



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTER FISIKOKIMIA DARI MIKROALGA YANG DITUMBUHKAN DI
MEDIA DENGAN BERBAGAI KADAR LIMBAH SAWIT**

SKRIPSI

BUNGA SALSABILA FAIRUZ

1906351700

DEPARTEMEN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS INDONESIA

2023



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTER FISIKOKIMIA DARI MIKROALGA YANG DITUMBUHKAN DI
MEDIA DENGAN BERBAGAI KADAR LIMBAH SAWIT**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana

BUNGA SALSABILA FAIRUZ

1906351700

DEPARTEMEN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS INDONESIA

2023

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Bunga Salsabila Fairuz

NPM : 1906351700

Tanda Tangan : 

Tanggal : 28 Desember 2023

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Bunga Salsabila Fairuz

NPM : 1906351700

Program Studi : Kimia

Judul Skripsi : Karakter Fisikokimia dari Mikroalga yang Ditumbuhkan di Media dengan Berbagai Kadar Limbah Sawit

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Tuti Wukirsari, Ph.D.

()

Pembimbing II : Ade Andriani, Ph.D.

()

Penguji I : Dra. Sri Handayani, M. Biomed.

()

Penguji II : Dr. Isnaini Rahmawati, S. Si., M.Si.

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Januari 2024

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul "Karakter Fisikokimia dari Mikroalga yang Ditumbuhkan di Media dengan Berbagai Kadar Limbah Sawit." Penyusunan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam menyelesaikan program studi penulis di Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari beberapa pihak secara moral maupun spiritual akan menjadi sulit bagi penulis dalam penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Tuti Wukirsari, Ph.D. dan Ade Andriani, Ph.D. selaku dosen pembimbing yang senantiasa memberikan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing, mengarahkan, dan menyemangati penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Jarnuzi Gunlazuardi, S.Si. selaku pembimbing akademik yang senantiasa memberikan saran terkait pengambilan keputusan akademik dan memberikan dukungan penuh kepada penulis.
3. Para staf peneliti kelompok riset Enzim terkait Karbohidrat, Nuryati, Eva Agustriana, M.Si., dan Rike Rachmayati, M.Si. yang selalu meluangkan waktu untuk membantu penulis dalam pengerjaan prosedur penelitian di lab dan memberikan masukan selama penelitian berlangsung.
4. Orang tua penulis (Leonardo, Purnomo, Rika, dan Dita) yang telah memberikan kasih sayang, doa, dan dukungan penuh atas semua keputusan yang penulis ambil. Terima kasih juga penulis ucapkan untuk dik tercinta (Daffa dan Melda) yang telah memberikan perhatian dan menyemangati penulis untuk terus semangat dalam menyelesaikan penulisan laporan.
5. Keluarga besar Opung Bunga dan keluarga besar bapak Bambang yang senantiasa memberikan perhatian lebih dan terus memberikan bantuan selama masa perkuliahan.

6. Sahabat penulis sejak SMP (Pinkkan, Shofia, Chairul, dan Nizar) yang sudah meluangkan waktu untuk menemani penulis menghabiskan waktu kosong disela perkuliahan.
7. Aidah, Priestly, dan Sandra selaku teman penulis yang selalu meluangkan waktu untuk menampung semua keluh kesah dunia perkuliahan yang dihadapi penulis.
8. Rosita, Talia, dan Zakiyyah selaku teman bimbingan tugas akhir penulis yang selalu hadir untuk saling menyemangati dan memberikan masukan dalam menyelesaikan penelitian tugas akhir.

Dalam penulisan laporan ini, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan di dalamnya yang disebabkan karena terbatasnya kemampuan penulis dan referensi yang dipakai oleh penulis. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan kontribusi yang positif bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang Biokimia. Akhir kata, semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua. Aamiin.

Depok, 28 Desember 2023

Penulis,



Bunga Salsabila Fairuz

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Bunga Salsabila Fairuz
NPM : 1906351700
Prodi : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

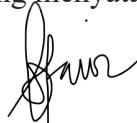
Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non eksklusif (Non-exclusive Royalty Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul “Karakter Fisikokimia dari Mikroalga yang Ditumbuhkan di Media dengan Berbagai Kadar Limbah Sawit” beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan memublikasikan tugas akhir saya selama mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok

Tanggal: 26 Desember 2023

Yang menyatakan



Bunga Salsabila Fairuz

ABSTRAK

Nama Periset : Bunga Salsabila Fairuz
Program Studi : S1 Kimia, Departemen Kimia, FMIPA UI
Judul Riset : Karakter Fisikokimia dari Mikroalga yang Ditumbuhkan
di Media dengan Berbagai Kadar Limbah Sawit
Pembimbing I : Tuti Wukirsari, Ph.D.
Pembimbing II : Ade Andriani, Ph.D.

Karotenoid adalah pigmen alami tidak larut air yang terkenal karena bersifat antioksidan dan merupakan prekursor vitamin A. Beta-karotena merupakan provitamin A terbaik yang umum digunakan dalam industri sebagai pigmen oranye-merah untuk membuat berbagai produk makanan. Pada penelitian ini beta-karotena diekstraksi dari mikroalga dengan jenis spirulina yang ditumbuhkan pada media zarrouk dengan penambahan limbah sawit dalam berbagai persentase. Kandungan karotenoid dalam mikroalga diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol, metanol, heksana, dan diklorometana. Berdasarkan hasil FESEM, terdapat perubahan ukuran granula pada mikroalga yang ditumbuhkan dalam variasi persentase limbah sawit (POME) sebagai media. Diklorometana merupakan pelarut ekstraksi terbaik berdasarkan hasil penentuan kadar beta-karotena dengan spektrofotometer Vis. Persentase limbah sawit dalam media berbanding terbalik dengan kadar beta-karoten dalam mikroalga. Limbah sawit pada media mikroalga menghambat pembentukan pigmen dan menurunkan aktivitas antioksidan ekstrak, berdasarkan metode DPPH.

Kata Kunci: karotenoid, beta-karotena, spirulina, limbah sawit, metode DPPH.

ABSTRACT

Name : Bunga Salsabila Fairuz
Program : Chemistry
Title : Physicochemical Properties of Microalgae Grown in
Media with Various Levels of Palm Oil Waste
Counsellor I : Tuti Wukirsari, Ph.D.
Counsellor II : Ade Andriani, Ph.D.

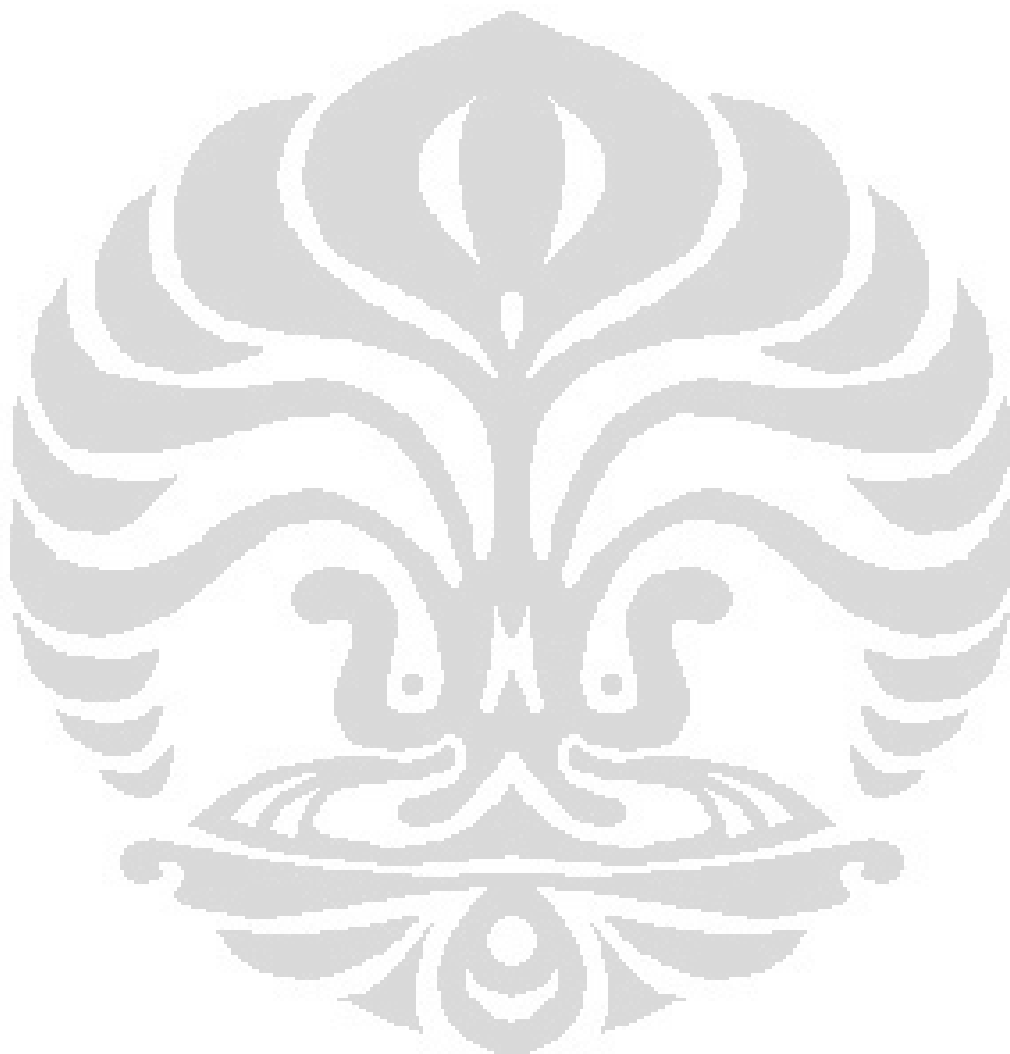
Carotenoids are natural, insoluble pigments that are famous for their antioxidant properties and are precursors of vitamin A. Beta-carotene is the best pro-vitamin A which is commonly used in industry as an orange-red pigment to make various food products. In this study, beta-carotene was extracted from microalgae, spirulina, grown in zarrouk media with the addition of palm oil waste in various percentages. Carotenoid content in microalgae was extracted using the maceration method with ethanol, methanol, hexane and dichloromethane solvents. Based on FESEM results, there were changes in microalgae granule size that grown in variety percentages of palm oil waste (POME) as medium. Dichloromethane was the best extraction solvent based on the results of determining beta-carotene content using a Vis spectrophotometer. The percentage of palm waste in the media was inversely proportional to the beta-carotene content in microalgae. Palm waste in microalgae medium inhibits pigment formation and reduces antioxidant activity, based on the DPPH method.

