

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui metode yang paling efisien untuk mengekstrak kandungan lipid dari mikroalga *Botryococcus braunii*. Adapun metode yang digunakan adalah ekstraksi lipid menggunakan pelarut organik dan pelarut cairan ionik. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikroalga Program Studi Biologi Universitas Padjadjaran dan di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati pada bulan Mei 2016 sampai bulan Juli 2016. Karakterisasi jenis lipid yang terekstrak dan analisis dengan instrumen GC-MS.

#### **3.1 Alat dan Bahan**

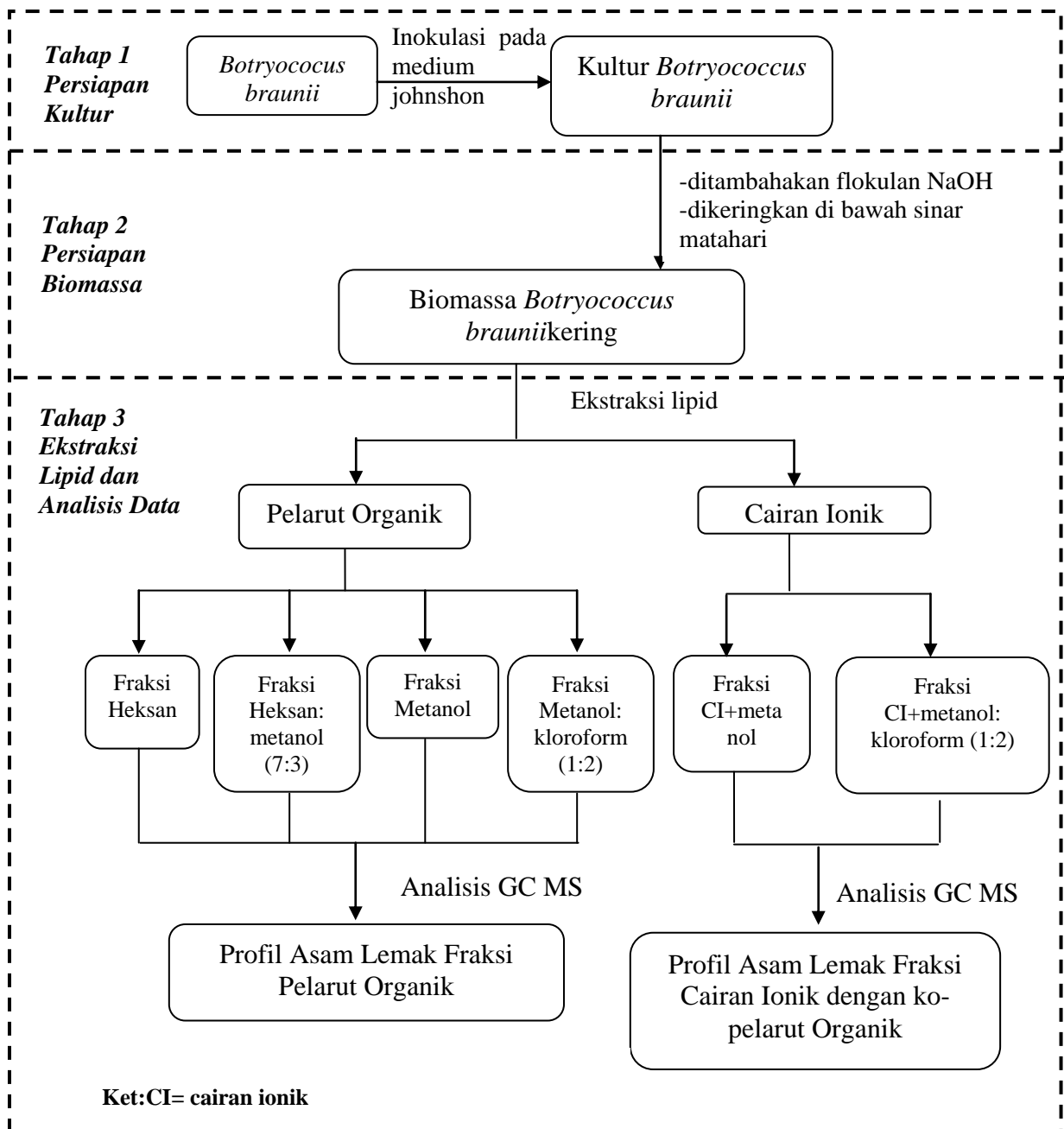
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pompa aquarium, kain satin, *shaker*, pemanas listrik yang dilengkapi stirrer, magnetik stirrer, *rotary evaporator*, *sentrifuse*, Instrumen GC-MS Shimadzu, dan peralatan gelas lainnya seperti gelas kimia, corong gelas dan botol vial. Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur *Botryococcus braunii*, bahan pembuatan medium johnson yang terdiri dari 0,5 g magnesium sulfat ( $MgSO_4$ ), 0,2 g magnesium klorida ( $MgCl_2$ ), 1 g kalium nitrat ( $KNO_3$ ), 0,2 g kalium klorida ( $KCl$ ), 27 g natrium klorida ( $NaCl$ ), dan 0,035 g Kalium fosfat ( $KH_2PO_4$ ) dan 1 L aquades, bahan untuk proses pemanenan menggunakan flokulan basa yaitu 1 g natrium hidroksida ( $NaOH$ ), bahan ekstraksi menggunakan pelarut organik yaitu 13 g kloroform, 25 g metanol, 16 g heksan, cairan ionik yaitu 0,4 g Cis-oleilimidazolinium asetat, bahan proses esterifikasi yaitu campuran  $BF_3$ -metanol sebanyak 9 mL.

