

Identifikasi Asam Lemak dari Ragi *Rhodotorula gracilis*

Dyah Oktavia, Refdinal Nawfa

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: refnawfa@chem.its.ac.id

Abstrak – Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar dan jenis asam lemak yang terkandung dalam ragi *Rhodotorula gracilis*. Lipid diekstraksi menggunakan campuran pelarut kloroform:metanol (2:1 v/v). Lipid yang diperoleh kemudian ditransesterifikasi dengan BF₃-metanol 14%. Hasil transesterifikasi dianalisis menggunakan Kromatografi lapis Tipis dan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM). Kadar lipid total ragi *R. gracilis* yang diperoleh sebesar 0,0841 g/g sel kering (8,4107%). Total metil ester yang diperoleh dari hasil transesterifikasi sebesar 83,86%. Hasil Analisis asam lemak menunjukkan ada lima jenis metil ester yang teridentifikasi yaitu asam tridekanoat 0,98%, asam heksadekanoat (asam palmitat) 15,37%, asam heptadekanoat 2,09%, asam 9-oktadekanoat (asam oleat) 58,88%, dan asam oktadekanoat (asam stearat) 6,54%.

Kata kunci: Lipid; asam lemak; metil ester; transesterifikasi; BF₃-metanol; *Rhodotorula gracilis*

I. PENDAHULUAN

Ragi (*yeast*) termasuk kelompok jamur yang tidak dapat membentuk miselium dan dapat tumbuh serta berkembang biak lebih cepat daripada jamur. Ragi mampu menghasilkan energi dari senyawa organik dalam kondisi aerob maupun anaerob sehingga dapat tumbuh dalam kondisi ekologi yang berbeda^[1].

Kandungan utama dari ragi adalah protein, karbohidrat dan lipid. Persentase ketiga komponen tersebut bervariasi tergantung jenis ragi. Sebagai contoh, *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kandungan protein sebesar 55,4%, karbohidrat 28% dan lipid 45%^[2], sedangkan *R. gracilis* memiliki kandungan protein sebesar 20%, karbohidrat 20% dan lipid 51%^[3]. Identifikasi atau taksonomi mikroorganisme lebih banyak menggunakan karakteristik morfologi. Cara seperti ini memiliki kelemahan yaitu adanya kemungkinan perbedaan kriteria secara morfologi diantara para peneliti^[4]. Oleh karena itu, diperlukan studi-studi taksonomi secara lebih mendalam, tidak hanya berdasarkan pada karakteristik morfologi saja tetapi juga fisiologis, kimiawi dan ciri-ciri genetik^[5].

Komposisi asam lemak yang terkandung dalam suatu mikroorganisme dapat digunakan untuk taksonomi^[6]. Asam lemak memiliki variasi struktur yang banyak sehingga berpotensi digunakan sebagai biomarker. Kegunaannya adalah meramalkan komposisi asam lemak suatu mikroorganisme berdasarkan komposisi asam lemak yang dimiliki oleh mikroorganisme lain dalam satu marga. Misalnya, delapan jenis ragi dari marga *Pichia sp* diketahui mengandung komposisi asam lemak yang hampir sama yaitu asam lemak palmitat, asam lemak palmitoleat, asam lemak stearat, asam lemak oleat, dan asam lemak linoleat, sedangkan perbedaannya hanya ditemui pada asam lemak linolenat. Beberapa spesies tidak memiliki asam lemak linolenat, seperti *P. haplophila*, *P. etchellsii*, dan *P.*

sorbitophila^[7]. Beberapa jenis ragi dari marga *Rhodotorula* juga memiliki kesamaan komposisi asam lemak. *Rhodotorula glutinis* memproduksi asam lemak palmitat hingga 30,06%; stearat hingga 39,65%; oleat hingga 28,46% dan linoleat 8,01%^[8]. Komposisi asam lemak *R. rubra* yaitu asam lemak oleat hingga 47%, linoleat 8% dan palmitat 37%. Komposisi asam lemak *R. minuta* yaitu asam palmitat hingga 15%, stearat hingga 5%, oleat hingga 30% dan linoleat hingga 13%^[9].