Keywords: carotenoids, beta-carotene, spirulina, palm waste, DPPH methode.

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	3
KATA PENGANTAR	5
ABSTRAK.....	1
ABSTRACT	2
DAFTAR ISI	3
DAFTAR GAMBAR	6
BAB 1.....	7
PENDAHULUAN	7
1.1 Latar Belakang.....	7
1.2 Rumusan Masalah.....	9
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.4 Hipotesis	10
1.5 Manfaat penelitian	10
BAB 2.....	11
TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Pigmen.....	11
2.2.1 Karotenoid dan Beta-karotena.....	11
2.2.2 Fikosianin	12
2.2.3 Klorofil	12
2.2 Mikroalga.....	12
2.3 Antioksidan.....	14
2.4 Limbah Sawit.....	15

BAB 3.....	17
METODOLOGI PENELITIAN.....	17
3.1 Tempat dan waktu penelitian.....	17
1.2 Alat dan Bahan	17
3.2.1 Alat	17
3.2.2 Bahan	17
1.3 Metode penelitian	18
3.3.1 Penumbuhan mikroalga	18
3.3.2 Analisis Granula Mikroalga dengan FE-SEM.....	18
3.3.3 Ekstraksi beta-karotena.....	18
3.3.4 Analisis beta-karotena dengan spektrofotometer UV-Vis.....	18
3.3.5 Analisis beta-karotena menggunakan GC-MS	19
3.3.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan	19
BAB 4.....	21
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Penumbuhan Mikroalga.....	21
4.2 Analisis granula mikroalga dengan FE-SEM	22
4.3 Ekstraksi beta-karotena.....	23
4.4 Analisis beta-karotena dengan spektrofotometer UV-Vis.....	25
4.5 Analisis beta-karotena dengan menggunakan GC-MS.....	25
4.6 Penentuan aktivitas antioksidan.....	27
BAB 5.....	30
KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Limbah sawit (POME)	8
Gambar 2.1 Struktur beta-karotena	12
Gambar 2.2 Spesies mikroalga	13
Gambar 2.3 Reaksi pada DPPH	15
Gambar 4.1 Biomassa mikroalga	21
Gambar 4.2 Hasil analisis FESEM	22
Gambar 4.3 Ekstrak karotenoid dalam pelarut heksana dan diklorometana	24
Gambar 4.4 Ekstrak karotenoid dalam pelarut diklorometana	24
Gambar 4.5 Ekstrak mikroalga pada uji antioksidan	29

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada abad kesembilan, kerajaan Kanem di Chad telah menemukan manfaat dari *Arthrospira platensis*. Saat ini, alga biru-hijau dari genus *Arthrospira*, umumnya dikenal sebagai spirulina, dibudidayakan secara komersial di seluruh dunia untuk nutrisinya (Marzorati dkk., 2020). Mikroalga kaya akan sumber karbohidrat, protein, enzim, dan serat. Selain itu, mikroalga juga mengandung banyak vitamin dan mineral, di antaranya vitamin A, C, B1, B2, B6, niasin, iodin, kalium, zat besi, magnesium, dan kalsium (Priyadarshani & Rath, 2012). Mikroalga yang diperuntukkan sebagai tambahan nutrisi bagi manusia sekarang ini sudah dipasarkan dalam berbagai bentuk mulai dari tablet, kapsul, dan cairan. Mikroalga juga ditambahkan ke dalam pasta, makanan ringan, permen, atau bahkan minuman. Mikroalga juga dapat digunakan sebagai sumber nutrisi bagi manusia, mikroalga dapat dimasukkan ke dalam pakan untuk berbagai macam hewan mulai dari ikan (budidaya) hingga hewan peliharaan dan hewan ternak. Selain digunakan dalam bidang pangan, mikroalga juga telah dimanfaatkan di bidang kosmetik. Spesies mikroalga yang banyak ditemukan di produk perawatan kulit ialah *Arthrospira* dan *Chlorella*. Ekstrak mikroalga dapat ditemui dengan mudah ditemukan pada produk perawatan wajah dan kulit, misalnya pada produk krim anti-penuaan, produk perawatan yang menyegarkan atau regenerasi, emolien dan sebagai anti iritasi pada pengelupas. Mikroalga juga dapat ditemukan pada produk perlindungan matahari dan produk perawatan rambut (Spolaore dkk., 2006).

Beta-karotena merupakan senyawaan penting yang terdapat dalam mikroalga. Berdasarkan penelitian terdahulu, mikroalga merupakan sumber beta-karotena alternatif yang paling baik dibandingkan dengan mikroorganisme lain (Fernandes dkk., 2021). Beta-karotena juga dapat disintesis dalam skala besar secara kimia. Namun, karena efek samping merugikan dari beta-karotena sintetis dengan kemurnian rendah yang umumnya dikaitkan masyarakat dengan obat, minat masyarakat lebih terfokus pada produk alami sebagai alternatif terhadap obat konvensional. Oleh karena itu, mikroalga sebagai sumber

alternatif karotenoid alami, perlu dibudidayakan dan dikembangkan untuk memenuhi kebutuhan pasar (Sathasivam & Ki, 2018).

Berbagai penelitian telah melaporkan penggunaan limbah untuk media pertumbuhan mikroalga seperti limbah makanan (Kumar dkk., 2022), limbah karet (Utomo dkk., 2015), limbah tambak udang (Santanumurti dkk., 2021), dan limbah ternak ayam. Limbah *palm oil mill effluent* (POME) yang dihasilkan dari industri sawit sangat melimpah di Indonesia. Indonesia merupakan produsen sawit terbesar di dunia dengan jumlah produksi pada Desember 2023 mencapai 46 juta metrik ton (USDA). POME merupakan limbah sawit berwarna kecoklatan dengan tekstur bubur yang mengandung senyawa organik larut air (Gambar 1.1). Jika tidak diolah dengan baik, POME berdampak buruk terhadap lingkungan (Lam dkk., 2018; Zangeneh dkk., 2018). Konsep menggunakan mikroalga untuk mengolah POME sudah diakui sebelumnya (Kamyab dkk., 2018). Penggabungan budidaya mikroalga dengan pengolahan air limbah berpotensi besar sebagai teknologi ramah lingkungan. Kandungan senyawa organik dan anorganik dalam limbah sawit dapat berfungsi sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan mikroalga (Selmani dkk., 2013). Pemanfaatan senyawa organik dan anorganik dalam limbah dapat menyebabkan penurunan yang signifikan pada kadar senyawa organik dan anorganik yang terkandung dalam mikroalga (Kamyab dkk., 2018).



Gambar 1.1 Limbah POME

Sumber: bspjipekanbaru.kemenperin.go.id

Pada studi ini, digunakan mikroalga dengan jenis spirulina yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan berbagai variasi konsentrasi limbah sawit, yaitu 0, 30, 60, dan 100%. Morfologi mikroalga ditentukan dengan FESEM. Pengaruh konsentrasi limbah dalam media terhadap kandungan pigmen, khususnya beta-karoten, dalam mikroalga ditentukan. Ekstraksi karotenoid dilakukan dengan metode maserasi memakai pelarut etanol, metanol, heksana, dan diklorometana. Pemilihan pelarut tersebut didasarkan dari sifatnya yang mudah diuapkan, sehingga pemisahan pelarut dan beta-karoten hasil ekstraksi akan mudah dilakukan. Aktivitas antioksidan ekstrak kasar juga ditentukan dengan metode DPPH.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah persentase limbah sawit (POME) sebagai media pertumbuhan memengaruhi kadar beta-karotena mikroalga?
2. Apakah perbedaan pelarut memengaruhi jumlah beta-karotena yang dapat diekstraksi dari mikroalga yang ditumbuhkan pada limbah sawit (POME)?
3. Apakah limbah sawit (POME) sebagai media pertumbuhan memengaruhi aktivitas antioksidan ekstrak kasar mikroalga?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan kadar beta-karotena mikroalga yang ditumbuhkan dalam media yang mengandung POME dengan berbagai persentase
2. Menentukan pelarut terbaik untuk mengekstraksi beta-karotena dari mikroalga yang ditumbuhkan dalam media limbah sawit (POME)
3. Menentukan aktivitas antioksidan ekstrak kasar mikroalga yang ditumbuhkan dalam limbah sawit (POME)

1.4 Hipotesis

1. Persentase limbah sawit (POME) dalam media memengaruhi kadar beta-karotena mikroalga
2. Perbedaan pelarut memengaruhi jumlah beta-karotena yang dapat diekstraksi dari mikroalga yang ditumbuhkan pada limbah sawit (POME)
3. Limbah sawit (POME) sebagai media pertumbuhan memengaruhi aktivitas antioksidan ekstrak kasar mikroalga

1.5 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan pengetahuan lebih dalam tentang penggunaan limbah sawit (POME) sebagai campuran media pertumbuhan mikroalga, prosedur ekstraksi beta-karotena dari mikroalga yang ditumbuhkan pada limbah sawit (POME), dan penentuan kadar beta-karotena ekstrak mikroalga guna memberikan opsi baru sumber beta-karotena.

BAB 2

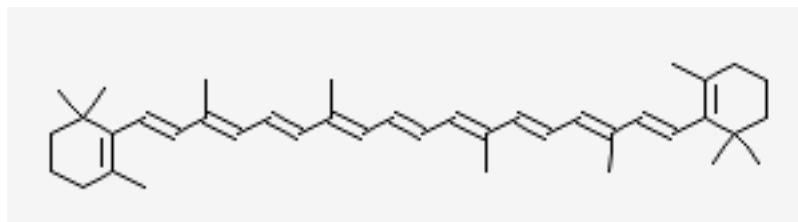
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pigmen

2.2.1 Karotenoid dan Beta-karotena

Karotenoid merupakan pigmen alami yang dikenal karena karakteristik antioksidannya dan berbagai perlindungannya untuk kesehatan manusia. Karotenoid dikenal dengan kemampuan antioksidan, dengan melindungi sel dari bahaya yang disebabkan oleh radikal bebas. Beta-karotena, *zeaxanthin*, *astaxanthin*, dan *canthaxanthin* adalah contoh karotenoid unggul dan sering dipelajari secara ekstensif karena penggunaannya yang meluas (Singh dkk., 2015). Selain itu, karotenoid menemukan aplikasi luas dalam barang-barang kosmetik karena kapasitasnya untuk melindungi dari radiasi UV (Saini & Keum, 2018). Struktur penting dari sebuah karotenoid adalah *polyene backbone* yang terdiri dari serangkaian ikatan C=C terkonjugasi. Struktur inilah yang bertanggung jawab atas sifat pigmentasi dan kemampuan karotenoid ketika berinteraksi dengan radikal bebas dan karenanya bertindak sebagai antioksidan yang efektif (Young & Lowe, 2018).

