

2. TINJAUAN PUSTAKA

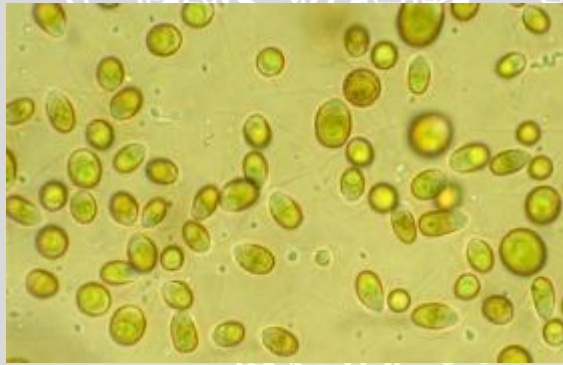
2.1 Mikroalga *Dunaliella* sp.

Mikroalga merupakan tumbuhan bersel tunggal, berkembang biak sangat cepat dengan daur hidup relatif pendek. Selain memiliki laju pertumbuhan yang sangat cepat, mikroalga juga memiliki senyawa metabolit yang dapat dijadikan sebagai alternatif pangan yang dapat bersaing dengan produk pertanian dalam mengatasi lahan yang semakin terbatas (Panggabean, 1998). Mikroalga dapat tumbuh jauh lebih cepat dengan hanya membutuhkan media tumbuh yang lebih sedikit (Widjaja, 2009). Mikroalga biasanya menggandakan dirinya sekitar 24 jam sekali, namun pada fase eksponensial biasanya lebih singkat yaitu hanya 3,5 jam sekali (Darsi *et al.*, 2012). Kebanyakan spesies mikroalga menghasilkan produk yang khas seperti karotenoid, asam lemak, polisakarida (Chen *et al.*, 2013). *Dunaliella* sp. merupakan contoh mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan terutama sebagai sumber karotenoid.

Dunaliella merupakan alga hijau penghasil pigmen karotenoid dalam jumlah yang besar yaitu sampai beberapa ratus milligram per gram berat kering sel. *Dunaliella* menghasilkan karotenoid β -karoten. *Dunaliella* biasa dijumpai pada habitat berkadar garam tinggi sampai 300 ppt melebihi konsentrasi garam di laut yang normalnya 35 ppt. Algae ini juga mampu hidup pada konsentrasi garam 2–5 M dengan menggunakan gliserol yang merupakan produk fotosintetik utamanya, sebagai larutan osmoregulator internal terhadap lingkungan luar yang berkadar garam tinggi (Chen *et al.*, 2011). Mikroalga *Dunaliella* memiliki dinding sel yang berukuran (9-11 μm) (Abusara *et al.*, 2011), tidak memiliki vakuola kontraktil kecuali mereka yang ditumbuhkan pada konsentrasi garam rendah dan ada yang memiliki ataupun tidak memiliki stigmata tempat pembentukan pigmen

merah β -karoten. Pigmen muncul bila *Dunaliella* ditumbuhkan pada konsentrasi garam dan cahaya tinggi (Vo dan Tranc, 2014), dengan pH, konsentrasi nitrogen rendah (Saha *et al*, 2013). *Dunaliella* dapat mengakumulasi jumlah karotenoid yang tinggi yaitu dapat mencapai 12,6% dari berat kering, termasuk β -karoten (60,4% dari total karatenoid), ketika dibudidayakan dibawah kondisi stres salinitas dan dikombinasikan dengan tingkat nitrogen rendah. (El-Baky *et al.*, 2007). Berikut ini adalah klasifikasi *dunaliella* sp. menurut Oren (2005):

Kingdom : Plantae
Filum : Chlorophyta
Kelas : Chlorophyceae
Order : Volvocales
Family : Dunaliellaceae
Genus : *Dunaliella*
Spesies : *Dunaliella* sp.