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini dilakukan identifikasi asam lemak dari ragi *R. gracilis* untuk mengetahui komposisi asam lemaknya. Hasil transesterifikasi asam lemak yang diperoleh dianalisis berdasarkan karakterisasi Kromatografi lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Gas-Spektrometri Massa KG-MS).

II. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Pembuatan Media

Media padat dibuat menggunakan bahan-bahan yang terdiri dari (g/L): glukosa 10, agar 15, pepton 7,5 dan ekstrak ragi 7,5. Media cair dibuat menggunakan bahan-bahan yang terdiri dari (g/L): glukosa 10, pepton 7,5 dan ekstrak ragi 7,5.

2.2 Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Satu koloni *R. gracilis* dibiakkan dalam media cair, kemudian setiap enam jam diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum untuk mengetahui turbiditasnya.

2.3 Produksi Biomassa dan Sel Kering

Satu ose biakan ragi diinokulasi ke dalam media cair dan digoyang dengan *shaker* 120 rpm. Selanjutnya dilakukan pemanenan pada jam ke 18.

2.4 Ekstraksi Lipid Total

Sel kering yang diperoleh digerus kemudian diekstrak sebanyak lima kali menggunakan pelarut 50 ml kloroform:metanol (2:1 v/v) dengan cara direfluks selama 1 jam pada temperatur 45-50 °C.

2.5 Reaksi transesterifikasi

Lipid yang diperoleh kemudian diubah menjadi metil ester menggunakan pelarut kloroform:metanol (2:1 v/v), reagen BF₃-metanol dan ko-pelarut toluena.

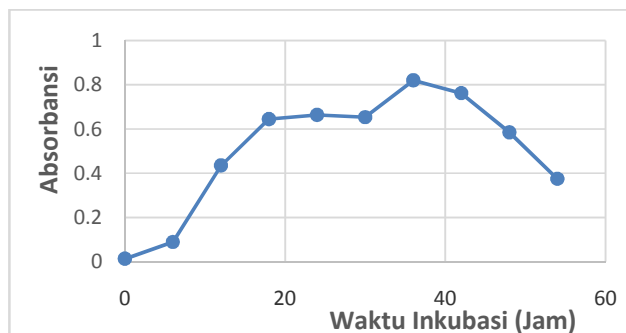
2.6 Analisis asam lemak

Metil ester yang diperoleh kemudian dianalisis dengan KLT dan KG-SM

III. HASIL DAN DISKUSI

3.1 Kurva Pertumbuhan

Pada penelitian ini digunakan metode turbidimetri. Setelah dilakukan pengukuran absorbansi terhadap waktu, diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 3.1.



Gambar 1 Kurva pertumbuhan *R. gracilis*

Gambar 1 menunjukkan bahwa fase pertumbuhan dipercepat berlangsung pada ±6 jam pertama. Pada fase ini ragi merombak materi dalam medium agar dapat digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya. Ragi mengalami fase eksponensial pada jam ke-8 hingga jam ke-36. Fase eksponensial ditandai dengan peningkatan biomassa secara signifikan meskipun tidak diikuti dengan laju yang konstan. Fase ketiga adalah fase stasioner yang terjadi beberapa setelah jam ke-36. Ragi mengalami laju pertumbuhan maksimum pada fase ini, namun jumlah sel yang mati juga bertambah karena nutrisi dalam medium semakin berkurang. Biomassa tidak akan mengalami banyak perubahan.

Pemanenan sebaiknya dilakukan pada akhir fase log karena pada saat itu ragi aktif melakukan pembelahan sehingga biomassa yang dihasilkan mencapai jumlah yang optimal dan belum dihasilkan banyak metabolit toksik. Berdasarkan Gambar 3.1 pemanenan ragi dilakukan pada jam ke-18 karena pada jam tersebut ragi mengalami pertumbuhan paling cepat.