Beta-karotena adalah bahan yang terkenal dengan sifat antioksidan. Seperti karotenoid pada umumnya, struktur kimia beta-karotena (Gambar 2.1) terdiri dari 40 atom karbon (Syukri dkk., 2021). Dari 600 jenis karotenoid yang teridentifikasi, beta-karotena, pigmen merah/oranye/kuning cerah, menampilkan sifat antioksidan dan atribut fungsional yang mencakup melindungi tubuh dari masalah kardiovaskular dan berbagai jenis kanker, mengurangi peradangan, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, membantu faktor pertumbuhan dan jalur komunikasi seluler internal, mengendalikan spesialisasi sel, menawarkan perlindungan sinar UV, dan berfungsi sebagai prekursor vitamin A (Jalali-Jivan dkk., 2021).



Gambar 2.1 Struktur beta-karotena

Sumber: *National Center for Biotechnology Information. Drug and Lactation Database, Beta-carotene*

2.2.2 Fikosianin

Fikosianin merupakan suatu fikobiliprotein yang bertanggung jawab atas warna biru-hijau pada spirulina. Pigmen ini digunakan sebagai pewarna biru alami dalam berbagai aplikasi makanan seperti permen karet, produk susu, es, dan jeli. Pewarna ini juga dapat digunakan pada kosmetik seperti lipstik. Di bidang farmasi, fikosianin menunjukkan efek antitumor, aktivitas antioksidan, berkontribusi meredakan peradangan, dan gangguan yang disebabkan oleh stres oksidatif. Metode konvensional untuk menilai kemurnian dan degradasi fikosianin melibatkan serapan UV-vis dengan serapan maksimum pada 620 nm (Adjali dkk., 2022).

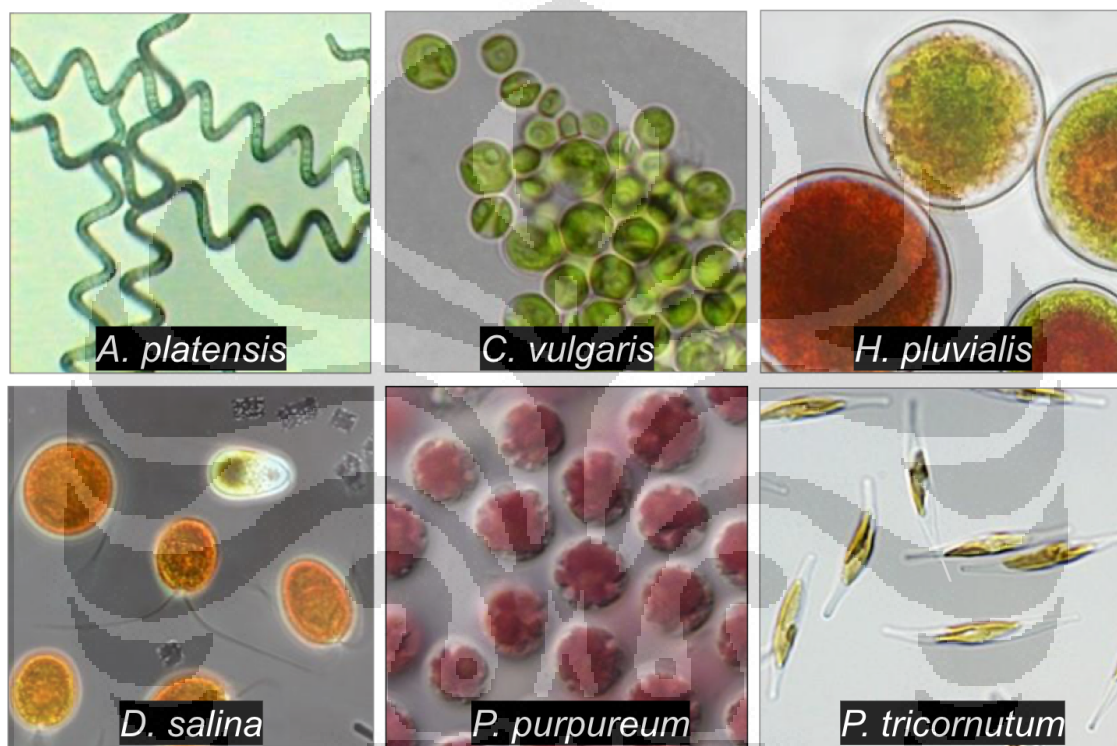
2.2.3 Klorofil

Seperti pigmen alami lainnya, klorofil memiliki berbagai peran dalam industri bahan aditif, terutama digunakan secara luas sebagai pewarna. Pigmen kehijauan ini terdapat pada organisme fotosintesis oksigenik seperti tumbuhan, mikroalga, dan *cyanobacteria*, memainkan peran penting dalam fotosintesis dengan menyerap dan mengubah energi matahari menjadi energi kimia. Sebagai pigmen hijau alami yang paling melimpah, klorofil kini menarik perhatian besar sebagai pewarna makanan, pakan, kosmetik, dan obat-obatan, serta suplemen makanan fungsional (Sun dkk., 2023).

2.2 Mikroalga

Mikroalga mengacu pada mikroorganisme fotosintetik bersel tunggal yang memiliki ukuran antara beberapa mikrometer hingga ratusan mikrometer dengan diameter antara 3-30 μ m. Sianobakteri ini dikatakan berharga karena kemampuannya menghasilkan

beragam senyawa di dalam selnya. memiliki kapasitas untuk membuat zat berharga, beberapa spesies mikroalga yang sudah digunakan dalam bidang industri diantaranya adalah *A. platensis*, *C. vulgaris*, *H. pluvialis*, *D. salina*, *P. purpureum*, dan *P. tricornutum* (Gambar 2.2). *A. platensis*, atau lebih dikenal dengan nama spirulina, mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi, yaitu protein, dan nutrisi lainnya seperti lemak, karbohidrat, antioksidan, dan vitamin (Armelia dkk., 2023; Gallego dkk., 2022).



Gambar 2.2 Beberapa spesies mikroalga yang umum dimanfaatkan dalam industri

Sumber: *The University of Manchester: Microalgae strain catalogue*

Spesies spirulina dapat tumbuh di lingkungan dengan salinitas yang bervariasi. Spirulina menunjukkan distribusi luas di berbagai ekosistem, meliputi lingkungan darat dan perairan. Mikroalga jenis ini terdiri dari 60-71% protein, 8% lemak, 16% karbohidrat, 17% karotena, lebih dari 1% klorofil-a, 18% fikosiananin, dan 20-30% asam linoleat dari total asam lemak. Kualitas spirulina sangat erat kaitannya dengan unsur hara yang ada dalam media budidaya, unsur hara makro (N, P, K, S, Ca, Mg, Na), unsur hara mikro (Cu, Zn, Bo, Co, Mo), dan unsur hara tambahan. nutrisi (H, C, O) memainkan peran penting. Nitrogen, unsur penting untuk pertumbuhan spirulina, terdapat di air laut dalam bentuk

organik (protein, asam amino, urea) dan anorganik, termasuk nitrat (NO_3), nitrit (NO_2), amonium (NH_4), amonia (NH_3), dan molekul nitrogen (N_2) dalam bentuk gas (AlFadhly et al., 2022; Ruliaty et al., 2022). Berbagai teknik dan medium dapat digunakan untuk membudidayakan spirulina, contohnya sistem terbuka seperti kolam dan danau dengan menggunakan media budidaya berbasis kimia seperti media Zarrouk, Conway dan Kosarik. Media Zarrouk merupakan yang paling sering digunakan oleh banyak perusahaan untuk budidaya Spirulina. Namun, keseluruhan biaya media budidaya Zarrouk tidak berkelanjutan dalam jangka panjang karena perkiraan biaya per liter media budidaya adalah 0,08 dolar amerika yang mencakup sekitar 35% dari total biaya produksi biomassa alga (Armelia dkk., 2023).

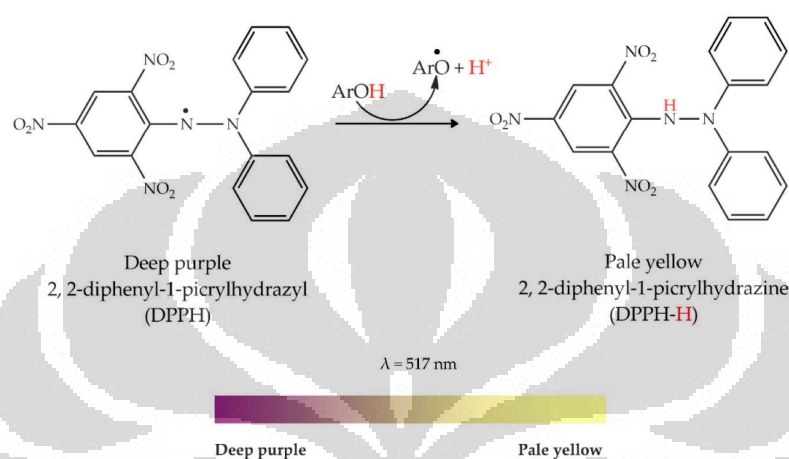
2.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan jenis senyawa yang memiliki kemampuan untuk mengatasi atau mengurangi efek yang dihasilkan oleh oksidan dalam tubuh. Cara kerjanya dengan memberikan satu elektron kepada senyawa radikal bebas (senyawa yang bersifat reaktif), sehingga dapat menghambat aktivitas senyawa tersebut dengan menghasilkan produk stabil. Antioksidan memainkan peran yang begitu penting untuk menghambat aktivitas senyawa tersebut (Saleh dkk., 2012).

