

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**

KKC
KK
LP 72/19
Pur
u



**UPAYA PENGEMBANGAN BIODESEL UNTUK PENYEDIAAN
ENERGI TERBARUKAN MENGGUNAKAN MICROALGA *Chlorella sp*
STRAIN LOKAL**

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Purkan S.Si.,M.Si	0016117201
Dr. Wiwin Retnowati, M.Kes	0009046803
Dr. Abdulloh, S.Si, M.Si	0023047103

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASVAREKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Upaya Pengembangan Biodiesel Untuk Penyediaan Energi Terbarukan Menggunakan Microalga *Chlorella* sp Strain Lokal

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr PURKAN, S.Si, M.Si
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0016117201
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Kimia
 Nomor HP : 085861682618
 Alamat surel (e-mail) : purkan@fst.unair.ac.id

Anggota (1)
 Nama Lengkap : WIWIN RETNOWATI
 NIDN : 0009046803
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

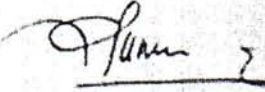
Anggota (2)
 Nama Lengkap : Dr ABDULLOH S.Si, M.Si
 NIDN : 0023047103
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
 Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 190,070,000

Mengetahui,
 Dekan FST Unair

 Prof. Wjn Darmanto, M.Si.Ph.D)
 NIP/NIK 196106161987011001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
 Ketua,


 (Dr PURKAN, S.Si, M.Si)
 NIP/NIK 197211161997021001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

 (Prof. Henry Purubasuki, M.Si.Ph.D)
 NIP/NIK 196705071991021001

MILIK
 PERPUSTAKAAN
 UNIVERSITAS AIRLANGGA
 SURABAYA

RINGKASAN

Ketahanan energi menjadi salah satu isu nasional di Indonesia, sehingga perlu mendapat perhatian dari semua komponen bangsa, sebab krisis di bidang energi ini dapat berdampak pada banyak sektor, yang tidak hanya sebatas pada sektor ekonomi tetapi juga sektor politik, keamanan, kesehatan, lingkungan, dan kemanusiaan. Universitas Airlangga sebagai bagian dari komponen bangsa memiliki tanggung jawab dalam menjaga ketahanan energi nasional, dengan menjadikan riset penyediaan energi terbarukan dari sumber hayati yang melimpah di Indonesia sebagai salah satu unggulan dalam pengembangan *roadmap* penelitiannya. Lingkungan perairan Indonesia memiliki keanekaragaman hayati mikroalga yang sangat tinggi, tetapi potensinya belum dimanfaatkan secara maksimal. Di banyak negara, mikroalga telah dimanfaatkan untuk agen produksi biofuel, sebab mikroalga mampu menghasilkan asam lemak dan karbohidrat yang tinggi. Melalui proses esterifikasi, asam lemak mikroalga dapat dikonversi menjadi biodiesel.

Chlorella sp adalah jenis mikroalga yang banyak ditemukan di perairan Indonesia, namun potensinya dalam memproduksi biodiesel masih belum dikembangkan. Konstruksi penelitian ini adalah memanfaatkan *Chlorella sp* strain lokal untuk produksi biodiesel pada skala laboratorium dan pilot. Target ini akan diselesaikan dalam dua tahun. Pada tahun 1 dilakukan optimasi media dan kondisi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp*, sehingga proses fermentasi dapat menghasilkan biomassa dengan kandungan asam lemak yang tinggi. Selain itu juga dilakukan penentuan produktifitas dan komposisi asam lemak yang dihasilkan oleh mikroalga *Chlorella sp* strain lokal. Pada tahun ke-2, akan dilakukan optimasi proses produksi biodiesel oleh mikroalga *Chlorella sp*. Dalam tahap ini akan dilakukan penentuan produktivitas biodiesel oleh mikroalga *Chlorella sp* baik dalam sistem esterifikasi *in-situ* maupun *ex-situ*.

Pada tahun pertama, mikroalga *Chlorella sp* difermentasi dalam media DG11 dengan suplai CO₂. Optimasi media dan kondisi fermentasi dilakukan, sehingga fermentasinya dapat menghasilkan biomassa dengan kandungan asam lemak yang tinggi. Kadar Biomassa mikroalga yang dihasilkan dalam proses fermentasi ditentukan dengan mengukur optical densitynya, sedangkan kandungan dan komposisi asam lemak pada biomassa akan ditentukan dengan metode titrasi dan GC-MS.

Mikroalga *Chlorella vulgaris* dapat dikultur secara baik pada media BG-11 yang mengandung beberapa campuran mineral. Pertumbuhan mikroalga ini berlangsung lebih optimal ketika digunakan starter dengan kadar sebesar 16% (v/v). Biomassa *Chlorella vulgaris* strain lokal dapat menghasilkan lipid dengan kadar cukup tinggi, yaitu sebesar 31% (v/v), ketika diekstrak dengan pelarut campuran n-heksan-etanol (1:1). Analisis dengan GC-MS dapat diketahui bahwa kandungan lipid pada *Chlorella vulgaris* tersusun atas asam lemak dominan, yaitu asam pentadekanoat, asam heksadekanoat, asam heptadekanoat, asam stearat dan asam nonadekanoat.

Pada tahun kedua dilakukan penentuan kondisi optimum proses produksi biodiesel dari mikroalga *Chlorella sp* strain lokal, baik secara *ex-situ* maupun *in-situ*. Proses insitu dalam transesterifikasi mikroalga *Chlorella vulgaris* menghasilkan biodiesel yield yang lebih tinggi dari pada *ex-situ*. Produksi biodiesel insitu ini dapat berlangsung optimum ketika dikenai ultrasonikasi pada daya 25kHz/270W, menggunakan *co-solvent* n-heksana, dan dengan perbandingan berat biomassa dengan metanol sebesar 3:50. perbandingan 3:50 menghasilkan presentase konversi biodiesel dan biodiesel *yield* yang lebih tinggi adalah 20,31 % b/b dan 3,87 % b/b menggunakan metode sonikasi. Proses insitu ini dapat menghasilkan biodiesel sebesar 20,31 % b/b. Optimasi proses insitu dengan variable/ parameter yang lain perlu dilakukan pada penelitian selanjutnya, sehingga proses tersebut dapat menghasilkan biodiesel yang lebih tinggi

Kata kunci: biodiesel, *Chlorella sp*, strain lokal, mikroalga



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi tahun Anggaran 2018 yang berjudul “**Upaya Pengembangan Biodiesel Untuk Penyediaan Energi Terbarukan Menggunakan Mikroalga *Chlorella sp* Strain Lokal**” dapat didanai. Pada kesempatan yang sama, peneliti mengucapkan terima kasih kepada :

1. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
2. Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Dikti yang telah memberi kesempatan untuk melakukan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi.
3. Rektor dan Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi, Universitas Airlangga yang telah memberi dukungan penuh
4. Dekan dan Ketua Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga yang telah memberi dukungan penuh, fasilitas instrumen dan laboratorium

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, dan industri terutama untuk pemanfaatan mikroalga untuk produksi biodiesel

Surabaya, 5 Nopember 2018

Peneliti

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Biofuel	4
2.2. Biodiesel	5
2.2.1 Bahan baku biodiesel	6
2.2.2 Sintesis Biodiesel	7
2.2.3 Karakteristik Biodiesel	10
2.3 Mikroalga	11
2.3.1 Karakteristik Mikroalga	13
2.3.2 Mikroalga sebagai bahan baku produksi biodiesel	14
2.3.3 Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga	15
2.4 Mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i>	15
2.4.1 Morfologi mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i>	16
2.4.1.1. Dinding sel	16
2.4.1.2 Sitoplasma	17
2.4.1.3 Mitokondria	17
2.4.1.4 Kloroplas	17
2.4.2 Peningkatan produksi lipid <i>Chlorella vulgaris</i>	18
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	20
3.1. Tujuan Penelitian	20
3.2. Hasil yang ditargetkan	20
3.3. Manfaat Penelitian	21
BAB IV METODE PENELITIAN	22
4.1 Diagram Alir Penelitian	22
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.3 Bahan dan sampel penelitian	23
4.4. Peralatan Penelitian	23
4.5. Prosedur Penelitian	23
BAB V HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	26
5.1 Produksi Biodiesel Secara <i>Ex-situ</i> : Ekstraksi dan Konversi Lipid Menjadi Biodiesel	26
5.2 Produksi Biodiesel Secara <i>In-Situ</i> : Optimasi Daya Sonikasi	26
5.3 Pengaruh <i>Co-solvent</i> dalam Produksi Biodiesel Secara <i>In-Situ</i>	30
5.4. Optimasi Berat Biomassa pada transesterifikasi insitu	31
5.5 Komposisi FAME dari Transesterifikasi Mikroalga Secara <i>In-situ</i>	33
5.6. Luaran yang telah dicapai	34

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel		Hal
2.1	Klasifikasi standar biodiesel ASTM D6751 dan EN 14214	10
2.2	Klasifikasi mikroalga berdasarkan warnanya	12
2.3	Kandungan lipid pada starin mikroalga	14
5.1	Persen luas FAME dari analisis GC-MS dengan variasi daya sonikasi	29
5.2.	Persen luas FAME dari analisis GC-MS dengan variasi jenis pelarut	30
5.3.	Persen luas FAME dari analisa GC-MS dengan variasi perbandingan jumlah berat biomassa terhadap volume metanol	32
5.4	Komposisi FAME dari biodiesel dengan parameter pengaruh jumlah berat biomassa (berat mikroalga: volume metanol; 2:50) menggunakan tiga metode yang berbeda	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Hal
2.1	Empat generasi sumber produksi biofuel	5
2.2	Mekanisme reaksi pembentukan biodiesel	8
2.3	Mekanisme tahapan reaksi pembentukan biodiesel TG (Trigliserida), DG(Digliserida), MG(Monogliserida)	8
2.4	Reaksi katalis basa (NaOH) dgn FFA	9
2.5	Reaksi sintesis biodiesel dengan menggunakan katalis asam	9
2.6	Skema proses fotosintesis, fiksasi CO ₂ , dan akumulasi karbon	12
2.7	Skema ultrastruktur <i>Chlorella vulgaris</i>	16
2.8	Struktur klorofil	18
2.9	Skema biosintesis metabolit <i>Chlorella vulgaris</i>	19
4.1	Diagram alir penelitian	22
5.1	Alat sonikator yang digunakan pada transesterifikasi insitu	27
5.2	FAME yang terbentuk setelah transesterifikasi insitu	28
5.3.	Pengaruh daya sonikasi terhadap konversi biodiesel	29
5.4	Pengaruh jenis pelarut terhadap konversi biodiesel (% b/b) dari transesterifikasi secara <i>in-situ</i>	31
5.5.	Pengaruh jumlah berat biomassa tergantung jenis metode yang digunakan terhadap konversi biodiesel (%) dari transesterifikasi secara <i>in-situ</i>	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Hal
1	Bukti publikasi pada The 12 th Korea-ASEAN Joint Symposium dan Seminar Congress Of Indonesian Society For Biochemistry And Molecular Biology In Conjunction With International Collaboration Seminar Of Chemistry And Industry (Cosci 2018)	41
2	Bukti accepted pada Jurnal Bioscience, Biotechnology Research Asia	46
3	Bukti submit article rke jurnal Open Chemistry (De Gruyter)	47

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Bahan bakar minyak (BBM) merupakan komoditas penting yang sangat menentukan pertumbuhan ekonomi dunia. Konsumsi minyak dunia mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan jumlah penduduk dan perkembangan teknologi. Tingkat konsumsi BBM di Indonesia dalam 10 tahun terakhir dilaporkan sebesar 58,61% dari total konsumsi energi final nasional. Jumlah cadangan minyak nasional yang tersedia, yaitu 4,3 miliar barel, diperkirakan hanya mampu mencukupi untuk 12 tahun mendatang (ESDM, 2010).

Ketahanan energi menjadi salah satu isu nasional di Indonesia, sehingga perlu mendapat perhatian dari semua komponen bangsa, sebab krisis di bidang energi ini dapat berdampak pada banyak sektor, yang tidak hanya sebatas pada sektor ekonomi tetapi juga sektor politik, keamanan, kesehatan, lingkungan, dan kemanusiaan. Universitas Airlangga sebagai bagian dari komponen bangsa memiliki tanggung jawab dalam menjaga ketahanan energi nasional, yang diwujudkan dengan menempatkan riset penyediaan energi terbarukan dari sumber hayati yang melimpah di Indonesia, sebagai salah satu topik unggulan dalam pengembangan *roadmap* penelitiannya.

Pengembangan energi alternatif dari Bahan Bakar Nabati (BBN) yang bersumber pada komoditas pertanian seperti kelapa sawit, jarak pagar, tebu, dan ubi kayu, juga dinilai tidak cukup efektif dan efisien, sebab pengembangannya masih terkendala oleh faktor penggunaan lahan dan pasokan pangan. Pengembangan BBN berbahan baku komoditas pertanian dapat mengganggu ketersediaan pangan nasional. Karena itu perlu dikembangkan biofuel dari sumber lain yang persediaanya mudah didapatkan.

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang memiliki kemampuan menggunakan karbondioksida dan sinar matahari untuk membentuk biomassa dan menghasilkan sekitar 50% oksigen di atmosfer. Jenis mikroalga yang ada di alam dilaporkan ada empat macam, yakni diatom (*Bacillariophyceae*), ganggang hijau (*Chlorophyceae*), ganggang emas (*Chrysophyceae*), dan ganggang biru (*Cyanophyceae*). Meskipun Indonesia memiliki keanekaragaman hayati mikroalga yang sangat tinggi,

tetapi potensinya masih belum dimanfaatkan secara maksimal. Di banyak negara, mikroalga telah dimanfaatkan untuk agen produksi biofuel, sebab mikroalga mampu menghasilkan asam lemak dan karbohidrat yang tinggi. Melalui proses esterifikasi, asam lemak mikroalga dapat dikonversi menjadi biodiesel. Potensi mikroalga sangat menjanjikan untuk digunakan sebagai agen dalam produksi biofuel di masa depan, karena memiliki kelebihan dalam pertumbuhannya, yaitu cepat, produktivitasnya tinggi, tidak memerlukan lahan yang luas dalam pembiakannya, dan dapat menggunakan air untuk nutrisi tumbuh. Disamping itu penggunaan mikroalga sebagai sumber biodiesel juga tidak mengganggu pasokan pangan, sebab mikroalga tidak berkompetisi dengan bahan pangan (Guerrero 2010 dalam Luthfi *et al.* 2010). Potensi lainnya dari penggunaan mikroalga adalah kemampuannya dalam menggunakan karbondioksida dan mengubahnya menjadi oksigen. Kemampuan ini dapat menciptakan lingkungan menjadi bersih dari pencemar gas CO₂ sehingga dapat menekan efek pemanasan global.

Chlorella sp adalah jenis mikroalga yang banyak ditemukan di perairan Indonesia, namun penggunaannya untuk memproduksi biodiesel masih belum dikembangkan. Penelitian ini adalah dirancang untuk memanfaatkan *Chlorella sp* strain lokal tersebut dalam produksi biodiesel pada skala laboratorium dan pilot. Target ini akan diselesaikan dalam dua tahun. Pada tahun 1 dilakukan optimasi media dan kondisi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp*, sehingga proses fermentasi dapat menghasilkan biomassa dengan kandungan asam lemak yang tinggi. Selain itu juga dilakukan penentuan produktifitas dan komposisi asam lemak yang dihasilkan oleh mikroalga *Chlorella sp* strain lokal. Sedangkan pada tahun ke-2, akan dilakukan optimasi proses produksi biodiesel oleh mikroalga *Chlorella sp*. Dalam tahap ini akan dilakukan penentuan produktivitas biodiesel oleh mikroalga *Chlorella sp* baik dalam sistem esterifikasi *in-situ* maupun *ex-situ*.

1.2 Rumusan Masalah

Chlorella sp adalah jenis mikroalga yang banyak ditemukan di perairan Indonesia, namun potensinya dalam memproduksi biodiesel masih belum dikembangkan. Konstruksi penelitian ini adalah memanfaatkan mikroalga *Chlorella sp* strain lokal untuk produksi biodiesel, dan terkait hal ini terdapat permasalahan berikut :

1. Bagaimana formula media dan kondisi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp* strain lokal yang optimum, sehingga proses fermentasinya dapat menghasilkan biomassa dengan kandungan asam lemak yang tinggi ?
2. Bagaimana kandungan dan komposisi asam lemak yang terdapat dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp* strain lokal ?
3. Bagaimana kondisi optimum untuk proses produksi biodiesel dari biomassa mikroalga *Chlorella sp* strain lokal, sehingga yield biodiesel yang dihasilkan tinggi ?
4. Bagaimana kinerja mikroalga *Chlorella sp* strain lokal dalam memproduksi biodiesel baik secara *in-situ* maupun *ex-situ*?

BAB II

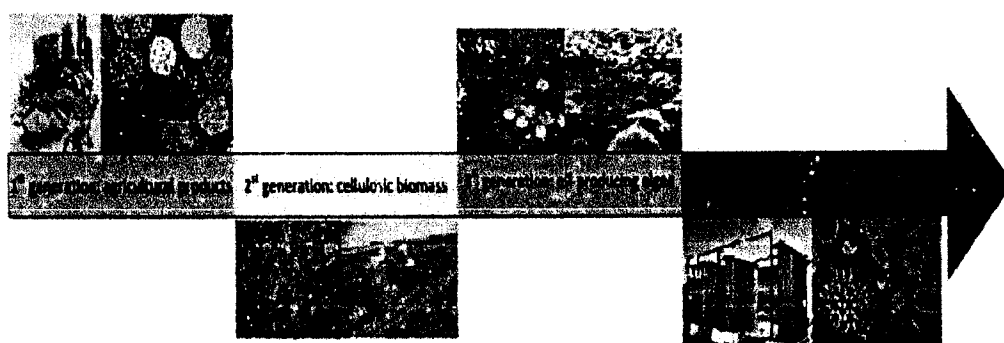
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biofuel

Biofuel adalah bahan bakar yang berasal dari minyak nabati (tanaman atau lemak hewan) dan dikenal dengan istilah bahan bakar nabati (BBN). Biofuel merupakan salah satu energi alternatif yang bersifat *renewable* (dapat diperbarui) yang digunakan untuk mengatasi krisis energi secara global (Demirbas, 2010). Produksi biofuel terus mengalami peningkatan dan menunjukkan pertumbuhan secara global dikarenakan fluktuasi harga minyak fosil yang tidak stabil, persediaan sumber bahan bakar fosil yang terus mengalami pengurangan, kekhawatiran terhadap bahaya bagi lingkungan serta kebutuhan akan keamanan energi. Sifat biofuel berbeda dengan bahan bakar fosil, yaitu antara lain biofuel mampu menghasilkan pembakaran yang lebih bersih dengan kandungan oksigen yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan bahan bakar fosil. Selain itu, biofuel menghasilkan kadar sulfur dan nitrogen dalam level rendah sehingga mampu mengurangi kadar sulfur dan nitrogen oksida yang dilepaskan melalui proses pembakaran ke udara (Nwokoagbara *et al.*, 2015).

