

# ISOLASI DAN ANALISIS ASAM LEMAK *Scenedesmus quadricauda* YANG DIISOLASI DARI AIR KOLAM

Devy Susanty  
Universitas Nusa Bangsa  
Jl KH Soleh Iskandar KM 4. Cimanggu Tanah Sareal Bogor 16166  
e-mail: dvsusanty@gmail.com

## ABSTRACT

### *Isolation and Fatty Acid Analysis of Scenedesmus quadricauda from freshwater*

*Microalgae have fast growth rate and fatty acids which potential as bioenergy. In addition, microalgae are also living with binding carbon dioxide for photosynthesis, so as to reduce air pollution. In this study, samples were taken from the freshwater, Sawahan, Padang, West Sumatra. Nile red staining performed on the samples to see the potential of lipid content. Microalgae having lipid content were isolated using the capillary pipette technique then it was identified using a microscope. Isolated microalgae was identified as Scenedesmus quadricauda. Microalgae growth measured by optical density value. It cultivated in different concentrations of NaNO<sub>3</sub> to see the effect of the amount of nitrogen on the growth. Scenedesmus quadricauda grew well at a concentration of 0.5 g / L NaNO<sub>3</sub>. Fatty acid analysis was done by using GC-MS. Scenedesmus quadricauda had several types of fatty acids. The most abundant fatty acid in Scenedesmus quadricaudawas C18: 1.*

**Keywords:** *Microalgae, Scenedesmus quadricauda, Nile red staining, Isolation, Fatty acid*

## ABSTRAK

Mikroalga memiliki laju pertumbuhan yang cepat dan mengandung asam lemak sehingga berpotensi sebagai bioenergi. Selain itu, mikroalga juga hidup dengan mengikat karbondioksia untuk proses fotosintesis, sehingga mampu mengurangi pencemaran udara. Pada penelitian ini, sampel mikroalga diambil dari air kolam dari daerah Sawahan, Padang, Sumatera Barat. Pewarnaan nilered dilakukan terhadap sampel untuk melihat potensi kandungan lipid. Mikroalga yang memiliki kandungan lipid diisolasi dengan menggunakan teknik pipet kapiler, kemudian isolat diidentifikasi secara morfologi dengan menggunakan mikroskop. Isolat yang diperoleh diidentifikasi sebagai *Scenedesmus quadricauda*. Isolat dikultivasi dalam Bold Bassal Medium (BBM). Pertumbuhan mikroalga diukur dengan melihat nilai optical density. Isolat dikultivasi dalam berbagai konsentrasi NaNO<sub>3</sub> untuk melihat pengaruh jumlah nitrogen terhadap pertumbuhannya. *Scenedesmus quadricauda* tumbuh dengan baik pada konsentrasi 0,5 g/L NaNO<sub>3</sub>. Analisa asam lemak dilakukan dengan menggunakan GC-MS. Pada *Scenedesmus quadricauda* ditemukan beberapa jenis asam lemak. Asam lemak yang paling banyak terkandung pada mikroalga ini yaitu C18:1.

**Kata kunci:** *Mikroalga, Scenedesmus quadricauda, Pewarnaan nile red, Isolasi, Asam lemak*

## PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan sumber biodiesel yang dapat diperbaharui dan dapat memenuhi permintaan minyak untuk transportasi (Hossain *et al.*, 2008). Mikroalga dapat digunakan sebagai sumber energi bahan bakar alternatif karena mengandung jumlah minyak yang tinggi, dapat diekstrak, diproses, dan diubah menjadi bahan bakar transportasi dengan menggunakan teknologi yang tersedia. Mikroalga memiliki laju pertumbuhan yang cepat, dapat tumbuh

tanpa ditanam pada lahan dan hidup pada air yang tidak dapat diminum, memerlukan lebih sedikit air, dan tidak menggantikan kultur tanaman untuk makanan, produksinya tidak bergantung pada cuaca dan dapat dipanen harian (Gouveia *et al.*, 2009). Mikroalga menggunakan proses fotosintesis yang sama dengan tumbuhan tingkat tinggi (da-Silva *et al.*, 2009) sehingga mampu mengurangi efek rumah kaca. Disamping itu, penggunaan mikroalga tidak membahayakan produksi makanan (Hu *et al.*, 2008), bahkan mikroalga juga dapat ber-

potensi sebagai sumber nutrisi karena beberapa mikroalga dapat mengandung asam lemak esensial (Ratha *et al.*, 2013).