Gambar 1. *Dunaliella* sp (Google image, 2015)

Berikut ini disajikan kandungan nutrisi yang terdapat pada mikroalga *Dunaliella salina* :

Tabel 1. Kandungan Nutrisi *Dunaliella salina*

Parameter		
1.	Bobot Kering (g. L ⁻¹)	3,29
2.	Kadar air (%)	15,58
3.	Kadar abu (%)	58,29
4.	Kadar protein (% BK)	17,08
5.	Kadar lemak (% bk)	0,003
6.	Kadar karbohidrat total (%bk)	15,07
7.	Total karoten (ppm)	0,19
8.	Asam amno (% w/w bk)	
-	Asam aspartat	0,73
-	Asam glutamat	0,73
-	Serin	0,37
-	Histidin	0,07
-	Glisin	0,39
-	Threonin	0,29
-	Arginin	0,33
-	Alanin	0,46
-	Tirosin	0,21
-	Metionin	0,06
-	Valin	0,37
-	Fenilalanin	0,32
-	Isoleusin	0,29
-	Leusin	0,45
-	Lisin	0,25
-	Prolin	Tidak terdeteksi

Sumber : Darsi *et al.*, (2012)

2.1.1 Kultivasi Mikroalga *Dunaliella sp.*

Kultur mikroalga adalah suatu proses penumbuhan mikroalga dengan berbagai skala dan dengan pengkodisian yang terkontrol dan aseptik. Beberapa pengkondisian perlu dilakukan seperti faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi kadar beta karoten mikroalga *Dunaliella sp.* adalah faktor abiotik (cahaya matahari, temperatur, nutrisi, O₂, CO₂, pH, salinitas) kemudian faktor biotik (bakteri, jamur, virus, dan kompetisi dengan mikroalga lain), serta faktor teknik cara pemanenan (Handayani 2012). Pemilihan media yang sesuai untuk laju pertumbuhan mikroalga, nutrisi yang diperlukan mikroalga untuk tumbuh dan juga faktor biaya yang perlu diperhatikan dalam penumbuhan mikroalga (Mulyanto, 2010). Kultur *Dunaliella sp.* dapat dilakukan dengan mudah dan dengan menggunakan alat yang sederhana, dilakukan dengan beberapa

tahapan diantaranya adalah tahapan kultur laboratorium, kultur intermediete, dan kultur masal (Balai Perikanan dan Budidaya Air Payau, 2015).

2.1.2 Kultur laboratorium

Kultur agar atau kultur di *plate/petridish* dilakukan tanpa aerasi. Kultur agar diawali dengan sterilisasi alat dan pembuatan media agar yang sudah diberi pupuk PA (*Pro Analis*) kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* kemudian dituang ke *petridish* steril $\frac{3}{4}$ bagian. Setelah media agar membeku dilakukan inokulasi menggunakan metode gores. *Dunnaliella* sp. yang ditanam akan tumbuh setelah satu minggu. Selanjutnya dilakukan kultur test tube tanpa menggunakan aerasi.

Kultur test tube tanpa menggunakan aerasi dilakukan dengan memindahkan koloni mikroalga yang telah tumbuh ke kultur *testube*, yaitu dengan memupuk media steril dengan dosis 1ml/liter. Pupuk yang digunakan adalah pupuk PA. *Dunnaliella* sp. menggunakan pupuk walne. Sebelum melakukan kultur terlebih dahulu diambil satu koloni dari media agar dan diberi air laut steril kemudian dicek di bawah mikroskop, apabila steril tidak ada kontaminasi maka dikultur di *test tube*. Sebuah *test tube* diberi media air laut steril yang sudah dipupuk $\frac{3}{4}$ bagian kemudian ditambahkan dengan bibit satu koloni. Mikroalga akan tumbuh minimal 7 hari. Hasil kultur *test tube* selanjutnya dapat dijadikan bibit (*starter*) pada kultur erlenmeyer tanpa aerasi yaitu dengan menyiapkan media air laut yang sudah dipupuk dengan dosis 1 ml/liter kemudian ditambahkan bibit *Dunnaliella* sp. dengan lama kultur 6-7 hari. Selanjutnya dilakukan kultur erlenmeyer dengan menggunakan aerasi.

Kultur erlenmeyer skala 1-2 liter dengan menggunakan toples dilakukan dengan menggunakan aerasi. Kultur ini dilakukan dengan sterilisasi media pertumbuhan mikroalga dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat. Setelah media air laut dingin, kemudian

dilengkapi dengan peralatan aerasi dan dipupuk dengan dosis 1 ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3:7. Suhu media pertumbuhan mikroalga dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 Watt sebanyak dua buah serta diinkubasi selama 5 – 7 hari. Selanjutnya dilakukan kultur carboy dengan menggunakan aerasi.

