



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH NITROGEN TERHADAP KANDUNGAN
ESSENSIAL BIOMASSA *Chlorella vulgaris* Buitenzorg**

SKRIPSI

**FADLI YUSANDI
0606076330**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH NITROGEN TERHADAP KANDUNGAN
ESSENSIAL BIOMASSA *Chlorella vulgaris* Buitenzorg**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

**FADLI YUSANDI
0606076330**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Fadli Yusandi

NPM : 0606076330

Tanda tangan:



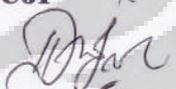
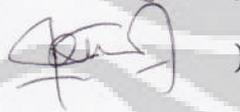
Tanggal : 5 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Fadli Yusandi
NPM : 0606076330
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Essensial
Biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Ir. Dianursanti, M.T ()
Penguji 1 : Ir Tania Surya Utami, M.T ()
Penguji 2 : Ir. Rita Arbianti, M.Si ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 5 Juli 2010

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kepada Allah SWT atas izin-Nya skripsi ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Tugas skripsi dengan judul Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Essensial Biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis dalam meraih gelar Sarjana Teknik di Departemen Teknik Kimia FTUI.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- (1) Bapak Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA, selaku ketua Departemen Teknik Kimia FTUI.
- (2) Ibu Ir. Dianursanti, M.T atas bimbingan yang telah diberikan.
- (3) Semua dosen Teknik Kimia FTUI atas ilmu yang telah diberikan.
- (4) Ibu, ayah, dan adik-adik yang sangat ingin penulis bahagiakan. Terima kasih atas dukungan, kasih sayang, dan doa yang diberikan.
- (5) Teman-teman sepenelitian, Putu, Heru, dan Ponco.
- (6) Teman-teman angkatan 2006 atas kebersamaan dan pertemanannya.
- (7) Tim Riset Mikroalga angkatan 2005 yang telah banyak mengajarkan mengenai penelitian.
- (8) Pihak-pihak lain yang mendukung dan membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu, penulis mengharapkan saran dan kritik untuk memperbaiki penulisan di masa yang akan datang.

Depok, 5 Juli 2010

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang betrandu tangan di bawah ini:

Nama : Fadli Yusandi

NPM : 0606076330

Program Studi : Teknik Kimia

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

PENGARUH NITROGEN TERHADAP KANDUNGAN ESSENSIAL BIOMASSA *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 5 Juli 2010

Yang menyatakan,



(Fadli Yusandi)

ABSTRAK

Nama : Fadli Yusandi
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Essensial Biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan nutrisi nitrogen yang tepat dalam memanfaatkan mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg sebagai bahan baku baik biodiesel maupun suplemen makanan. Nutrisi nitrogen divariasikan menjadi empat yaitu konsentrasi yang ada pada benneck (500 mg NaNO₃/Liter), konsentrasi kekurangan nitrogen (250 mg NaNO₃/Liter), konsentrasi kelebihan nitrogen (750 mg NaNO₃/Liter), dan sumber nitrogen yang berbeda (500 mg CO(NH₂)₂/Liter). Konsentrasi nitrogen yang ada pada medium benneck merupakan nutrisi yang paling optimal untuk menghasilkan lipid hingga mencapai 0.42 g/g biomassa. Sedangkan sumber nitrogen urea merupakan nutrisi yang paling tepat untuk menghasilkan protein hingga mencapai 0.54 g/g biomassa. Untuk menghasilkan klorofil, medium yang kelebihan nitrogen merupakan nutrisi yang paling tepat hingga mencapai 4.9 g/100g biomassa.

Kata kunci : nitrogen, *Chlorella sp.*, lipid, protein, klorofil.

ABSTRACT

Name : Fadli Yusandi
Majors : Chemical Engineering
Title : Influence of Nitrogen to Essential Content of *Chlorella vulgaris* Buitenzorg's Biomass

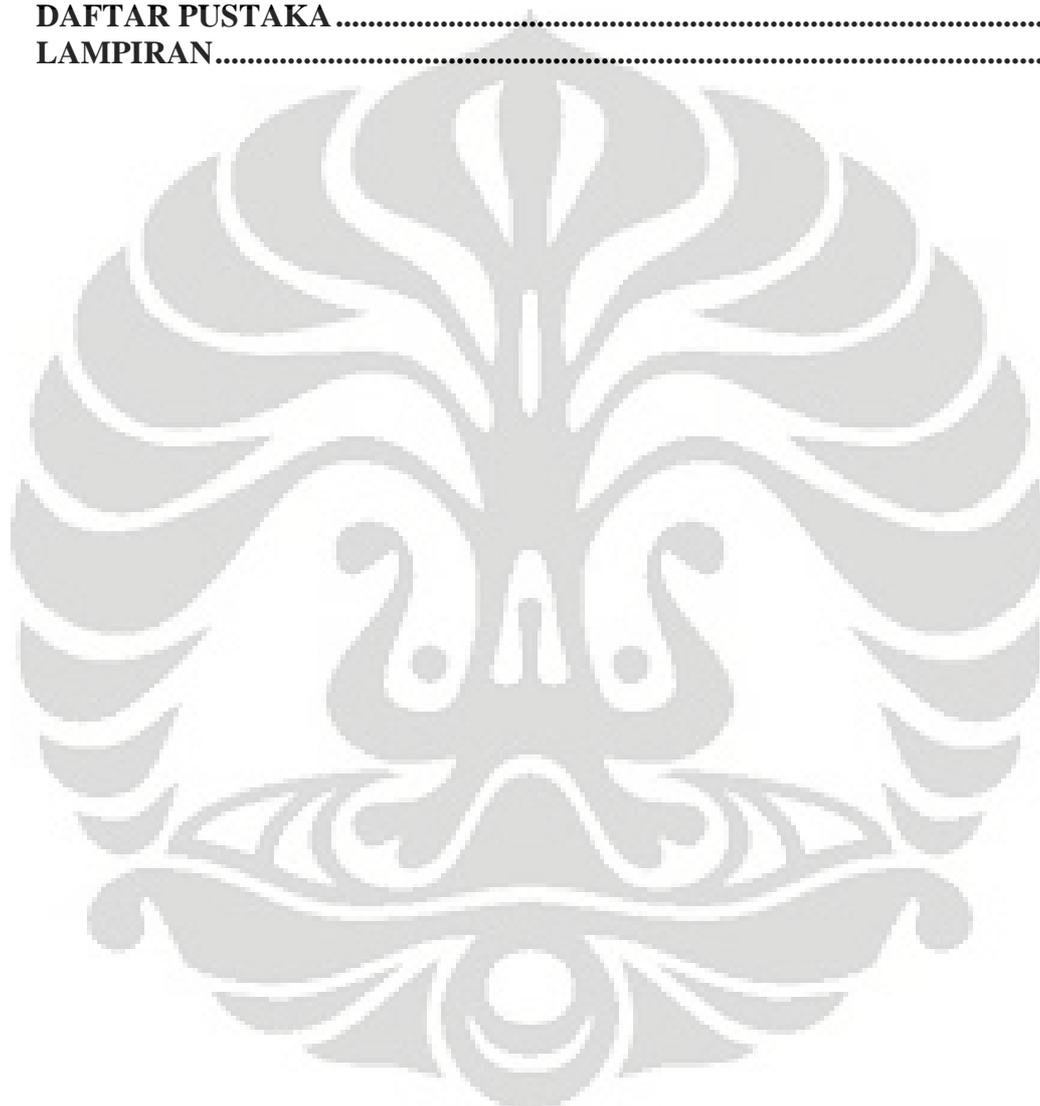
The purpose of this study was to determine the proper nitrogen nutrients in microalgae *Chlorella vulgaris* Buitenzorg use as raw material for both biodiesel and food supplements. Nitrogen nutrients varied into four namely the concentration that existed at the benneck (500 mg NaNO₃/Liter), the concentration of nitrogen deficiency (250 mg NaNO₃/Liter), excess nitrogen concentration (750 mg NaNO₃/Liter), and different nitrogen sources (500 mg CO (NH₂)₂/Liter). Nitrogen concentration in the medium benneck there is the most optimal nutrition to produce lipids up to 0:42 g / g biomass. While the source of urea nitrogen is the most appropriate nutrients to produce the protein until it reaches 0:54 g / g biomass. To produce chlorophyll, medium that excess nitrogen is the most appropriate nutrients to reach 4.9 g/100g biomass.

Keywords: nitrogen, *Chlorella sp.*, lipid, protein, chlorophyll.

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Sistematika Penulisan	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Alga Hijau <i>Chlorella vulgaris</i>	7
2.1.1 Struktur Sel Alga Hijau	7
2.1.2 Fotosintesis Alga Hijau	9
2.1.3 Aplikasi Alga Hijau	11
2.2 Kebutuhan Sumber Nutrisi Mineral	11
2.2.1 Peran Nutrisi Nitrogen.....	12
2.2.2 Siklus Nitrogen	13
2.3 Kandungan Essensial <i>Chlorella</i> sp.	17
2.3.1 Protein.....	17
2.3.2 Klorofil	18
2.3.3 Lipid.....	19
2.4 State of The Art	20
3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Diagram Alir Penelitian.....	22
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	23
3.3 Variabel Penelitian	25
3.4 Prosedur Penelitian	25
3.4.1 Tahap Persiapan.....	25
3.4.2 Pelaksanaan Kegiatan Penelitian	30
3.4.3 Pengambilan Data.....	30
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Pembahasan Umum	34
4.2 Pengaruh Nitrogen terhadap <i>Chlorella vulgaris</i> Buitenzorg.....	41

4.2.1 Pengaruh Nitrogen terhadap Pertumbuhan.....	45
4.2.2 Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Lipid.....	47
4.2.3 Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Protein.....	49
4.2.4 Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Klorofil.....	51
5. KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	58

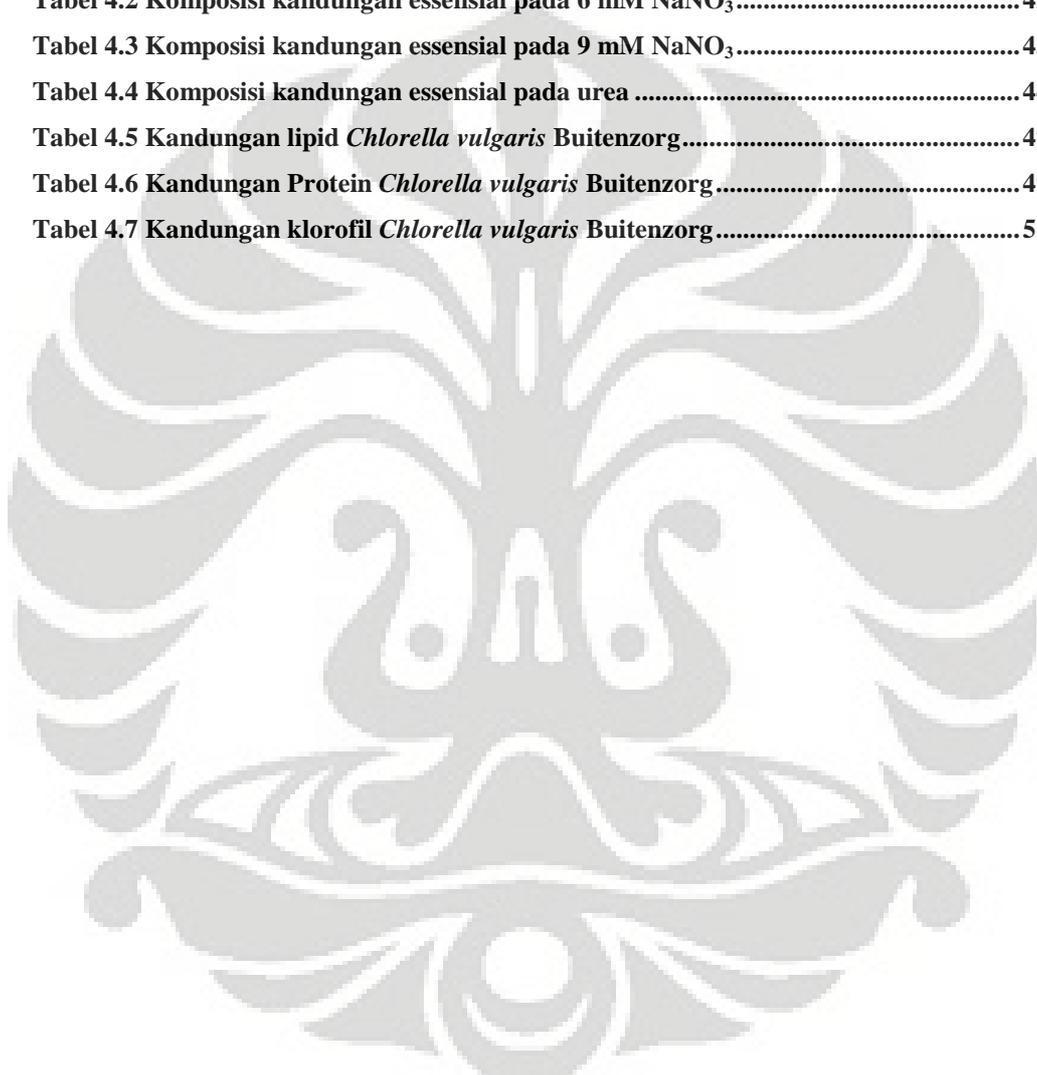


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Produk utama dari fotosintesis reaksi gelap dan terang	10
Gambar 2.2 Perbandingan utilitas sel alga antara ammonium dan nitrat	14
Gambar 2.3 Pengubahan ammonium menjadi senyawa organik utama.....	16
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian.....	22
Gambar 3.2 Skema proses pengambilan data kandungan	23
Gambar 3.3 Rangkaian Peralatan Fotobioreaktor Tunggal	28
Gambar 4.1 Rangkaian peralatan fotobioreaktor.....	36
Gambar 4.2 Pre-culture mikroalga.....	37
Gambar 4.3 Kultivasi mikroalga.....	38
Gambar 4.4 Hasil pengujian lipid awal.....	39
Gambar 4.5 Hasil akhir pengujian lipid.....	40
Gambar 4.6 Komposisi kandungan essensial biomassa pada 3 mM NaNO ₃	42
Gambar 4.7 Komposisi kandungan essensial biomassa pada 6 mM NaNO ₃	43
Gambar 4.8 Komposisi kandungan essensial biomassa pada 9 mM NaNO ₃	44
Gambar 4.9 Komposisi kandungan essensial biomassa pada urea	45
Gambar 4.10 Pengaruh nitrogen terhadap profil pertumbuhan mikroalga.....	46
Gambar 4.11 Pengaruh nitrogen terhadap kandungan lipid mikroalga	48
Gambar 4.12 Pengaruh nitrogen terhadap kandungan protein mikroalga	49
Gambar 4.13 Pengaruh nitrogen terhadap kandungan klorofil mikroalga	52

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Road map penelitian.....	20
Tabel 3.1 Bahan Medium Benneck	26
Tabel 4.1 Komposisi kandungan essensial pada 3 mM NaNO ₃	41
Tabel 4.2 Komposisi kandungan essensial pada 6 mM NaNO ₃	42
Tabel 4.3 Komposisi kandungan essensial pada 9 mM NaNO ₃	43
Tabel 4.4 Komposisi kandungan essensial pada urea	44
Tabel 4.5 Kandungan lipid <i>Chlorella vulgaris</i> Buitenzorg.....	47
Tabel 4.6 Kandungan Protein <i>Chlorella vulgaris</i> Buitenzorg	49
Tabel 4.7 Kandungan klorofil <i>Chlorella vulgaris</i> Buitenzorg	51



BAB I PENDAHULUAN

Bab ini akan membahas mengenai latar belakang masalah dilakukannya penelitian, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan makalah.

1.1 Latar Belakang Masalah

Alga atau ganggang merupakan sekelompok organisme autotrof yang tidak memiliki organ dengan perbedaan fungsi yang nyata, bahkan dapat dianggap tidak memiliki organ seperti yang dimiliki tumbuhan seperti akar, batang, daun, dll. Meskipun demikian, pemanfaatan alga ternyata sangatlah luas. Alga dapat digunakan sebagai pakan ternak dan kerang laut, pupuk dan penyubur tanah, pewarna kimia, zat stabilisator pada susu, dan pengendali polutan, kemampuan dalam mengubah gas karbon dioksida menjadi oksigen. Namun, pemanfaatan alga yang paling dikembangkan saat ini adalah kemampuannya sebagai sumber makanan tambahan dan sumber energi alternatif pengganti bahan bakar fosil seperti biodiesel.

Pemanfaatan alga sebagai sumber nutrisi manusia dikarenakan oleh kandungan protein dan klorofil yang dimilikinya. Kandungan klorofil yang dimiliki *Chlorella vulgaris* bisa dikatakan paling tinggi di antara seluruh alga hijau bahkan tumbuhan tingkat tinggi di dunia yaitu sekitar 28,9 g/kg berat biomassa. Selain sebagai sumber nutrisi, klorofil mempunyai fungsi yang lain seperti antioksidan, aflatoksin, anti proteolitik, dll (“Beberapa Manfaat Klorofil”). Sedangkan, kandungan protein yang dimiliki oleh *Chlorella vulgaris* dapat dikatakan tinggi dengan kandungan sekitar 59.8 % dari berat kering biomassa (Wijanarko & Ohtaguchi, 2004).

Pemanfaatan alga sebagai bahan bakar alternatif khususnya biodiesel sudah banyak dilakukan mulai dari tahun 1978 dimana diluncurkannya sebuah program riset di Amerika bernama *Aquatic Species Program* yang dibiayai oleh *U.S Department of Energy*. Awalnya, program tersebut difokuskan pada

produksi hidrogen dari alga. Namun, fokus tersebut berubah ke produksi biodiesel karena kandungan minyak yang dimiliki oleh alga pada tahun 1982 dan berakhir pada 1998 (Sheehan et al., 1998). Menurut Victor Garlington (2009), terdapat tiga alasan utama kenapa alga menjadi *biofuel* baru. Pertama karena alga bukanlah sumber makanan utama manusia sehingga konversi dari sumber makanan ke sumber energi tidak berpengaruh. Kedua karena alga tumbuh dengan cepat sehingga tidak perlu waktu lama untuk memanen. Ketiga karena alga mampu memfiksasi CO₂ yang ada di udara sehingga membantu menanggulangi permasalahan pemanasan global.

Diantara sekian banyak jenis mikroalga, salah satu yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan baku biodiesel adalah *Chlorella sp.* *Chlorella sp.* merupakan salah satu golongan alga hijau (*Chlorophyta*) yang unik karena memiliki komponen biomassa penyerap cahaya dengan konsentrasi tinggi melebihi seluruh organisme fotoautotrof yang lain, termasuk tanaman tingkat tinggi. Selain itu, kandungan lipid *Chlorella sp.* juga lumayan besar dibandingkan beberapa mikroalga lainnya yaitu sekitar 11,6% berat kering (Wijanarko & Ohtaguchi, 2004). Bahkan, menurut Gouveia dan Oliveira (2009), *Chlorella vulgaris* merupakan salah satu jenis mikroalga yang potensial dijadikan bahan baku biodiesel dengan produktivitas biomassa sekitar 0.18 g / L hari.

Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan kultur seperti unsur hara dalam media kultur dan kualitas air. Menurut Wahyudin (2008), untuk mendapatkan *Chlorella sp.* yang memiliki tingkat pertumbuhan yang baik dalam hal jumlah dan kadar protein yang tinggi dalam proses pengkulturan, maka harus diperhatikan penggunaan media kultur yang memberikan hasil terbaik. Karena setiap media mempunyai komposisi unsur hara yang berbeda-beda dan masing-masing mempunyai fungsi yang berbeda pula. Diantara sekian banyak unsur hara yang diserap oleh mikroalga, terdapat tiga nutrisi yang paling dibutuhkan oleh mikroalga autotrof. Ketiga nutrisi tersebut adalah karbon, nitrogen, dan fosfor. Diantara ketiga nutrisi tersebut, nitrogen merupakan nutrisi yang paling berperan dalam pembentukan kandungan esensial mikroalga. Nitrogen merupakan komponen utama pembentuk asam amino, nuklotida, klorofil, dan *phycobillin* (Graham & Wilcox, 2000). Nutrisi

nitrogen yang diberikan untuk alga memiliki faktor pembatas. Jika berlebihan, maka hanya produk tertentu yang terbentuk, sebaliknya akan menghasilkan produk yang berlainan. Hal tersebut juga tergantung pada proses asimilasi nitrogen ke dalam mikroalga tersebut karena tidak semua bentuk nitrogen dapat diserap langsung oleh mikroalga.

Berbagai macam penelitian telah dilakukan untuk melihat pengaruh nitrogen tersebut. Bahkan, penelitian yang telah dilakukan tidak hanya berkisar tentang mikroalga tetapi juga berbagai macam ragi. Pengaruh nitrogen terhadap ragi yang dilakukan oleh Evans dan Ratledge (1983) menunjukkan bahwa sumber nitrogen asam amino dan urea dapat meningkatkan kandungan lipid *Rhodospiridium toruloides* CBS 14 hingga mencapai 52 % berat biomassa dibandingkan nitrat. Sebaliknya, penelitian yang dilakukan oleh Yanqun Li (2008) menunjukkan bahwa sumber nutrisi nitrat justru memberikan peningkatan kandungan lipid hingga mencapai 35 % berat biomassa *Neochloris oleoabundans* dibandingkan sumber nutrisi urea.

Selain itu, konsentrasi nutrisi nitrogen juga memberikan pengaruh bagi kandungan esensial biomassa. Menurut Arief Widjaya (2007), jika konsentrasi nitrat yang diberikan dikurangi akan meningkatkan kandungan lipid *Chlorella vulgaris* hingga mencapai 40 % berat kering. Tidak hanya Arif dkk, penelitian yang dilakukan oleh Weldy dan Huesemann (2007) juga menunjukkan hasil peningkatan kandungan lipid *Dunaliella salina* yang mencapai 44 % berat kering dengan penurunan konsentrasi nitrat. Begitu pula dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Converti (2009) dimana saat konsentrasi nitrat diturunkan akan meningkatkan kandungan lipidnya *Chlorella vulgaris* mencapai 15 gram lipid per 100 gram biomassa kering. Namun, penelitian yang dilakukan oleh Yanqun Li (2008) menunjukkan hasil yang sedikit berbeda. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh mereka, terdapat kondisi optimal dengan konsentrasi nitrat yang diberikan untuk hasil lipid *Neochloris oleoabundans* yang maksimal. Jika kurang atau lebih dari konsentrasi tersebut, kandungan lipid yang dihasilkan akan menurun.

Peningkatan lipid yang terjadi pada alga dengan menggunakan nutrisi nitrogen sangat dibutuhkan jika alga dimanfaatkan sebagai bahan baku biodiesel.

Akan tetapi, pemanfaatan alga sebagai sumber nutrisi manusia terutama protein dan klorofil pastinya akan terpengaruh juga. Karena ternyata nutrisi nitrogen juga dapat mempengaruhi kandungan yang lain. Hal itu ditunjukkan oleh Yanqun Li (2008) dalam penelitiannya terhadap *Neochloris Oleoabundans*. Kandungan klorofil yang dimilikinya akan terus meningkat seiring penambahan konsentrasi nitrogen hingga mencapai kondisi maksimumnya.

Oleh karena itu, penelitian ini tidak hanya melihat pengaruh nitrogen terhadap lipid tetapi juga protein dan klorofil yang dimiliki oleh mikroalga hijau *Chlorella vulgaris* Buitenzorg. Selain itu, variasi nutrisi nitrogen yang digunakan tidak hanya perubahan konsentrasinya saja tetapi juga sumber nutrisi nitrogen yang diberikan. Dengan adanya penelitian ini diharapkan kandungan nutrisi *Chlorella vulgaris* Buitenzorg pada nutrisi nitrogen yang berbeda dapat ditentukan sehingga pemanfaatannya baik sebagai sumber nutrisi manusia maupun bahan baku biodiesel dapat dioptimalkan.

1.2. Rumusan masalah

Dalam penelitian ini, rumusan masalahnya adalah:

Bagaimana pengaruh nitrogen terhadap kandungan esensial terutama lipid, klorofil, dan protein pada biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg?

1.3. Tujuan penelitian

Dalam penelitian ini, tujuan yang diharapkan adalah:

- Menentukan kandungan lipid, klorofil, dan protein biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg yang dikultur pada nutrisi nitrogen yang berbeda.
- Menentukan nutrisi nitrogen yang baik digunakan untuk hasil lipid, protein, dan klorofil biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg yang maksimal.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses, Departemen Teknik Kimia, FT-UI.
- Mikroalga yang digunakan adalah *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

- Sistem reaktor yang digunakan adalah fotobioreaktor berbentuk *flat* dengan volume 6 dm³.
- Metode pencahayaan dilakukan dengan kontinyu (4000 lux).
- Medium yang digunakan adalah medium Benneck dengan nutrisi nitrogen yang divariasikan menjadi 4 yaitu konsentrasi nitrogen pada medium benneck yang normal (500 mg NaNO₃/Liter atau 6 mM NaNO₃), konsentrasi kekurangan nitrogen (250 mg NaNO₃/Liter atau 3 mM NaNO₃), konsentrasi kelebihan nitrogen (750 mg NaNO₃/Liter atau 9 mM NaNO₃), dan sumber nitrogen yang diubah (500 mg CO(NH₂)₂/Liter atau 8 mM urea).
- Kandungan essensial biomassa *Chlorella vulgaris* yang akan diuji hanya tiga yaitu lipid, protein dan klorofil.

1.5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan dalam penulisan skripsi ini adalah:

BAB I PENDAHULUAN

Bab ini berisi penjelasan mengenai latar belakang masalah, perumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan makalah

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menjelaskan teori umum tentang mikroalga hijau *Chlorella sp.*, proses fotosintesis, manfaat mikroalga hijau *Chlorella sp.*, nutrisi mineral yang dibutuhkan mikroalga hijau *Chlorella sp.*, peran nutrisi dan siklus nitrogen, kandungan essensial mikroalga hijau *Chlorella sp.*.

BAB III METODE PENELITIAN

Bab ini berisi penjelasan tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan penelitian, variabel penelitian, dan prosedur penelitian.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini berisi hasil pengamatan penelitian yaitu pengaruh nitrogen terhadap mikroalga hijau *Chlorella sp.* baik dari segi pertumbuhan, kandungan lipid, kandungan protein, maupun kandungan klorofil.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

Berisi kesimpulan dari hasil penelitian serta saran untuk penelitian selanjutnya.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Pada tinjauan pustaka, akan dibahas mengenai alga hijau, khususnya *Chlorella sp.*, mulai dari struktur sel, proses fotosintesis, hingga aplikasinya. Selain itu, akan dijelaskan pula mengenai sumber nutrisi mineral bagi alga, terutama nitrogen, serta kandungan esensial yang dimiliki oleh alga baik lipid, protein, maupun klorofil.

2.1. Alga Hijau *Chlorella vulgaris*

Chlorophyta atau alga hijau merangkul kelompok besar organisme dengan variabilitas morfologis yang besar mulai dari bentuk makroskopik hingga mikroskopik. Alga hijau mempunyai klorofil a, klorofil b, dan beberapa karotenoid yang dapat disintesis dan diakumulasi di luar kloroplas baik dalam kondisi defisiensi nitrogen maupun kondisi stres lainnya. Sedangkan dinding sel umumnya mengandung selulosa. Alga hijau juga dikelompokkan menjadi *cocoid*, flagelata uniseluler atau kolonial, filamen multiseluler atau multinukleat. Alga hijau sebagian besar hidup di air tawar, namun tidak sedikit pula hidup di laut.

Chlorella merupakan salah satu genus berukuran kecil, uniseluler, sel *nonmotile*; tidak memproduksi zoospora. Sel memiliki dinding sel tipis, dan kloroplas berbentuk cangkir. Akumulasi pati terjadi di dalam kloroplas. *Chlorella* mereproduksi dengan membentuk sel anak atau *autospores* dari bentuk yang sama dengan sel induk. Tumbuh di kondisi autotrof, kondisi heterotrof dan mixotrof. *Chlorella* adalah spesies yang paling penting dalam industri mikroalga; untuk dibudidayakan dan dijual sebagai makanan kesehatan (Richmond, 2004).

2.1.1. Struktur Sel Alga Hijau

Beberapa ahli mikroalga menganggap bahwa setiap organisme yang memiliki klorofil a dan talus yang tidak dapat dibedakan akar, batang, dan daun disebut alga. Secara mikroskopis, struktur sel antara alga dengan tumbuhan darat hampir sama seperti struktur dinding selnya. Layaknya organisme eukariotik,

struktur sel alga hijau, khususnya *Chlorella vulgaris*, terdiri atas dinding sel, membran plasma, sitoplasma dan kloroplas dengan ukuran sel *Chlorella* berkisar antara 2-12 μm berbentuk unisel yang *spherical* atau *ellipsoidal* (Graham & Wilcox, 2000).

- Dinding sel

Dinding sel mikroalga disusun oleh lapisan *microfibrillar* selulosa, yang dikelilingi oleh lapisan *amorf*. Dinding sel disekresi oleh aparat Golgi. Beberapa spesies tidak memiliki dinding sel. Dinding sel biasanya tersusun dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Dinding sel ini berfungsi untuk melindungi bagian dalam sel dari pengaruh luar. Bagian ini mengandung serat yang dapat dikonsumsi oleh manusia sebagai makanan sehat.

- Inti sel

Inti sel, nukleus, merupakan struktur dengan ukuran yang relatif besar berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sitoplasma. Sedangkan sitoplasma dikelilingi oleh membran sel. Pada umumnya di dalam sebuah sel hanya ada satu nukleus. Namun, ada beberapa jenis sel yang memiliki dua atau lebih nukleus. Bagian ini memiliki peran yang sangat penting karena bertugas mengatur seluruh aktivitas sel seperti berfotosintesis dan berkembang biak.

Nukleus terdiri dari nukleoprotein yaitu kombinasi protein dan asam nukleat. Zat ini banyak mengandung enzim. Di dalam inti sel terdapat sebuah inti lagi yang berukuran lebih kecil yang disebut dengan nukleolus. Nukleolus merupakan anak inti sel yang sangat kecil dan terbentuk dari kumpulan RNA (*Ribo Nucleic Acid*) sehingga nukleolus berperan dalam sintesis protein di dalam sel.

Selain itu, inti sel juga memiliki jaringan-jaringan halus yang berada di dalam cairan inti yang mengandung gen. Jaringan ini disebut dengan benang kromatin dan berfungsi sebagai pembawa informasi genetik dari sel induk kepada sel anak pada saat berkembang biak.

- Mitokondria

Mitokondria terdiri atas struktur-struktur berbentuk seperti cerutu. Struktur-struktur kecil tersebut tersusun dari protein dan lipid yang membentuk suatu sel yang stabil dan keras. Dinding mitokondria berlapis dua dan lapisan dalamnya memiliki banyak lekukan. Struktur ini berguna untuk memperluas bidang permukaan penyerapan oksigen dalam proses respirasi sel.

Mitokondria berfungsi sebagai pusat pembangkit tenaga sel dengan menghasilkan ATP sebagai sumber energi. Selain itu, mitokondria berperan penting dalam proses respirasi sel dan tempat pemecahan molekul protein dan lemak kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana yang selanjutnya digunakan sebagai sumber energi.

- Kloroplas

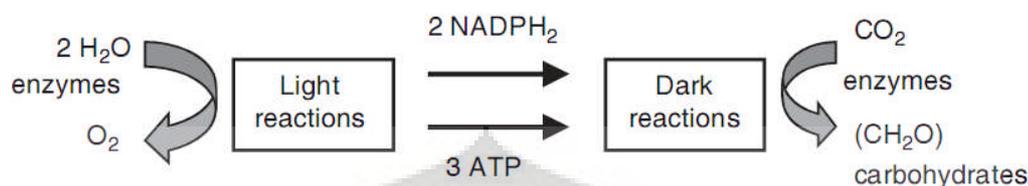
Kloroplas umumnya berbentuk seperti cangkir atau lonceng yang letaknya di tepi sel. Kloroplas terdiri atas lamela fotosintetik dan diselubungi oleh suatu membran ganda berisi *thylakoids*, klorofil, dan stroma. Dalam proses fiksasi CO₂, kloroplas dapat menyerap energi cahaya yang digunakan untuk melakukan proses fotosintesis.

2.1.2. Fotosintesis Alga Hijau

Fotosintesis merupakan proses perubahan senyawa anorganik dan energi cahaya menjadi bahan organik yang dilakukan oleh tumbuhan dan mikroorganisme eukariotik. Mikroorganisme eukariotik biasanya dibagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan pigmen fotosintesisnya: *Rhodophyta* (ganggang merah), *Chrysophyta* (ganggang keemasan), *Phaeophyceae* (ganggang coklat) dan *Chlorophyta* (ganggang hijau). Organ fotosintesis tersebut terletak di kloroplas yang mengandung lapisan membran lipoprotein (*thylakoids*) dan stroma.

Fotosintesis dapat dinyatakan sebagai reaksi redoks yang digerakkan oleh energi cahaya, di mana karbon dioksida dan air diubah menjadi karbohidrat dan oksigen. Konversi yang terjadi dibagi menjadi dua tahap, reaksi terang dan gelap. Dalam reaksi terang, energi cahaya yang terikat pada membran fotosintesis diubah menjadi energi kimia memberikan reduktor biokimia NADPH₂ dan senyawa

berenergi tinggi ATP. Dalam reaksi gelap yang berlangsung di stroma, NADPH₂ dan ATP digunakan dalam konversi karbon dioksida menjadi karbohidrat.



Gambar 2.1 Produk utama dari fotosintesis reaksi gelap dan terang (Richmond, 2004).

Dalam reaksi gelap terdapat konsumsi oksigen sebagai masukan proses respirasi. Dengan perkataan lain, oksigen yang dihasilkan pada reaksi terang digunakan kembali untuk proses respirasi pada reaksi gelap. Pada kondisi beradiasi rendah (cahaya yang terbatas), laju fotosintesis secara linear tergantung pada intensitas cahaya. Namun, laju fotosintesis akan menurun dan menjadi tidak efisien saat kondisi cahaya optimumnya terlewati.

Semua organisme yang melakukan fotosintesis mengandung pigmen organik untuk menangkap energi cahaya. Ada tiga kelompok utama pigmen yaitu klorofil, karotenoid dan *phycobilins*. Klorofil (pigmen hijau) dan karotenoid (pigmen kuning atau oranye) bersifat lipofilik dan terhubung dengan protein kompleks, sedangkan *phycobilins* bersifat hidrofilik.

Molekul klorofil terdiri dari cincin *tetrapyrrole* yang mengandung atom magnesium dan alkohol rantai-panjang *terpenoid*, kecuali untuk klorofil c. Molekul-molekul ini terikat dengan apoprotein secara tidak kovalen. Secara struktural, berbagai jenis molekul klorofil baik a, b, c, maupun d berbeda. Semua klorofil memiliki dua gelombang penyerapan utama: biru atau biru-hijau (450-475 nm) dan merah (630-675 nm). Klorofil a merupakan bagian dari inti dan pusat reaksi pigmen-protein kompleks. Sedangkan klorofil b, c, dan d merupakan perpanjangan rentang penyerapan cahaya dari klorofil a.

Untuk kuantifikasi, pigmen klorofil diambil dalam pelarut organik (metanol, etanol, aseton, dll). Absorbansi ekstrak ditentukan secara spektrofotometri dan konten pigmen dihitung dengan menggunakan rumus matematika (Graham & Wilcox, 2000).

2.1.3. Aplikasi Alga Hijau

Tahun 1960, ilmuwan Jepang menemukan bahwa *Chlorella sp.* mengandung banyak vitamin, mineral, dan nutrien yang penting bagi tubuh. Sejak saat itu pengembangan *Chlorella sp.* berpindah haluan kearah suplemen kesehatan. Apalagi ketika Dr. Fujimake dari *People's Scientific Research* di Tokyo berhasil melakukan pemisahan suatu substansi yang larut dalam air melalui *Chlorella sp.* secara elektroforesis yang selanjutnya dikenal dengan nama CGF (*Chlorella Growth Factor*). CGF dapat menunjang pertumbuhan dan meningkatkan kekebalan tubuh alami.

Selain itu, *Chlorella sp.* juga merupakan mikroalga hijau yang sangat spesial karena kandungan klorofilnya yang paling tinggi dibandingkan seluruh mikroalga hijau bahkan seluruh tanaman tingkat tinggi. Sel *Chlorella* mempunyai dinding sel kuat dan getah usus manusia tidak mampu mencernakannya. Dinding *Chlorella* yang sangat tebal (14 mm) terdiri dari 27% protein; 9,2% lemak; 15,4% selulosa; 31% hemiselulosa; 3,3% glukosamin; dan 5,2% abu yang banyak mengandung zat besi serta kapur. Struktur dinding sel *Chlorella* mirip dengan dinding sel bakteri dan jamur. Dari berbagai penelitian tentang dinding sel, dinding sel yang utuh juga diperlukan sebagai salah satu perangsang sistem kekebalan tubuh, menyerap kolesterol, menyerap racun, dan merangsang limfosit dinding usus. Namun, pemanfaatan *Chlorella* sebagai bahan pangan alternatif mengharuskan seluruh dinding sel dipecahkan dan dipisahkan. Sedangkan pemanfaatan *Chlorella* dalam bidang kesehatan memerlukan sebagian dinding sel dalam keadaan utuh.

2.2. Kebutuhan Sumber Nutrisi Mineral

Dalam proses pertumbuhan, Mineral yang diperlukan untuk pertumbuhan alga serupa dengan tanaman tingkat tinggi. Nutrisi mineral yang dibutuhkan alga adalah karbon dioksida, nitrogen, fosfat, dan zat besi. Nutrisi mineral yang diberikan untuk proses pertumbuhan alga ada faktor pembatasnya. Jika tidak tersedia dalam jumlah yang cukup, nutrisi mineral tersebut akan membatasi pertumbuhan alga. Bila kandungan mineral ini lebih dari faktor pembatasnya, pertumbuhannya akan meningkat sampai mineral lain menjadi terbatas jumlahnya.