Sebagian besar produksi biofuel berasal dari produk fermentasi gula yang dihasilkan dari strain ragi secara konvensional atau melalui reaksi transesterifikasi dengan katalis asam/basa/enzim. Biofuel diklasifikasi menjadi empat generasi berdasarkan sumber biomassa yaitu sebagai berikut: biofuel generasi pertama berasal dari turunan tanaman pangan dan minyak seperti tebu, minyak nabati dan lemak hewani. Biofuel pada generasi ini masih terbatas untuk sektor transportasi karena terjadinya persaingan pangan untuk lahan pertanian, keamanan pangan dan keseimbangan energi kontroversial. Biofuel generasi kedua melibatkan proses pengolahan biologi pada biomassa yang mengandung lignoselulosa. Biofuel generasi ini merupakan turunan dari sumber biomassa yang berasal dari sebagian besar residu pertanian seperti residu pengolahan kayu dan komponen *non-edible* dari tanaman pangan serta budidaya tanaman non pangan seperti jarak pagar (*jatropha*), biji tembakau, *mahua*, *miscanthus*. Oleh karena itu terjadi persaingan secara tidak langsung dengan tanah yang subur meskipun, biofuel generasi ini memiliki dampak bagi lingkungan yang lebih rendah jika

dibandingkan dengan biofuel generasi pertama akan tetapi, biaya proses konversi menjadi energi tidak layak secara ekonomis. Biofuel generasi ketiga adalah biofuel yang berasal dari mikroalga dan memiliki potensi untuk dikembangkan serta diproduksi skala besar. Mikroalga dapat digunakan sebagai bahan baku untuk memproduksi bahan bakar fosil karena mikroalga memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan cepat, memiliki kemampuan hidup dalam kondisi lingkungan yang ekstrim serta tidak terjadinya kompetisi dengan bahan pangan (Milano *et al.*, 2016). Biofuel generasi keempat merupakan rekayasa mikroalga yang dilakukan dengan menggunakan rekayasa biologi maupun DNA rekombinan untuk modifikasi langsung metabolisme sel dan modifikasi karakteristik jaringan metabolisme pada alga dengan tujuan untuk meningkatkan produksi biofuel (Shen, 2014).



Gambar 2.1 Empat generasi sumber produksi biofuel (Shen, 2014)

2.2 Biodiesel

Biodiesel berasal dari dua kata yaitu “bio” yang berarti hidup dan “diesel” yang berarti mesin diesel, yang berasal dari nama penemu mesin diesel “Rudolf diesel”. Istilah biodiesel berkaitan dengan bahan bakar olahan untuk mesin diesel yang berasal dari sumber makhluk hidup (hayati ataupun hewani). Selain itu biodiesel dapat didefinisikan secara spesifik yaitu campuran senyawa mono alkil ester dari asam-asam lemak rantai panjang yang berasal dari reaksi kimia transesterifikasi menggunakan bahan baku yang dapat diperbarui seperti minyak nabati atau lemak hewani dengan menggunakan alkohol dan penambahan katalis asam/basa/enzim (Martins *et al.*, 2010). Biodiesel menjadi bahan bakar alternatif utama sebagai pengganti bahan bakar fosil. Biodiesel sebagai sumber

energi yang bersifat *renewable* dan menarik karena beberapa alasan antara lain: (1) bahan bakar terbarukan yang dapat diperoleh secara alami (2) bersifat biodegradasi dan memiliki toksisitas yang rendah (3) bersifat ramah lingkungan dan menghasilkan residu hasil pembakaran yang sangat rendah serta tidak berbahaya bagi lingkungan (5) biodiesel bersifat lebih baik dari minyak bumi dalam hal emisi gas buang yang menghasilkan kadar sulfur dan nitrogen dalam level rendah dan tidak berkontribusi terhadap global warming (6) bisa digunakan pada mesin diesel dengan sedikit modifikasi atau tanpa modifikasi (7) dapat menghasilkan proses pembakaran yang lebih baik dibandingkan minyak bumi karena kandungan oksigen yang masih tinggi (Martins *et al.*, 2010).

2.2.1 Bahan baku biodiesel

Bahan baku biodiesel diklasifikasi menjadi beberapa generasi yaitu: bahan baku biodiesel generasi pertama seperti kedelai, minyak kelapa sawit, *jatropha*, sunflower, minyak canola. Bahan baku biodiesel pada generasi ini merupakan tanaman yang digunakan untuk menghasilkan biodiesel karena lebih dari 95 % jenis biodiesel terbuat dari minyak nabati. Sumber bahan baku biodiesel generasi pertama menimbulkan banyak permasalahan terutama berdampak pada pangsa pasar pangan secara global dan ketahanan pangan. Produksi biodiesel dari minyak nabati juga memiliki dampak negatif bagi lingkungan karena membutuhkan lahan yang luas untuk produksi biodiesel (Martins *et al.*, 2010).

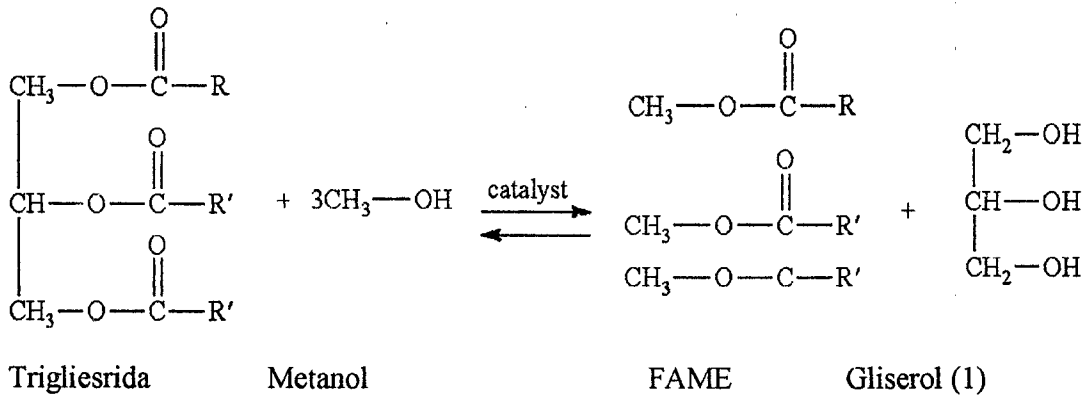
Bahan baku biodiesel generasi kedua digunakan untuk mengurangi ketergantungan pada minyak nabati dan sumber bahan baku pangan, sehingga dikembangkan sumber bahan baku non pangan seperti *jatropha*, *mahua*, minyak jojoba, biji tembakau. Selain itu, sumber biodiesel generasi kedua berasal dari minyak nabati bekas hasil penggorengan (minyak jelantah), lemak hewani yang berasal dari daging sapi maupun babi dan produksi biodiesel dari tanaman *non-edible* juga telah ekstensif diteliti dalam beberapa tahun terakhir. Sumber bahan baku ini efektif sebagai sumber bahan baku biodiesel untuk mengurangi persaingan dengan produk pangan selain itu, sumber bahan baku ini lebih efisien dan lebih bersifat ramah lingkungan jika dibandingkan dengan sumber bahan baku biodiesel generasi pertama (Martins *et al.*, 2010).

Penelitian dan eksplorasi sumber bahan baku biodiesel generasi ketiga dilakukan dan dikembangkan hal ini dikarenakan bahan baku biodiesel generasi pertama dan kedua tidak efisien sebagai bahan baku biodiesel yang disebabkan oleh biaya pangan yang tinggi dan terjadinya kompetisi dengan bahan pangan. Bahan baku biodiesel generasi ketiga berasal dari sumber biomassa mikroalga. Mikroalga menjadi kandidat yang menjanjikan sebagai bahan baku biodiesel karena efisiensi fotosintesis yang tinggi untuk menghasilkan biomassa dan tingkat pertumbuhan yang cepat serta produktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanaman konvensional. Selain itu proses budidaya mikroalga yang mudah dilakukan jika dibandingkan dengan tanaman lainnya. Mikroalga memiliki kandungan minyak yang tinggi sebesar 25 kali, lebih tinggi jika dibandingkan dengan biodiesel konvensional. Mikroalga dapat memproduksi minyak setidaknya 70 % dari biomassa kering, serta hanya memerlukan 0,1 m² tahun/kg biodiesel dan memerlukan lahan untuk memproduksi 121.104 kg biodiesel/tahun. Nilai produksi ini merupakan salah satu alasan mikroalga telah diakui sebagai sumber biomassa yang berpotensi untuk memproduksi biodiesel, yang sebelumnya didominasi dengan sumber bahan baku biodiesel yang berasal dari minyak kelapa sawit (Martins *et al.*, 2010).

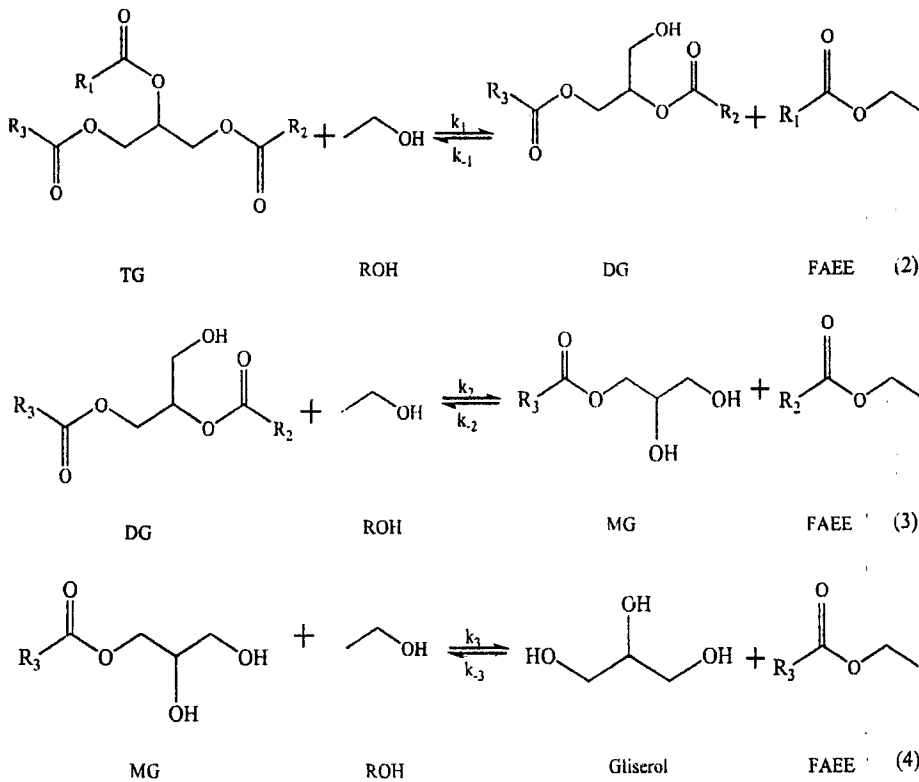
2.2.2 Sintesis Biodiesel

Biodiesel dapat disintesis melalui reaksi esterifikasi (FFA) atau reaksi transesterifikasi (lipid trigliserida) dengan menggunakan alkohol. Produksi biodiesel melalui reaksi transesterifikasi yaitu proses produksi satu ester menjadi ester dalam bentuk lain atau memproduksi mono-alkil ester dari minyak nabati (trigliserol) yaitu gliserol ester dari asam-asam lemak rantai panjang dengan alkohol rantai pendek (Knothe and Razon, 2017).

Tahapan reaksi transesterifikasi menunjukkan reaksi antara trigliserida (TG) dengan alkohol (ROH), reaksi ini berlangsung secara reversibel menghasilkan biodiesel (R'COOR) dan zat antara yaitu digliserida (DG) dan monogliserida (MG) kemudian reaksi berlangsung secara reversibel dengan alkohol hingga terbentuk gliserol. Reaksi transesterifikasi pembentukan biodiesel secara umum (Gambar 2.2). Sedangkan tahapan-tahapan reaksi pembentukan biodiesel (Gambar 2.3):



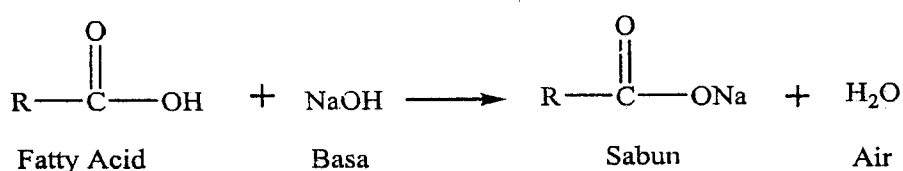
Gambar 2.2 Mekanisme reaksi pembentukan biodiesel



Gambar 2.3 Mekanisme tahapan reaksi pembentukan biodiesel TG (Trigliserida), DG(Digliserida), MG(Monogliserida) (Liu *et al.*, 2016)

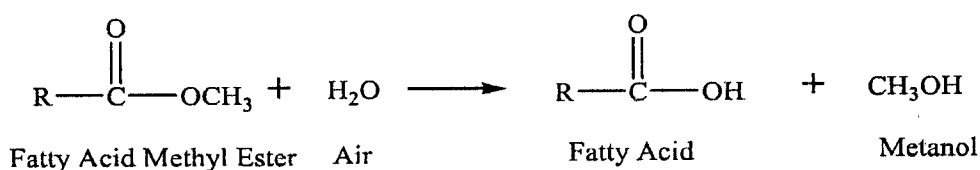
Sintesis biodiesel dapat dilakukan melalui reaksi esterifikasi maupun reaksi transesterifikasi laju reaksi dapat dipercepat dengan adanya penambahan katalis. Katalis

yang digunakan dalam reaksi transesterifikasi yaitu katalis asam, basa dan enzim. Pada reaksi transesterifikasi dengan katalis basa laju reaksi tinggi dan reaksi berlangsung secara cepat jika dibandingkan dengan katalis lainnya (asam ataupun enzim). Akan tetapi, katalis basa memiliki sensitifitas yang tinggi terhadap asam lemak bebas (FFA), FFA dapat bereaksi dengan katalis basa membentuk sabun. Adanya sabun pada saat reaksi dapat menghambat pemisahan gliserol dan memudahkan pembentukan emulsi selama tahap pencucian sehingga menyulitkan proses sintesis biodiesel lebih lanjut. Mekanisme reaksi transesterifikasi dengan menggunakan katalis basa ditunjukkan dengan gambar sebagai berikut:



Gambar 2.4 Reaksi katalis basa (NaOH) dgn FFA (Siddiquee & Rohani, 2011)

Reaksi transesterifikasi dengan menggunakan katalis asam reaksi berlangsung lambat jika dibandingkan dengan menggunakan katalis basa dan membutuhkan rasio antara lipid dengan alkohol dalam jumlah besar. Akan tetapi keuntungan katalis asam adalah mampu mengkatalisis reaksi esterifikasi maupun transesterifikasi untuk menghasilkan biodiesel dalam jumlah yang lebih banyak. Reaksi dengan katalis asam sebaiknya mencegah adanya kontak dengan air karena air mampu menurunkan jumlah produksi biodiesel yang terbentuk. Mekanisme reaksi sintesis biodiesel dengan menggunakan katalis asam ditunjukkan dengan gambar sebagai berikut:



Gambar 2.5 Reaksi sintesis biodiesel dengan menggunakan katalis asam (Siddiquee and Rohani, 2011)

2.2.3 Karakteristik Biodiesel

Analisis standar biodiesel bertujuan untuk memastikan kualitas bahan bakar biodiesel untuk aspek komersial seperti yang ditunjukkan pada tabel sebagai berikut (Knothe and Razon, 2017):

Tabel 2.1 Klasifikasi standar biodiesel ASTM D6751 dan EN 14214

Spesifikasi	ASTM D6751		EN 14214	
	Limit	Metode	Limit	Metode
Viskositas kinematika	1.9-6.0 mm ² /s	D445	3,5-5,0 mm ² /s	EN ISO 3104
Angka setana	Min. 47	D613, D6890	Min. 51	EN ISO 5165
Titik kabut	Report			
Stabilitas oksidasi	Min. 3 jam	EN 14112	Min. 8 jam	EN 14112 & 15751
Densitas			860-900 kg/m ³	
Gliserol bebas	Maks. 0,02 % massa	D6584	Maks. 0,02 % massa	EN 14105
Monoasilgliserol	Maks. 0,4 % massa	D6584	Maks. 0,7 % massa	EN 14105
Gliserol total	Maks. 0,24 % massa	D6584	Maks. 0,25 % massa	EN 14105
Bilangan asam	Maks. 0,5 mg KOH/g	D664	Maks. 0,5 mg KOH/g	EN 14104
Kombinasi Na K	Maks. 5 ppm (µg/g)	EN 14538	Maks. 5 mg/kg	EN 14108, EN 14109
S	Maks 0,015 % atau 0,05 % massa	D5453	10 mg/kg	EN ISO 20846 & 20884
P	Maks. 0,001 % massa	D4951	4 mg/kg	EN 14107
Kombinasi Ca Mg	5 ppm (µg/g)	EN 14538	5 mg/kg	EN 14538

Karakteristik bahan bakar biodiesel meliputi komponen dan unsur minor yang terbentuk selama reaksi transesterifikasi berlangsung seperti gliserol, asilgliserol serta material asing yang muncul dan mempengaruhi kualitas produksi biodiesel yang dihasilkan. Spesifikasi standar biodiesel meliputi monoasilgliserol, gliserol bebas dan gliserol total spesifikasi terakhir meliputi semua asilgliserol dan kemungkinan gliserol. Komponen lain yang mungkin ada dalam jumlah kecil dari produksi biodiesel serta berdampak negatif terhadap kualitas bahan bakar atau kinerja pembakaran seperti sifat elemen dalam jumlah kecil (heteroelemen) yang disebabkan oleh sisa katalis atau bahan baku yang berlebih. Unsur-unsur yang terbatas dalam standar biodiesel adalah Na, K, S,

P, Ca dan Mg. Selain itu, biodiesel juga harus meminimalisir adanya asam lemak bebas (FFA) karena FFA dapat menyebabkan terjadinya korosi pada mesin (Knothe and Razon, 2017).

