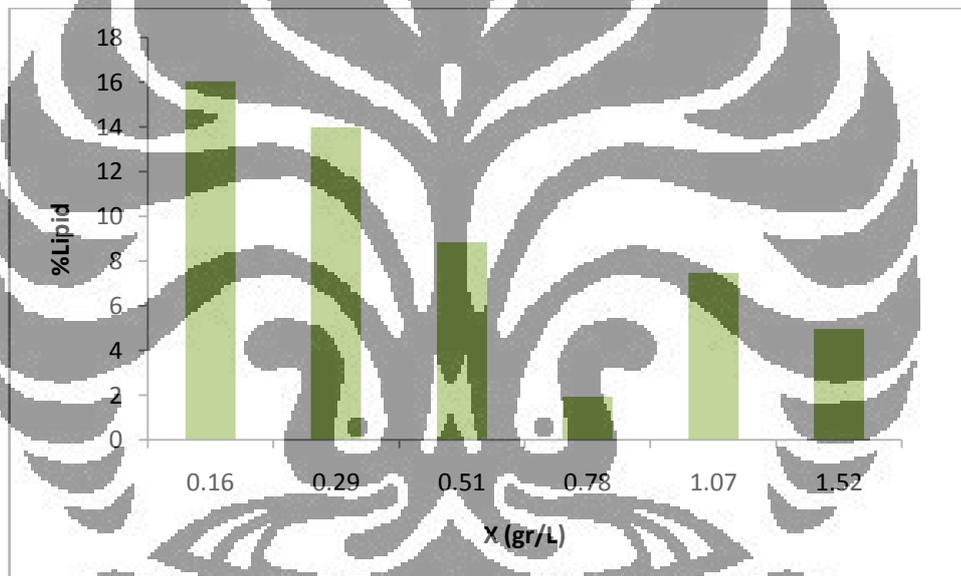
MICROWAVE			
OD	Lipid (g/L)	X (gr/L)	% Lipid
0.346	0.04	0.1560	25.6411
0.603	0.065	0.2863	22.7003
1.042	0.07	0.5090	13.7529
1.581	0.035	0.7823	4.4737
2.15	0.095	1.0709	8.8709
3.036	0.08	1.5203	5.2623



Gambar 4.5 Grafik % Lipid vs Massa Kering (X) dengan microwave 100°C selama 5 menit

Tabel 4. 5 *Yield* Lipid dengan Sonikasi 53 MHz 10 menit

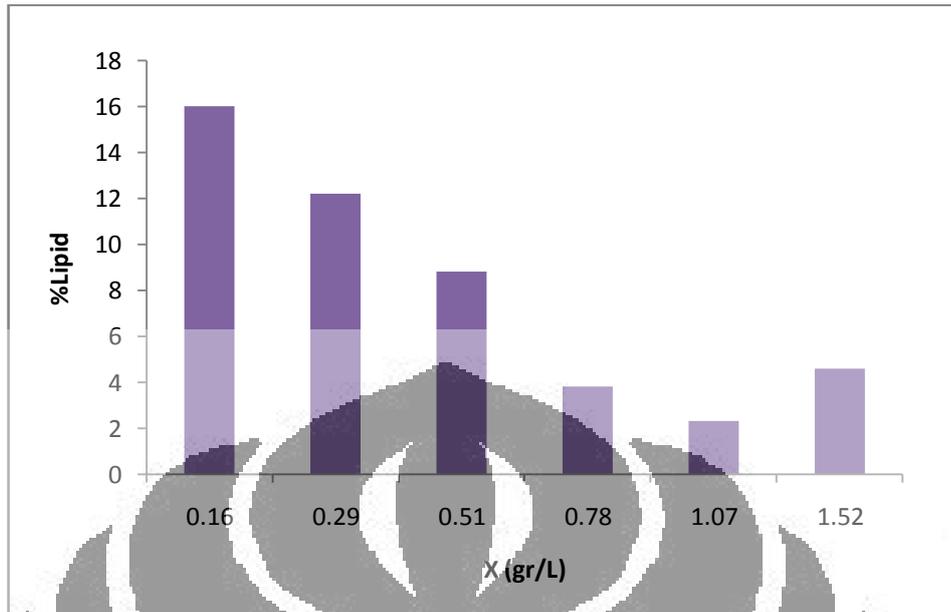
SONIKASI			
OD	Lipid (g/L)	X (gr/L)	%lipid
0.346	0.025	0.1560	16.0257
0.603	0.04	0.2863	13.9694
1.042	0.045	0.5090	8.8412
1.581	0.015	0.7823	1.9173
2.15	0.08	1.0709	7.4702
3.036	0.075	1.5203	4.9334