#### **3.2 Metode Penelitian**

Penelitian ini dibagi ke dalam beberapa tahapan diantaranya persiapan kultur, persiapan biomassa serta ekstraksi lipid (menggunakan pelarut organik dan ekstraksi lipid menggunakan pelarut cairan ionik) dan analisis data. Hasil ekstraksi dari berbagai pelarut tersebut dianalisis jenis dan kandungan lipidnya



menggunakan instrumen GC-MS. Adapun alur penelitian yang dilakukan dapat digambarkan **Gambar 3.1**



**Gambar 3.1** Alur Penelitian

### 3.2.1 Persiapan Kultur *Botryococcus braunii*

Persiapan kultur *Botryococcus braunii* diawali dengan pembuatan medium kultur Johnshon dengan komposisi bahan sebagai berikut; 0,5 g magnesium sulfat ( $MgSO_4$ ), 0,2 g magnesium klorida ( $MgCl_2$ ), 1 g kalium nitrat ( $KNO_3$ ), 0,2 g

kalium klorida (KCl), 27 g natrium klorida (NaCl), dan 0,035 g Kalium fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Bahan – bahan pembuatan medium Johnson tersebut dilarutkan dalam 1 liter aquades, kemudian dicampurkan dengan inokulan induk *Botryococcus braunii* sebanyak 10% dari jumlah medium yang telah dibuat.

### 3.2.2 Persiapan Biomassa *Botryococcus braunii*

Teknik pemanenan kultur *Botryococcus braunii* yang dengan cara flokulasi, yaitu dengan menambahkan natrium hidroksida (NaOH) (dengan komposisi 1 gram per 1 liter kultur) sehingga biomassa *Botryococcus braunii* dapat mengendap dan terpisah dari mediumnya. Biomassa yang telah mengendap disaring dengan menggunakan kain satin kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari.

### 3.2.3 Ekstraksi Lipid dan Analisis Data

Ekstraksi lipid yang dilakukan pada tahap ini menggunakan beberapa variasi pelarut organik yaitu heksan, heksan:metanol (7:3), metanol:kloroform(1:2) dan metanol. Pemilihan variasi pelarut tersebut didasarkan pada sifat kepolaran pelarut. Adapun data yang diperoleh adalah massa ekstrak lipid yang dihasilkan dan profil asam lemak masing-masing pelarut menggunakan instrument GC-MS

#### a. Ekstraksi Lipid Menggunakan Pelarut Organik

Prosedur ekstraksi lipid dari mikroalga menggunakan pelarut organik dilakukan berdasarkan pada penelitian Sun A Cho *et al* pada tahun 2013 (Cho *et al.*, 2013). Sebanyak 0,5 gram biomassa *Botryococcus braunii* ditambahkan pelarut organik yaitu heksana, heksan:metanol (7:3), metanol dan metanol:kloroform (1:2) sebanyak 9,5 gram. Campuran biomassa dengan pelarut organik di-*stirer* selama 5 jam pada suhu ruang kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan biomassa dengan filtratnya. Filtrat yang diperoleh diuapkan pada tekanan rendah dengan

menggunakan alat *rotary evaporator*. Hasil lipid yang diperoleh ditimbang menggunakan neraca analitik dan dianalisis menggunakan instrumen GC-MS.

### **b. Ekstraksi Lipid Menggunakan Cairan Ionik**

Prosedur ekstraksi lipid dari mikroalga menggunakan pelarut organik dilakukan berdasarkan pada penelitian Sun A Cho *et al* pada tahun 2013 (Cho *et al.* 2013). Sebanyak 0,175 gram cairan ionik masing-masing dilarutkan dalam 10 mL pelarut metanol dan metanol:kloroform (1:2). Setelah larut, masing-masing 9,5 gram larutan cairan ionik dan pelarut organik tersebut ditambahkan ke dalam 0,5 gram biomassa *Botryococcus braunii* kemudian distirer selama 12 jam pada suhu 65°C. Campuran biomassa dan pelarut disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan biomassa dengan filtratnya. Filtrat yang diperoleh diuapkan pada tekanan rendah dengan menggunakan alat *rotary evaporator*. Hasil lipid yang diperoleh ditimbang menggunakan neraca analitik dan dianalisis menggunakan instrumen GC-MS.

### **c. Analisis Sampel Menggunakan Instrumen GC-MS**

Untuk menganalisis lipid hasil ekstraksi, perlu dilakukan preparasi pada sampel. Ekstrak lipid di transmetilasi dengan larutan metanol-BF<sub>3</sub>, lalu dipanaskan hingga suhu 60°C sehingga terbentuk dua lapisan, lapisan atas yang kaya metil ester dipisahkan untuk dianalisis dengan menggunakan GC-MS Shimadzu. Adapun parameter pengukuran analisis spektrometri GC MS antara lain suhu kolom 60°C, *flow* kolom 1,31 mL/menit, suhu injektor 280°C, mode injektor split, dan waktu analisa 30 menit.