Berikut ini adalah nutrisi-nutrisi mineral yang dibutuhkan untuk pertumbuhan alga (Richmond, 2004):

- Kandungan garam total yang ditentukan dari lokasi habitat alga tersebut.
- Komponen ion utama seperti K, Mg, Na, Ca, SO dan Cl.
- Sumber nitrogen, terutama nitrat, amonia dan urea.
- Sumber karbon baik CO₂ atau HCO₃⁻.
- pH.
- Sedikit elemen dari beberapa agen *chelating* seperti *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA).
- Vitamin

Selain itu, perlu dipertimbangkan pula rute karbon yang dipilih baik itu organik maupun anorganik untuk membentuk kerangka karbon pada sintesis yang lebih lanjut. Sumber organik yang biasa digunakan adalah glukosa, fruktosa, dan asam asetat. Keuntungan dari asam asetat sebagai sumber CO₂ yaitu pH yang dihasilkannya. Pertimbangan lainnya adalah tujuan budidaya alga baik dilihat dari pemeliharaan kultur terhadap pertumbuhannya untuk *yield* biomassa optimal maupun terhadap *stress* untuk biosintesis komponen organik berharga yang optimal yang dapat ditentukan dari berbagai nutrisi yang berbeda. Biasanya, nutrisi dengan nitrogen berlebih dan salinitas rendah digunakan untuk menghasilkan biomassa yang tinggi.

Diantara seluruh nutrisi yang ada, terdapat tiga nutrisi yang paling penting bagi pertumbuhan yaitu C, N dan P dan kehadiran tiga nutrisi tersebut menjadi sangat pokok dalam pengembangan bioteknologi alga.

2.2.1. Peran Nutrisi Nitrogen

Setelah karbon, nitrogen merupakan nutrisi paling penting bagi biomassa yang dihasilkan karena nitrogen merupakan salah satu unsur kimia penting, baik untuk protein maupun DNA. Dengan demikian, setiap organisme hidup harus dapat mengasimilasi nitrogen untuk bertahan hidup. Dalam kondisi nitrogen yang terbatas, sel-sel akan mengalami perubahan warna (penurunan klorofil dan peningkatan karotenoid) dan terjadi akumulasi senyawa karbon organik seperti polisakarida dan minyak tertentu.

Umumnya, nitrogen diserap dalam bentuk nitrat (NO_3), urea, dan ammonium. Namun, sumber nitrogen biasanya lebih mudah berasimilasi dalam bentuk ammonium dibandingkan nitrat. Ketika ammonium digunakan sebagai sumber nitrogen utama, pH kultur dapat turun secara signifikan selama sel aktif bekerja karena melepaskan ion H^+ . Hal tersebut dilakukan untuk mengendalikan pH kultur saat sel-sel alga sedang bekerja. Jika menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen utama, pH kultur akan meningkat.

Nitrogen, yang biasanya menyumbang sekitar 7-10% dari berat kering sel, merupakan konstituen penting bagi protein baik struktural maupun fungsional dalam sel alga. Secara umum, mikroalga memiliki kemampuan terbatas untuk menghasilkan tempat penyimpanan nitrogen ketika tumbuh dalam kondisi nitrogen yang cukup. Ketika mikroalga dikultur dalam kondisi nitrogen terbatas, efek yang paling menonjol adalah degradasi aktif dan spesifik dari *phycobilisomes*. Sampai nitrogen sel turun di bawah nilai ambang batas, fotosintesis masih terus terjadi, meskipun pada tingkat yang rendah. Aliran karbon dialihkan dari sintesis protein mengarah ke sintesis lemak atau karbohidrat. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa biosintesis dan akumulasi lipid dapat ditingkatkan dalam kultur alga dengan nutrisi nitrogen yang terbatas.

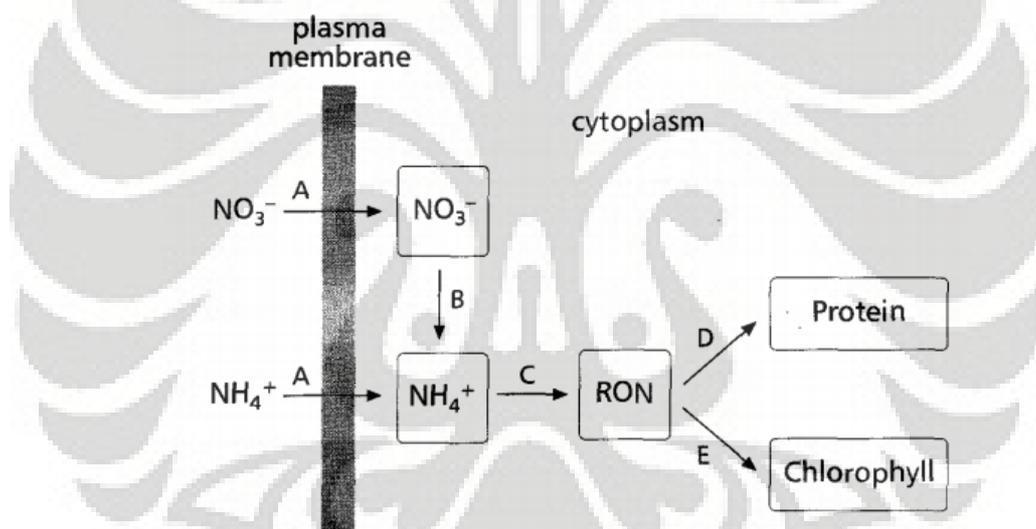
Namun, beberapa spesies alga meningkatkan karbohidrat mereka ketimbang kadar lemak mereka di bawah kondisi keterbatasan nitrogen, misalnya *Dunaliella*, di mana sejumlah besar gliserol dapat diakumulasikan bersama dengan meningkatkan monosakarida, disakarida dan polisakarida dalam kondisi pertumbuhan kekurangan nitrogen.

2.2.2. Siklus Nitrogen

Secara umum, nitrogen mempunyai fungsi sebagai komponen utama pembentuk asam inti, protein, hormon, dan koenzim. Dalam udara kering, nitrogen memiliki jumlah yang cukup besar yaitu sekitar 78% ("Udara"). Nitrogen yang ada di udara tidak hanya dalam bentuk senyawa N_2 , tetapi juga dalam bentuk senyawa NO , NO_2 , N_2O dan NH_3 bahkan ada yang sudah dalam bentuk ion NO_3^- dan NH_4^+ . Berbagai penelitian telah banyak dilakukan untuk melihat pengaruh nitrogen terhadap mikroalga, tidak hanya *Chlorella sp.* dan alga hijau tetapi juga

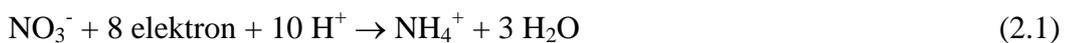
mikroalga lainnya juga. Bahan yang biasa digunakan sebagai sumber nitrogen adalah NaNO_3 , urea, dan asam amino seperti glutamin, alanin, dll. Pada bahan NaNO_3 terdapat ion NO_3^- sedangkan urea dan asam amino terdapat ion NH_4^+ . Ion tersebut banyak digunakan karena ion tersebut merupakan ion yang biasanya diserap oleh tumbuhan.

Senyawa nitrogen selain yang sudah menjadi ion NO_3^- dan NH_4^+ harus diubah terlebih dahulu menjadi ion tersebut agar mudah diserap. Namun, ion yang biasanya paling mudah diserap adalah ion NH_4^+ karena ion tersebut dapat berada pada situasi lingkungan yang asam atau kekurangan oksigen (hipoksia) sedangkan ion NO_3^- tidak terserap.



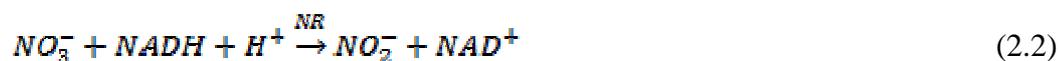
Gambar 2.2 Perbandingan utilitas sel alga antara ammonium dan nitrat, meliputi sistem transportasi membran (A), ammonium dapat langsung mengkonversi reduced organic nitrogen (RON) dan mengubahnya menjadi protein dan chlorophyll dengan bantuan sistem enzim C, D, E, sedangkan nitrat membutuhkan sistem enzim tambahan (B) (Graham & Wilcox, 2000).

Oleh karena itu, ion NO_3^- biasanya diubah terlebih dahulu menjadi NH_4^+ melalui proses reduksi nitrat dengan reaksi sebagai berikut:



Pada reaksi tersebut, kondisi yang dibutuhkan adalah kondisi yang sangat asam. Peningkatan pH tersebut tentu saja akan mengganggu pertumbuhan sehingga perlu dilakukan cara lain. Cara yang lebih baik adalah dengan mengubah

nitrat menjadi nitrit terlebih dahulu dan selanjutnya baru diubah menjadi ion ammonium. Reaksi perubahan nitrat menjadi nitrit adalah:



Reaksi tersebut membutuhkan NADH untuk mengubah nitrat menjadi nitrit. Padahal NADH sangat dibutuhkan untuk membentuk lipid, protein dan klorofil pada proses respirasi sehingga semakin banyak yang dibutuhkan untuk proses reduksi nitrat menjadi nitrit maka semakin sedikit lipid, klorofil dan protein yang terbentuk. Selanjutnya nitrit akan diubah menjadi ion ammonium dengan reaksi sebagai berikut:

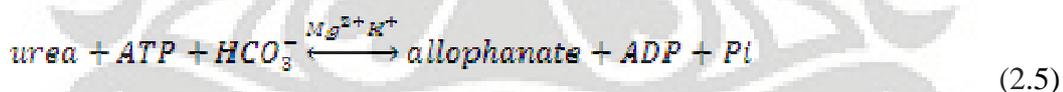


Berdasarkan reaksi tersebut, derajat keasaman yang dibutuhkan tidak seasm reaksi reduksi nitrat menjadi ion ammonium.

Selain sodium nitrat, bahan yang digunakan sebagai sumber nitrogen lainnya adalah urea. Menurut Leftley dan Syrett (1973), terdapat dua enzim yang dapat memecah urea menjadi ammonium dalam media kultur alga. Enzim yang pertama adalah urease (urea amidohidrolase). Enzim ini hanya menghidrolisis urea dengan persamaan reaksi sebagai berikut:



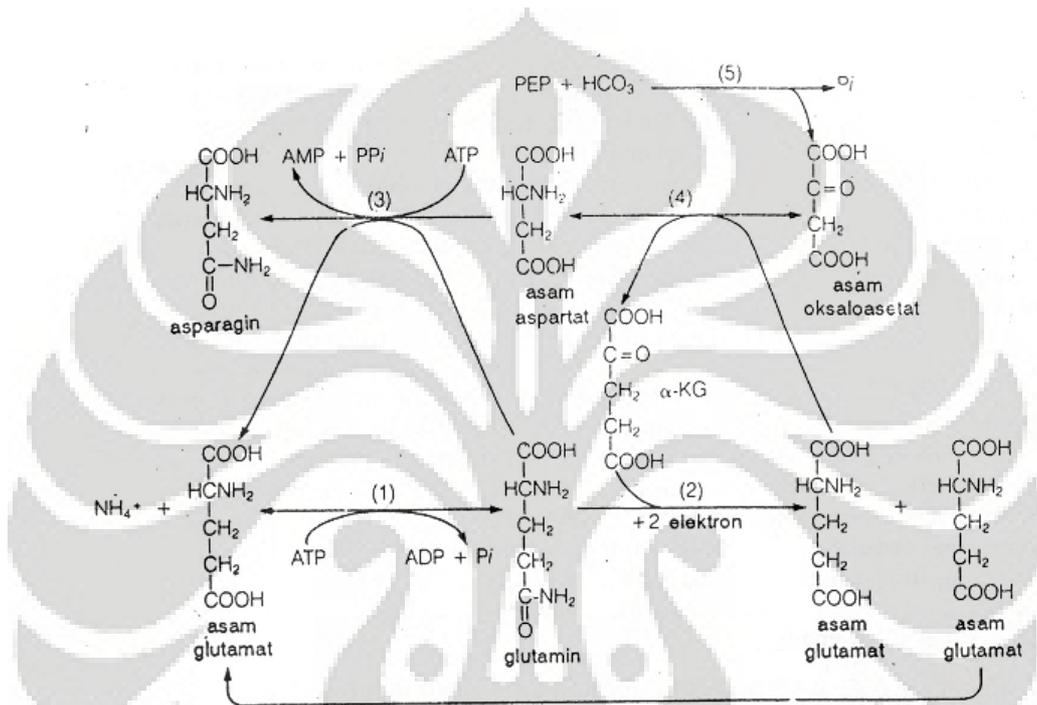
Enzim yang kedua adalah urea amidolyase. Enzim ini dibantu oleh ATP untuk memecah urea dengan persamaan reaksi sebagai berikut:



Enzim yang biasanya digunakan adalah enzim urease karena enzim ini tidak membutuhkan energi. Sedangkan, enzim urea amidolyase digunakan saat enzim urease sudah tidak dapat memecah urea lagi. Menurut Hodson dan Thompson (1969), *Chlorella vulgaris* merupakan salah satu mikroalga hijau yang kekurangan enzim urease. Hal tersebut membuat pemecahan urea menjadi ammonia membutuhkan energi dengan bantuan enzim urea amidolyase. Energi yang dibutuhkan tersebut dalam bentuk adenosine triphosphate. Dibandingkan enzim nitrat reduktase yang membutuhkan nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), enzim urea amidolyase hanya membutuhkan ATP yang memberikan

energi lebih sedikit. Dengan perkataan lain, perubahan nitrat membutuhkan lebih banyak energi dibandingkan perubahan urea untuk menjadi ammonium.

Selanjutnya, NH_4^+ akan bereaksi dengan asam glutamat dan akan menghasilkan senyawa organik utama seperti asam amino, protein, dan klorofil dengan reaksi sebagai berikut:



Gambar 2.3 Perubahan ammonium menjadi senyawa organik utama (Salisbury & Ross, 1992).

Namun, NH_4^+ yang berlebihan akan membuat pertumbuhan dari tumbuhan dan alga menurun karena gugus tersebut sangat beracun yang dapat menghambat pembentukan ATP di kloroplas maupun di mitokondria dengan bertindak sebagai bahan pencerai. Oleh karena itu, pada berbagai penelitian menunjukkan bahwa peningkatan kandungan lipid yang terjadi akan mengakibatkan laju pertumbuhan yang terjadi menurun.

Konversi nitrat menjadi ammonium membutuhkan energi dan enzim nitrat reduktase yang meliputi besi dan molibdenum sebagai kofaktornya. Sebaliknya, serapan ammonium tidak tergantung pada ketersediaan besi. Namun, bakteri nitrifikasi yang mudah mengkonversi ammonium menjadi nitrat, sering

membatasi ketersediaan ammonium bagi alga. Akibatnya terjadi tekanan selektif bagi evolusi nitrat reduktase, yang terjadi dalam berbagai kelompok alga. Aktivitas nitrat reduktase biasanya diinduksi oleh amonium dalam tingkat rendah, sementara aktivitas nitrat reduktase juga ditekan oleh tingginya kadar ammonium. Ahli ekologi menemukan bahwa aktivitas nitrat reduktase adalah cara yang berguna untuk memperkirakan tingkat asimilasi nitrogen ke dalam alga.

2.3. Kandungan Essensial *Chlorella sp.*

Chlorella mengandung vitamin dan mineral yang sangat tinggi, di antaranya vitamin B kompleks yang dapat memberikan energi tinggi, vitamin E dan C, serta sejumlah besar mineral seperti magnesium, potassium, besi, dan kalsium, serat untuk diet, asam nukleat, asam amino, enzim, CGF (*Chlorella Growth Factor*), dan substansi lain. Namun kandungan yang paling besar dimiliki oleh *Chlorella vulgaris* adalah protein, klorofil, dan lipid.

2.3.1. Protein

Protein ditemukan oleh Jöns Jakob Berzelius pada tahun 1838. Protein merupakan senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi. Kata protein berasal dari bahasa Yunani *proteios*, yang artinya "pertama", karena termasuk dalam kelompok senyawa yang terpenting dalam organisme hewan. Protein adalah poliamida, dan hidrolisis protein menghasilkan asam-asam amino. Molekul protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen dan kadang kala sulfur serta fosfor. Protein merupakan salah satu dari biomolekul raksasa, selain polisakarida, lipid, dan polinukleotida, yang merupakan penyusun utama makhluk hidup. Selain itu, protein merupakan salah satu molekul yang paling banyak diteliti dalam biokimia.

Kebanyakan protein merupakan enzim atau subunit enzim. Protein berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel makhluk hidup dan virus. Jenis protein lain berperan dalam fungsi struktural atau mekanis, seperti misalnya protein yang membentuk batang dan sendi sitoskeleton. Protein terlibat dalam sistem kekebalan (imun) sebagai antibodi, sistem kendali dalam bentuk hormon, sebagai komponen penyimpanan (dalam biji) dan juga dalam transportasi hara.

Sebagai salah satu sumber gizi, protein berperan sebagai sumber asam amino bagi organisme yang tidak mampu membentuk asam amino tersebut (heterotrof). Untuk mengetahui besarnya kandungan protein yang ada pada *Chlorella vulgaris*, cara yang paling sering digunakan adalah metode *Lowry* karena tidak memerlukan peralatan khusus dan hanya mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Pada metode ini digunakan kurva kalibrasi dari BSA (*Bovine Serum Albumin*) untuk mengetahui besarnya kandungan protein yang ada (Prihantini, 2007).

2.3.2. Klorofil

Klorofil adalah kelompok pigmen fotosintesis yang terdapat dalam tumbuhan, menyerap cahaya merah, biru dan ungu, serta merefleksikan cahaya hijau yang menyebabkan tumbuhan memperoleh ciri warnanya. Terdapat dalam kloroplas dan memanfaatkan cahaya yang diserap sebagai energi untuk reaksi-reaksi cahaya dalam proses fotosintesis. Klorofil a merupakan salah satu bentuk klorofil yang terdapat pada semua tumbuhan autotrof. Klorofil b terdapat pada ganggang hijau *chlorophyta* dan tumbuhan darat. Klorofil c terdapat pada ganggang coklat *Phaeophyta* serta diatom *Bacillariophyta*. Klorofil d terdapat pada ganggang merah *Rhadophyta*.

Klorofil dalam tanaman memiliki fungsi sebagai bejana pengubah energi dari cahaya matahari menjadi energi kimia, sehingga perubahan CO₂ dan H₂O menjadi karbohidrat dan oksigen dapat berlangsung. Dalam bidang gizi dan nutrisi, klorofil memiliki fungsi luas sebagai “pembersih alami” dalam tubuh manusia, pengontrol kandungan Ca (kalsium), membantu pencernaan protein, pencernaan lemak, penyerapan unsur-unsur Fe (besi), serta membersihkan darah (Suriawiria, 2005). Melihat pentingnya manfaat klorofil dalam tubuh, maka analisa kandungan klorofil perlu dilakukan. Pengukuran tersebut dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri, pada panjang gelombang 645 dan 663nm (Richmond, 2004).

2.3.3. Lipid

Secara luas lipid didefinisikan sebagai sesuatu yang dapat larut dalam lemak (*lipophilic*) seperti lemak, minyak, lilin, kolesterol, sterol, vitamin yang larut lemak (seperti vitamin A, D, E, K), monogliserida, digliserida, fosfolipid, dan lain-lain. Lipid merupakan molekul kecil yang *hidrophobic* atau *amphiphilic* yang seluruh atau sebagian berasal dari dua bagian unit biokimia yang berbeda yaitu kelompok *ketoacyl* dan *isoprene*. Meskipun istilah lipid menggunakan lemak sebagai sinonimnya, lemak merupakan bagian kelompok dari lipid yang disebut trigliserida.