Antioksidan berperan penting dalam menjaga makanan tetap awet dengan menghambat proses oksidasi, serta memberikan banyak kontribusi pada berbagai jenis suplemen makanan, nutrasetikal, dan bahan makanan fungsional. Pada bidang kesehatan, antioksidan juga digunakan untuk mengurangi resiko penyakit berkat kemampuannya dalam melindungi tubuh dari kerusakan akibat oksidasi. Ekstrak alami merupakan sumber dari banyak zat antioksidan. Antioksidan secara alami dapat ditemukan dalam tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme yang kaya akan vitamin, senyawa fenolik, dan karotenoid (Flieger dkk., 2021; Shahidi & Zhong, 2015).

Salah satu uji antioksidan yang umum dilakukan adalah metode DPPH. Radikal DPPH• ditemukan oleh Goldschmidt dan Renn pada tahun 1920-an. Pertama kali dikembangkan oleh Blois pada tahun 1958. Radikal ini terkenal karena stabilitasnya yang luar biasa akibat delokalisasi radikal dalam cincin aromatik. Radikal ini memiliki warna ungu tua yang intens. Dalam uji coba, radikal ini dinetralkan dengan menerima atom hidrogen atau elektron dari spesies antioksidan (atau agen pereduksi) selama proses

tersebut, diubah menjadi bentuk tereduksi (DPPH atau DPPH-H) pada akhir proses (Gambar 2.3). Elektron tak berpasangan dari radikal DPPH menyerap dengan kuat pada panjang gelombang 517 nm, menghasilkan warna ungu tua. Namun, ketika elektron ganjil berpasangan dengan elektron lain, warna awal perlahan-lahan memudar menjadi kuning pucat.



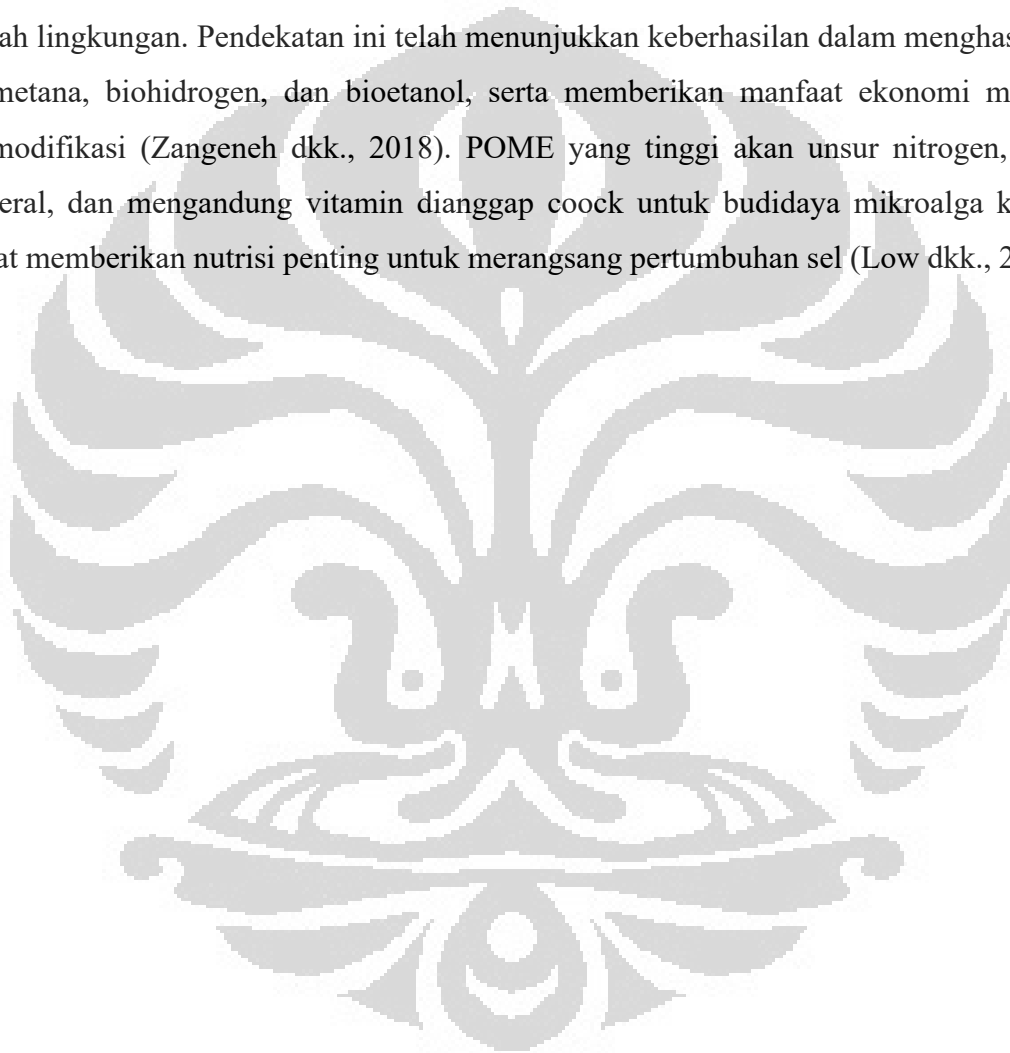
Gambar 2.3 Reaksi DPPH ketika bertemu suatu senyawaan antioksidan

Sumber: *National Center for Biotechnology Information. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations*

2.4 Limbah Sawit

Palm Oil Mill Effluent (POME) adalah air limbah yang dihasilkan selama proses sterilisasi minyak sawit, sebelum dapat dilepaskan dengan aman ke lingkungan POME harus diolah terlebih dahulu. POME, limbah berupa lumpur tebal dan berwarna coklat, memiliki tingkat *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) dan *Chemical Oxygen Demand* (COD) yang tinggi. Peningkatan kadar BOD dan COD yang disebabkan oleh POME dapat mencapai hingga 100.000 mg/L. Oleh karena itu, meskipun POME digolongkan dalam limbah non-toksik, limbah ini memberikan kontribusi pada masalah lingkungan karena kemampuannya yang besar dalam menghabiskan kandungan organik dan nutrisi di dalam sistem akuatik, seperti oksigen dan zat gizi lainnya (Kamyab dkk., 2018).

Di antara metode konvensional, pengolahan biologis, termasuk sistem anaerobik dan aerobik, banyak digunakan untuk mengolah POME. Namun demikian, teknik-teknik yang ada masih belum mencapai pengolahan yang komprehensif, dan POME yang diolah secara biologis masih mempertahankan warna coklat tua. Pewarnaan yang persisten ini disebabkan oleh adanya unsur tanaman seperti lignin dan senyawa fenolik, yang tidak berubah selama proses pengolahan biologis. Dengan itu, muncul pemanfaatan mikroalga dalam pengolahan POME untuk menghasilkan biofuel sebagai solusi yang kompetitif dan ramah lingkungan. Pendekatan ini telah menunjukkan keberhasilan dalam menghasilkan biometana, biohidrogen, dan bioetanol, serta memberikan manfaat ekonomi melalui biomodifikasi (Zangeneh dkk., 2018). POME yang tinggi akan unsur nitrogen, kaya mineral, dan mengandung vitamin dianggap cocok untuk budidaya mikroalga karena dapat memberikan nutrisi penting untuk merangsang pertumbuhan sel (Low dkk., 2021).



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Pusat Penelitian Bioteknologi, *Science Center*, Jl. Raya Jakarta-Bogor No.KM 46, Pakansari, Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Penelitian akan dilaksanakan pada bulan September hingga Desember 2023.

1.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat kaca yang lazim digunakan di laboratorium, *micropipet* (DRAGONLAB), tabung sentrifugasi (Falcon) 15 & 50 mL, botol semprot, *water bath* (Stuart), *magnetic stirrer* (Thermo Fisher Scientific), *magnetic bar*, mortar, alu, *centrifuge* (KUBOTA 6200), vorteks (Thermo Fisher Scientific), *deepwell maximizer bio-shaker* (TAITEC), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800), FE-SEM (Thermo Fisher Scientific), GC-MS (Shimadzu).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga, standar beta-karotena, KOH, etanol, metanol, kloroform, akuades, heksana, diklorometana, metoksiamina hidroklorida, *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroasetamida.

1.3 Metode penelitian

3.3.1 Penumbuhan mikroalga

Sampel mikroalga yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari ITB. Mikroalga ditumbuhkan dari medium zarrouk yang ditambahkan empat variasi konsentrasi limbah sawit (POME), yaitu 0, 30, 60, dan 100%.

3.3.2 Analisis Granula Mikroalga dengan FE-SEM

Morfologi permukaan sampel mikroalga yang ditumbuhkan bermedium limbah sawit (POME) 0, 30, 60, dan 100% diperiksa menggunakan FE-SEM. Sampel dianalisis dengan perbesaran 1000 dan 2000 kali untuk mengetahui apakah terjadi perubahan struktur pada granula mikroalga seperti pengelupasan, pecah dan retak.

3.3.3 Ekstraksi beta-karotena

Ekstraksi beta-karotena dilakukan dengan metode meserasi. Diawali dengan pembuatan KOH 10 M. Sebanyak 56 g KOH padat dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 100 mL. Selanjutnya, ke dalam empat erlenmeyer berisi 1 g mikroalga masing-masing ditambahkan 14 mL KOH 10 M, diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 5 menit, kemudian dipanaskan dengan *water bath* pada suhu 60°C selama 10 menit. Setelah itu, campuran didinginkan hingga suhu ruang dan disaring. Kertas saring bersama dengan residu yang menempel kemudian dimasukkan kembali ke empat erlenmeyer berbeda. Ke dalam setiap erlenmeyer ditambahkan 9 mL pelarut untuk ekstraksi (etanol, metanol, heksana, atau diklorometana). Campuran dalam erlenmeyer diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 10 menit, lalu dipindahkan ke tabung sentrifugasi berukuran 50 mL untuk disentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 10 menit. Supernatan yang berwarna kekuningan dipisahkan, disaring, dan ditampung pada tabung sentrifugasi berukuran 15 mL. Jika tidak segera digunakan, filtrat disimpan di lemari pendingin dengan suhu 14°C.

3.3.4 Analisis Beta-karotena dengan Spektrofotometer UV-Vis

Deret larutan standar beta-karotena dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 1,5; 3; 6; 9; dan 12 µg/mL dibuat dari padatan standar beta-karotena yang dilarutkan dalam aseton. Absorbans diukur dengan spektrofotometer Vis pada λ_{max} 545 nm (Popescu dkk., 2022).

Kurva standar yang diperoleh digunakan untuk menentukan kadar beta-karotena dalam ekstrak karotenoid yang diperoleh dari prosedur ekstraksi di atas.