2.3 Mikroalga

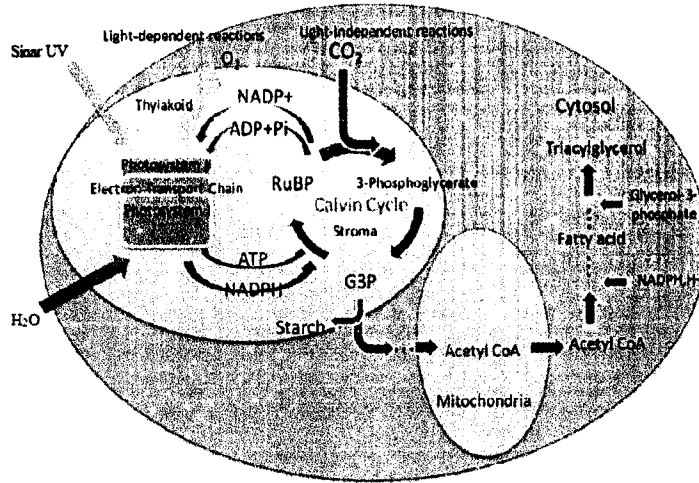
Mikroalga adalah organisme mikroskopis dan *single cell* yang ditemukan secara alami di perairan air tawar dan air laut. Mikroalga yang ada di semua ekosistem mewakili berbagai macam spesies yang hidup dalam berbagai kondisi lingkungan. Diperkirakan ada lebih dari 50.000 spesies mikroalga yang ada diseluruh ekosistem di dunia namun, hanya sekitar 30.000 spesies mikroalga yang telah dipelajari dan dianalisis (Martins *et al.*, 2010).

Mikroalga dikenal sebagai salah satu mikroorganisme yang hidup tertua *thallophyte* (tanaman yang tidak memiliki akar, batang dan daun) serta memiliki klorofil a sebagai pigmen utama untuk melakukan proses fotosintesis. Mekanisme fotosintesis pada mikroorganisme ini serupa dengan tanaman yang lebih tinggi. (Dragone *et al.*, 2010).

Peningkatan produksi biomassa atau lipid yang tinggi dari mikroalga dan efisiensi penyerapan CO₂ merupakan parameter yang penting dalam memanfaatkan mikroalga sebagai biodiesel. Beberapa metode pendekatan telah dikembangkan seperti rekayasa genetik untuk meningkatkan komposisi lipid, protein dan karbohidrat. Selain itu rekayasa genetik untuk meningkatkan efisiensi fotosintesis. Fotosintesis pada mikroorganisme melibatkan sumber energi yaitu sinar UV yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan. Mikroalga mengoptimalkan pengiriman cahaya yang dapat mempengaruhi proses fotosintesis secara langsung. Metode yang digunakan pada tahapan kultivasi biomassa dari mikroalga sebagian besar bergantung pada photosistem (PS I dan PS II) dimana sumber energi yang digunakan dalam reaksi fotokimia. Mikroalga mampu menyerap cahaya yang lebih banyak dari pada yang dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Energi cahaya yang berlebih dihamburkan sebagai panas dan berfluoresensi dengan menghasilkan reaksi sebagai berikut (Zeng *et al.*, 2011):



Pada persamaan reaksi sebelumnya ketika foton meningkat dalam mikroalga, efisiensi konversi cahaya akan meningkat dan kemampuan fiksasi CO₂ juga akan meningkat (Zeng *et al.*, 2011).



Gambar 2.6 Skema proses fotosintesis, fiksasi CO₂, dan akumulasi karbon (Zeng *et al.*, 2011)

Mikroalga diklasifikasi berdasarkan warna dan karakteristik seperti jenis pigmen, sifat kimia terkait penyimpanan produk serta karakteristik dinding sel. (Dragone *et al.*, 2010). Beberapa kriteria tambahan pada klasifikasi mikroalga meliputi karakteristik sitologi dan morfologi seperti sel flagel, skema struktur flagella pada bagian nucleus serta sel pada daerah envelop retikulum endoplasma yang berada disekitar kloroplas dan kemungkinan hubungan antara retikulum endoplasma dengan membran nuclear (Alam *et al.*, 2012).

Tabel 2.2 Klasifikasi mikroalga berdasarkan warnanya

No	Warna	Group
1	Ganggang kuning-hijau	<i>Xanthophyceae</i>
2	Ganggang merah	<i>Rhodophyceae</i>
3	Ganggang emas	<i>Chrysophyceae</i>
4	Ganggang hijau	<i>Chlorophyceae</i>
5	Ganggang cokelat	<i>Phaeophyceae</i>
6	Cyanobacteria	<i>Cyanophyceae</i>

2.3.1 Karakteristik Mikroalga

Biomassa mikroalga memiliki sejumlah keuntungan jika dibandingkan dengan jenis biomassa lainnya seperti hasil panen yang cepat, kandungan minyak yang tinggi, kebutuhan air dalam jumlah rendah dan mudah untuk ditumbuhkan. Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik yang dapat menghasilkan tiga komponen utama biokimia seperti lipid, protein dan karbohidrat. Selain tiga komponen tersebut mikroalga juga menghasilkan unsur-unsur lain yang bisa dikonversi menjadi bahan bakar meliputi unsur C, H, O dan N dan unsur ini sebagai pembeda pada mikroalga jika dibandingkan dengan biomassa lignoselulosa.

Komponen lipid yang terbentuk pada mikroalga sebesar 7-23 % dari berat kering. Lipid yang dihasilkan pada mikroalga bervariasi bergantung pada tipe mikroalga. Lipid dari mikroalga terdiri dari jenis asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh dengan rantai karbon 14-20 untuk pembentukan, dan > 20 rantai karbon untuk selanjutnya. Tipe lipid dari bentuk trigliserida yang digunakan untuk produksi biodiesel melalui reaksi transesterifikasi (Chen *et al.*, 2015).

Komponen protein yang terbentuk pada mikroalga sebesar 6-52 % dari berat kering. Protein dalam bentuk asam amino merupakan sumber utama unsur nitrogen pada mikroalga. Protein dapat dimurnikan dan digunakan sebagai makanan, pakan ternak, dan kesehatan. Fraksi protein mikroalga dapat dikonversi menjadi bahan bakar cair dengan menghilangkan nitrogen tetapi proses konversi menjadi bahan bakar cair ini sulit untuk dilakukan (Chen *et al.*, 2015).

Mikroalga memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi terkait proses efisiensi fotosintesis yang tinggi. Karbohidrat merupakan sumber energi yang paling penting dan sebagai nutrisi biologis yang terdiri dari 5-23 % dari berat bahan baku alga. Karbohidrat merupakan homopolimer dengan *D-glukopyronase* yang terikat pada ikatan β -glycosidic dan atau α -glycosidic dan dapat diubah menjadi monomer glukosa. Karbohidrat terakumulasi dalam plastida sebagai bahan cadangan makanan (pati) atau menjadi komponen pada dinding sel (selulosa, pektin dan polisakarida sulfat) (Chen *et al.*, 2015). Kandungan lipid pada berbagai strain mikroalga dilaporkan sebagai berikut (Naghdi *et al.*, 2016):

Tabel 2.3 Kandungan lipid pada starin mikroalga

Strain	Lipid content (%BSK)	Produktivitas Lipid (mg/L/g)	Reference
<i>Chaetoceros calcitrans</i> CS 178	40	18	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Chaetoceros muelleri</i> F&M-M43	34	22	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella protothecoides</i>	43-46	1881-1840	Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella protothecoides</i>	55	932	Xu <i>et al.</i> (2006)
<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM-212	19	45	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	21	254	Liang <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.1	180	Gouveia and Oliveira (2009)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	51	354	Liu <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorococcum</i> sp. UMACC 112	19	54	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	17	120	Gouveia and Oliveira (2009)
<i>Isochrysis</i> sp. F&M-M28	22	38	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Monodus subterraneus</i> UTEX 151	16	30	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	23-30	84-142	Chiu <i>et al.</i> (2009)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	35-48	385-413	Pal <i>et al.</i> (2011)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	29	90	Gouveia and Oliveira (2009)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29	90	Gouveia and Oliveira (2009)
<i>Pavlova lutheri</i> CS 182	36	50	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	39	79	Ho <i>et al.</i> (2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	18	90	Gouveia and Oliveira (2009)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	18	35	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Spirulina maxima</i>	4	210	Gouveia and Oliveira (2009)
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34	15	43	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)

2.3.2 Mikroalga sebagai bahan baku produksi biodiesel

Produksi biodiesel dari mikroalga memiliki beberapa keuntungan antara lain (Martins *et al.*, 2010) :

1. Tahapan kultivasi yang mudah dilakukan serta proses kultivasi yang tidak memerlukan lahan yang luas.
2. Mikroalga tidak bersaing dengan lahan tanaman pangan yang digunakan untuk produksi pangan.

3. Mikroalga melakukan reproduksi pada dirinya sendiri melalui reaksi fotosintesis dengan mengubah energi matahari menjadi energi kimia.
4. Mikroalga memiliki siklus pertumbuhan yang relatif singkat, dalam waktu beberapa hari mikroalga bisa tumbuh di habitat perairan serta hanya membutuhkan sinar matahari dan beberapa nutrisi sederhana.
5. Spesies mikroalga dapat hidup dengan menyesuaikan kondisi lingkungan.
6. Mikroalga memiliki tingkat pertumbuhan dan produktivitas yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanaman agrikultur lainnya.

2.3.3 Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga

Pertumbuhan mikroalga bergantung pada sumber cahaya, karena sumber cahaya dapat mengubah energi kimia seperti adenosine tri phosphate (ATP) dan nikotinamide adenin dinukleotida phosphate (NADP), pengaruh perbedaan cahaya mempengaruhi pertumbuhan alga. Umumnya mikroalga menggunakan cahaya pada panjang gelombang dari 400-700 nm untuk proses fotosintesis. Panjang gelombang yang diserap pada mikroalga berbeda-beda bergantung pada spesiesnya. Untuk mikroalga hijau menyerap energi cahaya yang digunakan fotosintesis melalui klorofil sebagai pigmen utama serta menyerap energi pada kisaran panjang gelombang 450-475 nm dan 630-675 nm serta karetenoid sebagai pigmen yang menyerap energi cahaya pada panjang gelombang 400-550 nm. Penelitian melaporkan bahwa pertumbuhan mikroalga pada panjang gelombang cahaya yang berbeda-beda. Merah (600-700 nm) dan biru (400-500 nm) yang dapat merangsang pertumbuhan mikroalga, laju pertumbuhan mikroalga dan kandungan lipid yang berbeda bergantung pada intensitas cahaya. Tingkat pertumbuhan mikroalga dan kadar lipid dipengaruhi oleh parameter lingkungan seperti suhu, intensitas cahaya, komposisi gas, nutrisi pada proses kultivasi (Blair *et al.*, 2014).

2.4 Mikroalga *Chlorella vulgaris*

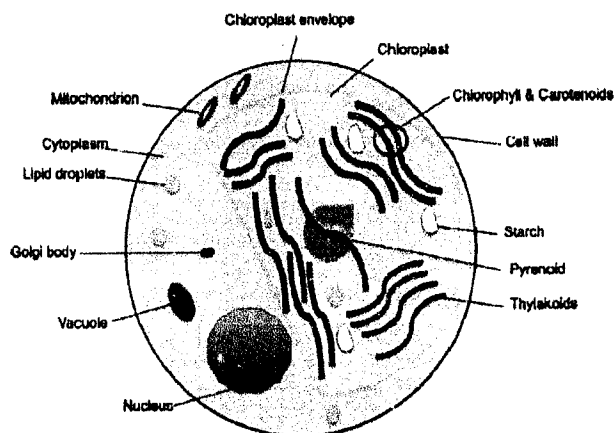
Klasifikasi ilmiah atau taksonomi dari mikroalga tipe *Chlorella vulgaris* adalah sebagai berikut (Sa *et al.*, 2014) :

Domain : Eukariot
Kingdom : Protista

Divisi : *Chlorophyta*
 Kelas : *Trebouxiophyceae*
 Ordo : *Chlorellales*
 Famili : *Chlorellaceae*
 Genus : *Chlorella*
 Spesies : *Chlorella vulgaris*

2.4.1 Morfologi mikroalga *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris adalah sel mikroskopik *spherical* dengan ukuran diameter 2-10 μm dan memiliki banyak elemen struktural yang mirip dengan tanaman pada umumnya (Gambar 2.7). Komponen penyusun morfologi dari mikroalga *Chlorella vulgaris* yaitu dinding sel, sitoplasma, mitokondria dan kloroplas (Sa *et al.*, 2014)



Gambar 2.7 Skema ultrastruktur *Chlorella vulgaris* (Sa *et al.*, 2014)

2.4.1.1. Dinding sel

Dinding sel berfungsi untuk menjaga kekakuan dan integritas sel untuk melindungi terhadap serangan dan lingkungan yang ekstrim. Dinding sel bervariasi sesuai dengan fase pertumbuhan. Selama pembentukan awal pada *autosporangia* dinding sel baru terbentuk dan rapuh membentuk lapisan unilaminar dengan ukuran 2 nm. Dinding

sel dari sel anak akan secara bertahap meningkat ketebalannya sampai mencapai 17-21 nm setelah proses pematangan. Dimana lapisan *mikrofibrillar* terbentuk yang mewakili lapisan mirip kitosan yang terdiri dari glukosamin yang mempengaruhi kekakuan. Pada tahap dewasa ketebalan dan komposisi dinding sel tidak konstan karena dapat berubah sesuai dengan pertumbuhan dan kondisi lingkungan yang berbeda. Selanjutnya beberapa penelitian menjelaskan kekakuan dinding sel dengan memusatkan perhatian pada lapisan *sporopollenin* walaupun umumnya bahwa *Chlorella vulgaris* memiliki dinding sel *unilamin* yang tidak memiliki *sporopollenin* yang merupakan karotenoid terpolimerisasi yang ditemukan pada dinding sel *Haematococcus pluvialis* dan *chlorella fusca* namun penelitian melaporkan bahwa adanya *sporopollenin* dengan mengamati lapisan *trilaminar* luar dengan mendeteksi residu pada *acetolisis* (Sa *et al.*, 2014).

2.4.1.2 Sitoplasma

Sitoplasma adalah zat seperti gel yang berbatasan dengan membran sel dan terdiri dari air, protein dan mineral terlarut. Host organel internal pada *Chlorella vulgaris* seperti mitokondria, nukleus, vakuola dan kloroplas tunggal serta badan golgi aparatus (Sa *et al.*, 2014).

2.4.1.3 Mitokondria

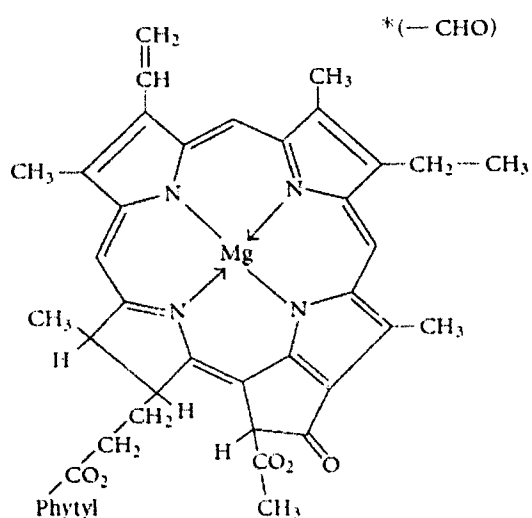
Setiap mitokondria mengandung beberapa material genetik seperti *respiratory apparatus* dan memiliki lapisan ganda, membran luar yang mengelilingi keseluruhan organel dan terdiri dari protein dan fosfolipid. Namun membran terdiri dari komponen protein tiga kali lebih banyak daripada fosfolipid, mengelilingi ruang internal yang disebut sebagai matriks yang mayoritas mengandung protein pada mitokondria (Sa *et al.*, 2014).

2.4.1.4 Kloroplas

Chlorella vulgaris memiliki kloroplas tunggal dengan pembungkus membran ganda yang tersusun dari fosfolipid, membran luar adalah permeabel untuk metabolit dan ion tetapi membran dalam memiliki fungsi yang lebih spesifik untuk transportasi protein. *Starch granular* terdiri dari komposisi kloroplas terutama selama kondisi pertumbuhan yang tidak menguntungkan. *Pyrenoid* mengandung *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase* (RubisCo) yang tinggi dan merupakan pusat fiksasi karbon dioksida (CO₂). Kloroplas juga menyimpan sekumpulan tilakoid dimana pigmen-pigmen

dominasi disintesis untuk menutupi warna pigmen lainnya seperti *lutein*. Tekanan nitrogen, lipid *globule* menumpuk pada sitoplasma dan kloroplas (Sa *et al.*, 2014).

