



SKRIPSI

**ANALISA ASAM LEMAK RAGI *Rhodotorula graminis*
NBRC 0190**

**QURROTA A'YUN THOYYIBAH
NRP 1411100044**

**Dosen Pembimbing
Drs. Refdinal Nawfa, M.S.**

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016



SCRIPT

**FATTY ACID ANALYSIS OF YEAST *Rhodotorula graminis*
NBRC 0190**

**QURROTA A'YUN THOYYIBAH
NRP 1411100044**

**Advisor Lecturer
Drs. Refdinal Nawfa, M.S.**

Department of Chemistry
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya
2016

LEMBAR PENGESAHAN

ANALISA ASAM LEMAK RAGI
Rhodotorula graminis NBRC 0190

SKRIPSI

Oleh:

Qurrota A'yun Thoyyibah

NRP 1411 100 044

Surabaya, 29 Januari 2016

Dosen Pembimbing,



Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

NIP. 19580425 198701 1 001

Mengetahui:

Ketua Jurusan Kimia,



Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M. Sc.

NIP. 19710616 199703 1 002

**ANALISA ASAM LEMAK RAGI *Rhodotorula graminis*
NBRC 0190**

Nama : QURROTA A'YUN THOYYIBAH

NRP : 1411 100 044

Jurusan : Kimia ITS

Dosen Pembimbing: Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

Abstrak—Penelitian berikut mengenai pengidentifikasian asam lemak yang terdapat pada spesies *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 pada *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang. Ragi *R. graminis* dibiakkan pada media padat dan media cair berupa campuran glukosa, pepton dan ekstrak yeast (1:0,5:0,3). Selanjutnya ragi diinokulasi selama rentang waktu tertentu sesuai data kurva pertumbuhan. Biomassa hasil inokulasi kemudian dibersihkan dan dikeringkan selama 24 jam. Sel kering diambil lipid totalnya dengan larutan kloroform-metanol (2:1). Lipid total selanjutnya ditransesterifikasi agar dapat diketahui kandungan asam lemaknya dengan metode KLT dan KG-SM. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa pada plat KLT dengan eluen petroleum eter:dietil eter:etil asetat (3:3:2) terdapat perubahan senyawa lipid menjadi senyawa metil ester setelah mengalami reaksi transesterifikasi serta adanya delapan asam lemak yang muncul pada kromatogram KG. Kedelapan asam lemak tersebut yaitu metil heksadekanoat, asam z-7-heksadekenoat; asam n-heksadekanoat; metil oktadek-9-enoat, metil 14-metil-heptadekanoat, asam oleat, asam oktadek-9-enoat; dan bis(2-etilheksil) adipat yang telah umum ditemukan pada *R. graminis* lainnya.

Kata Kunci: Asam lemak, klasifikasi mikroorganisme, *Rhodotorula graminis*

**FATTY ACID ANALYSIS OF YEAST *Rhodotorula graminis*
NBRC 0190**

Name : QURROTA A'YUN THOYYIBAH
NRP : 1411 100 044
Department : Chemistry ITS
Supervisor : Drs. Refdinal Nawfa, M.S.

Abstract—The following studies regarding the identification of fatty acids contained in the species *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 Laboratory at the National Institute of Technology and Evaluation Japan. Yeast *R. graminis* cultured on solid media and liquid media in the form of a mixture of glucose, peptone and yeast extract (1:0.5:0.3). Furthermore, the yeast inoculated during a certain time span for which data growth curve. Biomass results of inoculation is then cleaned and dried for 24 hours. Dry cell taken total lipid with a solution of chloroform-methanol (2: 1). The next total lipid transesterified in order to know the fatty acid content by using TLC and GC-MS. The results obtained show that the TLC plate with eluent petroleum ether:diethyl ether:ethyl acetate (3:3:2) there are changes in lipid compound into methyl ester compound after a transesterification reaction as well as the presence of eight fatty acid that appears on the chromatogram GC. These 8th fatty acids, namely hexadecanoic acid, methyl esters; z-7-hexadecenoic acid, n-hexadecanoic acid, 9-octadecanoic acid, methyl esters; heptadecanoic acid, 14-methyl-, methyl esters; octadec-9-enoic acid; and hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester which is commonly found on the others *R. graminis*.

Key Word: *Fatty acid, microorganism classification, Rhodotorula graminis*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin. Segala puji senantiasa penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga naskah skripsi yang berjudul “ANALISA ASAM LEMAK RAGI *Rhodotorula graminis* NBRC 0190” dapat diselesaikan dengan baik. Tulisan ini tidak dapat terwujud tanpa bantuan, dukungan dan dorongan dari semua pihak. Maka dari itu penulis sangat berterima kasih kepada:

1. Bapak Drs. Refdinal Nawfa, M.S. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses penyusunan naskah ini.
2. Bapak Prof. Dr. Surya Rosa Putra, M.S. yang telah memberikan pengarahan selama melakukan penelitian.
3. Bapak Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M. Sc. selaku Ketua Jurusan Kimia atas fasilitas yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.
4. Bapak Lukman Atmaja, Ph.D. selaku dosen wali atas pengarahannya dalam pengambilan mata kuliah.
5. Keluarga besar yang selalu memberikan semangat, dukungan dan doa.
6. Teman-teman angkatan 2011 Kimia ITS-CHEM11TS atas semua perhatian dan dukungannya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini tidak terlepas dari kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat meningkatkan kualitas tulisan ini. Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, 28 Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| LEMBAR PENGESAHAN..... | iv |
| KATA PENGANTAR..... | vi |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| BAB I..... | 1 |
| PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3. Tujuan Penelitian..... | 2 |
| BAB II..... | 3 |
| TINJAUAN PUSTAKA..... | 3 |
| 2.1. Karakter <i>Rhodotorula Graminis</i> | 3 |
| 2.2. Fase Pertumbuhan Mikroba..... | 5 |
| 2.3. Media Pemiakan Mikroorganisme | 7 |
| 2.4. Asam Lemak..... | 9 |
| 2.4.1. Karakterisasi dan Jenis Asam Lemak..... | 9 |
| 2.4.2. Asam Lemak <i>Rhodotorula</i> | 12 |
| 2.5. Metode Isolasi Asam Lemak | 14 |
| 2.6. Metode Analisa Asam Lemak | 16 |
| 2.6.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)..... | 16 |
| 2.6.2. Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa..... | 18 |

| | |
|--|----|
| BAB III..... | 27 |
| METODE PENELITIAN | 27 |
| 3.1. Peralatan | 27 |
| 3.2. Bahan..... | 27 |
| 3.2.1. Sampel Ragi..... | 27 |
| 3.2.2. Bahan Kimia..... | 27 |
| 3.3. Prosedur Kerja..... | 27 |
| 3.3.1. Pembuatan Media Pertumbuhan..... | 27 |
| 3.3.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Ragi..... | 28 |
| 3.3.3. Produksi Biomassa <i>R. graminis</i> | 28 |
| 3.3.4. Ekstraksi Lipid Total | 29 |
| 3.3.5. Analisa Asam Lemak..... | 29 |
| BAB IV..... | 33 |
| HASIL DAN PEMBAHASAN | 33 |
| 4.1. Kurva Pertumbuhan..... | 33 |
| 4.2. Produksi Biomassa | 35 |
| 4.3. Ekstraksi Lipid Total | 36 |
| 4.4. Analisa Asam Lemak..... | 36 |
| 4.4.1. Analisa Lipid dan Asam Lemak dengan KLT | 36 |
| 4.4.2. Analisa Asam Lemak dengan KG-SM | 37 |
| BAB V | 57 |
| KESIMPULAN DAN SARAN | 57 |
| 5.1 Kesimpulan..... | 57 |
| 5.2 Saran..... | 57 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 59 |

| | |
|----------------------|----|
| LAMPIRAN | 65 |
| BIODATA PENULIS..... | 75 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|---------------|---|----|
| Gambar 2. 1. | Morfologi <i>Rhodotorula graminis</i> | 3 |
| Gambar 2. 2. | Fase pertumbuhan mikroba | 5 |
| Gambar 2. 3. | Kurva pertumbuhan <i>Rhodotorula glutinis</i> | 6 |
| Gambar 2. 4. | Struktur umum triasilgliserol..... | 9 |
| Gambar 2. 5. | Asam lemak jenuh | 10 |
| Gambar 2. 6. | Struktur trans- (atas) dan cis- (bawah) pada asam oleat (asam lemak tak jenuh)..... | 11 |
| Gambar 2. 7. | Ilustrasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) | 17 |
| Gambar 2. 8. | Mekanisme reaksi esterifikasi asam lemak dengan katalis asam..... | 18 |
| Gambar 2. 9. | Mekanisme reaksi transesterifikasi asam lemak dengan katalis basa..... | 21 |
| Gambar 2. 10. | Skema peralatan kromatografi gas | 23 |
| Gambar 4. 1. | Kurva pertumbuhan <i>Rhodotorula graminis</i> | 33 |
| Gambar 4. 2. | Kromatogram lipid total dengan eluen petroleum eter, dietil eter dan asam asetat (3:3:2)..... | 37 |
| Gambar 4. 3. | Lapisan yang terbentuk setelah proses penyetimbangan hasil transesterifikasi..... | 38 |
| Gambar 4. 4. | Kromatogram metil ester (hasil transesterifikasi lipid) dengan eluen petroleum eter, dietil eter dan asam asetat (3:3:2)..... | 39 |
| Gambar 4. 5. | Kromatogram Kromatografi Gas senyawa metil ester | 40 |
| Gambar 4. 6. | Spektra massa metil heksadekanoat pada waktu retensi 12,59 | 42 |
| Gambar 4. 7. | Penataan ulang McLafferty metil heksadekanoat | 42 |
| Gambar 4. 8. | Pola fragmentasi metil heksadekanoat | 43 |
| Gambar 4. 9. | Spektra massa asam Z-7-Heksadekanoat pada waktu retensi 13,01..... | 43 |
| Gambar 4. 10. | Pola fragmentasi asam Z-7-Heksadekanoat | 44 |
| Gambar 4. 11. | Spektra massa asam n-heksadekanoat pada waktu retensi 13,8 | 45 |

| | | |
|---------------|--|----|
| Gambar 4. 12. | Pola fragmentasi lengkap asam n-heksadekanat | 46 |
| Gambar 4. 13. | Spektra massa metil oktadek-9 enoat pada waktu retensi 14,31 | 47 |
| Gambar 4. 14. | Penataan ulang McLafferty dan pola fragmentasi metil oktadek-9-enoat | 47 |
| Gambar 4. 15. | Spektra massa metil 14-metil-heptadekanat pada waktu retensi 14,53 | 48 |
| Gambar 4. 16. | Pola fragmentasi metil 14-metil-heptadekanat | 49 |
| Gambar 4. 17. | Penataan ulang McLafferty metil 14-metil-heptadekanat | 49 |
| Gambar 4. 18. | Spektra massa asam oleat pada waktu retensi 14,89 | 50 |
| Gambar 4. 19. | Pola fragmentasi asam oleat | 51 |
| Gambar 4. 20. | Spektra massa asam oktadek-9enoat pada waktu retensi 15,04 | 52 |
| Gambar 4. 21. | Pola fragmentasi asam oktadek-9-enoat | 52 |
| Gambar 4. 22. | Spektra massa bis(2-etilheksil) adipat pada waktu retensi 17,37 | 53 |
| Gambar 4. 23. | Pola fragmentasi bis(2-etilheksil) adipat | 54 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabel 2. 1. | Komposisi asam lemak <i>Rhodotorula graminis</i> yang ditumbuhkan pada media glukosa | 14 |
| Tabel 2. 2. | Nilai titik didih dari berbagai jenis pelarut nonpolar | 15 |
| Tabel 2. 3. | Nilai titik didih dari berbagai jenis pelarut polar.... | 16 |
| Tabel 3. 1. | Perbandingan massa asam lemak dan kebutuhan BF ₃ -metanol dalam reaksi | 30 |
| Tabel 4. 1. | Pembacaan kromatogram KG-SM dari sampel hasil transesterifikasi..... | 41 |
| Tabel 4. 2. | Perbandingan beberapa jenis asam lemak dalam <i>Rhodotorula graminis</i> | 55 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1. Skema Kerja..... | 65 |
| Lampiran 2. Data dan Perhitungan..... | 67 |
| Lampiran 3. Data kurva pertumbuhan <i>Rhodotorula graminis</i> | 69 |
| Lampiran 4. Dokumentasi penelitian | 70 |
| Lampiran 5. <i>Database</i> Beberapa Spektra Massa Asam Lemak dan Metil Ester..... | 71 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Klasifikasi organisme pertama kali diusulkan oleh Robert Whittaker pada tahun 1969. Usulan ini membawa dampak positif bagi peneliti flora dan fauna di dunia. Kondisi alam yang semakin berubah setiap saat menyebabkan banyak ditemukannya organisme baru sehingga pengelompokan organisme diperlukan untuk memudahkan penelitian. Selain itu, pengelompokan organisme juga diperlukan dalam pemberian nama spesies yang sedang diteliti (Anonim, 2014). Hal ini juga berlaku terhadap organisme renik yang umum disebut mikroorganisme.

Pengelompokan mikroorganisme atau mikroba dapat dilihat berdasarkan habitat dan sumber diperolehnya (Brown, dkk, 2011). Selain itu, mikroorganisme juga dapat diklasifikasikan berdasarkan karakteristik morfologi atau penampakan fisik seperti bentuk tubuh, warna dan ciri-ciri fisik lainnya. Namun, cara tersebut tidak memperlihatkan hasil optimal sehingga para peneliti menggunakan unsur kimiawi dalam melakukan identifikasi. Beberapa unsur yang dapat diamati yaitu keberadaan jenis enzim, antibodi, pemotongan asam amino, jenis asam lemak, komposisi basa DNA, pemotongan RNA ribosom, reaksi rantai polimerisasi, dan hibridisasi asam nukleat (Janse, 1997).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan menyebutkan bahwa hubungan kekerabatan antar mikroorganisme banyak disebabkan oleh kemiripan komposisi basa DNA berdasarkan hasil pemotongan DNA organisme tersebut. Namun, pada beberapa kasus identifikasi asam lemak lebih berguna untuk klasifikasi bakteri fotosintetik (Salih, 2012). Asam lemak yang diidentifikasi berupa asam lemak ekstraseluler atau PFLA (*phospholipid fatty acid*) dan asam lemak intraseluler atau CFA (*cellular fatty acid*).

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi asam lemak pada ragi *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 yang berbeda dari *Rhodotorula*, spp lain yang telah diteliti sebelumnya. Sehingga dapat diketahui kesamaan dan perbedaan dari jumlah total dan jenis asam lemak pada masing-masing spesies tersebut. Berdasarkan hasil yang telah diperoleh maka dapat dilakukan klasifikasi terhadap mikroorganisme dan spesies yang menjadi objek penelitian (Galzy, dkk, 1995).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang tersebut, permasalahan yang diambil pada penelitian ini adalah jenis asam lemak pada spesies *R. graminis* dari Laboratorium NBRC 0190 pada *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang yang belum diketahui sebelumnya.

1.3. Tujuan Penelitian

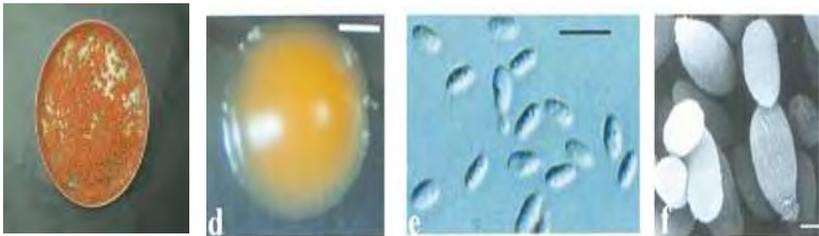
Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis asam lemak yang terdapat pada spesies *R. graminis* yang diperoleh dari Laboratorium NBRC 0190 pada *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karakter *Rhodotorula Graminis*

Rhodotorula graminis merupakan spesies yang pertama kali diumumkan oleh seorang ilmuwan bernama Di Menna pada tahun 1958. Spesies ini dapat ditemukan dan hidup dalam berbagai kondisi serta lingkungan yang ekstrim seperti gunung berapi, laut dalam dan daerah pengolahan air limbah. *R. graminis* merupakan ragi berwarna oranye kemerah muda (JGI, 2014). Terlihat pada Gambar 2. 1. (Wang & Chang, 2002) di bawah ini bahwa spesies tersebut berbentuk bulat *ovoidal* atau memanjang serta berpermukaan halus berkilau dan cembung.



Gambar 2. 1. Morfologi *Rhodotorula graminis*

Pada umumnya *Rhodotorula graminis* melakukan reproduksi dengan tunas multilateral. Selain itu *R. graminis* dapat ditemukan baik secara tunggal atau berpasangan. Spesies *Rhodotorula graminis* dapat dikembang biakkan di luar habitatnya menggunakan media yang telah ditentukan. Pada umumnya *R. graminis* dapat tumbuh pada media yang mengandung karbohidrat dan nitrogen, sehingga media buatan yang sesuai yaitu Bacto YMGP (*malt-yeast-glucose-pepton*) agar atau YGP (*extract yeast-glukosa-pepton*) agar (Wang & Chang, 2002).