Mikroalga memiliki kandungan lipid dan asam lemak yang dapat dikonversi menjadi biodiesel melalui reaksi transesterifikasi. Kemampuan mikroalga dalam menghasilkan biodiesel terkait dengan lipid dan asam lemak yang terkandung dalam mikroalga tersebut. Kadar lipid bergantung pada jenis mikroalga dan proses kultivasi-nya. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat spesies dan proses kultivasi yang baik dalam produksi biodiesel. Diantara mikroalga yang sudah diteliti dengan kondisi kultivasi tertentu dan dapat menghasilkan biodiesel yaitu, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina maxima*, *Nannochloropsis* sp, *Neochloris oleabundans*, *Scenedesmus obliquus* dan *Dunaliella tertiolecta* (Gouveia *et al.*, 2009).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan yaitu Bold Bassal's Medium, Nile red (Aldrich Sigma N 3303), Aseton, Physiological Saline (0,9 % NaCl).

Peralatan yang digunakan yaitu Mikroskop fluorescent ( $\lambda=515-565$ , Zeiss); Inkubator (Sanplatec), Autoclave, Mikroplate 48 wells, Petri Dish, Sentrifius (999 x100 rpm, himac CT-15D, Hitachi), PCR (Takara), GC-MS (kolom DB WAXTR 30 m,  $\phi=0,250$   $\mu\text{m}$ ; Agilent), Laminar Air Flow, Neraca Analitik, dan peralatan Gelas lainnya.

### Metode

#### Pengambilan Sampel

Sampel Mikroalga diambil dari air kolam di daerah Sawahan (00°56'35.701" LS dan 100°22'18.091" BT) dengan cara menyaring 3 L air kolam. Mikroalga yang terkumpul kemudian di simpan dalam medium BBM sebanyak 250 mL sebagai stok awal.

#### Pewarnaan Nile red

Pewarnaan Nile red (1 mg/mL aseton) dilakukan terhadap sampel dan isolat. mikroalga sebanyak 0,5 mL

disentrifius dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit, kemudian dicuci beberapa kali dengan *physiological saline*. Setelah dicuci, mikroalga diresuspended lagi dengan *physiological saline* dan ditambahkan Nile red (1: 100 v/v). Setelah itu dilakukan Inkubasi selama 20 menit dan dilihat di bawah mikroskop fluorescent (Elumalai *et al.*, 2011).

### Isolasi Mikroalga

Isolasi mikroalga dilakukan dengan teknik pipet kapiler (Belcher *et al.*, 1982). Pipet kapiler dibuat dengan membakar pipet dan menarik ujungnya hingga membentuk kapiler. Sel mikroalga diambil dengan menggunakan pipet kapiler dan dilihat dengan mikroskop. Sel mikroalga yang telah diambil dipindahkan ke dalam mikroplate yang telah diisi dengan medium BBM dan diinkubasi pada suhu 30°C, pencahayaan lampu dengan intensitas  $\pm 3000$  lux, pH medium= 7. Mikroalga yang diisolasi dibiarkan tumbuh selama  $\pm 2$  minggu dan diamati setiap hari dengan mikroskop.

### Kultivasi Mikroalga

Kultivasi mikroalga dilakukan dalam medium BBM (pH= 7) dengan pemberian cahaya secara berkelanjutan ( $\pm 3000$  lux), suhu 30°C, di dalam *flask culture*.

### Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga ditentukan berdasarkan absorbansinya ( $\text{OD}_{570}$ ) dan diukur dengan menggunakan *Microplate Reader* (PerkinElmer) setiap hari selama 21 hari.

### Analisis Asam Lemak dengan GC-MS

Isolat mikroalga sebanyak 10 mL disentrifius dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifius, supernatan dipisahkan. Pelet yang diperoleh dikeringkan dengan gas nitrogen. Setelah kering, ditambahkan 5  $\mu\text{L}$  internal standar (C19:0) 0,1 mg/mL untuk standar dalam menentukan jumlah asam lemak pada mikroalga. Untuk proses transesterifikasi, ditambahkan 0,1 mL HCL-Metanol 0,5 %, dan 0,4 mL dehydrated methanol.