Klorofil adalah salah satu senyawa bioaktif yang dapat diekstraksi dari biomassa mikroalga. Klorofil dapat digunakan sebagai bahan pewarna makanan dan memiliki antioksidan sebagai antimutagenik. Klorofil diklasifikasi menjadi dua yaitu klorofil a dan klorofil b. Kerangka molekul klorofil adalah *porphyrinmacrocycle* yang terdiri dari empat cincin pirol. Cincin pirol memiliki 4 atom karbon dan 1 atom nitrogen. Perbedaan struktur klorofil menghasilkan pigmen dengan absorbansi maksimum dari 660-665 nm biru/hijau klorofil a dan pigmen dengan absorbansi maksimum 642-652 nm hijau/kuning klorofil b. Berikut ini adalah struktur klorofil a, klorofil b adalah posisi gugus fungsi metil diganti dengan gugus formil (Hosikian *et al.*, 2010).

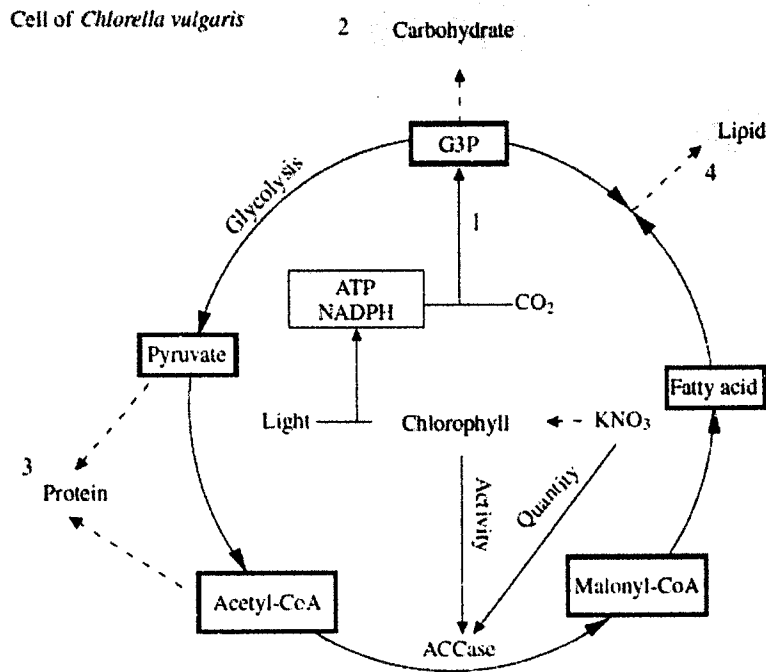


Gambar 2.8 Struktur klorofil (Hosikian *et al.*, 2010)

2.4.2 Peningkatan produksi lipid *Chlorella vulgaris*

Pertumbuhan sel *Chlorella vulgaris* dan akumulasi lipid terkait erat dengan kondisi kultivasi meliputi level KNO_3 konsentrasi CO_2 dan intensitas cahaya tidak berpengaruh terkait akumulasi lipid akan tetapi, berpengaruh pada pertumbuhan sel, klorofil a dan komponen biokimia seperti karbohidrat, protein dan lipid. Untuk

peningkatan produktivitas lipid, hubungan antara semua faktor tersebut mungkin terjadi. Berikut adalah gambar biosintesis komponen *Chlorella vulgaris* (Lv et al., 2010).



Gambar 2.9 Skema biosintesis metabolit *Chlorella vulgaris* (Lv et al., 2010).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin diselesaikan dalam penelitian ini adalah :

Tahun I

1. Mengoptimasi media dan kondisi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp* strain lokal, sehingga proses fermentasinya dapat menghasilkan biomassa dengan kandungan asam lemak yang tinggi
2. Menentukan produktifitas dan komposisi asam lemak yang terdapat dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp* strain lokal

Tahun II

1. Menentukan kondisi optimum proses produksi biodiesel dari biomassa mikroalga *Chlorella sp* strain lokal, sehingga yield biodiesel yang dihasilkan tinggi
2. Menentukan kinerja mikroalga *Chlorella sp* strain lokal dalam memproduksi biodiesel baik secara *in-situ* maupun *ex-situ*

3.2. Hasil yang ditargetkan

Penelitian ini ditargetkan untuk mendapatkan kondisi optimum pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp* dan proses produksi biodiesel dari biomassa yang dihasilkan, sehingga dapat dihasilkan rendemen yang optimal. Hasil temuan dan luaran lain dari penelitian ini adalah publikasi internasional yang diharapkan dapat memperkaya riset dibidang pengembangan keaneragaman hayati di bidang energi, lingkungan dan kesehatan. Jika hal ini dikaitkan dengan arah riset nasional dan *roadmap* penelitian Universitas Airlangga yang salah satu prioritasnya pengembangan riset-riset unggulan di bidang material baru dan terbarukan (*new and renewable material*) penelitian yang diusulkan ini **sangat penting** untuk dilakukan karena menghasilkan *energi biodiesel dari sumber terbarukan*..



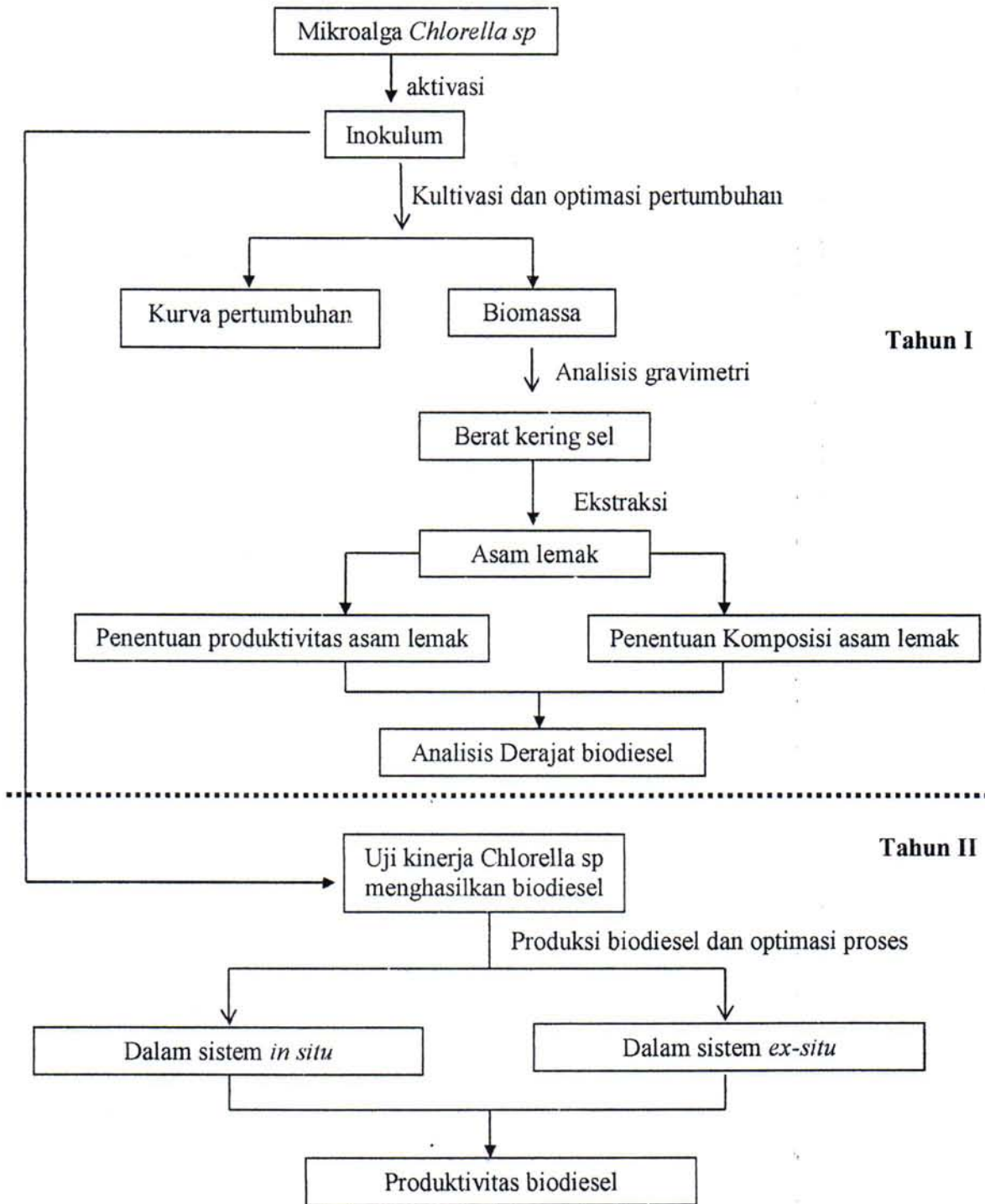
3.3. Manfaat Penelitian

Keutamaan atau manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut ::

1. Penyediaan bahan bakar alternatif dari sumber terbarukan sangat penting agar dapat menghemat cadangan energi bahan bakar nasional yang utamanya berasal dari energi fosil. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi baik di darat maupun di perairan, namun belum optimal dimanfaatkan terutama dalam pengembangan energi alternatif tersebut. Pemanfaatan mikroalga untuk produksi biodiesel dapat menambahkan pemanfaatannya di masa mendatang.
2. Pemanfaatan mikroalga sebagai agent pemproduksi biodiesel dapat memberi keuntungan lain bagi lingkungan dalam menekan efek pemanasan global, sebab mikroalga yang tergolong sebagai mikroorganisme fotosintetik mampu menggunakan karbondioksida dan sinar matahari untuk menghasilkan senyawa asam lemak dan karbohidrat dalam jumlah tinggi, yang selanjutnya berguna sebagai bahan baku dalam produksi biofuel.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Diagram Alir Penelitian



Gambar 4.1 Diagram alir penelitian



4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Biokimia dan Laboratorium Instrumentasi Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga mulai bulan Maret-Nopember 2018.

4.3 Bahan dan sampel penelitian

4.3.1. Bahan penelitian

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini berderajat pro analis (p.a). Bahan-bahan kimia tersebut antara lain: NaNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, EDTA, Fe ammonium sitrat, asam sitrat, Na_2CO_3 , H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kloroform, metanol, etanol, asam palmitat, stearat, linoleat, plate KLT, asam sulfat pekat, dan HCL

4.3.2. Sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah mikroalga *Chlorella* sp strain lokal Indonesia, yang akan digunakan untuk agen dalam produksi biodiesel.

4.4. Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium termometer, neraca digital, *Shaker inkubator*, *laminer*, *hot plate stirer*, *mikropipet*, *setrifuge*, desikator, *autograph* AG-10 TE Shimadzu, turbidimeter, Spektrofotometer UV-Vis, dan Spektrofotometer FTIR Bruker Tensor 27 dan DSC.

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Pembuatan media

Media cair yang digunakan untuk menumbuhkan mikroalga adalah media BG-11. Media ini dibuat dengan mencampur komponen yang terdiri atas NaNO_3 1.5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, EDTA 0.0005 g, Fe ammonium sitrat 0.005 g, asam sitrat 0.005 g, Na_2CO_3 0.02 g dan 1 mL larutan *element trace metal* dalam 1 L akuades pada pH 7.0. Larutan trace metal dibuat dengan melarutkan H_3BO_3 2.85 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g dan $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g dalam 1 L akuades. Semua larutan ini kemudian disterilisasi

dengan pemanasan pada suhu 120°C selama 30 menit. Setelah sterilisasi dilakukan pengontrolan pH media pada nilai sekitar 7.1 dengan menggunakan larutan NaOH atau HCL..

4.5.2. Pembuatan inokulum mikroalga

Strain mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Chlorella sp*, diperoleh dari balai budi daya air payau Jepara. Pada awal perlakuan mikroalga yang berasal dari balai budi daya tersebut diaktivasi selama 5-7 hari dalam tabung Erlenmeyer 1 L pada suhu kamar. Kultur yang telah mengandung mikroalga aktif, kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan pelet selnya, yang selanjutnya diresuspensi dan ditransfer ke dalam photobioreaktor sebagai biakan inokulum.

4.5.3. Kultivasi mikroalga

Sebanyak 1 L media cair steri BG11 dalam reaksi photobioreaktor, diinokulasi dengan 100 ml inokulum mikroalga *Chlorella sp* secara aseptis. Kemudian kultur diinkubasi pada suhu kamar, dengan pemberian aerasi dan cahaya yang berasal dari LED 40 watt. Setiap hari dilakukan sampling untuk penentuan berat sel kering biomassa dalam proses penentuan kurva pertumbuhan. Ketika pertumbuhan mencapai fase logaritmik, maka mikroalga digunakan untuk serangkaian pengujian seperti kadar total biomassa dan total lipid. Pada kultivasi ini dilakukan juga optimasi ketersediaan CO₂, pH dan aerasi sehingga diperoleh kondisi optimum yang dapat menghasilkan biomassa dan lipid yang paling tinggi.

4.5.4. Penentuan Biomassa

Penentuan berat kering biomassa ditentukan dengan metode gravimetri. Sebanyak 10 ml kultur mikroalga disentrifuge untuk diambil pelet selnya, lalu dicuci dua kali dengan akuades untuk menghilangkan sisa media. Kemudian pelet dikeringkan hingga didapatkan berat yang konstan dengan pengovenan suhu 50°C selama 24 jam. Konsentrasi biomassa di hitung sebagai berat kering per liter.

4.5.5. Penentuan kadar Lipid dan produktivitas

Kandungan lipid ditentukan melalui proses ekstraksi dan metode gravimetri. Total lipid diekstrak dari biomassa kering dari mikroalga menggunakan campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 2:1 (v/v) dan ultrasonikasi. Kandungan lipid dihitung dan dinyatakan sebagai persen berat kering sel.

Produktifitas lipid dinyatakan sebagai jumlah lipid yang dihasilkan per berat kering mikroalga perhari pada kondisi percobaan. Makin tinggi produktifitas lipidnya makin baik potensi mikroalga tersebut untuk digunakan sebagai agen produksi biodiesel.

4.5.6. Analisis komposisi asam lemak

Komposisi asam lemak akan dianalisis dengan GC-MC. Derajat biodiesel unsaturated dihitung dari komposisi asam lemak menggunakan rumus $UD = \sum P_i \times N_i$; dimana UD adalah rata-rata derajat unsaturated biodiesel, P_i = fraksi dari komponen asam lemak, dan N_i adalah jumlah ikatan rangkap dalam setiap komponen asam lemak.

4.5.7. Produksi biodiesel dengan mikroalga

Produksi biodiesel dari mikroalga akan dilakukan melalui proses esterifikasi asam lemak yang dihasilkan mikroalga. Proses esterifikasinya akan dilakukan dengan dua cara, yaitu fermentasi langsung dan tak langsung. Dalam fermentasi langsung, pertumbuhan mikroalga akan diinhibisi dengan senyawa metanol pada kondisi asam. Pada konversi tahap ini akan dilakukan optimasi kondisi konversi, sehingga kadar fatty acid metil esterasi (FAME) yang dihasilkan tinggi. Sedangkan pada cara yang tak langsung, asam lemak diekstrak dulu dari biomassa mikroalga, lalu dilanjutkan dengan esterifikasi dengan metanol. Kandungan FAME dari kedua tahap akan diidentifikasi dengan GC-MS.

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Produksi Biodiesel Secara *Ex-situ* : Ekstraksi dan Konversi Lipid Menjadi Biodiesel

Tahap produksi biodiesel secara *ex-situ* diawali dengan proses ekstraksi lipid dari mikroalga *Chlorella vulgaris*, dan dilanjutkan dengan transesterifikasi lipid yang diperoleh menjadi biodiesel. Lipid dari mikroalga *Chlorella vulgaris* diekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut campuran metanol dan kloroform dengan perbandingan (2:1), lalu ditambahkan air sebagai *co-solvent*. Campuran direfluks selama 2 jam pada suhu ± 60 °C dan bantuan stirer pada kelajuan 7 rpm. Campuran kemudian didinginkan dan disentrifuge untuk memisahkan fase cair dengan fase padat. Fase cair yang diperoleh adalah berwarna hijau, karena adanya klorofil yang ikut terekstrak. Lipid diisolasi dengan metode penguapan menggunakan *rotary vacuum evaporator* suhu 50°C pada kelajuan 30 rpm. Tetesan lipid ditampung dan ditimbang. Proses ini dapat menghasilkan % kadar lipid sebesar 19,22 % b/b.

Ekstraksi lipid pada penelitian ini mengacu metode Bligh dan Dryer yang menggunakan campuran pelarut metanol dan kloroform dengan perbandingan (2:1). Kloroform yang bersifat semi-polar dan lebih cenderung non-polar difungsikan untuk mengikat dan menarik lipid non-polar dan yang bersifat netral. Lipid dibungkus (*wrapped*) dengan lapisan tunggal fosfolipid (polar). Sementara metanol difungsikan untuk memecahkan lapisan fosfolipid yang bersifat reaktif polar. Prabakaran dan Ravindran (2011) melaporkan bahwa ekstraksi lipid dengan metode refluks menggunakan campuran pelarut metanol dan kloroform mampu menghasilkan lipid yield sebesar 19 % b/b.

5.2 Produksi Biodiesel Secara *In-Situ* : Optimasi Daya Sonikasi

Transesterifikasi *in-situ* dimulai dengan memasukkan biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* yang telah ditimbang ke dalam gelas beaker yang mengandung campuran metanol dan asam sulfat pekat sambil diaduk. Katalis asam digunakan karena kandungan FFA (asam lemak bebas) yang tinggi pada lipid mikroalga. Jadi, katalis asam

digunakan agar tidak terjadi pembentukan emulsi atau reaksi penyabunan (Kim *et al.*, 2014). Setelah itu campuran diberi perlakuan ultrasonikasi menggunakan alat ultrasonikator JY92-IIDN (Gambar 5.1). Perlakuan ini ditujukan untuk melisis sel mikroalga agar lipid mudah terekstraksi dan juga menyediakan energi agar reaksi transesterifikasi dapat berlangsung optimal. Campuran reaksi transesterifikasi membentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas yang mengandung FAME dan lapisan bawah yang mengandung pelarut dan gliserol. Campuran reaksi ini selanjutnya direfluks pada suhu $\pm 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. selama 3 jam dengan pengadukan stirer kecepatan 5 rpm.