Berikut merupakan taksonomi dari spesies *Rhodotorula graminis* (EOL, 2015):

| | |
|---------|-------------------------------|
| Kingdom | = Ragi |
| Fillum | = Basidiomycota |
| Class | = Microbotryomycetes |
| Ordo | = Sporidiobolales |
| Genus | = <i>Rhodotorula</i> |
| Species | = <i>Rhodotorula graminis</i> |

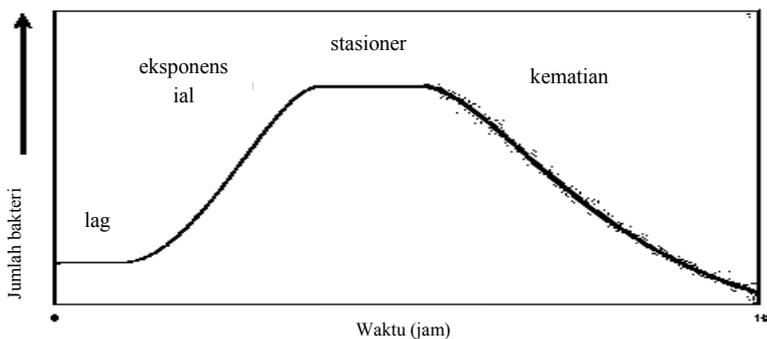
Marga *Rhodotorula* dapat beradaptasi dan menyerap Nitrogen bebas yang terkandung dalam media atau lingkungan (Movina & Putra, 2007). Kandungan Nitrogen yang dapat diserap oleh marga *Rhodotorula* adalah minimal sebanyak 2% dan *Rhodotorula* dapat tumbuh secara normal pada lingkungan dengan jumlah Nitrogen sebanyak 14%. Dengan demikian, ragi jenis ini dapat dimanfaatkan sebagai penyubur tanah karena mengandung senyawa hopanoid dan berperan dalam proses pengomposan (Yudi, dkk, 2008). Selain senyawa triterpenoid jenis hopanoid dan morfologi yang hampir sama berdasarkan pengelompokan taksa, ragi marga *Rhodotorula* juga dikelompokkan berdasarkan kandungan karbohidrat, basa DNA dan zat warnanya (Komagata, dkk, 1985).

Secara umum marga *Rhodotorula* berpenampakan cerah dengan warna khas oranye kemerahan. Warna tersebut dapat digunakan sebagai indikator adanya zat warna merah yaitu karotenoid. Sebagai contoh adalah kandungan karotenoid pada *Rhodotorula glutinis* yaitu β -karoten (Tan, dkk, 2014). Selain kandungan zat warna, karbohidrat dan basa DNA, senyawa lain yang dapat menentukan taksonomi dari ragi *Rhodotorula* adalah jenis asam lemak yang ada dalam spesies tersebut. Senyawa lipid yang terkandung dalam ragi marga *Rhodotorula* telah banyak dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai bahan bakar biodiesel (Compagno, dkk, 2012).

2.2. Fase Pertumbuhan Mikroba

Pertumbuhan mikroba merupakan suatu proses perbanyakan diri yaitu dengan bertambahnya jumlah sel. Proses perbanyakan atau reproduksi mikroba dapat melalui dua cara yaitu pembelahan sel dan reproduksi seksual. Namun pada umumnya mikroba yang melakukan reproduksi seksual yaitu jamur. Selain jumlah sel, pertumbuhan mikroba juga dapat dilihat melalui penambahan panjang atau jari-jari sel, luas sel, volume dan berat kering sel, atau jenis protein dan komponen selular lainnya serta kebutuhan metabolisme mikroba (Ulfatmi, dkk, 2008). Dalam pertumbuhannya, mikroba memerlukan nutrisi sebagai sumber energi dan kondisi fisio-kimia lingkungan yang mendukung serta tidak terserang toksin atau inhibitor. Dalam jangka waktu 20-90 menit mikroba jenis bakteri akan membelah diri, sedangkan ragi membelah diri antara 90-120 menit dan kapang akan mengalami pertumbuhan setelah 4-8 jam (Wibowo, 2005).

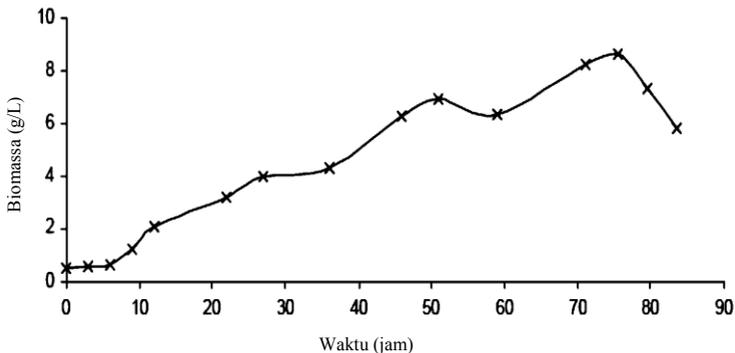
Dalam pertumbuhannya, mikroba akan mengalami 4 tahap penting yaitu *lag phase* (fase adaptasi), *exponential phase* (fase perbanyakan), *stationary phase* (fase konstan), dan *death phase* (fase penurunan populasi atau kematian). Tahapan yang terjadi pada fase pertumbuhan mikroorganisme atau mikroba dapat dilihat pada Gambar 2. 2. berikut (Kusnadi, 2002).



Gambar 2. 2. Fase pertumbuhan mikroba

Fase pertama merupakan fase adaptasi yang merupakan periode penyesuaian mikroba terhadap kondisi dan lingkungan dari media tanam. Lama waktu terjadinya fase tersebut sesuai dengan jenis bakteri serta nutrisi pada media yang disediakan. Fase kedua yaitu fase pertumbuhan dimana mikroba mulai mengalami pembelahan sel dan perbanyakan jumlah sel. Dalam fase ini pertumbuhan sel aktif dapat diamati bila mikroba dibiakkan pada media padat. Fase selanjutnya yaitu fase statis dimana jumlah sel yang hidup tetap konstan. Jumlah nutrisi yang perlahan mulai berkurang dapat menyebabkan mikroorganisme mengeluarkan senyawa metabolit sekunder atau bertindak sebagai inhibitor pertumbuhan sel lain. Sehingga jumlah sel hidup tidak mengalami perubahan. Fase terakhir yaitu fase kematian dimana nutrisi yang terdapat dalam media perlahan habis sehingga populasi mikroba mengalami penurunan jumlah akibat dari sel yang mati. Pada fase ini jumlah sel mati lebih banyak daripada sel hidup (Kusnadi, 2002).

Gambar 2. 3. di bawah ini menunjukkan fase pertumbuhan dari ragi ordo Sporidiobolales yaitu spesies *R. glutinis* yang telah dipelajari oleh Marova dkk (Marova, dkk, 2011):



Gambar 2. 3. Kurva pertumbuhan *Rhodotorula glutinis*

2.3. Media Pemiakan Mikroorganism

Dalam memiakan mikroorganism diperlukan media pemiakan khusus untuk mendapatkan koloni-koloni yang baik dan diinginkan. Media yang umum digunakan dibagi menjadi 8 tipe berikut (Moat & Foster, 1979):

- a. Media kompleks: merupakan tipe media yang diusulkan oleh Pasteur, Koch dan Tyndall yaitu ekstrak nutrisi yang berasal dari material tumbuhan dan hewan yang telah dididihkan. Beberapa media kompleks yang ada seperti *Tryptic Soy Agar* yang berisi ekstrak daging (*pepton*), susu (*tryptone*), tepung kedelai (*soytone*) atau ragi. Dari bahan-bahan tersebut diperoleh ekstrak protein yaitu peptida pendek dan asam amino.
- b. Media tetap: media ini dibuat dari formulasi bahan alami dengan konsentrasi yang telah diketahui. Pada umumnya media ini berisi karbon seperti glukosa dan tepung kanji. Selain itu juga berisi asam amino, vitamin dan bahan lain yang diperlukan oleh mikroba.
- c. Media organisme anaerob: media ini digunakan untuk memiakan mikroba yang tidak memerlukan oksigen. Bahan yang digunakan seperti *Sodium thioglycolate*.
- d. Teknik biakan khusus: media ini digunakan untuk memiakan bakteri-bakteri yang memerlukan perlakuan khusus. Bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dalam media buatan seperti *Mycrobacterium leprae* yang tumbuh pada armadillo, *Treponema pallidum* yang tumbuh pada testis kelinci, dan bakteri intraseluler yang hanya tumbuh pada sel inangnya.
- e. Media selektif: media ini diperlukan untuk menekan pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan dan memperbesar pertumbuhan bakteri yang dimaksud. Seperti *Saboraud's Dextrose Agar* yang digunakan untuk mengisolasi ragi pada pH 5,6 dan *Brilliant Green Agar* untuk mengisolasi bakteri gram negative seperti *Salmonella* serta *Bismuth Sulphite Agar* untuk mengisolasi *Salmonella typhi*.

- f. Media pembeda: media ini digunakan untuk membantu melihat dengan jelas koloni dari organisme yang diinginkan. Seperti *Blood Agar* untuk melihat adanya bakteri yang dapat merusak sel darah merah yaitu *Streptococcus pyogenes*.
- g. Media selektif dan pembeda: media ini digunakan untuk membedakan koloni dari organisme yang diinginkan serta menghalangi tumbuhnya mikroba lain. Seperti *Mannitol Salt Agar* untuk memperjelas dan selektif terhadap *Staphylococcus aureus* dan *MacConkey Agar* untuk memperjelas dan selektif terhadap *Salmonella*.
- h. Media penyubur: media ini digunakan untuk menumbuhkan mikroba yang mungkin ditemukan dalam jumlah sedikit. Tidak seperti media selektif, media ini tidak diperlukan untuk menekan pertumbuhan mikroba lain.

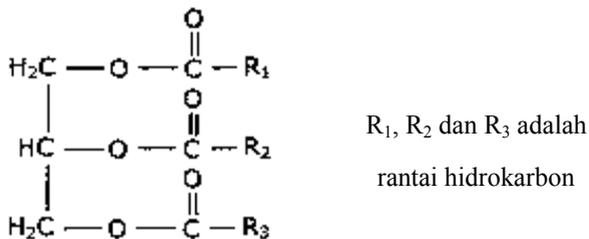
Media pertumbuhan mikroba tersebut disesuaikan dengan keperluan makanan dan lingkungan yang diperlukan. Menurut Black (2002), faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah suhu, derajat keasaman dan jumlah oksigen yang diperlukan. Berdasarkan rentang suhu, bakteri dapat dikelompokkan menjadi psikrofil (bakteri yang tumbuh pada suhu 0°C-20°C), mesofil (bakteri yang tumbuh pada 20°C-45°C), termofil (bakteri yang tumbuh pada suhu 35°C atau lebih). Perubahan suhu dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perubahan karakteristik mikroba. Faktor lingkungan kedua yaitu derajat keasaman (pH). Rentang pH yang diperlukan oleh bakteri antara 4-9 dengan pH optimum pada rentang 6,5-7,5 sedangkan jamur optimum tumbuh pada pH 4-6. Agar pH tetap konstan maka diperlukan penambahan larutan penyangga/*buffer* sesuai media dan jenis mikroorganisme. Faktor ketiga yaitu banyaknya jumlah oksigen yang diperlukan oleh mikroba. Berdasarkan kebutuhannya terhadap oksigen, mikroorganisme dibagi menjadi empat kelompok yaitu mikroorganisme aerob yang memerlukan oksigen, mikroorganisme anaerob yang tidak memerlukan oksigen karena tidak memiliki enzim katalase yang dapat

menguraikan H_2O_2 menjadi air dan oksigen, mikroorganisme fakultatif anaerob dan mikroaerofilik yaitu mikroorganisme yang memerlukan oksigen dalam jumlah terbatas dan apabila berlebih akan menimbulkan kematian. faktor lingkungan terakhir yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah salinitas (kebutuhan garam) yang dapat dikelompokkan menjadi non halofil, halotoleran, halofil dan halofil ekstrim.

2.4. Asam Lemak

2.4.1. Karakterisasi dan Jenis Asam Lemak

Leماج, minyak, dan trigliserida merupakan senyawa turunan asam lemak yang tersusun atas komponen yang sama yaitu triasilgliserol. Senyawa triasilgliserol yaitu senyawa hasil gabungan antara gugus karboksil ($-COOH$) pada asam lemak dan gugus hidroksil ($-OH$) pada gliserol melalui reaksi esterifikasi atau transesterifikasi. Gambar 2. 4. (Simpson, 2012) berikut menunjukkan struktur umum dari senyawa triasilgliserol.

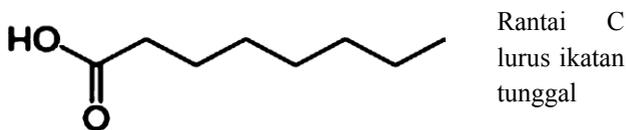


Gambar 2. 4. Struktur umum triasilgliserol

Selain trigliserida, senyawa lain yang merupakan turunan asam lemak yaitu fosfolipid dan glikolipid yang terletak pada membran sel. Dengan bentuk turunan yang beragam, senyawa ini sangat penting bagi kelangsungan makhluk hidup bersel satu dan bersel banyak baik jenis hewan maupun tumbuhan. Selain itu asam lemak juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar juga dapat berperan sebagai hormon dan cakra intrasel (Rusdiana, 2004). Rantai sederhana dari senyawa asam lemak pada umumnya adalah $CH_3-[CH_2]_n-COOH$ (Simpson, 2012).

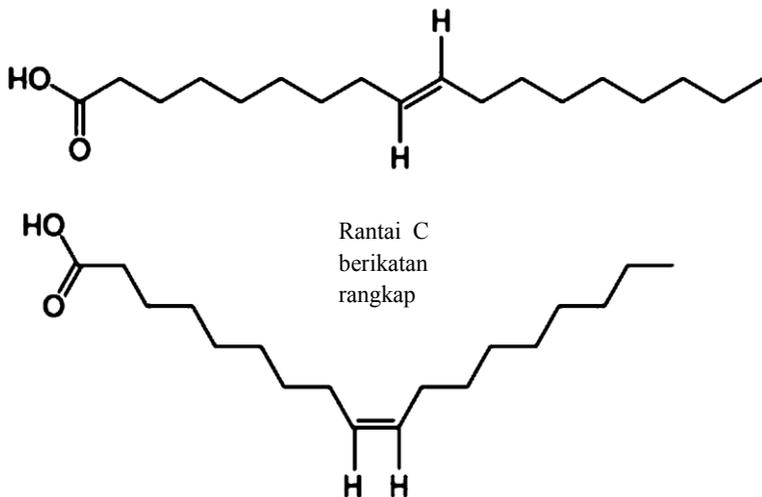
Asam lemak termasuk golongan senyawa organik nonpolar yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik seperti dietileter, kloroform, dan benzena. Sifat kepolaran yang mirip menjadi satu alasan mengapa asam lemak larut dalam pelarut organik tersebut. Secara umum, asam lemak merupakan senyawa hidrokarbon rantai panjang dan tidak bercabang. Asam lemak juga merupakan nama lain dari asam karboksilat karena mempunyai gugus karboksil (Herlina, dkk, 2009). Jenis asam lemak yang telah dikenal hingga kini yaitu asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh. Perbedaan klasifikasi tersebut ditentukan atas ada atau tidaknya ikatan rangkap yang terdapat pada asam lemak.

Seperti yang tampak pada Gambar 2. 5. (Sartika, 2008) bahwa asam lemak jenuh merupakan jenis asam lemak dengan ikatan tunggal pada rantai karbonnya. Sedangkan Gambar 2. 6. (Schieberle, dkk, 2009) menunjukkan asam lemak tak jenuh yang memiliki ikatan rangkap pada rantai karbonnya. Jumlah ikatan rangkap yang umum dimiliki oleh asam lemak tak jenuh pada lemak yaitu satu ikatan sedangkan ikatan rangkap pada minyak berjumlah dua atau lebih yang sering disebut dengan *polyunsaturated* (Sartika, 2008).



Gambar 2. 5. Asam lemak jenuh

Secara fisik lemak hewani berupa zat padat dan lemak nabati berwujud cair (minyak) bila diletakkan pada suhu kamar. Selain itu lemak yang mengandung asam lemak jenuh mempunyai titik lebur tinggi berkisar 85°C dan lemak yang mengandung asam lemak tak jenuh mempunyai titik lebur rendah berkisar $-7,9^{\circ}\text{C}$ (Schieberle, dkk, 2009). Selain perbedaan ikatan rangkap, hal lain yang menyebabkan kenaikan titik lebur asam lemak adalah menurunnya jumlah ikatan cis-terisolasi pada senyawa tersebut. Adanya ikatan rangkap cis pada rantai panjang senyawa asam lemak menyebabkan struktur menjadi bengkok sehingga asam lemak tersebut lebih sulit dalam pembentukan kristal dibandingkan dengan senyawa jenuh dengan jumlah karbon dan panjang senyawa sama (Ngili, 2009). Pada Gambar 2. 6. berikut ditunjukkan perbedaan antara struktur cis- dan trans- secara umum.



Gambar 2. 6. Struktur trans- (atas) dan cis- (bawah) pada asam oleat (asam lemak tak jenuh)

Secara kimiawi asam lemak bisa diolah dengan berbagai reaksi salah satunya adalah reaksi esterifikasi untuk mengubah asam lemak bebas menjadi senyawa ester. Reaksi lain yang dapat digunakan untuk memecah lemak dan minyak menjadi asam lemak bebas dan gliserol yaitu reaksi hidrolisis. Selanjutnya ada reaksi penyabunan yang dilakukan dengan cara menambahkan larutan basa pada trigliserida. Terdapat pula reaksi hidrogenasi untuk menjernihkan asam lemak atau minyak. Selain itu ada pula pembentukan keton dan oksidasi (Schieberle, dkk, 2009).

Sifat fisik trigliserida ditentukan oleh sifat asam lemak penyusunnya. Faktor-faktor yang umum diketahui adalah semakin panjang rantai hidrokarbon asam lemak penyusun trigliserida maka titik leleh senyawa tersebut akan semakin tinggi. Kedua, semakin banyak jumlah ikatan rangkap pada asam lemak penyusun trigliserida maka titik leleh akan semakin tinggi apabila senyawa tersebut tersusun dalam konformasi trans. Ketiga, letak gugus hidroksi pada asam lemak juga mempengaruhi sifat fisik asam lemak tersebut (Page & Soendoro, 1985).

2.4.2. Asam Lemak *Rhodotorula*

Berdasarkan sistem klasifikasi organisme modern (sistem lima kingdom), bakteri digolongkan pada kingdom monera atau disebut kingdom prokariotik. Selain bakteri, yang termasuk dalam kingdom monera yaitu *mycoplasma*, *cyanobacteria*, *archaebacteria*, dan *astinomycota* (Stewart, 2008). Istilah ‘bakteri’ berasal dari bahasa Yunani yaitu *bakterion* yang berarti tongkat atau batang. Namun kata ‘bakteri’ kini digunakan untuk menyebut mikroba bersel satu/tunggal (Adam, 1992). Selain kingdom prokariotik, sel tunggal juga dimiliki oleh beberapa spesies kingdom eukariotik dan beberapa spesies kingdom ragi.