Campuran divortex dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam, kemudian didinginkan. Lipid diekstrak dengan menggunakan heksan sebanyak 5 mL. Campuran dikocok selama 1 menit hingga terbentuk dua fasa. Setelah itu dilakukan setrifius 2000 rpm selama 5 menit, Fasa heksan diambil dan dipindahkan ke tabung baru, dikeringkan dengan gas nitrogen, kemudian disimpan di dalam kulkas. Sebelum analisa dengan GC-MS heksan ditambahkan lagi sebanyak 40 µL. Sampel diinjeksikan ke kolom GC-MS sebanyak 1µL.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi

Isolasi mikroalga ditujukan untuk memisahkan satu spesies mikroalga yang akan dikembangkan dan dianalisis lebih lanjut. Berbagai teknik isolasi yang dapat dilakukan seperti teknik dilusi, penggunaan media agar, dan penggunaan mikropipet atau pipet kapiler (Andersen *et al.*, 2005).

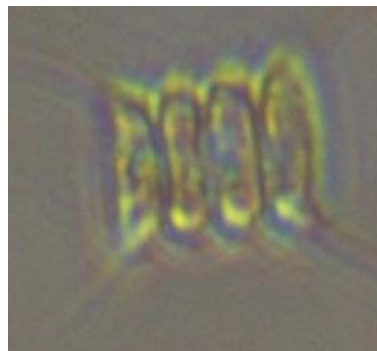
Isolasi mikroalga dilakukan berdasarkan pengamatan awal pada sampel. Mikroalga yang diisolasi yaitu mikroalga yang dominan tumbuh pada sampel, memiliki pertumbuhan cepat, dan mengandung lipid. Isolasi mikroalga dilakukan dengan teknik pipet kapiler (Belcher *et al.*, 1982). Dengan menggunakan pipet kapiler pada isolasi mikroalga, maka spesies yang ingin diisolasi lebih mudah diperoleh (Andersen *et al.*, 2005). Mikroalga yang

diisolasi diidentifikasi dengan micros-kop berdasarkan morfologinya. Mikroalga yang diisolasi diidentifikasi sebagai *Scenedesmus quadricauda* (Gambar 1).

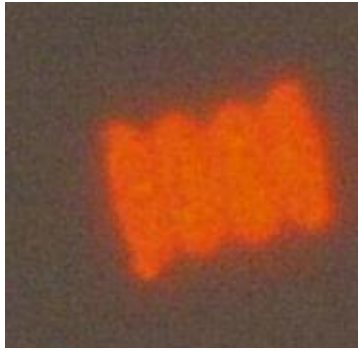
### Pewarnaan Nile Red

Pewarnaan *Nile red* dilakukan terhadap sampel awal untuk mengetahui spesies mikroalga yang memiliki kandungan lipid. Hasil pewarnaan terhadap sampel awal tidak begitu jelas. Hal ini disebabkan karena banyaknya spesies mikroalga di dalam sampel dan berada dalam keadaan menyatu, sehingga sulit memastikan spesiesnya. Oleh karena itu pewarnaan juga dilakukan terhadap mikroalga yang sudah diisolasi. Hasil pewarnaan Nile red pada isolat mikroalga dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa isolat memiliki kandungan lipid karena adanya warna kuning yang terbentuk.

Pewarnaan *Nile red* dilakukan untuk melihat adanya lipid pada mikroalga secara kualitatif. Mikroalga yang mengandung lipid menunjukkan adanya warna kuning setelah dilakukan pewarnaan dengan *Nile red*. Interaksi antara *Nile red* dengan lipid menyebabkan pewarnaan kuning pada mikroalga. Lipid netral berupa hidrokarbon dan trigliserida ditandai dengan pembentukan warna kuning, sedangkan lipid polar ditandai dengan warna merah (Pedro *et al.*, 2013).



Gambar 1. Mikroalga yang Diisolasi (*S. quadricauda*) Dilihat dengan Mikroskop Fluorescent (ZEISS, perbesaran 320x).