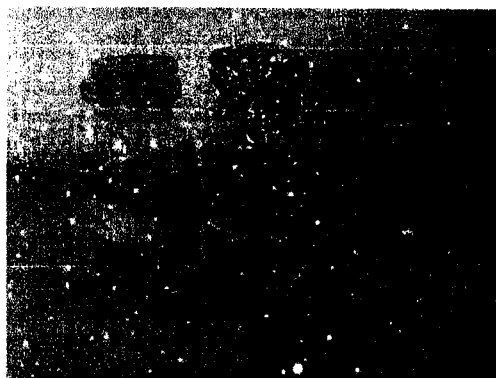
Gambar 5.1. Ultrasonikator JY92-IIDN yang digunakan pada transesterifikasi *in-situ*

Reaksi transesterifikasi tersebut terbentuk dua lapisan yaitu lapisan bawah mengandung residu dari biomassa yang berwarna hijau keputihan. Hal ini karena sonikasi memecah dinding sel sehingga bercampur sempurna dengan pelarut, FAME yang terbentuk, dan residu sel mikroalga yang akan membentuk emulsi (Zhang *et al.*, 2014). Lapisan atas mengandung campuran dari reaksi antara pelarut dan biomassa mikroalga. Setelah reaksi transesterifikasi menggunakan metode sonikasi, dilanjutkan dengan metode refluks. Campuran tersebut dimasukkan dalam labu alas bulat yang telah dihubungkan dengan kondensor balik lalu direfluks sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* pada kelajuan 5 rpm selama 3 jam pada suhu $\pm 60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Campuran didinginkan dan kemudian disentrifuge untuk memisahkan fasa cairan dan residu biomassa. Filtrat berwarna hijau diambil dan selanjutnya diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60°C untuk menguapkan metanolnya. Setelah

metanol menguap, terbentuk larutan hijau yang kental. Pada larutan ini terkandung campuran antara gliserol, FAME, dan katalis serta zat klorofil.

FAME pada campuran diekstrak dengan menambahkan n-heksana supaya dapat mengikat FAME tersebut, dan selanjutnya dipisahkan dengan corong pisah. FAME terdapat pada lapisan atas, sedang lapisan bawahnya mengandung gliserol, katalis dan sisa metanol. Lapisan atas diambil, dan ditmbauh dengan air panas untuk mencuci. Pencucian menggunakan air (*water washing*) sangat efektif untuk menghilangkan kontaminan atau kotoran. Air panas digunakan karena dapat mencegah terjadinya presipitasi dari asam lemak ester jenuh dan memperlambat pembentukan emulsi (Demirbas *et al.*, 2006). Setelah pencucian berulang kali, fasa air menjadi jernih yang menunjukkan bahwa kontaminan telah sepenuhnya hilang. Fasa air dan fasa biodiesel (FAME) dapat dipisahkan menggunakan corong pisah (Predojevic, 2008). Fasa organik (FAME) ditambahkan natrium sulfat anhidrat yang bertujuan untuk menghilangkan sisa air yang masih terdapat dalam fasa organik tersebut, lalu diuapkan pada suhu 40°C sehingga terbentuk biodiesel (FAME) murni (Gambar 5.2). Biodiesel yang diperoleh kemudian dianalisis dengan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) untuk penentuan kadar dan jenis metil ester yang dihasilkan. .



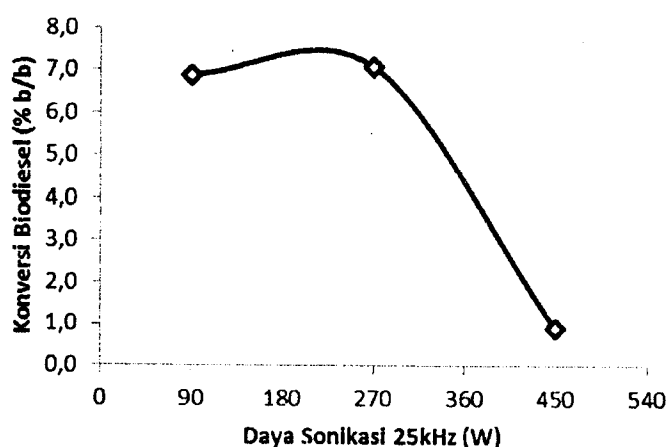
Gambar 5.2 FAME yang terbentuk setelah transesterifikasi *in-situ*

Selama proses transesterifikasi insitu ini dilakukan optimasi terhadap daya ultrasonikasi, yaitu 25kHz/90W; 25kHz/270W; 25kHz/450W. Perolehan biodiesel pada berbagai perlakuan biodiesel terlihat pada tabel 5.1 dan gambar 5.3.

Tabel 5.1 Persen luas FAME dari analisa GC-MS dengan variasi daya sonikasi

Daya Sonikasi	Persen Luas FAME
25kHz/90W	59,76
25kHz/270W	53,16
25kHz/450W	3,76

Daya Ultrasonikasi 25kHz/270W menghasilkan presentase konversi biodiesel tertinggi yaitu 7,07 % b/b (Gambar 5.2).



Gambar 5.3 Pengaruh daya sonikasi terhadap konversi biodiesel (% b/b) dari transesterifikasi secara *in-situ*

Pengaruh daya sonikasi juga diteliti oleh Martinez-Guerra *et al.* (2015) dalam produksi biodiesel dari minyak sayur bekas (*used vegetable oil*). Dilaporkan bahwa pemberian daya sonikasi 4,0 W/mL menghasilkan biodiesel *yield* sebesar 90 % b/b, dan meningkat menjadi 94 % b/b ketika digunakan daya 5,0 W/mL. Produk biodiesel menurun untuk ultrasonikasi dengan 11 W/mL.

Secara umum, diasumsikan bahwa apabila semakin tinggi input daya sonikasi yang diberikan maka akan semakin cepat reaksi transesterifikasi yang akan menghasilkan konversi biodiesel yang tinggi. Namun, pada reaksi yang menggunakan gelombang ultrasonikasi, hal ini berlaku untuk tingkat daya sonikasi tertentu. Hal ini dapat dijelaskan bahwa apabila semakin tinggi jumlah daya ultrasonik yang diberikan pada campuran reaksi, maka semakin besar jumlah gelembung kavitas ultrasonik yang terbentuk dalam larutan tersebut yang meningkatkan luas permukaan antarmuka antara lipid dan metanol.

Gelembung kavitasi yang terbentuk juga mempercepat proses sel lisis (disrupsi) dinding sel dari mikroalga sehingga meningkatkan ekstraksi lipid dari sel (Park *et al.*, 2015). Hal ini secara langsung dapat mempercepat transesterifikasi secara *in-situ* dari mikroalga *Chlorella vulgaris*. Namun apabila input daya sonikasi yang diberikan terlalu tinggi, hal ini dapat memicu pembentukan gelembung yang berlebih yang akan bergabung antara satu sama lain membentuk gelembung kavitasi yang lebih besar dan stabil yang dapat menjadi penghalang (*barrier*) terhadap proses transfer energi akustik. Fenomena ini dikenal sebagai efek dikoupling (*decoupling effect*) (Martinez-Guerra *et al.*, 2014). Maka, dapat disimpulkan bahwa daya sonikasi optimum pada penelitian ini adalah sebesar 25kHz/270W.

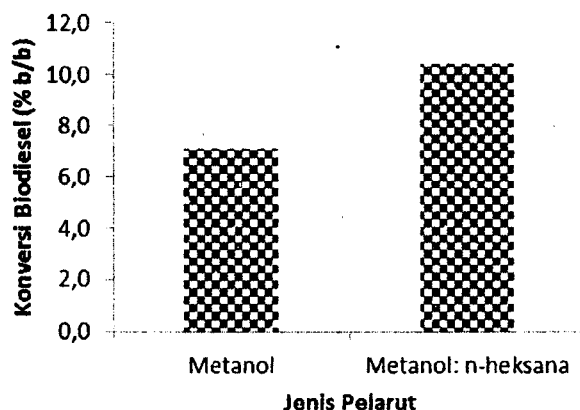
5.3 Pengaruh *Co-solvent* dalam Produksi Biodiesel Secara *In-Situ*

Pada penelitian pengaruh *co-solvent*, metode yang digunakan adalah metode sonikasi dan refluks. Penelitian dilakukan menggunakan *co-solvent* n-heksana dengan perbandingan *co-solvent* yaitu metanol:n-heksana (3:1) dan tanpa menggunakan *co-solvent*. Dari hasil analisa FAME menggunakan GC-MS seperti yang dapat dilihat pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa persentase FAME yang dihasilkan menggunakan penggunaan *co-solvent* adalah lebih tinggi dari tanpa penggunaan *co-solvent*.

Tabel 5.2 Persen luas FAME dari analisa GC-MS dengan variasi jenis pelarut

Jenis Pelarut	Persen Luas FAME
Metanol	53,16
Metanol : n-heksana	54,29

Penggunaan *co-solvent* n-heksana menghasilkan presentase konversi biodiesel tertinggi yaitu 10,39 % b/b. Terjadi kenaikan 35% perolehan biodiesel dibanding tanpa adanya *co-solvent* (Gambar 5.4).



Gambar 5.4 Pengaruh jenis pelarut terhadap konversi biodiesel (% b/b) dari transesterifikasi secara *in-situ*

Hal ini karena polaritas pelarut n-heksana yang cenderung bersifat non-polar mempermudah terjadinya kontak antara metanol dengan lipid yang umumnya bersifat non-polar sehingga proses ekstraksi lipid akan terjadi lebih cepat dan mudah (Cao *et al.*, 2013). Pelarut n-heksana tidak hanya mampu untuk melarutkan rantai panjang trigliserida tetapi juga dapat bercampur (*miscible*) dengan metanol dalam sistem katalis homogen (Zhang *et al.*, 2016). Dari hasil penelitian Zhang *et al.*, (2016) dilaporkan bahwa apabila n-heksana digunakan sebagai *co-solvent* dengan perbandingannya dengan etanol yaitu 1:3 dapat menghasilkan biodiesel *yield* yaitu sebesar 87,75% b/b. Presentase biodiesel *yield* adalah yang paling tinggi apabila dibandingkan dengan *co-solvent* yang lain seperti petroleum eter, aseton, dan dietil eter. Penggunaan *co-solvent* pada transesterifikasi *in-situ* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan biodiesel *yield*. Selain dapat mengurangi volume metanol yang bereaksi, sistem *co-solvent* berperan sebagai agen ekstraksi yang akan membentuk sistem homogen secara langsung antara minyak dari mikroalga, metanol dan katalis (Xu *et al.*, 2010).

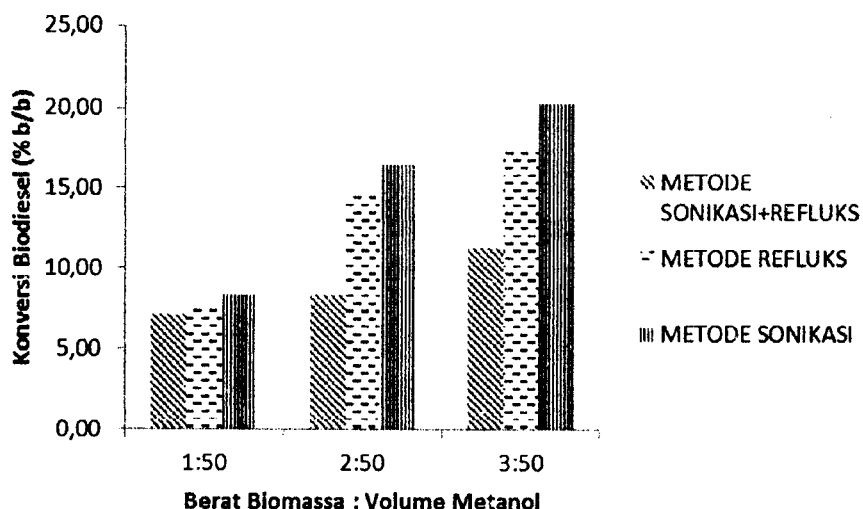
5.4. Optimasi Berat Biomassa pada transesterifikasi insitu

Optimasi ini dilakukan dengan bervariasi berat biomassa mikroalga yang dicampur dengan metanol, yaitu 1:50; 2:50; 3:50. Metanol dibuat volume tetap yaitu 50 mL. Reaksi transesterifikasi pada ketiga campuran dilakukan dengan 3 metode yang

berbeda, yaitu ultrasonikasi, refluks dan kombinasi ultrasonikasi dengan refluks. Untuk metode ultrasonikasi, gelombang ultrasonikasi diberikan dengan daya 25kHz/270W selama 60 menit. Sementara dengan metode refluks, proses refluks dijalankan selama 3 jam, dan untuk metode sonikasi dan refluks, waktu ultrasonikasi adalah 30 menit dan refluksnya selama 3 jam. Hasil FAME diperoleh paling tinggi bila digunakan metode sonikasi dengan perbandingan berat biomassa terhadap volume metanol sebanyak 3:50 (Table 5.3). Perbandingan jumlah berat biomassa terhadap volume metanol menggunakan metode sonikasi yaitu 3:50 menghasilkan presentase biodiesel tertinggi yaitu 20,31 % b/b (Gambar 5.5)

Tabel 5.3 Persen luas FAME dari analisa GC-MS dengan variasi perbandingan jumlah berat biomassa terhadap volume metanol

Jenis Metode	Berat Biomassa:Volume Metanol	Persen Luas FAME
anSonikasi Dan Refluks	1:50	53,16
	2:50	17,27
	3:50	54,51
Refluks	1:50	37,24
	2:50	38,65
	3:50	26,82
Sonikasi	1:50	30,93
	2:50	17,06
	3:50	68,08



Gambar 5.5 Pengaruh jumlah berat biomassa tergantung jenis metode yang digunakan terhadap konversi biodiesel (%) dari transesterifikasi secara *in-situ*

Jumlah berat biomassa berpengaruh terhadap konversi biodiesel. Aulakh *et al.* (2013) melaporkan bahwa transesterifikasi trigliserida dari biomassa *Aspergillus sp.*, dapat menghasilkan biodiesel 15,5-79% b/b ketika menggunakan biomassa sebanyak 5-30%, selanjutnya menurun bila biomassa yang digunakan melebihi 40% b/b. Hal ini diduga oleh adanya efek efisiensi viskositas biomassa dalam campuran reaksi.

5.5 Komposisi FAME dari Transesterifikasi Mikroalga Secara *In-situ*

Komposisi FAME yang terbentuk dari reaksi transesterifikasi mikroalga secara *insitu* dengan tiga metode adalah hampir sama (Tabel 5.4). FAME yang terbentuk adalah *methyl tetradecanoate*, *7,10,13-hexadecatrienoic acid*, *pentadecanoic acid*, *14-methyl-, 9,12,15-octadecatrienoic acid*, *(z,z,z)-, methyl stearate*, *eicosanoic acid* dengan luas puncak yang berbeda (%) Table 5.4).

Tabel 5.4 Komposisi FAME dari biodiesel dengan parameter pengaruh jumlah berat biomassa (berat mikroalga: volume metanol; 2:50) menggunakan tiga metode yang berbeda

No.	Nama Senyawa Metil Ester	Persen Luas FAME		
		Metode Sonikasi	Metode Refluks	Metode Sonikasi & Refluks
1	<i>Methyl tetradecanoate</i>	0,66	0,93	0,51
2	<i>7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester</i>	9,80	ND	ND
3	<i>7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester</i>	4,31	3,64	0,74
4	<i>Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester</i>	12,00	14,37	7,72
5	<i>Valeric acid, tridec-2-ynyl ester</i>	0,91	ND	ND
6	<i>Methyl 10-trans,12-cis-octadecadienoate</i>	5,64	ND	ND
7	<i>9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-</i>	10,53	6,51	2,10
8	<i>Methyl stearate</i>	0,80	8,19	0,54
9	<i>2-Ethylbutyric acid, octadecyl ester</i>	0,58	ND	ND
10	<i>Eicosanoic acid, methyl ester</i>	3,98	1,12	2,53
11	<i>10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester</i>	ND	0,96	ND
12	<i>2-Ethylbutyric acid, nonadecyl ester</i>	ND	2,93	ND
13	<i>Fumaric acid, 2-chloroethyl pentadecyl ester</i>	ND	ND	3,13

*ND = Tidak terdeteksi

5.6. Luaran yang telah dicapai

Bagian dari hasil penelitian ini akan dipresentasikan pada The 12th Korea-ASEAN Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable Energy, September 10~14, 2018. Selain itu juga akan dipresentasikan pada Annual Congress Of Indonesian Society For Biochemistry And Molecular Biology In Conjunction With International Collaboration Seminar

Of Chemistry And Industry (Cosci 2018), Surabaya, 11-12 October 2018. Abstrak dan letter of acceptance dari panitia seminar dicantumkan pada bagian Lampiran 1.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Proses insitu dalam transesterifikasi mikroalga *Chlorella vulgaris* menghasilkan biodiesel yield yang lebih tinggi dari pada exsitu. Produksi biodiesel insitu ini dapat berlangsung optimum ketika dikenai ultrasonikasi pada daya 25kHz/270W, menggunakan *co-solvent* n-heksana, dan dengan perbandingan berat biomassa dengan metanol sebesar 3:50. perbandingan 3:50 menghasilkan presentase konversi biodiesel dan biodiesel *yield* yang lebih tinggi adalah 20,31 % b/b dan 3,87 % b/b menggunakan metode sonikasi.
2. Proses insitu ini dapat menghasilkan biodiesel sebesar 20,31 % b/b.

6.2. Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengotimasi proses insitu dengan variable/ parameter yang lain sehingga dapat menghasilkan biodiesel yang lebih tinggi.