Suatu molekul dikategorikan sebagai lipid jika mempunyai kelarutan yang rendah dalam air, larut dalam pelarut organik, dan terdiri dari C, H, O. Lipid mempunyai fungsi biologis seperti membran, penyimpan energi dan metabolisme, *signaling*, dan lain-lain. Salah satu lipid yang digunakan sebagai komponen utama pada membran biologis adalah *glycerophospholipids* seperti cellular plasma membran dan intracellular dari organelles. Pada tumbuhan dan alga, *galactocyldiacylglycerols* dan *sulfoquinovosyldiacylglycerol* yang kekurangan grup fosfat, merupakan komponen utama dari membran kloroplas dan *organelles* yang berhubungan. Selain itu, komponen tersebut merupakan lipid yang paling melimpah pada jaringan fotosintesis pada tanaman tingkat tinggi, alga, dan beberapa bakteri.

Manfaat lipid yang paling dikembangkan saat ini adalah sebagai sumber energi manusia. Lipid banyak dijadikan sebagai bahan baku untuk biodiesel. Lipid yang biasa digunakan tersebut adalah trigliserida. Cara yang paling sering digunakan adalah dengan mencampurkan trigliserida tersebut dengan alkohol dan dibantu oleh katalis sehingga menghasilkan biodiesel.

Untuk mengetahui kandungan lipid yang ada pada *Chlorella vulgaris*, cara yang paling mudah adalah dengan menggunakan ekstraksi *Bligh-Dyer* karena tidak memerlukan peralatan yang khusus seperti metode ekstraksi lainnya (ekstraksi *soxhlet*, fluida superkritis, dll). Metode ini menggunakan prinsip gravimetri dengan bantuan zat pelarut polar dan non polar (Bligh & Dyer, 1959).

2.4. State of The Art

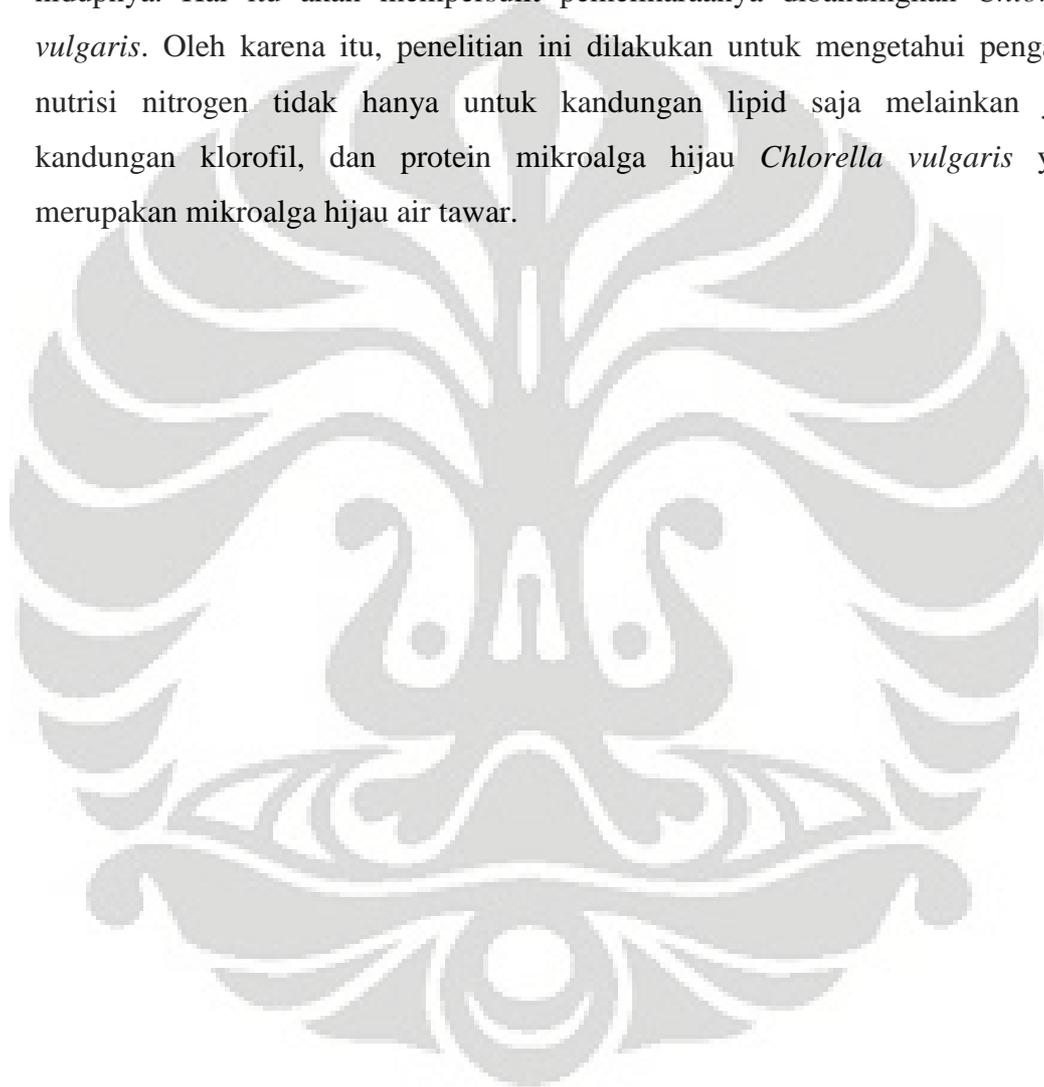
Berikut ini adalah rangkuman penelitian pengaruh nutrisi nitrogen terhadap kandungan essensial beberapa mikroorganisme dan arah penelitian yang akan dilakukan.

Tabel 2.1 Road map penelitian

		kandungan essensial		
		Lipid	klorofil	Protein
Mikroorganisme	<i>Rhodospiridium toruloides</i> CBS 14	Evans and Ratledge (1983)		
	<i>Dunaliela salina</i>	Weldy and Huesemann (2007)		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Widjaja, Chien, and Ju (2008)		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Converti, Casazza, Ortiz, Perego, and Borghi (2009)		
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	Yanqun Li, Horsman, Wang, Wu, and Christopher (2008)		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Penelitian Ini		

Penelitian mengenai pengaruh nutrisi nitrogen terhadap kandungan essensial mikroalga telah banyak dilakukan, mulai dari pengaruh terhadap ragi seperti *Rhodospiridium toruloides* CBS 14 hingga mikroalga hijau *Chlorella vulgaris*. Namun, yang lebih banyak diteliti hanya mengenai kandungan lipidnya saja, seperti yang dilakukan oleh Evans dan Ratledge (1983) dengan *Rhodospiridium toruloides* CBS 14, Weldy dan Huesemann (2007) dengan *Dunaliela Salina* dan Widjaja, et.al. (2008) serta Converti, et.al. (2009) dengan menggunakan *Chlorella vulgaris*. Akan tetapi, penelitian yang telah dilakukan tersebut belum ada yang melihat pengaruh nitrogen terhadap kandungan essensial lain seperti klorofil dan protein. Padahal, nutrisi nitrogen merupakan salah satu

pembentuk kandungan essensial tersebut. Ada pun penelitian yang tidak hanya melihat kandungan lipidnya saja tetapi juga kandungan klorofilnya juga telah dilakukan oleh Yanqun Li, et.al (2008). Namun, penelitian tersebut menggunakan mikroalga hijau *Neochloris oleoabundans* yang merupakan alga hijau yang hidup di laut. Berbeda dengan *Chlorella vulgaris* yang hidup di air tawar, *Neochloris oleoabundans* membutuhkan salinitas yang cukup tinggi dalam media kultur hidupnya. Hal itu akan mempersulit pemeliharanya dibandingkan *Chlorella vulgaris*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh nutrisi nitrogen tidak hanya untuk kandungan lipid saja melainkan juga kandungan klorofil, dan protein mikroalga hijau *Chlorella vulgaris* yang merupakan mikroalga hijau air tawar.

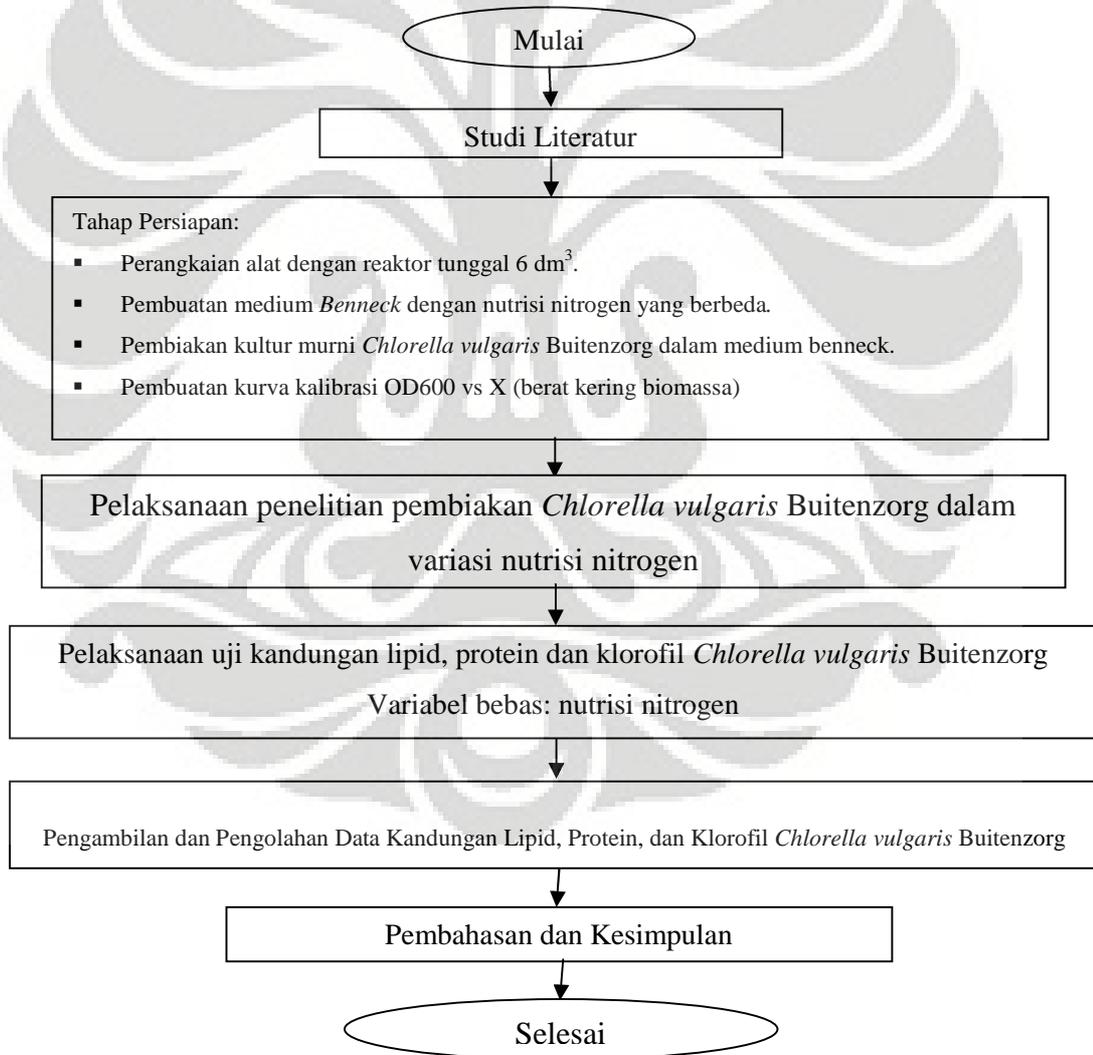


BAB III METODE PENELITIAN

Pada bab ini akan dijelaskan mengenai diagram alir penelitian, alat dan bahan penelitian, variabel penelitian, prosedur serta pengolahan data untuk mendapatkan hasil penelitian.

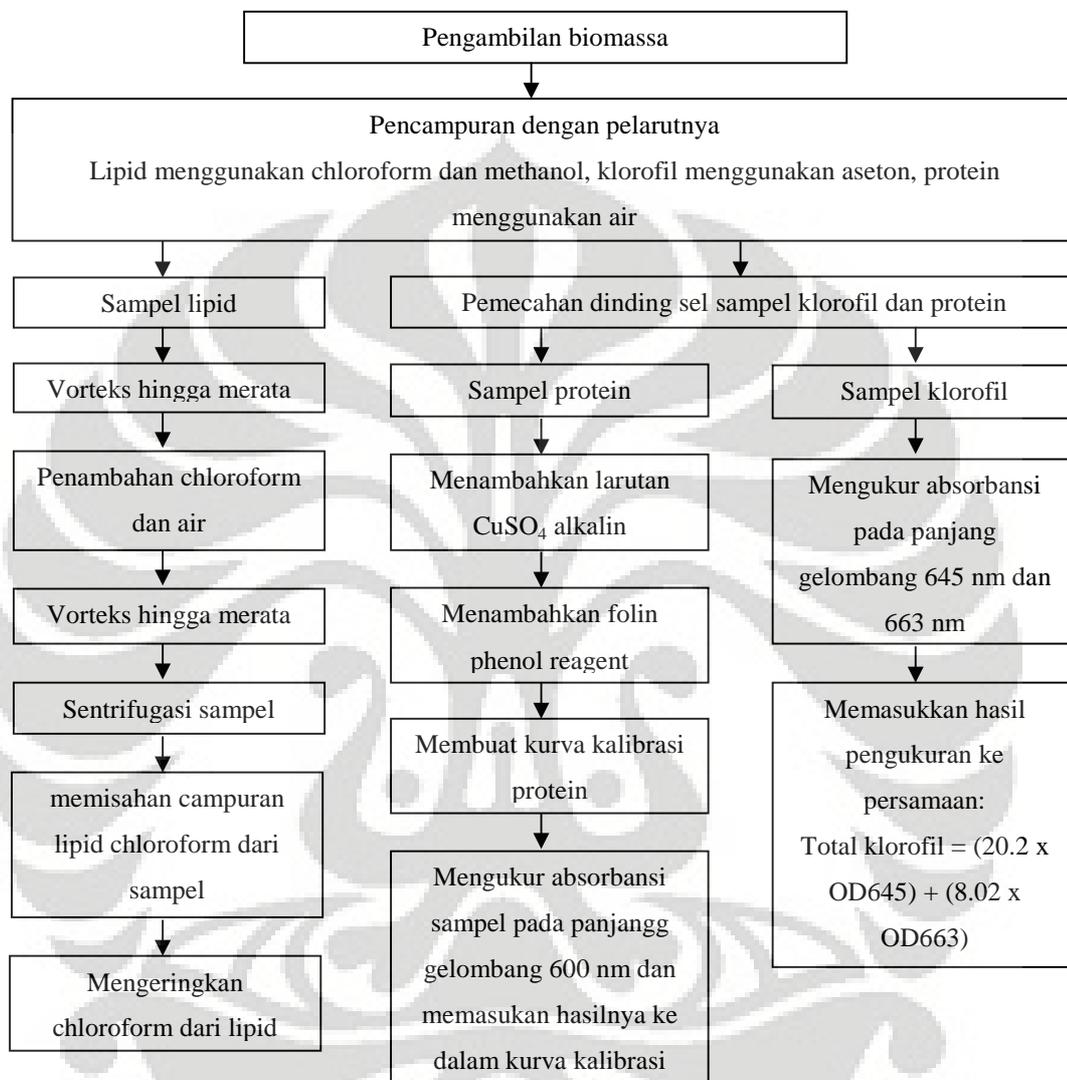
3.1. Diagram Alir Penelitian

Skema proses penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada diagram alir berikut ini:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

Sedangkan skema proses pengambilan data kandungan dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 3.2 Skema proses pengambilan data kandungan

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah:

- Fotobioreaktor *flat* transparan berbentuk akuarium dengan kapasitas 6 dm³ yang dilengkapi dengan aliran *input* dan *output* gas CO₂ dan udara.
- Kompresor udara portabel.
- Tabung gas CO₂ yang dilengkapi dengan regulator.
- Flowmeter udara dan flowmeter CO₂.

- Lampu *Phillip Hallogen* 20W/12V/50Hz dan transformator 220V primer/ 12V sekunder dengan intensitas maksimum 60 klx sebagai sumber iluminasi.
- T-septum yang terbuat dari bahan gelas sebagai titik indikator konsentrasi CO₂ yang masuk ke dalam fotobioreaktor.
- Peralatan *glassware* yang terdiri dari erlenmeyer 100 cm³ (sebagai *discharge* gas CO₂ dan udara *output* fotobioreaktor, pipet ukur 5 cm³, pipet pasteur, gelas ukur 10 cm³, 100 cm³ botol sampel sel, dan beaker glass 20 cm³ dan 100 cm³).
- Selang silikon dan selang plastik (sebagai rangkaian peralatan dan konektor rangkaian).
- Unit *Gas Chromatography* TCD Shimadzu GC-8A (untuk mengukur konsentrasi gas CO₂ *input* dan *output* fotobioreaktor), *Recorder* C-R6A *Chromatograph* (untuk mendapatkan printout dari hasil GC), serta tabung gas (*carrier gas*) Argon.
- *Syringe* 1001 RT *Hamilton* 1 cm³ (*inlet-outlet*) (untuk mengambil sampel dari *input* dan *output* CO₂).
- *Set Lightmeter* Lxtron LX-103 (sebagai penghitung kekuatan intensitas cahaya, dengan satuan Lx ataupun *Foot-Candle*).
- pH meter HANNA Model HI 8014 dengan larutan buffer 4 dan 7.
- Lemari kerja ultraviolet (sebagai *transfer box*).
- Oven (untuk sterilisasi alat dan mengeringkan sel *Chlorella*).
- *Spectro UV-VIS* RS *Spectrometre*, LaboMed. Inc (untuk menghitung OD/absorbansi) dan *Centrifuge* (untuk memisahkan sel *Chlorella vulgaris* dari mediumnya).
- *Glass beads* (untuk membantu pemecahan dinding sel *Chlorella sp.*).
- *Sonicator* untuk memecah dinding sel *Chlorella sp.*

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Starter mikroalga hijau *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.
- KH₂PO₄, MgSO₄, NaNO₃, dan FeCl₃ untuk membuat medium *Benneck* dan sebagai pengganti NaNO₃ digunakan Urea.
- Gas CO₂ sebagai bahan untuk fotosintesis mikroalga.
- *Aquadest* untuk membuat medium *Benneck* dan mencuci peralatan.

- Alkohol 70% untuk sterilisasi peralatan.
- *Chloroform* dan *Methanol* sebagai pelarut dalam pengujian kandungan lipid.
- *Acetone* sebagai pelarut dalam pengujian kandungan klorofil.
- *Folin phenol reagent* dan *CuSO₄ alkaline* (*CuSO₄* 0.5% dalam H₂O, Na₂CO₃ 2% dalam 0.1 N NaOH, NaK-Tartrate 1% dalam H₂O) sebagai bahan uji protein.
- BSA 1% sebagai bahan standar dalam kalibrasi uji protein.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel yang dapat ditentukan dalam penelitian ini adalah :

- Variabel tetap.
Variabel tetap dalam penelitian ini adalah intensitas cahaya (I) dan kecepatan superfisial CO₂.
- Variabel bebas.
Variabel ini merupakan variabel yang diatur pada suatu harga tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini adalah sumber nutrisi nitrogen yang digunakan.
- Variabel terikat.
Variabel terikat pada penelitian ini adalah kandungan lipid, klorofil, dan protein dalam sampel biomassa *Chlorella sp.*

3.4. Prosedur Penelitian

Berikut ini akan dijelaskan tahapan-tahapan penelitian, mulai dari persiapan hingga pengambilan data kandungan lipid.

