



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI MIKROALGA THRAUSTOCHYTRIDS PENGHASIL
ASAM DOKOSAHEKSANOAT (DHA)**

SKRIPSI

**HANNIE PUSPAANANDA
0806398285**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI MIKROALGA THRAUSTOCHYTRIDS PENGHASIL
ASAM DOKOSAHEKSANOAT (DHA)**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**HANNIE PUSPAANANDA
0806398285**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JUNI 2012**

ii

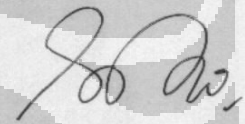
Universitas Indonesia

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 19 Juni 2012



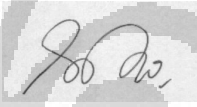
Hannie Puspaananda

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Hannie Puspaananda

NPM : 0806398285

Tanda tangan : 

Tanggal : 19 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Hannie Puspaananda
NPM : 0806398285
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi Mikroalga Thraustochytrids Penghasil Asam
Dokosaheksanoat (DHA)

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Maksun Radji M. Biomed., Ph.D., Apt.

Pembimbing II : Prof. Dr. Witono Basuki M.Sc.

Penguji I : Dr. Amarila Malik, M.Si., Apt.

Penguji II : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc. Apt.

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 16 Juli 2012

KATA PENGANTAR

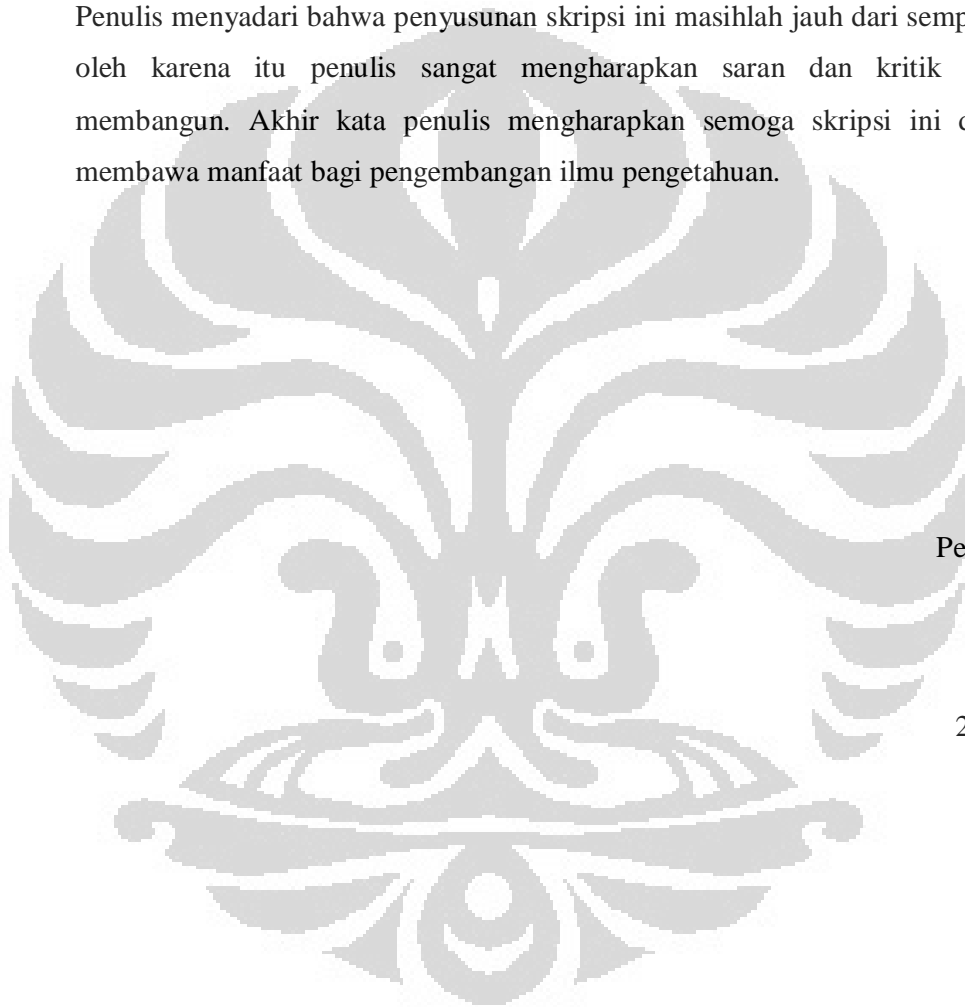
Segala puji dan syukur saya panjatkan kepada Allah S.W.T karena atas segala rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari sepenuhnya bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu saya hendak mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Maksum Radji M. Biomed.,Ph.D., Apt dan Prof. Dr. Witono Basuki M.Sc selaku pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan saya selama penelitian berlangsung serta dalam proses penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Sutriyo S.Si., M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Bapak dan Ibu staf pengajar serta karyawan dan laboran yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan hingga penelitian di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Bapak Adhy Pradana, Ibu Reni Giarni, Ibu Dini Ayudia serta para peneliti dan karyawan di PTB BPPT Serpong yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis selama penelitian berlangsung.
6. Mama, papa, nenek, kakek serta adik tercinta dan pihak keluarga lainnya yang telah banyak memberikan doa, semangat dan dukungan baik moral maupun material kepada penulis hingga penulis mampu menyelesaikan masa pendidikan dan penelitiannya.

7. Sahabat – sahabat seperjuangan Evelina, Cyntiani, Citra, Nurul, Wenny, Nalla, Puji, dan Rio serta teman – teman Farmasi UI angkatan 2008 yang telah memberikan doa, dukungan dan semangat kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.



Penulis

2012

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

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

Nama : Hannie Puspaananda
NPM : 0806398285
Program Studi : Sarjana Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian 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:

Isolasi Mikroalga Thraustochytrids Penghasil Asam Dokosaheksanoat (DHA)

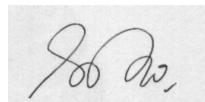
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 19 Juni 2012

Yang menyatakan



(Hannie Puspaananda)

viii

Universitas Indonesia

ABSTRAK

Nama : Hannie Puspaananda
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi Mikroalga Thraustochytrids Penghasil Asam Dokosaheksanoat (DHA)

Asam dokosaheksanoat (DHA) merupakan asam lemak omega-3 esensial yang berperan penting terhadap kerja otak, jaringan saraf serta retina. Saat ini, mikroalga mendapat perhatian sebagai sumber alternatif yang potensial dalam menghasilkan asam lemak omega-3, yang biasanya didapatkan dari produk ikan. Sebagai sumber DHA konvensional, minyak ikan memiliki kandungan DHA yang rendah, yang dapat memicu penangkapan ikan berlebihan (*over fishing*) apabila dibutuhkan jumlah DHA yang banyak. Mikroalga Thraustocytrids ditengarai sebagai mikroalga yang sangat potensial dalam menghasilkan DHA. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat mikroalga Thraustocytrids yang mampu menghasilkan (DHA). Mikroalga Thraustochytrids diisolasi dari guguran daun mangrove yang terletak di Kawasan Mangrove Lampung dengan metode *direct planting*. Mikroalga yang tumbuh diamati morfologinya dengan mikroskop cahaya. Koloni Thraustochytrids yang tumbuh dipurifikasi hingga dihasilkan koloni tunggal yang selanjutnya diperbanyak dan dibuat biomasnya. Asam lemak diekstraksi dan dimetilasi dengan metode *direct transesterification* serta diidentifikasi kandungan DHANYA dengan menggunakan Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa. Hasil identifikasi menunjukkan terdapat DHA pada sampel minyak mikroalga Thraustochytrids. Keberadaan DHA dipastikan oleh kecocokan fragmentasi massa DHA sampel dan fragmentasi massa DHA pada database spektrum massa NIST (National Institute of Standards and Technology).

Kata kunci : Asam lemak, DHA, *direct planting*, Kromatografi Gas–Spektrofotometri Massa, mikroalga, Thraustochytrids
xiv+84 halaman : 7 gambar; 51 lampiran
Daftar Pustaka : 48 (1972-2011)

ABSTRACT

Name : Hannie Puspaananda
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation of Thraustochytrids Microalgae which Produce Docosahexaenoic Acid (DHA)

Docosahexaenoic acid (DHA) is an omega-3 fatty acid that is essential for the proper functioning of the brain, neural tissues and retina. In recent years, microalgae have gained attention as a potential alternative source of omega-3 fatty acid, which are commonly sourced from fish stocks. Fish stocks, as the conventional source of DHA have a very low concentration of DHA, which could bring overfishing issue as an impact of getting a high concentration of DHA. Thraustochytrids is known as a potential microalgae source of DHA. The purpose of this study is to isolate a Thraustochytrids microalgae that can produce DHA. Thraustochytrids microalgae were isolated from fallen mangrove leaves at Lampung Mangrove Zone with direct planting technique. The morphology of growing microalgae was observed with light microscope. The growing Thraustochytrids colony was purified until a single colony was obtained. The selected colony was cultured and was dried to make its biomass. Fatty acid was extracted and methylated using direct transesterification method. The presence of DHA in microalgae isolate was identified with Gas Chromatography- Mass Spectrophotometer. The result of DHA identification proved that the isolate of Thraustochytrids microalgae was contained DHA. The presence of DHA in the microalgae oil sample was confirmed by the similarity of DHA mass fragmentation in the sample and DHA mass fragmentation in NIST (National Institute of Standards and Technology) Library Database.

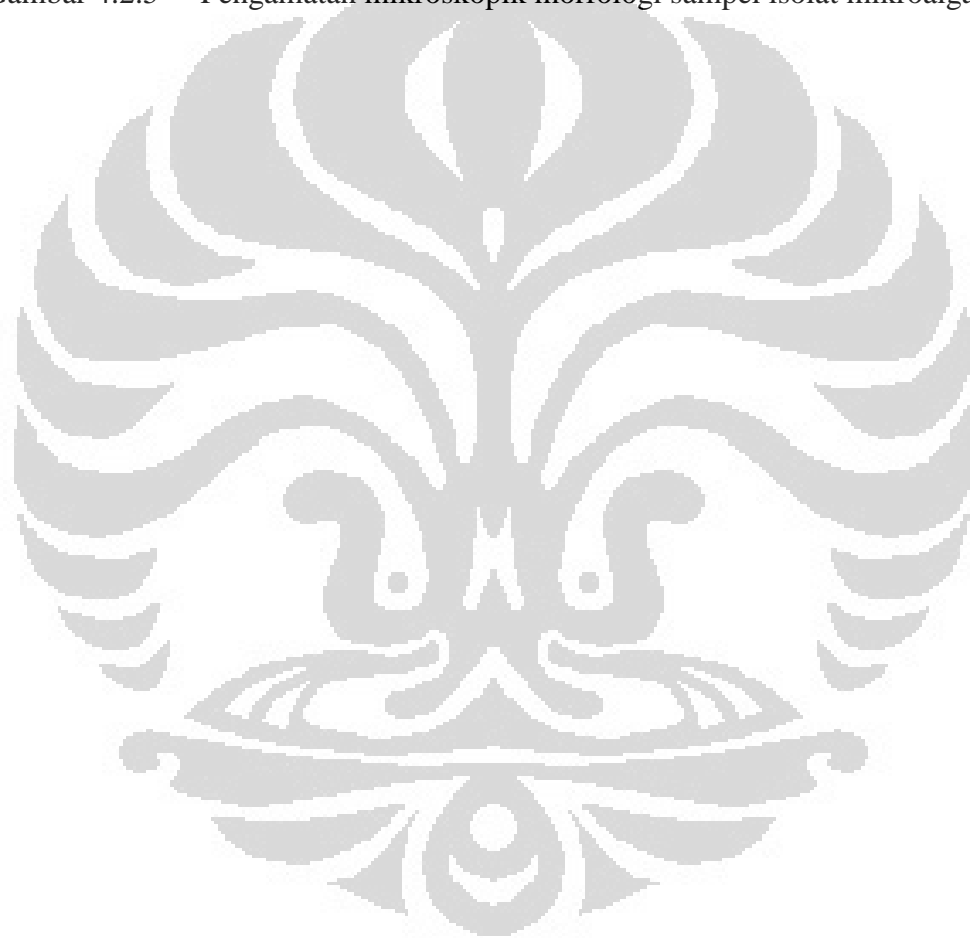
Keywords : DHA, direct planting, fatty acid, Gas Chromatography- Mass Spectrophotometer, microalgae, Thraustochytrids
xiv+84 pages : 7 pictures; 51 appendixes
Bibliography : 48 (1972-2011)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Mikroalga.....	4
2.2 Kawasan Mangrove	8
2.3 Metode Isolasi Thraustochytrids.....	8
2.4 Asam Dokosaheksanoat (DHA).....	9
2.5 Metode Analisis Asam Dokosaheksanoat (DHA)	14
BAB 3 METODE PENELITIAN	17
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	17
3.2 Alat.....	17
3.3 Bahan	18
3.4 Medium dan Pembuatan Medium	18
3.5 Reagen dan Pembuatan Reagen	19
3.6 Cara Kerja	19
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Penyiapan Sampel.....	22
4.2 Isolasi Mikroalga Thraustochytrids	24
4.3 Analisis DHA secara kualitatif dengan Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa (KG-SM)	29
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR ACUAN	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
Gambar 4.1.1	Kawasan Mangrove Lampung tempat pengambilan sampel	38
Gambar 4.1.2	Sampel guguran daun mangrove.....	38
Gambar 4.2.1	Potongan guguran daun mangrove.....	39
Gambar 4.2.2	Isolat mikroalga yang tumbuh pada medium padat By+	40
Gambar 4.2.3	Isolat yang ditumbuhi jamur	41
Gambar 4.2.4	Pengamatan mikroskopik morfologi sampel isolat mikroalga 1..	41
Gambar 4.2.5	Pengamatan mikroskopik morfologi sampel isolat mikroalga 2...	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1	Alat Kromatografi Gas - Spektrofotometri Massa (KG-SM) 51
Lampiran 2	Fragmentasi DHA pada Database <i>NIST Library</i> 51
Lampiran 3	Kromatogram LP-01 52
Lampiran 4	Fragmentasi DHA LP-01 52
Lampiran 5	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-01 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 53
Lampiran 6	Kromatogram LP-09 54
Lampiran 7	Fragmentasi DHA LP-09 54
Lampiran 8	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-09 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 55
Lampiran 9	Kromatogram LP-15 56
Lampiran 10	Fragmentasi DHA LP-15 56
Lampiran 11	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-15 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 57
Lampiran 12	Kromatogram LP-16 58
Lampiran 13	Fragmentasi DHA LP-16 58
Lampiran 14	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-16 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 59
Lampiran 15	Kromatogram LP-18 60
Lampiran 16	Fragmentasi DHA LP-18 60
Lampiran 17	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-18 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 61
Lampiran 18	Kromatogram LP-24 62
Lampiran 19	Fragmentasi DHA LP-24 62
Lampiran 20	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-24 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 63
Lampiran 21	Kromatogram LP-29 64
Lampiran 22	Fragmentasi DHA LP-29 64
Lampiran 23	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-29 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 65
Lampiran 24	Kromatogram LP-30 66
Lampiran 25	Fragmentasi DHA LP-30 66
Lampiran 26	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-30 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 67
Lampiran 27	Kromatogram LP-31 68
Lampiran 28	Fragmentasi DHA LP-31 68
Lampiran 29	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-31 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i> 69
Lampiran 30	Kromatogram LP-38 70
Lampiran 31	Fragmentasi DHA LP-38 70

Lampiran 32	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-38 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	71
Lampiran 33	Kromatogram LP-40	72
Lampiran 34	Fragmentasi DHA LP-40	72
Lampiran 35	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-40 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	73
Lampiran 36	Kromatogram LP-41	74
Lampiran 37	Fragmentasi DHA LP-41	74
Lampiran 38	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-41 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	75
Lampiran 39	Kromatogram LP-42	76
Lampiran 40	Fragmentasi DHA LP-42	76
Lampiran 41	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-42 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	77
Lampiran 42	Kromatogram LP-47	78
Lampiran 43	Fragmentasi DHA LP-47	78
Lampiran 44	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-47 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	79
Lampiran 45	Kromatogram LP-53	80
Lampiran 46	Fragmentasi DHA LP-53	80
Lampiran 47	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi DHA LP-53 dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	81
Lampiran 48	Kromatogram standar DHA (blanko positif)	82
Lampiran 49	Fragmentasi standar DHA (blanko positif).....	82
Lampiran 50	Perbandingan <i>head to tail</i> fragmentasi standar DHA dengan DHA pada database <i>NIST Library</i>	83
Lampiran 51	Sertifikat analisis standar DHA (Sigma).....	84

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam dokosaheksanoat atau yang biasa dikenal dengan DHA merupakan asam lemak tidak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA) berantai karbon 22 dengan 6 ikatan rangkap. DHA termasuk ke dalam PUFA omega-3, yaitu merupakan asam lemak yang ikatan rangkap pertamanya terdapat pada atom karbon nomor 3 dihitung dari ujung metil rantai asam lemak (ERNA, 2008).

DHA merupakan asam lemak omega-3 yang penting bagi tubuh, karena merupakan asam lemak esensial bagi manusia. Selain itu DHA merupakan asam lemak utama di dalam otak, jaringan saraf serta retina (ERNA, 2008). Mengonsumsi DHA dapat berdampak positif terhadap pencegahan berbagai penyakit, seperti penyakit jantung, kanker serta alzheimer. Pada penyakit jantung, DHA diteliti dapat bergabung dengan membran sel jantung, sehingga berdampak kardioprotektif (Masson et al., 2007). Pada penyakit kanker, DHA diteliti dapat memulihkan proses pengaturan tertentu di dalam sel, sehingga menyebabkan sel-sel kanker tersebut dapat dihancurkan oleh sistem kekebalan tubuh (Corsetto et al., 2010), dan pada pencegahan penyakit Alzheimer, penelitian menunjukkan penambahan DHA pada diet tikus dapat mengurangi penurunan kemampuan belajar ke tingkat yang lebih rendah (Catalan et al., 2002 & Hashimoto et al., 2002). Selain bersifat prefentif terhadap beberapa penyakit, DHA juga dapat ditambahkan pada makanan, seperti contohnya pada susu formula bayi. Penambahan DHA pada susu formula bayi bertujuan agar susu formula bayi dapat memiliki kandungan DHA yang serupa dengan kandungan DHA yang terdapat dalam air susu ibu (ASI), yang kandungan DHAnya tiga puluh kali lipat lebih banyak daripada yang terdapat dalam susu sapi. Karena dampak yang menguntungkan tersebut, asam lemak omega-3 DHA perlu ditambahkan pada makanan untuk memelihara tubuh dan otak dalam kondisi yang optimal (Birch et al., 2000).

American Dietetic Association dan *Dietitians of Canada* secara resmi merekomendasikan 20 - 35% dari energi harian harus berasal dari lemak pada makanan, dengan penekanan pada konsumsi asam lemak omega-3 (Kris-Etherton & Innis, 2007). *American Heart Association* merekomendasikan kepada konsumen yang sehat untuk mengkonsumsi lemak ikan per minggu dan mendorong pasien yang mengidap penyakit jantung koroner untuk mengkonsumsi 1 g/hari EPA dan DHA (Kris-Etherton et al., 2002). Sedangkan, WHO merekomendasikan untuk mengkonsumsi 1-2 porsi ikan per minggu bagi orang sehat agar mendapatkan asupan 200-500 mg dari EPA dan DHA dengan pertimbangan bagi kesehatan jantung dan perkembangan syaraf (ERNA, 2008).

Sumber utama asam lemak omega-3 DHA yang tersedia di pasaran adalah minyak ikan, yang biasanya dikonsumsi dalam bentuk ikan yang dimasak, kapsul minyak ikan, atau makanan dengan bahan tambahan minyak ikan (Alonso & Maroto, 2000). Sejak 1984 produksi minyak ikan masih stabil, dengan produksi rata-rata tahunan sebesar 13 juta ton, namun dengan adanya peningkatan permintaan terhadap minyak ikan, harga minyak ikan naik dengan cepat. Diperkirakan, 50 % minyak ikan yang ada saat ini, berasal dari industri akuakultur (Tidwell & Allan, 2001). *Food and Agriculture Organization United Nations* meramalkan bahwa permintaan terhadap minyak ikan global pada tahun 2015 akan mencapai 145% dari kapasitas produksi global historis dan diperkirakan akan terus meningkat (New & Wijkström, 2002). Namun, minyak ikan sendiri memiliki beberapa kekurangan yang cukup menjadi masalah, salah satu masalah utamanya adalah kandungan DHA yang terdapat dalam minyak ikan relatif rendah, yakni hanya 7-14 %. Dengan kandungan DHA yang rendah dari minyak ikan, maka untuk menghasilkan kandungan DHA yang tinggi diperlukan ikan dalam jumlah yang sangat banyak. Hal tersebut dapat menyebabkan penangkapan ikan yang berlebihan (*over fishing*) yang memicu pada ketidakseimbangan dari ekosistem laut (Lahaye, 2001). Kemudian, beberapa kekurangan lainnya adalah sifat minyak ikan yang tidak stabil terhadap oksidasi serta memiliki bau amis yang menyebabkan minyak ikan sulit untuk ditambahkan pada produk suplemen makanan, susu formula bayi ataupun obat-obatan yang diharapkan dapat memiliki aroma dan rasa yang menarik. Disamping itu pula kekurangan lain dari minyak

ikan adalah terkandung asam lemak tidak jenuh ganda lain yang mirip DHA tetapi bukan merupakan DHA (*DHA like compounds*) yang menyebabkan DHA dari minyak ikan sulit untuk ditambahkan pada obat yang memerlukan kandungan DHA dengan kemurnian yang tinggi (Belarbi et al., 2000).

Dewasa ini, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa terdapat sumber lain yang dapat menghasilkan DHA dengan jumlah yang lebih tinggi daripada DHA yang dihasilkan dari minyak ikan, yakni, salah satunya adalah dari mikroalga. Mikroalga telah diteliti mampu menghasilkan DHA dengan konsentrasi tinggi yang sesuai bagi kelompok vegetarian (Scott et al., 2007). Spesies mikroalga yang dapat menghasilkan DHA diantaranya adalah *Cryptocodinium cohnii*, *Ulkenia* sp. *Thraustochytrium aureum* dan *Schizochytrium* sp.. Dua spesies yang terakhir termasuk ke dalam anggota mikroalga Thraustochytrid. Thraustocytrids ditengarai sebagai mikroalga yang sangat potensial dalam menghasilkan DHA, dikarenakan mikroalga tersebut dapat tumbuh dalam kondisi heterotrof sehingga dapat diproduksi dengan biaya yang lebih rendah. Selain itu, keuntungan lain yang dimiliki oleh mikroalga Thraustocytrids yaitu memiliki kecepatan tumbuh dan kemampuan mengakumulasi asam lemak yang lebih tinggi dibandingkan dengan mikroalga lainnya (Perveen et al., 2006).

Pada penelitian ini, akan dilakukan isolasi mikroalga Thraustochytrids penghasil DHA dari kawasan mangrove di Indonesia, yang kemudian akan diuji kemampuannya dalam menghasilkan DHA. DHA dari mikroalga tersebut diharapkan dapat bermanfaat bagi industri farmasi sehingga dapat meningkatkan taraf kesehatan masyarakat.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat mikroalga Thraustochytrids yang mampu menghasilkan asam dokosaheksanoat (DHA).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

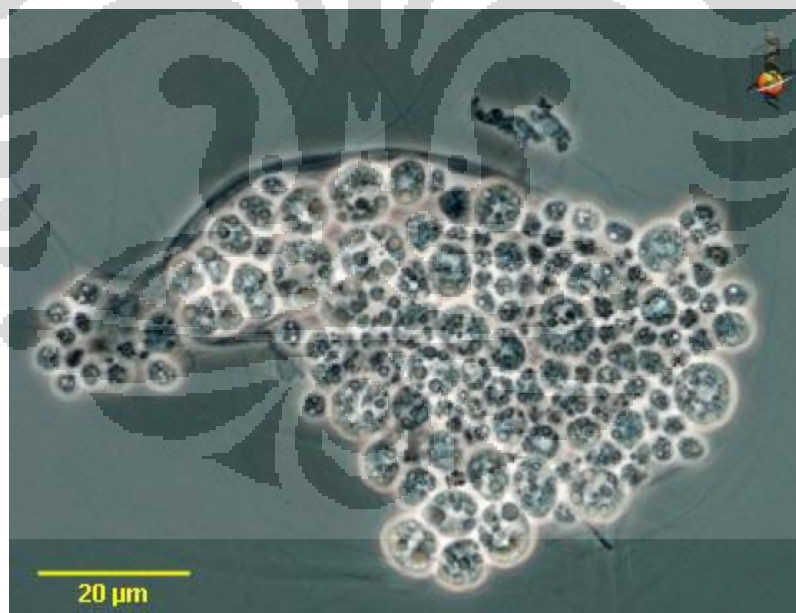
2.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan kumpulan beragam mikroorganisme yang masing – masing memiliki suatu karakteristik khas yang membedakannya, masing – masing mikroorganisme tersebut dapat dibedakan atas ukuran sel, warna serta tempat habitatnya di laut selain dari selnya yang bersifat uniseluler dan dapat berupa mahluk fotoautotof ataupun heterotrof (Olaizola, 2003). Mikroalga dapat berupa mahluk prokariotik maupun eukariotik, dan seiring evolusinya mereka dapat dikatakan sebagai makhluk primitif atau makhluk novel. Keberagaman ini membuat mikroalga dapat dijadikan sebagai suatu sumber yang potensial dari berbagai produk yang pada tingkat tertentu dapat bermanfaat sebagai bahan pendukung makanan (baik bagi nutrisi manusia ataupun hewan), kosmetik, farmasi, serta bagi industri bahan bakar (Olaizola, 2003).

Saat ini mikroalga sedang memperoleh berbagai perhatian dikarenakan dapat menjadi solusi yang paling memungkinkan untuk berbagai permasalahan kritis yang sedang terjadi, seperti menyangkut peran sebagai sumber alternatif bahan bakar maupun sebagai sumber yang potensial dari banyak komponen bioaktif yang dibutuhkan manusia seperti asam lemak omega 3 yang umumnya berasal dari ikan. Kekhawatiran terhadap ketersediaan ikan menyebabkan mikroalga menjadi sumber yang berpotensi untuk menjadi alternatif yang diharapkan dapat tanpa henti menyediakan minyak yang kaya akan asam lemak omega 3. Mikroorganisme seperti mikroalga memiliki berbagai keuntungan apabila dibandingkan dengan sumber energi tradisional, hal ini dikarenakan mikroorganisme memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan sumber lain, jumlah produksi biomassa yang tinggi serta penggunaan lahan yang tidak terlalu banyak dibandingkan dengan sumber tradisional (Lee et al., 2009).

2.1.1 Mikroalga Thraustochytrids

Thraustochytrids (Thraustochytriidae) merupakan mikroalga laut yang bersifat heterotrof dan umumnya diisolasi dari berbagai sampel seperti air laut, sedimen serta guguran daun dari kawasan mangrove (Lewis et al., 1999). Thraustochytrids (Thraustochytriidae) dahulu dianggap sebagai protozoa (sebagai rhizopoda, porifera, fungi (sebagai mycetozoa), atau tumbuhan (sebagai chrysophyta). Namun, berbagai bukti ultrastruktural menunjukkan bahwa Thraustochytrids (Thraustochytriidae) tidak dapat dikategorikan sebagai hewan, tumbuhan ataupun fungi melainkan kedalam suatu divisi tunggal yaitu divisi Labyrinthulomycota. Divisi Labyrinthulomycota terdiri dari kelas tunggal yaitu Labyrinthulea, dan ordo Labyrinthulida dengan dua suku yaitu Labyrinthulidae dan Thraustochytriidae (Olive, 1975). Labyrinthulidae memiliki 1 marga yaitu *Labyrinthula* dengan berangotakan 8 spesies, sedangkan Thraustochytriidae terdiri dari 7 marga, yaitu *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia*, *Labyrinthuloides*, *Japonochytrium*, *Aplanochytrium*, dan *Althornia* (Porter, 1989).



Gambar 1. *Labyrinthuloides* salah satu anggota Thraustochytrids (Sumber: American Type Culture Collection)

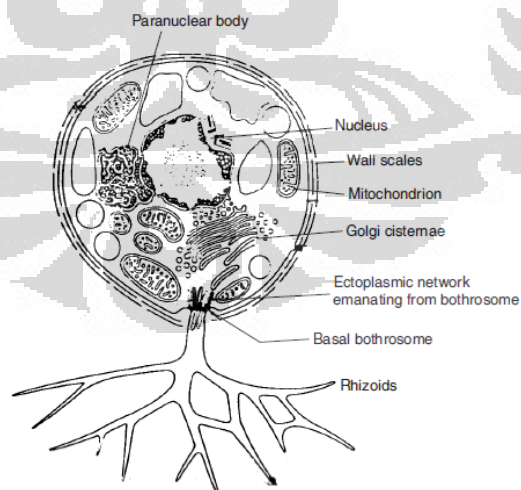
2.1.1.1 Klasifikasi Thraustochytrids

Kingdom	: Protoctista
Divisi	: Labyrinthulomycota
Kelas	: Labyrinthulea
Ordo	: Labyrinthulida
Suku	: Thraustochytriidae

2.1.1.2 Morfologi

Thraustochytrids memiliki suatu jaringan khas yang tumbuh dari bagian basal. Jaringan itu tumbuh dari suatu organ yang disebut dengan sagenogen. Bagian sitoplasma sel tidak termasuk ke dalam bagian jaringan Thraustochytrids, hal ini dikarenakan bagian sitoplasma yang memadat menyumbat sagenogen (Perkins, 1972).

Thraustochytrids juga memiliki dinding sel. Dinding tersebut disintesis oleh badan golgi dan di transport menuju membran sel dimana selanjutnya akan disimpan menjadi dinding sel. Komponen utama dari dinding sel berupa karbohidrat L-galatosia yang dihasilkan dari proses hidrolisis pada 2 spesies yang telah dianalisa yaitu *Scyzochitrium aggregatum* and *Thraustochytrium motivum* (Darley et al., 1973).