DAFTAR PUSTAKA

- Amini, S. dan Sugiyono. 2009. Penelitian optimalisasi umur mikroalga *Spirulina platensis* penghasil bahan baku biofuel. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan VI Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*, Jilid III, Pengolahan/Teknologi Hasil Perikanan.p 1–5.
- Basmal, J. 2008. Peluang dan tantangan pemanfaatan mikroalga sebagai biofuel. *Squalen Buletin Pascapanen Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3 (1): 34–39.
- Broto, W. dan Richana, N. 2007. Inovasi teknologi proses industri bioetanol dari ubi kayu skala perdesaan. <http://balitkab.bimasakti.malang.co.id/PDF/05-BB%20Pascapanen.Bioetanol.pdf>. Diakses pada tanggal 2 Maret 2016.
- Cheng Yan, Raúl Munoz, Liandong Zhu, Yanxin Wang., 2016, The effects of various LED (light emitting diode) lighting strategies on simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction by using of microalgae *Chlorella sp.*, *Energy* 106: 554-561
- ESDM [Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral]. 2005. Pergeseran kebijakan energi akan menguntungkan Sumatera Selatan. http://dbm.djmbp.esdm.go.id/old/portal-dpmb/modules/news/news_detail.php?id=1518.
- Hossain, A.B.M., Salleh, A., Boyce, A.N., Chowdhury, P., and Naquiuddin, M. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4 (3): 250–254.
- Jassinnee Milano, HwaiChyuan Ong, H.H.Masjuki, W.T.Chong, Man Kee Lam, Ping Kwan Loh, ViknesVellayan,, 2016, Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation, *Renewable and Sustainable, EnergyReviews*, 58: 180–197
- Santhanam, N. 2010. Ethanol from algae. <http://www.oilgae.com/algae/pro/eth/eth.html>. Diakses pada tanggal 26 Maret 2016
- Víctor Matamoros, Yolanda Rodríguez, 2016, Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: Laboratory scale study., *Journal of Hazardous Materials.*, 309: 126–132
- Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., Baqui, A., 2012. Biofuel from

- algae-Is it a viable alternative? *Procedia Eng.* 49, 221–227.
- Araujo, G.S., Matos, L.J.B.L., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L., 2013. Ultrasonics Sonochemistry Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrason. - Sonochemistry* 20, 95–98.
- Blair, M.F., Kokabian, B., Gude, V.G., 2014. Journal of Environmental Chemical Engineering Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Biochem. Pharmacol.* 2, 665–674.
- Chen, Y., Wu, Y., Hua, D., Li, C., Harold, M.P., Wang, J., Yang, M., 2015. Thermochemical conversion of low-lipid microalgae for the production of liquid fuels: challenges and opportunities. *RSC Adv.* 5, 18673–18701.
- Demirbas, A., 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers. Manag.* 51, 2738–2749.
- Dong, T., Wang, J., Miao, C., Zheng, Y., Chen, S., 2013. Biore source Tec hnology Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. *Bioresour. Technol.* 136, 8–15.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A., Teixeira, J., 2010. Third generation biofuels from microalgae. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 1355–1366.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., 2010. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel* 89, 677–684.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M.K., 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae : A Review on the Process Engineering Aspects 2010.
- Jones, C.S., Mayfield, S.P., 2012. Algae biofuels : versatility for the future of bioenergy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 346–351.
- Keris-sen, U.D., Sen, U., Soydemir, G., Gurol, M.D., 2014. Bioresource Technology An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresour. Technol.* 152, 407–413.
- Knothe, G., Razon, L.F., 2017. Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 58, 36–59.
- Liu, Y., Lu, H., Ampong-Nyarko, K., Macdonald, T., Tavlarides, L.L., Liu, S., Liang, B., 2016. Kinetic studies on biodiesel production using a trace acid catalyst. *Catal.*

Today 264, 55–62.

- Lv, J., Cheng, L., Xu, X., Zhang, L., Chen, H., 2010. Bioresource Technology Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresour. Technol.* 101, 6797–6804.
- Martins, A., Caetano, N.S., Mata, T.M., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications : A review 14, 217–232.
- Milano, J., Chyuan, H., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Kee, M., 2016. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 58, 180–197.
- Najafi, G., Ghobadian, B., Yusaf, T.F., 2011. Algae as a sustainable energy source for biofuel production in Iran : A case study. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 3870–3876.
- Nwokoagbara, E., Olaleye, A.K., Wang, M., 2015. Biodiesel from microalgae : The use of multi-criteria decision analysis for strain selection. *FUEL* 159, 241–249.
- Ramdhan, M., Timur, A., 2013. Aplikasi Sistem Informasi Geografis Dalam Penilaian Proporsi Luas Laut Indonesia (Application of Geographic Information System for Assessment of Indonesia Marine Proportion) 141–146.
- Rattanapoltee, P., Kaewkannetra, P., 2014. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. *Energy* 78, 4–8.
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., Lasa, H. De, 2013. Integrated CO₂ capture , wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing — A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 622–653.
- Rezende, R., Mendonça, D., Norie, C., Alexandre, D., Aranda, G., Maria, C., Lapa, L., 2014. Ultrasonics Sonochemistry Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrason. Sonochem.* 2, 5–9.
- Sa, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., 2014. Morphology , composition , production , processing and applications of *Chlorella vulgaris* : A review 35, 265–278.
- Salam, K.A., Velasquez-orta, S.B., Harvey, A.P., 2016. Surfactant-assisted direct biodiesel production from wet *Nannochloropsis oculata* by in situ transesterification / reactive extraction 9, 366–371.

- Shen, Y., 2014a. Carbon dioxide bio-fixation and wastewater treatment via algae photochemical synthesis for biofuels production. *RSC Adv.* 4, 49672–49722.
- Shen, Y., 2014b. Carbon dioxide bio-fixation and wastewater treatment via algae photochemical synthesis for biofuels production. *RSC Adv.* 4, 49672–49722.
- Siddiquee, M.N., Rohani, S., 2011. Experimental analysis of lipid extraction and biodiesel production from wastewater sludge. *Fuel Process. Technol.* 92, 2241–2251.
- Zeng, X., Danquah, M.K., Dong, X., Lu, Y., 2011. Microalgae bioengineering : From CO₂ fixation to biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 3252–3260.

Lampiran 1

Bagian dari hasil penelitian ini telah dipresentasikan pada International Conference

1. The 12th Korea-ASEAN Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable Energy, September 10~14 , 2018
2. Annual Congress of Indonesian Society For Biochemistry And Molecular Biology In Conjunction With International Collaboration Seminar Of Chemistry And Industry (Cosci 2018) "Recent Development of Omics Technology For Human Prosperity" Surabaya, 9-12 October 2018

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



Department of Chemical and Biological Engineering,
College of Engineering,
Korea University,
Seoul, 136-701,
Republic of Korea

INVITATION LETTER
September 10-14, 2018

The 12th Korea-ASEAN Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable Energy

Purkan Purkan

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
Airlangga University, Surabaya, Indonesia

Purkan Purkan

We are pleased to invite you to present a paper on "Ex-Situ Biodiesel Production From Local Strain of *Chlorella vulgaris* Microalgae" at the 12th Korea-ASEAN Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable Energy (September 10-14, 2018) in Korea University, Seoul, Korea.

Your participation is very important to the success and continuity of the program. We hope you will be able to attend and look forward to seeing you at the Symposium.

Thank you very much for your cooperation.

Sincerely yours,

Prof. Seung Weok Kim Ph.D
Chairman of the Symposium
Organizing Committee
Korea University

Telephone: +82-2-3290-3300
FAX: +82-2-926-6102
E-mail: kimsuw@korea.ac.kr



The Indonesian Society
for Biochemistry and
Molecular Biology

AnMicro

Asian Network on Microbial Utilization

**Annual Congress Of Indonesian Society For Biochemistry And Molecular Biology In Conjunction
With International Collaboration Seminar Of Chemistry And Industry (Cosci 2018)
"Recent Development of Omics Technology For Human Prosperity"
Surabaya, 9-12 October 2018
<http://workshop.fst.conference.unair.ac.id/>**

LETTER OF ACCEPTANCE

21st August 2018

Primary Author : Purkan

**Paper Title : Cultivation of Indonesian strain of Chlorella vulgaris Microalgae as Lipid
Source for Biodiesel Production**

Dear Author,

Congratulation on the acceptance of your paper as Oral presentation. Please submit your full paper no later than September, 15th, 2018.

And thank you for your interest in the "*Annual Congress Of Indonesian Society For Biochemistry And Molecular Biology In Conjunction With International Collaboration Seminar Of Chemistry And Industry (COSCI 2018)*".

On behalf of the Conference Advisory Committee, I would like to formally invite you to attend the seminar to present your paper on 11-12th October 2018 at Garuda Mukti Building, Universitas Airlangga, Campus C Unair Molyorejo, Surabaya, Indonesia.

Regards,
Chair, Conference Organizing Committee

Dr. Purkan, M.Si

Abstract The 12th Korea-ASEAN Joint Symposium
**Ex-Situ Biodiesel Production From Local Strain of *Chlorella vulgaris*
Microalgae**

Purkan Purkan^{1*}, Abdulloh Abdulloh¹, Ersalina Nidianti¹, Heri Septya Kusuma², Wiwin Retnowati³

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

² Department of Chemical Engineering, Faculty of Industrial Technology, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, Indonesia

³ Microbiology Division, Faculty of Medicine, Airlangga University, Jl Prof Dr. Moestajab, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: purkan@fst.unair.ac.id

ABSTRACT

Study of fatty acid methyl ester (FAME) or biodiesel production from microalgae of *Chlorella vulgaris*, local strain of Indonesia was conducted by culturing of the microalgae to prepare biomass, lipid extraction and transesterification of the lipid to FAME using acid catalyst. The *Chlorella vulgaris* had grown well in BG-11 medium and produced the density cells as 5,8 g/L on 16 days after culture using starter 20% (v/v). Pre and non threathmen of cell disruption methods as well as various solvent was developed to extract the lipid from the *Chlorella vulgaris* biomass. The highest lipid as 31% (w/w) was obtained when extraction was conducted by pre-threathmen cell disruption in 25KHz /180 watt and by using a mixture of n-hexane-ethanol (1:1) as solvent. Transesterification reaction of lipid with methanol was done by H₂SO₄ as catalyst at 45°C for 2 hours to produce fatty acid methyl ester (FAME). IN GC-MS analysis, the process could produce a total of FAME as 10%(w/w) which correspond to pentadecanoic methyl ester; hexadecanoic methyl ester; heptadecanoic methyl ester; methyl stearate; and nonadecanoic methyl ester. The yield of FAME will be increased in future by in-situ transesterification method which convert *Chlorella vulgaris* biomass directly into the biodiesel.

Keywords: microalgae; *Chlorella vulgaris*; FAME, biodiesel, cell disruption

References

1. Amini S, Susilowati R.. *Squalen.*, 2010; 5(1): 23-32.
2. Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T. *J. Sci. Technol.*, 2015; 26(6): 1179–1187.

International Collaboration Seminar Of Chemistry And Industry (Cosci 2018)
Cultivation of Indonesian strain of *Chlorella vulgaris* Microalgae as Lipid Source for Biodiesel Production

Purkan Purkan^{1*}, Abdulloh Abdulloh¹, Ersalina Nidianti¹, Abdillah Safa¹, Wiwin Retnowati²

¹ *Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya 60115- Indonesia*

² *Microbiology Division, Faculty of Medicine, Airlangga University, Jl Prof Dr. Moestajab, Surabaya, Indonesia*

*Corresponding author: purkan1@fst.unair.ac.id

ABSTRACT

*The fatty acid methyl ester (FAME) production from *Chlorella vulgaris* microalgae has been studied by sequentially investigation on the culturing of microalgae for biomass preparation, lipid extraction, and lipid transesterification for production of methyl ester. Culturing of the *Chlorella vulgaris* in the BG-11 medium showed a well growth resulting a dry cell biomass 11,6 g/L after cultured for 6 days by using inocula as 16% (v/v). Lipid of the biomass then was extracted by using various solvents with and without additional sonication. The effect of sonication could enhanced the yield of lipid from the biomass that extracted with various solvents. The highest of lipid as 31% (w/w) was obtained when the lipid extraction was conducted by a mixture solvent of n-hexane-ethanol in rasio 1:1 with additional sonication for 30 mins at frequensi 20 KHz. The lipid that obtained in the work was reacted with methanol to produce the fatty acid methyl ester (FAME). The reaction that carried out in the transesterification process at 45°C for 2 hours by using H₂SO₄ as catalyst resulted in FAME as 10%(w/w). In the GC-MS analysis, the FAME represented to the pentadecanoic methyl ester; hexadecanoic methyl ester; heptadecanoic methyl ester; methyl stearate; and nonadecanoic methyl ester. Optimization of the reaction parameters in the transesterification step will be developed in the future to improve the FAME product.*

Keywords: *microalgae; *Chlorella vulgaris*; methyl ester, FAME, sonication*

Lampiran 2. Bukti accepted pada Jurnal Bioscience, Biotechnology Research Asia



ACCEPTANCE LETTER

Registered with Registrar of Companies in India vide Regd. No. MA6NG1200110002

Biosciences, Biotechnology Research Asia

Published by **ORIENTAL SCIENTIFIC PUBLISHING CO.**

Dr. S.A. Iqbal

Executive Editor

S.No. **BBRA/3688/18**

M/s. Received on **11/06/2018**

Postal Address

Mrs. Meena Iqbal Khan C/o Dr. M.N. Khan
54, Near Post Office, Thana Road, Shahjahanabad,
Bhopal - 462 001 (India)
Mobile : +91-9893222458
E-mail : bbra_meena@yahoo.co.in
www.biotech-asia.org

Purkan Purkan

Dear Dr.
.....
Department of Chemistry, Faculty of Science
.....
and Technology, Airlangga University,
.....
Surabaya Indonesia
.....

(A) Your manuscript **Cultivation of Indonesian strain of Chlorella vulgaris**
.....
Microalgae as Lipid Source for Biodiesel Production
.....
.....

has been accepted for publication in **BIOSCIENCES, BIOTECHNOLOGY RESEARCH ASIA** Vol. **15**.....
No. **2**....., 20 **18**.....

(B) To expedite the process of publication please send your subscription charges and of your co-authors
subscription charges **Abdulloh Abdulloh, Ersalina Nidianti, Abdillah Safa,**
.....
Wiwin Retnowati
.....
.....

Dated
02-07-2018

For : Executive Editor/Publisher

Lampiran 3. Bukti submission article ke jurnal Open Chemistry (De Gruyter)

Agneszka.Topolska@degruyteropen-com.sherwebcloud.com X [App Icons] G Suite

4 of 8 < >

Submission of 15 manuscripts

purkan purkan <purkan@fst.unair.ac.id> to Agneszka
Dear Dr Agneszka Topolska.

Herewith I submit 15 manuscripts to publish in open chemistry. We hope they can publish in the year. Regarding to the invoice of publication charge, please inform me soon, so we can prepare early.

Thank you so much for your attention. I am looking forward to hear good information from you.

Regards
Dr. Purkan, M.Si

15 Attachments

Biodiesel Production by Using Lipid Extracted From Indonesian strain of Microalgae *Chlorella vulgaris*

Purkan Purkan^{1*}, Abdulloh Abdulloh¹, Ersalina Nidianti¹, Abdillah Safa¹, Wiwin Retnowati², Wiwie Soemarjati³, Seung Wook Kim⁴

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya 60115- Indonesia

² Microbiology Division, Faculty of Medicine, Airlangga University, Jl Prof Dr. Moestajab, Surabaya, Indonesia

³ Brachiswater Aquaculture Development Center Situbondo

⁴ Korea University, Department of Chemical and Biological Engineering; Adjunct Professor at Universitas Airlangga

*Corresponding author: purkan@fst.unair.ac.id

ABSTRACT

The fatty acid methyl ester (FAME) production from *Chlorella vulgaris* has been studied by sequential investigation such as microalgae culturing, lipid extraction, and lipid conversion to FAME. The *C. vulgaris* could grow well in the BG-11 medium and had a doubling time 3.7 days for its growth using inocula 16% (v/v). The optimum of dry cell biomass as 11,6 g/L was obtained after the microalgae culture harvested at 6 days. Lipid extraction from the biomass was carried out in various solvents and ultrasonication power, resulted lipid as 31% (w/w) when extracted with a mixed solvent of n-hexane-ethanol in ratio 1:1 and ultrasonication treatment at power 25 kHz/270W for 30 min. The lipid then converted to FAME through transesterification reaction with methanol using H₂SO₄ catalyst at 45°C for 2 hours, and resulted FAME with area 32.26% in GC-MS analysis. The area was corresponded to FAME rendement as 13.68% (w/w). Fatty acid profiles of FAME obtained from GC-MS analysis showed the major peaks of fatty acids found in *Chlorella vulgaris* were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and margaric acid (C17:0), and nonadecanoic acid (C19:0). Optimization of the transesterification reaction will be developed in future to improve the FAME product.

Keywords: microalgae; *Chlorella vulgaris*, FAME, ultrasonication

INTRODUCTION

Depletion of petroleum energy resources or fuel oil as a result of high fuel consumption becomes a major issue in many countries. To overcome this problem many countries develop biofuels, one of which is biodiesel as renewable energy. It is also classified as a safety energy, because it has no aromatic compounds, easily degraded, and free of SO_x component. Biodiesel is more specifically defined as the monoalkyl esters of long-chain fatty acids derived from the chemical reaction (transesterification) of

renewable feedstocks, such as vegetable oil or animal fats, and alcohol with or without a catalyst [1].

Biodiesel has a significant energy similar to petroleum-derived diesel oil, therefore it has more potential to substitute the diesel. Because the cost raw of material needs 75% of the total cost on biodiesel production [2], the choice of an appropriate resource is the most important thing to ensure a low production cost biodiesel. Microalgae has been suggested as a good candidate for fuel production because of their advantages of higher photosynthetic efficiency, higher biomass production and faster for growth than other energy crops [3]. Microalgal cells have a high oil content, so it is a suitable to be developed as a material source in the biodiesel production. The composition of various fatty acids in microalgae makes the biodiesel that has different characteristics [2]. In addition, the use of microalgae does not compete with food [3].