Kultur carboy/stoples 10 liter menggunakan aerasi dilakukan dengan sterilisasi media pertumbuhan mikroalga dengan menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat ≤ 5 ppm. Setelah media pertumbuhan netral, kemudian media dipupuk dengan dosis 1 ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3:7. Suhu media pertumbuhan mikroalga dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 Watt sebanyak dua buah serta diinkubasi selama 5 – 7 hari. Selanjutnya hasil dari kultur carboy digunakan untuk starter pada kultur intermediet.

2.1.3 Kultur intermediet

Kultur intermediet adalah kultur dengan aquarium 100 liter dan kultur conicel 500 liter-1 ton dilakukan dengan sterilisasi air laut menggunakan kaporit 10 ppm selama 24 jam dan dinetralkan dengan thiosulfat 5ppm. Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk walne TG (*Technical Growth*) dengan dosis 1 ml/l. Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3:7. Kultur dilakukan pada ruangan *outdoor* dengan atap fiber tembus cahaya matahari dan lama inkubasi 5-7 hari. Hasil dari kultur intermediet ini kemudian dapat dikeringkan dan dibuat untuk tepung mikroalga.

2.1.4 Pemanenan Mikroalga

Teknik yang dapat digunakan untuk proses pemanenan mikroalga meliputi flokulasi, sentrifugasi, dan filtrasi. Flokulasi merupakan proses partikel zat terlarut dalam larutan membentuk agregat yang disebut flok. Sel mikroalga

umumnya berukuran 5-50 μ m. Sel mikroalga dapat membentuk suspensi cukup stabil dengan bahan kimia yang memiliki muatan negatif pada permukaannya. Sentrifugasi merupakan proses pemisahan yang menggunakan gaya sentrifugal sebagai driving force untuk memisahkan padatan dan cairan. Proses pemisahan tersebut didasarkan pada ukuran partikel dan perbedaan densitas dari komponen yang akan dipisahkan. Filtrasi merupakan proses pemanenan mikroalga dengan ukuran sel yang besar. Proses ini tidak cocok digunakan untuk pemanenan mikroalga yang memiliki ukuran sel yang kecil. Untuk proses pemanenan *Dunaliella* sp. sendiri dilakukan dengan menggunakan kain saring dan dengan mengurangi asupan CO₂. Proses ini dilakukan karena lebih murah untuk digunakan dalam skala besar (Handayani dan Dessy, 2012). Selanjutnya hasil dari pemanenan mikroalga tersebut dikeringkan dan dibuat tepung mikroalga.

Pembuatan *Dunaliella* sp. powder dilakukan dengan cara memanen mikroalga dengan cara penyaringan. Setelah disaring diletakkan ke nampan untuk dikeringkan menggunakan oven (suhu 40^oC) atau diangin-anginkan (tidak boleh terkena matahari langsung). Setelah dikeringkan diblender dan diayak (60 mesh partikel powder mikroalga).

2.2 N-heksan

Senyawa-senyawa non-polar yang terkandung dalam sampel dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut yang bersifat nonpolar pula, salah satunya adalah n-heksan. Pelarut n-heksan merupakan salah satu pelarut yang baik untuk mengekstraksi senyawasenyawa yang bersifat non-polar karena memiliki beberapa keunggulan, diantaranya karena pelarut ini bersifat relatif stabil, mudah menguap serta selektif dalam melarutkan zat. (Satria, 2013). N-heksan adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C₆H₁₄. Awalan *heks-* merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran *-ana* berasal dari *alkana*, yang merujuk pada ikatan tunggal yang

menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air (Kastianti dan Amalia, 2008). Pada penelitian sebelumnya n-heksan terpilih sebagai pelarut yang sangat nonpolar, mampu mengekstrak senyawa bioaktif nonpolar, seperti β -karoten dengan konsentrasi bahan dan pelarut 1:9 menghasilkan karotenoid sebesar 237.85 mg/100 g. Karotenoid sebagian besar bersifat non polar sehingga lebih banyak yang terekstrak pada pelarut non polar seperti n-heksan (Wahyuni dan Simon 2012).