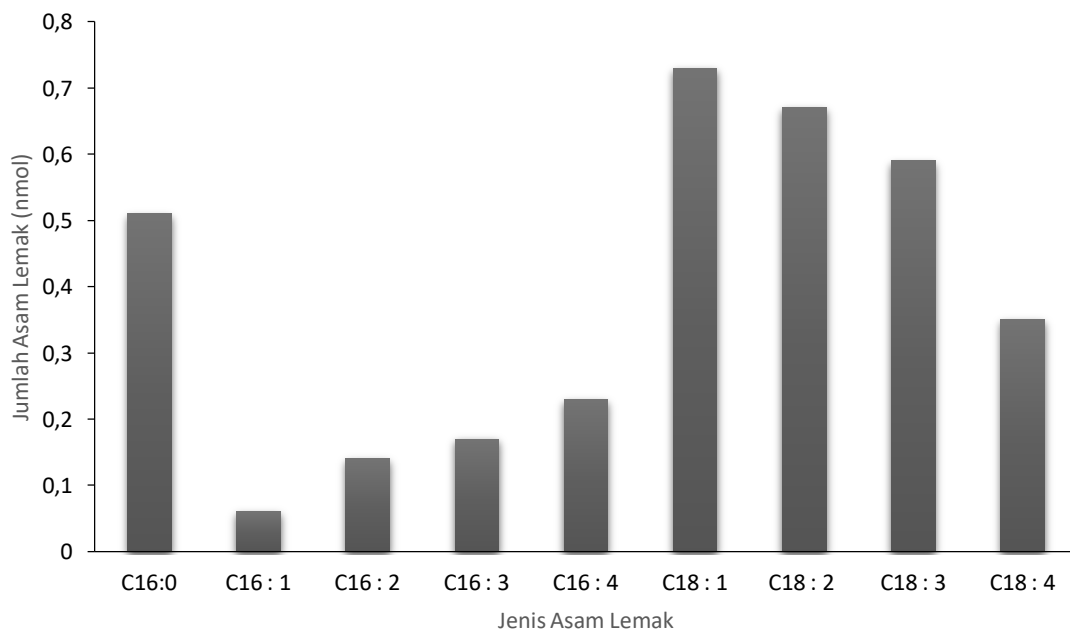
Gambar 2. Pewarnaan *Nile red* pada mikroalga yang diisolasi (*S. quadricauda*) Dilihat dengan mikroskop fluorescent (ZEISS, perbesaran 320x).

Penggunaan *Nile red* memudahkan skrining mikroalga yang mengandung lipid sebagai kandidat dalam produksi biodiesel. Namun, penggunaan *Nile red* tidak selalu memberikan gambaran yang bagus tentang kandungan lipid pada mikroalga. Adakalanya keberadaan lipid sulit dideteksi akibat tidak terbentuknya warna kuning yang jelas pada sel mikroalga. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ketidakberhasilan metode *fluorescent* dengan *Nile*

*red* dalam penentuan kandungan lipid netral pada alga hijau mengacu pada ketebalan, kekakuan dinding sel pada mikroalga mencegah pewarnaan *Nile red* masuk ke dalam sel untuk mengikat lipid dan memberikan peningkatan fluorescent yang khusus (Govender et al., 2012; Chen et al., 2009).

## ANALISIS ASAM LEMAK

Komposisi asam lemak yang terkandung pada mikroalga yang diisolasi ditentukan dengan membandingkan puncak internal standar (C19:0) dengan puncak masing-masing asam lemak (Gambar 3). Senyawa C19:0 merupakan senyawa yang ideal sebagai internal standar, karena senyawa ini memiliki sifat yang mirip dengan analit lainnya namun tidak mungkin ada pada sampel asam lemak alami (Angulo et al., 2008). Berdasarkan hasil tersebut terlihat bahwa asam lemak terbanyak yang terdapat pada *Scenedesmus quadricauda* adalah C:18.2.