Gambar 2. Struktur Thraustochytrids (Sumber: Fungal Diversity and Biotechnology)

Komponen sitoplasma Thraustochytrids meliputi mitokondria, granula lipid, badan multivesikular, serta badan golgi. Retikulum Endoplasma (RE) Thraustochytrids tersusun membentuk susunan sisterna paralel (Moss, 1980). Badan sel tersusun atas sisterna retikulum endoplasma (RE) yang membungkus dan kompleks yang telah ditemukan pada kebanyakan genus (Perkins, 1973).

2.1.1.3 Habitat dan Ekologi

Thraustochytrids memiliki anggota spesies yang tersebar di seluruh dunia, mereka dapat diperoleh dengan mudah pada habitatnya yang terdapat di laut dan sungai. Thraustochytrids secara umum dapat diisolasi dari material organik yang telah membusuk, seperti guguran daun, sedimen atau dari sampel air yang diperoleh dari kawasan pantai. Thraustochytrids dapat bertahan hidup pada permukaan material organik dan bersifat saprotropik. Thraustochytrids sebelumnya telah ditemukan di kawasan mangrove subtropis dan diduga sebagai koloni yang hidup secara detritus pada guguran daun mangrove (Margulis et al., 1989). Selain itu, Thraustochytrid juga dikaitkan dengan proses membusuknya daun mangrove, hal ini dikarenakan daun mangrove berperan dalam proses siklus karbon Thraustochytrids. Sehingga semakin busuk suatu daun mangrove diharapkan akan semakin banyak Thraustochytrids yang dihasilkan (Bongiorni et al., 2004).

Thraustochytrids telah banyak diisolasi dari habitatnya dengan kondisi salinitas yang beragam. Mulai dari air payau dengan salinitas sebesar 3% sampai dengan kolam tambak yang memiliki kadar garam tinggi sebesar 150% (Jones & Harrison, 1976). Thraustochytrids diduga merupakan makhluk yang bersifat eurihalin, yakni makhluk yang toleran terhadap salinitas yang tinggi. Namun, beberapa spesies ini juga ditemukan pada habitat dengan salinitas rendah atau bersifat stenohalin, yakni makhluk yang tidak toleran terhadap salinitas tinggi. Pada kondisi dimana Thraustochytrids berada pada lingkungan dengan salinitas tinggi, mikroalga ini ditemukan dalam keadaan istirahat. Pada observasi lebih lanjut ditunjukkan bahwa tidak lebih dari 14 spesies Thraustochytrids yang mampu tumbuh pada kultur murni dengan salinitas lebih besar dari 40% (Bahnweg, 1979). Selain itu, beberapa Thraustochytrids juga ditemukan tahan

Universitas Indonesia

terhadap proses pengeringan dan pembekuan. Hal ini dibuktikan oleh adanya beberapa Thraustochytrids yang ditemukan di kawasan pantai artik dan di laut kering yang berumur 50 tahun serta berhasil ditumbuhkan pada kultur murni oleh Kuznetsov (1981). Isolat Thraustochytrids tahan terhadap pengeringan selama 10 tahun atau pendinginan pada -10°C selama 1 bulan. Ketahanan Thraustochytrids terhadap lingkungan yang ekstrim, termasuk salinitas tinggi, adalah hal yang menarik karena sedikit dari spesies Thraustochytrids yang menunjukkan struktur morfologi yang resisten terhadap berbagai keadaan ekstrim.

2.2 Kawasan Mangrove

Hutan Mangrove adalah sebutan untuk sekelompok tumbuhan yang hidup di daerah pasang surut pantai. Hutan Mangrove dikenal juga dengan istilah *tidal forest*, *coastal woodland*, *vloedbosschen*, atau juga hutan payau. Hutan mangrove merupakan komunitas vegetasi pantai tropis, yang didominasi oleh beberapa jenis pohon mangrove yang mampu tumbuh dan berkembang pada daerah pasang surut pantai berlumpur (Bengen, 2000).

Ekosistem Mangrove merupakan sumber daya alam yang memberikan banyak keuntungan bagi kehidupan manusia, yakni dikarenakan oleh produktivitasnya yang tinggi serta kemampuannya dalam memelihara alam. Mangrove sendiri memproduksi nutrisi yang dapat menyuburkan perairan laut, mangrove membantu dalam perputaran karbon, nitrogen dan sulfur serta perairan mangrove kaya akan nutrisi baik nutrisi organik maupun anorganik (Bengen, 2001).

2.3 Metode Isolasi Thraustochytrids

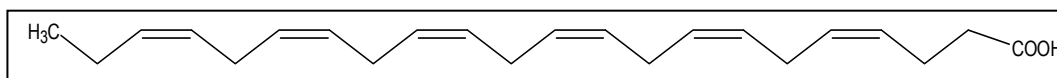
Thraustochytrids umumnya diisolasi dengan teknik *direct planting*. Namun Thraustochytrids juga dapat diisolasi dengan menggunakan teknik *baiting* sampel air laut dengan menggunakan polen pohon pinus, atau juga dapat diisolasi dengan menggunakan lembaran herbarium dari alga kering (Kuznetsov, 1981). Untuk teknik *direct planting*, potongan kecil seluas 1 cm^2 dipotong dari tanaman

atau material yang ditumbuhi alga dan diletakkan diatas permukaan agar pada cawan petri. Pada *pollen baiting*, tanaman atau material beralga diletakkan didalam tabung atau cawan petri yang didalamnya telah berisi air laut steril. Selanjutnya, permukaan atasnya ditaburi polen steril. Sedimen sampel selanjutnya digoreskan pada permukaan agar pada plat isolasi (Porter, 1989).

2.4 Asam Dokosaheksanoat (DHA)

Asam dokosaheksanoat atau yang biasa dikenal dengan DHA merupakan asam lemak tidak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA) berantai karbon 22 dengan 6 ikatan rangkap. Asam lemak sendiri merupakan komponen dari lemak. Asam lemak kebanyakan terdapat dalam bentuk terikat dengan molekul lain, seperti trigliserida atau fosfolipid. Saat mereka tidak berikatan dengan molekul lain, mereka dikenal sebagai asam lemak bebas (*free fatty acid*). Asam lemak merupakan sebuah rantai karbon linier dengan ujung metil (CH_3 - atau disebut sebagai ujung- ω) dan ujung karboksil ($-\text{COOH}$). Asam lemak dibedakan atas jumlah atom karbon dan ikatan rangkapnya, yaitu berupa asam lemak jenuh (*saturated fatty acid*, SFA), asam lemak tidak jenuh tunggal (*monounsaturated fatty acid*, MUFA), dan asam lemak tidak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA). DHA sendiri termasuk ke dalam asam tidak lemak jenuh ganda (PUFA) omega-3, dimana DHA memiliki ikatan rangkap pertama yang terletak pada atom karbon nomor 3 dihitung dari ujung metil rantai asam lemak, sehingga digolongkan kedalam PUFA omega-3. (ERNA, 2008).

2.4.1 Karakteristik Fisika Kimia Asam Dokosaheksanoat (DHA)



Gambar 3. Rumus bangun Asam Dokosaheksanoat (DHA)

Pemerian	:	Cairan minyak berwarna jingga atau kuning terang
Nama Senyawa	:	Asam cis-dokosa-4,7,10,13,16,19-heksanoat
Sinomim	:	Asam Servonat ; DHA
Rumus Molekul	:	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
Berat Molekul	:	328,488 g/mol
Berat Jenis	:	0.944 g/cm ³
Titik Didih	:	446.732 °C pada 760 mmHg

2.4.2 Manfaat Asam Dokosaheksanoat (DHA)

DHA merupakan substansi penting bagi pertumbuhan dan perkembangan fungsional otak serta merupakan komponen struktural dari fosfolipid pada membran sel. Komposisi dari fosfolipid tersebut dapat mempengaruhi karakteristik membran sel seperti fluiditas dan permeabilitasnya terhadap molekul lain. DHA merupakan PUFA utama yang terdapat pada otak, jaringan saraf, serta retina. DHA merupakan komponen esensial bagi proses penglihatan pada retina dan fungsi otak yang optimal (ERNA, 2008).

DHA terbukti mempunyai dampak menguntungkan dalam pencegahan penyakit kardiovaskuler, kanker, alzheimer serta schizoprenia. Pada penyakit kardiovaskuler, studi terbaru menunjukkan bahwa DHA dapat bergabung dengan membran sel jantung, sehingga berdampak kardioprotektif. Sedangkan, untuk memelihara kesehatan jantung disarankan untuk mengonsumsi asam lemak omega-3 sebanyak 1g/hari (Masson et al., 2007). Dampak menguntungkan asam lemak omega-3 terhadap penyakit kanker dihubungkan dengan fakta akan rendahnya kasus kanker payudara pada orang Eskimo yang dikenal banyak mengonsumsi asam lemak omega-3 dalam bentuk ikan (Nettleton, 1995). Sejak saat itu banyak penelitian dilakukan lebih lanjut untuk memahami dampak

Universitas Indonesia

menguntungkan asam lemak omega-3 pada penyembuhan berbagai penyakit kanker. Mekanismenya sendiri belum dapat dipahami sepenuhnya, namun banyak penelitian yang menunjukkan bahwa DHA dapat bermanfaat dalam melawan berbagai penyakit kanker. Sebagai contoh, Hering et al. (2007) menemukan bahwa perkembangbiakan sel kanker pankreas terhambat setelah diberi perlakuan dengan asam lemak omega-3. Dalam kasus tersebut diduga bahwa asam lemak omega-3 memulihkan proses pengaturan tertentu di dalam sel. Dengan pulihnya proses tersebut, sel-sel dapat dihancurkan oleh sistem kekebalan tubuh atau dengan perawatan kanker tradisional. Kemudian, asam lemak omega-3 diteliti dapat membantu dalam mencegah timbulnya kanker kolorektal. Hal ini ditunjukkan dari penurunan radang kolon dan tumorigenesis terhadap tikus yang diberi perlakuan dosis tinggi asam lemak omega-3 (Nowak et al., 2007). Lebih lanjut, Little et al. (2007) menemukan bahwa tikus tua yang diberi dosis harian 10 mg DHA mengalami lebih sedikit perlemahan otak dibandingkan dengan tikus kontrol yang tidak diberikan DHA. Pengaruh ini dihubungkan dengan adanya perubahan pada fluiditas selaput otak oleh DHA. Branchey dan Branchey (2008) menemukan bahwa orang dengan bertemperamental tinggi akan menjadi berkurang sifat pemaarah dan agresifnya dengan mengkonsumsi 3 g asam lemak omega-3 setiap hari selama 3 bulan dibandingkan dengan pasien yang diberi plasebo. Hal tersebut dikarenakan terjadi modifikasi neurotransmitter serotonergik. Peningkatan kandungan serotonin dalam otak akan menimbulkan penurunan agresifitas pada pasien.

Suplemen asam lemak omega-3 juga diteliti berdampak positif terhadap pengendalian penyakit schizoprenia (Peet & Stokes, 2005). Dampak menguntungkan ini terjadi karena adanya perubahan dalam komposisi membran otak yang kemudian menyebabkan perubahan beberapa sinyal intraneural sistem transduksi. Selain itu, DHA juga memainkan peran penting dalam perkembangan otak bayi. Makrides et al. (1995) menunjukkan bahwa bayi yang diberi makanan dengan ditambah suplemen yang dilengkapi DHA, akan terjadi perbaikan ketajaman pandangan dibandingkan dengan bayi yang diberi makan dengan formula standar. Dampak menguntungkan tersebut akan berlanjut sampai bertahun-tahun setelah masa kanak-kanak. Anak berumur empat tahun yang diberi

Universitas Indonesia

formula suplemen yang ditambahkan DHA selama 17 minggu pertama menunjukkan memiliki ketajaman pandangan dan nilai IQ yang tidak berbeda dengan anak-anak yang diberi ASI sedangkan anak-anak yang diberi formula biasa tanpa penambahan DHA mempunyai nilai IQ yang lebih rendah secara nyata. Penelitian-penelitian diatas tersebut menunjukkan bahwa suplemen DHA sangat penting pada saat tahap awal kehidupan (Birch et al., 2007).

2.4.3 Rekomendasi Asupan Asam Dokosaheksanoat (DHA)

Rekomendasi asupan total asam lemak tidak jenuh ganda (PUFA) yang disarankan oleh WHO adalah mulai dari 6% sampai 10% dari total asupan energi harian. Sedangkan rekomendasi untuk asam lemak omega-3 adalah 1 sampai 2%. *American Dietetic Association* dan *Dietitians of Canada* secara resmi merekomendasikan 20 - 35% dari energi harian harus berasal dari lemak makanan, dengan penekanan pada konsumsi asam lemak omega-3 (Kris-Etherton & Innis, 2007). *American Heart Association* merekomendasikan kepada konsumen yang sehat untuk mengkonsumsi lemak ikan per minggu dan mendorong pasien yang mengidap penyakit jantung koroner untuk mengkonsumsi 1 g/hari EPA dan DHA (Kris-Etherton et al., 2002). Sedangkan, WHO merekomendasikan untuk mengkonsumsi 1-2 porsi ikan per minggu bagi orang sehat agar mendapatkan asupan 200-500 mg dari EPA dan DHA dengan pertimbangan bagi kesehatan jantung dan perkembangan saraf (ERNA, 2008).

2.4.4 Sumber Asam Dokosaheksanoat (DHA)

Sumber utama asam lemak omega-3 (termasuk DHA) yang tersedia di pasar adalah minyak ikan, biasanya minyak ikan dikonsumsi dalam bentuk ikan yang dimasak, kapsul minyak ikan, atau makanan dengan bahan tambahan minyak ikan (Alonso & Maroto, 2000). Namun demikian, minyak ikan sebagai sumber asam lemak omega-3 mempunyai beberapa keterbatasan, seperti yang pertama adalah adanya kekhawatiran mengenai penerimaan konsumen terhadap minyak ikan atau kapsul minyak ikan karena rasa dan baunya yang kurang enak, seperti yang dilaporkan oleh Kris-Etherton et al. (2002) bahwa mengkonsumsi lebih dari

Universitas Indonesia

1 g/hari minyak ikan dapat menyebabkan rasa amis. Selain itu terdapat kekhawatiran lain mengenai adanya pencemaran logam berat pada ikan dan minyak ikan. *Environmental Protection Agency* dan *Food and Drug Administration* (FDA) merekomendasikan kepada wanita hamil, ibu menyusui serta bayi untuk menghindari makan ikan dan kerang yang mungkin memiliki kandungan merkuri yang tinggi (EPA, 2004). Kemudian, kekhawatiran lainnya terhadap penggunaan minyak ikan adalah mengenai kelanjutan sumber daya alam yang juga menjadi kekhawatiran industri akuakultur. Sejak 1984 produksi minyak ikan masih stabil, dengan produksi rata-rata tahunan sebesar 13 juta ton, namun dengan peningkatan permintaan terhadap minyak ikan menyebabkan harga minyak ikan naik dengan cepat. Saat ini, diperkirakan 50 % minyak ikan berasal dari industri akuakultur (Tidwell & Allan, 2001). *Food dan Agriculture Organization United Nations* meramalkan bahwa permintaan terhadap minyak ikan global pada tahun 2015 akan mencapai 145% dari kapasitas produksi global dan akan terus meningkat (New & Wijkström, 2002).

Oleh karena adanya kekhawatiran mengenai persediaan ikan sebagai sumber asam lemak omega-3, telah dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan sumber alternatif asam lemak yang penting ini. Mikroba seperti mikroalga atau fungi merupakan produsen utama asam lemak omega-3 karena memiliki lintasan biosintesa yang diperlukan. Mikroba tersebut telah diteliti secara ekstensif sebagai sumber potensial asam lemak. Asam lemak yang berasal dari mikroba dapat diekstrak dan digunakan sebagai komponen pada pangan yang ingin diperkaya dengan omega-3 (Simopoulos, 1999) atau sebagai bahan tambahan pakan unggas serta pakan ikan kolam (Harel et al., 2002). Studi terbaru juga telah meneliti tanaman tinggi dan hewan yang secara genetik diubah untuk menghasilkan asam lemak omega-3. Saat ini, asam lemak omega-3 dari mikroba menjadi alternatif yang lebih disukai, meski penelitian dalam pengembangan tumbuhan atau hewan transgenik untuk produksi omega-3 masih berlanjut.

2.5 Metode Analisis Asam Dokosaheksanoat (DHA)

2.5.1 *Direct Transesterification*

Metode *direct transesterification* atau disebut juga sebagai transesterifikasi in situ merupakan metode yang menggabungkan proses ekstraksi dan transesterifikasi menjadi proses tunggal sehingga penggunaan pelarut dan waktu yang digunakan dapat dikurangi (Yokochi et al., 1998). Pada proses ini biomassa ditambahkan dengan campuran alkohol dan asam atau basa yang akan menghasilkan ekstraksi reaktif dari lipid sebagai FAME (*fatty acid methyl esters*). Pada metode konvensional, volume pelarut dan waktu yang diperlukan menjadi lebih banyak dikarenakan pembuatan ekstrak lipid terlebih dahulu, yang dibutuhkan untuk derivatisasi untuk analisis dan kuantitasi dari *fatty acid methyl esters* (FAME) dengan kromatografi gas. Pengerjaan dengan langkah yang jauh lebih banyak akan meningkatkan peluang adanya kontaminasi, kehilangan jumlah sampel, serta keberagaman sampel. Penggunaan metode langsung (*direct transesterification*) untuk asam lemak sebelumnya telah diteliti oleh Lepage dan Roy (1984), bahkan telah digunakan untuk asam lemak dari jaringan pada sampel akuakultur yang telah di keringkan (*freeze dried*). Metode ini telah diteliti dapat diaplikasikan terhadap berbagai macam jenis lipid, baik lipid sederhana maupun lipid kompleks.

2.5.2 Kromatografi Gas - Spektrofotometri Massa (KG-SM)

2.5.2.1 Kromatografi Gas

Pada kromatografi gas, sebagai fase gerak digunakan gas dan sebagai fase diam dapat digunakan padatan atau cairan. Kromatografi gas dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok utama, yaitu: kromatografi gas padat dimana digunakan padatan sebagai fase diam dan kromatografi gas cair dimana digunakan cairan yang dilapiskan dengan tipis pada pendukung padat (*supporting solid*) yang inert atau dilapiskan langsung pada dinding dalam dari kolom sebagai fase diam. Fase gerak gas pada kromatografi gas lebih dikenal sebagai gas pembawa. Pemisahan campuran menjadi komponen – komponennya pada kromatografi gas padat terjadi karena perbedaan adsorpsi relatif masing masing komponen pada fase diam padatan, sedangkan pada kromatografi gas cair

Universitas Indonesia

permisahan terjadi karena perbedaan kelarutan (partisi) relatif masing – masing komponen pada fase diam cairan.

Kromatografi gas dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu tinggal / waktu retensi dari substansi yang dianalisis (sampel) dengan waktu retensi dari zat pembanding (standar). Analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan tinggi atau luas puncak kromatogram dari substansi yang dianalisis (sampel) dengan tinggi atau luas puncak kromatogram zat pembanding (standar) (McNair & Bonelli, 1988).

Kromatografi gas sebagai instrument untuk keperluan analisis saat ini menduduki posisi yang sangat penting dan banyak dipakai karena:

1. Aliran fase gerak gas dengan kecepatan atau tekanan terkontrol dapat dikendalikan
2. Pencampuran uap sampel ke dalam aliran fase gerak gas dapat dengan mudah terjadi
3. Kolom (yang merupakan tempat terjadinya pemisahan fisik) banyak jenisnya serta panjang dan suhunya dapat diatur. Kolom pada kromatografi gas ini dapat diganti dengan mudah dan cepat
4. Macam detektor yang dapat dipakai cukup banyak
5. Dapat digabungkan dengan instrumen lain sehingga merupakan teknik yang terpadu, seperti contohnya GC/FTIR/MS

2.5.2.2 Spektrofotometri Massa

Spektrofotometri massa pertama kali dikembangkan oleh ahli fisika Cambridge J.J Thompson dan F.W Aston di awal tahun 1990an untuk memisahkan isotop – isotop unsur dan menentukan massanya. Setelah dikembangkan, instrumen ini menarik perhatian para ahli kimia selama tahun 1950an dan sekarang merupakan instrumen analitik yang digunakan secara luas. Berbagai komponen dan penyesuaian dibuat untuk memenuhi berbagai kebutuhan (Day et al, 1996).

Dalam versi paling sederhana, yang masih sering dipakai, sebuah senyawa volatil diuapkan ke dalam ruang tempat molekul – molekul ditumbuk bertubi –

Universitas Indonesia

tubi oleh elektron dan dipancarkan oleh kawat pijar panas. Pengecepatan elektron – elektron ini dalam medan listrik akan menentukan energi mereka. Tabrakan antara sebuah molekul sampel dan sebuah elektron bisa saja melemparkan elektron lain dari molekul tersebut.

Penumbukan bergantung pada energi elektron tersebut, mengakibatkan molekul itu pecah menjadi gugus – gugus yang lebih kecil. Ion – ion positif diarahkan melalui medan listrik dan atau magnet dalam penganalisis massa, dan kondisi dimana detektor merasakan kedatangan suatu ion tertentu menetapkan suatu lintasan yang nantinya tergantung pada rasio massa terhadap muatan (m/e) ion tersebut.

Pemisahan dan identifikasi senyawa menggunakan KG-SM merupakan teknik analisis yang sangat handal yang dapat memberikan bukti / data terdapatnya suatu senyawa yang diduga. MS digunakan untuk memastikan identitas suatu senyawa obat yang telah diskriminasi atau diduga sementara. MS menghasilkan partikel bermuatan yang terdiri dari susunan ion pecahan (fragmen) ion dari molekul asalnya dimana urutan susunan ion ini sesuai dengan rasio massa/muatan ionnya. Spektrum massa dari asal senyawa adalah karakteristik dari senyawa tersebut.

Keuntungan utama MS dibandingkan dengan metode instrumental analitik lainnya adalah mempunyai *sensitivitas* dan *spesivitas* yang tinggi untuk mengidentifikasi atau mengkonfirmasi adanya suatu senyawa yang telah diduga. Spesivitas yang sangat tinggi menghasilkan karakterisasi pola pemecahan / fragmentasi yang dapat memberikan informasi tentang berat molekul dan struktur molekul (Day et al, 1996).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, meliputi: laboratorium bakteriologi, laboratorium pangan dan laboratorium mikologi, LAPTIAB, PUSPIPTEK, BPPT selama bulan Februari 2012- Mei 2012.

3.2 Alat

Alat - alat yang digunakan pada penelitian kali ini adalah sebagai berikut: *laminar air flow cabinet* [ESCO Airstream Vertical Laminar Flow], Mikroskop cahaya [Nikon Eclipse E600], spektrofotometer GC-MS [Thermo Scientific ISQ GC TRACE ULTRA] dilengkapi dengan kolom kapiler TR-FAME (30 m x 0,25mm x 0,25 μ m) dan AS 300 Series II *Autosampler*, neraca analitik [Radweg WAS 220/C/2], *hot magnetic stirrer* [AM 4], *water bath* [Kottermann], autoklaf [Iwaki ACV-2450], pH meter [Oakton pH 510] , *vortex mixer* [Stuart SA-8], lemari es [Sharp], inkubator [Mettler], oven [Mettler], filter membran [Sartorius], kamera digital [Nikon Coolpix S30], lemari asam, refraktometer, termometer, cawan petri gelas dan plastik diameter 6 cm dan 9 cm, tabung reaksi berpenutup Teflon berukuran 10 mL [Pyrex, Iwaki], pipet berukuran μ L [Eppendorf], jarum ose, tube eppendorf, tips pipet, pipet Pasteur, pipet volume, balon pipet, kaca objek dan *deck glass*, vial dan penutupnya [Chromacol], alat-alat gelas.

3.3 Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan berupa guguran daun mangrove yang diambil dari Kawasan Mangrove Bakauheni, Lampung. Guguran daun mangrove yang diambil adalah daun yang berwarna hijau, kuning dan coklat.

3.3.2 Bahan Kimia

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: Diklorometan [Merck], metanol [Merck], HCl P [Merck], NaCl [Merck], n-heksan [Merck], glukosa [Merck], etanol 70% dan 96%, *yeast extract* [Conda], *mycological peptone* [Fluka], air laut alami steril, aquadest, agar [Himedia], antibiotik streptomisin [Naqalai tesque], antibiotik penisilin G [Naqalai tesque], standar DHA [Sigma].

3.4 Medium dan Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium padat By+ dan medium padat *yeast extract peptone* (YEP).

3.4.1 Medium Padat By+ (Perveen, 2006)

Untuk membuat medium padat By+, dimasukkan *yeast extract* (0,1%), *mycological peptone* (0,1%), glukosa (0,5%) dan agar (1%) ke dalam erlenmeyer. Setelah semua bahan dimasukkan, ditambahkan air laut alami steril pH 6,0 (50%) dan dicukupkan dengan aquadest. Pencampuran dilakukan hingga homogen dengan menggunakan *hot magnetic stirrer*, erlenmeyer yang berisikan larutan kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan aluminium foil. Kemudian erlenmeyer berisi medium diautoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah steril, erlenmeyer didinginkan. kemudian ditambahkan antibiotik streptomisin dan antibiotik penisilin G. larutan media selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri. Penuangan ke dalam cawan petri dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* untuk menjaga kondisi pembuatan media tetap steril bebas kontaminan.

3.4.2 Medium Padat YEP

Untuk membuat medium padat YEP 1 L, dimasukkan *yeast extract* 1 g, *mycological peptone* 1 g, glukosa 10 g dan agar 13 g ke dalam Erlenmeyer. Setelah semua bahan dimasukkan, ditambahkan air laut alami steril pH 6,0 (15%) dan dicukupkan dengan aquadest hingga 1 L. Pencampuran dilakukan hingga homogen dengan menggunakan *hot magnetic stirrer*, erlenmeyer yang berisikan larutan kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan aluminium foil. Kemudian erlenmeyer berisi medium diautoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Larutan media selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri. Penuangan ke dalam cawan petri dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*.

3.5 Reagen dan Pembuatan Reagen

3.5.1 HCl 2M dalam Metanol

Untuk membuat 25 mL HCl 2M dalam metanol, pertama-tama dimasukkan metanol sebanyak 10 mL ke dalam *beaker glass*, kemudian dimasukkan 5 mL HCl pekat, selanjutnya ad metanol hingga 25 mL lalu aduk homogen.

3.5.2 Larutan NaCl jenuh

Untuk membuat 100 mL larutan NaCl jenuh, pertama – tama ditimbang NaCl sebanyak 36 gram. Selanjutnya, 36 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL aquadest, aduk homogen.

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Isolasi Mikroalga

Isolasi mikroalga dilakukan dengan metode *direct planting*, yaitu dengan cara sebagai berikut:

Guguran daun mangrove yang berwarna hijau, kuning dan coklat dipotong kecil – kecil bentuk persegi 1 x 1 cm², ditanam secara aseptik pada permukaan media By+ pada cawan petri, diinkubasikan pada suhu 28° C selama 1 sampai 4

hari. Selama proses inkubasi, pertumbuhan mikroalga diamati dari hari ke hari. Mikroalga yang tumbuh selanjutnya diambil secara aseptik dengan jarum ose steril dan digoreskan 4 kuadran (*streak plate*) pada medium By+ pada cawan petri lain. Diinkubasi selama 2 hingga 3 hari pada suhu 28°C.

Koloni mikroalga yang tumbuh selanjutnya dicocokkan morfologinya dengan morfologi mikroalga yang diinginkan (mikroalga Thraustochytrids) dengan cara melihat morfologinya dengan menggunakan mikroskop cahaya. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui apakah mikroalga yang diinginkan telah terisolasi atau belum. Setelah itu, dilakukan proses seleksi terhadap koloni mikroalga. Koloni mikroalga yang bebas kontaminan (mikroorganisme lain) diambil dan digoreskan kembali pada medium By+ baru pada cawan petri lain. Penggoresan mikroalga selanjutnya diulangi hingga didapatkan koloni mikroalga yang benar – benar murni. Pengulangan prosedur penggoresan mikroalga akan mengurangi kemungkinan kontaminasi bakteri.

3.6.2 Pengamatan Mikroskopik Morfologi Mikroalga

Mikroalga yang tumbuh pada cawan petri diambil sedikit dengan menggunakan jarum ose, kemudian disuspensikan dalam aquadest pada tube eppendorf. Aduk larutan dengan bantuan *vortex mixer* hingga homogen. Suspensi mikroalga dipipet sebanyak 2 µL dan ditetaskan diatas kaca objek, tutup dengan *deck glass*. Selanjutnya morfologi mikroalga diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dan dibandingkan dengan mikroalga Thraustochytrids pada literatur.

3.6.3 Kultur Isolat Mikroalga

Isolat mikroalga yang dianggap sudah murni selanjutnya dikultur dan diperbanyak dengan cara diinokulasikan secara aseptik menggunakan jarum ose steril pada cawan petri lain yang berisi media YEP dan selanjutnya diinkubasi selama 4 hari pada suhu 28°C.

3.6.4 Analisis Asam Dokosaheksanoat (DHA) dengan Kromatografi Gas - Spektrofotometer Massa (KG-SM)

3.6.4.1 Pembuatan Biomassa Kering Mikroalga

Koloni mikroalga yang telah murni dikerok (*scraped*) secara aseptik, kemudian diletakkan pada tabung reaksi ukuran 10 mL yang telah ditimbang sebelumnya. Selanjutnya koloni mikroalga tersebut dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam untuk dikeringkan. Kemudian tabung ditimbang kembali. Untuk menghitung berat biomassa mikroalga, dihitung berat tabung yang berisi mikroalga dikurangi berat tabung kosong.