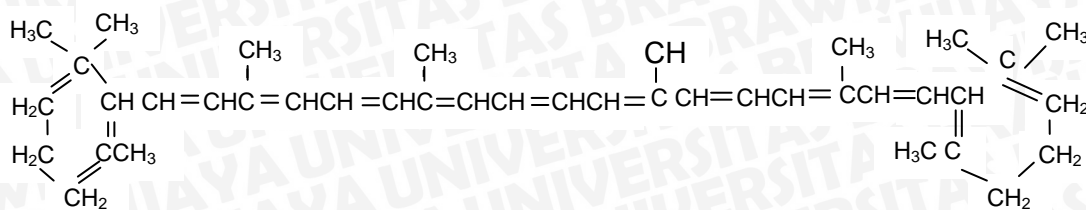
Tabel 2. Sifat Fisika Kimia n-heksan

Karakteristik	Syarat
Bobot molekul	86,2 gram/mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-95°C
Titik didih	69°C (pada 1 atm)
Densitas	0,6603 gr/ml pada 20°C

Sumber: Kastianti dan Amalia, (2008)

2.3 Beta Karoten

Beta Karoten (β -karoten) merupakan salah satu bentuk sederhana dari karotenoid yang memiliki rumus molekul $C_{40}H_{56}$. β -karoten memiliki 1 ikatan rangkap yang merupakan pigmen warna orange dan dapat ditemukan dalam buah-buahan sayuran. β -karoten bisa berikatan dengan klorofil maupun xantofil pada buah dan sayuran yang akan menyerap cahaya dalam spektrum cahaya orange atau merah dan akan menimbulkan warna hijau, ungu atau biru (Hock-Eng, *et al.*, 2011 dalam Tungriani *et al.*, 2012). β -karoten merupakan bagian karotenoid yang berperan sebagai provitamin A dan membantu melindungi dari beberapa penyakit kronis seperti kanker, diabetes, dan penyakit kardiovaskular. Struktur molekul β -karoten dapat dilihat pada Gambar 2.



Cincin β - ionon

β - Karoten

Cincin β - ionon

Gambar 2. Struktur β -karoten (Winarno, 2004)

β -karoten memiliki karakteristik ialah larut dalam lemak, sebagian besar bersifat non polar sehingga lebih banyak terekstrak pada pelarut non polar, serta sensitif terhadap udara, cahaya, dan suhu tinggi. Beta karoten dapat dikonversikan menjadi vitamin A, sehingga β -karoten disebut juga dengan provitamin A. Beta karoten disimpan dalam tubuh dalam bentuk β -karoten, sehingga β -karoten lebih aman dibandingkan dengan vitamin A sintesis (Kumalaningsih, 2006). Di dalam kloroplas algae terdapat β -karoten berfungsi sebagai pigmen pelengkap untuk penyerapan cahaya. Peran terpenting dari β -karoten di dalam sel ialah sebagai detoksifikasi oksigen teraktivasi dan klorofil triplet hasil reaksi fotosintesis dengan cahaya, selain itu β -karoten juga berperan dalam meredam singlet oksigen dan radikal bebas (Winarsi, 2011).

β -karoten berbeda dengan astaxantin, likopen dan kriptoxantin, karena β -karoten dapat diubah menjadi vitamin A di dalam tubuh. Cincin β dari β -karoten didalam tubuh akan diubah menjadi vitamin A oleh enzim 15,15' dioksigenase menjadi 2 molekul retinal, kemudian molekul retinal akan direduksi menjadi retinol yang merupakan vitamin A. Karotenoid khususnya β -karoten memiliki aktifitas antioksidan yang tinggi sehingga mampu mengurangi resiko penyakit jantung, stroke, semua penyakit kardiovaskuler dan melindungi tubuh dari risiko kanker paru-paru, payudara dan prostat β -karoten dalam men-deaktivasi radikal bebas diawali dengan proses peroksidasi lemak, karena β -

karoten merupakan salah satu tipe antioksidan lemak. Aktivitas antioksidan trans- β karoten lebih tinggi dari cis β -karoten. Senyawa β -karoten dalam bentuk isomer trans mempunyai aktifitas provitamin A sebesar 100%. Perubahan stuktur kimia β -karoten dari bentuk trans ke bentuk cis menyebabkan penurunan aktivitas vitamin A dari 100% ke 30% (Fretes *et al.*, 2012).