Gambar 3. Komposisi Asam Lemak Mikroalga pada *S. quadricauda* yang Diisolasi

Analisis asam lemak pada genus *Scenedesmus* yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya menunjukkan jumlah yang tinggi terhadap beberapa jenis asam lemak. *Scenedesmus* sp. yang berasal dari danau di India dan dikultur pada *Bold Bassal's Medium* mengandung asam lemak C18:2 dengan jumlah yang tinggi yaitu sebanyak 29% dari total asam lemak. Selain itu, spesies ini mengandung asam lemak C16:0 sebanyak 23,2% (Ratha *et al.*, 2013). Penelitian lain menunjukkan hasil yang mirip terhadap asam lemak utama yang terdapat pada *Scenedesmus* sp. Beberapa penelitian juga melaporkan bahwa asam lemak yang tinggi pada *Scenedesmus* sp. yaitu C18:1, C16:0, dan C18:2 (Yoo *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2012).

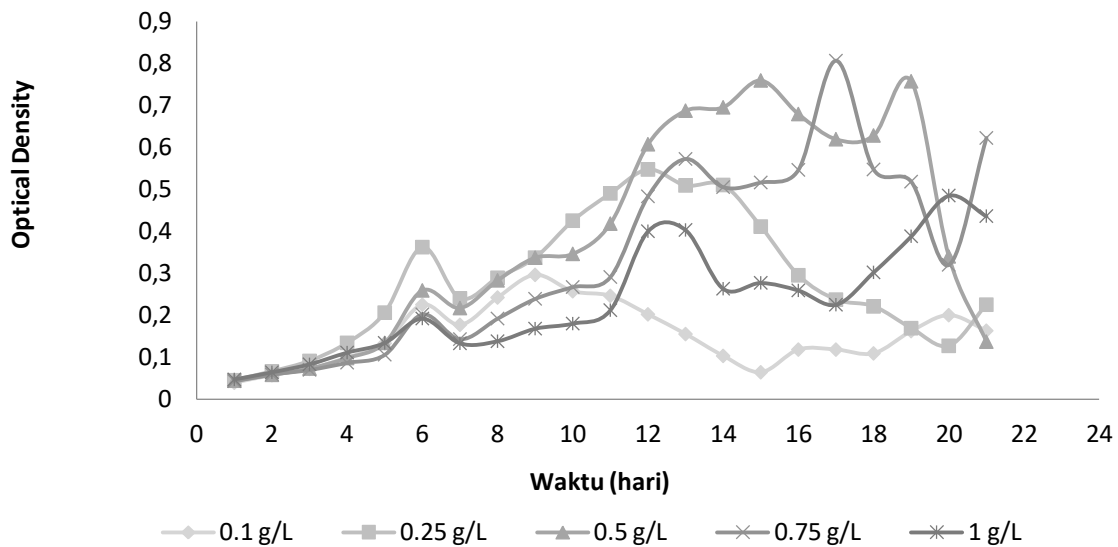
## PERTUMBUHAN MIKROALGA

Pertumbuhan mikroalga merupakan hal yang penting dalam produksi biodiesel. Mikroalga yang memiliki laju pertumbuhan tinggi dan mengandung lipid yang tinggi memiliki potensi sebagai biomassa dalam produksi biodiesel. Mikroalga yang diisolasi ditumbuhkan pada *Bold Bassal's Medium* dan diukur serapannya setiap hari menggunakan *microplate reader* (OD<sub>570</sub>) selama 21 hari untuk melihat pertumbuhannya. Pertumbuhan ketiga

isolat pada medium BBM diukur berdasarkan absorbansinya.

Modifikasi konsentrasi NaNO<sub>3</sub> dilakukan pada BBM untuk melihat konsentrasi nitrogen yang dibutuhkan untuk tumbuh dan bertahan hidup. Isolat memiliki pertumbuhan optimum pada konsentrasi NaNO<sub>3</sub> 0,5 g/L dalam medium BBM (Gambar 4).

Pertumbuhan mikroalga merupakan hal yang penting dalam produksi biodiesel. Mikroalga yang memiliki laju pertumbuhan tinggi dan mengandung lipid yang tinggi memiliki potensi sebagai biomassa dalam produksi biodiesel. Pada kultivasi mikroalga diperlukan berbagai nutrisi untuk medium pertumbuhannya. Nutrien utama yang diperlukan untuk produksi mikroalga adalah nitrogen dan phosphor (Wijffels *et al.*, 2010). NaNO<sub>3</sub> merupakan sumber nitrogen yang paling baik untuk pertumbuhan mikroalga (Ratha *et al.*, 2013). Variasi jumlah NaNO<sub>3</sub> dalam medium pertumbuhan mikroalga pada penelitian ini memperlihatkan peranan jumlah NaNO<sub>3</sub> terhadap pertumbuhan mikroalga. Pertumbuhan mikroalga pada setiap jumlah NaNO<sub>3</sub> berbeda-beda. *Scenedesmus quadricauda* memiliki pertumbuhan optimum 0,5 g/L NaNO<sub>3</sub> dalam medium BBM.