Indonesia has a high biodiversity of microalgae scattered in terrestrial and marine waters, however the potency of microalga has not yet explored optimally. Microalgae consist of various species such as diatom microalgae (Bacillariophyceae), green microalgae (Chlorophyceae), gold microalgae (Chrysophyceae), and blue microalgae (Cyanophyceae) [1]. Microalgal cultivation is essential for the provision of sustainable feedstock sources in biodiesel production. Microalgal cultures can be performed in a bioreactor containing a liquid medium with additional supply of air and irradiation. The cost of cultivation is also relatively cheap, since it does not require much fertilizer and nutrients.

The main components of triglycerides in microalgae can be converted to biodiesel or fatty acid methyl ester (FAME) through the transesterification reaction with methanol by using acid, base or enzyme catalysts. The reaction can be run in two ways, ie ex-situ and in-situ transesterification [4,5]. In the ex-situ method, the biodiesel is prepared through two stages, started by lipid extraction then followed by a transesterification reaction. While in the in-situ method, both lipid extraction and transesterification steps are performed in one process.

One of key parameters required for FAME production with ex-situ process is the high availability of lipid. Solvent extraction is used to obtain lipid from microalgae due to its simplicity and relatively inexpensive process which has almost no investment for equipment [6,7]. Various solvents such as hexane, methanol, chloroform, and combination of them are usually used in the extraction [8]. The efficiency on lipid extraction is highly dependent on the polarity of the solvent and the ease of solvent access to the lipid storage in the cell parts. In addition to the solvent extraction, some methods which facilitate the cell disruption are usually combined to enhance the lipid yield by some pre-treatments such as microwaves, sonication, bead-heating and supercritical extraction with CO₂ [9,10]. Although different methods for extracting compounds from several species of microalgae including *C. vulgaris* has been reported [10], but no comparison of lipid made to the solvent extraction, even its association with the biodiesel production.

This study has reports the FAME production from microalgae *C. vulgaris* isolated from Indonesia which performed by ex-situ process including the cultivation and harvesting of the microalgae, lipid extraction and its conversion to biofuels.

MATERIAL AND METHODS

Sample and chemicals

Chlorella vulgaris used in this research is obtained from Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP), Situbondo, East Java, Indonesia. All chemicals for solvents and reagents were obtained from commercial sources and had a specification in analytical grade.

Cultivation of microalgae

C. vulgaris was cultured in the BG-11 medium [11] in the fotobioreactor system (1 L) equipped by a light source from three lamps (each 40 Watt). The culture was incubated under aerated CO₂ at room temperature. An inocula of 16% (v/v) was used in the cultivation. The cell density of culture was measured by spectrophotometry at 540 nm to determine the growth curve.

Lipid extraction

Lipid extraction was performed by using the Bligh and Dyer method [12]. The 5 g of dry biomass of *C. vulgaris* was dissolved respectively in 30 mL methanol, 30 mL mixed solvent of chloroform: methanol in ratio of 2:1, and 30 mL n-hexane. Every work was further subjected with an ultrasonic wave by using ultrasonicator (JY 92-IIDN) at 25kHz/270W for 30 min, then refluxed at room temperature for 2 hours. After centrifuging at 6000 rpm for 10 min, the solvent phase was taken and evaporated in the rotary evaporator under vacuum at 60°C. This work was repeated for three times to get the entire lipid. The effects of solvents polarities on lipid extraction was also investigated in this study. Yield of lipid was calculated based on the equation:

$$\text{Lipid (\%)} = \frac{\text{mass of lipid (g)}}{\text{mass of microalgae (g)}} \times 100$$

Transesterification

The ex-situ transesterification was performed according to the Zhang method [13]. Lipids and methanol in molar ratio of 1:6 was mixed, then added 1% (w/w) concentrated sulfuric acid. The reaction was run at 45°C for 2 hours. After cooling, the filtrate was evaporated in a rotary vacuum evaporator at 60°C with 90 rpm. The filtrate was collected and added 10 mL n-hexane. The mixture was centrifuged at 8000 g for 20 min. Two layers which formed after centrifugation was shaken out for 20 min in the separation funnel. The bottom layer containing hydrophilic phase was removed, whereas the top layer containing organic phase was taken and washed with 10 mL of hot water. After addition of anhydrous sodium sulfate, the organic phase evaporated in a rotary vacuum evaporator at 45°C with a speed of 30 rpm. A solution containing FAME was collected and its weight was measured.

Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC-MS) Analysis

Sample was dissolved in n-hexane, then 1 µL of this injected into an Agilent GC-MS 5977 instrument using HP-5MS column with length 30 m, diameter 0.25 mm, and film thickness of 0.25 µm. Injection and detector temperature were maintained at 250°C.

Initial column temperature was set at 100°C for 5 min, then increased to 300°C with gradient of 20 °C/min. The MS Source and Quard of the instrument were 230°C and 150°C, respectively, then set at low mass of 30 and high mass of 550 for sample measurement. Methyl heptadecanoate was used as standard for this analysis. The conversion of biodiesel resulting from the transesterification process is determined by the equation:

$$\text{FAME}(\%) = \frac{\sum A - A_s}{A_s} \times \frac{C_s \times V_s}{m} \times 100\%$$

Where, $\sum A$ parameter constitutes as a total peak area of the methyl ester (C14:0-C24:1); A_s as a peak area of standard solution; C_s as a concentration of standard solution; V_s = volume of the standard solution and m as mass of samples [14].

RESULTS AND DISCUSSION

*The growth characteristics of *Chorella vulgaris* in a batchculture*

C. vulgaris was cultured to observe its growth profile. The growth of microalgae in BG-11 medium with an inoculum showed typical pattern with 4 phases consisting of adaptation, logarithmic, stationary and death phases (Fig.1). The adaptation phase was occurred at day 0-1 marked by no significant growth, because the microalgae need initial adaptation to new environment. The logarithmic phase was occurred at day 1 – 5 that indicated by a significant increase in the growth of *C. vulgaris*. In this phase, the microalgal cells uptake the excessive nutrients in the medium to support their growth to obtain the energy, so the number of cells was increased up to (0,79x10⁶/ml) logarithmically. At days 5, the growth of *C. vulgaris* entered to the stationary phase, characterized by stagnant growth. In this phase, the cell number of growth and death is balance. The *C. vulgaris* showed doubling time for it growth at 3.7 days, after determined based on the growth curve. Characteristics and morphological feature of the local strain of *C. vulgaris* have demonstrated its close similarity with genus *Chlorella vulgaris*. The individual cells of the strain are green colour, unicellular, spherical in shape its shows the Fig 2. Preparation of *C. vulgaris* biomass for lipid extraction was performed by using inoculum of 16% (v/v) followed by culturing for 5 days. A dry biomass of 11.6 g/L was obtained after draying overnight at 50°C.

*Lipid extraction from *C. vulgaris**

The lipid from *C. vulgaris* biomass was extracted by using several solvents both polar and non-polar such as methanol, methanol:chloroform, and hexane. The ultrasonication treatment was assisted to help the disruption of microalgae cells. The effect of ultrasonication power and polarity of solvents on lipid extraction was investigated in this study. Lipid extraction without assisted by ultrasonication using solvents of methanol, n-hexane, and a mixture chloroform with methanol in ratio 1: 2 resulted in lipid yield as 15%, 24% and 19% (w/w) respectively, whereas those with additional ultrasonication resulted in 17%, 29% and 22% (w/w). (Fig. 3). The solvent of n-hexane could extract lipid higher than the two other solvents. It seems that n-hexane has a role to disrupt the existing hydrophobic interactions between non-polar and neutral lipid compounds. In

addition to the result, the applying of ultrasonication treatment also affect the increase of lipid yield. The ultrasonic wave could induced the disruption of microalgae cells that facilitate the lipid becoming easy to contact with organic solvent. Since the presence of lipids in cells is enclosed by polar phospholipid layers of cell membrane, the splitting of the layer is required to release the non-polar lipids [13]. Based on this principle, the lipid extraction in the study was also conducted by a mixed solvent of n-hexane with methanol and ethanol respectively. The mixed solvent of n-hexane - methanol and n-hexane - ethanol in ratio of 1: 1 could extract the lipid of 25% and 31% (w/w) respectively (Fig 4). The polarity index of n-hexane – ethanol mixed solvent might fit to the *C. vulgaris* lipid, so it could extract lipid higher than n-hexane - methanol mixed solvent. Optimization of ultrasonication power on extraction had been investigated for the n-hexane - methanol mixed solvent, and the results showed the highest of lipid yield was obtained when the ultrasonication-assisted cell disruption of microalgae was done at power 25kHz/270W (Fig 5). The ultrasonic wave induce the cavitation process as a basis of cell lysis. Although an increase in the power ultrasonicator can improve the cavitation process so the cell is easy to lysis, but if the power used is excessive, it can cause bubbles that actually reduce lipid yield. The lipid product for the extraction was analyzed by GC-MC to search the fatty acids component, and resulted pentadecylic acid, palmitic acid, heptadecanoic acid, stearic acid, margaric acid and nonadecylic acid as component of the lipid (Table 1).

Lipid conversion to fatty acid methyl ester (FAME)

The production of fatty acid methyl ester (FAME) is conducted by mixing lipid with methanol in transesterification reaction using H_2SO_4 catalyst. The glyceride that presented in the lipid is transformed to glycerol and methyl esters. Because of the transesterification is included in the reversible reaction, so the excessive of methanol is needed to shift the reaction toward the FAME product [16]. Methanol was chosen as a reactant in the study because it is classified as a cheap material, having a low boiling point and its excess in the glycerol phase easily to be separated [15].

Fatty acid profiles analyzed by GC-MS showed 32.26% FAMES yield (Table 1). The area is corresponded to FAME rendement as 13.68% (w/w). GC-MS chromatogram of FAMES produced from ex-situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. The major peaks of fatty acids found in *Chlorella vulgaris* were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and margaric acid (C17:0), and nonadecanoic acid (C19:0). For fuel properties, the length of carbon chain and the number of double bonds are important, in which C16:1 and C18:1 are the ideal biofuel feedstock [17, 18]. Five common feedstocks includes C16:0 (palmitic acid), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid) and C18:3 (linolenic acid) which were suitable for biodiesel production [19,20]. Fatty acids conversion to fatty acid methyl esters (FAMES) can be economically applied at remote biomass production facilities for servicing production site and community energy and transport fuel needs [21].

The GC-MS chromatogram gave an unique retention time and ion fragmentation profile for every FAME. A chromatogram data corresponded to the retention time of 12.2 min showed fragmentation profile with the highest of molecular ions m/z at 270 (Fig 6 and 7). The fragment of m/z 270 might represent to the $C_{17}H_{34}O^{2+}$ ion for methyl

hexadecanoic. Abdulloh *et al.* (2014) described the m/z 74 fragment is derived from $C_3H_6O^{2+}$ ion yielded by the breakdown of $-\beta$ through McLafferty rearrangement [16]. The m/z 239 fragment represents the $C_{16}H_{31}O^+$ which a methoxy group was lost, whereas the m/z 43 fragment was produced by the release of a radical from $C_{12}H_{24}COOCH_3$ molecule. The molecular ion with m/z 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213 and 227 emerged due to the CH_2CH_2 fragmentation respectively, known as ion fragmentation pattern of the series $C_nH_{2n-1}O^{2+}$. This similiar mechanism was also reported for methyl palmitate [22]. The result showed the FAME could be produced well by ex-situ transesterification of lipid extracted from *C. vulgaris*. Optimizing the condition for the reaction will be perfected in future to improve the biodiesel yield.

CONCLUSION

The *C. vulgaris* could grow well in the BG-11 medium and showed the doubling time at 3.7 days for its growth using inocula 16% (v/v). The microalgae growth resulted dry cell biomass as 11,6 g/L after cultured for 6 days. The lipid as 31% (w/w) could be resulted after the biomass extracted by a mixed solvent of n-hexane-ethanol in rasio 1:1 and ultrasonication threatment at power 25 kHz/270W for 30 min. The lipid could be converted to FAME in the transesterification reaction with methanol using H_2SO_4 catalyst at 45°C for 2 hours, and appeared FAME with area 32.26% in GC-MS analysis that corresponded to FAME rendement as 13.68% (w/w). Fatty acid profiles analyzed by GC-MS showed the major peaks of fatty acids found in *Chlorella vulgaris* were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and margaric acid (C17:0), and nonadecanoic acid (C19:0). Optimization of the transesterification reaction will be developed in future to improve the FAME product.

ACKNOWLEDGEMENT

This reseach was suppoted by funding of Ministry of Research and Techonology, Republic of Indonesia, Contract Number: 004/SP2H/LT/DRPM/IV/2017. The authors would like to thank Prof. Seung Wook Kim (Korea University, Department of Chemical and Biological Engineering; Adjunct Professor, Universitas Airlangga) for his professional advice during completion of this manuscript.

REFERENCES

1. Amini S, Susilowati R. Produksi biodiesel dari mikroalga *Botryococcus braunii*. *Squalen.*, 2010; 5(1): 23-32.
2. Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *J. Sci. Technol.*, 2015; 26(6): 1179–1187.
3. Dong T, Wang J, Miao C, Zheng Y, Chen S. Biore source Tec hnoogy Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. *Bioresour Technol.*, 2013;136: 8–15.
4. Milano J, Ong H.C, Masjuki H, Chong W.T, Lam M.K, Loh P.K, Vellayan V. Microalgae Biofuels as an Alternative to Fossil Fuel for Power Generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.*, 2016; 58: 180–197.

5. Koberg M, Cohen M, Ben-Amotz A, Gedanken A. Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology.*, 2011; 102: 4265-4269.
6. Letellier M, Budzinski H. Microwave Assisted Extraction of Organic Compounds. *Analisis.*, 1999; 27: 259.
7. Widjaja A, Chao-Chang C, Yi-Hsu J. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*, 2009; 40: 13–20.
8. Mubarak M, Shaija A, Suchithra T.V. A Review on the Extraction of Lipid from Microalgae for Biodiesel Production. *Algal Research.*, 2015; 7: 117–123.
9. Byreddy A.R, Gupta A, Barrow C.J, Puri M. Comparison of Cell Disruption Methods for Improving Lipid Extraction from Thraustochytrid Strains. *Mar. Drugs.*, 2015; 13(8): 5111–5127.
10. Mendes R.L, Nobre B.P, Cardoso M.T, Pereira A.P, Palavra A.F. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Pharmaceutical Importance from Microalgae. *Inorg. Chim. Acta.*, 2003; 356: 328.
11. Stanier R.Y, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, 1971; 35: 171-205 .
12. Bligh E.G, Dyer W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959; 37: 911.
13. Zhang X.L, Yan S, Tyagi R.D, Drogui P, Surampalli R.Y. Ultrasonication Assisted Lipid Extraction from Oleaginous Microorganisms. *Bioresource Technology.*, 2014; 158, 253–261.
14. Ruppel T, Huybrighs T. Fatty Acid Methyl Esters in B100 Biodiesel by Gas Chromatography (Modified EN 14103). [www. Perkinelmer.com. html](http://www.perkinelmer.com.html). Retrieved on May 25, 2016
15. Park J.Y, Park M.S, Lee Y.C, Yang J.W. Review Advances in Direct Transesterification of Algal Oils from Wet Biomass.. *Bioresource Technology.*, 2015; 184: 267–275.
16. Abdulloh A, Maryam S, Aminah N.S, Triyono T, Trisunaryanti W, Mudasir M, Prasetyoko D. Modification of Turen's Bentonite with AlCl₃ for Esterification of Palmitic Acid. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis.*, 2014; 9 (1): 66-73.
17. Knothe, G., 2008. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* 22 (2), 1358–1364.
18. Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Christian Larroche, C., Thakur, I.S., 2017. Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: a review. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.050>.
19. Knothe, G., 2006. Analyzing biodiesel: standards and other methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 823–833.
20. Singh, J., Thakur, I.S., 2015. Evaluation of cyanobacterial endolithic *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for integrated wastewater treatment and biodiesel production: a toxicological perspective. *Algal Res.* 11, 294–303.

21. Selvarajan, R., Felföldi, T., Tauber, T., Sanniyasi, E., Sibanda, T., Tekere, M., 2015. Screening and evaluation of some green algal strains (Chlorophyceae) isolated from freshwater and soda lakes for biofuel production. *Energies* 8, 7502–7521.
22. Soerya D.M, Desi S.H. Analisis Spektrofotometer Infra Merah dan Kroma-tografi Gas-Spektrometri Massa Kandungan Senyawa Non polar Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* Linn.) Fermentasi. *J. Al-chemy*. 2003; 2: 57 – 66.

Figure Legends

- Fig 1.** The growth curve of *Chlorella vulgaris* in BG-11 medium with 16% (v/v) of inoculum. The curve showed a doubling time for cell growth on 3.7 days.
- Fig 2.** Microscopy picture of *C. vulgaris*, the green microalgae used in this study
- Fig 3.** The lipid extraction from *C. Vulgaris* biomass with different solvent.
- Fig 4.** The effect of solvent and sonication on the lipid extraction of *C. Vulgaris* biomass.
- Fig 5.** Effect sonification power on lipid extraction using hexane: methanol solvents.
- Fig 6.** The GC chromatogram of transesterification product of lipid from *Chorella vulgaris*. There are six peaks representing FAME, which are 11.671; 12.200; 12.765; 12.793; 13.182 and 13.634 min that correspond to pentadecanoic methyl ester; hexadecanoic methyl ester; heptadecanoic methyl ester; heptadecanoic methyl ester, methyl stearate; and nonadecanoic methyl ester respectively.
- Fig 7.** The MS spectrum of hexadecanoid methyl ester fragmentation.

Table Legend

Table 1. FAME composition of *Chlorella vulgaris*

Fig 2.