3.6.4.2 Ekstraksi dan Metilasi Lipid Mikroalga (*Direct Transesterification*)

Biomassa mikroalga yang terdapat dalam tabung kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan diklorometan (CH_2Cl_2), dan ditambahkan 1 mL HCl 2M dalam metanol, tutup rapat. Reaksikan dalam *water bath* pada suhu 60°C, selama 3 jam. Setelah itu, ditambahkan 2 mL larutan NaCl jenuh dan 1 mL n- heksan, campur homogen. Selanjutnya didiamkan agar terjadi pemisahan DHA dalam bentuk FAME (*fatty acid methyl ester*) dalam pelarut n-heksan. DHA dalam larutan n- heksan tersebut kemudian dipisahkan menggunakan pipet Pasteur dan disimpan dalam tube eppendorf pada suhu 4 °C sebelum dilakukan analisa menggunakan Kromatografi Gas – Spektrofotometer Massa (KG-SM).

3.6.4.3 Identifikasi Asam Dokosaheksanoat (DHA) dengan Kromatografi Gas – Spektrofotometer Massa (KG-SM)

Komposisi asam lemak dalam sampel minyak mikroalga selanjutnya dianalisa secara kualitatif dengan kromatografi gas – spektrofotometer massa dengan cara sebagai berikut: minyak mikroalga yang diperoleh, diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam vial berukuran 2 mL, tutup vial hingga rapat. Vial yang berisi minyak mikroalga kemudian diletakkan pada *autosampler* yang secara otomatis akan menginjek sampel minyak mikroalga dengan volume injeksi sebesar 1µL.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Sampel

Tahap awal penelitian ini adalah mengumpulkan sampel guguran daun mangrove. Guguran daun mangrove yang dijadikan sampel merupakan guguran daun mangrove yang diperoleh dari Kawasan Mangrove Lampung. Gambar kawasan mangrove tempat pengambilan sampel dan sampel guguran daun mangrove yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4.1.1 dan 4.1.2.

Mikroalga Thraustochytrids dapat bertahan hidup pada permukaan material organik dan bersifat saprotropik, seperti guguran daun yang diperoleh dari kawasan pantai (Porter, 1989). Thraustochytrids telah banyak diisolasi dari habitatnya dengan kondisi salinitas dan suhu yang beragam, mulai dari air payau dengan salinitas sebesar 3% sampai dengan kolam tambak yang memiliki kadar garam tinggi yaitu sebesar 150‰ (Jones & Harrison, 1976). Selain itu, beberapa Thraustochytrids juga ditemukan di kawasan pantai artik dan di laut kering yang berumur 50 tahun (Porter, 1989). Pada saat pengambilan sampel, air laut berada pada suhu 31°C dengan salinitas sebesar 27 ‰.

Total guguran daun mangrove yang diambil adalah sebanyak 60 daun, yang terdiri dari 25 daun berwarna coklat kehitaman, 14 daun berwarna coklat, 16 daun berwarna kuning kecoklatan, 2 daun berwarna kuning serta 2 daun berwarna hijau. Guguran daun yang terkumpul diletakkan didalam plastik yang kemudian diisi dengan sedikit air laut dan ditutup rapat. Sampel daun mangrove selanjutnya disimpan di dalam kotak pendingin yang telah diisi es. Penyimpanan pada suhu rendah tersebut dimaksudkan untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme yang ada pada sampel guguran daun mangrove selama perjalanan sebelum dilakukan proses penanaman. Proses penanaman dilakukan sesegera mungkin di Laboratorium Biokimia Universitas Lampung. Selanjutnya, sampel guguran daun mangrove tersebut masing – masing dibilas dengan air laut yang telah disterilkan dan diberi antibiotik. Hal tersebut bertujuan untuk menghilangkan atau

memperkecil kontaminan yang ada pada guguran daun mangrove sebelum dilakukan proses isolasi.

Tabel 4.1.1. Sampel guguran daun mangrove yang diperoleh

Sampel	Warna Daun	Sampel	Warna Daun
LP-01	Coklat Kehitaman	LP-31	Coklat
LP-02	Coklat Kehitaman	LP-32	Coklat
LP-03	Coklat Kehitaman	LP-33	Coklat
LP-04	Coklat Kehitaman	LP-34	Coklat
LP-05	Coklat Kehitaman	LP-35	Coklat
LP-06	Coklat Kehitaman	LP-36	Coklat
LP-07	Coklat Kehitaman	LP-37	Coklat
LP-08	Coklat Kehitaman	LP-38	Coklat
LP-09	Coklat Kehitaman	LP-39	Coklat
LP-10	Coklat Kehitaman	LP-40	Kuning Kecoklatan
LP-11	Coklat Kehitaman	LP-41	Kuning Kecoklatan
LP-12	Coklat Kehitaman	LP-42	Kuning Kecoklatan
LP-13	Coklat Kehitaman	LP-43	Kuning Kecoklatan
LP-14	Coklat Kehitaman	LP-44	Kuning Kecoklatan
LP-15	Coklat Kehitaman	LP-45	Kuning Kecoklatan
LP-16	Coklat Kehitaman	LP-46	Kuning Kecoklatan
LP-17	Coklat Kehitaman	LP-47	Kuning Kecoklatan
LP-18	Coklat Kehitaman	LP-48	Kuning Kecoklatan
LP-19	Coklat Kehitaman	LP-49	Kuning Kecoklatan
LP-20	Coklat Kehitaman	LP-50	Kuning Kecoklatan
LP-21	Coklat Kehitaman	LP-51	Kuning Kecoklatan
LP-22	Coklat Kehitaman	LP-52	Kuning Kecoklatan
LP-23	Coklat Kehitaman	LP-53	Kuning Kecoklatan
LP-24	Coklat Kehitaman	LP-54	Kuning Kecoklatan
LP-25	Coklat Kehitaman	LP-55	Kuning Kecoklatan
LP-26	Coklat	LP-56	Kuning Kecoklatan
LP-27	Coklat	LP-57	Kuning
LP-28	Coklat	LP-58	Kuning
LP-29	Coklat	LP-59	Hijau
LP-30	Coklat	LP-60	Hijau

4.2 Isolasi Mikroalga Thraustochytrids

Proses isolasi mikroalga Thraustochytrids dilakukan dengan menggunakan teknik *direct planting*, yakni dengan memotong bagian kecil seluas 1 cm² dari tanaman atau material yang ditumbuhi mikroalga, yang selanjutnya diletakkan diatas permukaan medium agar pada cawan petri yang berisikan media padat (Porter, 1989). Proses isolasi mikroalga dilakukan dengan menggunakan medium By+ yang berisikan glukosa 0.5 % (w/v), *yeast extract* 0.1 % (w/v), *mycological peptone* 0.1 % (w/v), air laut steril 50 % (v/v), agar 1 % (w/v), antibiotik streptomisin 0.3 g/l dan antibiotik penisilin G 0.3 g/l. Gambar potongan daun mangrove dapat dilihat pada Gambar 4.2.1. Proses pemisahan mikroalga terjadi karena adanya antibiotik yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan *mycological peptone*, berguna untuk memisahkan mikroalga dari jamur, dimana terjadi pertumbuhan mikroalga yang lebih cepat dibandingkan dengan jamur. Isolat mikroalga yang tumbuh segera diisolasi terlebih dahulu sebelum medium ditumbuhi oleh jamur dan kemudian ditanam pada medium By+ dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 1-4 hari. Selama masa inkubasi dilakukan pengamatan terhadap mikroalga yang tumbuh (Perveen, 2006).

Pada hari pertama inkubasi, terlihat belum terjadi pertumbuhan mikroorganisme apapun pada 60 cawan petri. Sedangkan pada hari kedua, terdapat 26 cawan petri yang sudah mulai ditumbuhi oleh jamur, 12 cawan petri mulai tampak ditumbuhi mikroalga yang masih terlalu sedikit untuk diisolasi dan sisanya belum terdapat pertumbuhan mikroorganisme apapun. Pada hari ketiga, jumlah cawan petri yang telah ditumbuhi mikroalga meningkat dari yang sebelumnya 12 menjadi 16 cawan petri. Karena jumlah isolat mikroalga pada 12 cawan petri tersebut dianggap sudah mencukupi, maka isolat mikroalga tersebut diisolasikan ke cawan petri lain yang berisikan medium By+ padat. Pada 26 cawan petri yang hari sebelumnya tampak ditumbuhi oleh jamur, 3 cawan petri tampak telah ditumbuhi mikroalga. Mikroalga tersebut langsung diisolasi karena dikhawatirkan akan terjadi pertumbuhan jamur yang lebih banyak yang dapat menutupi mikroalga. Proses isolasi pada 3 cawan petri tersebut dilakukan dengan hati-hati agar jamur yang ada pada cawan petri tersebut tidak ikut terbawa ke dalam medium padat baru pada cawan petri lain. Untuk 18 cawan petri lainnya

Universitas Indonesia

(yang pada hari kedua belum ditumbuhi mikroorganisme apapun), 13 cawan petri tidak mengalami pertumbuhan apapun dan 5 cawan petri sisanya ditumbuhi oleh jamur. Pada hari keempat, terjadi peningkatan jumlah isolat mikroalga pada 4 cawan petri yang pada hari sebelumnya telah ditumbuhi mikroalga dalam jumlah sedikit, dilakukan proses isolasi pada 4 cawan petri tersebut. Pada 18 cawan petri lainnya, tidak terjadi pertumbuhan mikroalga. Sedangkan pada 23 cawan petri yang sebelumnya ditumbuhi oleh jamur, nampak pertumbuhan mikroalga pada 2 cawan petri. Namun, dikarenakan karena jumlahnya yang terlalu sedikit dan telah tertutupi oleh pertumbuhan jamur yang sudah terlalu banyak, mikroalga tidak diisolasi. Secara keseluruhan, total mikroalga yang berhasil diisolasi adalah sebanyak 19 cawan petri. Gambar pertumbuhan isolat mikroalga dapat dilihat pada Gambar 4.2.2 dan 4.2.3.

Tabel 4.2.1. Pengamatan pertumbuhan mikroalga

Sampel	Warna Daun	Pengamatan pertumbuhan mikroorganisme (Hari ke-)								Hasil
		1		2		3		4		
		M	J	M	J	M	J	M	J	
LP-01	Coklat Kehitaman	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)		+
LP-02	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-03	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-04	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-05	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-06	Coklat Kehitaman	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)		+
LP-07	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-08	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-09	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	< (+)	<<	(+)		+
LP-10	Coklat Kehitaman	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-11	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	<	<<<	-
LP-12	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-
LP-13	Coklat Kehitaman	-	-	-	-	-	<	-	<<	-
LP-14	Coklat Kehitaman	-	-	-	-	<	-	<< (+)	-	+
LP-15	Coklat Kehitaman	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)		+
LP-16	Coklat Kehitaman	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)		+
LP-17	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<	-

LP-18	Coklat Kehitaman	-	-	<	-	<< (+)	<	(+)	+
LP-19	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-20	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-21	Coklat Kehitaman	-	-	-	-	-	<	-	<<
LP-22	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-23	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-24	Coklat Kehitaman	-	-	<	-	<< (+)	<	(+)	+
LP-25	Coklat Kehitaman	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-26	Coklat	-	-	-	-	-	<	-	<<
LP-27	Coklat	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-28	Coklat	-	-	-	-	-	<	-	<<
LP-29	Coklat	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)	+
LP-30	Coklat	-	-	-	-	<	-	<< (+)	-
LP-31	Coklat	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)	+
LP-32	Coklat	-	-	-	<	-	<<	<	<<<
LP-33	Coklat	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-34	Coklat	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-35	Coklat	-	-	-	-	-	<	-	<<
LP-36	Coklat	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-37	Coklat	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-38	Coklat	-	-	-	-	<	-	<< (+)	-
LP-39	Coklat	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-40	Kuning Kecoklatan	-	-	-	<	< (+)	<<	(+)	+
LP-41	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	<	-	<< (+)	-
LP-42	Kuning Kecoklatan	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)	+
LP-43	Kuning Kecoklatan	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-44	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-45	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-46	Kuning Kecoklatan	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-47	Kuning Kecoklatan	-	-	-	<	< (+)	<<	(+)	+
LP-48	Kuning Kecoklatan	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-49	Kuning Kecoklatan	-	-	-	<	-	<<	-	<<<
LP-50	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-51	Kuning Kecoklatan	-	-	<	-	<< (+)	<	(+)	+
LP-52	Kuning Kecoklatan	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)	+
LP-53	Kuning Kecoklatan	-	-	<	-	<< (+)	-	(+)	+
LP-54	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-55	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-56	Kuning Kecoklatan	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-57	Kuning	-	-	-	-	-	-	-	-

LP-58	Kuning	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-59	Hijau	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LP-60	Hijau	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : M : Mikroalga; J : Jamur; (+) : Mikroalga diisolasi/ telah diisolasi ke cawan petri lain yang berisi medium padat.

Selanjutnya, 19 cawan petri tersebut diamati morfologinya secara mikroskopik untuk memastikan bahwa terdapat mikroalga yang diinginkan didalamnya. Morfologi mikroalga yang tumbuh pada isolat dicocokkan dengan morfologi mikroalga Thraustochytrids yang sesungguhnya. Hal ini bertujuan untuk menapis isolat yang berisi mikroalga Thraustochytrids. Hasilnya, dari 19 isolat mikroalga yang diamati, 3 diantaranya telah terkontaminasi oleh bakteri dengan jumlah yang lebih dominan dibandingkan dengan jumlah mikroalga yang ada. Isolat tersebut kemudian dianggap tidak murni dan disingkirkan. Pengamatan mikroskopik morfologi sampel isolat mikroalga I dapat dilihat pada Gambar 4.2.4. Adanya bakteri yang tumbuh diduga oleh karena bakteri tersebut telah resisten terhadap antibiotik yang digunakan, atau dapat juga dikarenakan oleh jenis bakteri yang tumbuh pada isolat tersebut tidak sensitif terhadap antibiotik yang digunakan.

Tabel 4.2.2. Hasil pengamatan mikroskopik morfologi isolat mikroalga I

No.	Sampel	Hasil Pengamatan
1	LP-01	Murni Mikroalga
2	LP-06	Terkontaminasi Bakteri
3	LP-09	Murni Mikroalga
4	LP-14	Murni Mikroalga
5	LP-15	Murni Mikroalga
6	LP-16	Murni Mikroalga
7	LP-18	Murni Mikroalga
8	LP-24	Murni Mikroalga
9	LP-29	Murni Mikroalga
10	LP-30	Murni Mikroalga
11	LP-31	Murni Mikroalga
12	LP-38	Murni Mikroalga
13	LP-40	Murni Mikroalga
14	LP-41	Murni Mikroalga
15	LP-42	Murni Mikroalga
16	LP-47	Murni Mikroalga

17	LP-51	Terkontaminasi Bakteri
18	LP-52	Terkontaminasi Bakteri
19	LP-53	Murni Mikroalga

Setelah melakukan proses purifikasi isolat mikroalga dengan teknik *streak plate* berulang – ulang hingga didapatkan koloni tunggal dari mikroalga, pengamatan mikroskopik dilakukan kembali. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa isolat mikroalga yang didapatkan benar - benar murni (hanya terdapat mikroalga Thraustochytrids), sebelum dilakukan perbanyakan isolat untuk analisis kandungan DHA. Pengamatan mikroskopik morfologi isolat mikroalga II dapat dilihat pada Gambar 4.2.5. Hasilnya, terdapat 1 isolat yang dianggap tidak murni dan disingkirkan karena ditumbuhi oleh bakteri dengan jumlah yang jauh lebih dominan dibandingkan dengan jumlah mikroalga yang tumbuh. Sedangkan 15 isolat sisanya dianggap murni.

Tabel 4.2.3. Hasil pengamatan mikroskopik morfologi isolat mikroalga II

No.	Sampel	Hasil Pengamatan
1	LP-01	Murni Mikroalga
2	LP-09	Murni Mikroalga
3	LP-14	Terkontaminasi Bakteri
4	LP-15	Murni Mikroalga
5	LP-16	Murni Mikroalga
6	LP-18	Murni Mikroalga
7	LP-24	Murni Mikroalga
8	LP-29	Murni Mikroalga
9	LP-30	Murni Mikroalga
10	LP-31	Murni Mikroalga
11	LP-38	Murni Mikroalga
12	LP-40	Murni Mikroalga
13	LP-41	Murni Mikroalga
14	LP-42	Murni Mikroalga
15	LP-47	Murni Mikroalga
16	LP-53	Murni Mikroalga

Isolat mikroalga yang dianggap murni dan kemudian dikultur pada medium YEP padat adalah isolat yang mulanya berasal dari 6 daun berwarna coklat kehitaman, 4 daun berwarna coklat dan 5 daun berwarna kuning

kecoklatan. Daun yang berwarna kuning kecoklatan merupakan daun yang paling banyak menghasilkan mikroalga dengan persentase sebesar 31,25%. Hasil tersebut berbeda dengan teori dimana proses pembusukkan guguran daun mangrove dapat dikaitkan dengan adanya Thraustochytrids dimana daun mangrove berperan dalam proses siklus karbon Thraustochytrids (detritora). Sehingga semakin busuk suatu daun mangrove diharapkan semakin banyak Thraustochytrids yang dihasilkan (Bongiorni et al., 2004). Jamur yang tumbuh pada sampel guguran daun mangrove diduga merupakan mikroorganisme yang hidup pada daun mangrove dengan jumlah yang lebih dominan dibandingkan dengan mikroalga yang tumbuh. Hal tersebut dikarenakan jamur sendiri dapat pula bersifat sebagai mahluk detritivor yang mempengaruhi proses pembusukan daun. Mahluk detritivor merupakan organisme heterotrof yang memanfaatkan serpihan organik padat (detritus) sebagai sumber makanan (Rangkumar et al, 1993). Oleh karena itu, diharapkan pada penelitian selanjutnya dilakukan pemilihan lokasi yang sekiranya bebas dari adanya jamur, agar pada sampel guguran daun mangrove yang diperoleh hanya ditumbuhi oleh mikroalga, atau mikroalga tumbuh sebagai mahluk detritivor dominan pada guguran daun mangrove tersebut. Kemudian, 15 isolat yang dianggap murni tersebut selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Kromatografi Gas - Spektrofotometri Massa (KG-SM).

4.3 Analisis DHA secara kualitatif dengan Kromatografi Gas - Spektrofotometri Massa (KG-SM)

4.3.1 Pembuatan Biomassa Kering

Langkah pertama yang dilakukan adalah dengan membuat biomassa kering mikroalga. Pembuatan biomassa kering mikroalga dilakukan dengan cara memanaskan pasta isolat koloni mikroalga yang telah murni dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam (Yokochi et al., 1998). Berat biomassa kering yang ada dihitung dengan cara mengurangi berat tabung yang berisi biomassa kering dengan berat tabung kosong.

Tabel 4.3.1.1. Berat biomassa kering sampel isolat mikroalga

No.	Sampel	Berat Tabung Kosong (mg)	Berat Tabung Berisi Biomassa Kering (mg)	Berat Biomassa (mg)
1	LP-01	16866,7	16902,8	3,51
2	LP-09	16828,5	16857,3	2,88
3	LP-15	16952,8	16983,9	3,11
4	LP-16	16977,0	17006,7	2,97
5	LP-18	16877,1	16904,6	27,5
6	LP-24	16925,5	16036,6	1,11
7	LP-29	16853,8	16867,8	1,40
8	LP-30	17107,0	17133,1	2,61
9	LP-31	16816,0	16850,5	3,45
10	LP-38	16838,6	16882,6	4,40
11	LP-40	17035,1	17071,7	3,66
12	LP-41	17043,5	17070,7	2,72
13	LP-42	16811,0	16835,8	2,48
14	LP-47	16974,9	16992,7	1,78
15	LP-53	16995,0	17019,4	2,44

4.3.2 Ekstraksi dan Metilasi

Pada proses ekstraksi dan metilasi dipilih metode *direct transesterification* (transesterifikasi langsung), dimana merupakan metode yang menggabungkan proses ekstraksi dan transesterifikasi menjadi suatu proses tunggal sehingga penggunaan pelarut dan waktu yang digunakan dapat dikurangi (Yokochi et al., 1998). Pelarut diklorometan dipilih karena diklorometan dapat menghasilkan ekstrak lipid yang lebih banyak dibandingkan dengan pelarut kloroform (Gertler & Wells, 2011). Proses yang terjadi adalah, asam lemak yang telah terekstraksi oleh pelarut diklorometan, akan berikatan dengan metanol membentuk *fatty acid methyl ester* (FAME) dengan bantuan HCl sebagai katalisator asam. Setelah diperoleh FAME, dilakukan separasi untuk memisahkan FAME dari campuran pelarut. Penggunaan NaCl jenuh bertujuan untuk menarik kandungan air yang ada. Sedangkan komponen – komponen yang tidak larut dalam air (nonpolar), seperti asam lemak akan larut didalam pelarut heksan mengikuti teori *like dissolve like* dimana kelarutan akan terjadi apabila memiliki sifat kepolaran yang sama.

Heksan merupakan pelarut yang baik dan paling sering digunakan untuk melarutkan lipid dengan polaritas yang rendah (Gertler & Wells, 2011).

4.3.3 Identifikasi Asam Dokosaheksanoat (DHA) dengan Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa (KG-SM)

Sampel minyak mikroalga yang terdapat dalam pelarut n-heksan selanjutnya di analisis secara kualitatif dengan kondisi analisis sebagai berikut:

Temperatur kromatografi gas adalah 100°C yang dipertahankan selama 2 menit, kemudian dinaikkan hingga 180°C pada laju pemanasan $10^{\circ}\text{C}/\text{menit}$, diikuti dengan pemanasan sampai 260°C pada laju pemanasan $4^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ yang dipertahankan selama 15 menit. Temperatur injektor kromatografi gas adalah 270°C dan laju alir dari gas pembawa yang berupa gas Helium adalah $1,0\text{ mL}/\text{menit}$.

Temperatur penghubung pada spektrofotometer massa adalah 260°C , dengan energi elektron sebesar 70 eV dan volume injeksi sebesar $1\mu\text{L}$.

Database fragmentasi DHA pada *NIST library (National Institute of Standards and Technology)* digunakan sebagai pembandingan untuk memastikan kebenaran fragmentasi DHA pada sampel dengan cara melihat kualitas kemiripannya. Hasilnya, dari 15 sampel asam lemak mikrolaga yang dianalisis, 15 sampel tersebut mengandung DHA didalamnya dengan kualitas kemiripan lebih dari 900, dari skala 1 sampai 1000. Kromatogram dan fragmentasi DHA yang ada dapat dilihat pada lampiran.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi, dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Mikroalga berhasil diisolasi dari 15 sampel guguran daun mangrove dari total 60 daun yang dikumpulkan dari Kawasan Mangrove Lampung.
- b. Daun yang paling banyak menghasilkan isolat mikroalga adalah daun yang berwarna kuning kecoklatan dengan persentase sebesar 31,25%.
- c. 15 Isolat mikroalga yang dianalisis dengan Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa (KG-SM) terbukti memiliki kandungan asam dokosaheksanoat (DHA). 15 isolat tersebut adalah; LP-01; LP-09; LP-14; LP-16; LP-18; LP-24; LP-29; LP-30; LP-31; LP-38; LP-40; LP-41; LP-42; LP-47; dan LP-53.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh penulis adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan melakukan analisis kuantitatif guna mengetahui mikroalga yang paling potensial dalam menghasilkan DHA yang selanjutnya diidentifikasi gennya untuk mengetahui spesies mikroalganya.

DAFTAR ACUAN

- Alonso, D.L., & Maroto, F.G. (2000). Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 18, 481-497.
- Bahnweg, G. (1979). Studies on the physiology of Thraustochytriales I. Growth requirements and nitrogen nutrition of Thraustochytrium spp., Schizochytrium sp., Japonochytrium sp., Ulkenia spp., and Labyrinthuloides spp. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* 17: 245-268.
- Barrow, C., Shahidi, F.(2008) *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. US: Taylor & Francis Group.
- Belarbi, H. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil A process for high yield and scaleable recovery of high purity. *Enzyme and Microbial Technology* 26 : 516–529.
- Bengen, D. G. (2000). *Sinopsis Ekosistem dan Sumberdaya Alam Pesisir*. Bogor: Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan Institut Pertanian Bogor.
- Bengen, D. G. (2001). *Pedoman Teknis Pengenalan dan Pengelolaan Ekosistem Mangrove*. Bogor: Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan Institut Pertanian Bogor.
- Birch, E.B., Garfield, S., Castañeda, Y., Hughbanks-Wheaton, D., Uauy, R., Hoffman, D. (2007). Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Human Development* 83, 279-284.
- Bongiorni, L.; Pignataro, L.; Santangelo, G. (2004). Thraustochytrids (fungoid protists): an unexplored component of marine sediment microbiota. *Sci. Mar.* 68, 43-48.
- Branchey, L.B.,& Branchey, M. (2008). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids decrease feelings of anger in substance abusers. *Psychiatry Research* 157, 95-104.

- Catalan, J., Moriguchi, T., Slotnick, B., Murthy, M., Greiner, R.S., & Salem, N., (2002). Cognitive defects in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behavioral Neuroscience* 116(6), 1022-1031.
- Corsetto, P. A., et al. (2010). Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids in Health and Disease*, 10, 73-111.
- Darley, J. M., et al. (1973). Do groups always inhibit individuals' responses to potential emergencies? *Journal of Personality and Social Psychology*, 26, 395-399.
- Day, R.A., & Underwood, A.L. *Analisis kimia Kuantitatif*, edisi keenam, Penerbit Erlangga.
- EPA. (2004). What you need to know about mercury and shellfish. Washington, D.C, U.S: Environmental Protection Agency. January 29, 2012. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/admehg3.html>.
- ERNA. (2008). *Polyunsaturated fatty acid (PUFA)*. Belgium : 50 Rue de l'Assosiation.
- Gertler, W & Wells., S.G. (2011). *Final report algal based fuel*. Las Vegas: Nevada Renewable Energy Consortium.
- Harel, M., W. Koven, I. Lein, Y. Bar, P. Behrens, J. Stubblefield, Y. Zohar, A.R. Place. (2002). Advanced DHA, EPA, and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture*. 213: 347-362.
- Hashimoto, M., S. Hossain, T. Shimada, K. Sugioka, H. Yamasaki, Y. Fujii, Y. Ishibashi, J. Oka, and O. Shido. (2002). Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *Journal of Neuro chemistry*. 81(5): 1084-1091.
- Hering, J., et al. (2007). Inhibition of proliferation by omega-3 fatty acids in chemoresistant pancreatic cancer cells. *Annals of Surgical Oncology* 14(12), 3620-3628.
- Jones, E. B. G., & Harrison, (1976) J.L. Physiology of marine phycomycetes. Recent advance in Aquatic Mycology. New York: John Wiley and Son.

- Kamlangdee, J & Fan K.W. (2003). Polyunsaturated fatty acid production by Schyzochytrium sp. Isolated from mangrove. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 25(5), 643-650.
- Kris-Etherton, P., Harris, W.S., & Appel, L.J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106(21), 2747-2757.
- Kris-Etherton, P. & Innis, S. (2007). Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids. *Journal of the American Dietetic Association*. 107(9), 1599-1611.
- Kuznetsov, E.A. (1981). Anabiosis in lower aquatic fungi. *Mikologie and Fitopatologie* 15 : 526-531.
- Lahaye, M.(2001) Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J. Appl. Phycol.*, 13, 173–184.
- Lee, J.Y., et al. (2009). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Biores. Technol.* 101. S75-S77.
- Lepage, G., & C.C.Roy.(1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research* 25 :1391-1396.
- Lewis, T.E., et al. (1999). The Biotechnological Potential of Thraustochytrids. *Marine Biotechnology* 1 (6) : 580-587.
- Little, S.J., Lynch, M.A., Manku M., & Nicolaou A. (2007). Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 77, 155-162.
- Makrides, M., Neumann, M., Simmer, K., Pater, J., & Gibson, R. (1995). Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy?. *The Lancet* 345,1463-1468.
- Margulis, L. et al. (1989). Handbook of Protoctista Jones and Bartlett Publishers Boston. 914.
- Masson, S., Latini M., Tacconi, M., & Bernasconi, R. (2007). Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies. *Journal of Cardiovascular Medicine* 8 (suppl 1), 4-10.

- McNair., H, M. & Bonelli E.,J.. (1998). Dasar kromatografi gas. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Moss, B. L. (1980). The effect of photoperiod on receptacle initiation in *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *BT. Phycol. J.* 15: 291-301.
- New, M.B., & Wijkström, U.N. (2002). Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fishmeal trap. *FAO Fisheries Circular* No. 975. January 3, 2012. Rome, Italy: FAO. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y3781e/y3781e00.pdf>.
- Nettleton, J.A. (1995). *Omega-3 fatty acids and health*. New York, NY: Chapman & Hall.
- Nowak, J., et al. (2007). Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcino genesis* 28(9), 1991-1995.
- Olive, L., S. (1975). *The Mycetozoans*. New York : Academic Press: 293.
- Olaizola, M., (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.*20. 459-466.
- Perkins, F.O. (1972). The ultrastructure of holdfast. “ rhizoids,” and “slimetracks” in thraustochytriaceous fungi and labyrinthula spp. *Archiv fur Mikrobiologie* 84, 95-118.
- Perveen, Z., et al. (2006). Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology Letter* 28, 197–202.
- Peet, M. & C. Stokes.(2005). Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs.* 65: 1051-1059.
- Porter, D. (1990). Phylum Labyrinthulomycota. *Handbook of Protoctista*. Boston: Jones and Bartlett Publ.
- Scott et al. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. prospects, *Curr Opin Biotechnol.* 21:1–10.
- Simopoulos, A.P. (1999). New products from the agri-food industry: the return of n-3 fatty acids into the food supply. *Lipids* 34, 297-301.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 365-379.

- Tidwell, J.H. & Allan, G.L. (2001). Fish as food: aquaculture's contribution. *EMBO Reports*. 21(11), 958-963.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T., & Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *S. limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49, 72-76.