Secara umum, spesies bersel tunggal tersusun atas materi-materi seperti pada satu keping sel hewan yaitu membran sel, membran plasma, ribosom, dan bahan genetik. Bahan genetik

yang dimiliki oleh mikroorganisme sederhana yaitu DNA (*Deoxyribose Nuclei Acid*) dan RNA (*Ribose Nuclei Acid*) yang mengandung asam lemak. Selain kedua senyawa tersebut, membran sel hewan/organisme sederhana tersusun atas protein dan lemak yang disebut senyawa lipoprotein (Gajera, dkk, 2008). Pada membran sel mikroorganisme, lipid yang dimiliki tersusun atas asam lemak rantai panjang dengan jumlah hidrokarbon antara empat hingga duapuluh empat. Semakin panjang rantai hidrokarbon pada membran, maka asam lemak dari suatu mikroorganisme bersifat lebih hidrofobik. Selain itu terdapat lemak dan protein pada membran sel hewan yang menyebabkan membran menjadi lebih fleksibel dan tidak kaku. Perpaduan inilah yang menyebabkan membran dapat menyerap molekul polar dan nonpolar karena mempunyai sisi hidrofobik dari lemak dan sisi hidrofilik dari protein (Gajera, dkk, 2008).

Penelitian mengenai asam lemak yang terkandung pada beberapa genus *Rhodotorula* telah banyak dilakukan. Seperti *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, dan *Rhodotorula graminis*. Selain bahan genetik (DNA dan RNA), komposisi asam lemak pada mikroorganisme juga menjadi kriteria penting pada pengelompokan taksonomi berdasarkan asam lemak yang diproduksinya (Galzy, dkk, 1995). Berikut adalah Tabel 2. 1. yang menunjukkan hasil penelitian dari Deinema dan Landheer pada tahun 1960 serta Spencer dan Tulloch pada tahun berikutnya 1964.

Tabel 2. 1. Komposisi asam lemak *Rhodotorula graminis* yang ditumbuhkan pada media glukosa

| Asam Lemak | Persen Berat (%) | |
|--|---|---|
| | Prosentase asam lemak intraseluler (Deinema & Landheer, 1960) | Prosentase asam lemak ekstraseluler (Spencer & Tulloch, 1964) |
| Asam miristat | 0,5 | 1,3 |
| Asam laurat | 1,0 | - |
| Asam palmitat | 22,5 | 21,6 |
| Asam stearat | 1,0 | 2,3 |
| Asam palmitoleat | 3,5 | 1,6 |
| Asam oleat | 63,5 | 61,0 |
| Asam linoleat | 6,5 | 11,3 |
| Tidak teridentifikasi | 1,5 | 0,2 |
| Iodin <i>value</i> | 72,0 | - |
| Iodin <i>value</i> (dari hasil perhitungan: data analisa kromatografi) | 71,0 | - |

2.5. Metode Isolasi Asam Lemak

Metode ekstraksi digunakan untuk mengisolasi lipid yang terdapat dalam mikroorganisme. Metode ini merupakan proses pemisahan satu atau lebih senyawa menggunakan prinsip kelarutan senyawa-senyawa tersebut pada dua fasa berbeda yang digunakan. Metode ekstraksi yang sering dilakukan dalam mengisolasi lipid mikroba adalah ekstraksi padat-cair atau biasa disebut ekstraksi pelarut. Pada ekstraksi padat-cair, senyawa yang akan diekstrak terdapat dalam fasa padat dan efisiensi metode tersebut ditentukan oleh ukuran zat organik yang terkandung

dalam zat padat serta banyaknya kontak langsung antara zat organik dengan pelarut (Devianti, 2012).

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus disesuaikan dengan sifat dari senyawa yang akan diambil. Pada tahun 1959, Bligh dan Dyer menggunakan pelarut kloroform dan metanol dalam proses ekstraksi untuk memperoleh pelarut yang bersifat semipolar. Selain kepolaran, sifat lain dari pelarut yang perlu diperhatikan adalah harga, keberadaan, titik didih, dan kedekatannya dengan air. Berdasarkan sifat tersebut, pelarut organik yang umum digunakan dalam proses ekstraksi adalah heksana, eter, kloroform, aseton serta berbagai macam alkohol. Tabel 2. 2. dan Tabel 2. 3. berikut menunjukkan nilai titik didih dari beberapa jenis pelarut yang sering digunakan pada saat ekstraksi.

Tabel 2. 2. Nilai titik didih dari berbagai jenis pelarut nonpolar

| Pelarut Nonpolar | Rumus Kimia | Titik Didih (°C) | Momen Dipol (Debye) |
|------------------|---|------------------|---------------------|
| Dietil Eter | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$ | 35 | 1,15 |
| Kloroform | CHCl_3 | 61 | 1,04 |
| n-Heksana | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ | 69 | 0 |
| Toluena | $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$ | 111 | 0,37 |

(Carey & Sundberg, 2007)

Tabel 2. 3. Nilai titik didih dari berbagai jenis pelarut polar

| Pelarut Polar | Rumus Kimia | Titik Didih (°C) | Momen Dipol (Debye) |
|---------------|---|------------------|---------------------|
| Diklorometana | CH_2Cl_2 | 40 | 1,46 |
| Aseton | $\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$ | 56 | 2,88 |
| Metanol | $\text{CH}_3\text{-OH}$ | 65 | 1,7 |
| Etil Asetat | $\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$ | 77 | 1,81 |
| Air | H-O-H | 100 | 1,85 |
| Asam Asetat | $\text{CH}_3\text{-COOH}$ | 118.1 | 1,7 |

(Carey & Sundberg, 2007)

2.6. Metode Analisa Asam Lemak

2.6.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

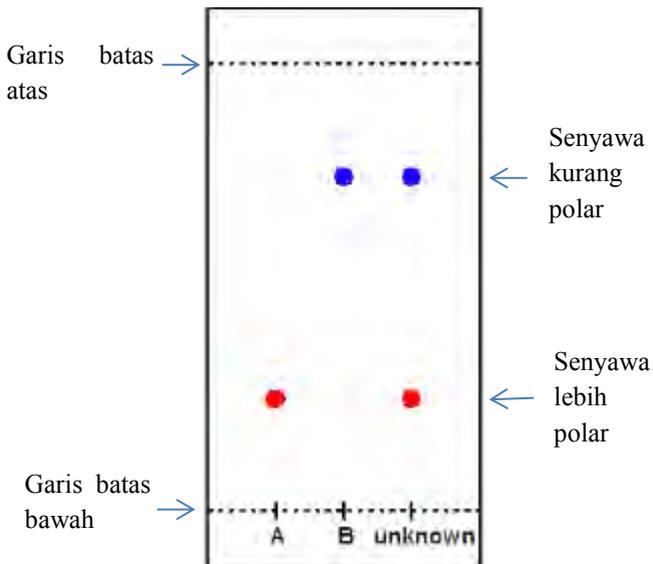
Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode analisa kualitatif untuk mendeteksi keberadaan komponen-komponen yang terdapat dalam suatu senyawa. Komponen-komponen tersebut dipisahkan berdasarkan perbedaan kepolaran masing-masing zat. Dalam penggunaan metode ini tidak diperlukan waktu yang lama dengan hasil pemisahan yang baik dan tidak memerlukan sampel dalam jumlah banyak (Brady, 1994).

Fasa diam yang digunakan dalam teknik ini adalah plat silika gel, alumina atau serbuk selulosa. Plat silika gel bersifat polar karena mengandung gugus hidroksil. Selain itu, fase diam juga harus dapat berpendar di bawah sinar ultraviolet. Sedangkan fase geraknya (eluen) disesuaikan dengan jenis sampel yang akan dipisahkan. Setelah pelarut (fase gerak) mencapai garis batas atas pada plat silika gel (fasa diam), maka letak noda senyawa dibandingkan dengan jarak tempuh pelarut. Perhitungan ini

disebut Rf (derajat retensi suatu komponen dalam fasa diam). Berikut adalah rumus perhitungan dari nilai Rf.

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Oleh karena itu Rf disebut juga faktor retensi. Semakin besar nilai Rf sampel maka semakin besar pula jarak gerak senyawa pada plat kromatografi lapis tipis begitu juga sebaliknya. Nilai Rf dapat menjadi bukti dalam identifikasi senyawa yang memiliki karakteristik sama atau mirip ketika nilai Rf keduanya memiliki nilai sama atau hampir sama (Sastrohamidjojo, 1985). Berikut pada Gambar 2. 7. merupakan contoh hasil yang akan diperoleh pada penggunaan metode KLT.

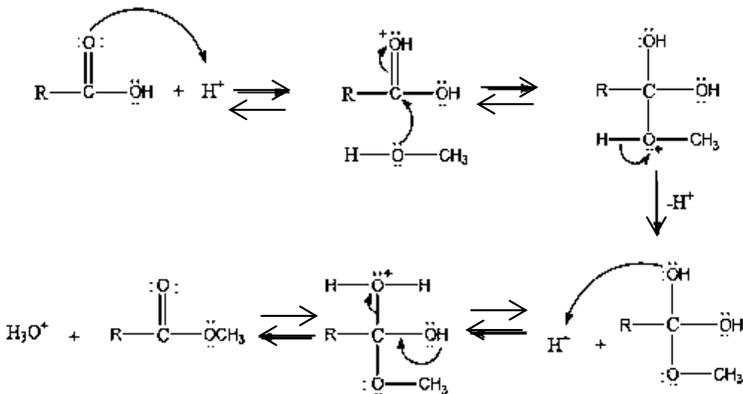


Gambar 2. 7. Ilustrasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.6.2. Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

Metode ini merupakan teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi antara dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Pemisahan campuran menggunakan suhu tinggi dalam rentang waktu yang cukup lama menyebabkan campuran senyawa mudah menguap tersebut akan terpisah perlahan-lahan sehingga diperlukan perubahan senyawa asam lemak yang akan diuji menjadi senyawa mudah menguap yaitu senyawa metil ester. Beberapa proses yang dapat dilakukan untuk mengubah asam lemak menjadi metil ester yaitu proses esterifikasi dan proses transesterifikasi.

Esterifikasi merupakan tahap pembentukan metil ester apabila jumlah kandungan asam lemak bebas pada senyawa uji lebih besar dari 4%. Dalam proses ini diperlukan katalis asam kuat seperti asam sulfat, asam sulfonat organik, resin penukar kation asam kuat (Soerawidjaja, 2006). Berikut Gambar 2. 8. memberikan contoh bagaimana proses esterifikasi terjadi.



Gambar 2. 8. Mekanisme reaksi esterifikasi asam lemak dengan katalis asam

Berikut adalah beberapa faktor yang mempengaruhi reaksi esterifikasi (Hindarso, dkk, 2003):

a. Waktu reaksi

Semakin lama waktu reaksi maka akan memperbanyak jumlah kontak antar senyawa sehingga akan menghasilkan metil ester lebih banyak. Ketika mencapai kesetimbangan reaksi maka penambahan waktu reaksi tidak akan memperbanyak hasil reaksi.

b. Pengadukan

Dengan melakukan pengadukan maka frekuensi tumbukan antar molekul pereaksi semakin bertambah. Hal ini menyebabkan reaksi terjadi lebih cepat dan reaksi berjalan sempurna.

c. Katalisator

Katalis berfungsi untuk mempercepat suatu reaksi. Dengan menambahkan katalisator maka tenaga yang diperlukan untuk mencapai energi aktivasi akan berkurang karena katalis dapat menurunkan energi aktivasi. Konsentrasi katalis yang digunakan dalam reaksi esterifikasi pada umumnya sebanyak 1%-4% berat dari 10% berat campuran pereaksi.

d. Suhu reaksi

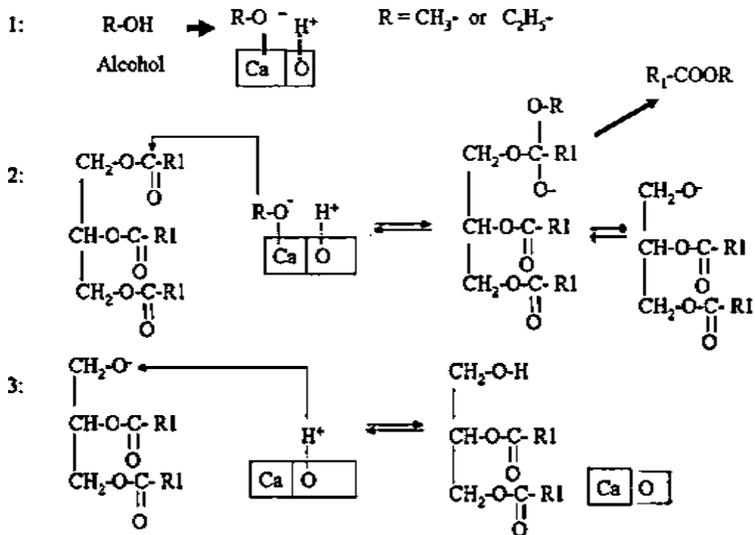
Suhu yang tinggi dapat mempercepat reaksi karena tumbukan antar molekul terjadi lebih cepat dari sebelumnya.

Berlawanan dengan proses sebelumnya, maka proses transesterifikasi dilakukan apabila kandungan asam lemak bebas pada senyawa uji kurang dari 4%. Selain jumlah asam lemak bebas, beberapa hal lain yang dapat mempengaruhi reaksi transesterifikasi adalah jenis dan konsentrasi katalis, rasio molar minyak terhadap alkohol, suhu reaksi, lama reaksi, kadar

kemurnian reaktan, kandungan ko-pelarut dengan penjelasan sebagai berikut (Mahajan, dkk, 2007):

- a. Kandungan air dan asam lemak bebas
Kandungan air dan asam lemak bebas yang terdapat pada reaktan menyebabkan terbentuknya sabun (reaksi saponifikasi) yang dapat mengurangi efek katalitik dan mengakibatkan menurunnya laju konversi metil ester (Kusdiana & Saka, 2004).
- b. Jenis dan konsentrasi katalis
Katalis yang dapat digunakan dalam reaksi transesterifikasi adalah katalis asam, basa maupun enzim. Diantara ketiga katalis tersebut, katalis basa lebih sering digunakan karena murah dan mudah ditemukan (Demirbas, 2008).
- c. Rasio molar minyak terhadap alkohol
Dengan perhitungan stoikiometri, setiap satu mol reaktan minyak pada reaksi transesterifikasi diperlukan 3 mol alkohol sehingga menghasilkan 3 mol metil ester dan satu mol gliserol. Penggunaan alkohol berlebih dapat meningkatkan jumlah hasil reaksi (metil ester).
- d. Ko-pelarut
Minyak dengan sifat nonpolar tentu tidak larut sempurna dalam pelarut metanol. Hal tersebut dapat menghambat terjadinya reaksi transesterifikasi sehingga diperlukan pelarut tambahan dengan sifat nonpolar dan monofase. Pelarut campuran itu disebut ko-pelarut untuk mempercepat proses reaksi.

Pada proses ini, pada umumnya asam lemak direaksikan dengan alkohol berlebih ditambah katalis basa. Gambar 2. 9. (Awaluddin, dkk, 2010) berikut merupakan contoh mekanisme reaksi transesterifikasi pada senyawa trigliserida menggunakan katalis basa.



Gambar 2. 9. Mekanisme reaksi transesterifikasi asam lemak dengan katalis basa

Setelah dilakukan perubahan senyawa asam lemak menjadi senyawa esternya maka diperlukan beberapa metode untuk memurnikan senyawa metil ester yang telah diperoleh tersebut yaitu sebagai berikut (Carolina, 2011):

a. Teknik separasi (pencucian dengan air)

Dengan air distilat, zat-zat pengotor seperti metanol, sisa katalis, gliserol dan sabun akan terpisah dari hasil reaksi yang diinginkan. Pada wadah, air dan zat terlarut di dalamnya akan berada di bagian bawah karena densitasnya

lebih besar daripada metil ester. Dengan meneteskan air perlahan-lahan dari atas secara merata, maka air akan turun membawa zat sisa yang tidak diinginkan.

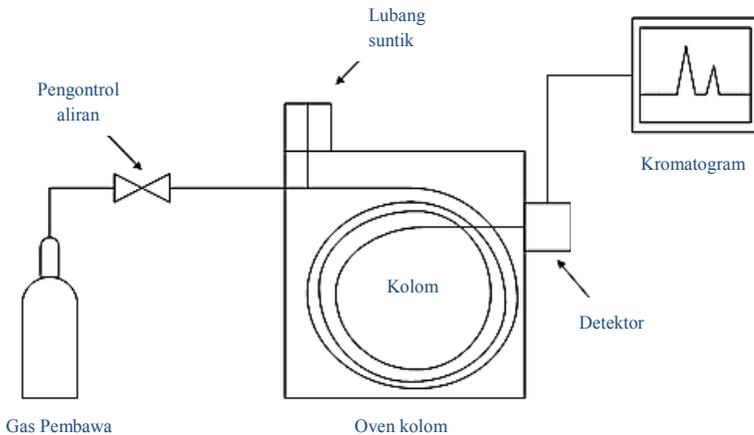
b. Teknik pengadukan (pencucian dengan air)

Metode ini dilakukan dengan kecepatan tinggi selama 5-10 menit. Dengan menambahkan air sebanyak jumlah metil ester yang diperoleh akan terbentuk emulsi dari campuran air-metil ester. Kemudian air dan metil ester terpisah dan metil ester terletak pada lapisan atas.

c. Aerasi

Teknik ini dilakukan dengan cara mengalirkan udara ke dalam metil ester selama 8-10 jam. Udara yang dihembuskan akan membawa alcohol dan katalis yang tidak bereaksi dan membentuk busa di permukaan.