3.2 Hasil analisis KLT

Hasil kromatogram KLT menunjukkan perbedaan kepolaran senyawa sebelum (lipid) dan sesudah proses transesterifikasi (metil ester). Hasil analisis KLT pada lipid memberikan noda yang berada di tengah plat KLT. Sedangkan hasil analisis KLT pada metil ester memberikan noda yang berada di batas atas plat KLT. Perbedaan Rf antara kedua hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa metil ester telah terbentuk pada reaksi transesterifikasi. Semakin tinggi nilai Rf menunjukkan bahwa senyawa semakin nonpolar.

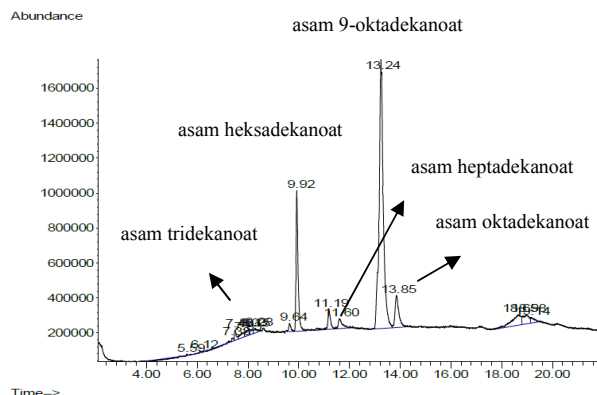
3.3. Hasil Analisis KG-SM

Komposisi asam lemak dalam ragi dapat dianalisis menggunakan KG-SM dengan mengubahnya terlebih dahulu menjadi turunannya yang lebih volatil yaitu dalam bentuk metil ester.

Reagen BF₃ dalam metanol digunakan untuk mengubah asam lemak menjadi metil esternya pada reaksi transesterifikasi. Senyawa tersebut sekaligus berfungsi sebagai katalis asam lewis untuk mempercepat reaksi transesterifikasi^[10]. Penambahan toluena sebagai ko-pelarut bertujuan untuk membentuk sistem monofase.

Lipid yang berwarna kuning kecoklatan berubah membentuk dua lapisan setelah reaksi transesterifikasi. Lapisan atas berwarna kuning bening dan merupakan lapisan metil ester, sedangkan lapisan bawah yang lebih keruh merupakan lapisan gliserol. Kedua lapisan dipisahkan. Lapisan atas dicuci dengan aquades untuk memisahkan gliserol, sisa metanol, dan BF₃ yang terlarut dalam lapisan metil ester.

Metil ester yang diperoleh dari reaksi transesterifikasi selanjutnya dianalisis menggunakan KG-SM untuk mengetahui jenis metil ester yang terkandung dalam sampel uji. Hasil analisis KG-SM dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 2 Hasil kromatogram reaksi transesterifikasi

Dari prediksi senyawa hasil analisis KG-SM, diketahui terdapat lima jenis metil ester yang teridentifikasi seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 1 Metil ester hasil analisis KG-SM

No	Nama Senyawa	Waktu retensi	% Luas area
1	Asam tridekanoat	7,50	0,98
2	Asam heksadekanat	9,92	15,37
3	Asam heptadekanat	11,60	2,09
4	Asam 9-oktadekanat	3,24	58,88
5	Asam oktadekanat	13,85	6,54

3.4. Pendekatan Taksonomi dari *R. gracilis*

Dari hasil analisis KG-SM, diketahui terdapat lima jenis metil ester yang teridentifikasi dari *R. gracilis* yaitu asam tridekanoat, asam heksadekanat (asam palmitat), asam heptadekanat, asam 9-oktadekanat (asam oleat) dan asam oktadekanat (asam stearat) dengan persentase masing-masing 0,98%, 15,37%, 2,09%, 58,88% dan 6,54%. Pada penelitian sebelumnya, diketahui komposisi asam lemak *R. glutinis* terdiri dari asam palmitat 30,06%, asam oleat 28,46%, asam stearat 39,65%, dan asam linoleat 8,01%. Pada penelitian lain diketahui bahwa *R. rubra* mengandung asam palmitat 37%, asam oleat 47%, dan asam linoleat 8%. Komposisi asam lemak *R. minuta* antara lain asam palmitat 15%, asam oleat 30%, asam stearat 5%, dan asam linoleat 13%. *R. mucilaginoso* TJY15a mengandung asam palmitat 22,3%, asam oleat 63,5%, asam stearat 5,2%, dan asam palmitoleat 1,8%^[11]. Hasil penelitian tersebut menunjukkan persamaan komposisi asam lemak diantara kelima ragi yaitu asam palmitat dan asam oleat, sedangkan asam tridekanoat dan asam heptadekanat hanya terdapat