GAMBAR

Gambar 4.1.1. Kawasan Mangrove Lampung tempat pengambilan sampel



Gambar 4.1.2. Sampel guguran daun mangrove

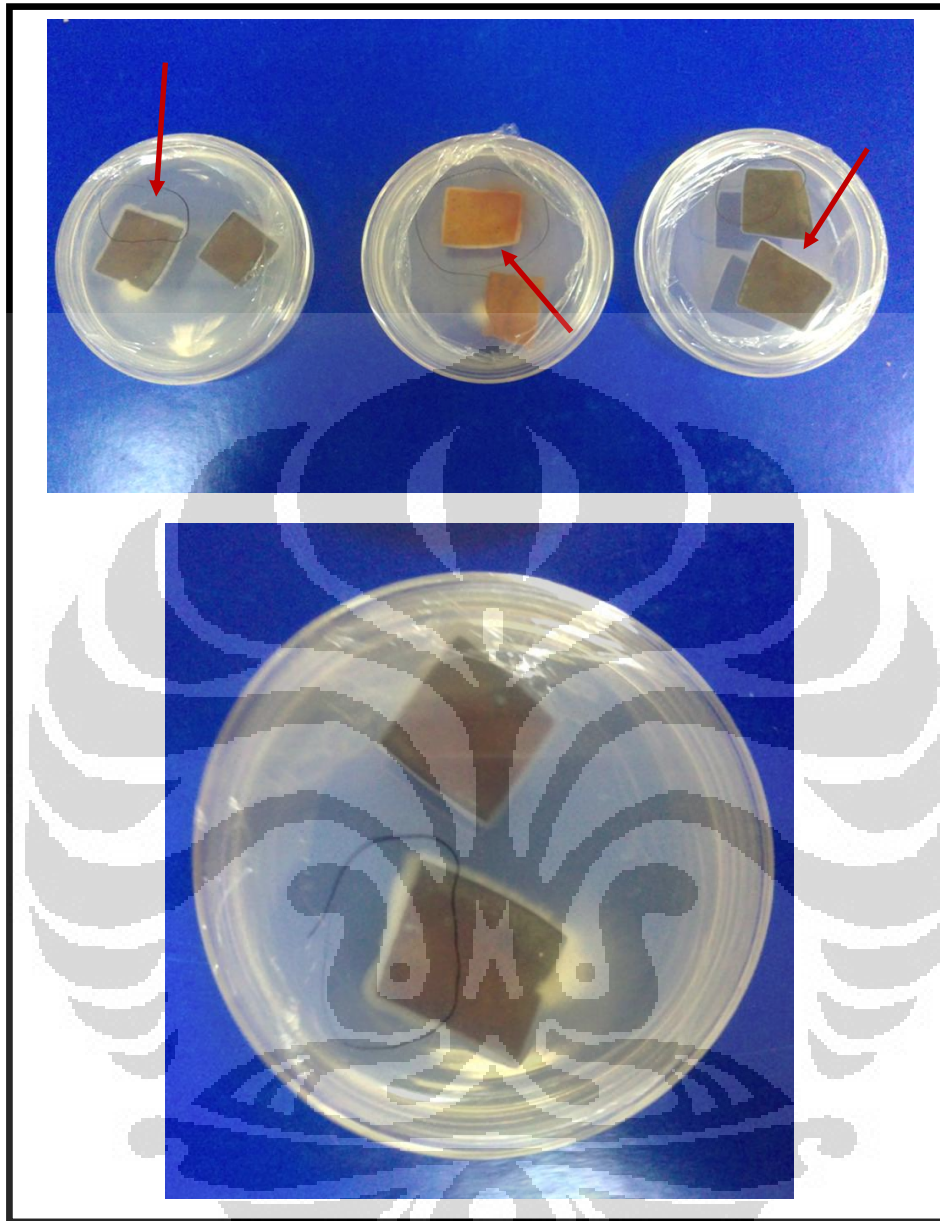


Gambar 4.2.1. Potongan guguran daun mangrove

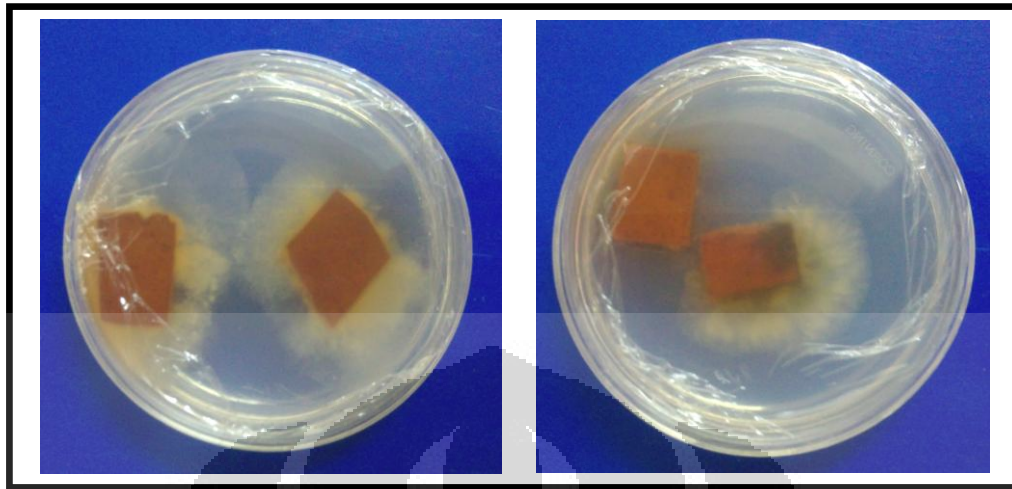


Keterangan : (a) Daun mangrove yang telah dipotong 1 cm²; (b) Cawan petri yang telah ditanami potongan daun mangrove

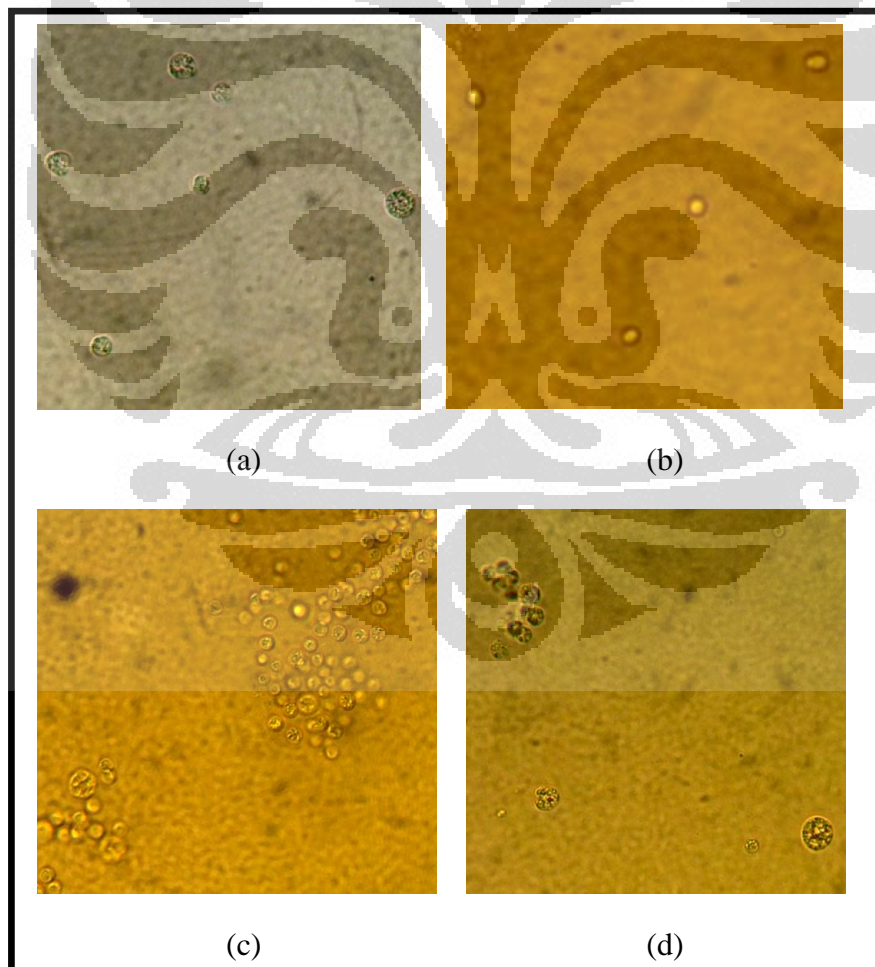
Gambar 4.2.2. Isolat mikroalga yang tumbuh pada medium padat By+

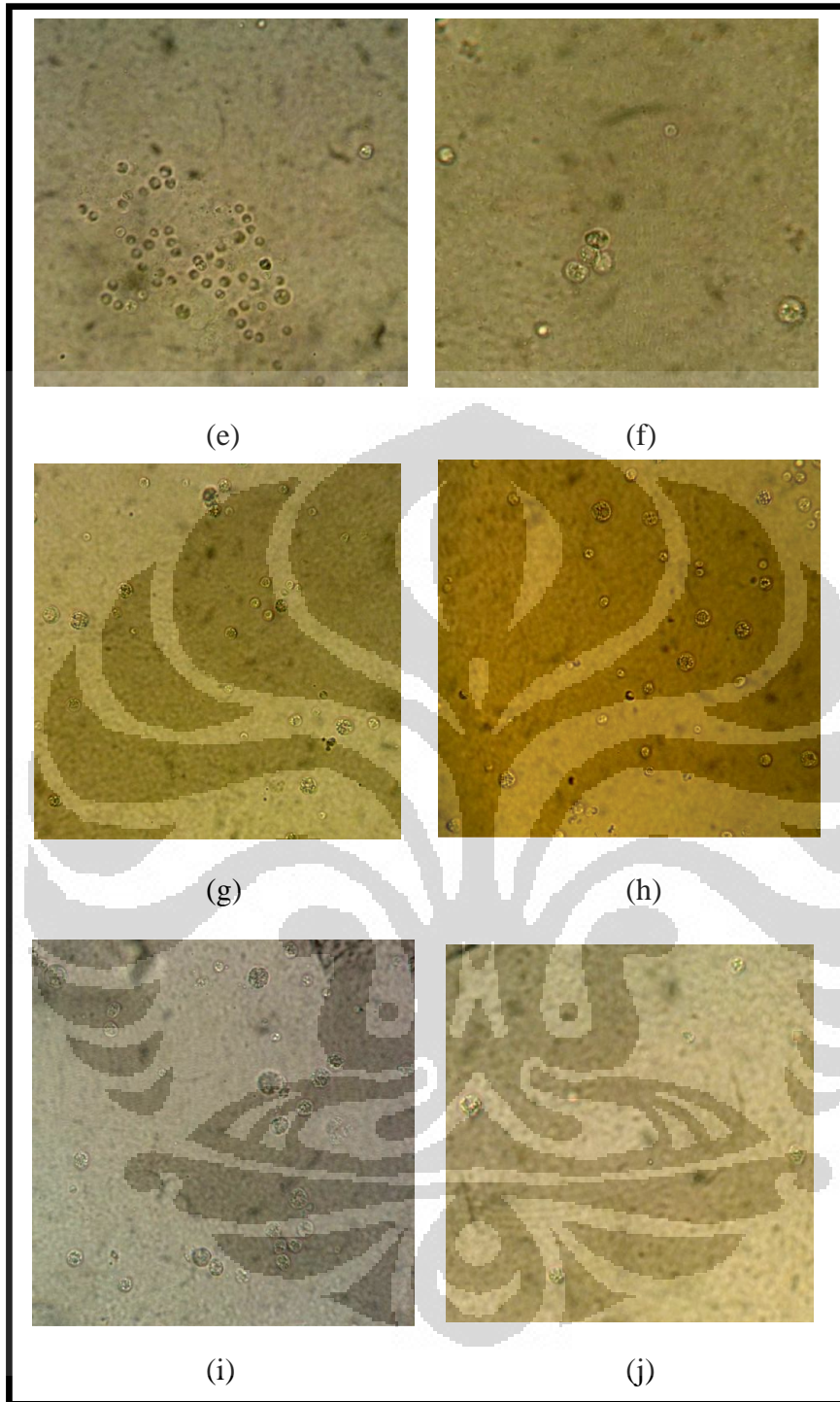


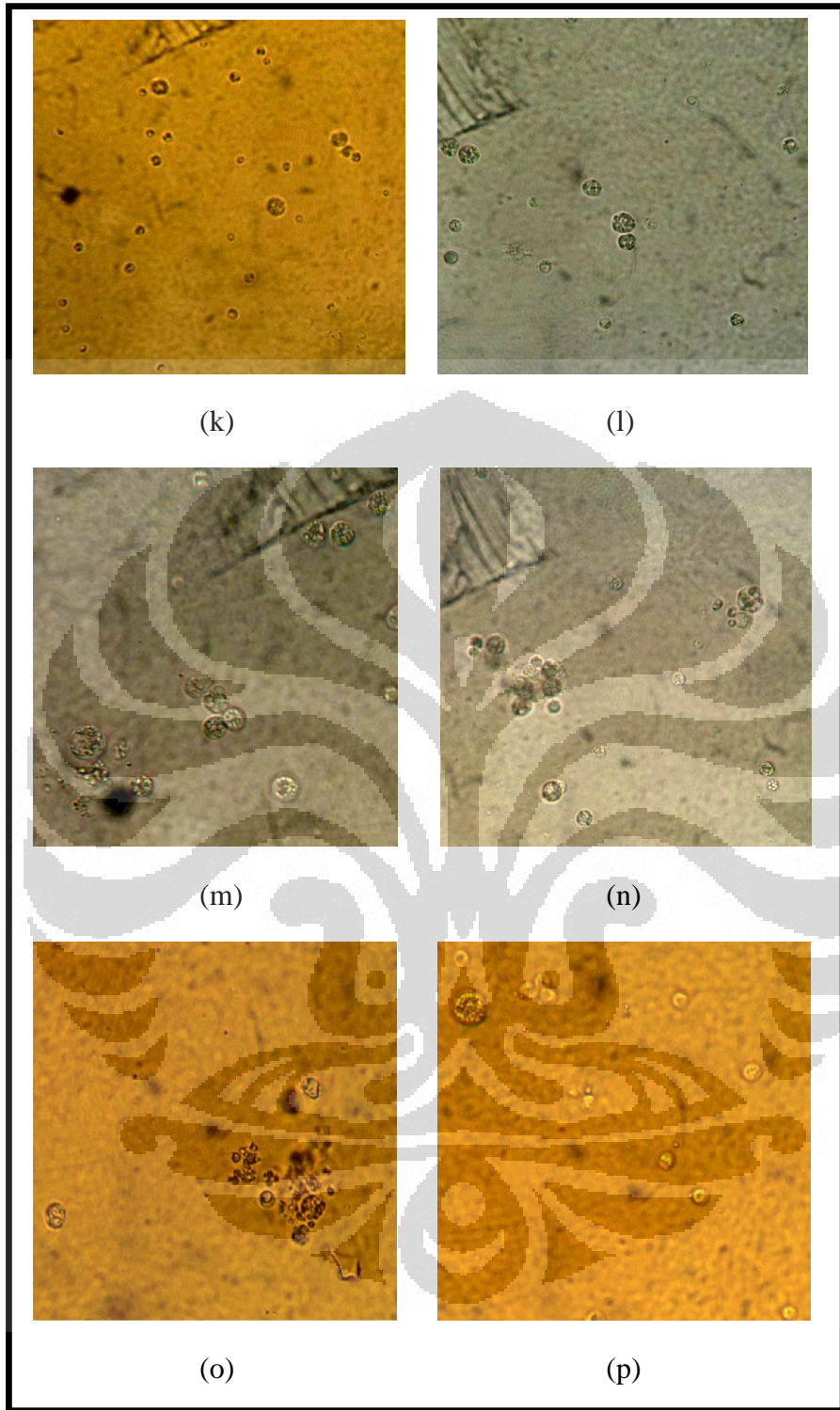
Gambar 4.2.3. Isolat yang ditumbuhi jamur

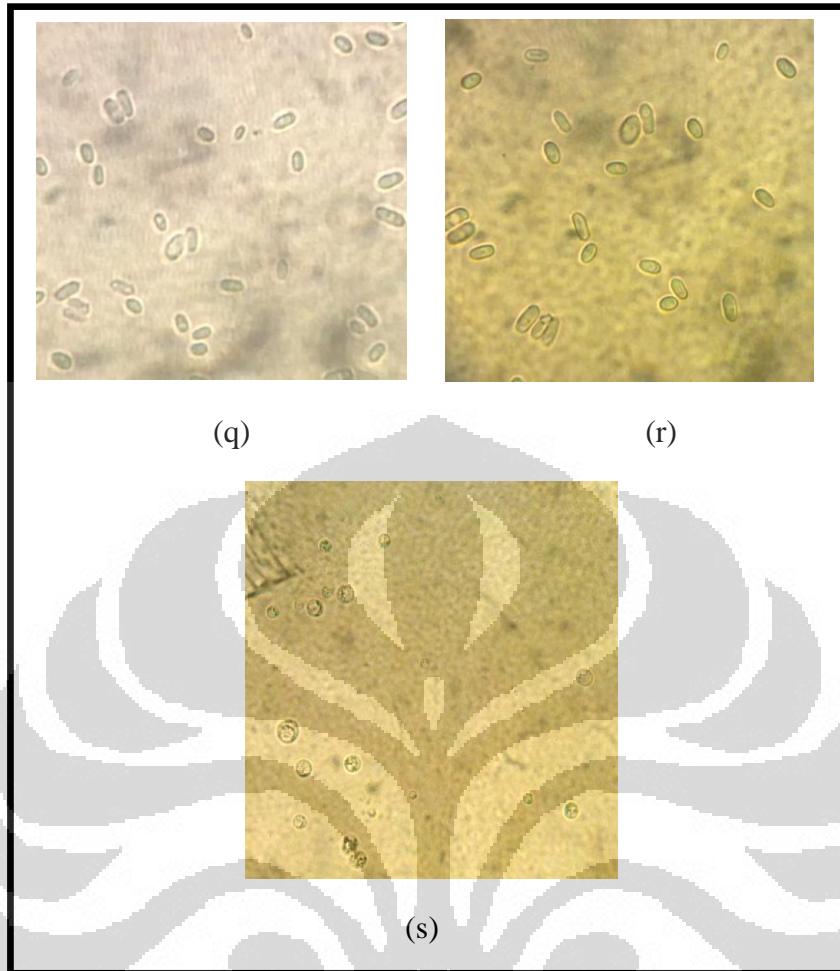


Gambar 4.2.4. Pengamatan mikroskopik morfologi sampel isolat mikroalga 1



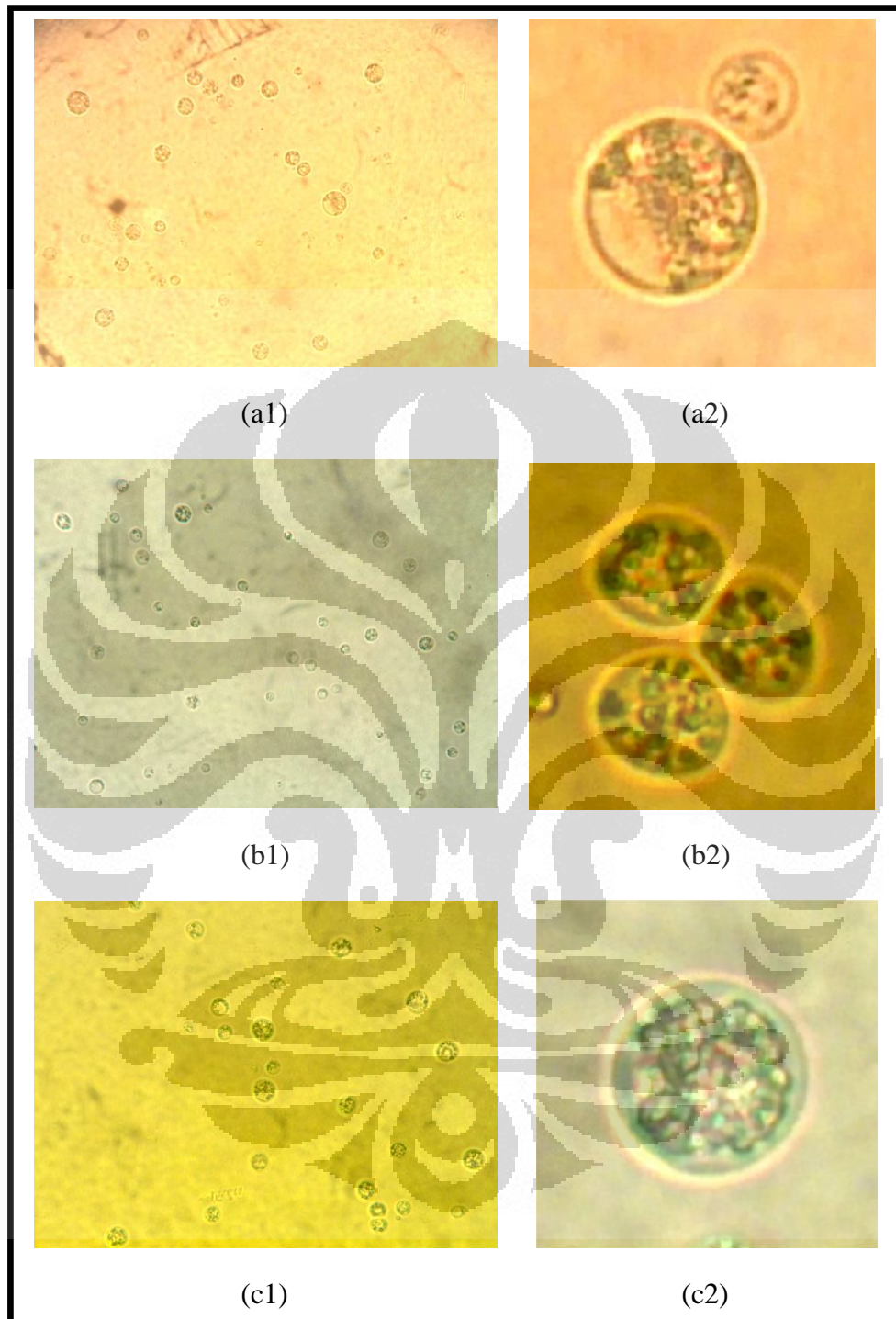






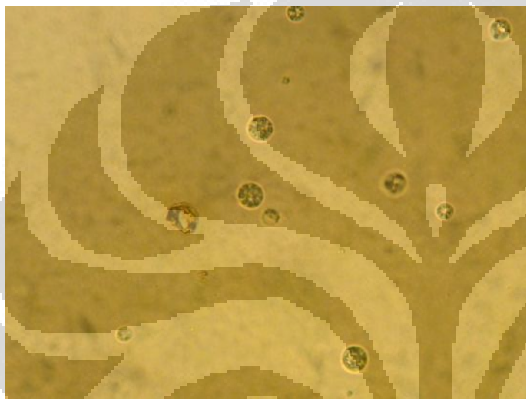
Keterangan : (a)LP-01; (b)LP-06; (c)LP-09; (d)LP-14; (e)LP-15; (f)LP-16;
 (g)LP-18; (h)LP-24; (i)LP-29; (j)LP-30; (k)LP-31; (l)LP-38;
 (m)LP-40; (n)LP-41; (o)LP-42; (p)LP-47; (q)LP-51; (r)LP-52;
 (s)LP-53. (Perbesaran 5x45).

Gambar 4.2.5. Pengamatan mikroskopik morfologi sampel isolat mikroalga 2





(d)



(e1)



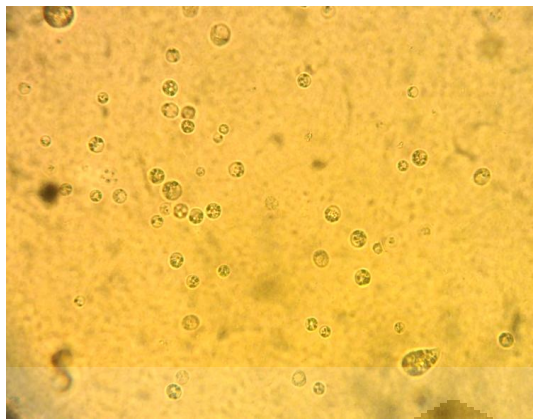
(e2)



(f1)



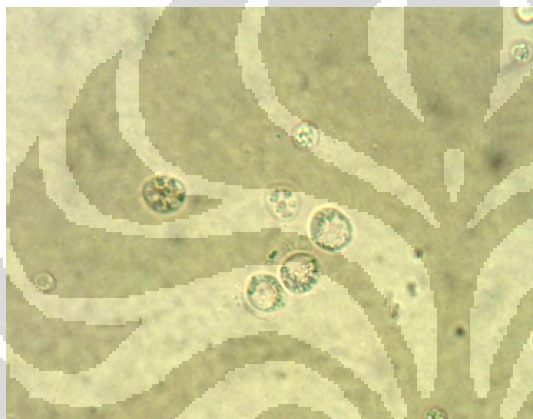
(f2)



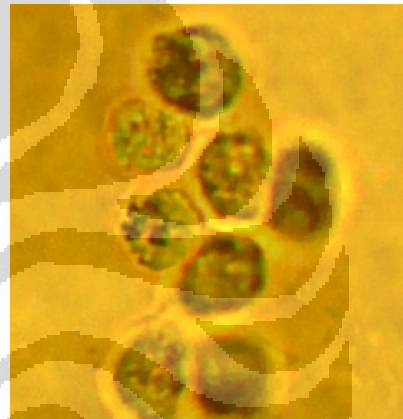
(g1)



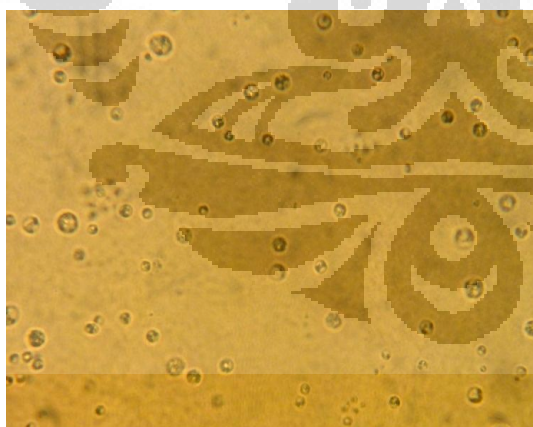
(g2)



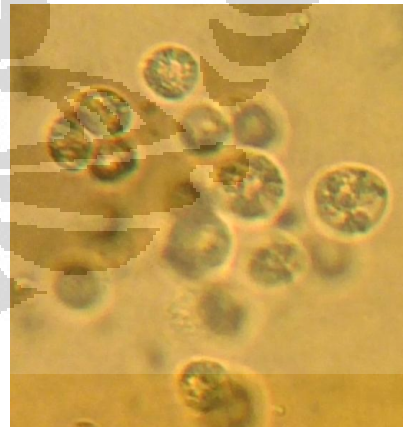
(h1)



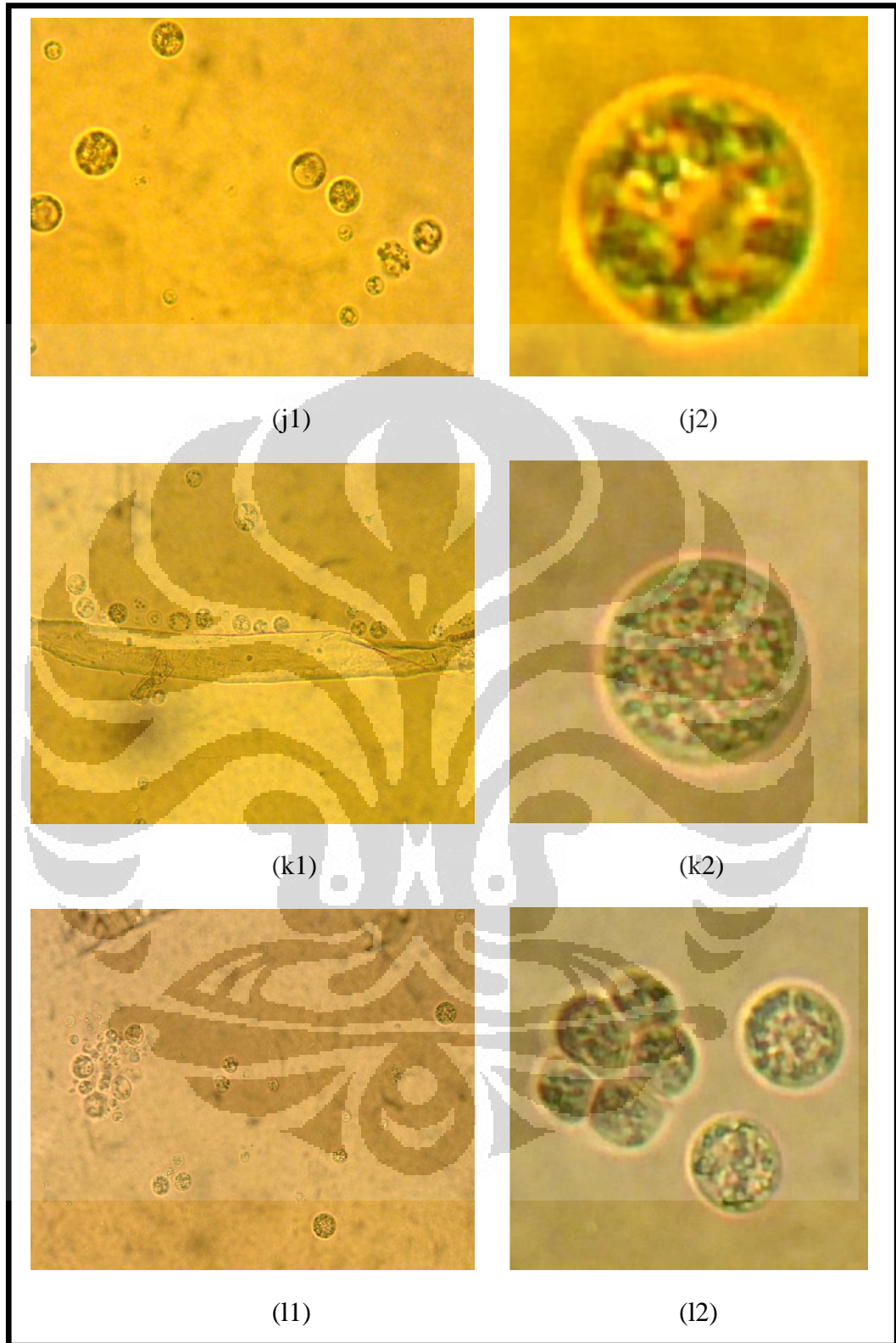
(h2)

