

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mikroalga

Termasuk kedalam kelas alga renik yang hidup berkoloni ataupun tunggal pada perairan tawar maupun laut, berukuran mikroskopik antara 3-30 μm dan berbentuk multiseluler atau uniseluler dengan pembagian fungsi organ yang belum jelas pada sel-sel komponennya dimana hal tersebut yang membedakan mikroalga dari tumbuhan tingkat tinggi lainnya. (Romimohtarto, 2004).

2.1.1. Pengertian

Mikroalga merupakan alga yang berukuran mikro yang dapat dijumpai pada air tawar dan air laut. Mikroalga dapat hidup soliter dan berkoloni. Mikroalga tidak seperti tanaman tingkat tinggi pada umumnya yang memiliki akar, batang, dan daun. Mikroalga mempunyai kemampuan fotosintetik dimana dapat menggunakan sinar matahari dan karbondioksida untuk menghasilkan biomassa serta menghasilkan sekitar 50% oksigen yang ada di atmosfer (Widjaja, 2009).

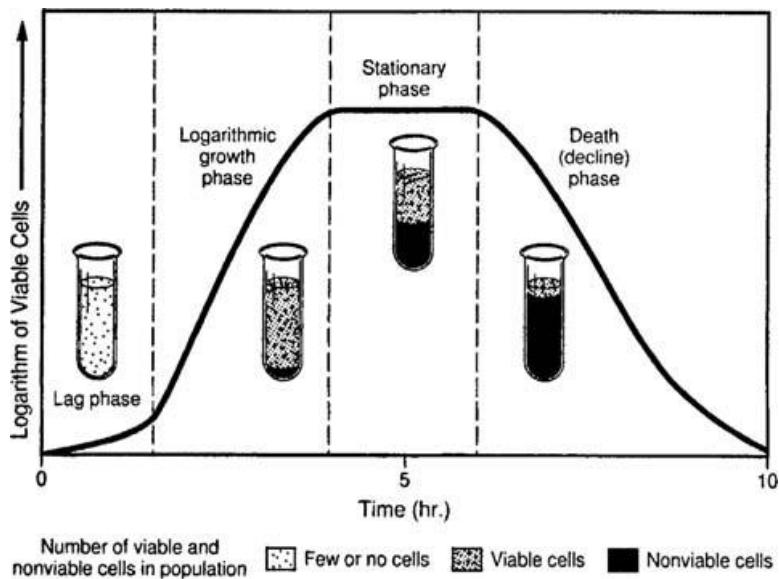
2.1.2. Klasifikasi

Dari sekitar 200.000–800.000 spesies mikroalga yang ada di bumi baru sekitar 35.000 spesies saja yang telah diidentifikasi. Klasifikasi mikroalga dikelompokan menjadi empat yaitu diatom (*Bacillariophyceae*), alga emas (*Chrysophyceae*), alga biru (*Cyanophyceae*), dan alga hijau (*Chlorophyceae*) (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). Mikroalga berdasarkan habitatnya dibagi menjadi dua yaitu air tawar yang disebut limoplankton dan untuk yang hidup di air laut disebut haloplankton. Mikroalga juga dikelompokan berdasarkan distribusi vertikal diperairan seperti yang hidup di zona euphotik disebut epiplankton, hidup di zona disphotik disebut mesoplankton, hidup di zona aphotik disebut bathyplankton, dan terakhir yang hidup di dasar perairan/ bentik disebut hypoplankton (Harsanto, 2009). Contoh spesies mikroalga di antaranya yaitu *Spirulina*, *Nannochloropsis sp.*, *Botryococcus braunii*, *Dunaliella primolecta*, *Nitzschia sp.*, *Tetraselmis suecia*, *Chlorella vulgaris* dan lain-lain (Widjaja, 2009).

2.1.3. Pertumbuhan

Mikroalga tumbuh dalam kurun waktu kultivasi 7-10 hari sudah dapat dipanen, dan bereproduksi secara seksual maupun aseksual, bergantung pada kondisi lingkungannya. Mikroalga tumbuh melalui tiga fase utama, yaitu fase lag, eksponensial, dan stasioner. Pertumbuhan mikroalga pada kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambahnya jumlah sel. Perkembangan sel dalam kultur mikroalga terdiri atas lima fase, yaitu fase lag (adaptasi), fase eksponensial (logaritmik), fase penurunan laju pertumbuhan (deklinasi), fase stasioner dan fase kematian (Fogg 1975).