Selanjutnya senyawa ester siap diuji dengan metode kromatografi gas. Metode ini merupakan metode gabungan antara metode ekstraksi dan destilasi. Berbeda dengan kromatografi lainnya, fase gerak pada kromatografi gas tidak bereaksi dengan analit dan hanya sebagai gas pembawa. Fasa gerak dalam metode ini adalah gas pembawa sampel yang dialirkan ke dalam kolom. Proses pemisahan komponen sampel pada kolom kromatografi gas dipengaruhi oleh interaksinya terhadap fasa diam. Jika fasa diam berupa padatan berpori maka akan terjadi proses absorbs dan bila fasa diam berupa cairan maka proses yang terjadi adalah partisi gas-cair (Kealay & Haines, 2002). Gambar 2. 10. (Devianti, 2012) berikut menunjukkan skema lengkap dari peralatan Kromatografi Gas (KG).



Gambar 2. 10. Skema peralatan kromatografi gas

Keterangan lengkap dari peralatan kromatografi gas di atas adalah sebagai berikut:

a. Fase gerak

Pada metode kromatografi gas (*Gas Chromatography*), fasa gerak yang digunakan yaitu berupa gas yang bertujuan untuk membawa solut (zat terlarut) menuju kolom. Gas yang dapat digunakan harus memenuhi syarat-syarat berikut yaitu gas inert (tidak reaktif dengan sampel atau pelarut) dan dapat dibeli dalam tingkat kemurnian yang tinggi, sesuai dengan detektor, serta dapat mengurangi difusi gas. Gas yang sering digunakan adalah helium dan argon yang tidak mudah terbakar namun sangat mahal meskipun memiliki nilai konduktivitas panas yang tinggi dan molekulnya kecil. Sehingga digunakan gas pembawa yang lebih murah yaitu hidrogen dan nitrogen. Kedua gas tersebut mudah terbakar sehingga harus berhati-hati dalam penggunaannya (Sastrohamidjojo, 1985).

b. Ruang suntik sampel

Ruang suntik sampel merupakan suatu lubang yang ditujukan sebagai tempat masuknya sampel secara cepat dan efisien. Saluran berupa tabung yang terbuat dari logam dan dilengkapi dengan septum karet pada salah satu ujung untuk mengakomodir adanya injeksi menggunakan *syringe*. Ada empat macam metode injeksi pada kromatografi gas, yaitu (Kenkel, 2002):

1. Injeksi langsung, yaitu sampel yang dimasukkan akan diuapkan terlebih dahulu di dalam *injector* panas kemudian dilakukan pemecahan.
2. Injeksi terpecah, yaitu sampel dimasukkan ke dalam *injector* panas dilakukan pemecahan terlebih dahulu.
3. Injeksi tanpa pemecahan, yaitu hampir semua sampel yang diuapkan dalam *injector* panas dibawa ke dalam kolom karena katup pemecah tertutup.
4. Injeksi langsung ke dalam kolom, yaitu ujung suntikan yang berisi sampel dimasukkan ke dalam kolom. Teknik ini digunakan pada senyawa-senyawa yang mudah menguap agar tidak mengalami peruraian akibat suhu tinggi (pirolisis).

c. Kolom

Kolom adalah tempat dimana terjadi proses pemisahan sampel. Kolom berisi komponen-komponen fase diam berupa tabung yang terbuat dari gelas atau logam (*stainless steel*, tembaga atau aluminium) dengan panjang sekitar 2-3 m dan diameter sebesar 2-4 mm. Tabung tersebut dibentuk spiral melingkar untuk hemat tempat dan mudah digunakan (Grob, 1995).

d. Detektor

Detektor merupakan perangkat penting dalam kromatografi gas. Terletak pada ujung keluar dari kolom pembawa komponen hasil pemisahan. Detektor dilengkapi dengan sensor elektronik yang berfungsi mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen yang terpisah menjadi sinyal elektronik. Sinyal elektronik kemudian menghasilkan kromatogram yaitu garis-garis puncak terhadap waktu. Waktu tambat dalam kromatogram merupakan data kualitatif sedangkan tinggi puncak dalam kromatogram menunjukkan data kuantitatif dari komponen yang terpisah.

e. Komputer

Keberadaan komputer yang telah dilengkapi perangkat lunak berguna untuk menerjemahkan sinyal-sinyal yang berasal dari detektor. Beberapa fungsi komputer antara lain (Kealay & Haines, 2002):

1. Memfasilitasi pengaturan parameter instrument seperti fase gas, suhu oven, dan penyuntikan sampel secara otomatis
2. Menampilkan kromatogram
3. Merekam data kalibrasi, retensi, serta perhitungan statistik lainnya
4. Menyimpan data parameter analisa untuk senyawa tertentu

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sterilisator (Steam pressure App) BJJ2-15-32. OSK 6508 Ogawa Seiki Jepang, Direct Air Flow HOTPACK model 524042 buatan Kanada sebagai ruang steril untuk pemindahan biakan. Inkubator dan *shaker* (pengocok otomatis) BARNSTEAD/THERMOLYNE model M 73730-26 USA digunakan untuk menginkubasi biakan dalam media padat dan cair. Liofilisator SNIJDERS Scientific b.v tipe 2040 buatan Belanda sebagai pengering biakan pada suhu rendah dan alat *sentrifuge* Kokusan H-107 OSK 6474B untuk memanen bakteri. Analisa kromatografi gas dilakukan dengan menggunakan KG-SM 6890 AGILENT. Disamping itu peralatan gelas yang lazim digunakan seperti erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, labu ukur, pipet tetes, pipet volume, spatula, dan peralatan lain.

3.2. Bahan

3.2.1. Sampel Ragi

Ragi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang.

3.2.2. Bahan Kimia

Media pertumbuhan ragi digunakan bahan kimia berupa glukosa, pepton, ekstrak yeast dan agar. Larutan metanol dan kloroform untuk mengekstrak lipid total dari sel kering. BF₃ dalam metanol (14%), toluen dan aquades untuk proses transesterifikasi. Serta petroleum eter, asam asetat glasial, dan dietil eter untuk proses kromatografi.

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Pembuatan Media Pertumbuhan

Terdapat dua jenis media pertumbuhan yang diperlukan yaitu media cair dan media padat. Bahan yang diperlukan dalam

pembuatan media cair yaitu glukosa sebanyak 10 g/L, pepton sebanyak 5 g/L, dan ekstrak yeast sebanyak 3 g/L. Ketiga bahan tersebut dilarutkan dalam aquades. Sedangkan untuk pembuatan media padat, bahan yang diperlukan yaitu glukosa sebanyak 10 g/L, pepton sebanyak 5 g/L, ekstrak yeast sebanyak 3 g/L, dan agar sebanyak 15 g/L. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades. Sterilisasi media menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Kongruang & dkk, 2014).

3.3.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Ragi

Satu koloni ragi *R. graminis* pada media padat dibiakkan ke dalam media cair 10 mL. Biakan ini selanjutnya diinokulasi (diinkubasi dengan penggoyangan) pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 35-45°C selama 1x24 jam. Selanjutnya biakan dipindahkan ke dalam media cair 50 mL dan diinokulasi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 35-45°C selama 1x24 jam.

Selanjutnya sebanyak 2,5 mL biakan yang berasal dari biakan 50 mL dipindahkan ke dalam 25 mL media cair baru (sejumlah 15 erlenmeyer). Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi setiap 6 jam dengan panjang gelombang maksimum 400 nm (Spencer & Tulloch, 1964).

3.3.3. Produksi Biomassa *R. graminis*

Satu koloni biakan ragi *R. graminis* pada media padat dimasukkan ke dalam media cair 10 mL pada labu erlenmeyer tertutup rapat. Kemudian biakan diinokulasi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 35-45°C selama 1x9 jam. Selanjutnya sebanyak 2,5 mL biakan yang berasal dari biakan 10 mL dipindahkan ke dalam 25 mL media cair baru pada labu erlenmeyer tertutup rapat dan diinokulasi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 35-45°C selama 1x9 jam. Selanjutnya biakan 25 mL dipindah ke dalam media cair 250 mL dan diinokulasi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 35-45°C sampai waktu stasioner (yang telah diketahui dari kurva pertumbuhan).

Total biakan yang akan dipanen sebanyak 1 L. Selanjutnya biakan yang akan diambil sebagai biomassa kemudian dipisahkan dari media cairnya menggunakan alat *sentrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 25°C. Kemudian biomassa dicuci dengan aquades (menggunakan teknik pemisahan) sebanyak tiga kali. Terakhir, sel basah tersebut kemudian ditimbang dan dikeringkan (liofilisasi) menggunakan alat *freeze dryer* selama 24 jam pada 1 atm dan suhu -88°C. Sel kering yang diperoleh kemudian ditimbang (Devianti, 2012).

3.3.4. Ekstraksi Lipid Total

Sel kering hasil biakan sebanyak 4 gram diekstrak sebanyak tujuh kali menggunakan 50 mL kloroform/metanol (2:1, v/v) dengan cara refluks selama satu jam pada suhu 45-55°C. Sampel berupa sel kering dihaluskan terlebih dahulu sebelum diekstrak. Hasil ekstraksi kemudian dipisahkan dari residunya menggunakan corong keramik dan dikondisikan dalam keadaan vakum. Hasil ekstraksi yang diperoleh kemudian dikeringkan dalam evaporator rotatif. Selanjutnya lipid total yang diperoleh ditimbang beratnya (Harsanto, 2009).

3.3.5. Analisa Asam Lemak

3.3.5.1. Analisa dengan Kromatografi Lapis Tipis

Lipid dan metil ester (hasil transesterifikasi lipid) yang diperoleh dari tahapan ekstraksi kemudian dianalisa menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan silika gel 60 F₂₅₄ sebagai adsorben (Devianti, 2012). Eluen yang digunakan dalam analisa yaitu campuran petroleum eter : dietil eter : asam asetat dengan perbandingan volume 3 : 3 : 2 dalam gelas kaca tertutup. Noda yang dihasilkan kemudian dilihat menggunakan sinar UV.

3.3.5.2. Analisa dengan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

Sebelum dilakukan uji KG-SM, lipid total yang diperoleh kemudian diubah menjadi metil ester dengan metode transesterifikasi. Lipid total hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu leher tiga dengan peralatan lengkap yaitu pemanas listrik dan

kondensor refluks, pengaduk magnetik, penangas air dan termometer. Kemudian ditambahkan BF₃-metanol (14%) pada lipid sesuai dengan perbandingan yang tertera pada Tabel 3. 1. berikut dan 10 mL toluena. Selanjutnya campuran di dalam labu *direfluks* pada suhu 60°C dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik pada kecepatan 300 rpm selama 30 menit (Devianti, 2012).

Tabel 3. 1. Perbandingan massa asam lemak dan kebutuhan BF₃-metanol dalam reaksi

| No | Massa asam lemak (mg) | Volum BF ₃ -metanol yang dibutuhkan (mL) |
|----|-----------------------|---|
| 1 | 100-250 | 5 |
| 2 | 250-500 | 7 |
| 3 | 500-750 | 9 |
| 4 | 750-1000 | 12 |

(Devianti, 2012)

Selanjutnya campuran homogen tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan didiamkan selama beberapa menit sampai terjadi pemisahan. Kemudian pisahkan lapisan-lapisan yang terbentuk dan lapisan atas dibiarkan berada di dalam corong pisah. Selanjutnya ditambahkan 2 mL aquades pada lapisan atas tersebut. Pencucian dengan aquades dilakukan beberapa kali sampai pH larutan menunjukkan pada angka 7. Terakhir, lapisan metil ester yang telah diperoleh tersebut ditimbang dan hasil yang diperoleh dihitung dengan persamaan berikut.

$$\% \text{ Hasil} = \frac{\text{massa produk (g)}}{\text{massa lipid (g)}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan analisa KG-SM pada metil ester yang telah diperoleh. Analisa metil ester dilakukan dengan KG-SM 6890 AGILENT pada kondisi reaksi sebagai berikut:

| | |
|--------------------------|---|
| Kolom | : HP-5MS 5% <i>Phenyl Methyl Silox</i> , panjang 30 m dengan diameter 250 μm . |
| Pengontrol aliran | : Tekanan |
| Tekanan | : 11,1 psi |
| Aliran dalam kolom | : 1,0 mL/menit |
| Suhu kolom | : 110°C |
| Suhu injektor | : 300°C |
| Pelarut | : Toluena |
| Gas pembawa | : Helium |
| Volum Injeksi | : 1,0 μL |
| Rasio split | : 50/1 |
| Aliran split | : 50 mL/menit |
| Program peningkatan suhu | : Suhu awal 110°C selama 1 menit kemudian dinaikkan hingga 250°C dengan kecepatan 10°C/menit. Kemudian suhu dipertahankan selama 20 menit pada 250°C. |

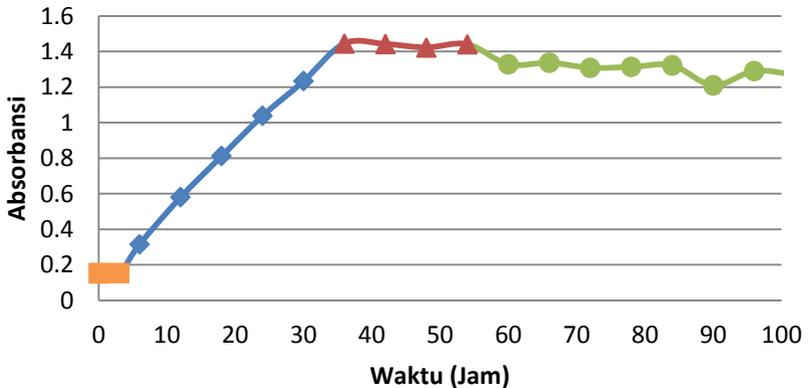
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan mikroba pada penelitian ini diuji menggunakan metode tidak langsung yaitu pengukuran yang dilakukan melalui kekeruhan/turbiditas sel. Dengan alat spektrofotometer dapat diketahui nilai kerapatan optik/*optical density* (OD) atau absorbansi (A). Metode tidak langsung merupakan metode yang mudah, cepat dan tidak merusak sampel. Akan tetapi tidak bisa diketahui jumlah sel hidup dan sel mati. Dengan demikian kurva pertumbuhan diperoleh dari hubungan nilai absorbansi dan waktu pengukuran (Black, 2002). Di bawah ini merupakan Gambar 4. 1. yang menunjukkan kurva pertumbuhan dari *R. graminis* yang dihasilkan selama penelitian.



Gambar 4. 1. Kurva pertumbuhan *Rhodotorula graminis*

Seperti telah disebutkan pada bab sebelumnya, kurva pertumbuhan diperlukan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan mikroorganisme. Sehingga peneliti dapat

mengetahui waktu yang tepat untuk melakukan pengambilan biomassa. Sel sejumlah satu koloni yang telah dibiakkan dan diinokulasi pada media cair, selanjutnya dipanen ketika mencapai fase stasioner, karena pada fase ini sel telah berkembangbiak secara optimal dan maksimal.

Hasil pengamatan yang diperoleh selama pertumbuhan sel dapat dilihat pada Gambar 4.1. bahwa sel telah mengalami 4 fase pertumbuhan. Fase pertama disebut fase lag yaitu fase adaptasi yang terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-3. Fase ini hanya terjadi sebentar dan tidak memerlukan waktu yang lama karena media pertumbuhan sudah sesuai dan tidak mengalami perubahan sehingga sel tidak perlu melakukan adaptasi terlalu lama. Pada fase ini juga, sel mulai mengalami peningkatan jumlah. Hal ini dapat dilihat bahwa kurva meningkat seiring bertambahnya waktu.

Selanjutnya fase kedua yang terjadi pada jam ke-3 hingga jam ke-36. Fase ini merupakan fase eksponensial atau disebut juga fase perbanyakan yaitu fase yang terjadi akibat dari meningkatnya jumlah biakan yang terdapat dalam media. Maka dalam kurva dapat kita lihat bahwa terjadi kenaikan absorbansi secara signifikan pada setiap waktu uji.

Fase selanjutnya yaitu fase stasioner. Fase ini merupakan petunjuk utama dalam pengambilan biomassa. Fase yang juga disebut fase konstan ini terjadi pada jam ke-36 hingga jam ke-54 namun tidak terlalu stabil. Dalam berbagai hasil penelitian juga telah disebutkan bahwa ragi *R. graminis* mempunyai waktu hidup yang sangat lama sehingga cenderung menghabiskan waktu. Pada umumnya, fase ketiga ditandai dengan hasil mendatar yaitu nilai absorbansi sama setiap waktu uji. Hal ini menunjukkan bahwa sel

sudah tidak dapat berkembangbiak lebih lanjut karena nutrisi yang tersedia telah banyak berkurang.

Fase terakhir adalah fase kematian yang terjadi di atas jam ke-54. Kurva fase yang disebut *death phase* ini cenderung menurun karena jumlah biomassa yang mati semakin banyak seiring berjalannya waktu. Hal ini terjadi akibat dari nutrisi yang terdapat dalam media semakin sedikit dan lama-kelamaan habis. Sehingga nilai absorbansi semakin berkurang pada waktu uji. Maka berdasarkan kurva yang telah diperoleh, pengambilan biomassa dilakukan pada jam ke-42 ketika terjadi fase stasioner.

4.2. Produksi Biomassa

Biomassa yang telah diinkubasi selama 42 jam kemudian diambil dengan cara memisahkannya dari media cair menggunakan peralatan *sentrifuge*. Teknik yang digunakan dalam metode ini adalah pemisahan berdasarkan ukuran dan berat molekul. Partikel yang mempunyai ukuran lebih besar atau lebih berat akan mengendap (Suhartono, 1989). Hasilnya, biomassa mengalami pengendapan dan media cair (supernatan) berada di atasnya setelah dipisahkan pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Biomassa yang diperoleh berwarna kemerahan dan supernatan berwarna kecoklatan. Kemudian biomassa dicuci dengan aquades untuk menghilangkan sisa-sisa media cair atau nutrisi yang tidak diserap oleh sel. Biomassa yang telah bersih ini kemudian disebut sel basah.