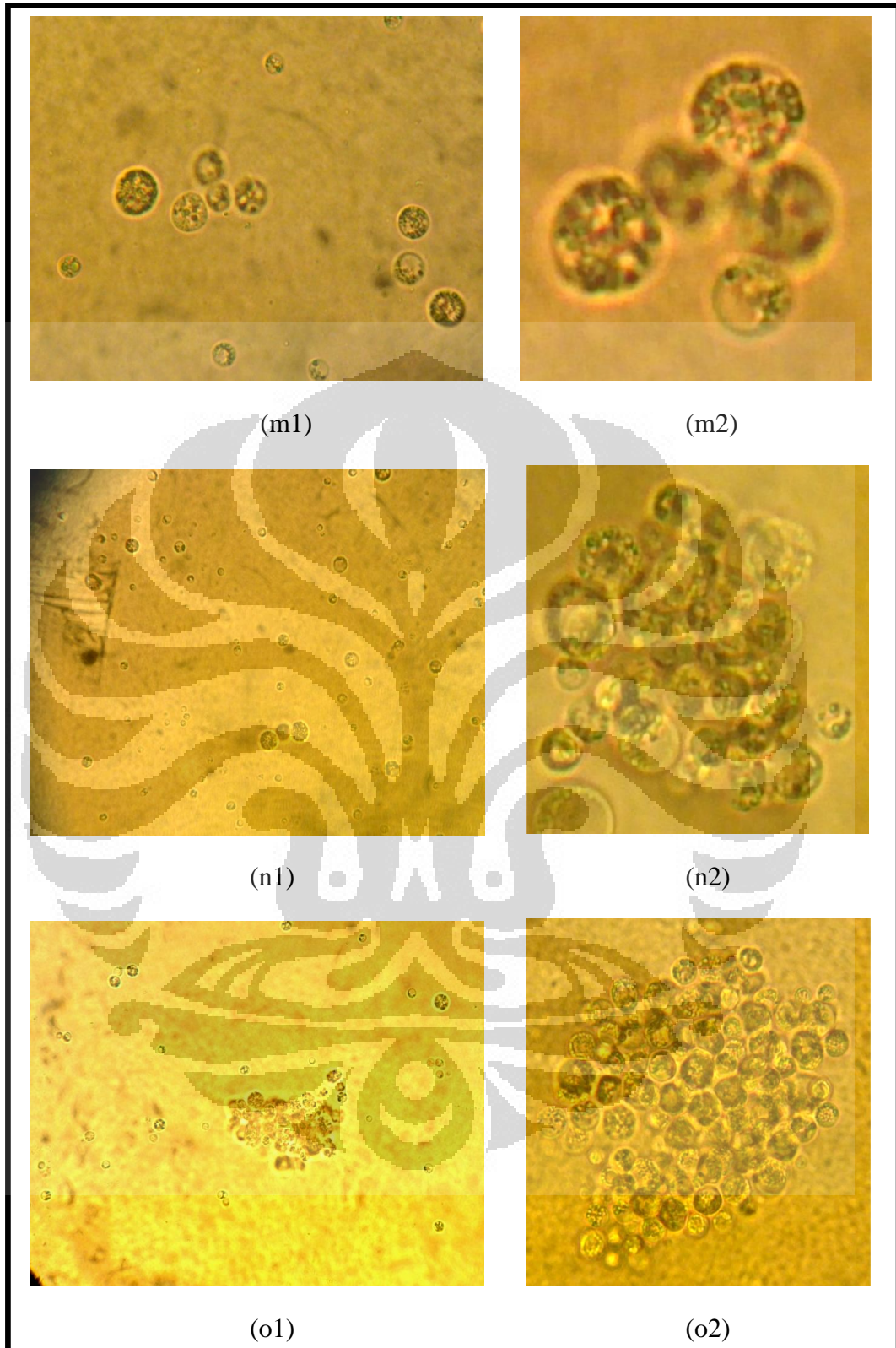


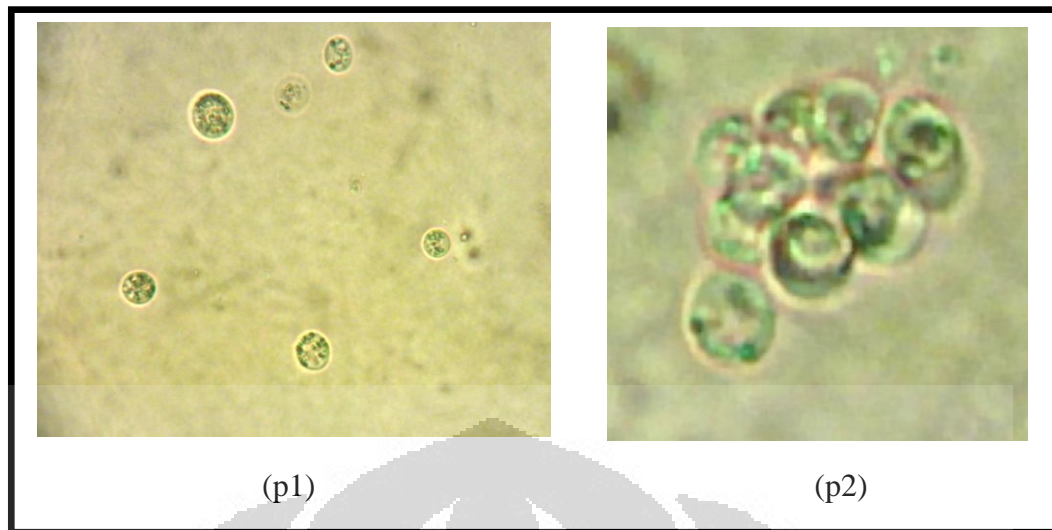
(i1)



(i2)





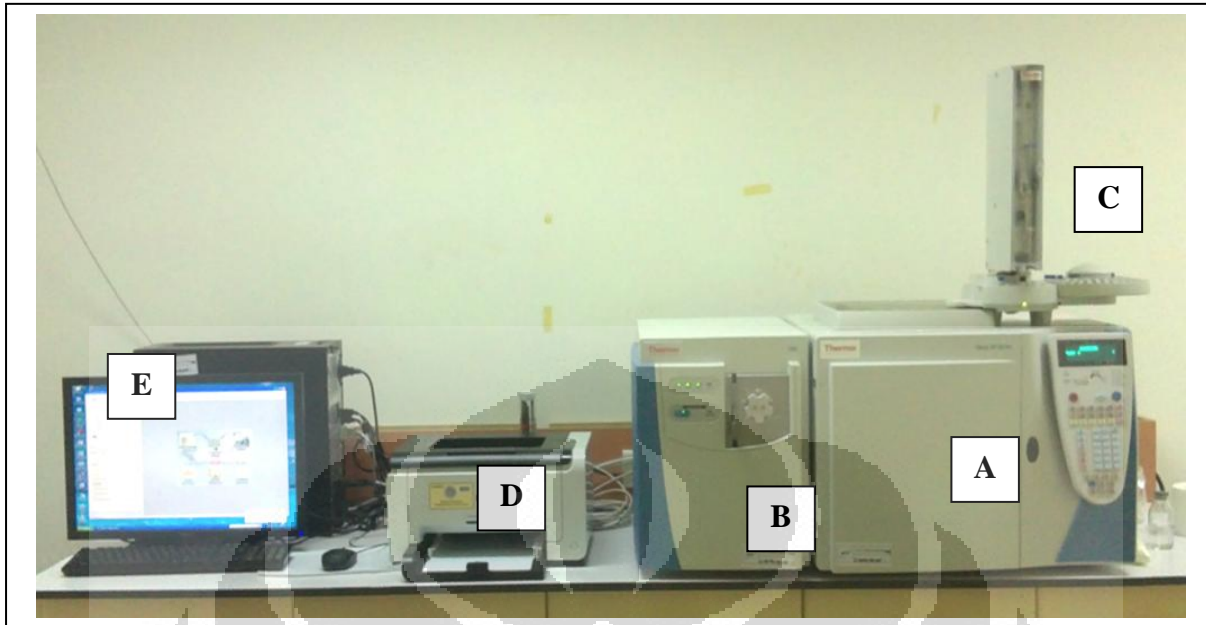


Keterangan : (a1) LP-01 (Perbesaran 5x45); (a2) LP-01 (Perbesaran 5x400); (b1) LP-09 (Perbesaran 5x45); (b2) LP-09 (Perbesaran 5x400); (c1) LP-14 (Perbesaran 5x45); (c2) LP-14 (Perbesaran 5x400); (d) LP-15 (Perbesaran 5x45); (e1) LP-16 (Perbesaran 5x45); (e2) LP-16 (Perbesaran 5x400); (f1) LP-18 (Perbesaran 5x45); (f2) LP-18 (Perbesaran 5x400); (g1) LP-24 (Perbesaran 5x45); (g2) LP-24 (Perbesaran 5x400); (h1) LP-29 (Perbesaran 5x45); (h2) LP-29 (Perbesaran 5x400); (i1) LP-30 (Perbesaran 5x45); (i2) LP-30 (Perbesaran 5x400); (j1) LP-31 (Perbesaran 5x45); (j2) LP-31 (Perbesaran 5x400); (k1) LP-38 (Perbesaran 5x45); (k2) LP-38 (Perbesaran 5x400); (l1) LP-40 (Perbesaran 5x45); (l2) LP-40 (Perbesaran 5x400); (m1) LP-41 (Perbesaran 5x45); (m2) LP-41 (Perbesaran 5x400); (n1) LP-42 (Perbesaran 5x45); (n2) LP-42 (Perbesaran 5x400); (o1) LP-47 (Perbesaran 5x45); (o2) LP-47 (Perbesaran 5x400); (p1) LP-53 (Perbesaran 5x45); (p2) LP-53 (Perbesaran 5x400).



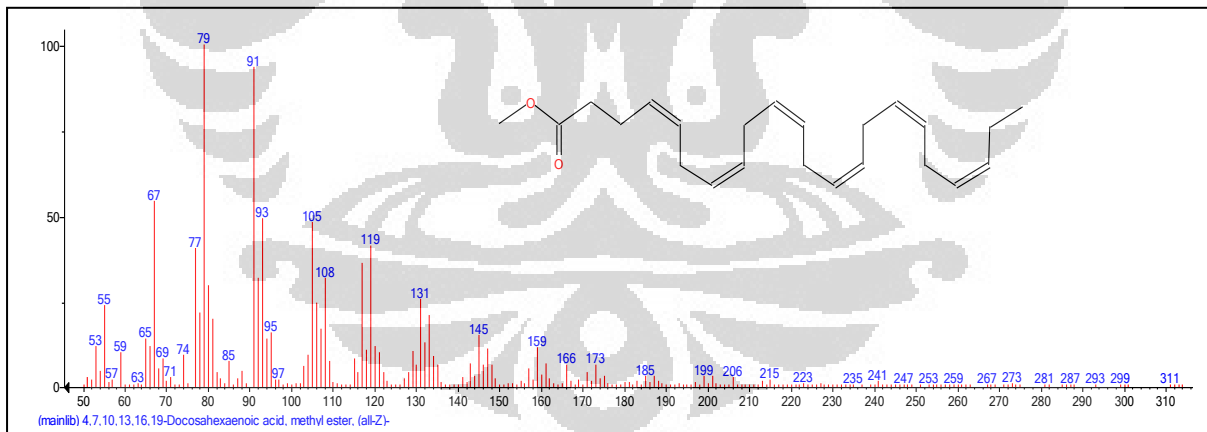
LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat Kromatografi Gas - Spektrofotometri Massa (KG-SM)

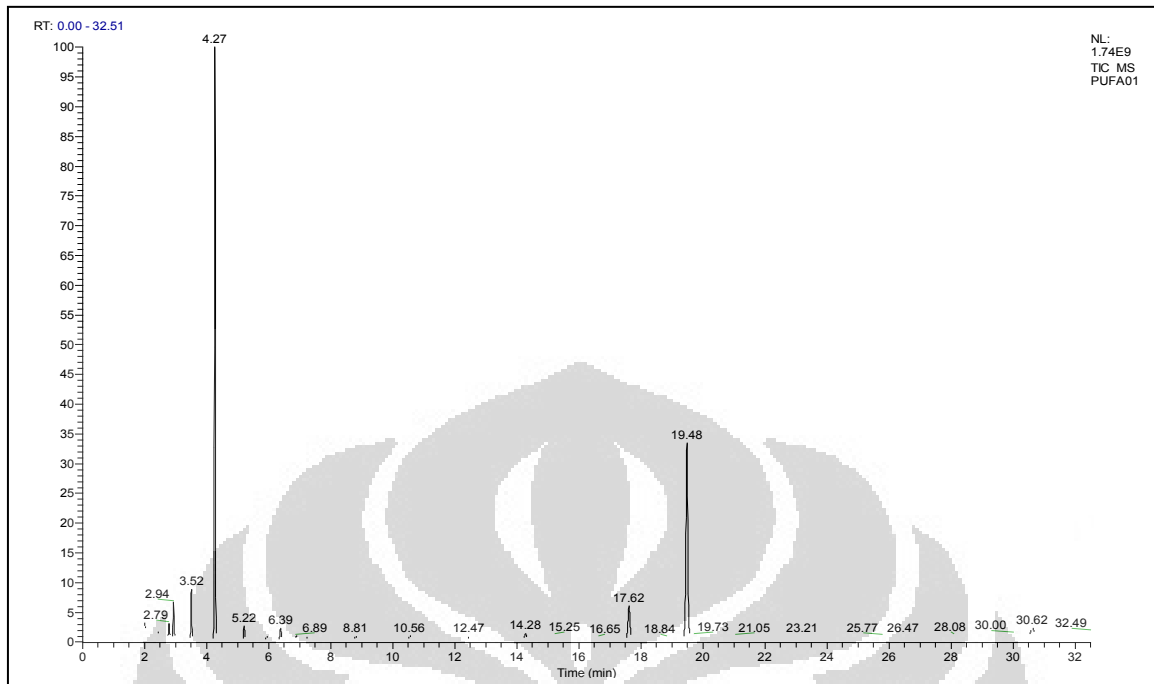


Keterangan : A. Kromatografi Gas; B. Spektrofotometri Massa; C. Autosampler; D. Printer; E. Komputer untuk mengontrol dan mengolah data pada alat.

Lampiran 2. Fragmentasi DHA pada database *NIST Library*

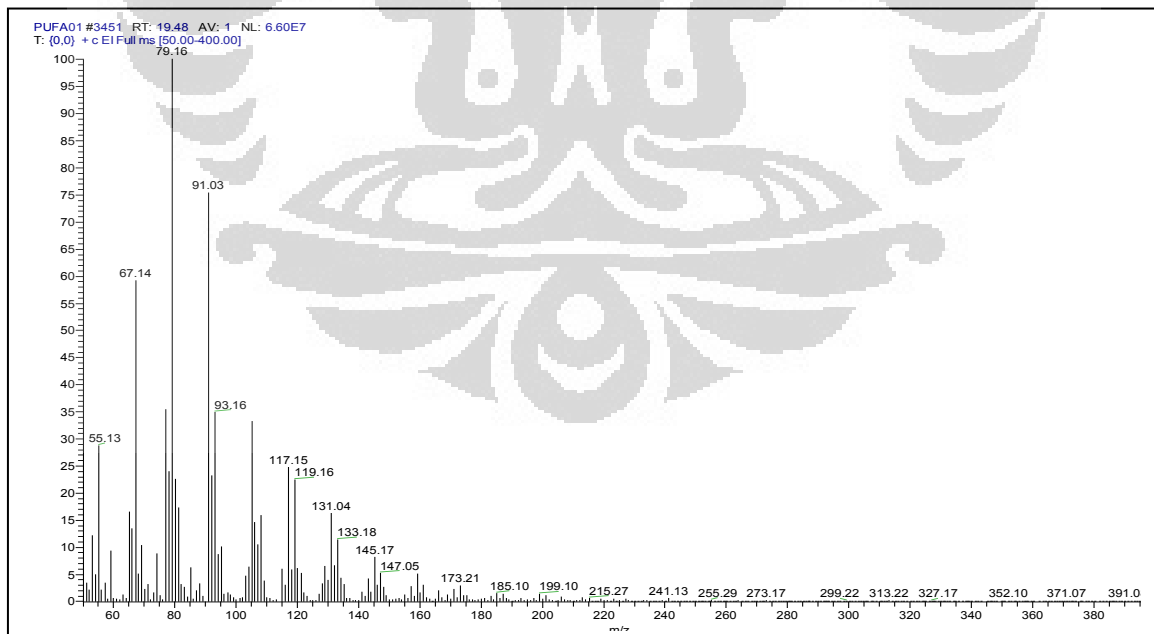


Lampiran 3. Kromatogram LP-01

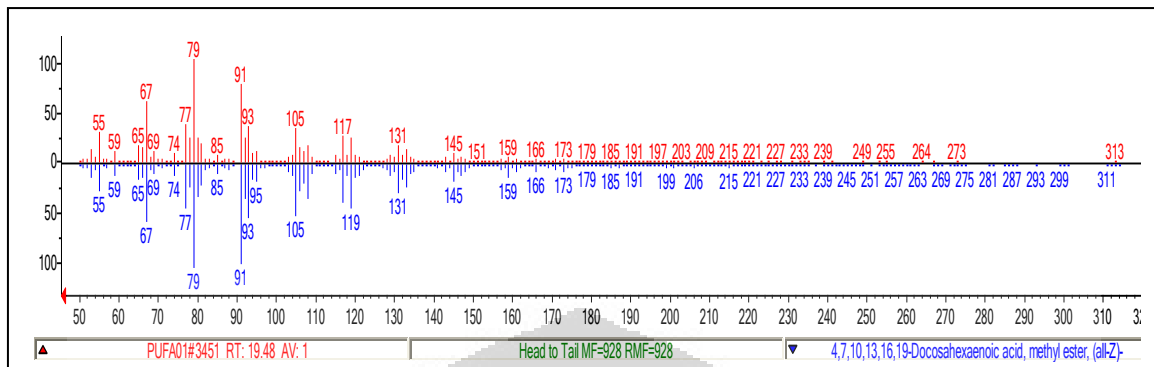


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,48.

Lampiran 4. Fragmentasi DHA LP-01

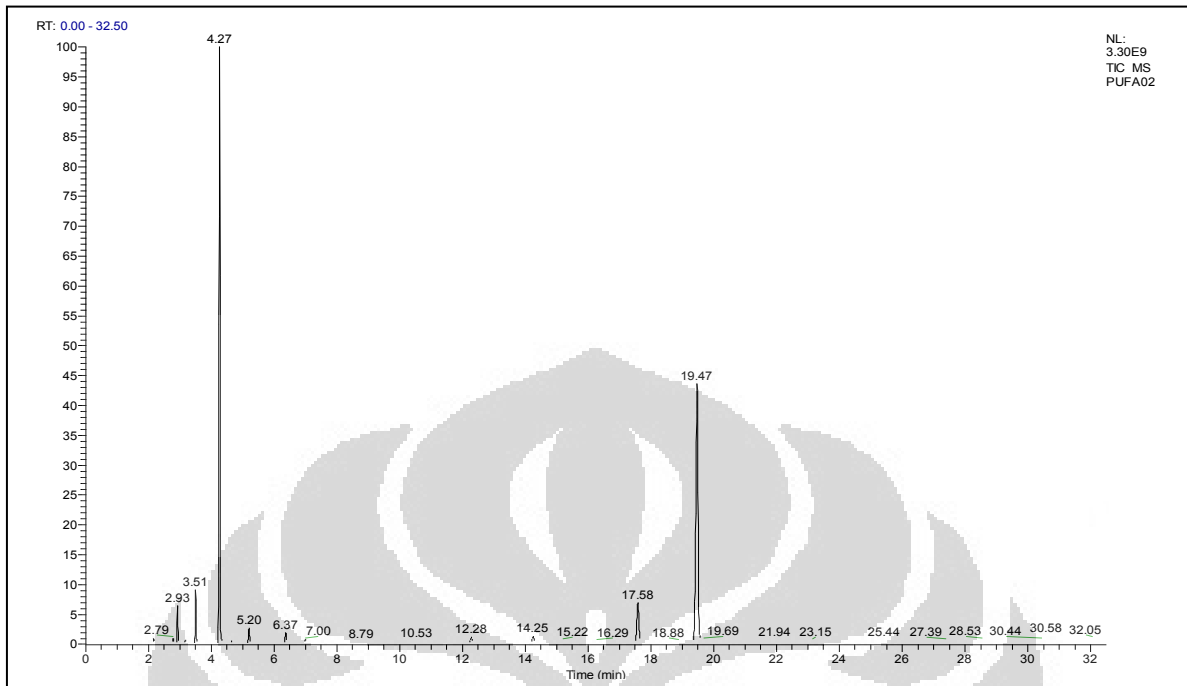


Lampiran 5. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-01 dengan DHA pada database NIST Library



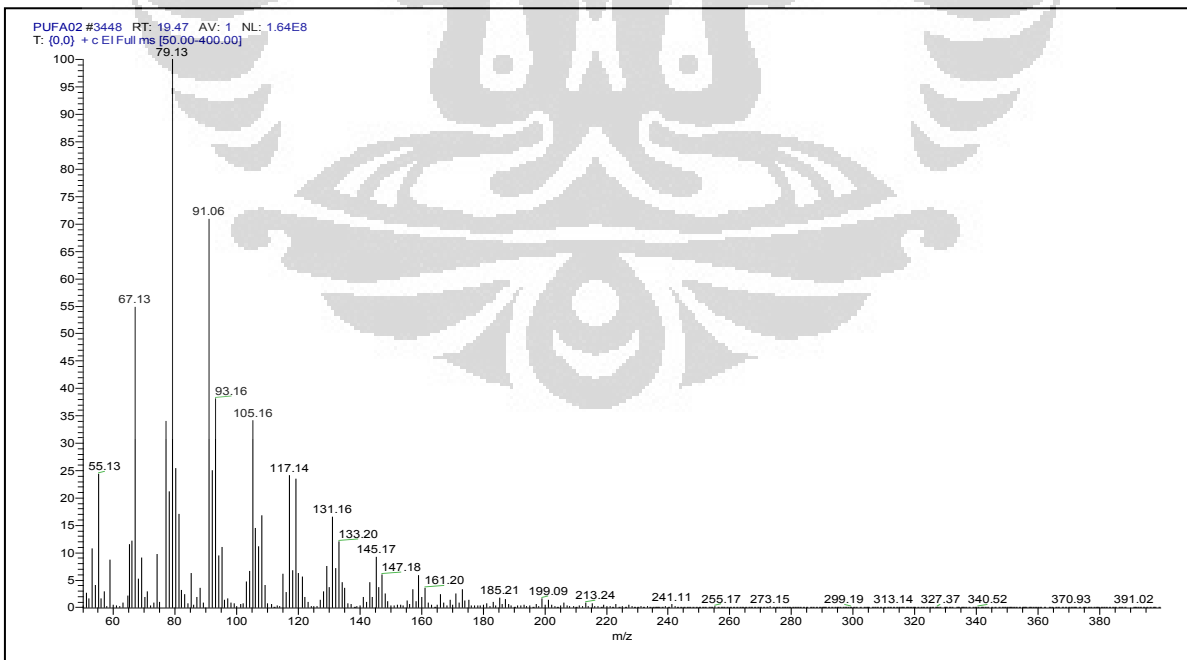
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 928.

Lampiran 6. Kromatogram LP-09

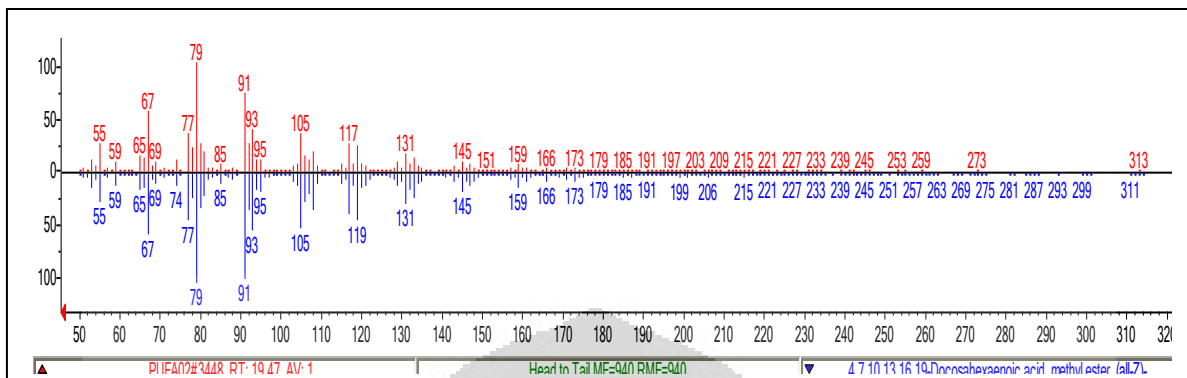


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,47.

Lampiran 7. Fragmentasi DHA LP-09

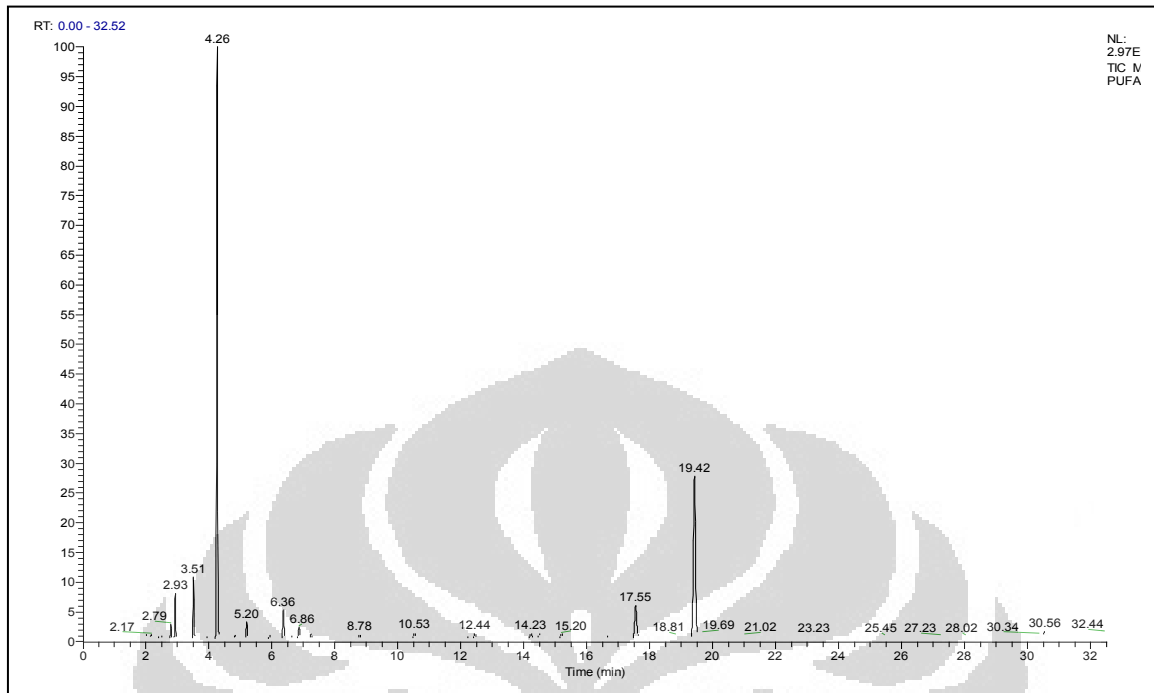


Lampiran 8. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-09 dengan DHA pada database NIST Library



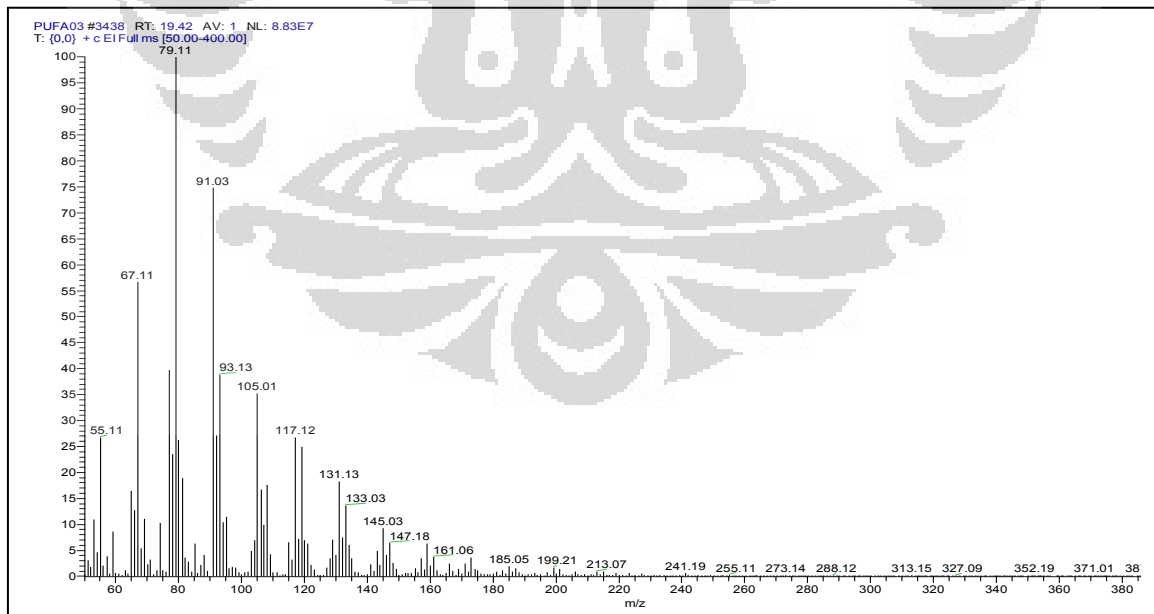
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-*Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 940.