1. Fase lag merupakan fase pertama dalam pertumbuhan mikroalga.
2. Fase kedua adalah fase eksponensial dimana percepatan pertumbuhan dan perbandingan konsentrasi komponen biokimia menjadi konstan.
3. Fase ketiga merupakan fase penurunan laju pertumbuhan yang disebabkan populasi sel terus bertambah namun tidak ada penambahan nutrien sedangkan pemanfaatan nutrien oleh mikroalga terus berlanjut, sehingga terjadi persaingan antar sel untuk mendapatkan nutrien yang semakin berkurang. Intensitas cahaya yang diterima sel semakin berkurang akibat jumlah sel yang semakin tinggi sehingga terjadi pembentukan bayangan dari sel itu sendiri juga dapat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan.
4. Kurva pertumbuhan mulai berubah karakter dari eksponensial menjadi linier pada saat faktor-faktor pertumbuhan mulai habis. Fase ini disebut fase stasioner. Peningkatan ukuran populasi tidak terjadi, jumlah sel terlihat cenderung konstan, karena laju pertumbuhan seimbang dengan laju kematian pada fase stasioner. Pertumbuhan mikroalga yang dikultur mencapai tingkat maksimal pada fase stasioner.
5. Fase kematian merupakan fase akhir yang ditandai dengan penurunan produksi biomassa karena kematian sel (Fogg 1975).



Gambar 2.1.Tahapan Perkembangbiakan dan Pertumbuhan Mikrolaga. Log Phase, Logarithmic Growth Phase, Stationary Phase, Death (Decline Phase)

Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga

1. Suhu

Suhu optimum untuk budidaya mikroalga berkisar antara 24-30°C, namun suhu ini dapat berubah-ubah sesuai dengan tempat dan medium tumbuh yang digunakan. Suhu dibawah 16°C dapat memperlambat pertumbuhan dan suhu diatas 35°C dapat menimbulkan kematian pada beberapa mikroalga (Kawaroe dkk., 2010).

2. Derajat keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) akan mempengaruhi kinerja kerja suatu enzim pH media berkisar antara 7.0–8.0 cukup baik digunakan dalam kultur alga di laboratorium. *Chlorella vulgaris* sendiri tahan terhadap lingkungan yang asam dengan mencapai pH 2. Pengontrolan pH kultur mikroalga merupakan salah satu faktor penting karena bila pH medium tidak sesuai akan berpengaruh pada kegiatan sel mikroalga dan mengakibatkan kegagalan kultur bahkan kematian. Ketika kepadatan sel meningkat, akan terjadi sedikit penurunan pH kultur akibat sisa metabolisme (Barsanti, 2006).

3. Cahaya

Seperti tumbuhan lainnya, mikroalga membutuhkan cahaya untuk melangsungkan proses fotosintesis. Intensitas cahaya yang dibutuhkan tiap-tiap mikroalga berbeda untuk dapat tumbuh secara optimum. Mikroalga hijau melimpah pada suhu tinggi dan intensitas cahaya tinggi (Kawaroe, 2010).