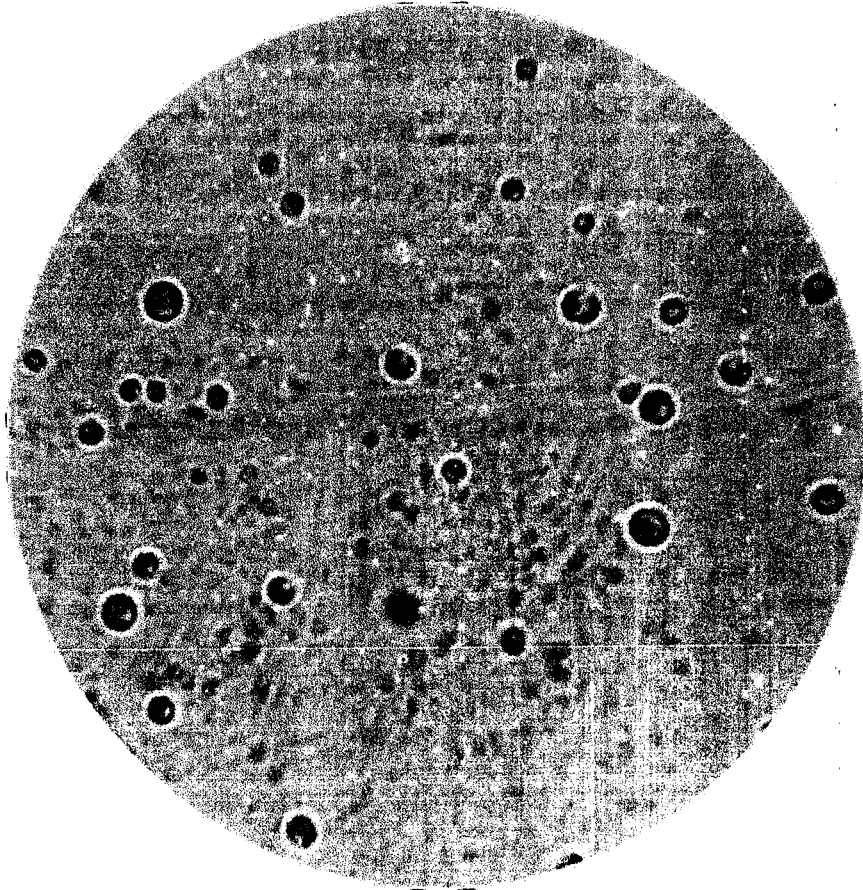


Fig 3

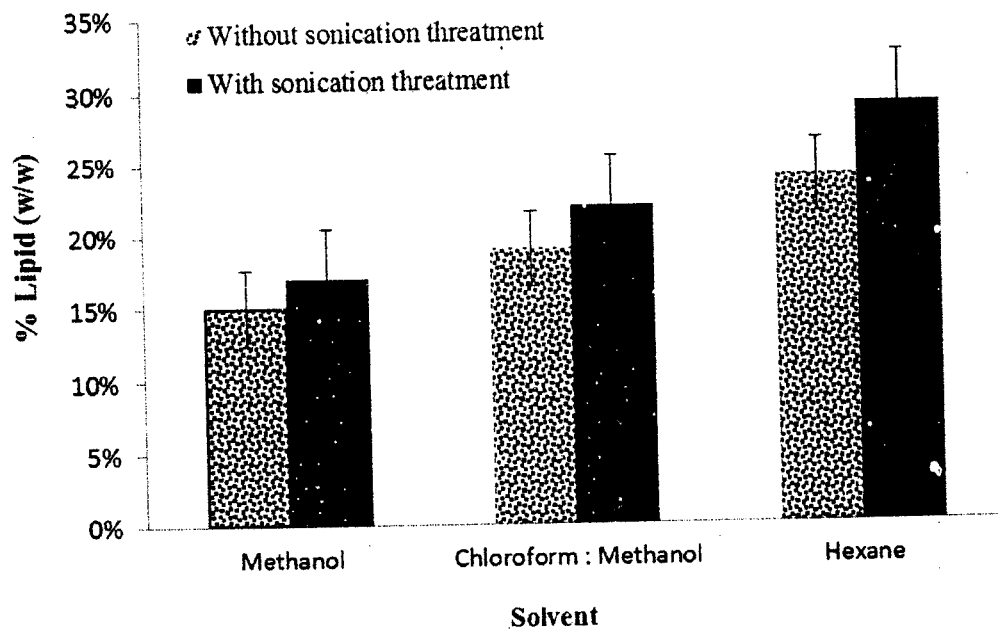


Fig 4

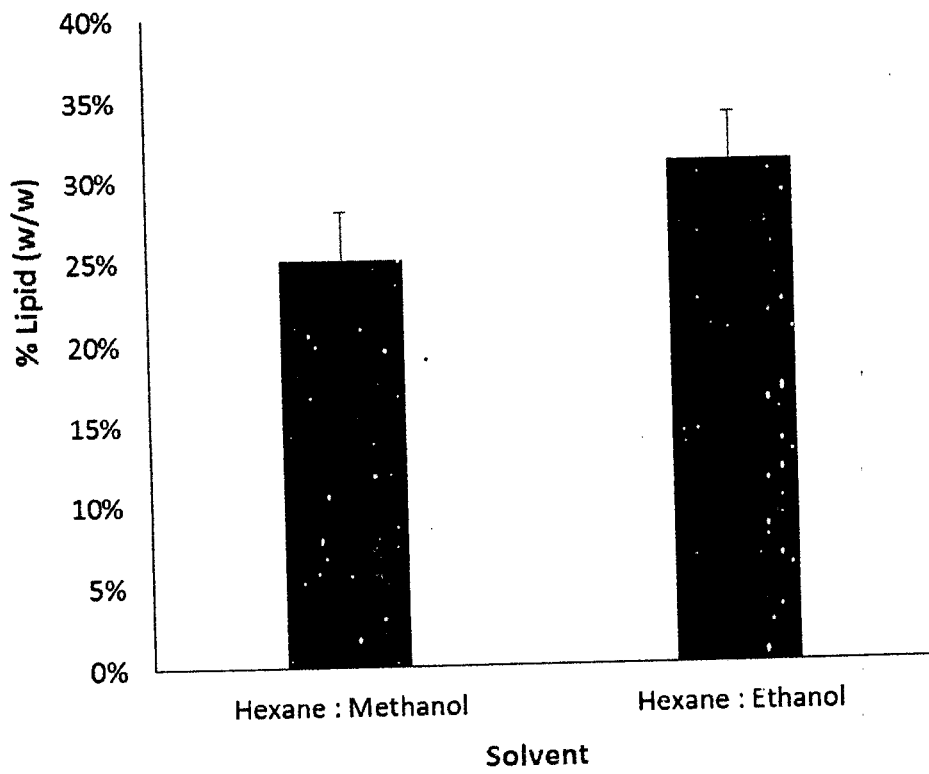


Fig 4

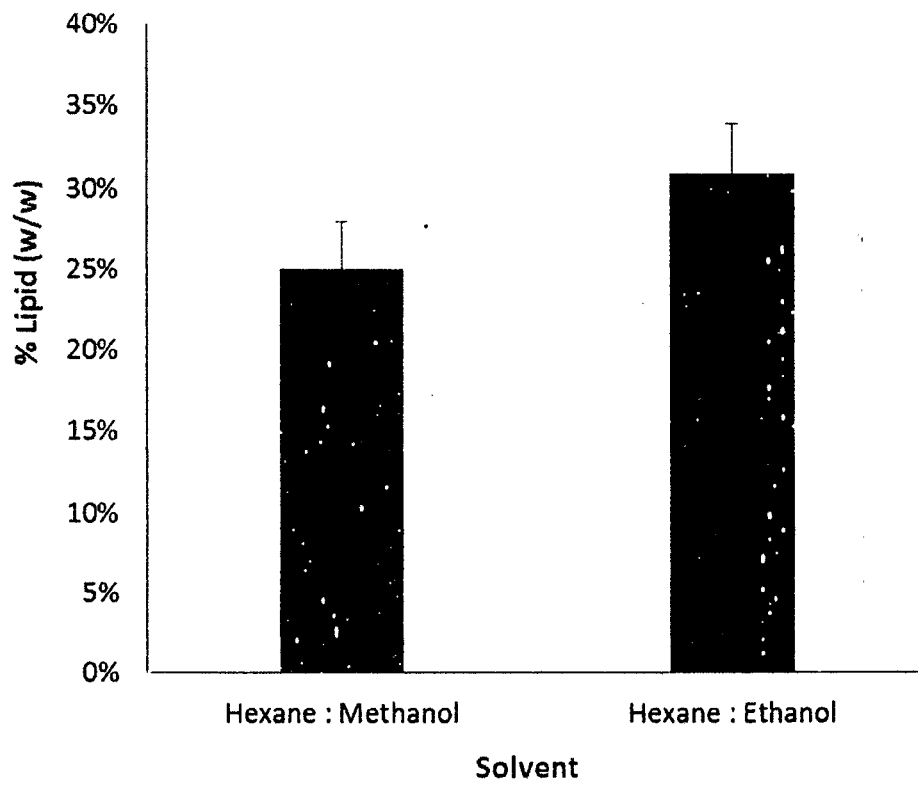


Fig 5

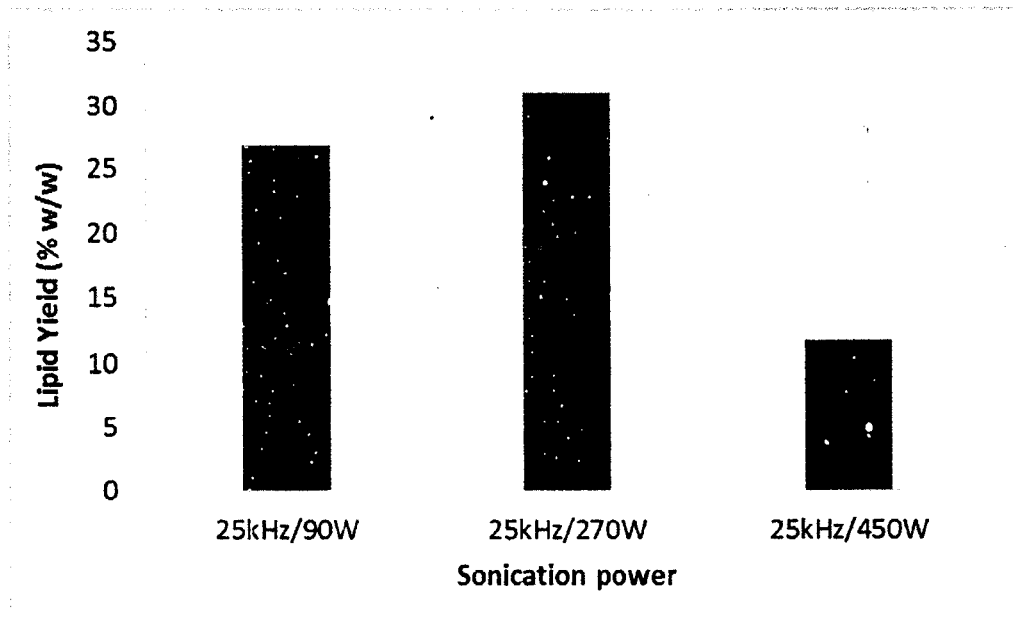


Fig 6

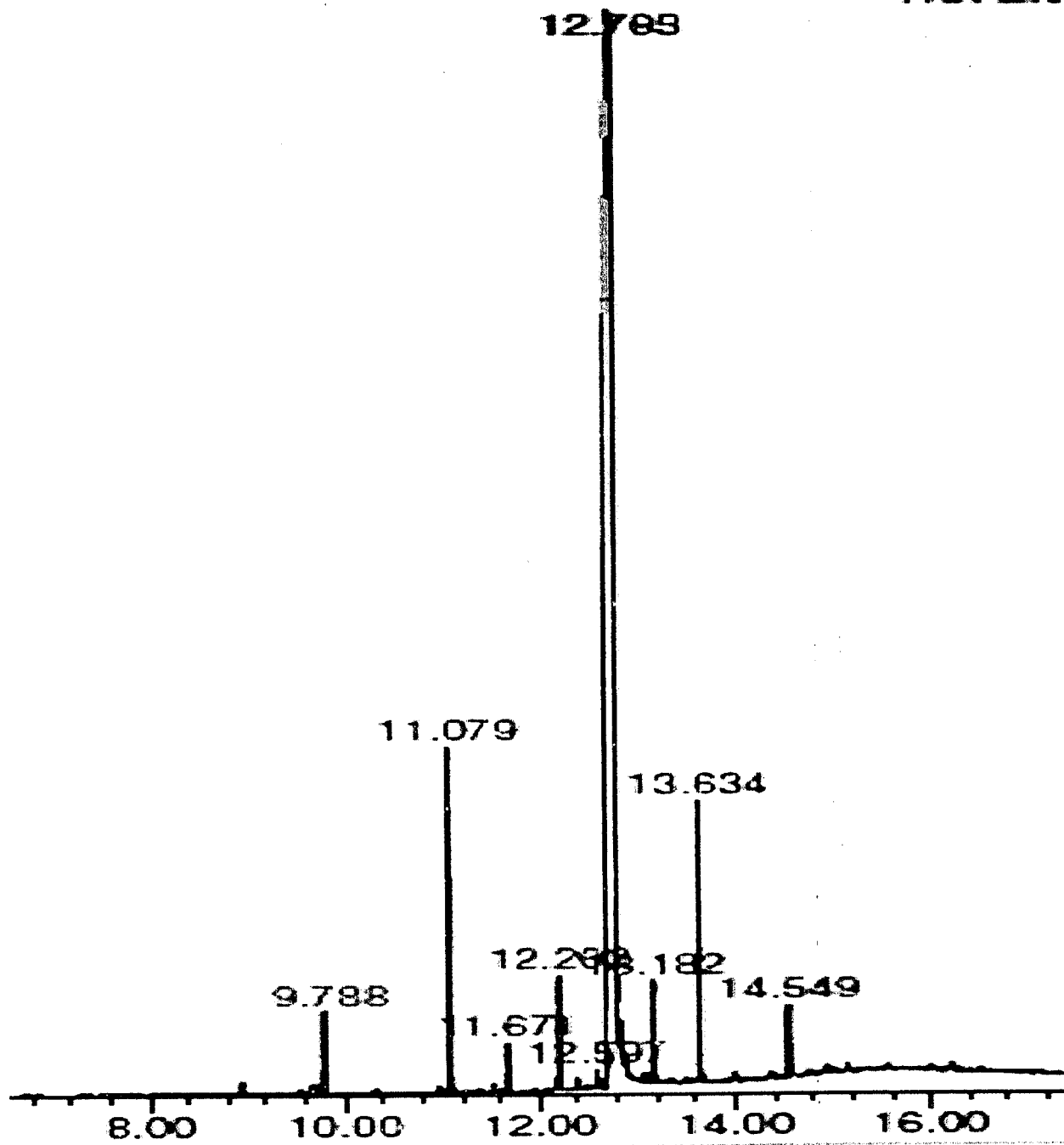


Fig 7

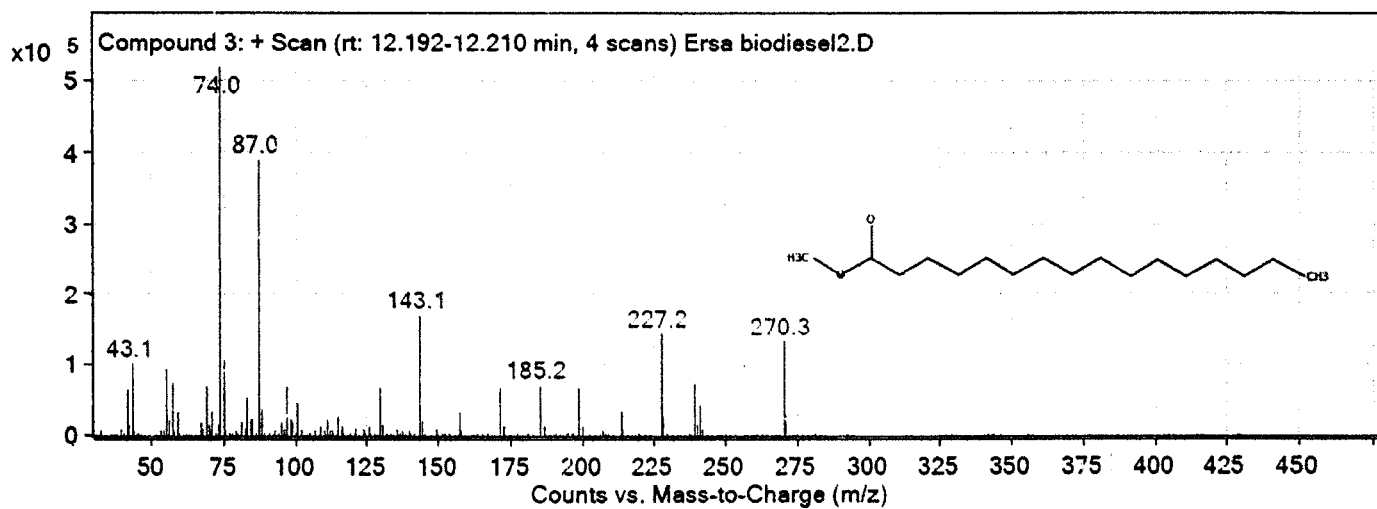


Table 1

No	FAME	RT (min)	Formula	Area %
1	Butylated Hydroxytoluene	9.788	C ₁₅ H ₂₄ O	1,29
2	1,2,4-Triazol-4-amine, N-(2-thienylmethyl)-	11.082	C ₇ H ₈ N ₄ S	4,97
3	Pentadecanoic acid, methyl ester	11.671	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0,59
4	Hexadecanoic acid, methyl ester	12.204	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1,55
5	8-Octadecenal	12.596	C ₁₈ H ₃₄ O	1,36
6	Heptadecanoic acid, methyl ester	12.768	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	67,74
7	Heptadecanoic acid, methyl ester	12.791	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	16,16
8	Methyl stearate	13.183	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	1,37
9	Nonadecanoic acid, methyl ester	13.634	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	3,96
10	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	14.548	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	1,01
Total : FAME in sample				32,26
Total : FAME in sample + standart				100

*Standart