Gambar 4. 6 Grafik % Lipid vs Massa Kering (X) dengan sonikasi 53MHz 10 menit

Tabel 4. 6 *Yield* Lipid Tanpa Pemecahan Dinding Sel

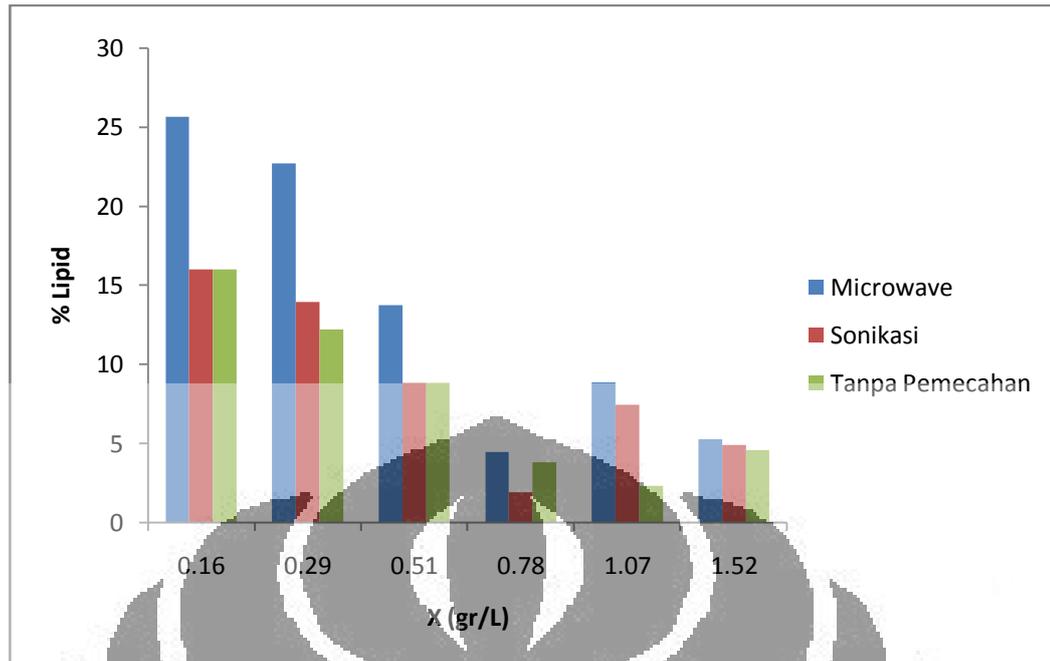
TANPA PERLAKUAN			
OD	Lipid (g/L)	X (gr/L)	%lipid
0.346	0.025	0.1560	16.0257
0.603	0.035	0.2863	12.2233
1.042	0.045	0.5090	8.8412
1.581	0.03	0.7823	3.8346
2.15	0.025	1.0709	2.3345
3.036	0.07	1.5203	4.6045