Gambar 4. Grafik Pertumbuhan Mikroalga *S. quadricauda* pada Berbagai Konsentrasi NaNO<sub>3</sub> dalam BBM

Kaitan jumlah nitrogen dalam medium dengan laju pertumbuhan mikroalga juga telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya terhadap spesies lain. Produktivitas biomassa tertinggi dari mikroalga *Neochloris oleoabundans* diperoleh dengan pemberian nitrogen yang bersumber dari sodium nitrat dengan konsentrasi 10 mM (Li *et al.*, 2008). Penelitian lain melaporkan pengaruh jumlah nitrogen terhadap pertumbuhan *Scenedesmus obliquus*. Pertumbuhan mikroalga tersebut lebih baik pada konsentrasi nitrogen 0,1 g/L dalam medium N11 (Mandal *et al.*, 2009). Pertumbuhan *Nannochloropsis gaditana* yang dikultur pada medium F2 dengan variasi konsentrasi nitrogen telah diteliti sebelumnya dan menunjukkan hasil bahwa *Nannochloropsis gaditana* tumbuh baik pada konsentrasi nitrat 8,0 mM (Pedro *et al.*, 2013).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat diketahui bahwa jumlah nitrogen di dalam medium mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Hal ini disebabkan karena nitrogen merupakan komponen esensial dalam sintesis protein yang nantinya digunakan untuk pertumbuhan mikroalga (Deng *et al.*, 2011). Masing-masing mikroalga membutuhkan jumlah nitrogen yang berbeda untuk mencapai pertumbuhan yang optimum.