Lampiran 9. Kromatogram LP-15

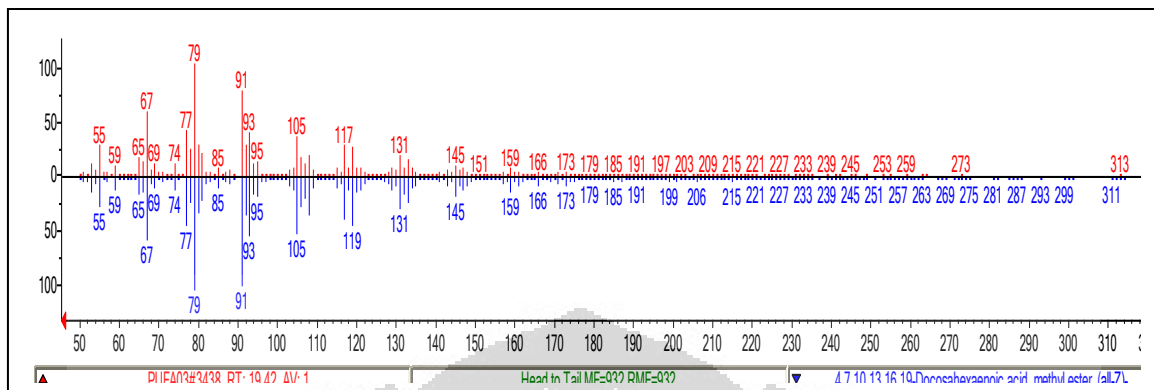


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,42.

Lampiran 10. Fragmentasi DHA LP-15

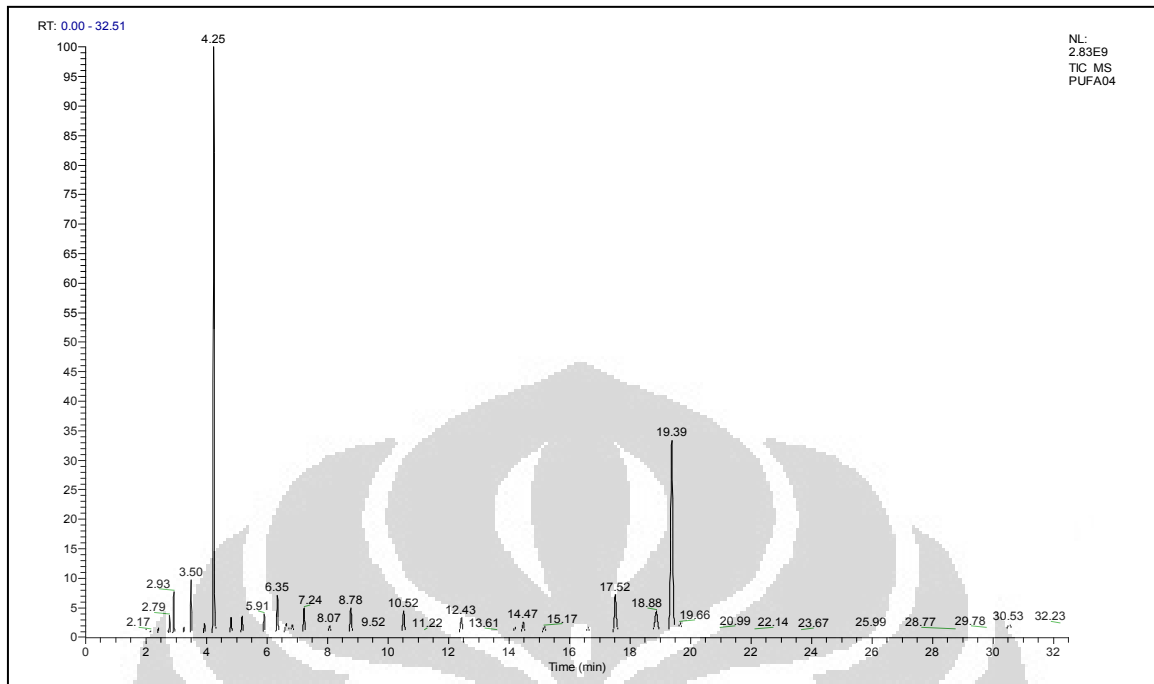


Lampiran 11. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-15 dengan DHA pada database NIST Library



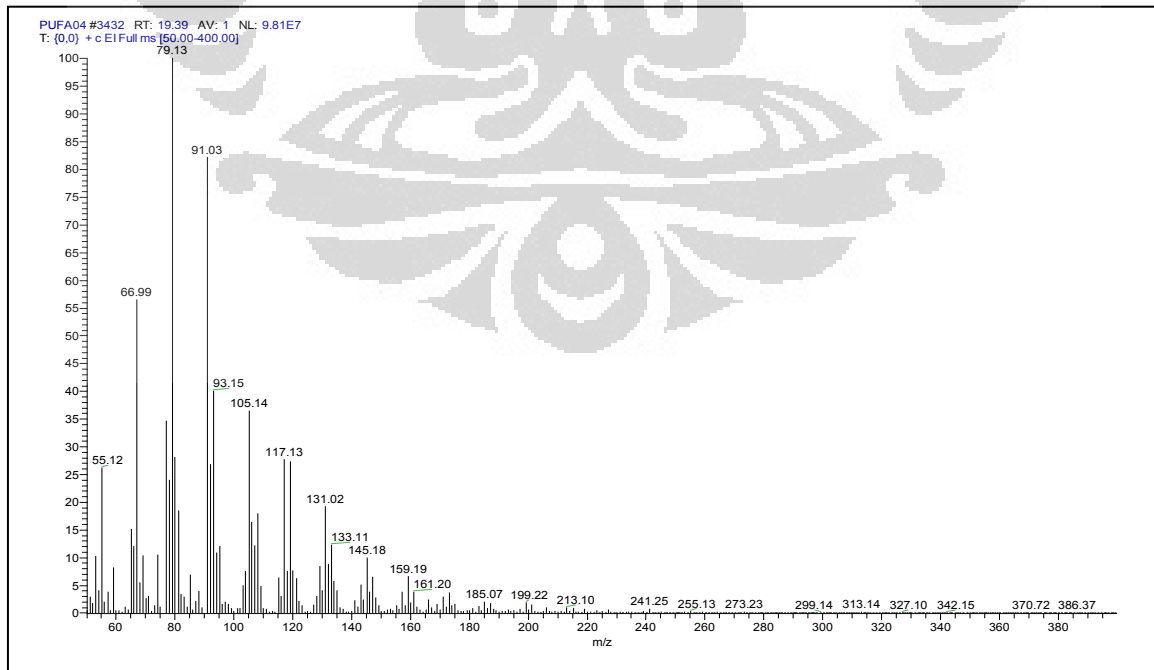
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-*Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 932.

Lampiran 12. Kromatogram LP-16

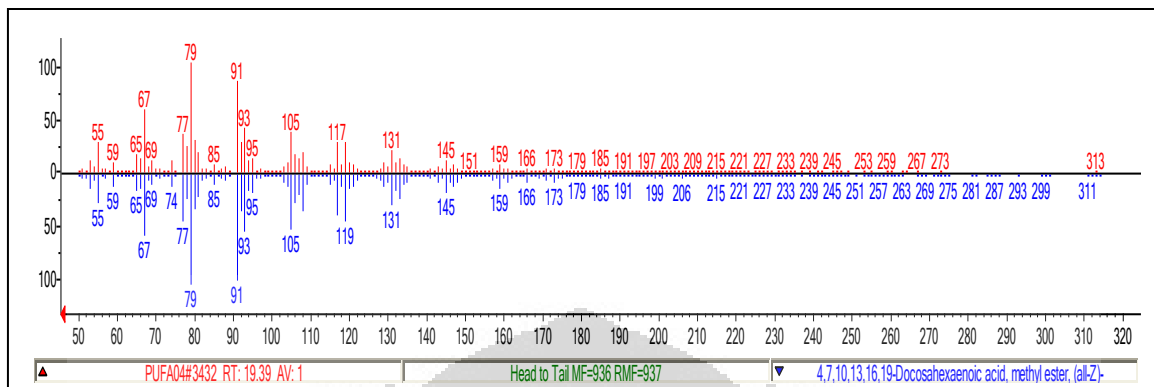


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,39.

Lampiran 13 Fragmentasi DHA LP-16

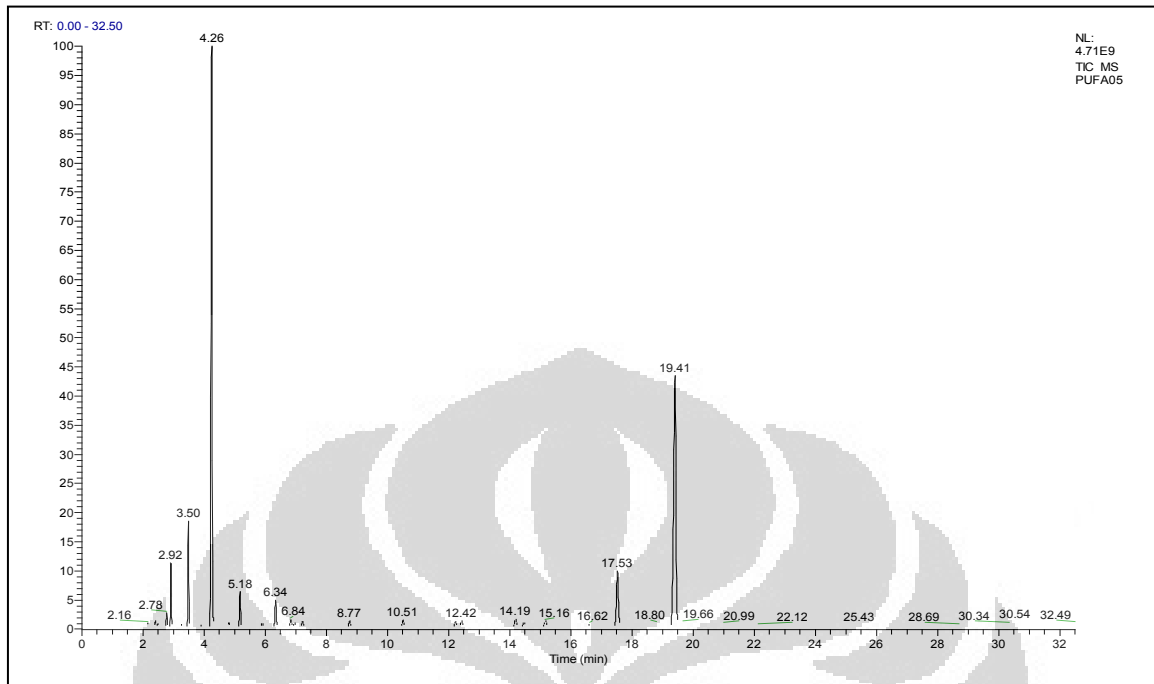


Lampiran 14. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-16 dengan DHA pada database NIST Library



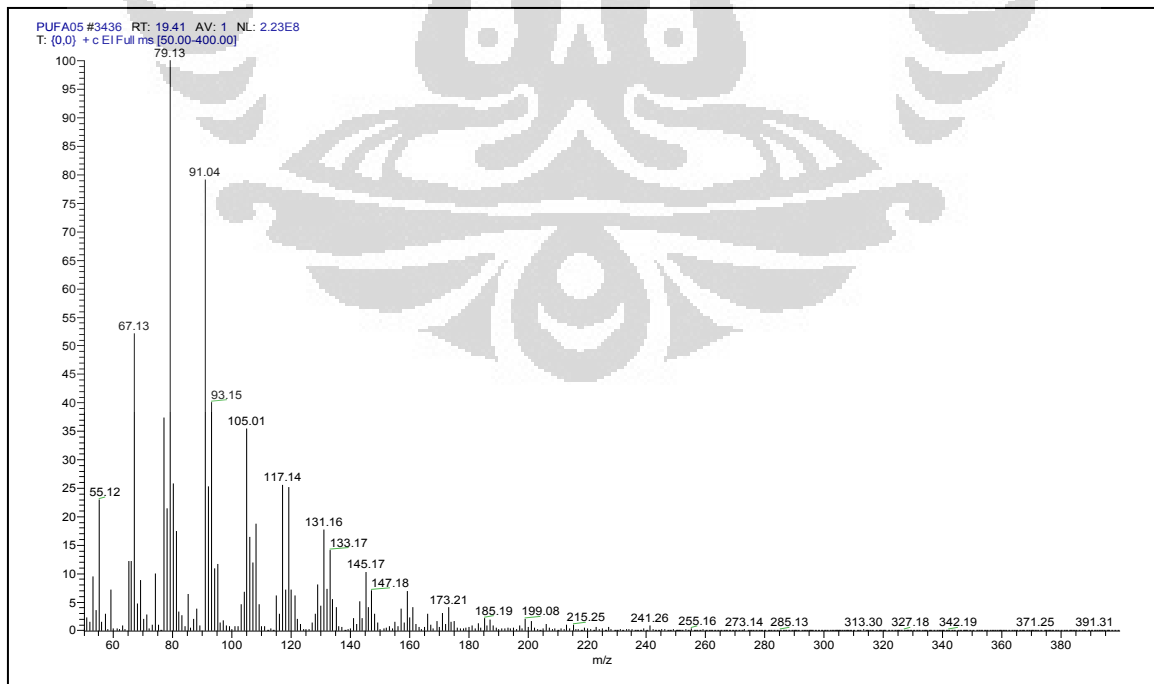
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 937.

Lampiran 15. Kromatogram LP-18

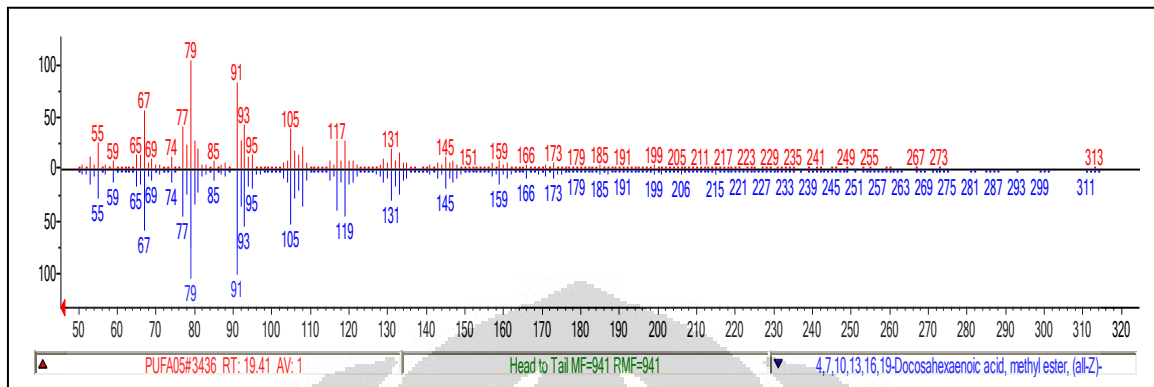


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,41.

Lampiran 16. Fragmentasi DHA LP-18

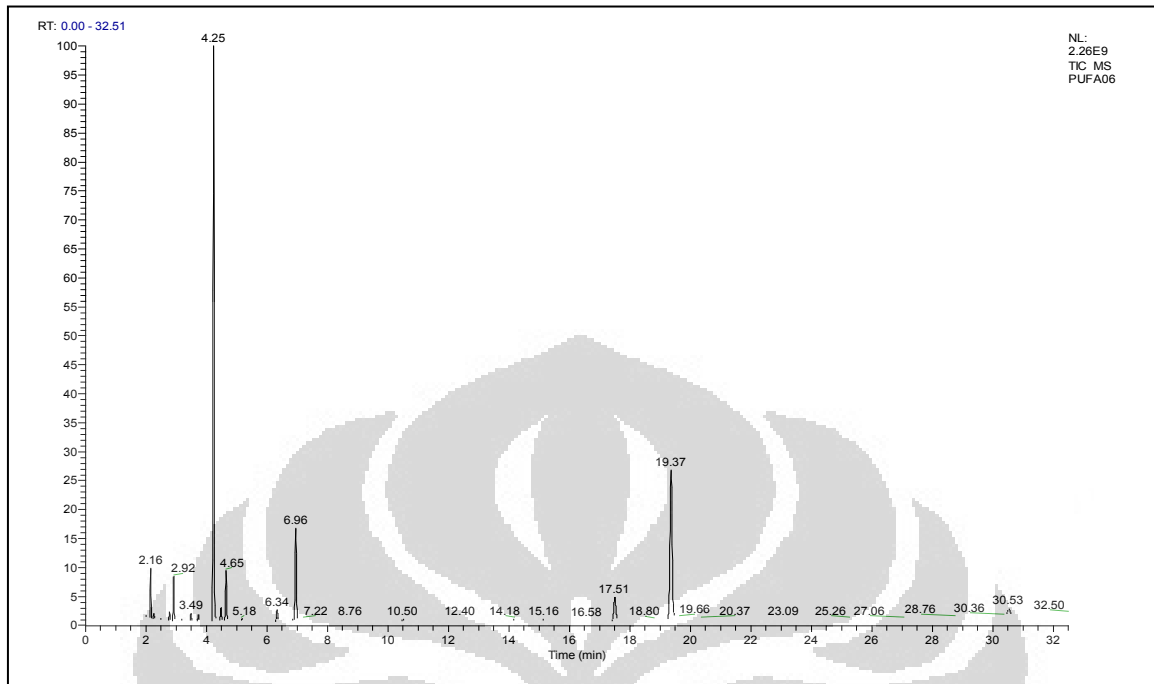


Lampiran 17. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-18 dengan DHA pada database NIST Library



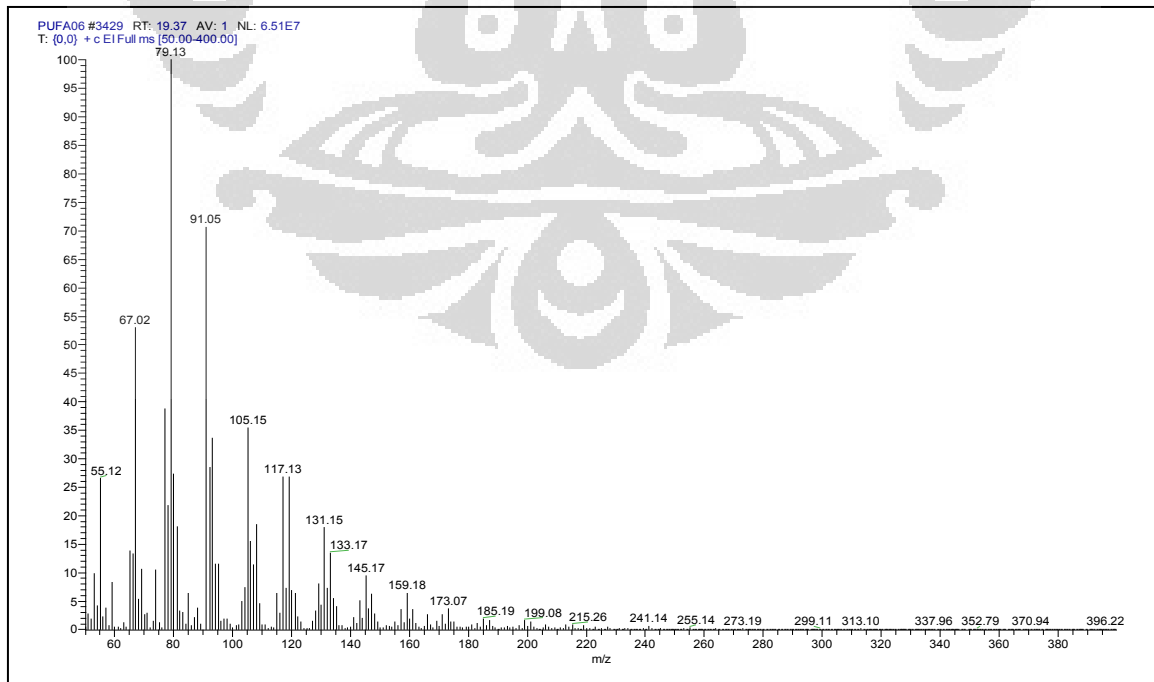
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 941.

Lampiran 18. Kromatogram LP-24

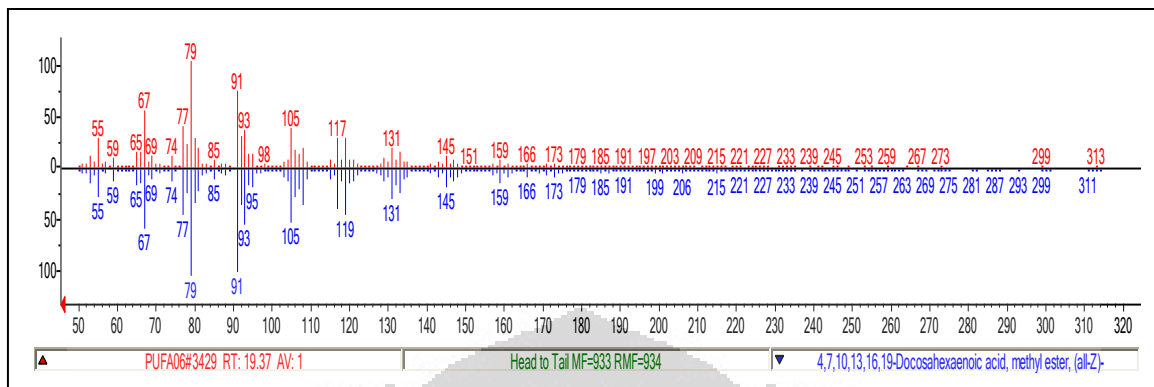


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,37.

Lampiran 19. Fragmentasi DHA LP-24

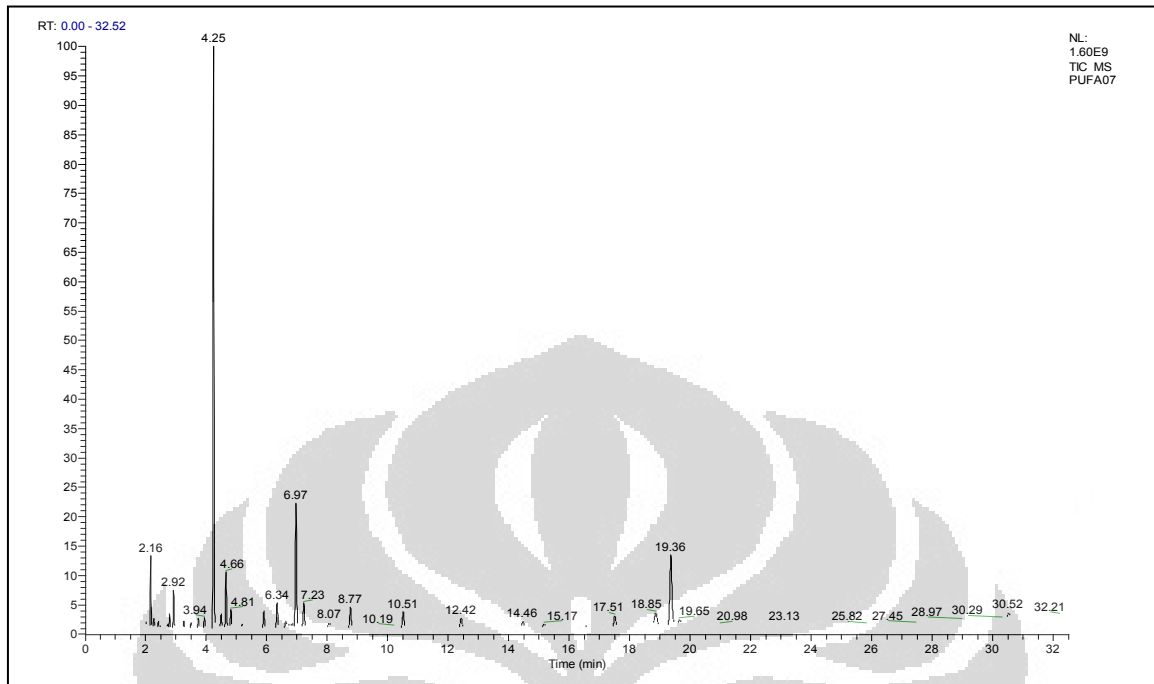


Lampiran 20. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-24 dengan DHA pada database NIST Library



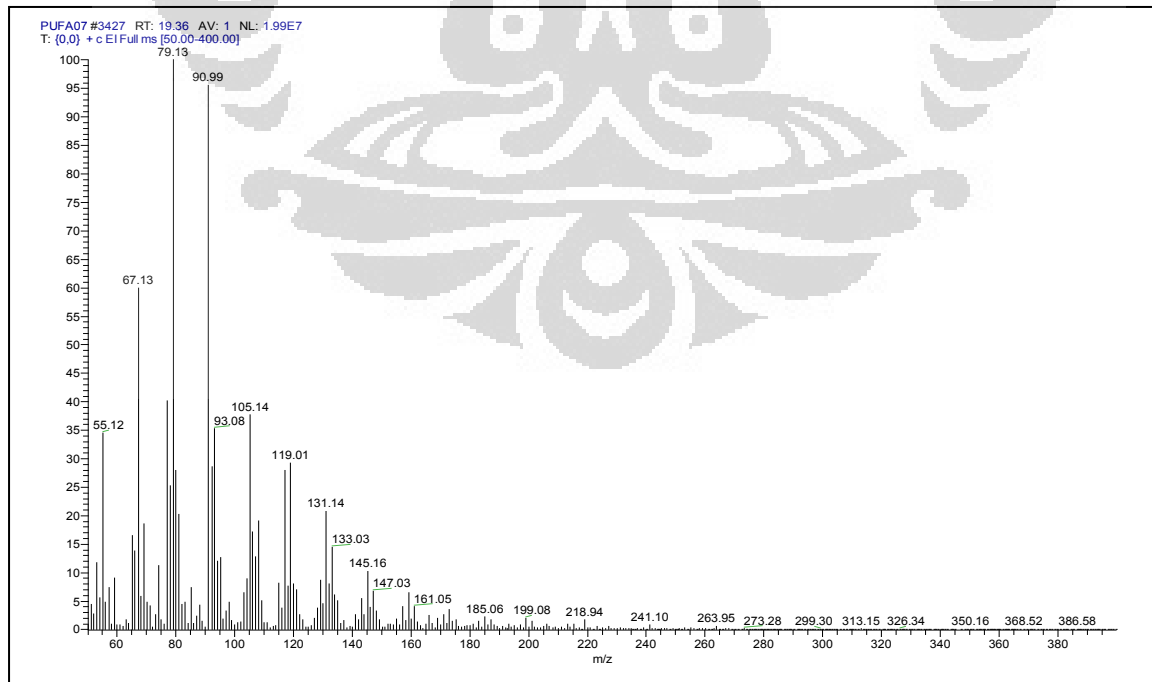
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 934.

Lampiran 21. Kromatogram LP-29

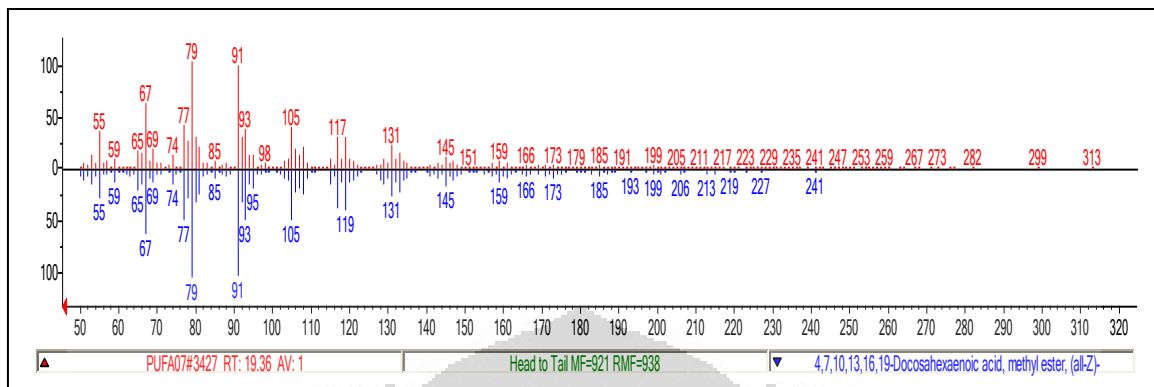


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,36.