Gambar 4.7 Grafik % Lipid vs Massa Kering (X) tanpa pemecahan dinding sel

Tabel 4.7 Tabel Perbandingan % Lipid dari 3 Metode Pemecahan Dinding Sel

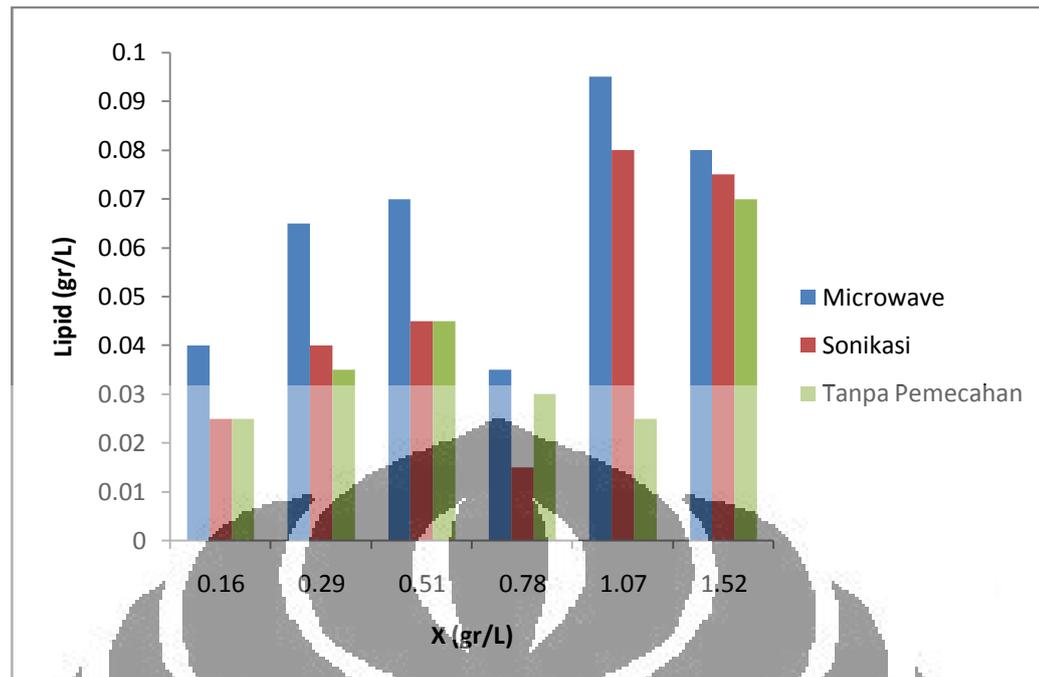
OD	X (gr/L)	% Lipid		
		Microwave	Sonikasi	Tanpa Pemecahan
0.346	0.1560	25.6411	16.0257	16.0257
0.603	0.2863	22.7003	13.9694	12.2233
1.042	0.5090	13.7529	8.8412	8.8412
1.581	0.7823	4.4737	1.9173	3.8346
2.15	1.0709	8.8709	7.4702	2.3345
3.036	1.5203	5.2623	4.9334	4.6045



Gambar 4. 8 Diagram Perbandingan % Lipid dengan Teknik yang Berbeda

Tabel 4. 8 Tabel Perbandingan Berat Lipid dengan 3 Metode yang Berbeda

OD	X (gr/L)	Berat Lipid (gr/L)		
		Microwave	Sonikasi	Tanpa Pemecahan
0.346	0.1560	0.0400	0.0250	0.0250
0.603	0.2863	0.0650	0.0400	0.0350
1.042	0.5090	0.0700	0.0450	0.0450
1.581	0.7823	0.0350	0.0150	0.0300
2.15	1.0709	0.0950	0.0800	0.0250
3.036	1.5203	0.0800	0.0750	0.0700