## KESIMPULAN

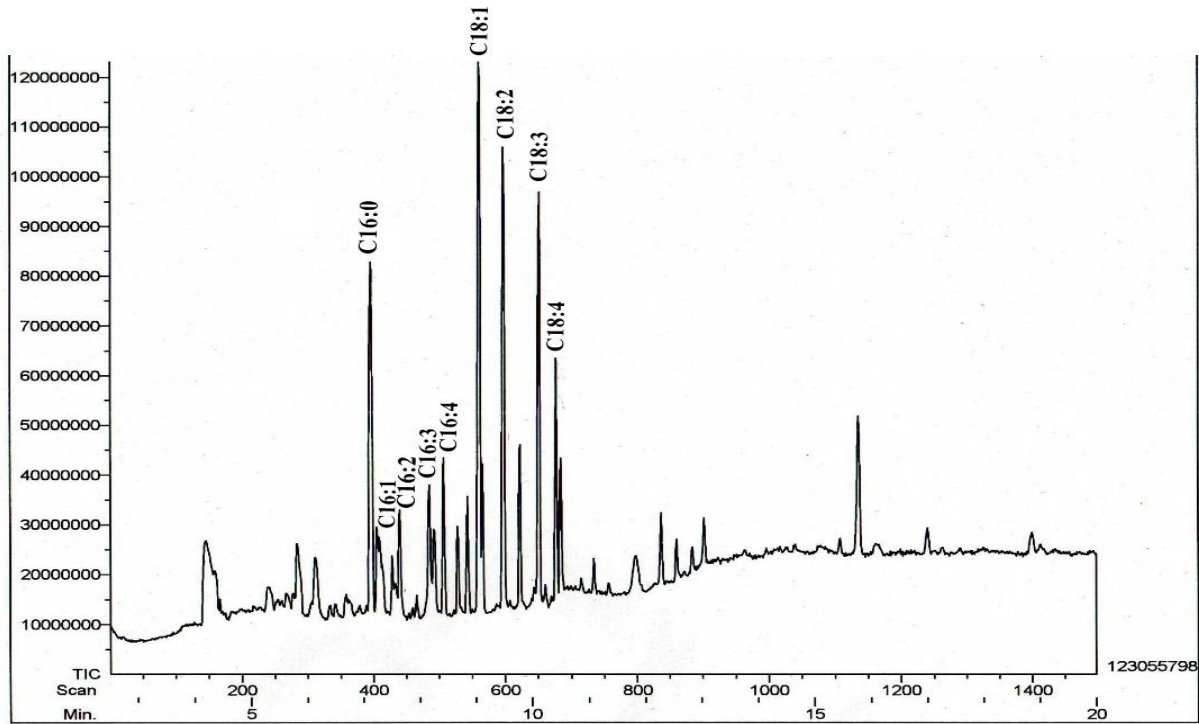
Mikroalga yang diisolasi yaitu *Scenedesmus quadricauda*. Pewarnaan Nile red dapat dimanfaatkan untuk memilih mikroalga yang mengandung lipid sebagai kandidat untuk produksi biodiesel. Asam lemak yang paling banyak pada *Scenedesmus quadricauda* adalah C18:1. *Scenedesmus quadricauda* memiliki pertumbuhan optimum pada 0,5 g/L NaNO<sub>3</sub> dalam medium BBM.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press.
- Angulo, J., K. Numberg, L. Mahecha, M. Olivera, D. Dannenberger. 2011. *Manual of lipid extraction, methylation and gas chromatography, for the study of different tissues in ruminant*
- research*. Research Institute for Biology of Farm Animals.
- Belcher, H., E. Swale. 1982. *Culturing Algae*. Culture Collection of Algae and Protozoa.
- Breuer, G., P.P.Lamers, D. E. Martens, R. B. Draaisma, R. H. Wijffels. 2012. *The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains*. *bioresource Technology*. 124: 217-226.
- Chen, W., C. Zhang, L. Song, M. Sommerfeld, Q. Hu. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*. 77 (1): 41-47.
- Da-Silva, T. L., A. Reis, R. Medeiros, A. C. Oliveira, L. Gouveia. 2009. Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry. *Appl Biochem Biotechnol*. 159 (2): 568-578.
- Deng, X., X. Fei, Y. Li. 2011. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(3): 260-270.
- Elumalai, S., S. Baskaran, V. Prakasam, N. S. Kumar. 2011. Ultra Structural Analysis and Lipid Staining of Biodiesel Producing Microalgae *Chlorella vulgaris* Collected from Various Ponds in Tamil Nadu, India. *Journal of Ecobiotechnology*. 3(1): 05-07.
- Gouveia, L., A.C.Oliveria. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 36(2): 269-274.
- Govender T., L. Ramanna, I. Rawat, F. Bux. 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*. 114: 507-511.
- Hossain, A. B. M. S., A. Salleh., A. N. Boyce, P. Chowdhury, M. Naquiddin. 2008. Biodiesel Fuel Production from Algae

- as Renewable Energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4 (3): 250-258.
- Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*. 54 (4): 621-639.
- Kaur, S., M. Sarkar, R. B. Srivastava, H. K. Gogoi, M. C. Kalita. 2012. Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. *New Biotechnology*. 29 (3): 332-344.
- Li, Y., M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, N. Dubois-Calero. 2008. Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog* 24: 815-820.
- Mandal, S., N. Mallick. 2009. Microalgae *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 84 (2): 281-291.
- Pedro, A. S., C.V.Gonzalez-Lopez, F.G. Acién, E. Molina-Grima. 2013. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 134: 353-361.
- Ratha, S. K., R. Prasanna, R. B. N. Prasad, C. Sarika, D. W. Dhar, A. K. Saxena. 2013. Modulating lipid accumulation and composition in microalgae by biphasic nitrogen supplementation. *Aquaculture*. 392: 69-76.
- Wijffels, R. H., M.J. Barbosa. 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*. 329 (5993): 796-799.
- Yoo, C, S. Y. Jun, J. Y. Lee, C. Y. Ahn, H. M. Oh. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*. 101: S71-S74.

**LAMPIRAN 1. Kromatogram GC-MS asam lemak *Scenedesmus quadricauda***



Gambar 5. Kromatogram GC-MS asam lemak pada *Scenedesmus quadricauda* (JEOL GCmate)