4. Nutrisi

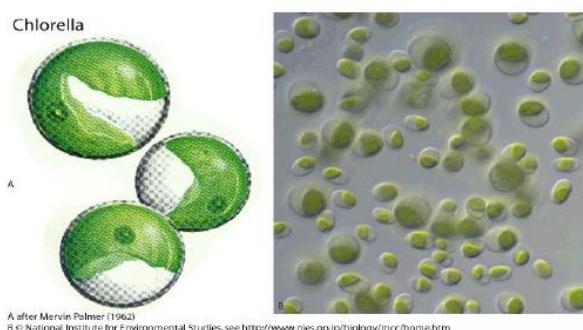
Mikroalga laut dapat tumbuh pada air laut tanpa diberi tambahan nutrisi namun sel yang diperoleh akan sangat sedikit. Oleh karena itu, untuk mendapatkan sel mikroalga dalam jumlah lebih besar dan cepat, maka perlu tambahan nutrisi pada media pertumbuhannya. Nutrisi yang dimaksud adalah makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien terdiri dari unsur C, H, N, P, K, S, Mg dan Ca. Sedangkan mikronutrien yang dibutuhkan antara lain Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mo, B, V dan Si. Di antara nutrien tersebut, unsur N dan P merupakan unsur yang biasa menjadi faktor pembatas untuk pertumbuhan mikroalga. Nitrogen dibutuhkan sebagai unsur pembentuk struktur protein, DNA, RNA, dan ATP. Perkayaan medium terkadang dilakukan untuk pertimbangan kebutuhan biomassa. Nutrien yang diberikan kepada mikroalga bergantung pada jenis mikroalga dan kebutuhannya. Dalam kultivasinya, setiap mikroalga membutuhkan nutrisi untuk dapat berkembang biak. Biasanya, digunakan medium premix (medium utama) dengan komposisi makro dan mikronutrien lengkap, contohnya medium Walne (Abyor, 2012).

2.2. *Chlorella vulgaris*

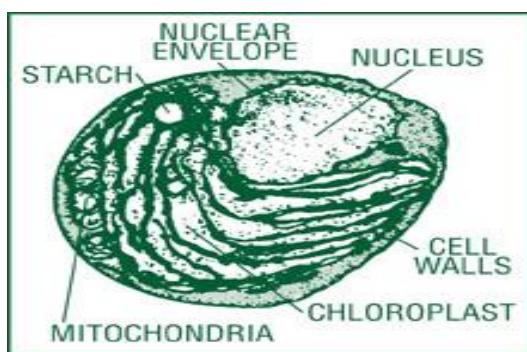
Nama *Chlorella* berasal dari bahasa Yunani yaitu "Chloros" yang berarti hijau dan "L.ella" yang berarti kecil (Brotowidjoyo, 1995). *Chlorella vulgaris* adalah salah satu jenis mikroalga yang dibudidayakan di perairan Indonesia dimana mikroalga tersebut dapat berkembang baik di negara yang beriklim tropis. Dalam hal ini untuk pembudidayaan mikroalga yaitu masih menggunakan media air yang diberi pupuk buatan seperti Walne dan Conwey. *Chlorella vulgaris* adalah alga hijau uniselular yang tidak mempunyai kemampuan bergerak dengan bentuk mikroskopik dan tidak memiliki akar, batang dan daun sejati (*thallus*) (Maharsyah, 2013).

Menurut Bold dan Wyne (1985) klasifikasi *Chlorella vulgaris* adalah:

| | |
|---------|-------------------------------|
| Kingdom | : Plantae |
| Phylum | : Chlorophyta |
| Kelas | : Chlorophyceae |
| Ordo | : Chlorococcales |
| Family | : Chlorellaceae |
| Genus | : Chlorella |
| Spesies | : <i>Chlorella vulgaris</i> . |



Gambar 2.2. *Chlorella vulgaris*. (Vert. 2014)



Gambar 2.3. Struktur Morfologi *Chlorella vulgaris*. (Vashishta, 1978)

2.2.1. Ciri Khas

Chlorella vulgaris merupakan ganggang hijau bersel tunggal dan berukuran mikroskopis. *Chlorella vulgaris* memiliki bentuk tubuh yang berbentuk bulat seperti bola ataupun bulat telur dan diameter selnya berukuran 3-8 mikrometer (Djarijah, 1995). Sel *Chlorella vulgaris* mempunyai protoplasma yang berbentuk cawan dan tidak mempunyai flagella sehingga tidak dapat bergerak aktif, dinding selnya terdiri dari selulosa dan pektin, setiap selnya terdapat sebuah inti sel dan satu kloroplas (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Protoplasma sel *Chlorella vulgaris* diliputi oleh suatu membran yang sangat selektif terhadap apa saja yang memasuki sel (Kumar dan singh, 1976).