Gambar 4.9 Diagram Perbandingan Berat Lipid dengan Teknik yang Berbeda

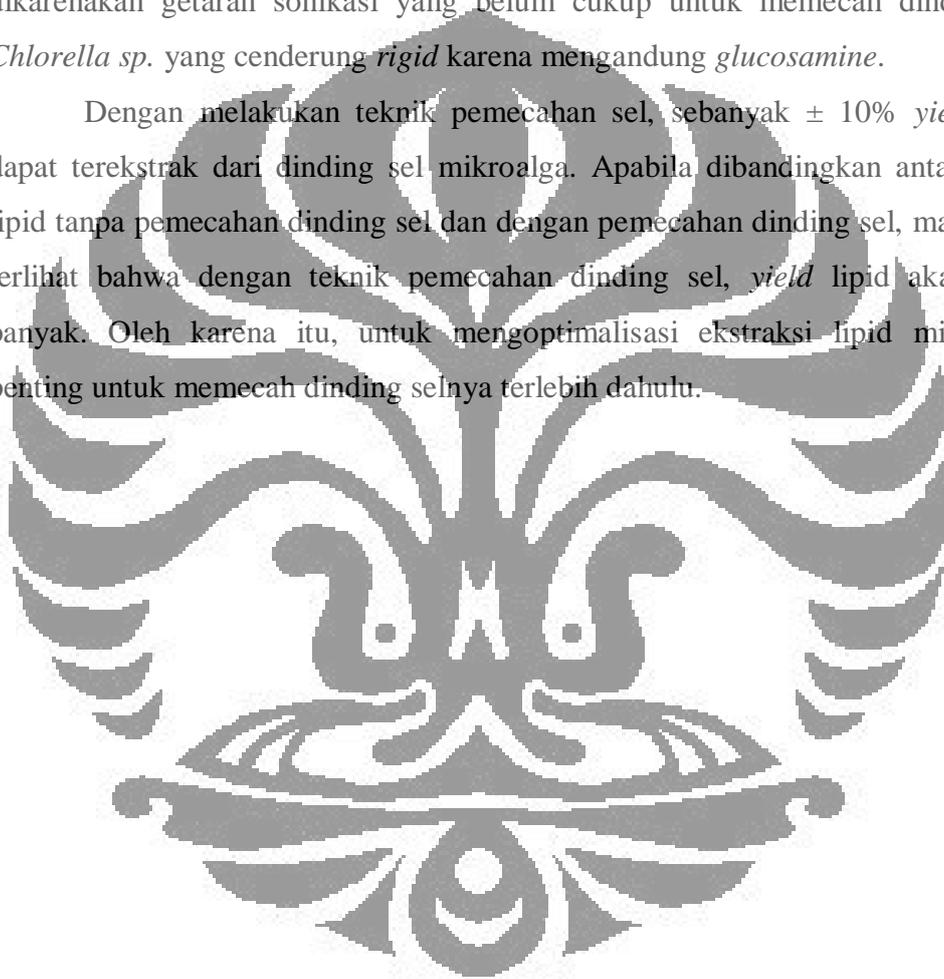
Dari gambar 4.7 dan 4.8 di atas, terlihat bahwa perolehan *yield* lipid terbesar adalah dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). Sementara, perolehan *yield* antara sonikasi dan tanpa dilakukan pemecahan dinding sel tidak begitu signifikan. Sesuai dengan literatur, MAE merupakan metode yang terbaik untuk mendapat hasil lipid yang optimum. Metode ini adalah metode yang sederhana, mudah dan metode yang paling efisien apabila dibandingkan dengan metode sonikasi untuk mengekstrak lipid dari mikroalga. Selain itu, metode ekstraksi lipid menggunakan *microwave* ini dapat dengan mudah di-*scale up* untuk skala yang lebih besar. Metode ekstraksi menggunakan *microwave oven* ini telah dilakukan untuk mengekstrak minyak dari sayur-sayuran dan lemak hewan (Mahesar et al., 2008; Virot et al., 2008).

Sel mikroalga memiliki tingkat kelembaban mikroskopik yang menjadi target untuk pemanasan *microwave*. Kelembaban yang berada dalam sel ini terevaporasi akibat efek dari *microwave* dan menyebabkan tekanan yang cukup besar pada dinding sel. Tekanan ini mendorong dinding sel dari dalam, sehingga akhirnya memecahkan dinding sel mikroalga menyebabkan substansi, dalam kasus ini lipid, keluar (Mandal, 2007). Beberapa observasi mengenai MAE ini telah dilakukan menggunakan sel tumbuhan. Observasi ini membuktikan bahwa

microwave memberikan efek pada struktur sel dikarenakan perubahan temperatur yang mendadak dan peningkatan tekanan di bagian dalam sel. Proses yang terjadi dalam *microwave* meliputi pemutusan ikatan hidrogen, sebagai hasil dari rotasi dipol *microwave* dan migrasi ion, sehingga meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam matriks yang menyebabkan komponen dapat terekstrak lebih optimum.