3.3.5 Analisis Beta-karotena Menggunakan GC-MS

Sebanyak 10 mg sampel mikroalga dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL kemudian diinkubasi dalam pendingin dengan suhu -80°C . Pelarut campuran dibuat dengan mencampurkan metanol:kloroform:akuades dengan perbandingan 5:2:2.

Sebanyak 1000 μL *pelarut* campuran yang mengandung 100 $\mu\text{g/mL}$ standar internal dimasukkan ke masing-masing *microtube* yang berisi sampel, selanjutnya dihomogenkan dengan vorteks dan inkubasi dengan *deepwell maximizer bio-shaker* pada 1200 rpm di suhu 37°C selama 30 menit. Setelahnya disentrifugasi selama 3 menit pada 10000 rpm suhu 4°C . Sebanyak 600 μL supernatan dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL, lalu ditambahkan 300 μL *ultrapure water*, dan divorteks. Sampel kembali disentrifugasi selama 3 menit pada 10000 rpm suhu 4°C . Supernatan dibagi ke dalam dua tempat, 400 μL dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL yang baru, sedangkan 200 μL dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi sebagai sampel *quality control* (QC). Untuk membuat sampel QC, dipindahkan 400 μL supernatan dari semua sampel ke dalam *microtube* yang baru. Semua sampel ditutup rapat dan pelarut diuapkan pada konsentrator di suhu 30°C selama dua jam, kemudian semua sampel dibekukan dengan *liquid nitrogen* dan *freeze dry* sepanjang malam.

Sebanyak 100 μL metoksiamina hidroklorida ditambahkan ke sampel yang sudah didiamkan semalaman dan diinkubasi dengan *deepwell maximizer bio-shaker* pada 1200 rpm di suhu 30°C selama 90 menit. Ke dalam campuran ditambahkan 50 μL MSTFA dan diinkubasi kembali dengan *deepwell maximizer bio-shaker* pada 1200 rpm di suhu 37°C selama 30 menit. Sampel yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada 10000 rpm suhu 25°C . Supernatan dipindahkan sebanyak 100 μL ke dalam vial GC/MS dan siap diinjeksikan.

3.3.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan pada mikroalga dilakukan dengan menggunakan *Microplate Spectrophotometer Multiskan Go* (Thermo Scientific) dan 96-well plate. Serbuk DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) (0,0019 g) dilarutkan dengan 5 mL

metanol dalam tabung falcon dan dihomogenkan dengan vorteks menghasilkan larutan DPPH (1 mM). Blangko dibuat dengan 50 μ L larutan DPPH dimasukkan ke *96- well plate* dan ditambahkan 50 μ L akuades.

Larutan induk vitamin C (50 μ g/mL) dibuat dengan cara melarutkan senyawa vitamin C sebanyak 5 mg dalam metanol pada labu 100 mL sampai tanda batas, lalu dihomogenkan. Dari larutan induk vitamin C, dibuat deret larutan standar 1, 2, 4, 5, 6, 8, dan 10 μ g/mL. Deret larutan standar diencerkan menggunakan metanol seperti pada pembuatan larutan induk.

Larutan sampel uji dibuat dengan 10 mg mikroalga dilarutkan dengan 1 mL dari tiga jenis pelarut berbeda. Pada *microtube*, 10 mg mikroalga yang ditumbuhkan dalam berbagai persentase limbah sawit dilarutkan dengan air, etanol, dan metanol. Sebanyak 50 μ L larutan sampel dimasukkan ke *96-well plate* dan ditambahkan 50 μ L larutan DPPH. Seluruh proses pengerjaan dilakukan dengan ditutup *aluminium foil* karena metanol mudah menguap ke lingkungan, serta larutan DPPH sensitif terhadap cahaya dan oksidan bebas di udara. Selanjutnya, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setiap sampel, deret larutan standar dan blangko di ukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan *Microplate Spectrophotometer Multiskan Go (Thermo Scientific)*.

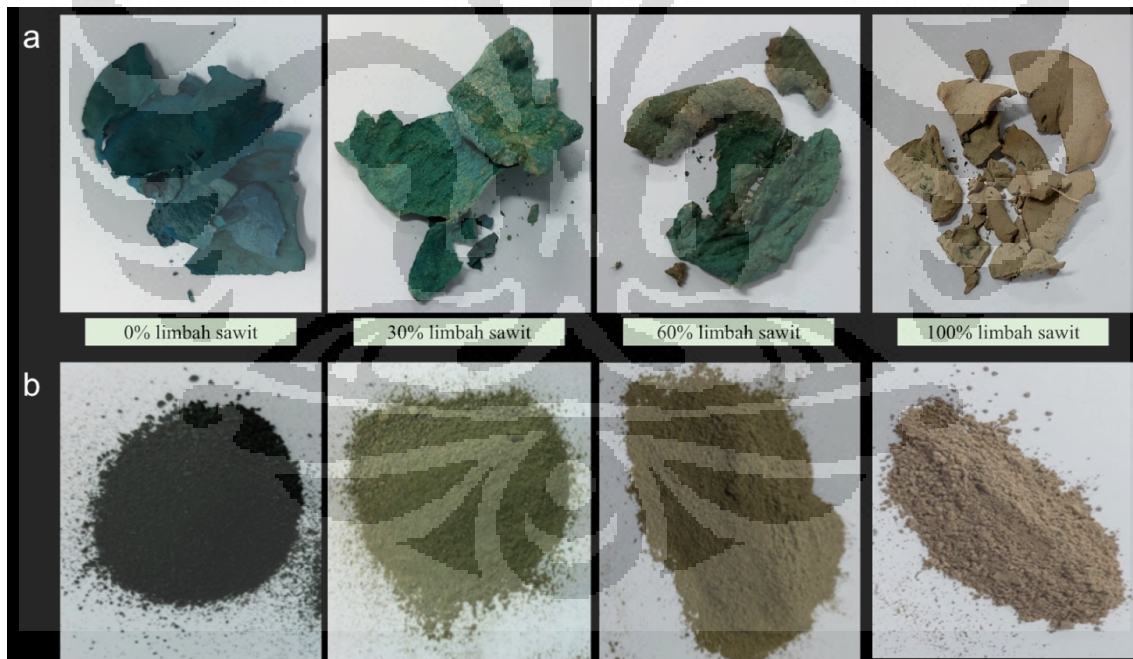
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penumbuhan Mikroalga

Pada penelitian ini, digunakan mikroalga dengan jenis spirulina. Spirulina adalah sianobakteri berfilamen dan multiseluler. Pada tahun 1962, Stanier dan Van Niel mengklasifikasikan spirulina sebagai alga yang termasuk dalam prokariota.

Mikroalga yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari ITB. Sampel yang di dapat berupa kepingan mikroalga yang sudah dikeringkan (Gambar 4.1a). Gambar 4.1 memperlihatkan bahwa penambahan limbah sawit ke dalam media pertumbuhan berpengaruh terhadap warna mikroalga. Meningkatnya persentase limbah sawit pada medium pertumbuhan membuat warna mikroalga menjadi semakin kecoklatan dan hampir tidak terlihat lagi warna hijau pekat yang khas.



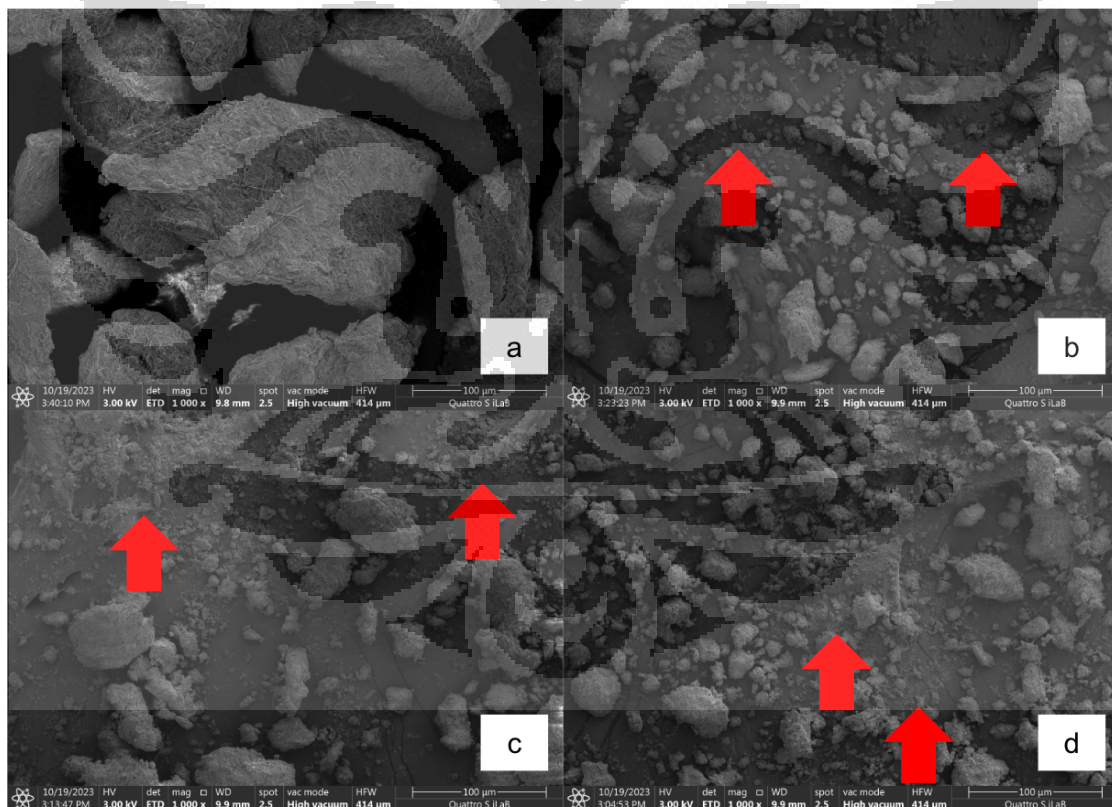
Gambar 4.1 Biomassa mikroalga. Sebelum dihaluskan (a) serta setelah dihaluskan dan disaring 100 mesh (b)

Warna hijau tua pada bubuk spirulina berasal dari klorofil (Park dkk., 2018), sedangkan warna biru-hijau khas spirulina disebabkan oleh fikosianin (Bortolini dkk.,

2022). Penurunan warna hijau dan biru-hijau yang terlihat pada biomassa spirulina dengan persentase POME lebih dari 0% mengindikasikan terhambatnya pembentukan pigmen klorofil dan fikosianin. Warna asal limbah sawit (POME) yang berwarna coklat gelap diduga menghalangi absorpsi cahaya dalam proses fotosintesis pada mikroalga.