Selanjutnya sel basah dikeringkan (diliofilisasi) dengan metode *freeze dryer* pada tekanan 1 atm dan suhu -88°C untuk menghilangkan kandungan zat cair yang terjebak di dalam sel. Cara efektif untuk menghilangkan cairan tersebut adalah dengan penguapan atau pemecahan ikatan molekul-molekul air yang terdapat di dalam sel (Hasibuan, 2005). Hingga diperoleh sel

kering berwarna kemerahan. Berat sel kering yang diperoleh dari 1 L biomassa adalah 2,53 g dari jumlah sel basah sebesar 11,46 g.

4.3. Ekstraksi Lipid Total

Sel kering sebanyak 4,47 g yang akan diekstrak terlebih dahulu dihaluskan untuk meningkatkan luas permukaannya. Hal ini menyebabkan hasil ekstraksi yang diperoleh maksimal karena sampel telah mendekati ukuran partikel pelarut sehingga campuran menjadi homogen. Selanjutnya penggunaan pelarut disesuaikan dengan kepolaran lipid yang akan diekstrak. Maka digunakan campuran pelarut yaitu pelarut kloroform (nonpolar) dan pelarut metanol (polar). Dengan ini diharapkan semua jenis lipid yang terkandung dalam sampel terekstrak dengan sempurna (Bligh & Dyer, 1959) karena kedua pelarut akan bersifat semipolar bila telah disatukan.

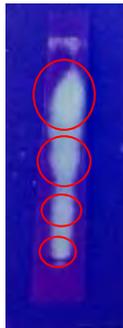
Selain itu, suhu yang digunakan dalam proses ekstraksi juga disesuaikan yaitu di bawah titik didih kedua pelarut. Hal ini agar pelarut tidak menguap sehingga lipid yang terekstrak di dalamnya dapat diperoleh. Hasil ekstraksi kemudian dikeringkan maka diperoleh lipid total sejumlah 1,91 g sehingga prosentase lipid total sejumlah 42,73% (w/w) dari sel kering. Jumlah ini termasuk sedikit apabila dibandingkan dengan berbagai referensi yang menyebutkan lipid total yang terdapat pada *R. graminis* dapat mencapai 70% (Compagno, dkk, 2012).

4.4. Analisa Asam Lemak

4.4.1. Analisa Lipid dan Asam Lemak dengan KLT

Analisa asam lemak dengan KLT bertujuan untuk mendeteksi keberadaan asam lemak secara kualitatif. Eluen atau fasa gerak yang digunakan adalah campuran dari petroleum eter:dietil eter:asam asetat (3:3:2). Perbandingan campuran homogen tersebut disesuaikan dengan sifat kepolaran lipid yang

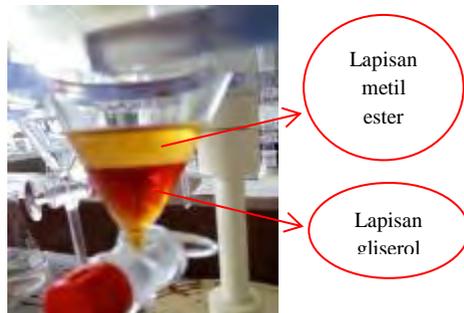
diperoleh. Sehingga semua senyawa yang terkandung dalam lipid dapat terpisah dan tampak jelas pada plat silika gel 60 F₂₅₄ yang digunakan sebagai fasa diam. Hasil kromatogram di bawah sinar UV 360 nm pada Gambar 2. memperlihatkan kromatogram lipid total hasil uji KLT. Adanya perbedaan letak noda menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai R_f. Hal ini menunjukkan adanya berbagai macam jenis lipid dalam lipid total yang diperoleh.



Gambar 4. 2. Kromatogram lipid total dengan eluen petroleum eter, dietil eter dan asam asetat (3:3:2)

4.4.2. Analisa Asam Lemak dengan KG-SM

Sebelum dilakukan uji KG-SM, lipid total yang diperoleh kemudian diubah menjadi metil ester dengan metode transesterifikasi. Transesterifikasi bertujuan untuk mengubah senyawa-senyawa jenis lipid menjadi senyawa metil ester untuk memudahkan karakterisasi dan analisa. Hasil transesterifikasi kemudian dipisahkan dan ditimbang sehingga menghasilkan beberapa lapisan. Gambar 4. 3. berikut menunjukkan adanya pemisahan senyawa pada hasil transesterifikasi yaitu lapisan berwarna kuning (atas) dan berwarna coklat (bawah).

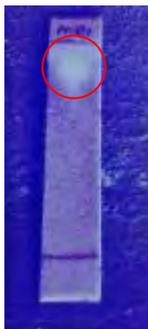


Gambar 4. 3. Lapisan yang terbentuk setelah proses penyetimbangan hasil transesterifikasi.

Pada proses ini lipid direaksikan dengan metanol dengan tambahan BF_3 sebagai katalis. Senyawa BF_3 merupakan katalis asam lewis yang umum digunakan untuk mempercepat proses transesterifikasi. Selain itu ditambahkan juga toluena yang berperan sebagai ko-pelarut. Penambahan ko-pelarut bertujuan untuk mempercepat reaksi karena terbentuknya sistem monofase (Mahajan, dkk, 2007) sehingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas merupakan lapisan metil ester dan lapisan yang berwarna lebih coklat adalah lapisan gliserol. Lapisan metil ester yang diperoleh kemudian dicuci dengan aquades untuk mengambil gliserol, sisa metanol, dan BF_3 yang masih terlarut didalamnya. Metil ester yang diperoleh sebanyak 1,48 g sehingga prosentase lipid yang diubah menjadi metil ester sebesar 77,49% (w/w). Hal ini sesuai dengan pernyataan Ichihara dan Fukubayashi (2010) yang menyatakan bahwa metil ester yang diperoleh dapat mencapai 99% menggunakan katalis BF_3 .

Selanjutnya asam lemak yang dihasilkan diuji dengan metode KLT untuk membandingkan adanya perubahan senyawa yang terjadi secara kualitatif setelah perlakuan transesterifikasi pada lipid yang diperoleh (Brady, 1994). Gambar 4.4. berikut

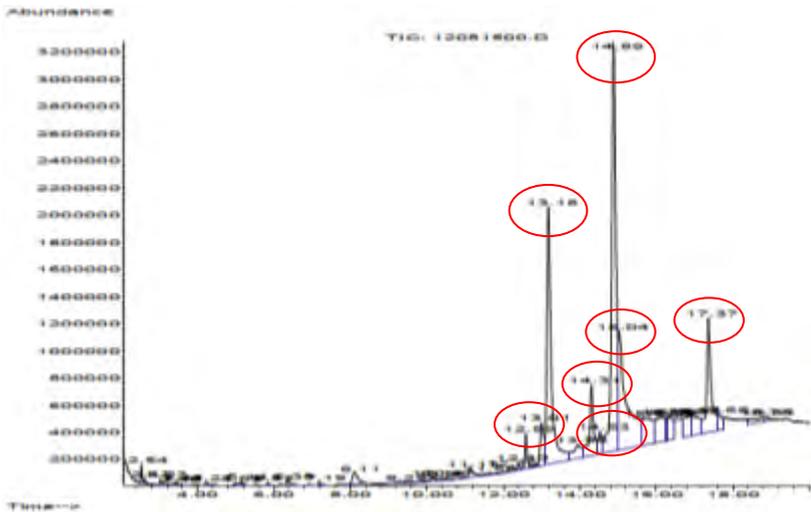
menunjukkan kromatogram metil ester menggunakan eluen yang sama seperti sebelumnya.



Gambar 4. 4. Kromatogram metil ester (hasil transesterifikasi lipid) dengan eluen petroleum eter, dietil eter dan asam asetat (3:3:2)

Apabila dibandingkan dengan Gambar 4.2. Terdapat perbedaan jumlah noda dan nilai Rf. Hal ini berarti bahwa senyawa jenis lipid lebih polar dibandingkan dengan senyawa metil ester. Sebab nilai Rf pada lipid total cenderung lebih kecil daripada metil esternya dan dapat dijelaskan bahwa proses transesterifikasi telah mengubah asam lemak/lipid menjadi metil ester karena berbagai noda lipid yang berada di bawah pada akhirnya terangkat semua ke atas.

Selanjutnya komponen dalam sampel metil ester hasil transesterifikasi diuji dengan metode KG-SM (kromatografi gas-spektroskopi massa). Metode ini digunakan karena senyawa metil ester merupakan senyawa volatil yang mudah terurai pada suhu tinggi. Hasil analisa metil ester dapat ditunjukkan oleh kromatogram KG pada Gambar 4. 5. berikut:



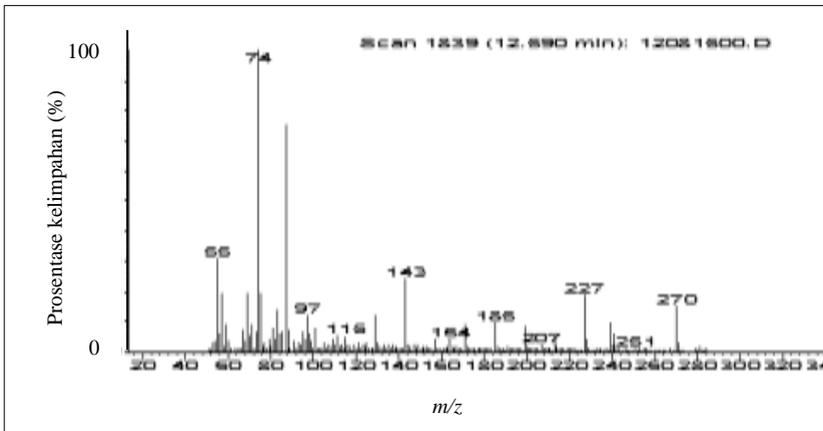
Gambar 4. 5. Kromatogram Kromatografi Gas senyawa metil ester

Tampak pada kromatogram bahwa terdapat 8 puncak tajam untuk asam lemak terindikasi pada *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 dari *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang. Penjelasan Gambar 4.5. diberikan pada Tabel 4. 1. berikut.

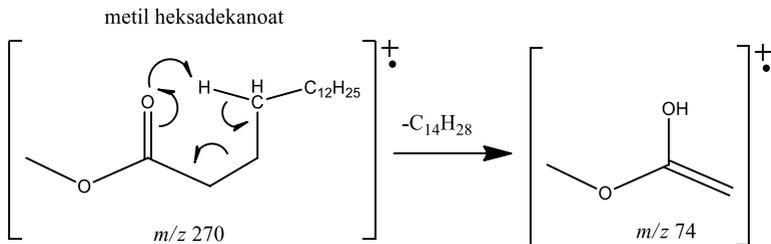
Tabel 4. 1. Pembacaan kromatogram KG-SM dari sampel hasil transesterifikasi

| No. | Jenis Asam Lemak | Waktu Retensi (menit) | Luas Area (%) | Tipe Asam Lemak |
|-----|------------------------------|-----------------------|---------------|------------------|
| 1 | Metil Heksadekanoat | 12,59 | 1,08 | Jenuh |
| 2 | Asam Z-7-Heksadekanoat | 13,01 | 2,34 | Tidak jenuh |
| 3 | Asam n-Heksadekanoat | 13,18 | 17,29 | Jenuh |
| 4 | Metil Oktadek-9-enoat | 14,31 | 4,43 | Tidak jenuh |
| 5 | Metil 14-Metil-Heptadekanoat | 14,53 | 1,37 | Rantai bercabang |
| 6 | Asam Oleat | 14,89 | 27,58 | Tidak jenuh |
| 7 | Asam Oktadek-9-enoat | 15,04 | 14,65 | Tidak jenuh |
| 8 | Bis(2-etilheksil) adipat | 17,37 | 8,08 | Rantai bercabang |

Senyawa pertama terdeteksi pada waktu retensi 12,59 yaitu metil heksadekanoat. Senyawa ini memiliki nama umum metil palmitat. Pada Gambar 4. 6. ditunjukkan spektra massa senyawa metil heksadekanoat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra tersebut mengacu pada *database* bahwa puncak dasar terjadi pada m/z 74 dan puncak molekul pada m/z 270. Berikut pada Gambar 4. 7. ditunjukkan struktur dan penataan ulang McLafferty serta Gambar 4. 8. menunjukkan pola fragmentasi yang terjadi pada metil heksadekanoat.



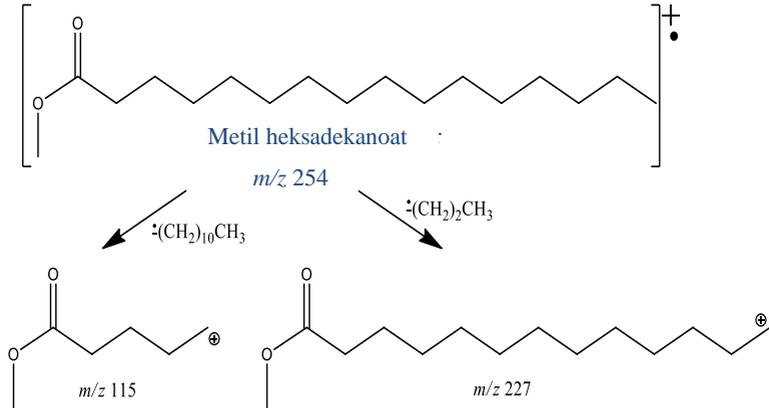
Gambar 4. 6. Spektra massa metil heksadekanoat pada waktu retensi 12,59



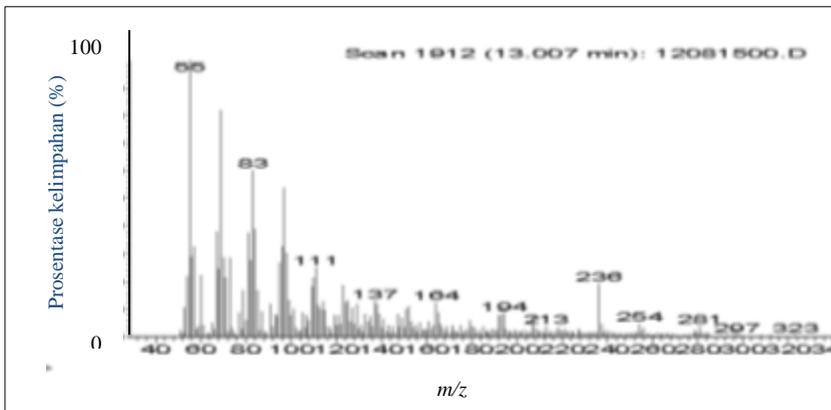
Gambar 4. 7. Penataan ulang McLafferty metil heksadekanoat

Senyawa berikutnya yang terdeteksi pada waktu retensi 13,01 adalah asam Z-7-Heksadekenoat. Senyawa ini memiliki nama umum asam hipogeat atau asam *cis*-palmitoleat. Pada Gambar 4. 9. ditunjukkan spektra massa asam Z-7-Heksadekenoat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra tersebut mengacu pada *database* bahwa puncak dasar terjadi pada m/z 55 dan puncak molekul pada m/z 254. Spektra massa tersebut pada beberapa nilai m/z kurang sesuai dengan *database* yang ada. Hal ini disebabkan karena detektor MS bersifat tentatif. Selanjutnya

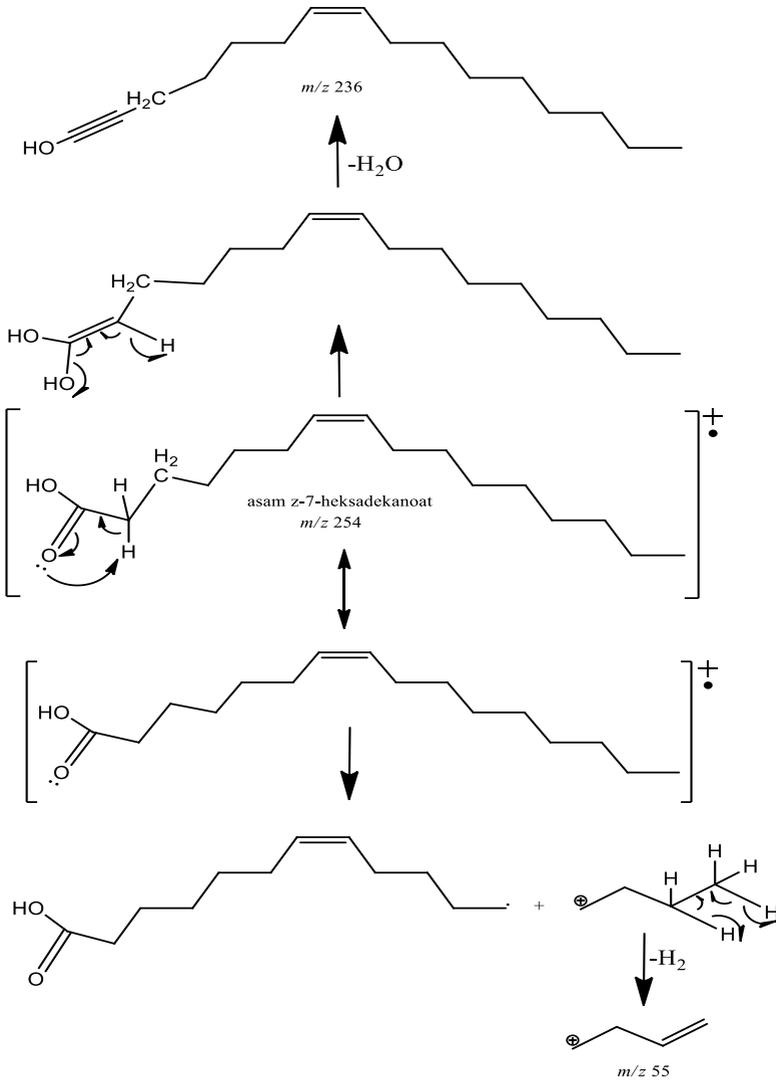
Gambar 4. 10. menunjukkan struktur pola fragmentasi yang terjadi pada asam Z-7-Heksadenoat.