3.4.1. Tahap Persiapan

- Sterilisasi peralatan
Peralatan yang digunakan pada penelitian harus disterilisasi terlebih dahulu agar tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme atau zat pengganggu yang dapat menghambat pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

Prosedur sterilisasi peralatan terbagi menjadi dua yaitu untuk peralatan yang terbuat dari gelas tahan panas dan untuk peralatan yang terbuat dari gelas tidak tahan panas. Untuk peralatan yang terbuat dari gelas tahan panas, prosedur

sterilisasi peralatannya adalah mencuci peralatan dengan sabun dan dibilas dengan air sampai bersih, mengeringkan peralatan dengan tisu atau kompresor udara dan kemudian menutup peralatan yang berlubang atau berongga dengan *aluminium foil* agar tidak terkontaminasi setelah disterilisasi, memasukkan peralatan yang akan disterilisasi ke dalam *autoclave* dan disterilisasi pada suhu 120°C selama $\pm 1,5$ jam untuk medium dan ± 45 menit untuk peralatan gelas, menyimpan peralatan yang sudah disterilisasi di dalam lemari penyimpanan yang dilengkapi dengan lampu UV.

Untuk peralatan yang terbuat dari gelas tidak tahan panas, prosedur sterilisasi peralatannya adalah sebagai berikut mencuci peralatan dengan sabun dan dibilas dengan air sampai bersih, mengeringkan peralatan dengan tisu atau kompresor udara dan kemudian menutup peralatan yang berlubang atau berongga dengan *aluminium foil* agar tidak terkontaminasi setelah disterilisasi, membilas peralatan dengan alkohol 70 % selama ± 5 menit dan kemudian dibilas dengan aquadest sebanyak 20 kali untuk memastikan tidak ada sisa alkohol pada alat, menyimpan peralatan yang sudah disterilisasi di dalam lemari penyimpanan yang dilengkapi dengan lampu UV selama ± 2 jam sebelum digunakan. Sterilisasi ini dilakukan sebelum alat tersebut dipakai, karena jika dibandingkan dengan peralatan yang dipanaskan, sterilisasi dengan prosedur ini lebih tidak tahan terhadap kontaminasi.

- Pembuatan medium *Benneck* dengan nutrisi nitrogen yang berbeda

Penggunaan medium *Benneck* untuk kultivasi *Chlorella vulgaris* Buitenzorg didasarkan atas pertimbangan antara lain karena nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Buitenzorg terdapat pada medium ini dan juga medium *Benneck* ini mudah dibuat.

Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat medium *Beneck* yaitu :

Tabel 3.1 Bahan Medium Benneck

Bahan	Aquadest (mg/dm^3)
KH_2PO_4	100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
NaNO_3	500
FeCl_3	3-5

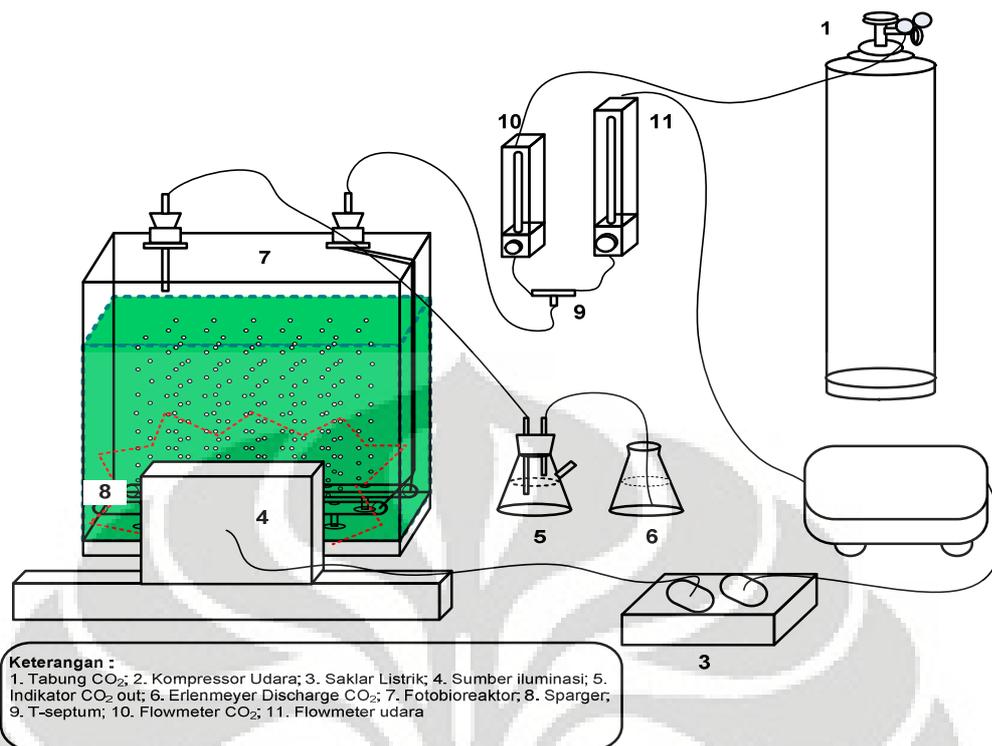
Cara pembuatan 1 dm³ medium *Benneck* adalah menyiapkan bahan-bahan pada tabel 3.1 diatas, kemudian melarutkan bahan-bahan tersebut dalam 1 dm³ *aquadest* dan diaduk sampai semuanya larut, mensterilkan medium menggunakan *autoclave* selama \pm 1,5 jam kemudian didinginkan, menyimpan medium tersebut dalam lemari pendingin bila tidak langsung digunakan. Apabila terdapat endapan di dasar medium maka endapan tersebut harus dipisahkan dahulu sebelum disimpan. Kemudian, memvariasikan konsentrasi NaNO₃ dalam medium *benneck* menjadi tiga kondisi. Kondisi yang pertama adalah kekurangan NaNO₃ dengan menggunakan 250 mg NaNO₃/Liter atau 3 mM NaNO₃. Kondisi kedua adalah kelebihan NaNO₃ dengan menggunakan 750 mg NaNO₃/Liter atau 9 mM NaNO₃. Dan kondisi terakhir adalah mengubah sumber NaNO₃ menjadi CO(NH₂)₂ atau urea dengan jumlah yang sama (500 mg CO(NH₂)₂/Liter)

- Pembuatan rangkaian peralatan

Penelitian ini menggunakan fotobioreaktor *flat* berukuran 6 dm³ dan dirangkai seperti yang ditunjukkan gambar 3.3 Fotobioreaktor yang akan digunakan diletakkan dalam posisi sejajar dan menghadap ke lampu halogen sebagai sumber iluminasi.

Kalibrasi flowmeter dilakukan agar dapat diketahui dengan tepat skala dari masing-masing flowmeter. Hal ini penting karena gas yang mengandung CO₂ yang akan dialirkan harus selalu dijaga konstan. Pada tiap sambungan selang dilapisi dengan *pipe seal* untuk memastikan tidak ada sambungan yang bocor sekaligus mencegah kontaminan masuk kedalam rangkaian. Sumber iluminasi yang digunakan adalah dua buah lampu halogen dengan kekuatan intensitas cahaya sampai 110,000 lx.

Berikut ini adalah ilustrasi rangkaian alat penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini:



Gambar 3.3 Rangkaian Peralatan Fotobioreaktor Tunggal

- Pembiakan kultur murni *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dalam medium *Benneck*

Prosedur pembiakan kultur murni adalah menyiapkan medium *Benneck* dan peralatan pembiakan (wadah, selang udara, tutup wadah) yang telah disterilkan terlebih dahulu, stok murni *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dimasukkan ke dalam wadah steril dan dicampur dengan medium *Benneck* yang telah steril. Perbandingan antara jumlah stok *Chlorella* dengan medium dapat diatur sesuai kebutuhan riset. Pindahkan ini harus dijaga steril, dilakukan dalam *transfer box*, setelah lingkungan disterilkan dengan alkohol 70% dan menggunakan api bunsen.

Lalu medium kultur tersebut dipindahkan ke dalam fotobioreaktor pembiakkan dan di-*bubbling* dengan menggunakan kompresor udara. Pada tahap ini juga harus diberikan cahaya namun cukup dengan intensitas kecil $\pm 3,000$ lx.

Pembiakan dapat dilakukan selama satu minggu atau lebih bila bertujuan untuk memperbanyak stok yang ada, tetapi jika hanya untuk melewati *lag time* dapat dilakukan selama 2-3 hari atau ± 60 jam, tergantung pertumbuhan jumlah selnya.

- Pembuatan kurva kalibrasi OD600 vs X (berat kering biomassa)

Pembuatan kurva kalibrasi OD600 vs X (berat kering biomassa) penting dalam penelitian ini, karena berkaitan langsung dengan jumlah sel *Chlorella sp.* yang terdapat dalam kultur. Berat kering biomassa perlu diketahui agar dapat dilihat perubahan jumlahnya dan hal ini berkaitan dengan besar intensitas cahaya yang dibutuhkan.

Langkah-langkah penghitungan adalah kultur yang akan diukur berat kering biomasanya diaduk sampai semua endapan *Chlorella vulgaris* Buitenzorg merata dalam medium, kemudian mengambil 5 ml sampel untuk diukur *optical density*-nya.

Spektrofotometer di-set pada panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang 600 nm didapat dari *peak* yang keluar selama kalibrasi panjang gelombang dengan menggunakan *Spektrofotometer Double Beam*. Untuk melihat nilai OD pada penelitian ini digunakan *spektrofotometer single beam*, dan cahaya tampak (VIS) sebagai sumber cahaya yang akan diabsorpsi oleh *Chlorella sp.*, kalibrasi spektrofotometer dengan menggunakan kuvet berisi aquades/medium pada panjang gelombang yang sama, kemudian mengatur agar absorbansinya menunjukkan angka 0.000 (no), masukkan sampel ke dalam kuvet, kemudian uji dalam spektrofotometer. Data yang diambil adalah nilai absorbansi pada range 0.2-0.4, jika melebihi dari range tersebut maka sampel harus diencerkan sampai nilai absorbansinya mencapai range tersebut. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah selnya dikalikan jumlah pengenceran yang dilakukan.

Untuk pengukuran berat kering biomasanya, sampel yang telah diukur *optical density*-nya *disentrifuge* untuk dipadatkan biomasanya. Setelah itu, biomassa yang telah padat dipisahkan dari mediumnya dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk dikeringkan. Setelah dikeringkan di dalam *oven*, sampel ditimbang beratnya. Berat kering biomassa yang dihasilkan merupakan pengurangan dari berat cawan petri yang berisi biomassa dengan berat cawan petri kosong. Selanjutnya membuat kurva antara OD600 dengan berat kering biomassa sehingga didapatkan suatu persamaan linearnya.

3.4.2. Pelaksanaan Kegiatan Penelitian

Pada penelitian ini akan dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama, biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dibiakan dalam fotobioreaktor yang berbeda nutrisi nitrogennya. Nutrisi nitrogen yang digunakan pada fotobioreaktor pertama, kedua, dan ketiga adalah NaNO_3 dengan konsentrasi 3 mM (250 mg NaNO_3 /Liter), 6 mM (500 mg NaNO_3 /Liter), dan 9 mM (750 mg NaNO_3 /Liter) secara berurutan. Sedangkan pada fotobioreaktor keempat menggunakan urea sebagai sumber nutrisi nitrogennya.

Setelah biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dibiakan pada nutrisi nitrogen masing-masing, tahap selanjutnya adalah menguji kandungan lipid, klorofil dan protein yang ada pada sampel biomassa tersebut. Untuk menguji kandungan lipid akan digunakan metode *Bligh-Dyer* yang memanfaatkan prinsip gravimetri dengan menggunakan pelarut polar dan nonpolar. Sedangkan untuk menguji kandungan klorofil dan protein, yang pertama kali dilakukan adalah pemecahan dinding sel biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg karena protein dan klorofil yang ada dilindungi di dalam dinding sel tersebut. Selanjutnya mengukur nilai absorbansi dari masing-masing sampel.

Hal yang perlu diperhatikan adalah semua prosedur penelitian harus dilakukan secara aseptik dengan menggunakan bunsen dan alkohol 70%, untuk menghindari atau mengurangi efek kontaminasi. Hal ini sangat penting karena efek kontaminasi dapat menghambat pertumbuhan mikroalga. Kondisi operasi yang akan digunakan pada fotobioreaktor adalah temperatur *ambient* (29°C) dan tekanan atmosferik (1 atm).

3.4.3. Pengambilan Data

Data yang diambil selama penelitian ini adalah waktu pengambilan sampel dan besarnya kandungan lipid, klorofil, dan protein yang ada pada biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg. Langkah-langkah yang dilakukan dalam pengambilan data adalah:

- Pengambilan Data Lipid.

Pengambilan data kandungan lipid dilakukan dengan metode *Bligh-Dyer*. Adapun prosedur pelaksanaan uji lipid adalah sebagai berikut (Bligh & Dyer,

1959): mencampurkan sampel, yang telah *disentrifuge* sebelumnya, dengan *chloroform* dan *methanol* sebanyak 1 ml dan 2 ml, berurutan. Kemudian sampel di *vortex* hingga melarut seluruhnya. Setelah itu, sampel ditambahkan aquades dan *chloroform* masing-masing sebanyak 1 ml. sampel kembali di *vortex* hingga melarut seluruhnya. Lalu, sampel *disentrifuge* hingga terbentuk dua lapisan, lapisan organik dibawah dan lapisan air diatasnya. Lapisan bawah yang merupakan campuran antara *chloroform* dengan lipid dipisahkan dengan menggunakan pipet tetes. Pemisahan tersebut dilakukan secara hati-hati agar lapisan atasnya tidak ada yang terangkat. Lipid yang telah dipisahkan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk dikeringkan pelarut *chloroform*nya. Besarnya kandungan lipid diketahui dari berat cawan petri sebelum dan sesudah dimasukan lipid.

Untuk menghitung biomassa *Chlorella sp.* yang terbentuk, sampel *disentrifuge* hingga terbentuk endapan. Endapan kemudian dicampurkan kembali dengan 2 mL akuades. Kemudian campuran diletakkan dalam cawan petri yang telah ditimbang sebelumnya, dan dioven pada temperatur 70-80°C selama 1 jam. Endapan kering yang terbentuk kemudian ditimbang kembali. Hasil dari pengujian lipid adalah berat lipid per berat biomassa atau persen berat dari lipid.

▪ Pengambilan Data Protein dan Klorofil.

Untuk menguji kandungan protein dan klorofil, dinding sel *Chlorella sp.* harus dipecahkan terlebih dahulu dengan menggunakan sonikator dan dibantu oleh *glass bead*. Hal tersebut dilakukan karena sifat dinding sel yang kuat menyebabkan protein dan klorofil terlindung didalamnya. Prosedur pemecahan dinding sel adalah: sepuluh mililiter sampel dan medium *disentrifugasi* hingga diperoleh endapan. Endapan tersebut dicuci dengan aquades steril sebanyak 2 ml, dan *disentrifugasi* kembali. Endapan yang terakhir diperoleh ditambahkan pelarutnya (aseton 80% untuk uji klorofil; air untuk uji protein) dan *glass beads* dengan perbandingan 1:1. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks dan sonikator. Penggunaan sonikator bertujuan untuk memecah dinding sel *Chlorella sp.* dengan menggunakan gelombang ultrasonik.

Tumbukan antar dinding sel *Chlorella sp.* akan dipercepat dengan menggunakan *glass bead*.

Untuk mengetahui besarnya kandungan klorofil dalam sampel, sampel yang telah homogen diaduk selama 1-2 menit dengan menggunakan vorteks, kemudian disentrifugasi kembali. Supernatan yang diperoleh dipindahkan kedalam kuvet untuk diukur nilai absorbansinya. Panjang gelombang yang digunakan untuk pengujian klorofil pada pelarut aseton ada dua yaitu 645 nm dan 663 nm. Data absorbansi tersebut dimasukkan ke dalam persamaan (Richmond, 2004):

$$\text{Klorofil a} = (12.7 \times \text{OD}_{663}) - (2.69 \times \text{OD}_{645}) \quad (3.1)$$

$$\text{Klorofil b} = (22.9 \times \text{OD}_{645}) - (4.64 \times \text{OD}_{663}) \quad (3.2)$$

$$\text{Total Klorofil} = (20.2 \times \text{OD}_{645}) + (8.02 \times \text{OD}_{663}) \quad (3.3)$$

Sedangkan untuk mengetahui besarnya kandungan protein dalam sampel perlu dibuat kurva standar kalibrasi dan persamaannya adalah $y = ax + b$, dimana y adalah absorbansinya dan x adalah mg proteinnya. Adapun prosedur pelaksanaan uji kandungan protein adalah:

Membuat larutan reagen. Metode *Lowry* menggunakan campuran empat macam larutan untuk uji protein; yakni: Larutan A : 1 ml CuSO_4 0.5% dalam H_2O CuSO_4 0.5% = 0.02 gram dalam 4 ml; Larutan B : 100 ml Na_2CO_3 2% dalam 0.1 N NaOH, Na_2CO_3 2% = 2 gram dalam 100 ml NaOH 0,1N; Larutan C: 1 ml NaK-Tartrate 1% dalam H_2O , NaK-tartrate 2% = 0.04 gram dalam 4 ml; Larutan D: BSA 0.1 mg/ml (1% dalam 100 ml)

Larutan CuSO_4 alkalin dibuat dengan memasukkan 2 ml larutan C (sodium tartrate) kedalam labu erlenmeyer 100ml, menambahkan 2 ml larutan A dan kemudian mengaduk dengan stirrer. Selama pengadukan, ditambahkan 96 ml larutan B. Kemudian, sampel yang telah disonikasi ditambahkan dengan larutan CuSO_4 alkalin sebanyak 2 ml dan didiamkan selama 10 menit. Setelah itu, tambahkan larutan *folin phenol reagent* ke dalam sampel. Setelah diaduk, sampel kembali didiamkan selama 30 menit hingga warna sampel mejadi kebiru-biruan. Lalu, ukurlah absorbansinya dari sampel pada panjang gelombang 600 nm. Data

absorbansi yang telah didapatkan dimasukkan ke dalam kurva kalibrasi untuk diketahui jumlah kandungan proteinnya.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dijelaskan mengenai pelaksanaan penelitian, pengamatan yang dilakukan selama penelitian, data yang diambil dalam penelitian ini, dan analisa dari data yang didapatkan tersebut.

4.1. Pembahasan Umum

Nutrisi nitrogen dipilih pada penelitian ini karena perannya bagi pertumbuhan dan pembentukan kandungan essensial yang sangat penting. Nutrisi nitrogen merupakan unsur kimia anorganik pembentuk kimia organik seperti protein, klorofil, lipid. Ketiga kandungan essensial tersebut dipilih karena konsentrasinya dari biomassa *Chlorella vulgaris* yang cukup tinggi. Namun, tidak semua bentuk dan konsentrasi nutrisi nitrogen dapat memberikan hasil kandungan essensial yang baik bagi biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg. Oleh karena itu, jenis nutrisi nitrogen yang digunakan pada pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dijadikan sebagai variabel bebas.