4.2 Analisis granula mikroalga dengan FE-SEM

FESEM digunakan untuk memvisualisasi morfologi biomassa mikroalga yang ditumbuhkan bermedium limbah sawit (POME) 0, 30, 60, dan 100%. Terdapat perbedaan ukuran granula mikroalga antara yang ditumbuhkan dengan penambahan 0% limbah sawit pada mediumnya, dengan mikroalga ditumbuhkan dengan penambahan limbah sawit di atas 0% (Gambar 4.2). Perbedaan penambahan persentase sawit membuat nutrisi yang tersedia pada media tumbuh mikroalga menjadi berbeda-beda.



Gambar 4.2 Hasil analisis FESEM dengan perbesaran 1000 kali. Mikroalga yang ditumbuhkan bermedium limbah sawit (POME) 0 (a), 30 (b), 60 (c), dan 100% (d)

Meningkatnya persentase limbah sawit (POME) pada media tumbuh mikroalga akan memberikan nutrisi unsur C yang berlebih. Meskipun karbon merupakan salah satu komponen terpenting yang mempengaruhi perkembangan dan komposisi biomassa mikroalga, tetapi jika digunakan secara berlebihan akan menghambat pertumbuhan mikroalga (Sari dkk., 2022). Pertumbuhan mikroalga yang terhambat pada media dengan persentase sawit yang kian besar menyebabkan mikroalga yang ditumbuhkan dengan persentase 0% memiliki ukuran granula yang paling besar dibandingkan yang lainnya. Mikroalga yang mediumnya ditambahkan limbah sawit 30-100% juga terlihat ditutupi oleh residu limbah sawit (Gambar 4.2b, 4.2c, dan 4.2d) sehingga seratnya tidak sejelas mikroalga dengan penambahan limbah sawit 0% (Gambar 4.2a).

4.3 Ekstraksi beta-karotena

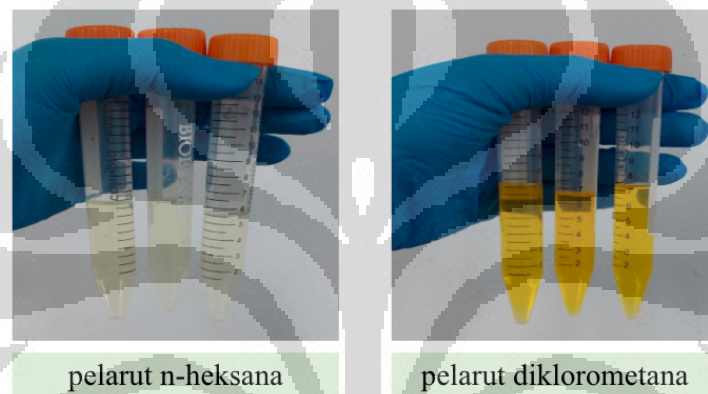
Ekstraksi beta-karotena dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara perendaman serbuk dalam pelarut air atau pelarut organik sehingga zat yang terkandung di dalamnya akan terlarut. Pada proses ekstraksi, penggunaan pelarut yang tepat merupakan salah satu hal yang perlu diperhatikan guna mendapatkan ekstrak dengan rendemen yang tinggi.

Beta-karotena dapat larut dalam pelarut organik (Miękus dkk., 2019) sebaliknya, tidak larut dalam air (Ishimoto dkk., 2019). Pada penelitian ini digunakan etanol, metanol, heksana, dan diklorometana sebagai pelarut, dengan pertimbangan keempat pelarut tersebut merupakan pelarut non polar (Abarca-Vargas dkk., 2016). Penggunaan pelarut yang berbeda dilakukan dengan tujuan menemukan pelarut yang menghasilkan ekstrak karotenoid terbaik. Ekstraksi dengan pelarut etanol dan metanol tidak diselesaikan karena hasil yang kurang memuaskan, hasil ekstrak yang didapatkan dengan kedua pelarut tersebut menunjukkan warna yang mendekati bening. Ini berkaitan dengan kepolaran etanol dan metanol yang meskipun digolongkan sebagai pelarut non polar, indeks polaritasnya masih jauh lebih tinggi dibandingkan diklorometana dan heksana (Abarca-Vargas dkk., 2016).

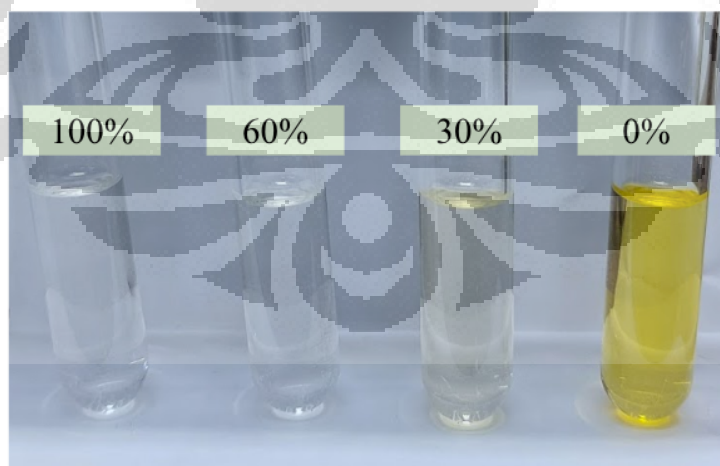
Dari hasil ekstraksi pada mikroalga dengan penambahan 0% pada medium (Gambar 4.3), dapat dilihat jika pelarut diklorometana menunjukkan warna kuning yang lebih pekat dibandingkan pelarut heksana. Diklorometana merupakan pelarut yang paling non polar dibandingkan heksana, etanol, dan metanol (Mokgotho dkk., 2013), ini yang

menyebabkan diklorometana bekerja sebagai pelarut terbaik diantara empat pelarut yang digunakan.

Pada Gambar 4.4 dapat dilihat terjadi perbedaan warna yang signifikan, warna kekuningan memudar seiring dengan meningkatnya persentase limbah sawit pada medium. Beta-karotena merupakan pigmen alami yang bertanggung jawab atas warna kuning pada mikroalga (Marzorati dkk., 2020). Penurunan warna kuning menandakan bahwa penambahan limbah sawit pada medium berdampak negatif dalam pembentukan pigmen beta-karotena.



Gambar 4.3 Ekstrak karotenoid yang diperoleh melalui maserasi mikroalga dengan pelarut heksana dan diklorometana



Gambar 4.4 Ekstrak karotenoid pada mikroalga yang ditumbuhkan dalam zarrouk medium dengan penambahan berbagai persentase limbah sawit (POME)

4.4 Analisis beta-karotena dengan spektrofotometer UV-Vis

Kadar beta-karotena yang terkandung dalam mikroalga dihitung berdasarkan absorbans yang didapatkan dari pengukuran menggunakan spektrofotometer Vis. Kadar beta-karotena dalam mikroalga yang diekstraksi dengan diklorometana sebagai pelarutnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Nilai kadar beta-karotena pada ekstrak karotenoid menggunakan pelarut diklorometana

Sampel	Pelarut	Kadar (μg) beta-karotena/ 1 g mikroalga
ZM + 0% POME	Diklorometana	29,1
ZM + 30% POME	Diklorometana	0,2
ZM + 60% POME	Diklorometana	0
ZM + 100% POME	Diklorometana	0

Kandungan beta-karotena mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan penambahan 0% limbah sawit yang diekstraksi dengan pelarut diklorometana tercatat 146 kali lebih banyak dari mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan penambahan 30% limbah sawit. Penambahan limbah sawit (POME) diduga mengganggu pembentukan karotenoid, sehingga kadar beta-karotena berbanding terbalik dengan meningkatnya konsentrasi limbah pada medium tumbuh mikroalga. Karena itu, semakin tinggi limbah yang ditambahkan pada medium pertumbuhan, semakin kecil kandungan beta-karotena dalam mikroalga.

4.5 Analisis beta-karotena dengan menggunakan GC-MS

Analisis metabolomik, dengan menggunakan *Gas Chromatography – Mass Spectrophotometer* (GC-MS), pada mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan penambahan limbah sawit (POME) berbagai persentase bertujuan untuk mengetahui metabolit yang terkandung pada ekstrak terkait, serta sebagai petunjuk kandungan senyawa yang berperan pada aktivitas antioksidan (Deyab dkk., 2021).

Asam amino dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang baik (Dash & Ghosh, 2017). Pada penelitian ini, hasil analisis GC-MS sampel mikroalga yang ditumbuhkan

pada media zarrouk dengan persentase limbah sawit (POME) 0% menunjukkan keberadaan asam amino L-alanina dan L-valina (Tabel 4.2) yang dapat berfungsi sebagai agen antioksidan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Nawal pada tahun 2022, dinyatakan bahwa persentase keberadaan karbohidrat, dan turunannya, pada spirulina akan bervariasi tergantung banyaknya unsur nitrogen yang terkandung dalam media pertumbuhan (Nawal et al., 2022). Hal ini dapat menjelaskan keberadaan asam D-Glukonik, asam D-Galaktonik, dan D-(+)-Talosa yang muncul pada sampel mikrolaga ZM + 0% POME, di mana unsur nitrogen yang ada dapat menutrisi mikroalga dengan baik. Namun demikian, pada sampel dengan persentase limbah sawit lebih tinggi dari itu, keberadaan karbohidrat dan turunannya, contohnya berupa gula, yang tidak lagi terdeteksi merupakan dampak dari terlalu tingginya nutrisi unsur nitrogen. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sari pada 2022, terlalu tingginya unsur nutrisi pada media pertumbuhan dapat menjadi masalah karena sisa dari nutrisi yang tidak terserap sempurna akan mengendap dan menghambat pertumbuhan mikroalga (Sari dkk., 2022). Dengan demikian, penurunan jumlah metabolit seiring dengan bertambahnya persentase limbah sawit pada media pertumbuhan juga diduga disebabkan oleh penyerapan nutrisi yang tidak sempurna oleh mikroalga.