Lampiran 22. Fragmentasi DHA LP-29

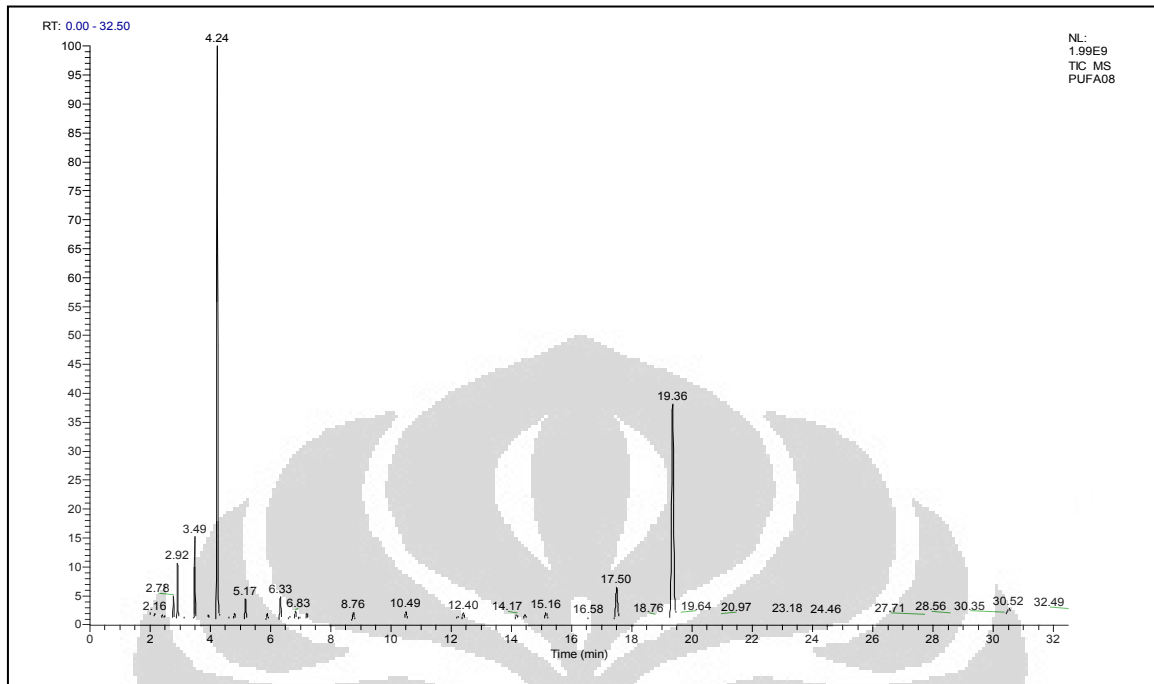


Lampiran 23. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-29 dengan DHA pada database NIST Library



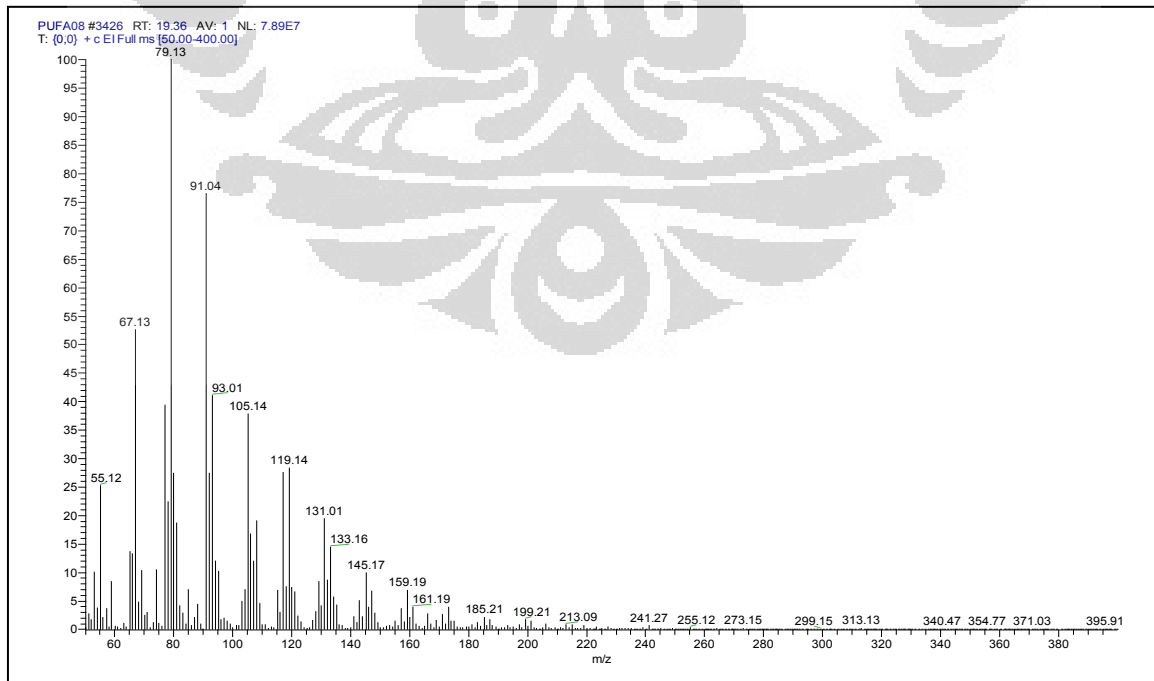
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 938.

Lampiran 24. Kromatogram LP-30

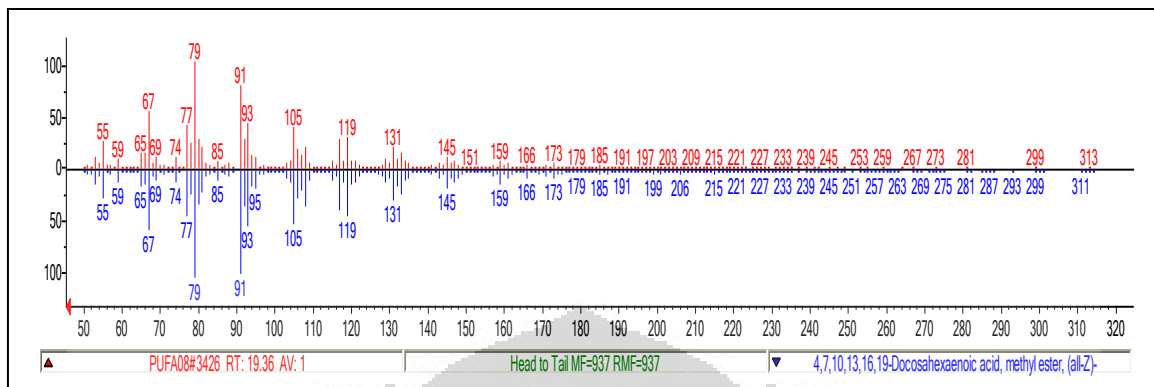


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,36.

Lampiran 25. Fragmentasi DHA LP-30

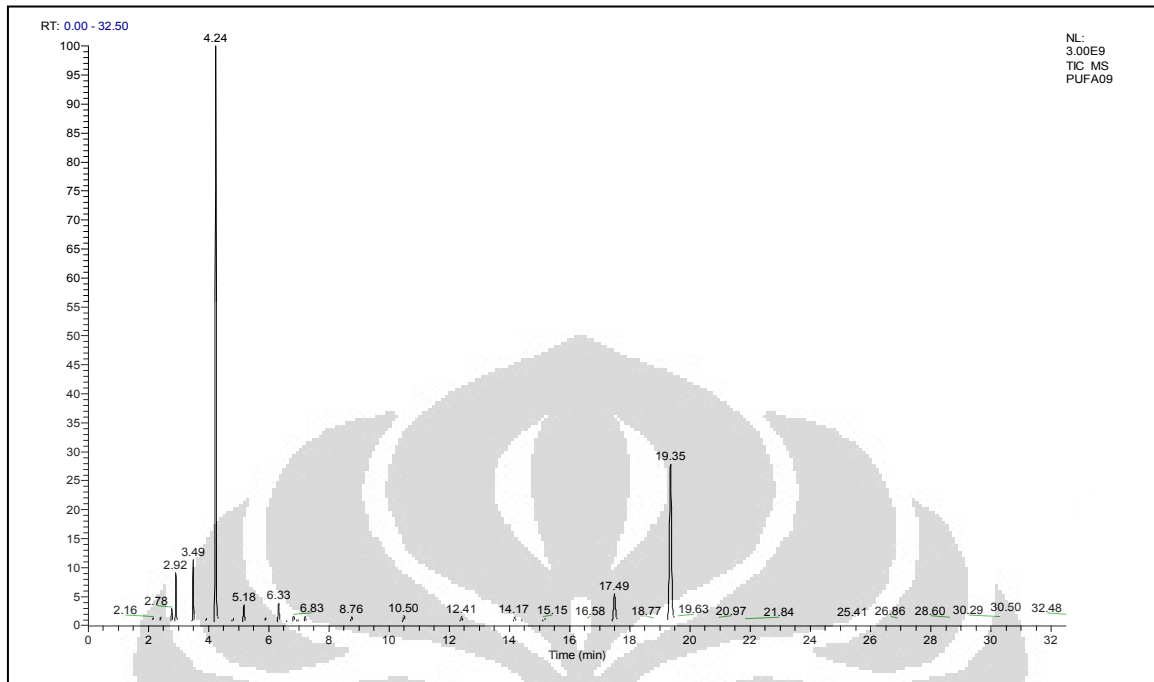


Lampiran 26. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-30 dengan DHA pada database NIST Library



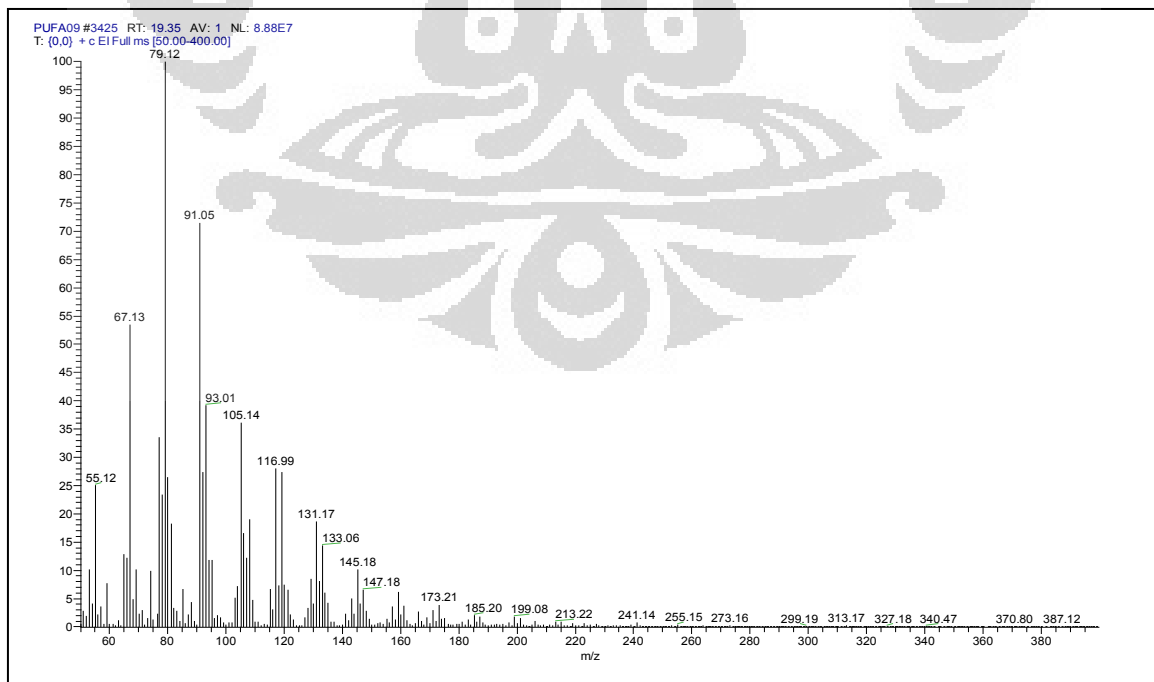
Keterangan : Fragmentasi Biru : *4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 937.

Lampiran 27. Kromatogram LP-31

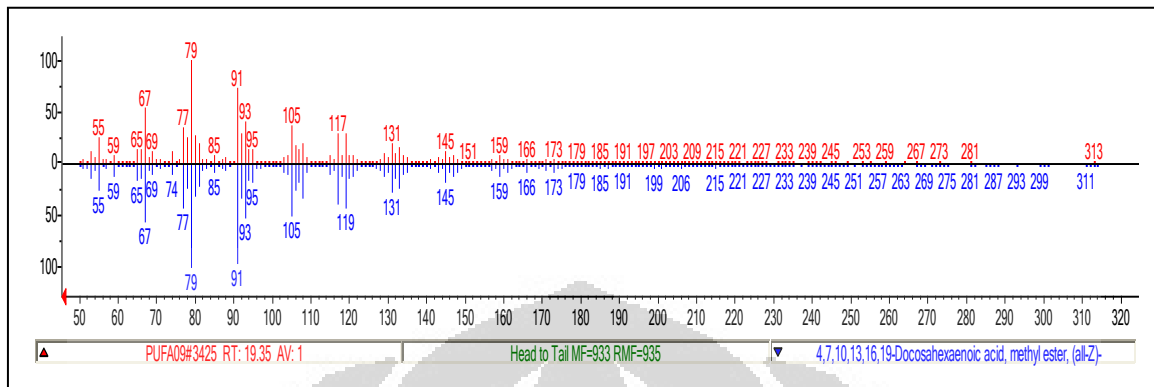


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,35.

Lampiran 28. Fragmentasi DHA LP-31

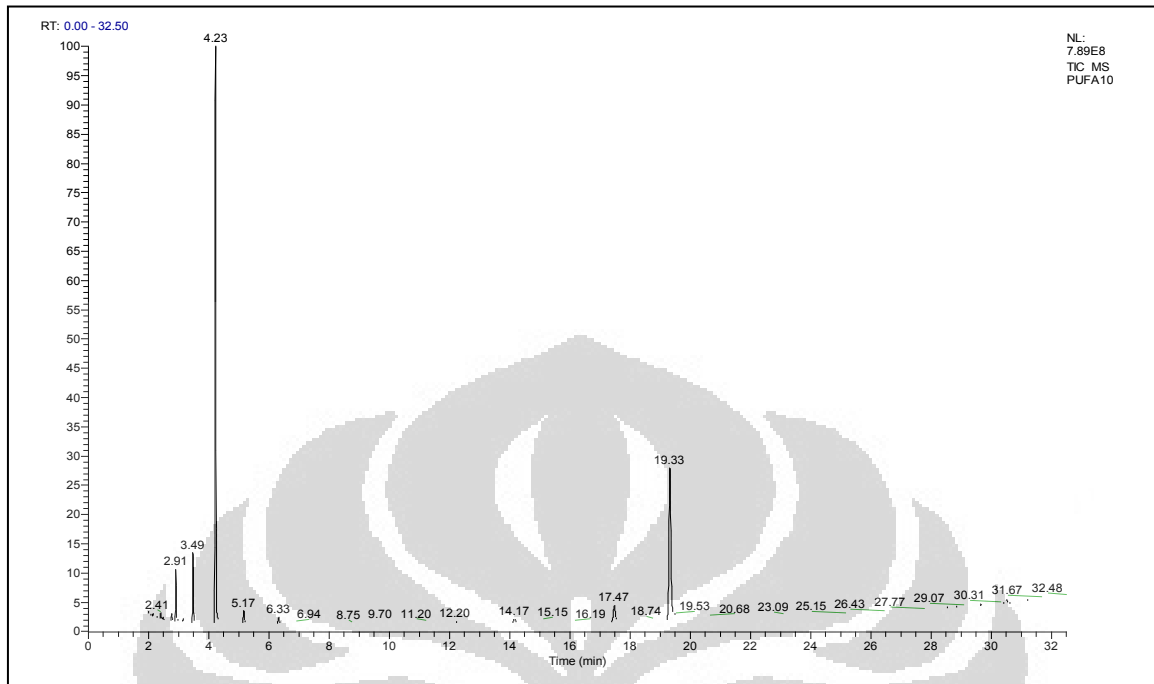


Lampiran 29. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-31 dengan DHA pada database NIST Library



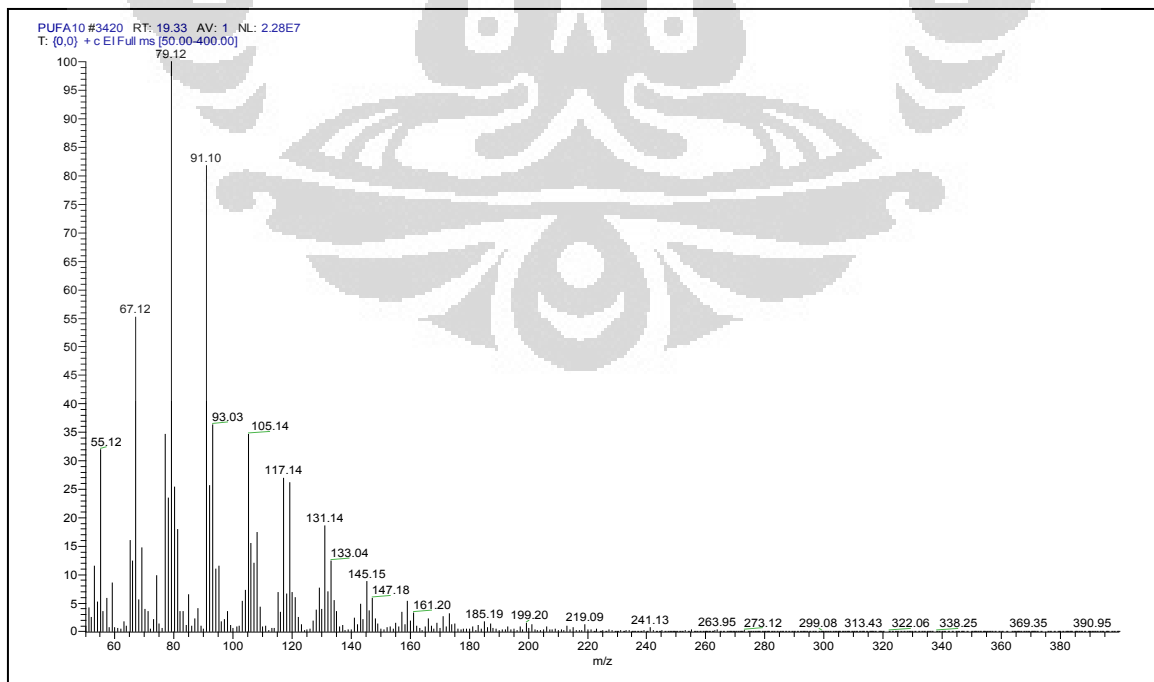
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 935.

Lampiran 30. Kromatogram LP-38

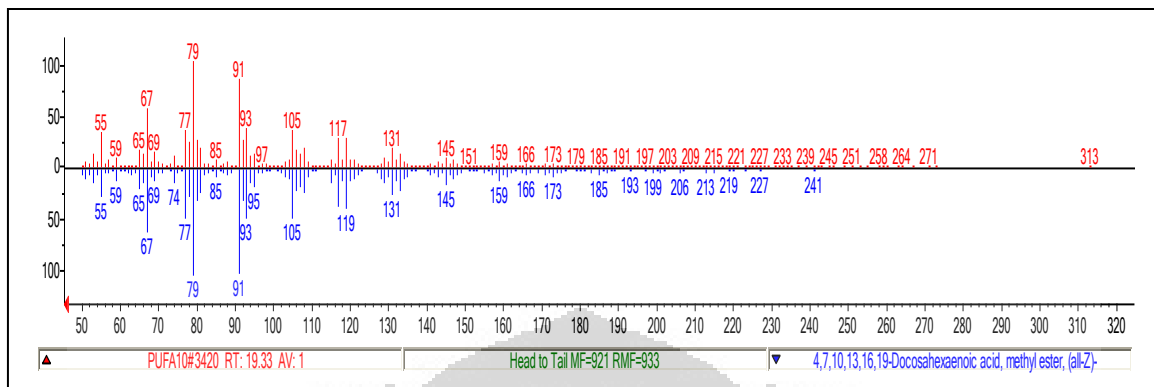


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,33.

Lampiran 31. Fragmentasi DHA LP-38

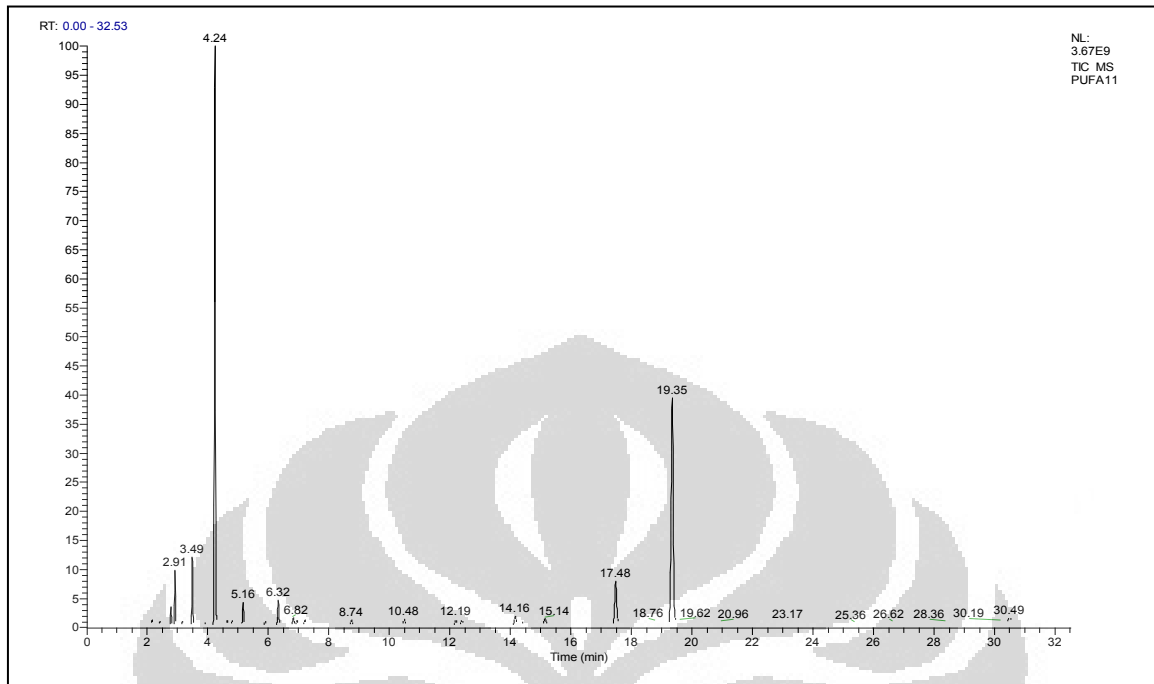


Lampiran 32. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-38 dengan DHA pada database NIST Library



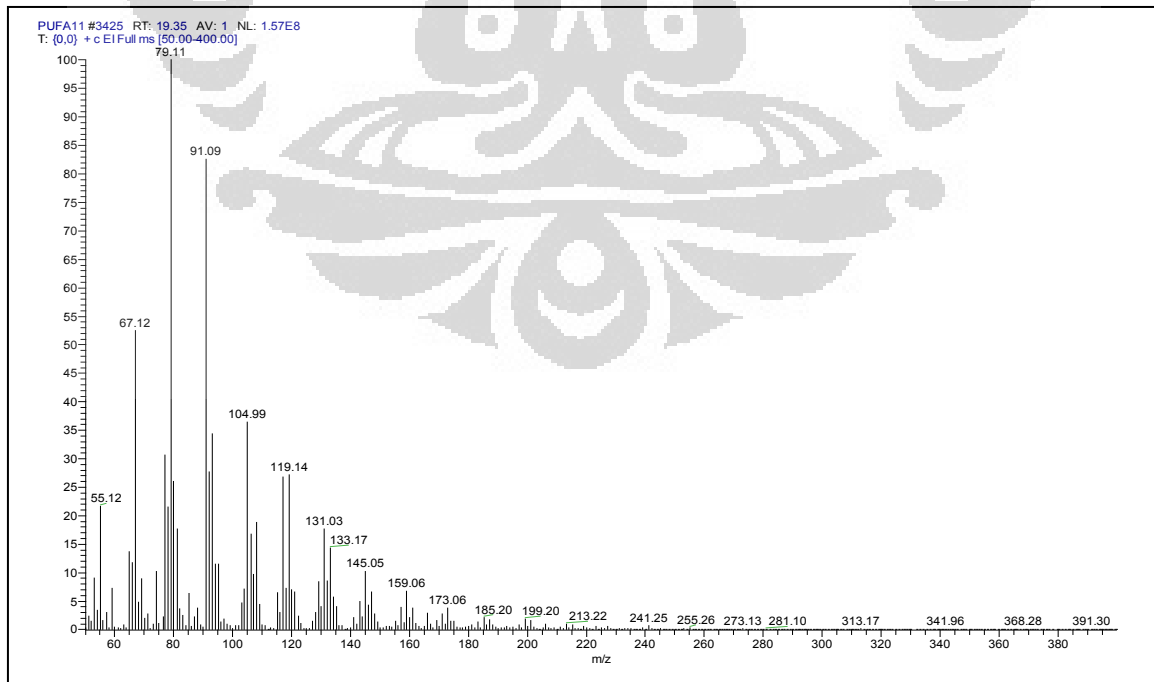
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 933.

Lampiran 33. Kromatogram LP-40

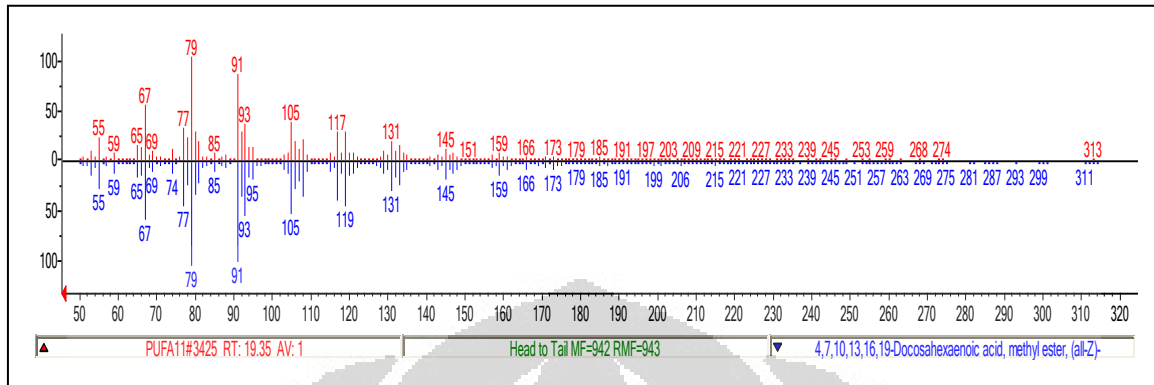


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,35.

Lampiran 34. Fragmentasi DHA LP-40

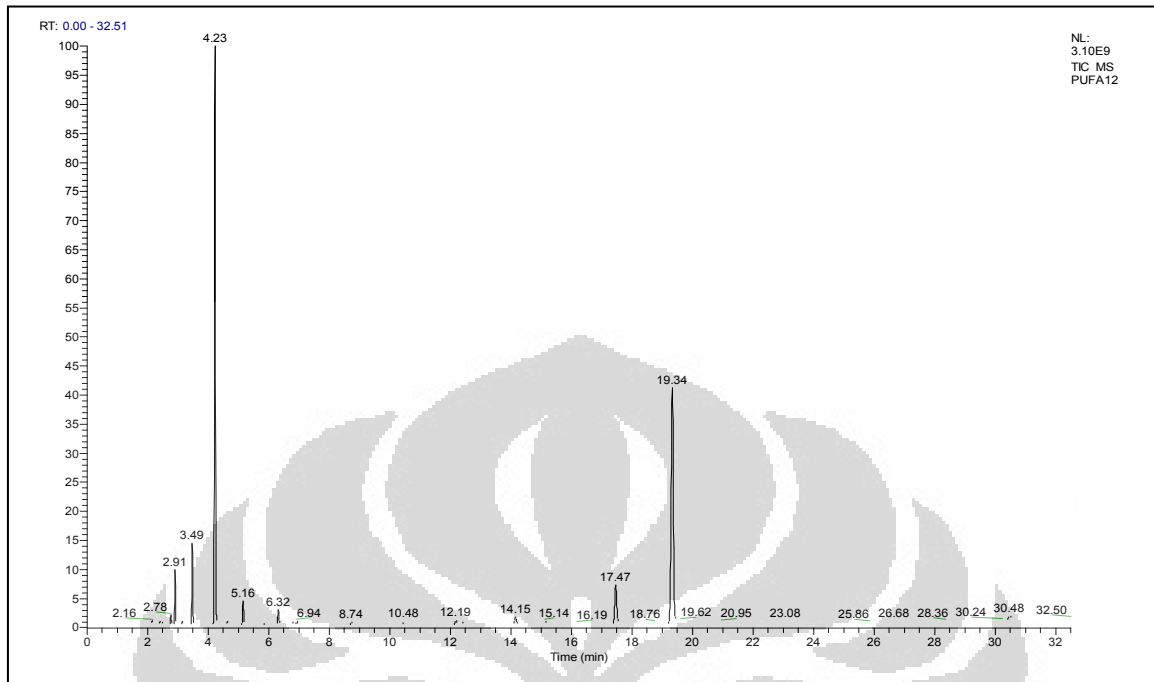


Lampiran 35. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-40 dengan DHA pada database
NIST Library



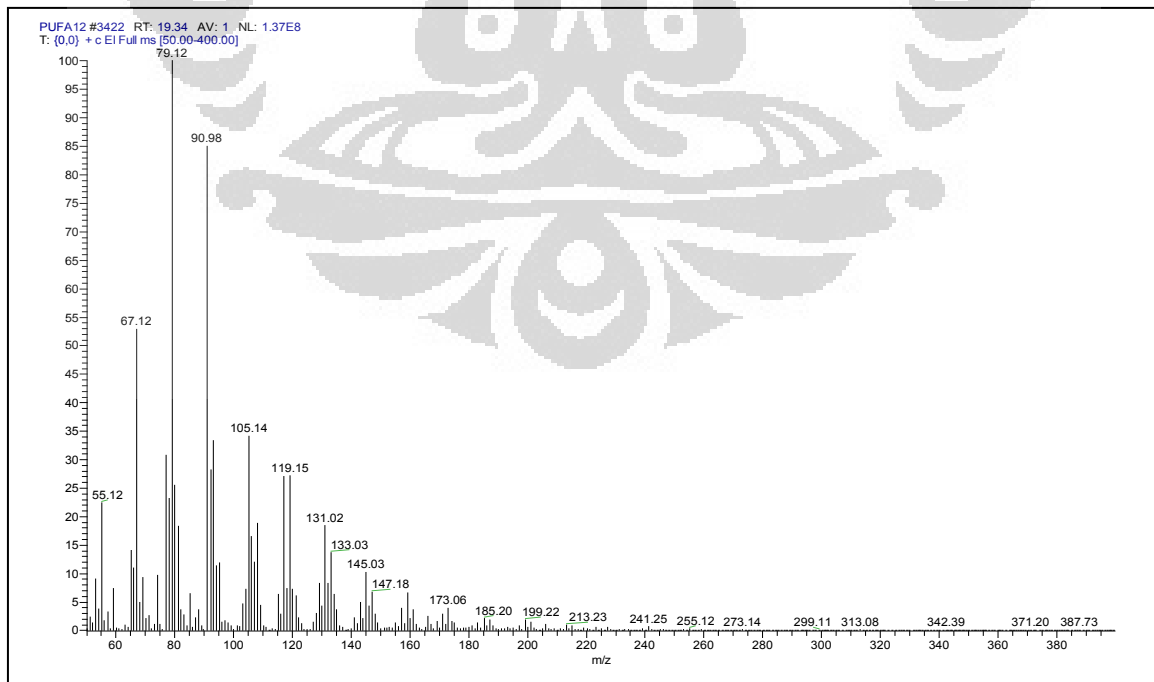
Keterangan : Fragmentasi Biru : *4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 943.