Chlorella vulgaris adalah mikroalga yang termasuk ke dalam golongan alga hijau (*chlorophyta*). Sel *Chlorella vulgaris* berbentuk bulat lonjong (ellipsoidal) dengan garis tengah sel antara 2-8 μm . Mikroalga ini berkembangbiak dengan cara membelah diri dan pembentukan spora, dengan waktu generasi yang sangat cepat. *Chlorella vulgaris* hidup secara berkoloni dalam jumlah besar. Dalam memperoleh makanan, *Chlorella vulgaris* menghasilkan makanannya sendiri melalui proses fotosintesis atau biasa disebut autotroph (Pratama, 2011).

2.2.2. Manfaat

Chlorella vulgaris berperan penting dalam pembuatan green water dan sebagai sistem keseimbangan bagi media pemberian ikan maupun udang (Adisukrisno, 1980). *Chlorella vulgaris* berfungsi sebagai organisme yang menyerap kelebihan ammonia, sebab kandungan ammonia lebih dari 0,5 ppm dapat membahayakan tambak udang oleh karena itu *Chlorella vulgaris* juga bisa sebagai starter tambak. *Chlorella vulgaris* juga berguna bagi larva ikan dimana tiap selnya berfungsi sebagai stabilisator, penghasil O² dan juga sebagai pakan zooplankton seperti *Rotifera* sp. (Sianipar dan Sutomo 1987).

2.2.3. Komponen Kimia

Produk khas yang dihasilkan mikroalga kebanyakan seperti karotenoid, antioksidan, asam lemak, enzim, polimer, peptida, toksin, dan sterol. Jenis spesies dan perlakuan pada saat kultivasi akan mempengaruhi komposisi kimia dari sel mikroalga yang mengandung bahan-bahan penting seperti protein, karbohidrat, lemak dan asam nukleat. Mikroalga memiliki kandungan protein yang sangat tinggi, sehingga mikroalga juga dikenal sebagai *single cell protein* (SCP). Sumber SCP yang dikenal masyarakat diantaranya *Spirulina maxima* dan *Chlorella vulgaris*. Karbohidrat dalam mikroalga dapat ditemukan dalam bentuk pati, glukosa, gula dan polisakarida lainnya. Kandungan lemak rata-rata sel alga bervariasi antara 1% dan 70% tetapi bisa mencapai 90% dari berat kering pada kondisi tertentu (Mata, T.M. 2010).

Chlorella vulgaris termasuk cepat dalam berkembang biak, mengandung gizi yang cukup tinggi, yaitu protein 42,2%, lemak kasar 15,3%, nitrogen dalam bentuk ekstrak, kadar air 5,7%, dan serat 0,4%. Untuk setiap berat kering yang sama. *Chlorella vulgaris* mengandung vitamin A, B, D, E dan K, yaitu 30 kali lebih banyak dari pada vitamin yang terdapat dalam hati anak sapi, serta empat kali vitamin yang terkandung dalam sayur bayam, kecuali vitamin C (Rostini, 2007). Mikroalga *Chlorella Vulgaris* memiliki kandungan protein sebesar 51 – 58%, karbohidrat 12 - 17%, lemak 14 – 22% dan asam nukleat 4 – 5% (Becker, 1994).

Tabel 2.1. Jenis mikroalga yang berpotensi untuk pangan (Freire, 2016)

| Mikroalga | Protein | Karbohidrat | Lipid |
|-----------------------------------|---------|-------------|--------|
| <i>Anabaena cylindria</i> | 43-56% | 25-30% | 4-7% |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 62% | 23% | 3% |
| <i>Chlamydomonas rheinhardtii</i> | 48% | 17% | 21% |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 57% | 26% | 2% |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58% | 12-17% | 14-22% |
| <i>Dunaliella salina</i> | 57% | 32% | 6% |
| <i>Euglena gracilis</i> | 39- 61% | 14-18% | 14-20% |
| <i>Spirulina platensis</i> | 46-63% | 8-14% | 4-9% |
| <i>Spirulina maxima</i> | 60-71% | 13-16% | 6-7% |
| <i>Nannochloropsis sp.</i> | 52% | 27% | 31-68% |
| <i>Synechococcus sp.</i> | 63% | 15% | 11% |