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah penentuan nutrisi nitrogen yang tepat digunakan untuk meningkatkan kandungan lipid, klorofil, dan protein. Dengan mengetahui nutrisi nitrogen yang tepat tersebut, jumlah kandungan essensial dapat dihasilkan dengan lebih optimal. Selain itu, pemanfaatan biomassa baik sebagai bahan baku energi alternatif biodiesel maupun bahan baku suplemen makanan dapat lebih dioptimalkan.

Pada tahap awal penelitian, medium yang akan digunakan dipersiapkan terlebih dahulu. Medium yang digunakan adalah medium *Benneck* dengan menggunakan senyawa $MgSO_4$, KH_2PO_4 , $FeCl_3$, dan $NaNO_3$ sebagai sumber nutrisi nitrogennya. Komposisi dalam medium *Benneck* dipilih karena senyawa yang digunakan tersebut mempunyai nutrisi mikro maupun makro yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroalga. Sumber nutrisi nitrogennya tersebut divariasikan menjadi empat variasi. Variasi pertama adalah konsentrasi nitrogen yang ada pada medium benneck tanpa adanya perubahan. Konsentrasi tersebut adalah sekitar 6 mM $NaNO_3$ (500 mg $NaNO_3$ /Liter) atau sebesar 82 mg

nitrogen/Liter. Variasi berikutnya adalah konsentrasi nitrogen yang ada pada medium benneck dikurangi menjadi 3 mM NaNO_3 (250 mg NaNO_3 /Liter) atau sebesar 41 mg nitrogen/Liter. Variasi yang ketiga adalah konsentrasi nitrogen yang ada pada medium benneck dilebihi menjadi 9 mM NaNO_3 (750 mg NaNO_3 /Liter) atau sebesar 123 mg nitrogen/Liter. Variasi yang terakhir adalah mengubah sumber nutrisi nitrogen NaNO_3 menjadi $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ dengan jumlah yang sama pada medium benneck (500 mg $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ /Liter). Urea dipilih sebagai perwakilan dari ion ammonium karena dapat memberikan konsentrasi nitrogen yang lebih tinggi yaitu sebesar 230 mg nitrogen/liter. Jadi, pengaruh nitrogen yang menggunakan urea tidak hanya dilihat dari sumber nitrogennya yang berbeda tetapi juga konsentrasinya.

Setelah medium selesai dibuat, langkah selanjutnya adalah merangkai peralatan yang akan digunakan. Peralatan yang dirangkai pertama kali adalah fotobioreaktor. Jenis fotobioraktor yang digunakan pada penelitian ini adalah fotobioreaktor *flat* atau datar. Kapasitas dan dimensi fotobioreaktor yang digunakan adalah 6 dm³ dan 38,5 cm x 10 cm x 25 cm. Desain fotobioraktor tersebut dipilih karena berdasarkan penelitian sebelumnya mampu mengurangi terjadinya *self shading*, peristiwa bertumpuknya sel *Chlorella* akibat pertumbuhan biomassa yang semakin padat sehingga cahaya sulit mencapai seluruh sel biomassa. Selain itu, fotobioreaktor *flat* juga lebih sederhana untuk skala laboratorium. Bahkan, penelitian-penelitian di Italia, Jerman, dan Israel yang menggunakan fotobioreaktor *flat* menunjukkan betapa menjanjikannya peralatan kultur tersebut (Richmond, 2004).

Salah satu rangkaian yang tidak kalah pentingnya adalah cahaya. Cahaya merupakan salah satu bagian terpenting bagi proses fotosintesis mikroalga. Tanpa adanya cahaya, ATP dan NADPH yang dibutuhkan untuk membentuk senyawa kimia organik tidak akan terbentuk. Namun, cahaya tersebut ada kondisi optimumnya. Pada penelitian ini, jenis pencahayaan yang digunakan adalah kontinyu. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya oleh Sang Made Kresna (2005) dan telah divalidasi oleh Ponco Widodo mengenai intensitas cahaya optimum, diketahui bahwa intensitas cahaya optimum untuk pencahayaan kontinyu sebesar 4000 lux. Jika lebih kecil dari kondisi optimum tersebut, proses

fotosintesis mikrolaga sulit untuk terjadi sehingga pertumbuhannya menjadi rendah. Namun, apabila lebih dari kondisi optimumnya tersebut akan berakibat fotoinhibisi, cahaya menjadi pencegah terjadinya proses fotosintesis dan akan merusak struktur sel mikroalga, terutama kloroplas.



Gambar 4.1 Rangkaian peralatan fotobioreaktor

Setelah rangkaian fotobioreaktor dan pencahayaan dipersiapkan, langkah selanjutnya adalah melakukan *pre-culture*. Kondisi operasi yang dilakukan pada proses *pre-culture* hampir sama dengan proses kultivasi. Hanya saja, sumber karbon dioksida yang digunakan berbeda, dimana pada proses kultivasi digunakan gas karbon dioksida sedangkan *pre-culture* menggunakan NaHCO_3 . Selain itu, pencahayaan yang dilakukan tidak terlalu tinggi intensitasnya yaitu hanya 2000-3000 lux tergantung jumlah biomassa yang ada pada awal *pre-culture*. Waktu yang dibutuhkan pada proses *pre-culture* cukup singkat, 2-3 hari, karena proses ini hanya bertujuan untuk mengadaptasikan mikroalga pada kondisi operasi yang akan digunakan pada penelitian.



Gambar 4.2 Pre-culture mikroalga

Tahap selanjutnya adalah membuat kurva kalibrasi antara *optical density* pada panjang gelombang 600 nm dengan X atau berat kering biomassa. Panjang gelombang tersebut digunakan karena absorbansi dari mikroalga berada paling tinggi dibandingkan pada panjang gelombang sinar tampak lainnya. Umumnya, selain kurva kalibrasi OD600 vs X dibuat pula kurva kalibrasi OD600 vs Nsel, dimana Nsel merupakan jumlah sel. Namun, kurva jumlah sel tersebut kurang akurat untuk menentukan besarnya biomassa yang ada. Kondisi setiap sel berbeda-beda, dimana terdapat kondisi sel yang kecil dan kondisi sel yang besar. Pada saat melakukan penghitungan jumlah sel pada ukuran sel kecil, hasil yang diberikan pasti berbeda dengan jumlah sel yang berukuran besar walaupun *optical density*nya sama.

Setelah semua persiapan selesai dilakukan, tahap selanjutnya adalah tahap kultivasi. Pada tahap ini, mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dan medium yang telah divariasikan dimasukkan ke dalam fotobioraktor dimana perbandingan antara mikroalga dengan medium yang dimasukan adalah 1 : 2. *Optical density* awal dari tiap fotobioraktor harus sama, dalam penelitian ini disamakan sebesar 0.200 pada panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya, aliran gas karbon dioksida dijaga konstan pada konsentrasi 5% dari aliran udara yang dimasukkan. Sedangkan kecepatan superficial yang digunakan untuk kecepatan aliran udara masuk dalam reaktor adalah kecepatan superficial optimum, yaitu sekitar 5 – 6 L/menit.

Setelah semua kondisi operasi disesuaikan, kondisi tersebut dijaga untuk tetap konstan dan seragam agar variasi yang dilakukan dapat dibandingkan satu sama lain. Cara menjaga agar kondisi operasi tetap konstan adalah dengan pengambilan data setiap empat jam sekali. Data yang diambil adalah ODsel, pH, I_0 , I_{back} , dan konsentrasi CO_2 . Data yang paling penting digunakan adalah OD sel untuk mengetahui profil pertumbuhan sel mikroalga. Sedangkan data yang lain hanya sebagai data pendukung untuk menjaga kondisi operasi dalam keadaan konstan. Data pH digunakan untuk mengetahui kondisi keasaman fotobioreaktor. Pada pH 6-7, karbon dioksida dan air akan lebih membentuk asam bikarbonat dibandingkan asam karbonat. Sel mikroalga akan lebih mudah berasimilasi dengan asam bikarbonat dibandingkan asam karbonat. Data I_0 digunakan untuk menjaga cahaya yang masuk ke dalam fotobioreaktor dalam keadaan konstan dan data I_{back} untuk memastikan terjadinya pertumbuhan di dalam fotobioraktor. Data terakhir yang diambil adalah data konsentrasi gas CO_2 input. Data tersebut dianalisa dengan *Gas Chromatography* yang bertujuan untuk menjaga gas CO_2 input agar konstan pada angka 5% dari aliran udara masuk.



Gambar 4.3 Kultivasi mikroalga

Pengambilan data selanjutnya adalah pengujian kandungan essential yang ada. Pengambilan data kandungan baik lipid, protein maupun klorofil dilakukan selama 24 jam sekali. Hal tersebut dilakukan agar perubahan yang terjadi dari kandungan essential tersebut dapat terlihat. Dalam penelitian ini, pengambilan

data kandungan dibatasi hanya tiga kali pengambilan data yaitu pada jam ke 24, jam ke 48, dan jam ke 72 karena setelah melewati 72 jam profil pertumbuhan mikroalga sudah berada pada keadaan stationer bahkan sudah ada yang sampai menurun laju pertumbuhannya (*death phase*). Dengan perkataan lain, fungsi nutrisi nitrogen sebagai sumber nutrisi pertumbuhan sudah tidak ada lagi saat kondisi tersebut karena pertumbuhannya sudah menurun.

Pengujian kandungan lipid menggunakan metode *Bligh-Dyer*. Metode ini dipilih karena sangat sederhana dibandingkan metode ekstraksi lipid lainnya yang membutuh peralatan khusus seperti *sohxlet*, *pressurized*, *microwave assisted*, *supercritical fluid*, dll. Prinsip yang digunakan pada metode ini hanya gravimetri dimana terdapat dua lapisan yang akan terbentuk dan terpisah berdasarkan berat molekulnya. Pelarut yang digunakan adalah methanol untuk mengikat air yang polar dan *chloroform* untuk mengikat lipid yang non polar.



Gambar 4.4 Hasil pengujian lipid awal. Lapisan bawah adalah lipid dengan chloroform, sedangkan lapisan atas adalah air dengan methanol.

Hasil akhir yang didapatkan dari pengujian lipid adalah produk lipid yang bercampur dengan *chloroform*. Pemisahan lipid dari *chloroform* cukup dengan menguapkan *chloroform* yang bersifat sangat *volatile*.



Gambar 4.5. Hasil akhir pengujian lipid. Campuran lipid-chloroform telah dikeringkan chloroformnya sehingga yang tersisa hanya lipid.

Pengujian selanjutnya adalah pengujian klorofil dan protein. Untuk melakukan pengujian kandungan ini, dinding sel mikroalga dipecah terlebih dahulu dengan menggunakan prinsip getaran dari gelombang ultrasonic yang dikenal dengan metode sonikasi. Untuk mempercepat pemecahan dinding sel mikroalga digunakan *glass bead*. Pengujian klorofil dilakukan dengan menggunakan metode kelarutan. Klorofil mempunyai sifat hidrofilik sehingga klorofil dapat larut dalam pelarut nonpolar. Dalam penelitian ini, pelarut nonpolar yang digunakan adalah aseton. Menurut Roijackers (2005), pelarut aseton memiliki kelebihan dalam menghasilkan yield yang lebih besar dibandingkan methanol. Kelarutan klorofil dalam aseton tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 645 dan 663 nm. Untuk mendapatkan kandungan klorofil, absorbansi yang terukur tersebut dimasukkan ke dalam persamaannya.

Untuk menguji kandungan protein, metode yang digunakan adalah metode *Lowry*. Metode *Lowry* dipilih karena metode ini merupakan pengembangan dari metode biuret. Selain itu, metode *Lowry* lebih sensitive dibandingkan metode biuret (“Penetapan Kadar Protein dengan Metode *Lowry*”). Persiapan yang dibutuhkan pada metode *Lowry* cukup rumit karena perlu membuat kurva kalibrasi terlebih dahulu. Kurva kalibrasi yang dibuat adalah kurva antara kandungan protein standar dengan absorbansinya. Protein standar yang digunakan adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA). Persiapan selanjutnya adalah membuat larutan CuSO_4 Alkalin. Protein yang ada pada sel mikroalga akan terikat dengan

tembaga yang ada pada larutan CuSO_4 alkalin. Kemudian, tembaga-protein yang terbentuk akan menguraikan *folin phenol reagent* (asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat) menjadi molibdenum yang berwarna biru. Semakin banyak protein yang menguraikan maka semakin berwarna biru pula sampel yang dihasilkan. Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur absorbansi protein adalah 600 nm. Hasil pengujian kandungan protein dan klorofil tidak dapat langsung digunakan sebagai produk karena pengujian yang dilakukan bukanlah ekstraksi langsung melainkan hanya uji kualitatif dari protein dan klorofil sehingga hasil yang didapatkan masih bercampur dengan pelarut yang tergolong berbahaya bagi tubuh manusia.

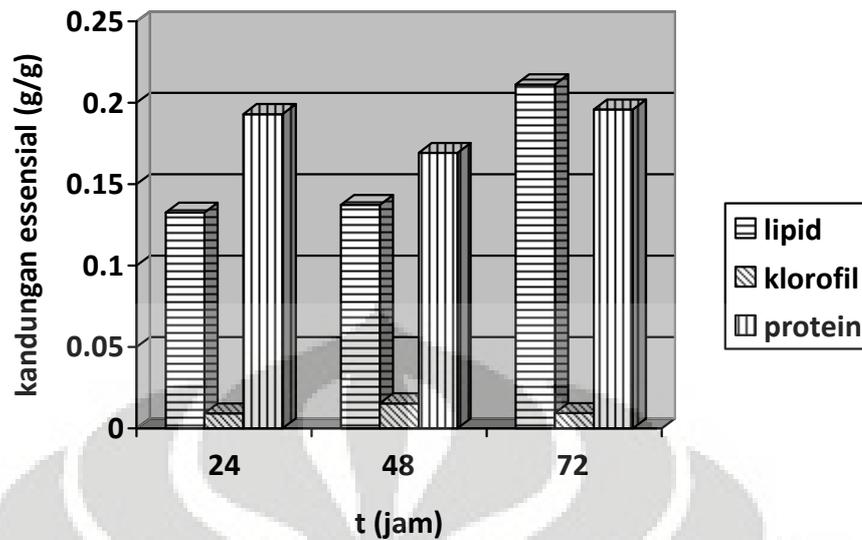
4.2. Pengaruh Nitrogen terhadap *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Pada bagian ini akan diberikan data hasil pengamatan yang diperoleh dari penelitian ini. Pengaruh nitrogen yang dilihat tersebut dipisahkan menjadi beberapa yaitu pengaruh terhadap pertumbuhan, kandungan lipid, kandungan klorofil, dan kandungan protein. Data yang diberikan terbagi menjadi dua yaitu dalam bentuk gambar dan bentuk angka atau perhitungan. Data gambar akan diberikan pada bab ini sedangkan data angka atau perhitungan akan diberikan pada bagian lampiran.

Pengaruh nitrogen tidak hanya dapat dilihat dari jumlah konsentrasinya dalam suatu medium tetapi juga jenis sumber nutrisi nitrogen yang digunakan. Berikut ini adalah hasil pengamatan kandungan esensial berdasarkan variasi nutrisi nitrogen yang digunakan.

Tabel 4.1 Komposisi kandungan esensial pada 3 mM NaNO_3

jam	kandungan esensial (mg/mg biomassa)		
	Lipid	klorofil	Protein
24	0.13	0.009	0.19
48	0.13	0.015	0.16
72	0.21	0.009	0.19

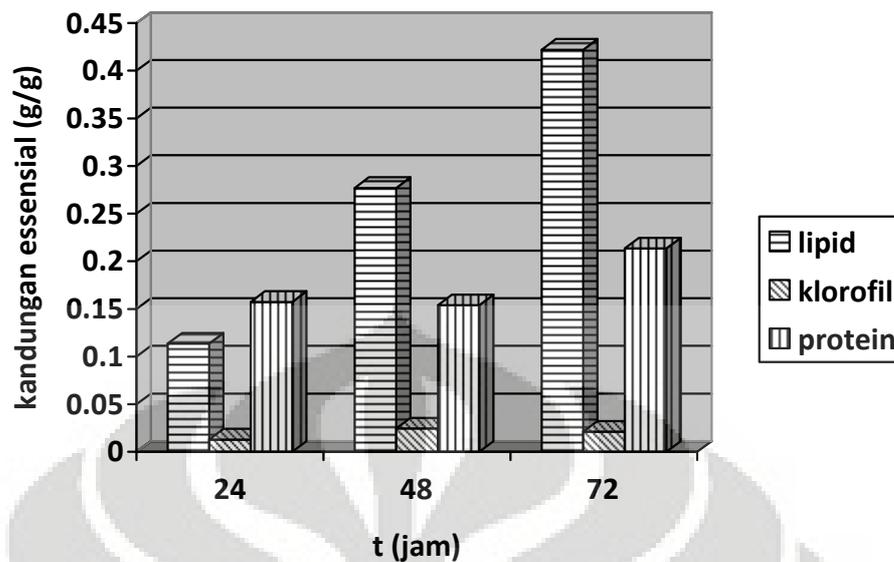


Gambar 4.6 Komposisi kandungan esensial biomassa pada 3 mM NaNO₃.

Berdasarkan Gambar 4.6 dapat diketahui bahwa kandungan protein yang dihasilkan oleh medium yang kekurangan nitrogen (3 mM NaNO₃) memiliki kecenderungan tetap. Sedangkan akumulasi lipid yang terjadi cenderung meningkat walaupun peningkatan yang terjadi tidak signifikan. Kandungan klorofil akan mengalami peningkatan pada jam ke-48 yang kemudian menurun. Peningkatan klorofil tersebut akan memaksa terjadinya penurunan kandungan protein yang dihasilkan.

Tabel 4.2 Komposisi kandungan esensial pada 6 mM NaNO₃

jam	kandungan esensial (mg/mg biomassa)		
	Lipid	klorofil	Protein
24	0.11	0.013	0.15
48	0.27	0.024	0.15
72	0.42	0.021	0.21

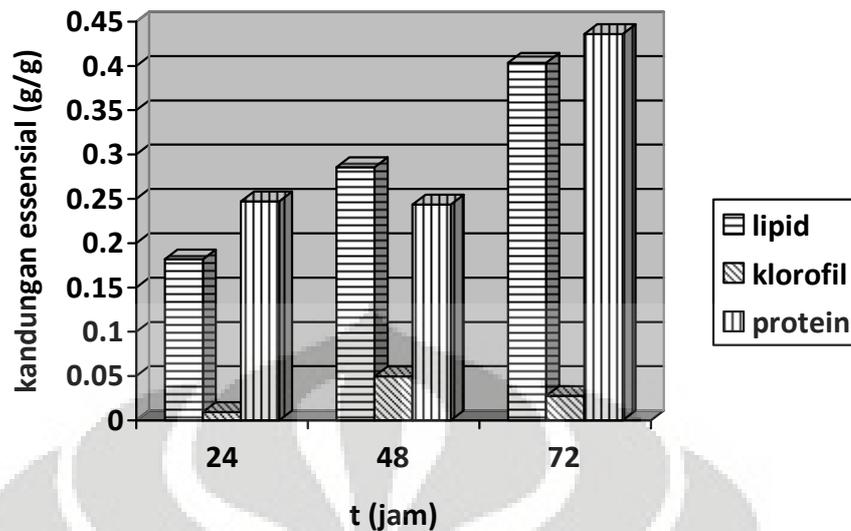


Gambar 4.7 Komposisi kandungan essential biomassa pada 6 mM NaNO₃.