Tabel 4.2 Kandungan senyawa pada mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan variasi persentase limbah sawit (POME)

Senyawa	Sampel			
	1	2	3	4
<i>Butanedioic acid, 2TMS derivative</i>	✓			
<i>D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyl</i>	✓			
<i>D-Galactonic acid, 6TMS</i>	✓	✓		
<i>D-Gluconic acid, 6TMS</i>	✓			
<i>Ethanamine, 2TMS derivative</i>				✓
<i>Glyceric acid, 3TMS derivative</i>	✓	✓		
<i>Glycerol, 3TMS derivative</i>	✓	✓	✓	
<i>Glyceryl-glycoside TMS ether</i>	✓	✓	✓	
<i>L-Alanine, 2TMS derivative</i>	✓			
<i>L-Valine, TMS derivative</i>	✓			
<i>Lactic Acid, 2TMS derivative</i>	✓	✓	✓	
<i>Palmitic Acid, TMS derivative</i>		✓	✓	
<i>Trifluoromethyl-bis-(trimethylsilyl)methyl ketone</i>				✓

Keterangan:

1. Mikroalga ZM + 0% POME
2. Mikroalga ZM + 30% POME
3. Mikroalga ZM + 60% POME
4. Mikroalga ZM + 100% POME

4.6 Penentuan aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak mikroalga yang ditumbuhkan pada limbah sawit (POME) dilakukan dengan metode DPPH. DPPH merupakan suatu senyawa radikal bebas yang digunakan sebagai reagen dalam penentuan antioksidan. Ekstrak mikroalga yang digunakan pada uji aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh Gambar 4.5.

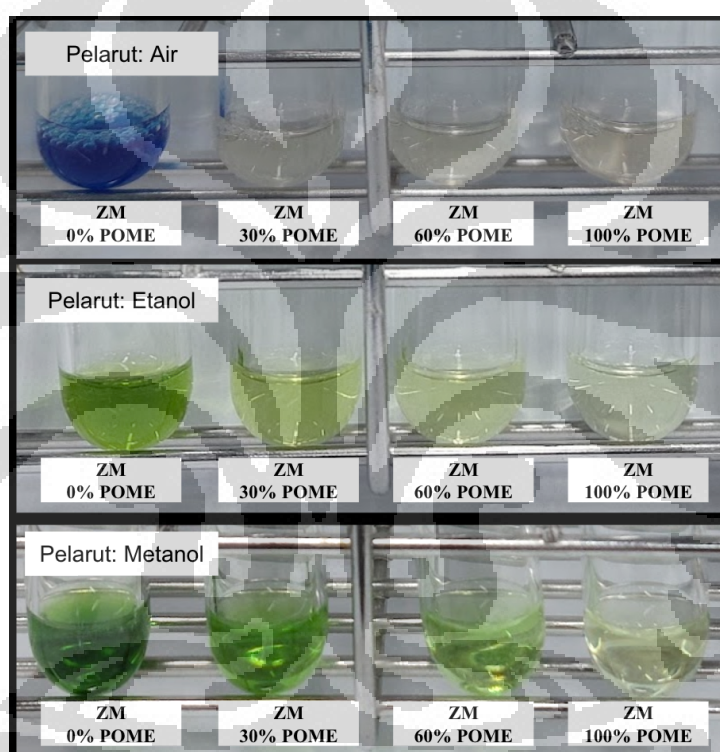
Aktivitas antioksidan dari mikroalga yang ditumbuhkan pada limbah sawit (POME) dilihat dari nilai % Inhibisi yang didapat (Tabel 4.3). Kode ZM pada nama sampel digunakan untuk menandakan penggunaan media zarrouk untuk pertumbuhan mikroalga. Penambahan limbah sawit pada media pertumbuhan diberi kode sesuai dengan persentase limbah sawit (POME).

Tabel 4.3 Hasil % Inhibisi dari ekstrak mikroalga yang ditumbuhkan dalam media mengandung limbah sawit (POME) dengan berbagai persentase

Nama sampel	Pelarut	% Inhibisi
ZM + 0% POME	Air	26,47
ZM + 30% POME	Air	0
ZM + 60% POME	Air	0
ZM + 100% POME	Air	0
ZM + 0% POME	Metanol	0
ZM + 30% POME	Metanol	0
ZM + 60% POME	Metanol	0
ZM + 100% POME	Metanol	0
ZM + 0% POME	Etanol	0
ZM + 30% POME	Etanol	0
ZM + 60% POME	Etanol	0
ZM + 100% POME	Etanol	0

Nilai % inhibisi yang dapat ditentukan hanya muncul pada perhitungan dari ekstrak mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan penambahan 0% limbah sawit (POME) menggunakan pelarut air dengan nilai 26,47%. Sementara itu, ekstrak mikroalga yang ditumbuhkan pada media zarrouk dengan penambahan 0% limbah sawit (POME) menggunakan pelarut metanol dan etanol tidak dapat ditentukan (*not detected*). Variasi penggunaan pelarut menyebabkan perbedaan warna pada ekstrak kasar mikroalga, ini berkaitan dengan kepolaran pelarut dan juga kepolaran pigmen dalam mikroalga. Fikosianin merupakan pigmen dengan warna biru pekat pada spirulina yang larut dengan baik dalam air (Silveira dkk., 2007), sedangkan klorofil dapat larut

dengan baik dalam etanol dan larut dengan lebih baik dalam metanol (Simon & Helliwell, 1997), maka dari itu warna biru yang muncul pada ekstrak kasar mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan penambahan 0% limbah sawit (POME) dengan pelarut air diduga sebagai fikosianin dan warna warna hijau pada ekstrak kasar mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk dengan penambahan limbah sawit (POME) adalah klorofil (Gambar 4.5). Rendahnya persentase inhibisi pada sampel selain mikroalga ZM 0% POME dengan pelarut air, diduga terjadi karena buruknya aktivitas antioksidan yang merupakan hasil dari terhambatnya pembentukan pigmen.



Gambar 4.5 Ekstrak mikroalga yang digunakan pada uji antioksidan

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Meningkatnya persentase limbah sawit yang ada pada medium pertumbuhan mikroalga membuat kadar beta-karotena menurun.
2. Dari empat pelarut yang digunakan pada penelitian ini, diklorometana menghasilkan ekstrak karotenoid terbaik.
3. Meningkatnya persentase limbah sawit yang ada pada medium pertumbuhan mikroalga menurunkan aktivitas antioksidan.

5.2 Saran

1. Studi lebih lanjut mengenai cara ekstraksi dengan metode sonikasi untuk mengetahui kadar beta-karotena mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk yang mengandung POME dengan berbagai persentase perlu dilakukan.
2. Studi lebih lanjut mengenai aktivitas antioksidan yang dilakukan selain dengan metode DPPH pada mikroalga yang ditumbuhkan dalam media zarrouk yang mengandung POME dengan berbagai persentase perlu dilakukan.
3. Studi lebih lanjut mengenai kadar nilai nutrisi dari berbagai macam sampel limbah sawit (POME) perlu dilakukan.
4. Studi lebih lanjut mengenai hasil perumbuhan spirulina pada media Conway dan Kosarik perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abarca-Vargas, R., Peña Malacara, C. F., & Petricevich, V. L. (2016). Characterization of chemical compounds with antioxidant and cytotoxic activities in bougainvillea x buttiana holtum and standl, (Var. rose) extracts. *Antioxidants*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/antiox5040045>
- Adjali, A., Clarot, I., Chen, Z., Marchioni, E., & Boudier, A. (2022). Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. Dalam *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 12, Nomor 3, hlm. 406–414). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005>
- AlFadhly, N. K. Z., Alhelfi, N., Altemimi, A. B., Verma, D. K., & Cacciola, F. (2022). Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus Spirulina: An Investigative Review on Current Trends. Dalam *Plants* (Vol. 11, Nomor 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11223063>
- AlFadhly, N. K. Z., Alhelfi, N., Altemimi, A. B., Verma, D. K., Cacciola, F., & Narayanankutty, A. (2022). Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of Spirulina and Their Health Benefits: A Review. Dalam *Molecules* (Vol. 27, Nomor 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27175584>
- Armelia, A., Djarot, I., Paminto, A., Nurfaiz, I., Nuha, & Handayani, T. (2023). Analisis Limbah Media Zarrouk Modifikasi yang Digunakan untuk Budidaya Spirulina platensis dan Analisis Kualitas Biomassanya sebagai Bahan Pangan Fungsional. 24(2), 315. <https://elsa.brin.go.id/>.
- Bortolini, D. G., Maciel, G. M., Fernandes, I. de A. A., Pedro, A. C., Rubio, F. T. V., Branco, I. G., & Haminiuk, C. W. I. (2022). Functional properties of bioactive compounds from Spirulina spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100134>
- Dash, P., & Ghosh, G. (2017). Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from Cucurbitaceae seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 54(13), 4162–4172. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2855-6>