Karbohidrat merupakan komponen yang paling banyak ditemukan pada organisme fito seperti tumbuhan dan alga. Karbohidrat memiliki rumus umum $C_n(H_2O)_n$ atau $(CH_2O)_n$ penggolongan karbohidrat terdiri dari empat, yaitu monosakarida, disakarida, oligosakarida dan polisakarida. Monosakarida tidak dapat diuraikan dengan cara hidrolisis menjadi karbohidrat lain dikarenakan molekulnya yang terdiri atas beberapa atom C saja. Monosakarida dibedakan menjadi aldosa dan ketosa. Contoh dari aldosa yaitu glukosa dan galaktosa. Contoh ketosa yaitu fruktosa (Winarno 2008). Sukrosa yang terdiri dari glukosa dan fruktosa bukan termasuk gula reduksi. Jenis karbohidrat lain yaitu oligosakarida dan polisakarida disusun oleh unit-unit monosakarida dan memiliki rumus umum yang berbeda. Amilum adalah polisakarida yang merupakan bentuk simpanan pada sel-sel tumbuhan termasuk buah, sedang selulosa atau serat kasar merupakan komponen struktural yang menyusun dinding sel tumbuhan. Anggota polisakarida lain yaitu pectin (Abidin 1991).

Oligosakarida merupakan jenis karbohidrat yang memiliki 2-10 monomer monosakarida. Oligosakarida yang terdiri dari 2 molekul disebut disakarida, misalnya sukrosa (terdiri dari molekul glukosa dan fruktosa) dan laktosa (terdiri dari molekul glukosa dan galaktosa). Beberapa pemanfaatan oligosakarida yaitu di bidang kimia, kosmetik, farmasi dan pangan, seperti pembuatan sirup (Aiyer 2005).

Oligosakarida yang tidak dicerna dan diserap dalam usus kecil akan difерентasi oleh bakteri-bakteri yang terdapat dalam usus besar, hal ini menyebabkan komposisi bakteri yang menguntungkan yaitu *bifidobacterium* (bakteri bifidus) dan *lactobacillus* akan bertambah jumlahnya, sedangkan untuk bakteri yang merugikan seperti *clostridium*, *coliform*, dan *enterococci* jumlahnya akan menurun. Laktulosa, galaktooligosakarida, fruktooligosakarida, inulin dan hidrolisatnya, maltooligosakarida adalah prebiotik yang umum di gunakan pada nutrisi makanan. Jenis prebiotik lainnya adalah GOS (galaktooligosakarida), inulin dan laktulosa (Collins dan Gibson, 1999).

2.2.4. Media Untuk Pertumbuhan *Chlorella*

Menurut Oh-Hama dan Miyachi (1988) unsur-unsur kimia utama yang menyusun Chlorella dan Scenedesmus adalah C, O, H, N, P, K, Mg, S, dan Fe. Unsur-unsur non logam (C, O, H, N, dan P) menyusun lebih dari 90% total biomassa dalam bentuk berat kering. Sisanya merupakan unsur-unsur logam (K, Mg, S, e). *Chlorella vulgaris* tumbuh pada media yang mengandung cukup unsur hara, seperti nitrogen (N), fosfor, kalium. *Chlorella vulgaris* akan tumbuh baik pada temperatur optimal yaitu 25° C. Nutrisi yang diperlukan mikroalga dalam jumlah besar adalah karbon, nitrogen, fosfor, sulfur, natrium, magnesium, kalsium. Dan membutuhkan besi, tembaga (Cu), mangan (Mn), seng (Zn), silikon (Si), boron (B), molibdenum (Mo), vanadium (V) dan kobalt (Co) dalam jumlah yang relatif sedikit (Chumadi dkk., 1992).