Sementara itu, sonikasi nampaknya tidak terlalu berpengaruh signifikan terhadap *yield* lipid pada mikroalga *Chlorella vulgaris* ini. Hal ini kemungkinan dikarenakan getaran sonikasi yang belum cukup untuk memecah dinding sel *Chlorella sp.* yang cenderung *rigid* karena mengandung *glucosamine*.

Dengan melakukan teknik pemecahan sel, sebanyak $\pm 10\%$ *yield* lipid dapat terekstrak dari dinding sel mikroalga. Apabila dibandingkan antara *yield* lipid tanpa pemecahan dinding sel dan dengan pemecahan dinding sel, maka jelas terlihat bahwa dengan teknik pemecahan dinding sel, *yield* lipid akan lebih banyak. Oleh karena itu, untuk mengoptimisasi ekstraksi lipid mikroalga, penting untuk memecah dinding selnya terlebih dahulu.



BAB V

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa kesimpulan yang dapat diambil. Diantaranya adalah:

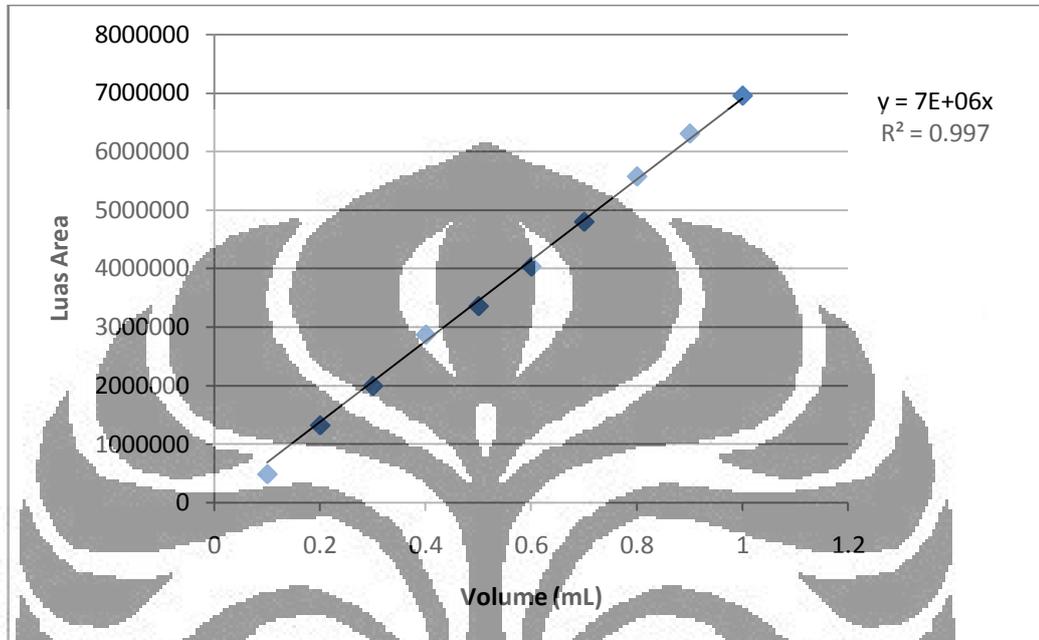
- Volume sampel mikroalga yang paling optimum untuk mendapatkan *yield* lipid terbesar adalah dengan perbandingan alga dan pelarut $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ 1:2:2, v/v
- *Yield* lipid hasil ekstraksi tanpa metode pemecahan dinding sel antara *pre-culture* dan filtrat tidak memiliki perbedaan yang signifikan
- Metode pemecahan dinding sel penting untuk dilakukan dalam rangka mengoptimisasi produksi intraseluler mikroalga *Chlorella vulgaris* karena dapat meningkatkan produksi lipid sebanyak 10% dibandingkan tanpa pemecahan dinding sel
- Metode pemecahan dinding sel MAE (*Microwave Assited Extraction*) merupakan metode yang paling efektif dan sederhana untuk mendapat *yield* lipid yang optimum dari mikroalga *Chlorella vulgaris*