Pada Gambar 4.7, akumulasi lipid pada biomassa yang dikultivasi dalam medium benneck dengan konsentrasi nitrogen normal (6 mM NaNO₃) terlihat lebih signifikan dibandingkan konsentrasi kekurangan nitrogen (3 mM NaNO₃). Bahkan, kandungan lipid yang dihasilkan dapat dikatakan paling besar dibandingkan medium lain. Sedangkan peningkatan klorofil menunjukkan kecenderungan yang sama dengan 3 mM NaNO₃, dimana terjadi pada jam ke-48 yang kemudian menurun pada 24 jam berikutnya. Peningkatan klorofil yang terjadi pada konsentrasi 6 mM NaNO₃ terlihat lebih signifikan. Kandungan protein yang dihasilkan menunjukkan kecenderungan yang sama dengan 3 mM dimana terjadi penurunan saat kandungan klorofil meningkat. Namun, kandungan protein yang dihasilkan memiliki kecenderungan peningkatan dibandingkan 3mM yang terlihat konstan.

Tabel 4.3 Komposisi kandungan essential pada 9 mM NaNO₃

Jam	kandungan essential (mg/mg biomassa)		
	Lipid	klorofil	Protein
24	0.18	0.009	0.24
48	0.28	0.049	0.24
72	0.40	0.027	0.43

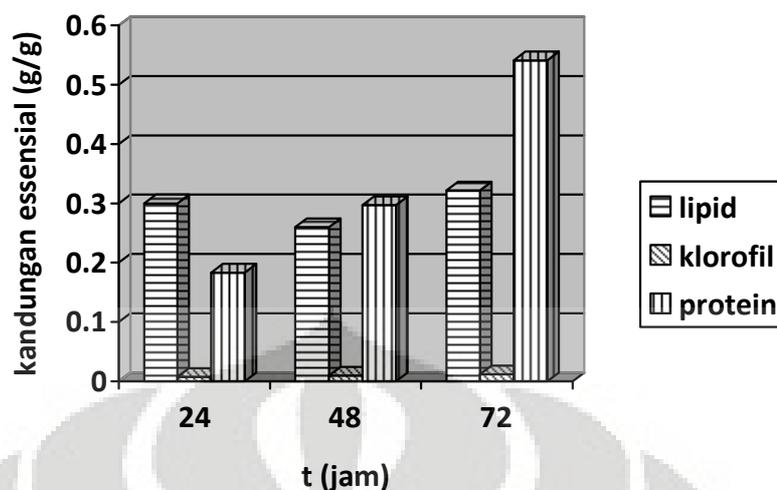


Gambar 4.8 Komposisi kandungan essential biomassa pada 9 mM NaNO₃.

Mikroalga yang dikultivasi dalam medium benneck dengan konsentrasi nitrogen yang berlebihan (9 mM NaNO₃) memiliki kecenderungan untuk meningkatkan kandungan lipid dan proteinnya. Kandungan protein yang dihasilkan jauh lebih banyak dibandingkan kandungan lipid. Kandungan klorofil yang dihasilkan juga meningkat. Saat terjadi peningkatan kandungan klorofil, kandungan protein menunjukkan penurunan. Hal itu ditunjukkan pula pada konsentrasi 3 mM dan 6 mM. Hal itu dikarenakan kloroplas hanya mampu membentuk klorofil sehingga pembentukan protein akan sedikit berkurang. Peningkatan kandungan klorofil, protein, dan lipid terlihat lebih signifikan walaupun kandungan lipid yang dihasilkan masih sedikit lebih rendah dibandingkan 6 mM NaNO₃.

Tabel 4.4 Komposisi kandungan essential pada urea

Jam	kandungan essential (mg/mg biomassa)		
	Lipid	klorofil	Protein
24	0.30	0.007	0.18
48	0.25	0.009	0.29
72	0.32	0.011	0.54

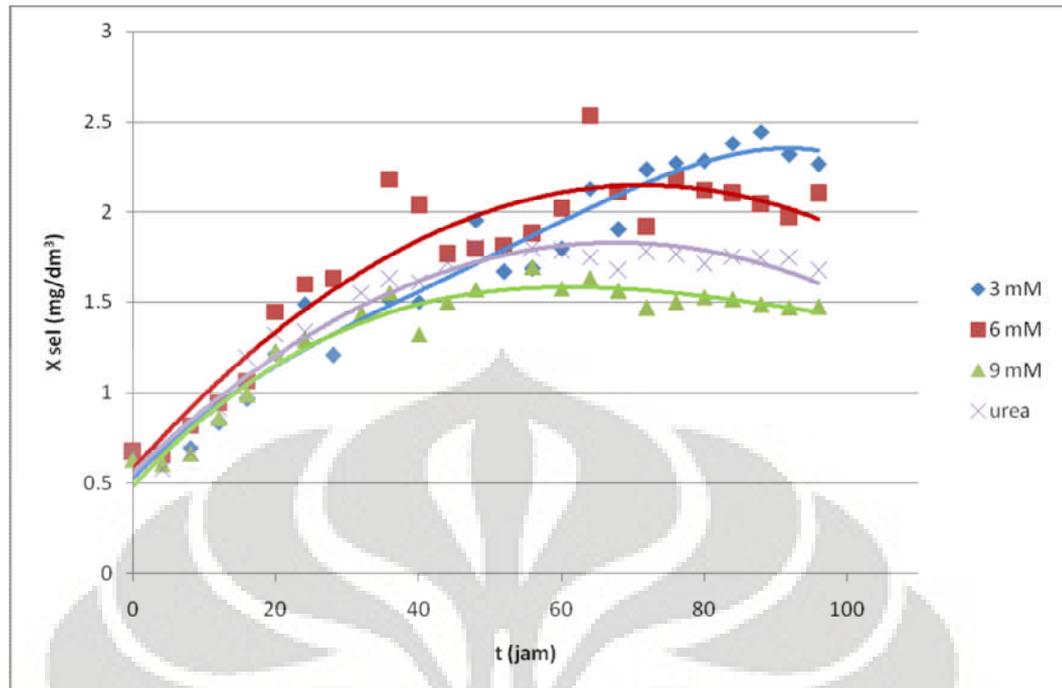


Gambar 4.9 Komposisi kandungan essential biomassa pada urea.

Pada saat diganti sumber nitrogennya dari NaNO_3 menjadi urea, kandungan lipid yang dihasilkan terlihat lebih konstan atau tetap. Sedangkan, peningkatan kandungan protein yang dihasilkan terlihat menunjukkan peningkatan yang sangat besar. Kandungan klorofil yang dihasilkan meningkat secara perlahan-lahan. Medium urea memiliki ion ammonium sehingga dapat diasimilasi langsung tanpa perlu dirubah terlebih dahulu. Hal tersebut membuat ATP dan NADPH_2 yang terbentuk pada proses fotosintesis dapat langsung digunakan seluruhnya dan senyawa organik seperti protein dapat dihasilkan lebih banyak. Pada medium yang menggunakan NaNO_3 sebagai sumber nutrisi nitrogennya, ATP dan NADPH_2 yang dihasilkan digunakan terlebih dahulu untuk merubah nitrat menjadi ammonium. Hal tersebut membuat perolehan proteinnya lebih kecil dibandingkan medium yang menggunakan urea. Penjabaran mengenai pengaruh nitrogen terhadap kandungan lipid, protein, dan klorofil serta biomassa akan lebih dijelaskan pada subbab-subbab berikut ini.

4.2.1. Pengaruh Nitrogen terhadap Biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Berikut ini adalah gambar hasil pengamatan pengaruh nitrogen terhadap biomassa kering mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.



Gambar 4.10 Pengaruh nitrogen terhadap profil pertumbuhan mikroalga.

Berdasarkan Gambar 4.10 dapat dilihat bahwa medium dengan konsentrasi nitrogen normal tanpa adanya perubahan (6 mM NaNO_3) merupakan medium pertumbuhan yang sangat baik karena berat kering sel yang diberikan memberikan hasil yang paling tinggi. Selain itu, pertumbuhan yang terjadi pada medium 6 mM NaNO_3 dapat dikatakan paling cepat dibandingkan medium yang lain.

Pada medium benneck yang kelebihan nitrogen (9 mM NaNO_3 dan urea), biomassa yang dihasilkan menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan kondisi normal (6 mM NaNO_3). Namun, biomassa yang dihasilkan oleh urea masih lebih besar dibandingkan 9 mM NaNO_3 . Hal itu dikarenakan energi yang digunakan untuk mengubah nitrat menjadi ammonium sehingga pertumbuhannya akan berkurang. Hal tersebut dapat terlihat dari persamaan 2.2 dimana perubahan nitrat membutuhkan energi berupa NADH. Sedangkan urea yang diubah untuk menjadi ammonium tidak membutuhkan energi dengan bantuan enzim urease (persamaan 2.4). Kalaupun tidak ada enzim urease, energi untuk mengubah urea menjadi ammonium hanyalah ATP yang tidak sebesar NADH dengan bantuan enzim urea amidolyase (persamaan 2.5). Namun, konsentrasi ammonium yang berlebihan tidak baik bagi pertumbuhan mikroalga. Hal itu dikarenakan kelebihan

ammonium dapat menjadi racun yang dapat menceraikan ATP (Salisbury & Ross, 1992) sehingga pertumbuhan yang dihasilkan tidak dapat melebihi kondisi medium benneck yang normal (6 mM NaNO₃)

Hasil pertumbuhan yang rendah pada kondisi kekurangan nitrogen (3 mM NaNO₃) dikarenakan konsentrasinya yang rendah. Saat terjadi kekurangan nutrisi nitrogen, pertumbuhan mikroalga akan melambat karena energi yang dihasilkan hanya dari hasil fotosintesis. Selain itu, konsentrasi ammonium yang terbentuk pada medium 3 mM sangat sedikit. Dengan konsentrasi ammonium yang sedikit akan membuat fungsi ammonium sebagai pencerai ATP tidak terjadi. Hal itu membuat pertumbuhannya terus meningkat dibandingkan 6 mM NaNO₃.

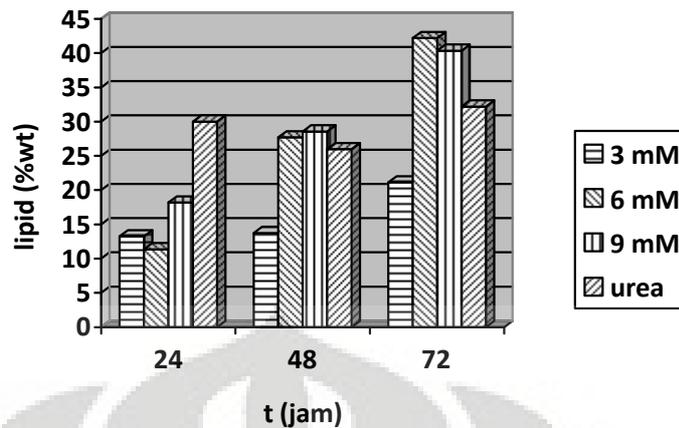
Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa medium benneck dengan kandungan nitrogen normal (6 mM NaNO₃) merupakan medium yang paling optimal untuk pertumbuhan. Jika konsentrasi diturunkan atau dinaikan dari kondisi optimalnya tersebut, pertumbuhan mikroalga akan menurun. Namun, medium tersebut masih memiliki kekurangan yaitu kelebihan ammonium yang membuat pertumbuhannya cepat mengalami *death phase*. Sedangkan medium dengan konsentrasi nitrogen yang kekurangan (3 mM NaNO₃) merupakan medium yang aman dari fungsi pencerai ATP tersebut. Namun, pertumbuhan yang diberikan lebih lambat dibandingkan kondisi normalnya (6 mM NaNO₃). Jadi, bentuk nutrisi nitrogen memberikan pengaruh terhadap jumlah biomassa *Chlorella vulgaris* dimana nitrogen dalam bentuk ammonium lebih mudah berasimilasi dibandingkan bentuk nitrat.

4.2.2. Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Lipid

Berikut ini adalah hasil penelitian pengaruh nitrogen terhadap kandungan lipid mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

Tabel 4.5 Kandungan lipid *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

jam	kandungan lipid (g lipid/g biomassa)			
	3 mM NaNO ₃	6 mM NaNO ₃	9 mN NaNO ₃	Urea
24	0.13	0.11	0.18	0.30
48	0.13	0.27	0.28	0.25
72	0.21	0.42	0.40	0.32



Gambar 4.11 Pengaruh nitrogen terhadap kandungan lipid mikroalga

Berdasarkan Gambar 4.11 terlihat bahwa pada mikroalga yang dikultivasi pada medium dengan sumber nutrisi nitrogen dari NaNO_3 akan terus meningkat. Sedangkan mikroalga yang dikultivasi dalam medium urea menunjukkan kecenderungan konstan. Hal tersebut dikarenakan kemampuan urea dalam berasimilasi. Berdasarkan persamaan reaksi 2.4, medium urea tidak membutuhkan energi untuk menghasilkan ammonium sehingga akumulasi lipid yang maksimal dapat langsung terjadi di dinding sel. Akumulasi lipid pada medium yang menggunakan urea sekitar 0.3 g/g biomassa. Namun, peningkatan akumulasi lipid tidak dapat terjadi lebih tinggi. Hal tersebut dikarenakan sel-sel mikroalga menggunakan energi yang ada untuk membentuk kandungan esensial yang lain seperti protein.

Pada medium benneck dengan konsentrasi nitrogen yang dikurangi (3 mM NaNO_3), peningkatan akumulasi lipid yang terjadi tidak begitu signifikan. Hasil akhir yang didapatkan selama kultivasi 72 jam hanya menghasilkan lipid sebesar 21%. Sedangkan medium benneck dengan konsentrasi nitrogen yang normal (6 mM NaNO_3) memberikan peningkatan signifikan, bahkan paling tinggi hingga mencapai 42%. Peningkatan kandungan lipid juga terjadi pada medium dengan konsentrasi nitrogen yang dilebihi (9 mM NaNO_3) hingga mencapai 40%. Jika dihubungkan dengan pertumbuhannya, kandungan lipid yang tinggi tersebut terjadi saat pertumbuhannya mulai menurun. Kecenderungan tersebut juga terjadi pada penelitian yang telah dilakukan oleh Yanqun Li, dkk (2008). Namun,

penurunan pertumbuhan yang terjadi pada medium yang kekurangan nitrogen (3 mM NaNO₃) bukan karena peningkatan kandungan lipid tetapi karena kekurangan nutrisi nitrogen.

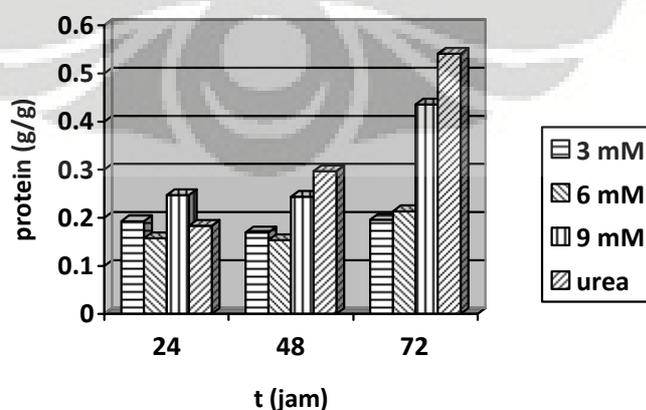
Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa nutrisi nitrogen yang baik untuk menghasilkan kandungan lipid yang tinggi adalah medium benneck dengan konsentrasi nitrogen normal tanpa adanya perubahan (6 mM NaNO₃). Peningkatan yang terjadi paling tinggi mencapai 42% pada jam ke-72 (sekitar 3 hari setelah kultivasi). Pengurangan konsentrasi nitrogen dari kondisi optimumnya tidak akan memberikan peningkatan kandungan lipid, begitu pula dengan penambahan konsentrasi nitrogen. Sedangkan medium benneck yang menggunakan urea sebagai sumber nitrogennya akan memberikan akumulasi lipid yang maksimal sejak awal kultivasi.

4.2.3. Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Protein

Berikut ini adalah hasil penelitian pengaruh nitrogen terhadap kandungan protein mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

Tabel 4.6 Kandungan Protein *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Jam	kandungan protein (g / g biomassa)			
	3 mM NaNO ₃	6 mM NaNO ₃	9 mM NaNO ₃	Urea
24	0.19	0.15	0.24	0.18
48	0.16	0.15	0.24	0.29
72	0.19	0.21	0.43	0.54



Gambar 4.12 Pengaruh nitrogen terhadap kandungan protein mikroalga

Dari Gambar 4.12 terlihat bahwa pada medium dengan konsentrasi nitrogen yang dikurangi (3 mM NaNO₃) menunjukkan kecenderungan kandungan protein yang tetap atau konstan yaitu sekitar 0.19 gram protein/gram biomassa. Hal itu dikarenakan nutrisi nitrogen yang dapat dibentuk menjadi protein sangat terbatas sehingga energi yang tersedia lebih digunakan untuk pertumbuhan dibandingkan membentuk protein. Begitu pula yang terjadi pada medium benneck dengan konsentrasi nitrogen yang normal (6 mM NaNO₃) dengan kandungan protein pada kisaran 0.15 g protein/g biomassa. Walaupun nutrisi nitrogennya lebih banyak, tetapi nutrisi nitrogen yang ada lebih digunakan pada pembentukan lipid. Namun, peningkatan kandungan protein terjadi walaupun sedikit hingga mencapai 0.21 g protein/g biomassa. Sedangkan pada medium yang dilebihi konsentrasi nitrogennya (9 mM NaNO₃), kandungan protein yang konstan hanya terjadi pada awal kultivasi yaitu mencapai 0.24 g protein/g biomassa. Hal tersebut dikarenakan proses perubahan nitrat menjadi ammonium yang membutuhkan energi, sesuai dengan persamaan 2.2. Dengan demikian, energi yang terbentuk pada awal kultivasi lebih digunakan untuk mengubah nitrat menjadi ammonium dibandingkan untuk membentuk protein. Akan tetapi, setelah nitrat diubah menjadi ammonium akan membuat kandungan proteinnya meningkat. Hal itulah yang terjadi pada medium yang kelebihan nitrogen (9 mM NaNO₃) jam ke-78 dengan kandungan protein mencapai 0.43 g protein/g biomassa. Pada medium yang menggunakan NaNO₃ sebagai sumber nitrogen akan terjadi sedikit penurunan kandungan protein pada jam ke-48. Pada waktu tersebut, peningkatan kandungan klorofil terjadi. Dengan demikian, pembentukan klorofil dan protein saling berkaitan dimana sel mikroalga tidak dapat membentuk kedua-duanya secara bersamaan sehingga saat salah satu kandungan, baik protein atau klorofil, meningkat akan membuat salah satunya menurun.