Chlorella vulgaris membutuhkan nutrisi yang terdiri dari unsur-unsur hara makro (makronutrien) dan unsur-unsur mikro (mikronutrien). Contoh unsur makro dalam pertumbuhan Chlorella adalah N, K, Mg, S, P, dan Cl. Unsur hara mikro adalah Cu, Zn, Mn, B, dan Mo (Pilz O, Gross W. 2004). Unsur hara tersebut diperoleh dalam bentuk persenyawaan dengan unsur lain. Tiap unsur hara memiliki fungsi-fungsi khusus yang tercermin pada pertumbuhan kepadatan yang dicapai oleh organisme yang dikultur tanpa mengesampingkan pengaruh dari lingkungan. Kebutuhan nutrien untuk tujuan kultur mikroalga harus tetap terpenuhi melalui penambahan media pemupukan guna menunjang pertumbuhan mikroalga. Dalam sintesa protein unsur N, P, dan S yang berperan, sedangkan yang berperan dalam metabolisme karbohidrat adalah unsur K, untuk unsur Fe dan Na berperan dalam pembentukan klorofil dan untuk unsur Cl akan dimanfaatkan untuk aktivitas kloroplas (Hama, O. h. S. Miyachi. 1998).

2.3. Metode Analisis

Henneberg dan Stohman mengembangkan analisa proksimat untuk pertama kalinya pada tahun 1860 di sebuah laboratorium penelitian di Weende, Jerman (Hartadi 1997). Untuk mengetahui kandungan nutrisi dan kualitas dari suatu bahan pakan atau pangan seperti kadar air, kadar abu, protein serta lemak perlu dilakukan analisis proksimat (Hui, 2006). Salah satu alasan penggunaan analisis proksimat adalah penggerjaannya yang relatif mudah untuk dilakukan dan tidak memerlukan biaya yang besar (Ensminger, 1994). Analisa proksimat dibagi beberapa fraksi nutrien yaitu kadar air, abu, protein kasar, lemak kasar, serat kasar dan bahan ekstrak tanpa nitrogen (BETN) (McDonald *et al.* 1995). Untuk menjadikan *Chlorella vulgaris* sebagai komoditi pangan, perlu dilakukan analisis proksimat untuk menyediakan data komponen utama dari suatu bahan baku yang umumnya terdiri dari kadar air, kadar abu, protein, lemak, dan karbohidrat. Dengan mengetahui kandungan nutrisinya maka penilaian kualitas bahan baku dari mikroalga tersebut dapat diketahui, dimana agar memenuhi syarat mutu mikroalga sebagai bahan baku, *Chlorella vulgaris* harus mengandung protein sebesar 20-50% untuk pangan, lemak sebesar 8-50% untuk Bio-diesel, dan Karbohidrat sebesar 20-50% untuk digunakan sebagai Bio-etanol (Ben-Amotz, 2009).

2.3.1. Kadar Air

Dalam pengolahan dan pengujian pangan kadar air merupakan analisis yang penting dan paling luas untuk dilakukan karena berkaitan dengan kualitas dan stabilitas bahan, serta berkaitan dengan kepentingan ekonomis bahan karena jumlah bahan kering (*dry matter*) sampel bahan kebalikan dengan jumlah air yang dikandungnya. Bahan yang berkadar air tinggi akan mudah rusak oleh jamur, pemanasan, serangga, dan resiko kontaminasi bakteri. Beberapa metode seperti pengeringan (thermogravimetri), metode destilasi (thermovolumetri), metode kimiawi (Fischer method), dan metode fisikawi dapat digunakan untuk mengetahui kadar air agar memenuhi standar komposisi dan peraturan pangan. Biomassa *Chlorella vulgaris* ditempatkan pada cawan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 30° C selama 24 jam sampai diperoleh biomassa *Chlorella vulgaris* kering dengan kadar air kurang dari 10%. Cawan porselin dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105° C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan (Kumalasari, 2014).