DAFTAR REFERENSI

- Chisti, Yusuf (2007). *Biodiesel from Microalgae*. Biotechnology Advances, **25**. Pp. 294-306
- Graham E, Linda dan Lee W. Wilcox (2000). *Algae*. New York: Prentice Hall, Inc
- Jain, Tripti, Jain V., Pandey R., Vyas A., Shukla SS (2009). *Microwave Assisted Extraction for Phytoconstituents - An overview*. Asian J. Research, **2(1)**. Pp. 19-25
- Lacoma, Tyler. *How does Sonication works?* http://www.ehow.com/how-does_5171302_sonication-work_.htm [diakses 19 Mei 2010]
- Lee, J-Y., Yoo, C., Jun S., Ahn, C., dan Oh, H. (2010). *Comparison of Several Methods for Effective Lipid Extraction from Microalgae*. Bioresources Technology, **101**. Pp. S75-S77
- Mandal, Vivekananda, Mohan, Yogesh, Hemalatha S. (2007). *Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research*. Pharmacognosy Reviews, **1**. Pp. 7-18
- Metherel, A., Taha, A. Y., Hamidizadi, Stark, Ken D (2009). *The application of ultrasound energi to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed)*. Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids, **10**. Pp. 1-7
- Rachmania, O., Setyarini R., Maulida L.(2010). *Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari Chlorella sp. dan Prediksinya sebagai Biodiesel*. Seminar Teknik Kimia Soehadi Reksowardojo 2010.
- Widjaja, A., Chien, Chao-Chang, Ju, Yi-Hsu (2009). *Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris*. Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers, **40**. Pp. 13-20

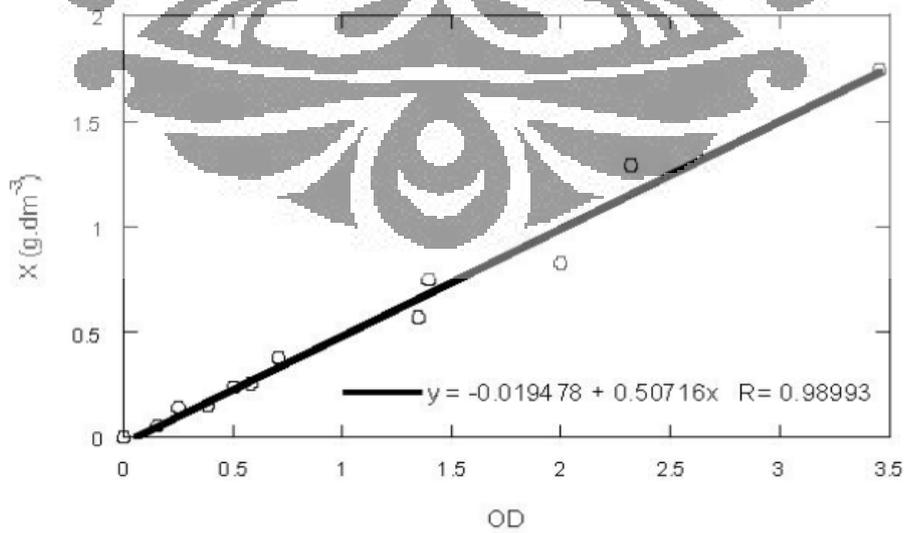
LAMPIRAN

Lampiran 1. Kalibrasi CO₂



Gambar L.1 Grafik Kalibrasi CO₂

Lampiran 2. Grafik OD vs X



Gambar L.2 Kurva Kalibrasi OD vs X

Lampiran 3. Tampilan Hasil Ekstraksi Lipid dengan 3 Metode Berbeda



Gambar L.3 Foto Hasil Ekstraksi Lipid (dari kiri: Microwave, sonikasi, tanpa pemecahan)