Gambar 4. 8. Pola fragmentasi metil heksadekanoat

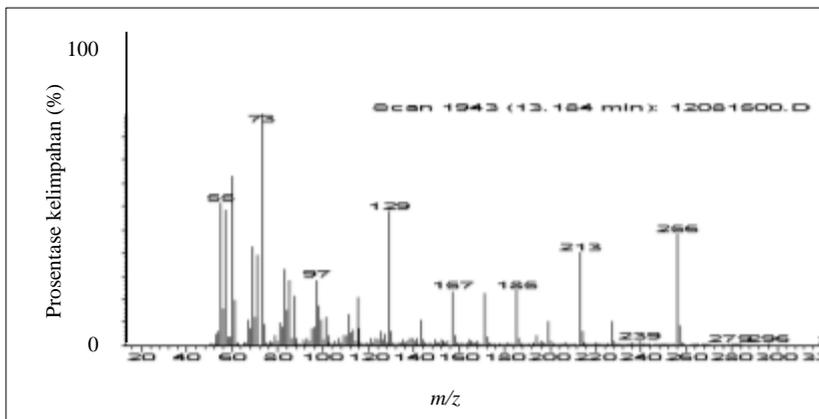


Gambar 4. 9. Spektra massa asam Z-7-Heksadenoat pada waktu retensi 13,01



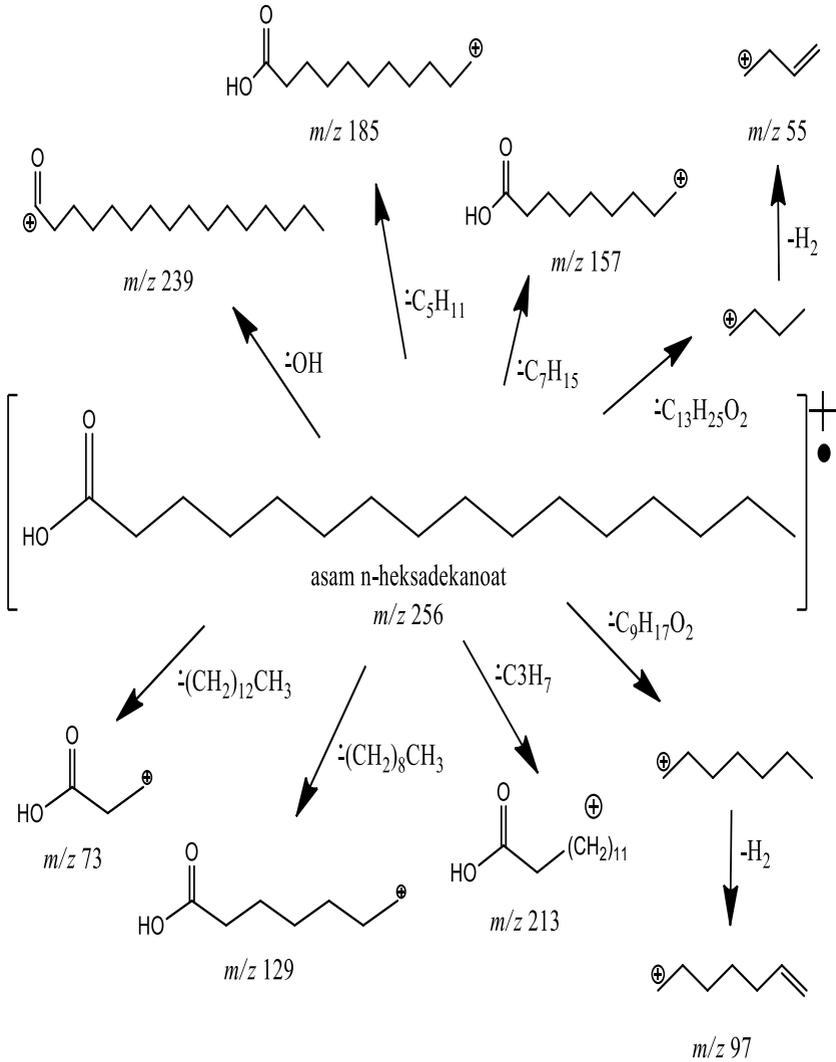
Gambar 4. 10. Pola fragmentasi asam Z-7-Heksadekanoat

Selanjutnya pada waktu retensi 13,18 terdeteksi senyawa asam n-heksadekanat. Senyawa ini memiliki nama umum asam palmitat atau *cetyllic acid*. Pada Gambar 4. 11. ditunjukkan spektra massa dari asam n-heksadekanat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra massa mengacu pada *database* bahwa puncak dasar terjadi pada m/z 73 dan puncak molekul pada m/z 256. Selanjutnya Gambar 4. 12. berikut menunjukkan pola fragmentasi yang terjadi pada asam n-heksadekanat.

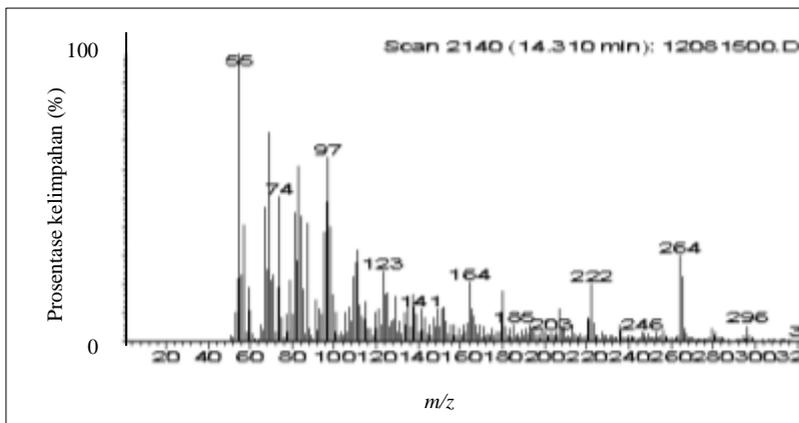


Gambar 4. 11. Spektra massa asam n-heksadekanat pada waktu retensi 13,8

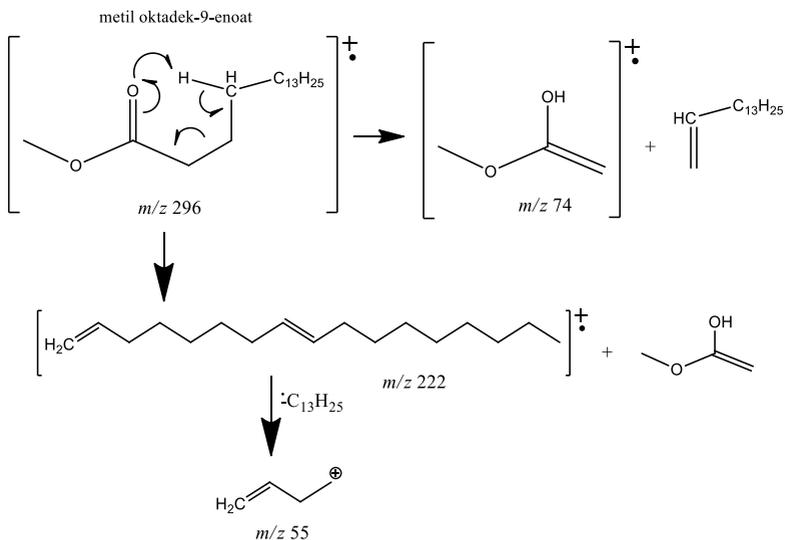
Senyawa berikutnya yang terdeteksi pada waktu retensi 14,31 adalah metil oktadek-9-enoat. Senyawa ini memiliki nama lain metil elaidat atau metil trans-oleat. Pada Gambar 4. 13. ditunjukkan spektra massa asam metil oktadek-9-enoat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra tersebut mengacu pada *database* bahwa puncak dasar terjadi pada m/z 55 dan puncak molekul pada m/z 296. Selanjutnya Gambar 4. 14. berikut menunjukkan penataan ulang McLafferty dan pola fragmentasi yang terjadi pada metil oktadek-9-enoat.



Gambar 4. 12. Pola fragmentasi lengkap asam n-heksadekanoat

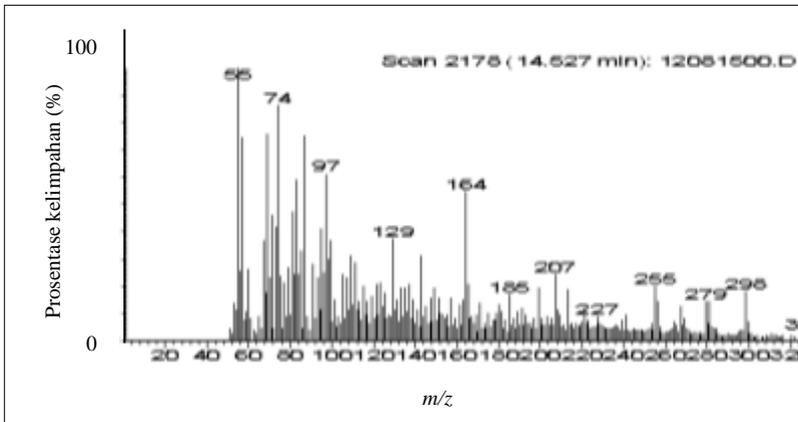


Gambar 4. 13. Spektra massa metil oktadek-9 enoat pada waktu retensi 14,31

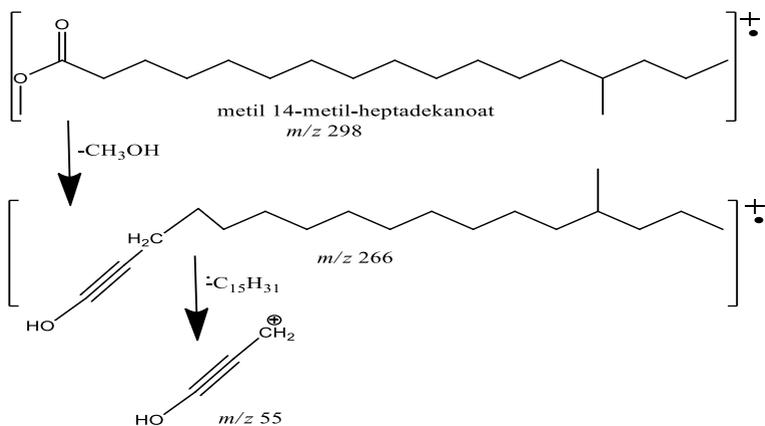


Gambar 4. 14. Penataan ulang McLafferty dan pola fragmentasi metil oktadek-9-enoat

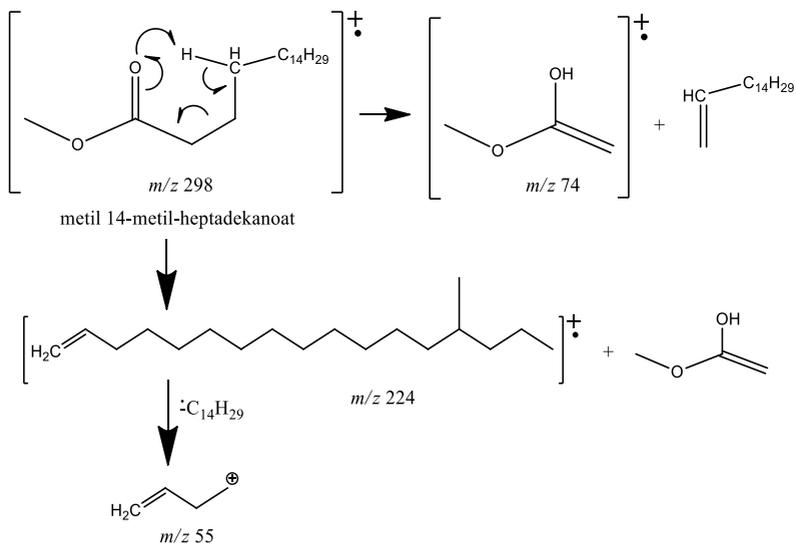
Berikutnya pada waktu retensi 14,53 terdeteksi senyawa metil 14-metil-heptadekanoat. Gambar 4. 15. berikut merupakan spektra massa metil 14-metil-heptadekanoat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra tersebut mengacu pada *database* namun terdapat perbedaan pada puncak dasar yang terbentuk. Fragmentasi metil 14-metil-heptadekanoat dalam sampel terjadi puncak dasar pada m/z 55 dan puncak molekul pada m/z 298. Sedangkan fragmentasi metil 14-metil-heptadekanoat dalam *database* terjadi puncak dasar pada m/z 74 dan puncak molekul pada m/z 298. Hal ini dikarenakan prediksi sampel pada *database* dalam detektor MS mendekati nilai dari metil 14-metil-heptadekanoat. Selanjutnya Gambar 4. 16. menunjukkan pola fragmentasi yang terjadi dan Gambar 4. 17. menunjukkan penataan ulang McLafferty pada metil 14-metil-heptadekanoat.



Gambar 4. 15. Spektra massa metil 14-metil-heptadekanoat pada waktu retensi 14,53

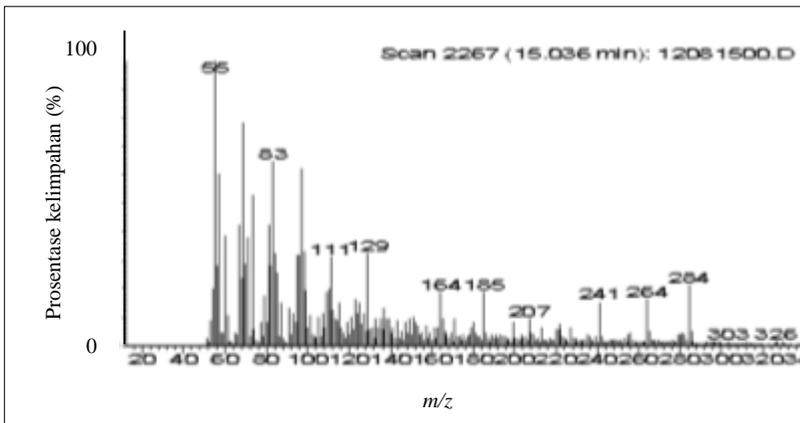


Gambar 4. 16. Pola fragmentasi metil 14-metil-heptadekanoat



Gambar 4. 17. Penataan ulang McLafferty metil 14-metil-heptadekanoat

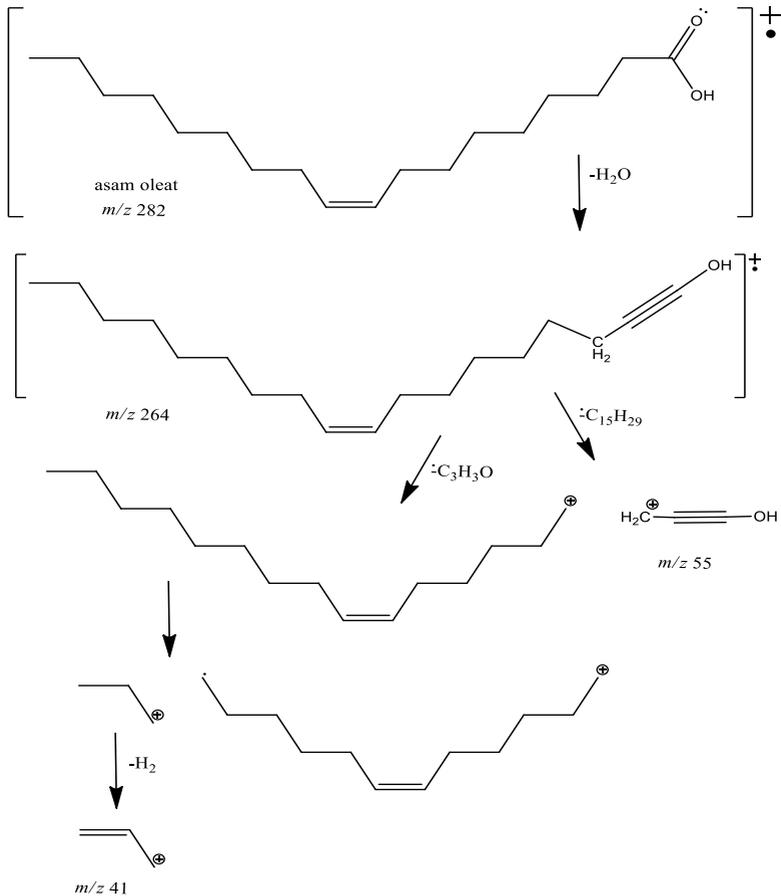
Selanjutnya pada waktu retensi 14,89 terdeteksi senyawa asam oleat. Senyawa ini memiliki nama IUPAC asam *cis*-9-oktadekanoat. Pada Gambar 4. 18. ditunjukkan spektra massa asam oleat yang terdapat pada sampel melalui metode KG-SM. Spektra ini berbeda dengan *database* pada puncak dasar yang muncul. *Database* menunjukkan bahwa puncak dasar terjadi pada m/z 41 sedangkan pada spektra berikut puncak dasar terjadi pada m/z 55. Pada keduanya, puncak molekul terjadi pada m/z 282. Hal ini dikarenakan prediksi sampel pada *database* dalam detektor MS tidak menyertakan nilai m/z di bawah 50. Selanjutnya Gambar 4. 19. menunjukkan pola fragmentasi asam oleat.