2.3.2. Kadar Abu

96% bahan pangan terdiri dari anorganik dan air, sedangkan sisanya merupakan unsur-unsur mineral. Campuran dari komponen anorganik atau mineral inilah yang disebut kadar abu. Abu yang merupakan sisa pembakaran dari sample setelah terbebas dari karbon dan air yang berupa unsur-unsur mineral zat organik. Mineral zat organik ini akan membentuk oksida-oksida atau bergabung dengan radikal-radikal negatif seperti fosfat, sulfat, nitrat, atau klorida selama proses pengabuan berlangsung. Dalam menentukan kadar bahan ekstrak tanpa nitrogen perlu diketahui kadar abu terlebih dahulu (Soejono, 1990). Kandungan abu ditentukan dengan cara mengabukan atau membakar bahan pakan dalam tanur, pada suhu 400-600°C sampai semua karbon hilang dari sampel, dengan suhu tinggi ini bahan organik yang ada dalam bahan pakan akan terbakar dan sisanya merupakan abu yang dianggap mewakili bagian inorganik makanan. Tetapi hasil tersebut tidaklah sepenuhnya mewakili bahan inorganik pada makanan baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif, dikarenakan abu juga mengandung bahan organik seperti sulfur dan fosfor dari protein, dan beberapa bahan yang mudah terbang seperti natrium, klorida, kalium, fosfor dan sulfur yang akan hilang selama pembakaran (Anggorodi, 1995).

2.3.3. Kadar Protein

Pada analisa proksimat bahan pakan, kadar protein mengacu pada istilah protein kasar. Protein kasar adalah jumlah rata-rata kandungan nitrogen (N) yang terdapat dalam bahan pakan sebanyak 16 gram per 100 gram protein atau bisa juga dikatakan banyaknya kandungan nitrogen (N) yang terkandung pada bahan tersebut dikali dengan 6,25 (NRC, 2001). Protein kasar terdiri dari protein dan nitrogen bukan protein (NPN) hal ini menjadikan kekurangan untuk analisis proksimat protein kasar yang menganggap semua nitrogen bahan pakan merupakan nitrogen (Cherney, 2000). Serta kadar nitrogen protein yang tidak selalu 16% (Soejono, 1990). Siregar (1994) menyatakan kandungan protein pakan dapat meningkat dari kadar awalnya ketika mikrobia mengubah senyawa-senyawa non protein nitrogen menjadi protein. Untuk analisis protein secara kualitatif metode yang digunakan terdiri atas reaksi xantoprotein, reaksi Hopkins-cole, reaksi millon nitroprusida, dan reaksi sakaguchi. Sedangkan untuk kuantitatif menggunakan metode Khejedal, metode titrasi formol, metode lowry, metode spekprofotometer visiable (buret), dan metode spektrofotometri.

2.3.4. Kadar Lemak

Lemak atau lipid, adalah suatu zat yang berfungsi sebagai sumber energi utama untuk proses metabolisme tubuh. Sumber lemak yang beredar dalam tubuh diperoleh dari makanan dan hasil produksi organ hati, yang disimpan didalam sel-sel lemak sebagai cadangan energi. Lemak kasar terdiri dari vitamin A, D, E dan K yang merupakan zat-zat nutrien bersifat larut dalam lemak, serta klorofil atau xanthophil yang merupakan pigmen yang sering terekstrak. Yang dimana kedua hal tersebut terhitung sebagai lemak kasar (NRC, 2001). Analisa lemak kasar sering disebut sebagai *ether extract* karena umumnya senyawa eter digunakan sebagai bahan pelarut. Hal ini karena lipid merupakan bahan organik dalam jaringan tanaman dan atau hewan yang bersifat larut dalam solven non-polar. Lipid dapat diextraksi dari jaringan dengan solven tersebut, selanjutnya solven diuapkan dan dilakukan penimbangan bobot untuk mengetahui residu lipid (gravimetri).

2.3.5. Kadar Karbohidrat

Semua monosakarida yang bebas gugus aldehid atau gugus ketonnya (pada struktur piran atau furan, gugus -OH hemiasetal bebas) bersifat mampu mereduksi ion Ferri atau Cupri dalam suasana alkalis. Oligosakarida yang masih memiliki gugus-OH hemiasetal bebas juga bersifat reduktif meskipun daya reduktifnya lebih rendah/lemah dibanding monosakarida. Pengujian gula reduktif secara kualitatif menggunakan larutan garam Cupri-sulfat encer (larutan jernih berwarna biru cerah) dalam kondisi alkalis, yang bila tereduksi akan menghasilkan endapan Cu₂O berwarna merah bata. Perubahan warna ini secara visual mudah diamati; kalaupun daya reduksi gulanya rendah endapan merah belum memisah sempurna namun warna larutan sudah berubah menjadi kuning atau oranye.