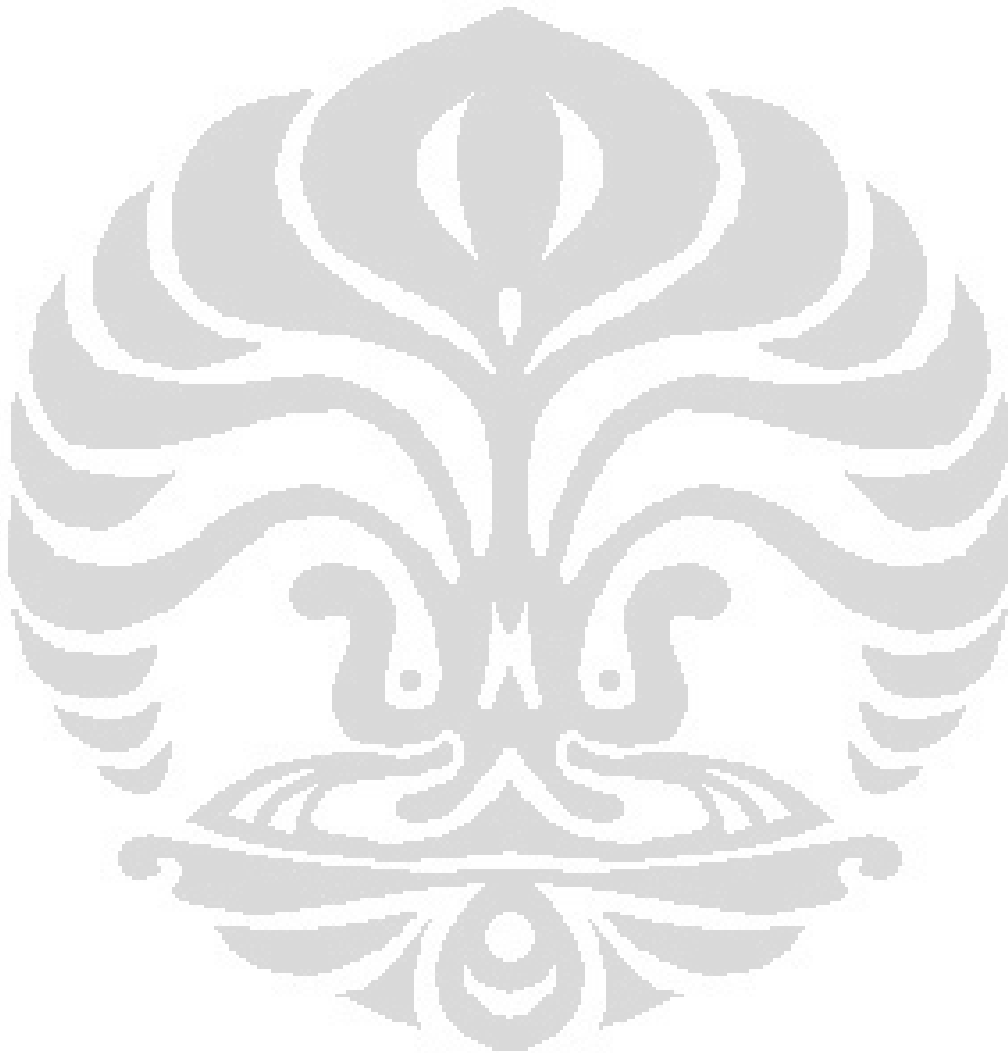
- Deyab, M., El-Sheekh, M., Hasan, R., Elsadany, A., & Abu Ahmed, S. (2021). Phytochemical Components of Two Cyanobacterial Local Strains. *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*, 11(1), 67–75.
<https://doi.org/10.21608/sjdfs.2021.195593>
- Fernandes, A. S., Nascimento, T. C., Pinheiro, P. N., Vendruscolo, R. G., Wagner, R., de Rosso, V. V., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2021). Bioaccessibility of microalgae-based carotenoids and their association with the lipid matrix. *Food Research International*, 148.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110596>
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. Dalam *Materials* (Vol. 14, Nomor 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>
- Gallego, R., Valdés, A., Suárez-Montenegro, Z. J., Sánchez-Martínez, J. D., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2022). Anti-inflammatory and neuroprotective evaluation of diverse microalgae extracts enriched in carotenoids. *Algal Research*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102830>
- Ishimoto, K., Miki, S., Ohno, A., Nakamura, Y., Otani, S., Nakamura, M., & Nakagawa, S. (2019). β -Carotene solid dispersion prepared by hot-melt technology improves its solubility in water. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3540–3546. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03793-8>
- Jalali-Jivan, M., Fathi-Achachlouei, B., Ahmadi-Gavlighi, H., & Jafari, S. M. (2021). Improving the extraction efficiency and stability of β -carotene from carrot by enzyme-assisted green nanoemulsification. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102836>
- Kamyab, H., Friedler, F., Klemeš, J. J., Chelliapan, S., & Rezanian, S. (2018). Bioenergy production and nutrients removal by green microalgae with cultivation from agro-wastewater palm oil mill effluent (POME) - A review. Dalam *Chemical Engineering Transactions* (Vol. 70, hlm. 2197–2202). Italian Association of Chemical Engineering - AIDIC.
<https://doi.org/10.3303/CET1870367>

- Kumar, Y., Kaur, S., Kheto, A., Munshi, M., Sarkar, A., Om Pandey, H., Tarafdar, A., Sindhu, R., & Sirohi, R. (2022). Cultivation of microalgae on food waste: Recent advances and way forward. Dalam *Bioresource Technology* (Vol. 363). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127834>
- Lam, S. S., Liew, R. K., Cheng, C. K., Rasit, N., Ooi, C. K., Ma, N. L., Ng, J. H., Lam, W. H., Chong, C. T., & Chase, H. A. (2018). Pyrolysis production of fruit peel biochar for potential use in treatment of palm oil mill effluent. *Journal of Environmental Management*, 213, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.092>
- Low, S. S., Bong, K. X., Mubashir, M., Cheng, C. K., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, Y. C., Lee, K. T., Munawaroh, H. S. H., & Show, P. L. (2021). Microalgae cultivation in palm oil mill effluent (POME) treatment and biofuel production. Dalam *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 13, Nomor 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su13063247>
- Marzorati, S., Schievano, A., Idà, A., & Verotta, L. (2020). Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: Supercritical CO₂ and water extraction methods for added value products cascade. *Green Chemistry*, 22(1), 187–196. <https://doi.org/10.1039/c9gc03292d>
- Miękus, N., Iqbal, A., Marszałek, K., Puchalski, C., & Świergiel, A. (2019). Green chemistry extractions of carotenoids from *Daucus carota* L.-Supercritical carbon dioxide and enzyme-assisted methods. Dalam *Molecules* (Vol. 24, Nomor 23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24234339>
- Mokgotho, M. P., Gololo, S. S., Masoko, P., Mdee, L. K., Mbazima, V., Shai, L. J., Bagla, V. P., Eloff, J. N., & Mampuru, L. (2013). Isolation and chemical structural characterisation of a compound with antioxidant activity from the roots of *Senna italica*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/519174>
- Park, W. S., Kim, H. J., Li, M., Lim, D. H., Kim, J., Kwak, S. S., Kang, C. M., Ferruzzi, M. G., & Ahn, M. J. (2018). Two classes of pigments, carotenoids and c-phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. *Molecules*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23082065>

- Popescu, M., Iancu, P., Pleșu, V., Bîldea, C. S., & Todasca, C. M. (2022). Different spectrophotometric methods for simultaneous quantification of lycopene and β -carotene from a binary mixture. *LWT*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113238>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae-A review. *Research Article J. Algal Biomass Utln*, 2012(4), 2229–6905.
- Ruliaty, L., Amalia, I. R., Sari, R. I., & Aulia, R. (2022). Different Nitrogen Sources to Improve the Quality of *Spirulina platensis* Culture in Mass Scale. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1118(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1118/1/012015>
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Dalam *Food Chemistry* (Vol. 240, hlm. 90–103). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Saleh, L. P., Suryanto, E., & Yudistira, D. A. (2012). *Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Tongkol Jagung (Zea mays L.)*.
- Santanumurti, M. B., Khanza, S., Abidin, Z., Putri, B., & Hudaidah, S. (2021). The Performance of Microalgae (*Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp. and *Dunaliella* sp.) on White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Wastewater Cultivation Media. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.20473/jafh.v11i1.21345>
- Sari, F. Y. A., Suryajaya, I. M. A., Christwardana, M., & Hadiyanto, H. (2022). Cultivation of Microalgae *Spirulina platensis* in Palm Oil Mill Effluent (POME) Media with Variations of POME Concentration and Nutrient Composition. *Journal of Bioresources and Environmental Sciences*, 1(2), 57–62. <https://doi.org/10.14710/jbes.2022.15052>
- Sathasivam, R., & Ki, J. S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. Dalam *Marine Drugs* (Vol. 16, Nomor 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md16010026>
- Selmani, N., Mirghani, M. E. S., & Alam, M. Z. (2013). Study the growth of microalgae in palm oil mill effluent waste water. *IOP Conference Series:*

- Earth and Environmental Science*, 16(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/16/1/012006>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. Dalam *Journal of Functional Foods* (Vol. 18, hlm. 757–781). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V., & Kalil, S. J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98(8), 1629–1634. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>
- Simon, D., & Helliwell, S. (1997). *Extraction and Quantification of Chlorophyll A from Freshwater Green Algae*.
- Singh, D., Barrow, C. J., Mathur, A. S., Tuli, D. K., & Puri, M. (2015). Optimization of zeaxanthin and β -carotene extraction from *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.02.001>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sun, H., Wang, Y., He, Y., Liu, B., Mou, H., Chen, F., & Yang, S. (2023). Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. Dalam *Marine Drugs* (Vol. 21, Nomor 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md21020082>
- Syukri, D., Si, S., & Si, M. (2021). *Pengetahuan Dasar tentang Senyawa Karotenoid sebagai Bahan Baku Produksi Produk Olahan Hasil Pertanian*.
- Utomo, T., Nawansih, O., & Komalasari, A. (2015). *Studi Penentuan Jenis Outlet Limbah Cair Karet Remah untuk Pertumbuhan Mikroalga dengan Sistem Open Ponds*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23960/jtihp.v20i2.109%20-%20120>
- Young, A. J., & Lowe, G. L. (2018). Carotenoids—antioxidant properties. Dalam *Antioxidants* (Vol. 7, Nomor 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox7020028>

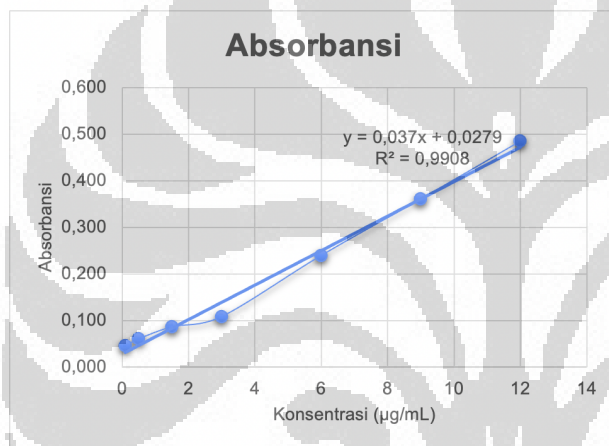
Zangeneh, H., Zinatizadeh, A. A., Zinadini, S., Feyzi, M., & Bahnemann, D. W. (2018). A novel photocatalytic self-cleaning PES nanofiltration membrane incorporating triple metal-nonmetal doped TiO₂ (K-B-N-TiO₂) for post treatment of biologically treated palm oil mill effluent. *Reactive and Functional Polymers*, 127, 139–152.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.04.008>



LAMPIRAN

1. Nilai absorbansi standar beta-karotena & kurva standar

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0,1	0,045
0,5	0,060
1,5	0,086
3	0,108
6	0,239
9	0,360
12	0,484



Sampel	Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Volume (mL)	Kadar (μg)
DCM 100%	0,0037	0	2,5	0
DCM 60%	0,01	0	2,3	0
DCM 30%	0,036	0,218918919	0,9	0,197
DCM 0%	0,42	10,5972973	2,75	29