Lampiran 36. Kromatogram LP-41

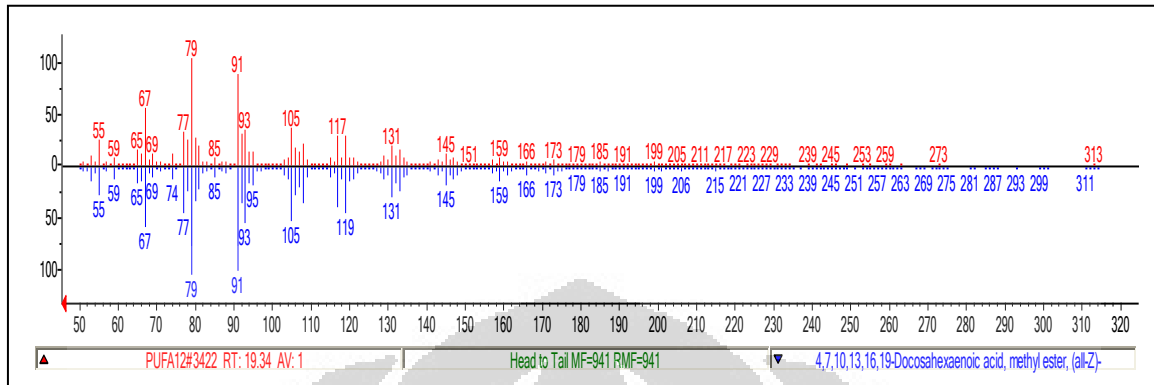


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,34.

Lampiran 37. Fragmentasi DHA LP-41

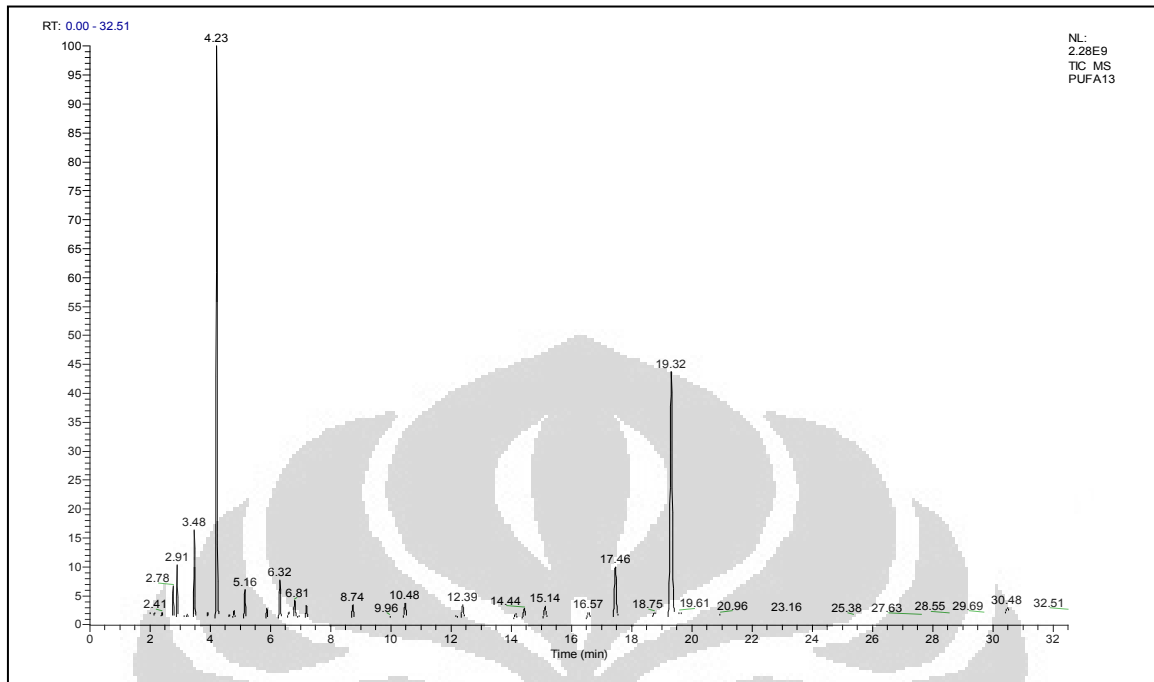


Lampiran 38. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-41 dengan DHA pada database NIST Library



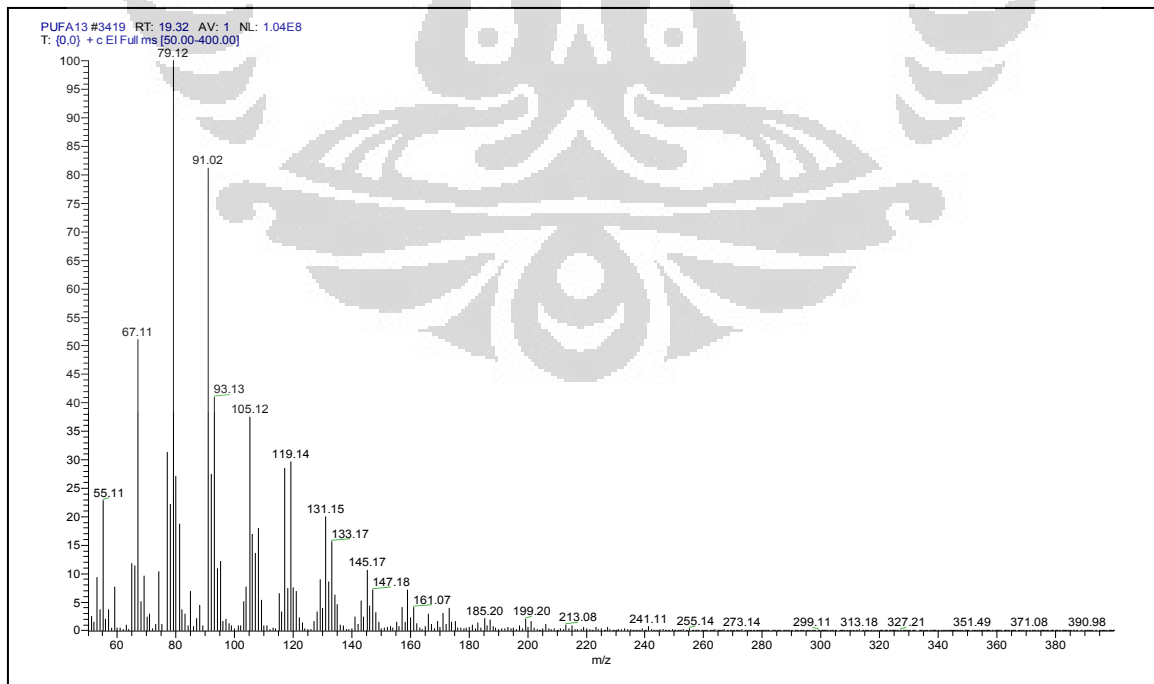
Keterangan : Fragmentasi Biru : *4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan dengan database sebesar 941.

Lampiran 39. Kromatogram LP-42

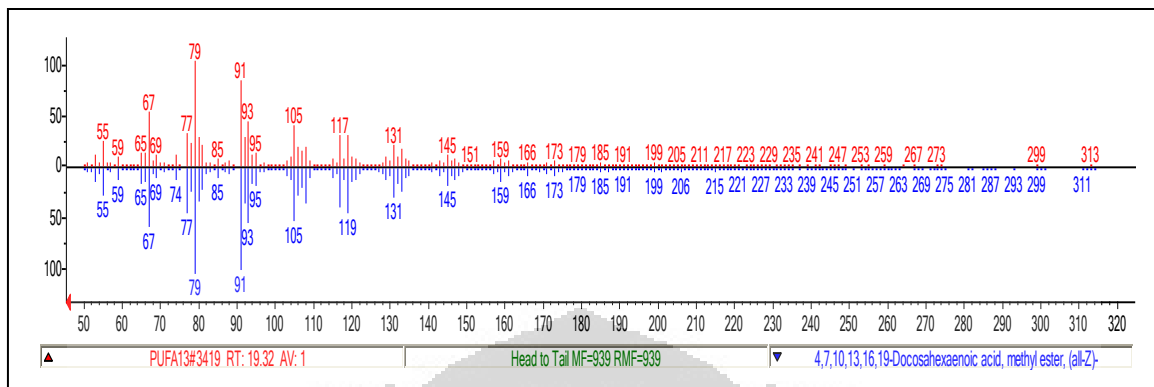


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,32.

Lampiran 40. Fragmentasi DHA LP-42

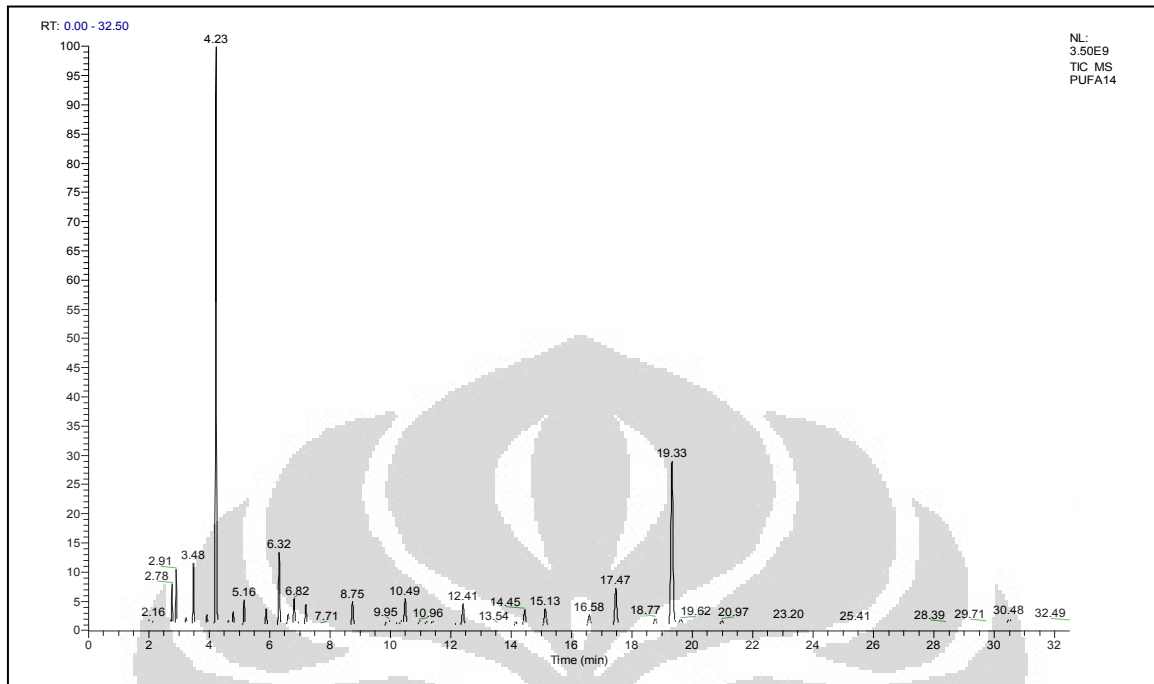


Lampiran 41. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-42 dengan DHA pada database NIST Library



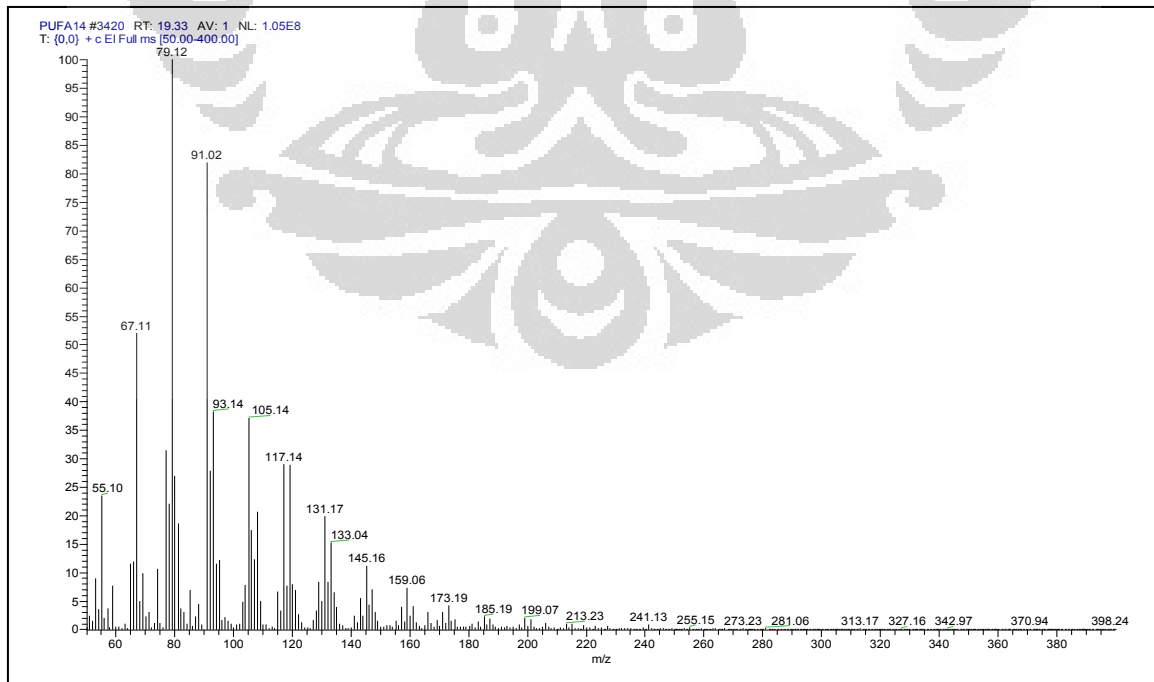
Keterangan : Fragmentasi Biru : *4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 939

Lampiran 42. Kromatogram LP-47

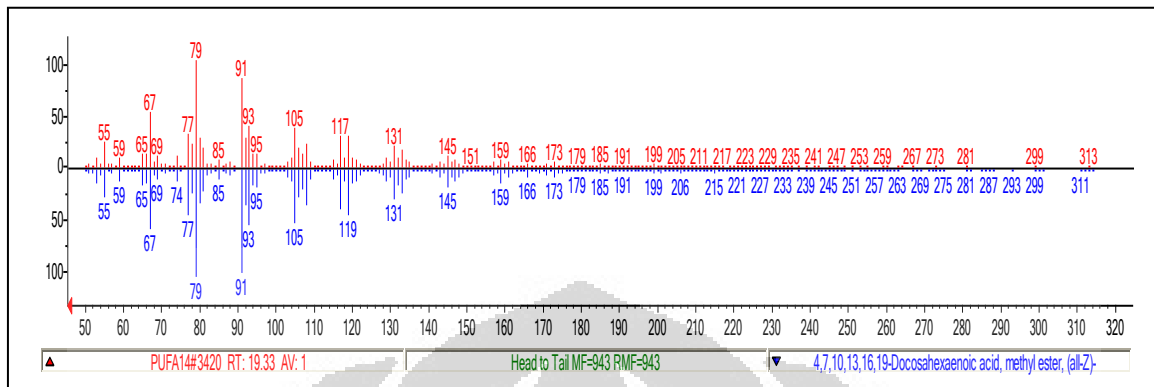


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,33.

Lampiran 43. Fragmentasi DHA LP-47

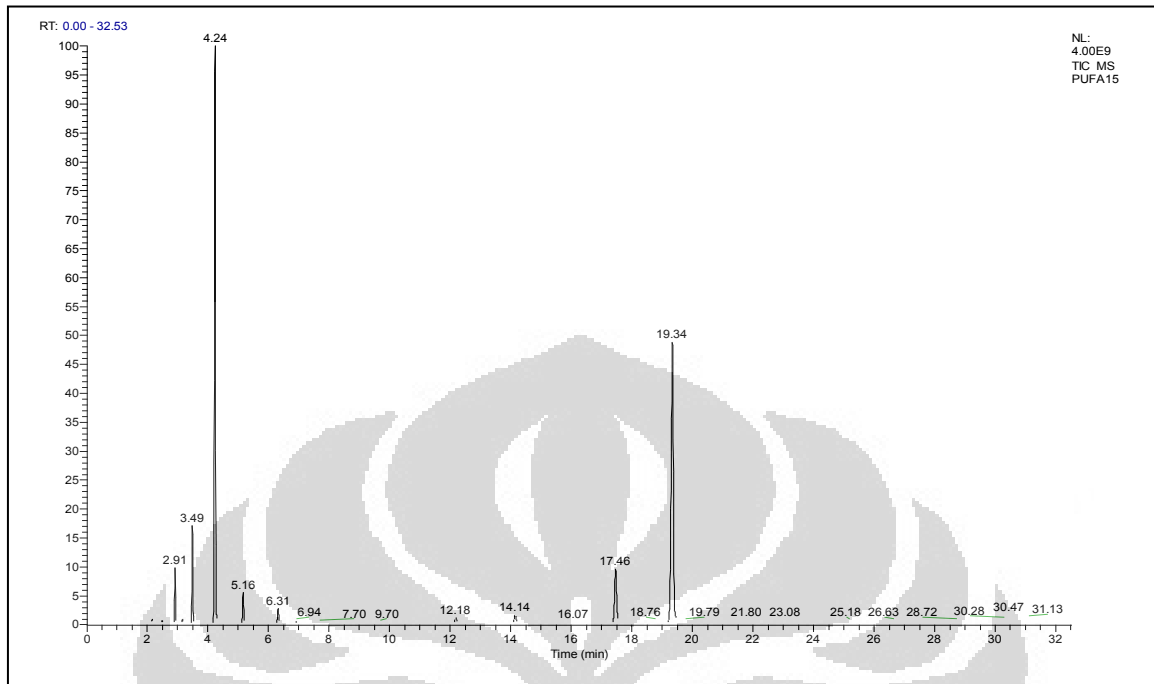


Lampiran 44. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-47 dengan DHA pada database NIST Library



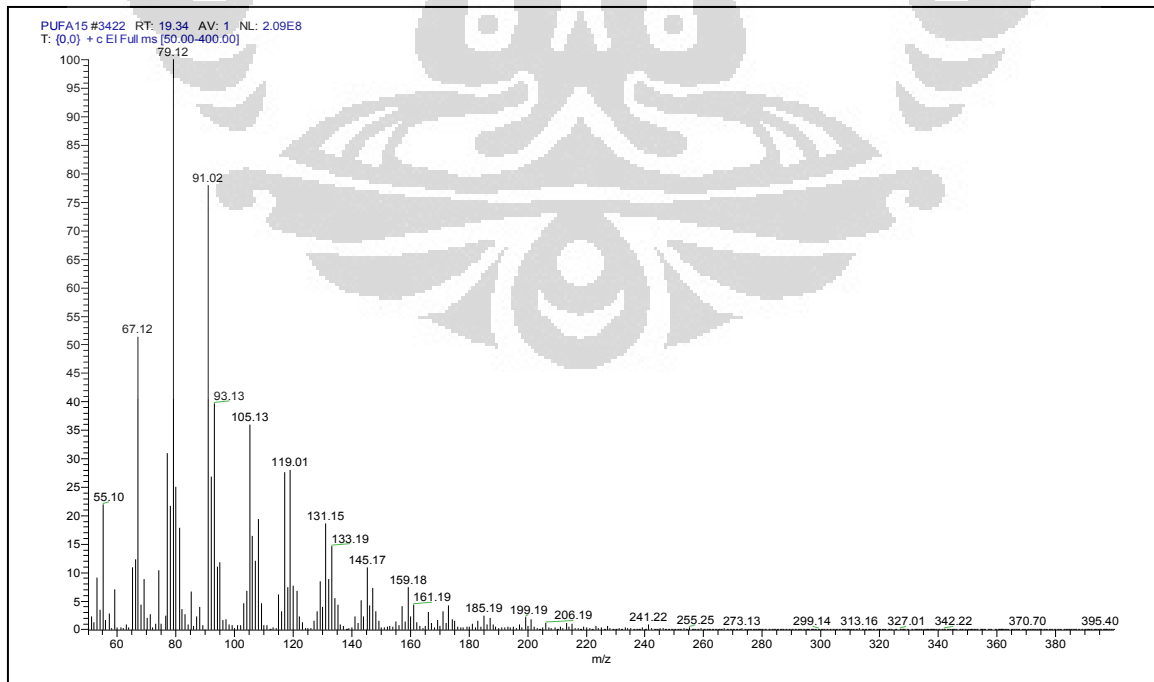
Keterangan : Fragmentasi Biru : *4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester* pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan sampel DHA dengan database sebesar 943.

Lampiran 45. Kromatogram LP-53

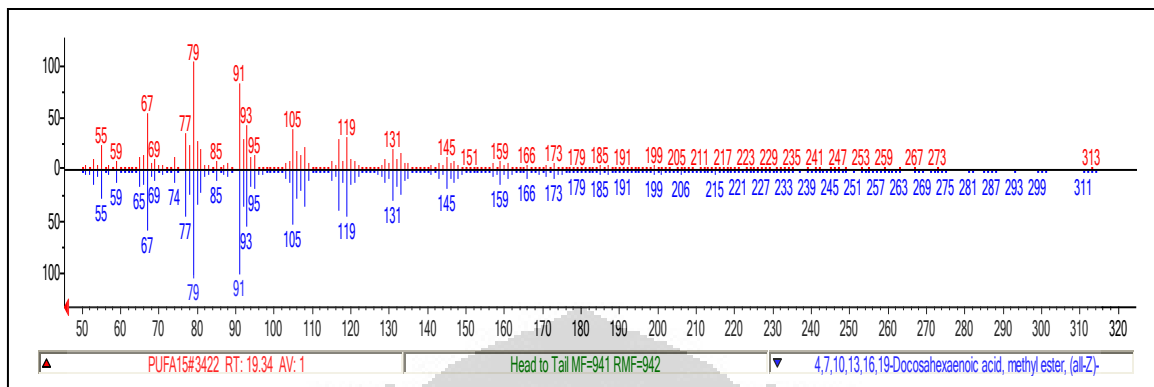


Keterangan : DHA pada sampel memiliki waktu retensi 19,34.

Lampiran 46. Fragmentasi DHA LP-53

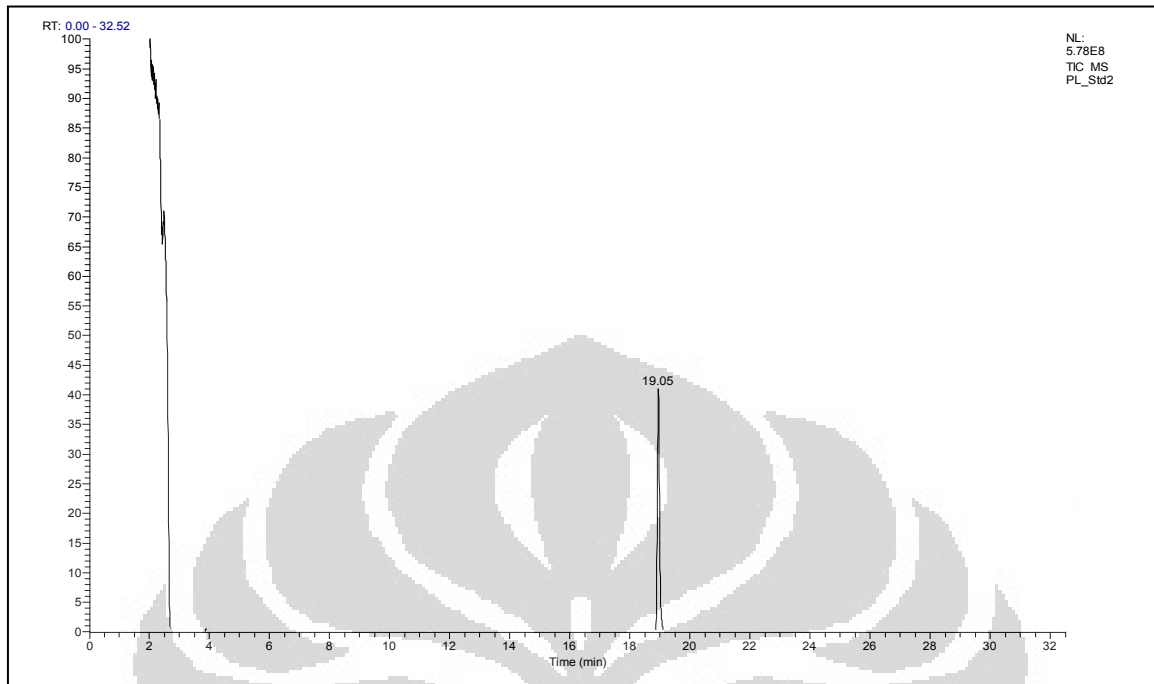


Lampiran 47. Perbandingan *head to tail* fragmentasi DHA LP-53 dengan DHA pada database NIST Library



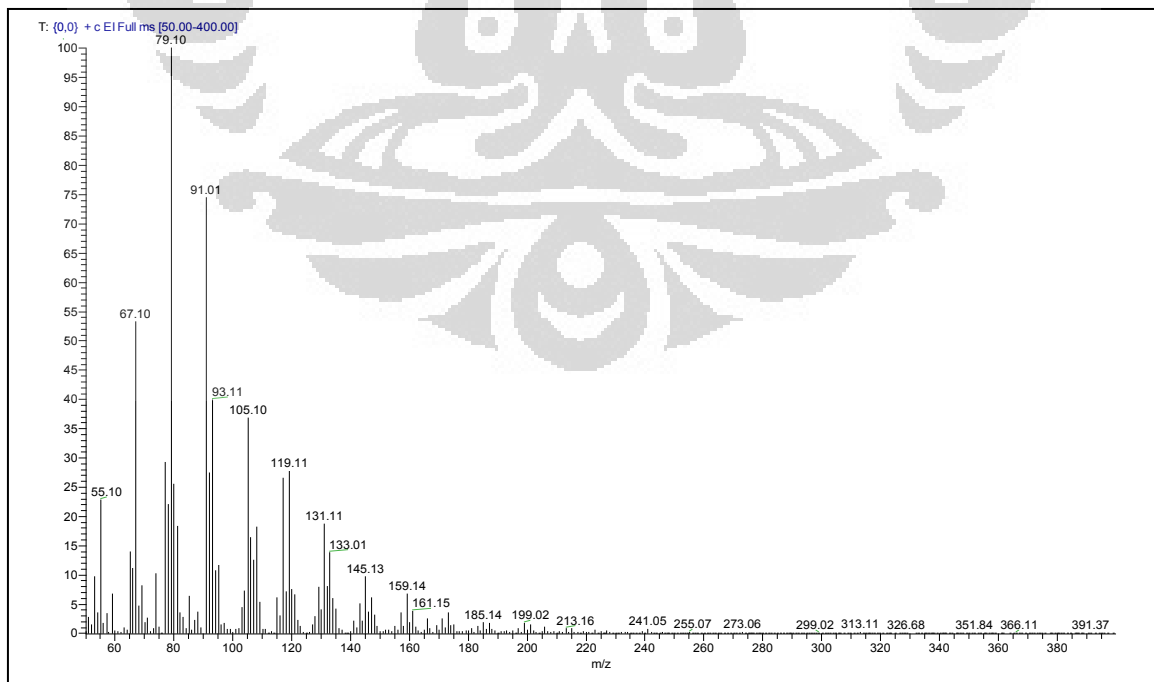
Keterangan : Fragmentasi Biru : 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : DHA pada sampel. Kualitas kemiripan DHA pada sampel dengan database sebesar 942.

Lampiran 48. Kromatogram standar DHA (blanko positif)

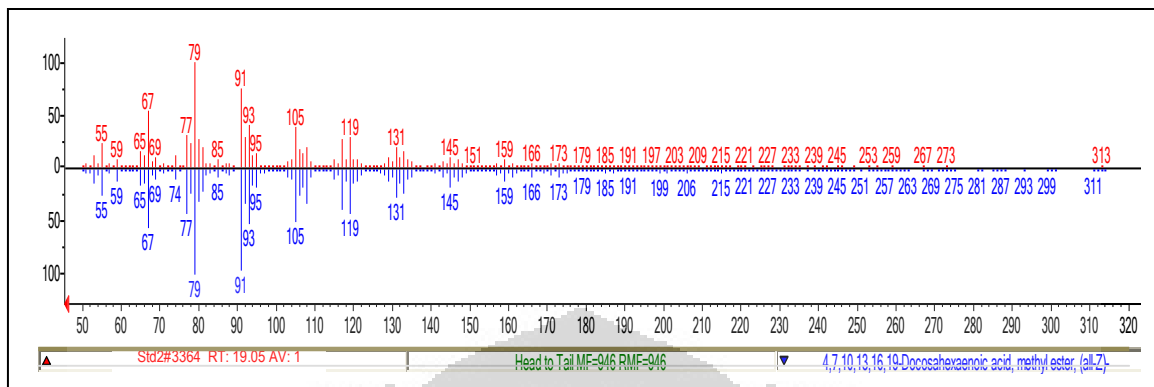


Keterangan : Standar DHA memiliki waktu retensi 19,05.

Lampiran 49. Fragmentasi standar DHA (blanko positif)



Lampiran 50. Perbandingan *head to tail* fragmentasi standar DHA dengan DHA pada database NIST Library



Keterangan : Fragmentasi Biru: 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl ester pada NIST Library; Fragmentasi Merah : Standar DHA. Kualitas kemiripan sampel DHA dengan database sebesar 946

Lampiran 51. Sertifikat analisis standar DHA (Sigma)

SIGMA-ALDRICH

Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 755 5459

Certificate of Analysis

Product Name: cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid,
298%

Product Number: D0534

Product Brand: SIGMA


Molecular Formula: C₂₂H₄₀O₂

Molecular Mass: 328.40

CAS Number: 6217-64-5

TEST	SPECIFICATION	LOT 049K1091 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS TO FAINT YELLOW	FAINT YELLOW
APPEARANCE (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
PURITY (GC)	298 %	99.6 %

QC RELEASE DATE 06/SEP/11


Edwina Schwizler, Manager
Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the Certificate of Analysis are the results determined at the time of analysis.

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis - Product D0534 Lot 049K1091 Page 1 of 1