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan dengan pelarut yang melibatkan perpindahan zat terlarut ke dalam pelarut untuk memperoleh ekstrak. Ekstraksi dapat dilakukan ekstraksi secara bertingkat dimulai dari pelarut non polar, lalu dengan pelarut semipolar dan polar sehingga diperoleh ekstrak yang mengandung senyawa nonpolar, semipolar, dan polar (Siregar *et al.*, 2013). Prinsip kerja ekstraksi pelarut adalah nilai kelarutan suatu komponen terhadap pelarutnya. Sedangkan prinsip ekstraksi mekanis adalah berdasarkan pada perbedaan tekanan (Putri *et al.*, 2014).

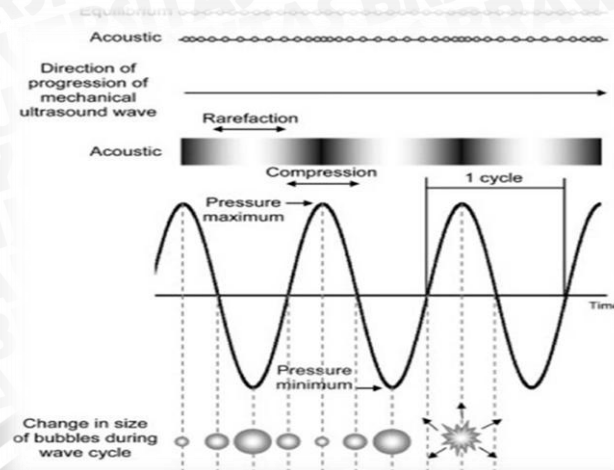
Secara tradisional, ekstraksi berbagai senyawa bioaktif dari produk alami telah dilakukan pada industri menggunakan pelarut yang berbeda. Metode ekstraksi konvensional seperti maserasi dan ekstraksi soxhlet memiliki banyak kelemahan seperti penggunaan pelarut dalam jumlah besar, waktu ekstraksi yang lama dan hasil ekstraksi yang lebih rendah. di di dapatkan Namun di antara semua teknik baru ekstraksi, ultrasonik adalah pengganti teknik ekstraksi tradisional yang murah dan sederhana. Aplikasi dari ekstraksi menggunakan ultrasonik adalah untuk ekstraksi lipid, protein, flavonoid, karotenoid, hemiselulosa, triterpenoid dan senyawa aromatik (Dey dan Virendra, 2013).

2.4.1 Ultrasonik

Ultrasonik merupakan salah satu metode ekstraksi menggunakan gelombang suara untuk merusak dinding dan menghasilkan rongga pada material tumbuhan sehingga mempermudah masuknya komponen. Masuknya

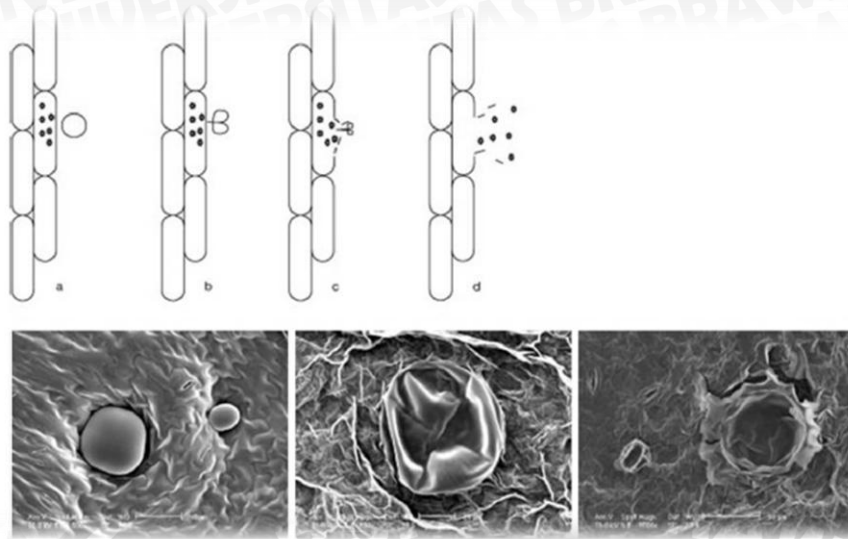
komponen pelarut menyebabkan terjadinya kontak antara pelarut dan senyawa bioaktif sehingga terjadi transfer massa. Sehingga, ekstraksi dengan menggunakan metode ultrasonik dapat meningkatkan *yield* ekstraksi meningkatkan kecepatan ekstraksi, menurunkan waktu dan menurunkan suhu maupun volume pelarut yang dapat membantu dalam ekstraksi senyawa yang labil terhadap panas (Dey dan Virendra, 2013).

Ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. dilakukan dengan metode ultrasonik dengan frekuensi 40 kHz, 300 W, dan suhu 30°C. Ekstraksi menggunakan ultrasonik telah terbukti secara signifikan mengurangi waktu ekstraksi dan meningkatkan hasil ekstraksi dalam banyak bahan sayuran (Ma *et al.*, 2008). Penerapan ultrasonik dalam industri makanan dapat dibagi menjadi dua kategori yang berbedadari intensitas rendah frekuensi tinggi ($f > 100\text{kHz}$) dan intensitas tinggi frekuensi rendah ($20\text{ kHz} \leq f < 100\text{kHz}$). Ultrasonik dengan intensitas rendah tidak mengubah sifat fisik dan kimia dari bahan di mana gelombang ultrasonik merambat. Ekstraksi dengan ultrasonik dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi dan laju ekstraksi, mengurangi suhu ekstraksi, dan meningkatkan rentang pemilihan pelarut. Kavitasasi merupakan faktor utama yang menyebabkan peningkatan ekstraksi. Kavitasasi merupakan pembentukan gelembung uap kecil dan pecahnya gelembung tersebut didalam sebuah cairan yang teradiasi oleh gelombang ultrasonik. Jika energi gelombang melalui jaringan maka akan melepaskan energi kalor. Kavitasasi ini yang dapat menyebabkan suhu tinggi lokal, tekanan lokal tinggi, dan radikal bebas, yang dapat mempercepat atau memicu reaksi kimia senyawa yang diekstrak (Sun *et al.*, 2011) Kavitasasi ultrasonik ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kavitasi Ultrasonik (Pivo,2013)

Ultrasonik memiliki cara kerja dengan mentransmisikan suara melalui cairan sebagai suatu gelombang yang terdiri dari penekanan (*alternating compression*) dan siklus emecahan (*rarefaction cycles*). Sumber gelombang (*transducer*) sebagai piston direndam dalam cairan dan dioperasikan dengan sangat kecil tetapi keras. Tekanan gelombang dapat dianalogikan sebagai pukulan ke medium yang ditrasnmisikan oleh interaksi molekular melalui cairan. Reaksi ini merupakan pukulan yang dapa tmenghasilkan emecahan gelombang. Ketika piston telah dioperasikan pada 20.000 pukulan per detik maka *ultrasound* dihasilkan dalam media. Jika pemecahan gelombang cukup kuat, kekuatan ini dapat meningkatkan tekanan negatif yang cukup besar untuk melewati kekuatan intermolekular mengikat cairan. Molekul tersebut akan membentuk bagian satu dengan yang lain menjadi gelembung-gelembung kecil melalui medium (Mason, 1990).



Gambar 4. *Cavitation bubble* merusak dan membebaskan senyawa aktif sel (Pico, 2013).

2.4.2 Maserasi

Penarikan senyawa kimia bahan alam yang akan diisolasi dapat dilakukan dengan proses ekstraksi. Ekstraksi adalah proses pelarutan senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam suatu sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan komponen yang diinginkan. Metode maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel dalam pelarut organik, Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1987).

Pada penelitian sebelumnya ekstraksi maserasi telah digunakan untuk mengekstrak pigmen kasar spirulina menggunakan pelarut Metanol (Yudiati dan Rani 2011). Metode ekstraksi konvensional seperti maserasi memiliki banyak kelemahan seperti penggunaan pelarut dalam jumlah besar, waktu ekstraksi yang lama dan hasil ekstraksi yang lebih rendah.