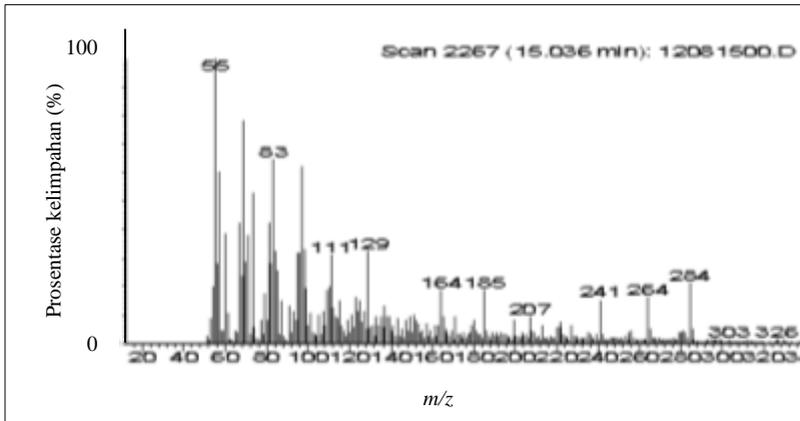
Gambar 4. 18. Spektra massa asam oleat pada waktu retensi 14,89

Selanjutnya pada waktu retensi 15,04 muncul senyawa asam oktadek-9-enoat. Senyawa ini memiliki nama IUPAC asam *trans*-oleat. Gambar 4. 20. berikut merupakan spektra massa asam oktadek-9-enoat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra ini berbeda dengan *database* pada puncak molekul yang muncul. *Database* menunjukkan bahwa puncak molekul terjadi pada m/z 282 sedangkan pada spektra berikut terjadi pada m/z 284. Pada

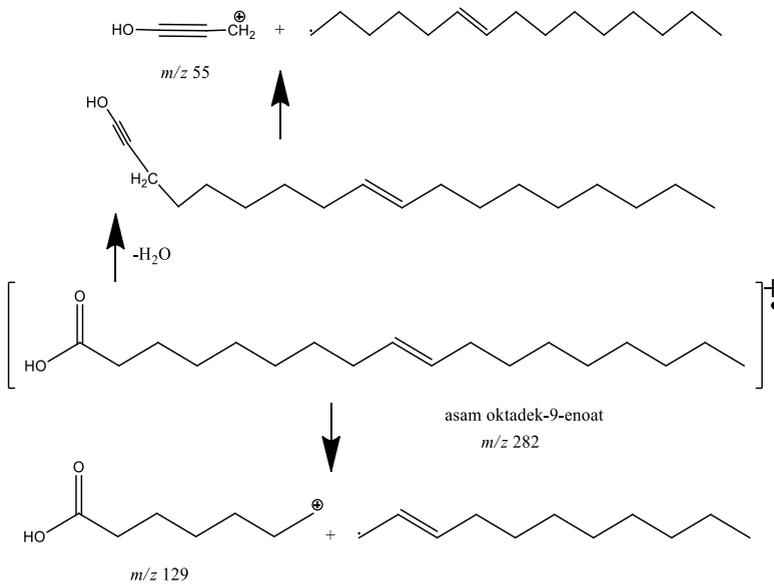
keduanya, puncak dasar terjadi pada m/z 55. Hal ini dikarenakan prediksi sampel pada *database* dalam detektor MS mendekati nilai dari asam oktadek-9-enoat. Selanjutnya Gambar 4. 21. menunjukkan pola fragmentasi yang terjadi pada asam oktadek-9-enoat.



Gambar 4. 19. Pola fragmentasi asam oleat

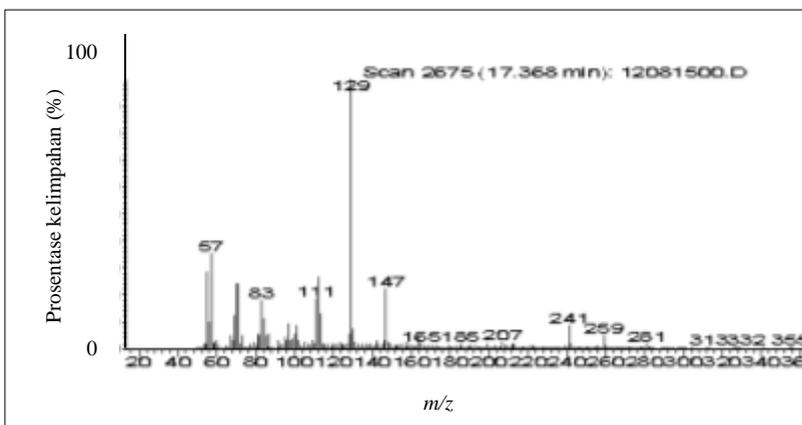


Gambar 4. 20. Spektra massa asam oktadek-9-enoat pada waktu retensi 15,04



Gambar 4. 21. Pola fragmentasi asam oktadek-9-enoat

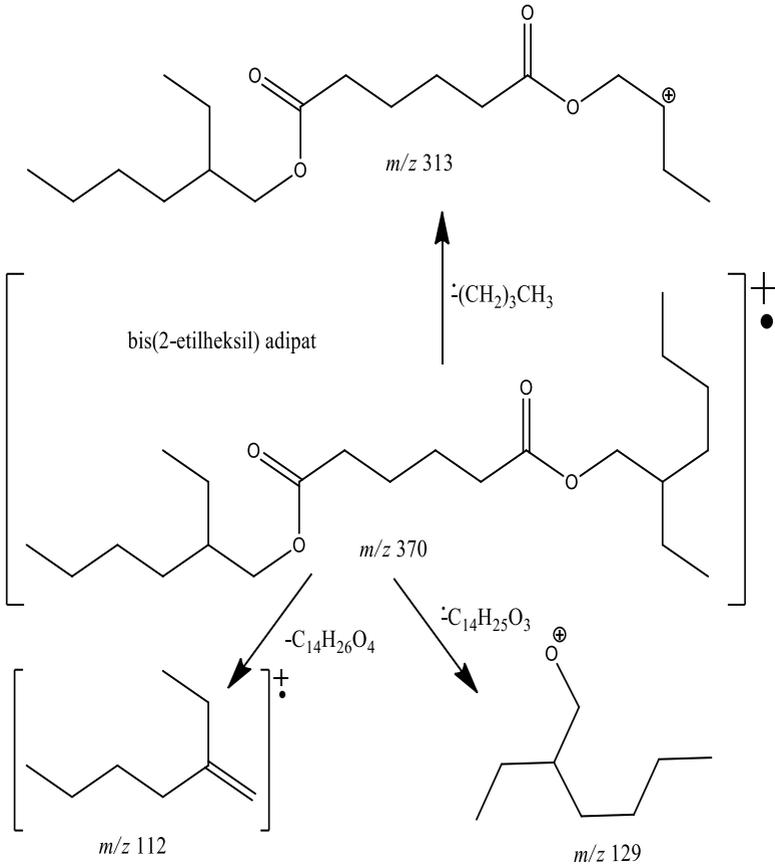
Senyawa terakhir yang terdeteksi pada waktu retensi 17,37 adalah bis(2-etilheksil) adipat. Senyawa ini memiliki nama lain asam adipat. Gambar 4. 22. berikut merupakan spektra massa bis(2-etilheksil) adipat yang diperoleh dari metode KG-SM. Spektra berikut seduai dengan *database* bahwa puncak dasar terjadi pada m/z 129 dan puncak molekul pada m/z 370. Selanjutnya Gambar 4. 23. menunjukkan pola fragmentasi yang terjadi pada bis(2-etilheksil) adipat.



Gambar 4. 22. Spektra massa bis(2-etilheksil) adipat pada waktu retensi 17,37

Hasil yang diperoleh dari data KG-SM tersebut secara umum dapat menjelaskan jenis asam lemak yang terkandung dalam sampel. Namun, metode KG-SM yang tentatif menyebabkan kurangnya ketelitian pembacaan data dari sampel sehingga data yang diperoleh belum sempurna. Penyempurnaan data dapat dilakukan dengan metode MS-MS. Jenis asam lemak pada sampel yang terdeteksi tersebut dapat dibandingkan dengan hasil penelitian Deinema dan Landheer (1960) serta Spencer dan Tulloch (1964). Pada Tabel 4. 2. diperlihatkan perbedaan dan

kesamaan asam lemak yang terkandung dalam *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 dibandingkan dengan penelitian sebelumnya.



Gambar 4. 23. Pola fragmentasi bis(2-etilheksil) adipat

Tabel 4. 2. Perbandingan beberapa jenis asam lemak dalam *Rhodotorula graminis*

| Asam Lemak dalam <i>Rhodotorula graminis</i> | Prosentase Asam Lemak dan Metil Ester (%) | | |
|--|---|---|---|
| | Prosentase berat asam lemak intraseluler (Deinema & Landheer, 1960) | Prosentase berat asam lemak ekstraseluler (Spencer & Tulloch, 1964) | Prosentase luas area asam lemak (GC) hasil penelitian |
| Asam miristat | 0,5 | 1,3 | 0 |
| Asam laurat | 1,0 | - | 0 |
| Asam palmitat | 22,5 | 21,6 | 1,08 (ester); 17,29 (asam) |
| Asam stearat | 1,0 | 2,3 | 0 |
| Asam palmitoleat | 3,5 | 1,6 | 2,34 |
| Asam oleat | 63,5 | 61,0 | 4,43 (ester); 42,23 (asam) |
| Asam linoleat | 6,5 | 11,3 | 0 |
| Asam adipat | - | - | 8,08 |
| Tidak teridentifikasi | 1,5 | 0,2 | 23,17 |
| Metil 14-metil-heptadekanoat | - | - | 1,37 |
| Iodin <i>value</i> | 72,0 | - | Tidak diuji |
| Iodin <i>value</i> (dari hasil perhitungan: data analisa kromatografi) | 71,0 | - | Tidak diuji |

Berdasarkan pada Tabel 4.2. tersebut dapat dilihat bahwa jenis asam lemak yang tidak terdeteksi dalam *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 asam miristat, asam laurat, asam stearat, dan asam linoleat. Selanjutnya jenis asam lemak yang tidak ada dalam *Rhodotorula graminis* pada penelitian sebelumnya adalah asam adipat dan metil 14-metil-heptadekanoat. Di dalam dunia industri, asam adipat dikenal dengan nama DEHA yang berguna sebagai bahan dasar dalam pembuatan plastik atau campuran PVC (polivinilklorida). Di Kanada, DEHA juga digunakan sebagai bahan dasar dalam pembuatan kosmetik, produk perawatan tubuh, pelapis interior, dan pelumas (Anonim., 2013). Selain itu di dalam suatu hasil penelitian disebutkan bahwa DEHA tersebar di berbagai mikroorganisme, salah satunya adalah spesies *Rhodotorula rubra* dan beberapa spesies dalam kingdom Yeast dan Bacteria (Bartko & Winkowski, 2012). Hal ini sangat mungkin terjadi karena kondisi lingkungan dan kondisi media yang digunakan berbeda. Sehingga hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa melalui metode analisa asam lemak dari suatu mikroorganisme dapat menjadi tolak ukur atau parameter pengelompokan mikroorganisme tersebut. Namun juga memiliki kelemahan karena asam lemak yang terkandung dalam mikroorganisme dipengaruhi kondisi lingkungan dan media.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dipaparkan, maka kesimpulan yang diambil adalah spesies *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 pada *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang mengandung beberapa jenis asam lemak yaitu metil heksadekanoat, asam Z-7-Heksadekenoat, asam n-heksadekanoat, metil oktadek-9-enoat asam oleat, asam oktadek-9-enoat, yang telah umum ditemukan pada spesies *R. graminis*. Sedangkan asam lemak jenis metil 14-metil-heptadekanoat dan bis(2-etilheksil) adipat yang tidak ditemukan pada *R. graminis* sebelumnya namun ditemukan pada genus *Rhodotorula* lainnya.

Secara umum persamaan *R. graminis* NBRC 0190 dengan *R. graminis* yang telah diteliti sebelumnya adalah keberadaan asam palmitat, asam oleat dan asam palmitoleat. Sehingga spesies *R. graminis* NBRC 0190 yang telah diteliti berikut dapat dimasukkan ke dalam genus *Rhodotorula spp.* Hal ini menunjukkan bahwa komposisi asam lemak pada mikroorganisme dapat digunakan sebagai metode untuk mengelompokkan atau mengklasifikasikan mikroorganisme tersebut.

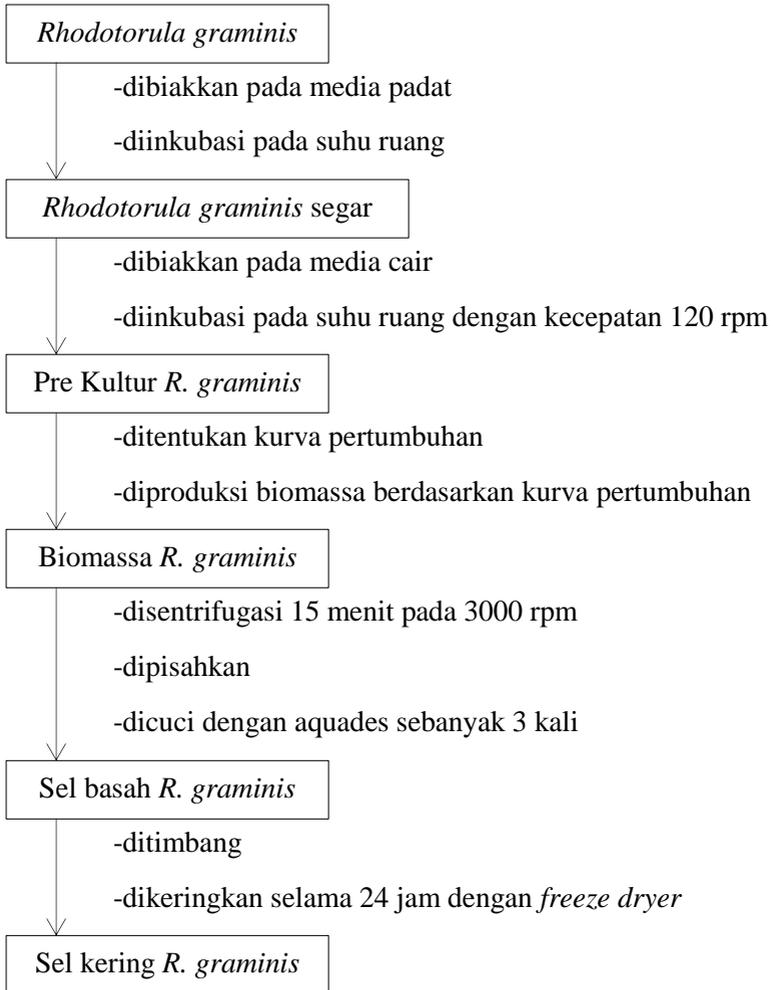
5.2 Saran

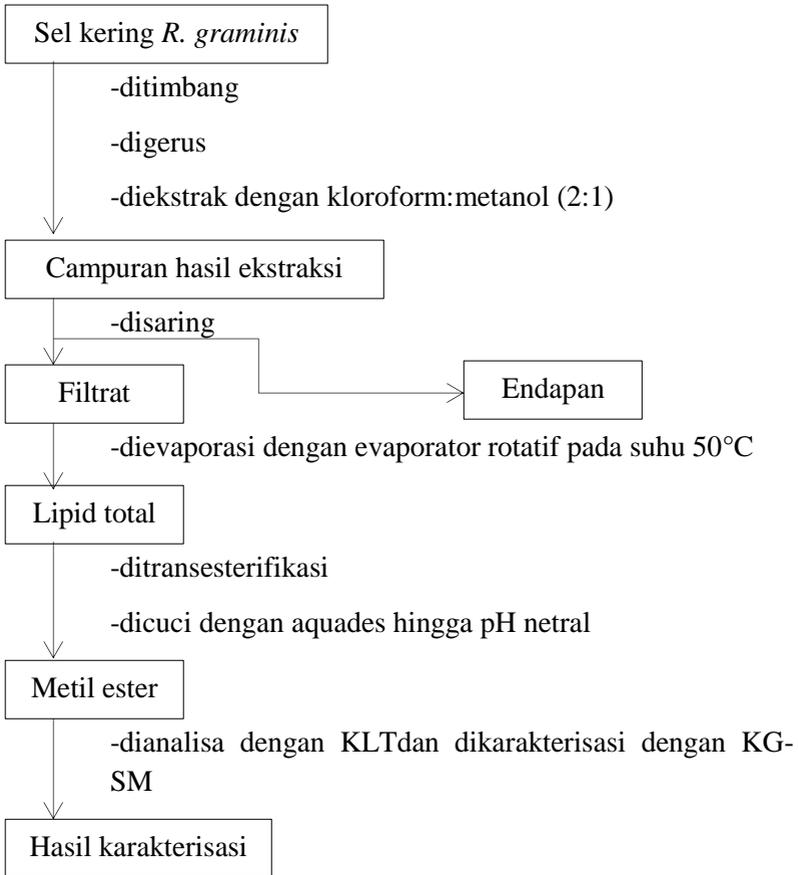
Setelah melakukan penelitian ini, jenis asam lemak terdeteksi dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menerapkan dan memanfaatkan berbagai jenis asam lemak yang dimiliki oleh *Rhodotorula graminis* NBRC 0190 pada *National Institute of Technology and Evaluation* Jepang.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja





Lampiran 2. Data dan Perhitungan

1. Komposisi Media

- Glukosa = 10 gram
- Pepton = 5 gram
- Ekstrak yeast = 3 gram
- Agar = 15 gram
- Aquades = 1000 mL

2. Pembuatan Larutan Stok A (Glukosa) 250 mL

Massa glukosa yang diperlukan untuk membuat larutan stok A sebanyak 250 mL dengan faktor pemekatan 20 adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{○ Massa glukosa} &= \frac{200 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 50 \text{ gram} \end{aligned}$$

3. Pembuatan Larutan Stok B (Pepton dan Ekstrak Yeast) sebanyak 250 mL

Massa pepton dan ekstrak yeast masing-masing yang diperlukan untuk membuat larutan stok B sebanyak 250 mL dengan faktor pemekatan 20 adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{○ Massa pepton} &= \frac{100 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 25 \text{ gram} \\ \text{○ Massa ekstrak ragi} &= \frac{60 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 250 \text{ mL} \\ &= 15 \text{ gram} \end{aligned}$$

4. Pembuatan Media

- Media cair dibuat dari larutan stok A dan larutan stok B dengan perbandingan (1:1)
 - i. Media cair 10 mL dibuat dari larutan stok A 0,5 mL dan larutan stok B 0,5 mL