pada *R. gracilis*, asam stearat tidak ditemukan dalam *R. rubra*, asam linoleat tidak ditemukan dalam *R. gracilis* dan *R. mucilaginoso* TJY15a, dan asam palmitoleat hanya terdapat pada *R. mucilaginoso* TJY15a.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa biomassa sel kering yang dihasilkan sebanyak 3,2720 g per 2000 mL media cair (1,6360 g/L). Massa lipid yang diperoleh dari ekstraksi biomassa ragi yaitu 0,2752 g atau sebesar 0,0841 g/g sel kering (8,41%). Total metil ester yang dihasilkan pada reaksi transesterifikasi yaitu 83,86%. Analisis asam lemak menggunakan alat KG-SM menunjukkan beberapa jenis metil ester yaitu asam tridekanoat 0,98%, asam heksadekanoat (asam palmitat) 15,37%, asam heptadekanoat 2,09%, asam 9-oktadekanoat (asam oleat) 58,88% dan asam oktadekanoat (asam stearat) 6,54%.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Wina, E. 1999. "Pemanfaatan Ragi (Ragi) sebagai Pakan Imbuhan untuk Meningkatkan Produktivitas Ternak Ruminansia". *Wartazoa* 9(2): 1-9.
- [2] Amotz, A.B., Fishler, R. dan Schneller, A. 1987. "Chemical Composition of Dietary Species of Marine Unicellular Algae and Rotifers with Emphasize on Fatty Acids". *Marine Biology* 95, 31-36.
- [3] Evans, C.T. dan Ratledge, C. 1984. "Phosphofructokinase and the Regulation of the Flux of Carbon from Glucose to Lipid in the Oleaginous Ragi *Rhodospiridium toruloides*". *Journal of General Microbiology* 130, 3251-3264.
- [4] Niiyama, Y. 1996. "Morphology and Systematics of *Anabaena* Strains in National Science Museum". *Japanese Journal of Phycology* 44, 1-8.
- [5] Castenholz, R.W. dan Waterbury, J.B. 1989. "Cyanobacteria: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol. 3, 1710-1727.
- [6] Welch, D.F. 1991. "Application of Cellular Fatty Acid Analysis". *Clinical Microbiology Reviews* 4, 422-438.
- [7] Viljoen, B.C., Kock, J.L.F., dan Britz, T.J. 1988. "The Significance of Long-chain Fatty Acid Composition and Other Phenotypic Characteristics in Determining Relationships Among Some *Pichia* and *Candida* Species". *Journal of General Microbiology* 134, 1893-1899.
- [8] Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R. dan Licha, M. 2009. "The Effect of Glycerol as A Sole and Secondary Substrate on the Growth and Fatty Acid Composition of *Rhodotorula glutinis*". *Bioresource Technology* 100, 356-361.
- [9] Saxena, V., Sharma, C.D., Bhagat, S.D., Saini, V.S. dan Adhikari, D.K. 1998. "Lipid and Fatty Acid Biosynthesis by *Rhodotorula minuta*". *JAOCS* 75(4): 501-505.
- [10] Klopfenstein, W. E. 1971. "On Methylation of Unsaturated Acids using Boron Trihalide-Methanol Reagents". *Journal of lipid research* 12(6), 773 - 776.
- [11] Li, M., Liu, G.L., Chi, Z., dan Chi, Z.M. 2009. "Single Cell Oil Production from Hydrolysate of Cassava Starch by Marine-Derived Yeast *Rhodotorula mucilaginoso* TJY15a". *Biomass and bioenergy* 34(1): 101-107.