- ii. Media cair 25 mL dibuat dari larutan stok A 1,25 mL dan larutan stok B 1,25 mL
- iii. Media cair 50 mL dibuat dari larutan stok A 2,5 mL dan larutan stok B 2,5 mL
- iv. Media cair 100 mL dibuat dari larutan stok A 5 mL dan larutan stok B 5 mL
- v. Media cair 250 mL dibuat dari larutan stok A 12,5 mL dan larutan stok B 12,5 mL
- Media padat dibuat dari larutan stok A dan larutan stok B dengan perbandingan (1:1) ditambah dengan agar. Sebagai contoh perhitungan agar yang ditambahkan untuk membuat 400 mL media padat adalah:
 - i. Larutan stok A sebanyak 20 mL dan larutan stok B sebanyak 20 mL
 - ii. Massa agar = $\frac{15 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 400 \text{ mL}$
= 6 gram

5. Prosentase metil ester

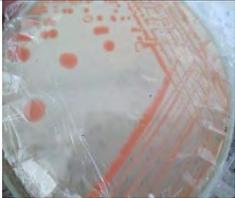
Prosentase metil ester diperoleh dari perbandingan massa metil ester dengan massa sel kering,

$$\begin{aligned}
 \% \text{ metil ester} &= \frac{\text{massa metil ester (g)}}{\text{massa sel kering (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,48 \text{ gram}}{4,47 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 33\%
 \end{aligned}$$

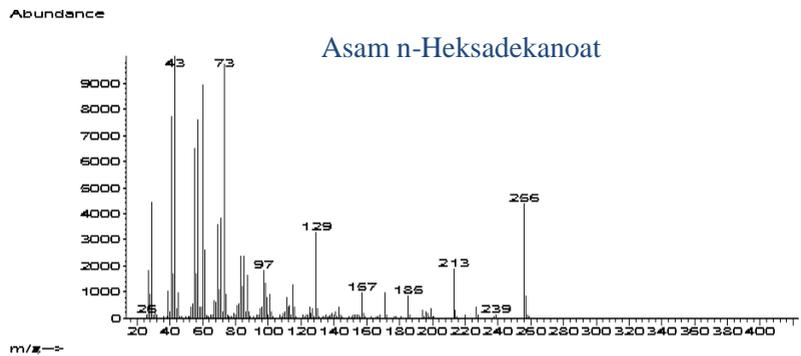
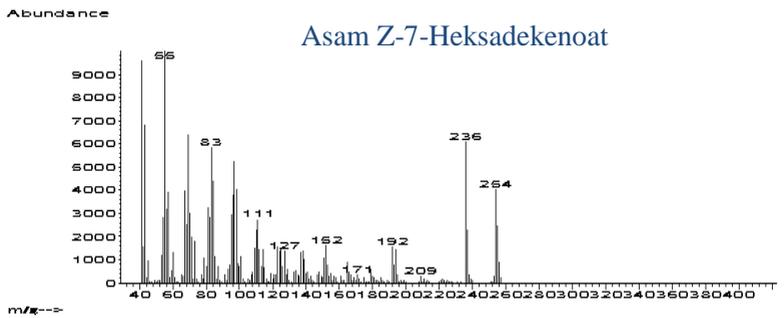
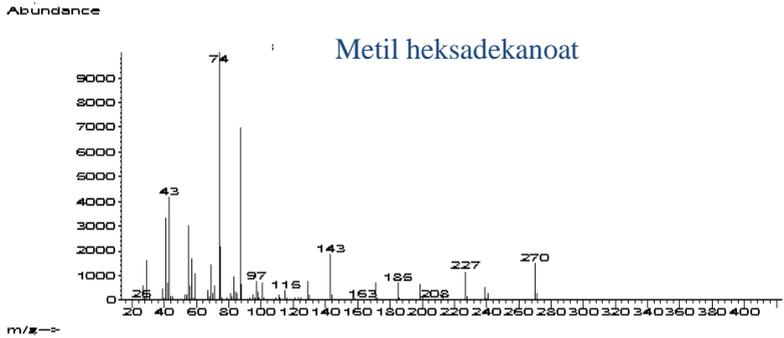
Lampiran 3. Data kurva pertumbuhan *Rhodotorula graminis*

| Jam ke- | Absorbansi |
|---------|------------|
| 0 | 0,153 |
| 3 | 0,154 |
| 6 | 0,316 |
| 12 | 0,580 |
| 18 | 0,811 |
| 24 | 1,037 |
| 30 | 1,232 |
| 36 | 1,445 |
| 42 | 1,442 |
| 48 | 1,423 |
| 54 | 1,441 |
| 60 | 1,328 |
| 66 | 1,337 |
| 72 | 1,308 |
| 78 | 1,313 |
| 84 | 1,322 |
| 90 | 1,209 |
| 96 | 1,290 |
| 102 | 1,271 |

Lampiran 4. Dokumentasi penelitian

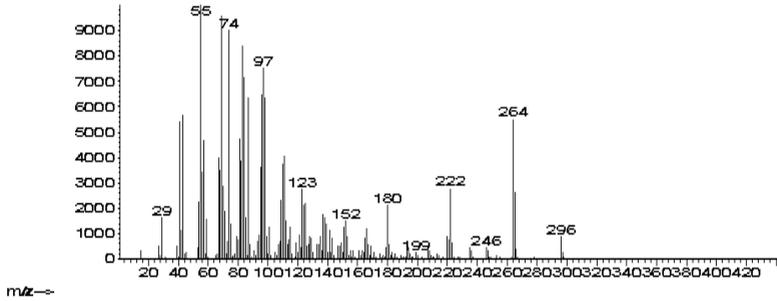
| | | | |
|--|---|---|---|
|  <p><i>Rhodotorula graminis</i></p> |  <p>Media cair</p> |  <p>Media padat</p> |  <p>Sel Biomassa</p> |
|  <p>Biomassa hasil sentrifugasi</p> |  <p>Sel basah</p> |  <p>Sel kering</p> |  <p>Proses Liofilisasi</p> |
|  <p>Proses ekstraksi</p> |  <p>Hasil ekstraksi</p> |  <p>Filtart hasil ekstraksi</p> |  <p>Residu hasil ekstraksi</p> |
|  <p>Hasil evaporasi</p> |  <p>Proses KLT</p> |  <p>Proses transesterifikasi</p> |  <p>Proses pemisahan metil ester</p> |

Lampiran 5. Database Beberapa Spektra Massa Asam Lemak dan Metil Ester



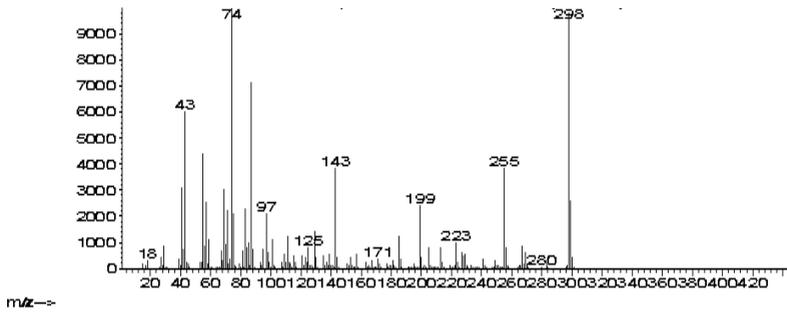
Abundance

Metil Oktadek-9-enoat



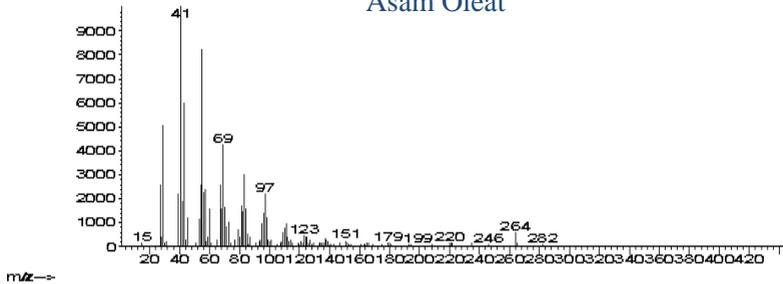
Abundance

Metil 14-Metil-Heptadekanoat



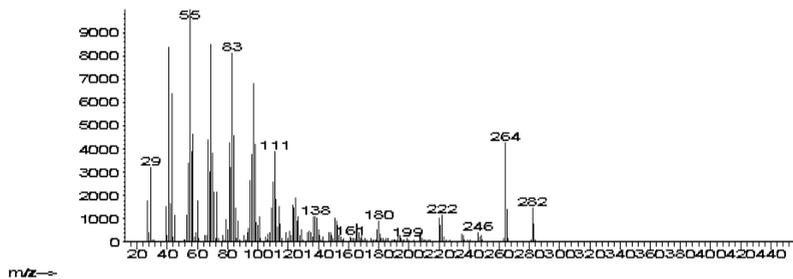
Abundance

Asam Oleat



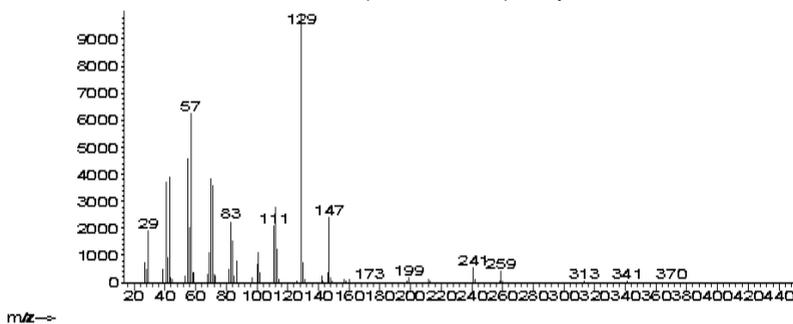
Abundance

Asam Oktadek-9-enoat



Abundance

Bis(2-etilheksil) adipat



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, S. (1992). *Dasar-dasar Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Perawat*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Anonim. (2014). *Identification and Taxonomic Classification of Microorganism(s) Represented for Use as Supplements under the Fertilizers Act*. Retrieved Maret 17, 2015, from CFIA: <http://inspection.gc.ca>
- Anonim. (2013). *Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (DEHA)*. Retrieved Nopember 11, 2015, from Chemical Substances: <http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca>
- Awaluddin, dkk. (2010). Pembuatan Biodiesel dari Minyak Kelapa melalui Reaksi Metanolisis Menggunakan Katalis CaCO₃ yang dipijarkan. *Jurnal Natur Indonesia*, 13(1):27-32.
- Bartko, J., & Winkowski, K. (2012). *Patent No. WO2012024097 A1*.
- Black, J. (2002). *Microbiology*. New York: John Willey and Sons.
- Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:911-917.
- Brady, J. (1994). *Kimia Universitas Asas dan Struktur*. Jakarta: Erlangga.
- Brown, dkk. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.). New York: Universitas Georgia.

- Carey, F., & Sundberg, R. (2007). *Advanced Organic Chemistry* (5th ed., Vol. Part A: Structure and Mechanisms). Springer Science & Business Media.
- Carolina, D. (2011). *Sintesis Metil Ester dari Lipid Bacillus stearothermophilus melalui reaksi transesterifikasi menggunakan BF₃*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Compagno, dkk. (2012). *Rhodotorula graminis Lipid Biosynthesis from Renewable Carbon Source for the Production of Biodiesel*. Italia: Universitas Milan.
- Deinema, H., & Landheer, C. (1960). Extracellular Lipid Production by A Strain of *Rhodotorula graminis*. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 37:178-179.
- Demirbas, A. (2008). Comparison of Transesterification Methods for Production of Biodiesel from Vegetable Oil and Fats. *Energy Conversion and Management*, 49:125-130.
- Devianti, V. (2012). *Pola Asam Lemak Bakteri yang Diduga Algaligenes Latus*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- EOL. (2015). *Rhodotorula graminis Di Menna*. Retrieved Februari 27, 2015, from Biodiversity Heritage Library.
- Gajera, dkk. (2008). *Fundamental of Bichemistry* (Vol. a textbook). India: International Book Distributing Corporation.
- Galzy, dkk. (1995). Fatty Acid and Carotenoid Composition of *Rhodotorula* Strains. *Arch Microbiology*, 164:173-179.

- Grob, R. (1995). *Modern Practice of Gas Chromatography* (3th ed.). New York: John Willey and Sons.
- Harsanto, S. (2009). *Analisis Asam Lemak Mikroalga Nannochloropsis oculata*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Hasibuan, R. (2005). *Proses Pengeringan*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Herlina, dkk. (2009). *Lemak dan Minyak*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Hindarso, dkk. (2003). *Pembuatan Biodiesel dari Minyak Nyamplung dengan Menggunakan Katalis Berbasis Kalsium*. Surabaya: Universitas Katolik Widya Mandala.
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Liquid Chromatography. *Journal of Lipid Research*, 51:635-640.
- Janse, J. (1997). *Fatty Acid Analysis In The Identification, Taxonomy, and Ecology of (Plant Pathogenic) Bacteria*. Belanda: Plant Protection Service.
- JGI. (2014). *Rhodotorula graminis strain WPI*. California: The Regents of University of California-Department of Energy .
- Kealay, D., & Haines, P. (2002). *Instant Notes: Analytical Chemistry*. New York: BIOS Scientific Publisher Limited.
- Kenkel, J. (2002). *Analytical Chemistry for Technicians*. USA: CRC Press.

- Komagata, dkk. (1985). Cellular Carbohydrate Composition, DNA Base Composition, Ubiquinone System, and Diazonium Blu B Color Test in the Genera *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* and Related Basidiomycetous Yeasts. *Journal Genetics and Applied Microbiology*, 31:519-550.
- Kongruang, S., & dkk. (2014). Optimization of Lipid Production By Oleaginous Yeast Using Response Surface Methodology. *Suranaree J. Sci. Technology*, 21(4):321-328.
- Kusdiana, D., & Saka, S. (2004). Effects of Water on Biodiesel Fuel Production by Supercritical Metanol Treatment. *Bioresource Technology*, 91:289-295.
- Kusnadi. (2002). *Kinetika Pertumbuhan Mikroba/Kinetika Enzim*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Mahajan, dkk. (2007). Variables Affecting the Production of Standard Biodiesel. *Journal of The American Oil Chemist's Society*, 84:189-195.
- Marova, dkk. (2011). *Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts-Application of WHole -Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds*. Retrieved Februari 27, 2015, from <http://intechopen.com>
- Moat, A., & Foster, J. (1979). *Microbial Physiology*. New York: John Willey and Sons.
- Movina, E., & Putra, S. (2007). *Hopanoid, Indikator Kimia Bagi Kesuburan Tanah*. Jakarta: Badan Pengurus Pusat IKAHIMKI.

- Ngili, Y. (2009). *Biokimia Struktur dan Fungsi Biomolekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Page, D., & Soendoro, R. (1985). *Prinsip-prinsip Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Rusdiana. (2004). *Metabolisme Asam Lemak*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Salih, B. (2012). *Gas Chromatography-Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*. Kroasia: InTech Publishing.
- Sartika, R. (2008). Pengaruh Asam Lemak Jenuh, Tidak Jenuh dan Asam Lemak Trans terhadap Kesehatan. *Jurnal Kesehatan Masyarakat NASional*, 2(4):154-160.
- Sastrohamidjojo. (1985). *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.
- Schieberle, dkk. (2009). *Food Chemistry* (4th revised and extended ed.). Jerman: Le-tex Publishing.
- Simpson, B. (2012). *Food Biochemistry and Food Processing* (2nd ed.). New York: John Willey and Sons.
- Soerawidjaja, T. (2006). *Fondasi-fondasi Ilmiah dan Keteknikan dari Teknologi Pembuatan Biodiesel*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Spencer, J., & Tulloch, A. (1964). Extracellular Glycolipids of Rhodotorula Species. *Canadian Journal of Chemistry*, 42.
- Stewart, M. (2008). *Classification of Life* (Revised ed.). New York: Lerner Publishing Group.
- Suhartono, M. (1989). *Enzim dan Bioteknologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Tan, dkk. (2014). Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* under Irradiation/High-Temperature and Dark/Low-Temperature Cultivation. *Bioresource Technology*, 157:149-153.
- Ulfatmi, dkk. (2008). *Pertumbuhan Mikroba*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Wang, P., & Chang, C. (2002). Six *Rhodotorula* Species from Taiwan. *Yeasts Science*, 17:23-26.
- Wibowo, M. (2005). *Pertumbuhan Mikroorganisme*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Yudi, dkk. (2008). *Pengomposan Daun Kopi dengan Rhizobium Japonicum dan Karakterisasi Hopanoid yang Dihasilkan*. Bandar Lampung: Universitas Lampung.

BIODATA PENULIS



Penulis bernama lengkap Qurrota A'yun Thoyyibah yang dilahirkan di Surabaya pada tahun 1993 merupakan anak pertama dari empat bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu TK Raden Patah Surabaya (1998-1999), MI Nurul Islam Sidoarjo (1999-2005), MTs Amanatul Ummah Surabaya (2005-2008), dan MAN Insan Cendekia Serpong Tangerang (2008-2011). Setelah itu menempuh jenjang pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA ITS melalui jalur SNMPTN Undangan dengan nomor registrasi pokok 1411100044. Selain kuliah, penulis juga aktif mengikuti berbagai organisasi yaitu sebagai staff bidang Kajian Strategis Departemen Dalam Negeri HIMKA ITS (2012-2013), Bendahara Umum UKM Lembaga Pers Mahasiswa 1.0 ITS selama dua periode (2012-2014), Ketua Departemen Keputrian CIS Kimia ITS (2013-2014), Ketua Keputrian JMMI TPPI ITS (2014-2015).

Semasa kuliah, penulis mengambil kolokium dan tugas akhir bidang Kimia Mikroorganisme. Pembimbing yang berjasa adalah Prof. Surya Rosa Putra, M.S. dan Drs. Refdinal Nawfa, M.S. dengan topik penelitian analisa asam lemak mikroorganisme. Selain itu, penulis pernah melakukan kerja praktik di PT. Indofood CBP Sukses Makmur, Tbk. divisi mie cabang Pasuruan. Selama kerja praktik, penulis ditempatkan di laboratorium *Quality Control* (QC) dan pengolahan limbah B3. Akhir kata, penulis berharap dapat berbagi manfaat melalui penelitian ini. Penulis dapat dihubungi melalui e-mail qurrotaayun59@gmail.com.