Pada medium benneck yang menggunakan urea sebagai sumber nitrogen menunjukkan kecenderungan kandungan protein yang terus meningkat. Semakin banyak nutrisi nitrogen yang diberikan akan membuat kandungan protein yang terbentuk semakin banyak. Hal tersebut dikarenakan nitrogen merupakan salah satu unsur pembentuk protein yang sangat penting. Berdasarkan persamaan 2.4,

medium yang menggunakan urea dapat langsung berubah menjadi ammonium sehingga dapat lebih mudah berasimilasi dengan mikroalga. Hal tersebut membuat kandungan protein yang terjadi tidak mengalami kondisi konstan seperti medium nitrat melainkan peningkatan yang terus-menerus. Peningkatan kandungan protein yang terjadi pada medium urea mencapai 0.54 g protein/g biomassa.

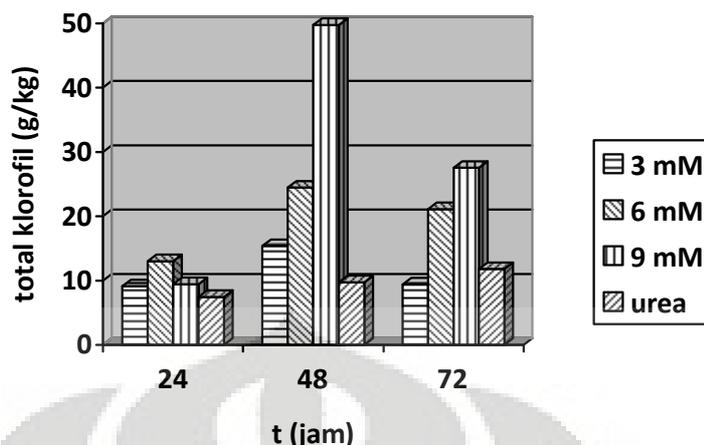
Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa medium yang menggunakan urea merupakan medium yang paling tepat digunakan jika mikroalga dimanfaatkan sebagai sumber makanan tambahan. Sedangkan medium yang menggunakan sumber nutrisi nitrogen NaNO_3 tidak begitu cocok digunakan karena energi yang terbentuk akan dipakai terlebih dahulu untuk mengubah nitrat menjadi ammonium dibandingkan untuk mensintesis protein. Selain itu, semakin banyak nutrisi nitrogen yang diberikan akan menghasilkan kandungan protein yang semakin banyak pula. Hal tersebut dikarenakan peran dari nitrogen sebagai salah satu unsur pembentuk protein. Jadi pengaruh nitrogen terhadap kandungan protein adalah, semakin besar konsentrasi nutrisi nitrogen yang diberikan akan menghasilkan kandungan protein yang semakin besar pula.

4.2.4. Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan Klorofil

Berikut ini adalah hasil penelitian pengaruh nitrogen terhadap kandungan klorofil mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg.

Tabel 4.7 Kandungan klorofil *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

jam	total klorofil (g / 100g biomassa)			
	3 mM NaNO_3	6 mM NaNO_3	9 mM NaNO_3	Urea
24	0.9	1.3	0.9	0.7
48	1.5	2.4	4.9	0.9
72	0.9	2.1	2.7	1.1



Gambar 4.13 Pengaruh nitrogen terhadap kandungan klorofil mikroalga

Berdasarkan Gambar 4.13 terlihat bahwa pada medium yang menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen mengalami peningkatan kandungan klorofil di jam ke-48. Jika dihubungkan dengan pertumbuhannya, peningkatan kandungan klorofil tersebut terjadi pada saat pertumbuhan yang maksimal. Hal tersebut dikarenakan pada pertumbuhan yang maksimal tersebut membutuhkan energi yang besar sehingga kloroplas perlu mengubah banyak energi cahaya menjadi energi kimia. Dan hal tersebut dapat terjadi jika klorofil sebagai penyerap energi cahaya ada dalam jumlah yang banyak. Semakin bekerjanya bagian kloroplas, semakin banyak pula klorofil yang dibutuhkan untuk menyerap energi cahaya. Dengan demikian, klorofil yang dibutuhkan akan semakin banyak. Pada medium yang kekurangan nitrogen (3 mM NaNO_3), peningkatan kandungan klorofil yang terjadi tidak begitu signifikan hanya mencapai 1.5 g/100g biomassa. Namun, peningkatan yang terjadi masih lebih rendah dibandingkan pada medium benneck dengan konsentrasi nitrogen normal (6 mM NaNO_3) yang mencapai 2.4 g/100g biomassa. Peningkatan kandungan klorofil yang paling maksimal dicapai oleh medium yang kelebihan nitrogen (9 mM NaNO_3) hingga mencapai 4.9 g/100g biomassa. Jika dihubungkan dengan kandungan protein yang terbentuk, peningkatan kandungan klorofil tersebut diikuti dengan penurunan kandungan protein. Dengan perkataan lain, sel-sel mikroalga yang ada hanya dapat meningkatkan salah satu kandungan saja baik itu protein ataupun klorofil. Hal

tersebut dikarenakan proses pembentukan klorofil dan sebagian protein ada di kloroplas sehingga saat kloroplas membentuk protein maka pembentukan klorofil akan berkurang, begitu pula sebaliknya.

Pada medium yang menggunakan urea sebagai sumber nitrogen, kandungan klorofil yang dihasilkan menunjukkan kecenderungan untuk selalu meningkat walaupun peningkatan yang terjadi hanya sedikit demi sedikit. Medium yang menggunakan urea lebih mudah berasimilasi dengan mikroalga. Selain itu, nutrisi nitrogen yang ada pada medium urea paling besar dibandingkan medium yang lain yaitu sekitar 230 mg nitrogen/Liter medium. Hal tersebut akan membuat kerja kloroplas tidak maksimal karena tidak ada paksaan untuk menghasilkan energi yang lebih besar. Dengan demikian, klorofil yang terbentuk hanya sedikit. Kandungan klorofil yang terbentuk mengalami peningkatan yang sedikit dari 0.7 g/100g biomassa menjadi hanya 1.1 g/100g biomassa. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa medium yang paling tepat digunakan untuk meningkatkan kandungan klorofil mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg adalah medium dengan konsentrasi nitrogen yang berlebihan (9 mM NaNO₃). Peningkatan yang paling tinggi tersebut dicapai pada saat jam ke 48 atau saat pertumbuhan yang maksimal. Jika konsentrasi nitrogen dikurangi, peningkatan kandungan klorofil juga akan terjadi meskipun tidak cukup banyak. Sedangkan perubahan sumber nutrisi dari bentuk nitrat menjadi urea tidak baik untuk menghasilkan klorofil karena klorofil yang terbentuk sangat sedikit. Jadi pengaruh nitrogen terhadap kandungan klorofil adalah, medium nitrat akan meningkatkan kandungan klorofil pada saat pertumbuhan maksimal dan semakin besar konsentrasi yang diberikan akan memberikan peningkatan yang semakin besar pula.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa kesimpulan yang dapat diambil. Diantaranya adalah:

- Medium benneck dengan konsentrasi NaNO_3 normal (6 mM NaNO_3) merupakan media yang paling baik untuk produksi biomassa *Chlorella vulgaris*.
- Medium benneck dengan konsentrasi NaNO_3 normal (6 mM NaNO_3) memberikan akumulasi lipid paling banyak sekitar 0.42 g/g biomassa dibandingkan medium lainnya.
- Semakin besar konsentrasi NaNO_3 akan memberikan hasil protein yang semakin besar hingga mencapai 0.4 g/g biomassa (untuk konsentrasi 9 mM NaNO_3). Begitu pula dengan kandungan klorofilnya yang mencapai 4.9 g/100g biomassa.
- Saat diubah sumber nitrogennya menjadi urea, akumulasi lipid langsung berada pada jumlah maksimalnya, yaitu sekitar 0.3 g/g biomassa.
- Sumber nitrogen urea dapat memproduksi protein paling besar dengan jumlah sekitar jumlah sekitar 0.54 g/g biomassa tetapi memberikan hasil klorofil yang kecil yaitu hanya sekitar 1 g/100g biomassa.

5.2. Saran

Pada penelitian selanjutnya diharapkan adanya pengembangan mengenai nutrisi yang diberikan. Nutrisi yang ditinjau pada penelitian ini hanyalah nutrisi nitrogen. Padahal, nutrisi-nutrisi makro dan mikro yang lain juga sangat berpengaruh bagi mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg baik dari segi pertumbuhan maupun kandungan esensial yang akan terbentuk. Dengan demikian, pemanfaatan mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg dapat lebih dioptimalkan lagi.

DAFTAR PUSTAKA

- Andika, Sang Made Kresna. (2005). Skripsi : "*Peningkatan Produksi Biomassa Chlorella vulgaris Buitenzorg Dengan Alterasi Pencahayaan Dalam Fotobioreaktor Kolom Gelembung*". Depok : Departemen Teknik Gas dan Petrokimia Universitas Indonesia.
- Anonim. (n.d.). *Beberapa Manfaat Klorofil*. 15 Mei 2009. <http://hijaudaun.viviti.com/entries/general/beberapa-manfaat-klorofil>
- Anonim. (n.d.). *Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry*. 15 Juni 2009. <http://yissaprayogo.wordpress.com/2010/05/04/penetapan-kadar-protein-dengan-metode-lowry-protein-concentration-determination-by-lowry-method/>
- Anonim. (n.d.). *Udara*. 28 April 2009. <http://id.wikipedia.org/wiki/udara>
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). *A rapid method for total lipid extraction and purification*. Can.J.Biochem.Physiol. 37:911-917
- Converti, Attilio. Alessandro A Casazza. Erika Y Ortiz. Patricia Perego. Marco Del Borghi. (2009). *Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production*. Chemical Engineering and Processing, vol 48 pp: 1146–1151
- Evans, Christopher T. and Colin Ratledge. (1983). *Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeast*. Journal of General Microbiology vol 130 pp:1693-1704.

Garlington, Victor. (2009). *Top 3 Reasons Why Algae Is The New Biofuel*. 15 Mei 2009. <http://www.70centsagallon.com/subpage6.html>

Gouveia, Luisa dan Ana Cristina Oliveira. (2008). *Microalgae as a raw material for biofuels production*. Journal Industrial Microbiology and Biotechnology Vol 36 pp:269-274.

Graham, Linda E, and Lee W. Wilcox. (2000). *Algae*. Upper Saddle River: Prentice-Hall, Inc

Hodson, Robert C. and John F. Thompson. (1969). *Metabolism of Urea by Chlorella vulgaris*. Plant Physiol. 44:691-696

Leftley, J.W. and P.J. Syrett. (1973). *Urease and ATP: Urea Amidolyase Activity in Unicellular Algae*. Journal of General Microbiology. 77:109-115

Lewaru, Muhammad Wahyudin. (2008). *Pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh pada media kultur PHM terhadap kandungan protein Chlorella sp.* Program Studi Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan :Universitas Padjadjaran Bandung

Prihantini, Nining Betawati. (2007). *Laporan Riset Unggulan FMIPA UI. "Pemanfaatan Medium Ekstrak Tauge (MET) Untuk Menghasilkan Biomassa Chlorella sp. Dan Scenedesmus sp. Dengan Kandungan Protein dan Klorofil yang Tinggi"*. Depok : Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Indonesia.

Richmond, Amos. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. Iowa. USA

- Roijackers, R.M.M. (2005). *A Comparison Between Two Method of Extracting Chlorophyll-a from Different Phytoplankton Samples*. *Aquatic Ecology Journal*. 15:179-183
- Salisbury, Frank B., dan Cleon W. Ross. (1992). *Plant Physiology*, 4th edition. Colorado: Wadsworth Publishing Co.
- Sheehan, J., T.G. Dunahay, dkk. (1998). *Technical Report : "A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program : Biodiesel from Algae"*. Colorado : U.S. Department of Energy.
- Suriawiria, Unus. (2005). *Chlorella Untuk Kesehatan dan Kebugaran*. Jakarta : Papas Sinar Sinanti.
- Weldy, Chad Share and Michael Huesemann. (2007). *Lipid Production by Dunaliella Salina in Batch Culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity*. U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research
- Widjaja, Arief, Chao-Chang Chien, dan Yi-Hsu Ju. (2008). *Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* Vol 40 pp:13-20.
- Wijanarko, A dan K. Ohtaguchi. (2004). *Carbon Dioxide Utilization for Global Sustainability : Reactor in series approximation, an enhancement effort of CO2 fixation and biomass production by Anabaena cylindrica*. *Study in Surface Science and Catalysis* Vol 153 pp:461-468.
- Yanqun Li, Mark Horsman, Bei Wang, Nan Wu, and Christopher Q Lan. (2008). *Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga Neochloris oleoabundans*. *Applications of Microbiology and Biotechnology* Vol 81 pp:629-636.

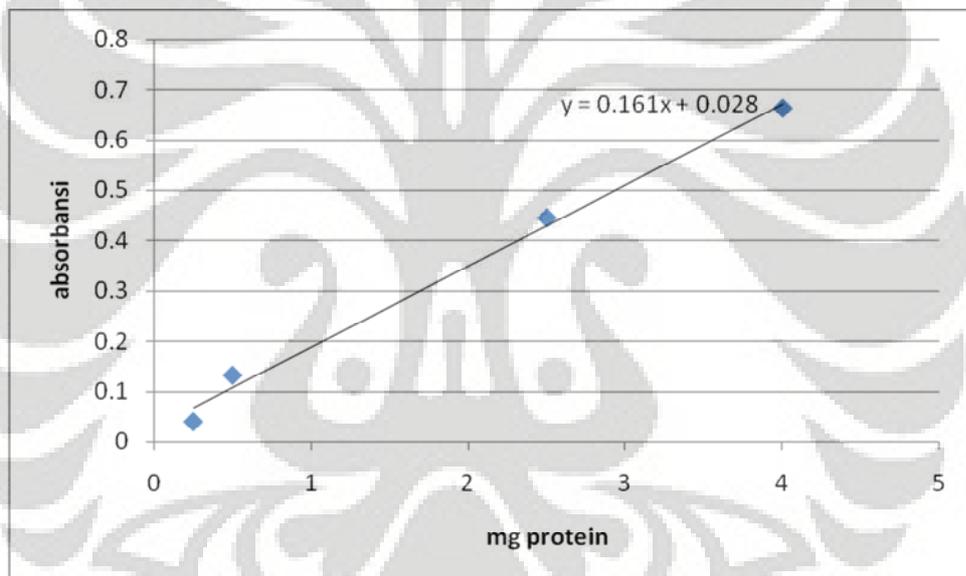
LAMPIRAN

Lampiran A. Kalibrasi protein

Tabel A. Kalibrasi Protein

mg BSA	Absorbansi
4	0.663
2.5	0.445
0.5	0.132
0.25	0.041

Gambar A. Kurva kalibrasi Protein



Lampiran B. Perhitungan konsentrasi nitrogen dalam variasi medium

B.1 Konsentrasi nitrogen dalam medium benneck.

Dik: berat molekul $\text{NaNO}_3 = 85$

- Konsentrasi nitrat dalam 500 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{NaNO}_3} = (\text{gram/mr})/\text{L} = (500\text{mg}/85)/1 \text{ Liter} = 6 \text{ mM}$$

- Konsentrasi nitrogen dalam 500 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{nitrogen}} = (\text{ar/mr}) \times 500 \text{ mg/L} = (14/85) \times 500 \text{ mg/L} = 82 \text{ mg/L}$$

B.2 Konsentrasi nitrogen dalam medium benneck yang dikurangi nitrogen.

Dik: berat molekul $\text{NaNO}_3 = 85$

- Konsentrasi nitrat dalam 250 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{NaNO}_3} = (\text{gram/mr})/\text{L} = (250\text{mg}/85)/1 \text{ Liter} = 3 \text{ mM}$$

- Konsentrasi nitrogen dalam 250 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{nitrogen}} = (\text{ar/mr}) \times 250 \text{ mg/L} = (14/85) \times 250 \text{ mg/L} = 41 \text{ mg/L}$$

B.3 Konsentrasi nitrogen dalam medium benneck yang dilebihi nitrogen.

Dik: berat molekul $\text{NaNO}_3 = 85$

- Konsentrasi nitrat dalam 750 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{NaNO}_3} = (\text{gram/mr})/\text{L} = (750\text{mg}/85)/1 \text{ Liter} = 9 \text{ mM}$$

- Konsentrasi nitrogen dalam 750 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{nitrogen}} = (\text{ar/mr}) \times 750 \text{ mg/L} = (14/85) \times 750 \text{ mg/L} = 123 \text{ mg/L}$$

B.4 Konsentrasi nitrogen dalam medium benneck yang nitrogennya diubah menjadi urea.

Dik: berat molekul $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 = 60$

- Konsentrasi urea dalam 500 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{NaNO}_3} = (\text{gram/mr})/\text{L} = (500\text{mg}/60)/1 \text{ Liter} = 8 \text{ mM}$$

- Konsentrasi nitrogen dalam 500 mg per Liter adalah:

$$M_{\text{nitrogen}} = (\text{ar/mr}) \times 500 \text{ mg/L} = (28/60) \times 500 \text{ mg/L} = 233 \text{ mg/L}$$

Lampiran C. Data pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Tabel C.1 Data pertumbuhan mikroalga dalam medium 3 mM dan 6 mM NaNO₃

jam	3 mM NaNO ₃				6 mM NaNO ₃			
	OD600	μ	X _{sel} (mg/dm ³)	pH	OD600	μ	X _{sel} (mg/dm ³)	pH
0	0.201667	0	0.654968	6.53	0.206667	0	0.671799	6.41
4	0.203	0.001647	0.659457	6.11	0.201667	-0.00612	0.654968	6.57
8	0.212	0.006246	0.689752	6.56	0.251	0.024127	0.819912	6.59
12	0.255	0.019554	0.834499	6.42	0.288	0.024127	0.944462	6.54
16	0.294	0.02356	0.965781	6.22	0.323	0.027974	1.064523	6.13
20	0.368	0.030073	1.21488	6.58	0.436667	0.037403	1.446025	6.34
24	0.448667	0.033319	1.48642	6.69	0.483333	0.0354	1.603115	6.69
28	0.365333	0.021221	1.205903	6.23	0.491333	0.030929	1.630044	6.5
36	0.455333	0.022623	1.508861	6.76	0.655	0.032042	2.180979	6.68
40	0.452667	0.020213	1.499885	6.54	0.612	0.027141	2.036232	6.74
44	0.534667	0.02216	1.775913	7.02	0.532	0.021489	1.766936	6.82
48	0.587333	0.02227	1.953199	6.85	0.541333	0.020061	1.798354	6.93
52	0.503	0.017576	1.669317	6.91	0.547	0.018718	1.817429	6.79
56	0.509	0.016533	1.689514	6.93	0.565	0.017959	1.878021	6.8
60	0.541	0.016447	1.797232	6.7	0.606	0.01793	2.016035	6.73
64	0.639	0.01802	2.12712	6.74	0.759	0.020326	2.531064	6.82
68	0.573	0.015357	1.904951	6.76	0.633	0.016461	2.106923	6.98
72	0.67	0.016676	2.231472	7.19	0.576	0.014236	1.915049	6.87
76	0.682	0.016032	2.271866	6.4	0.652	0.015118	2.17088	6.96
80	0.684	0.015267	2.278599	6.47	0.637	0.014071	2.120387	6.91
84	0.714	0.015051	2.379585	6.38	0.631	0.013288	2.10019	7.01
88	0.733	0.014665	2.443543	7.12	0.613	0.012355	2.039599	7.19
92	0.695	0.013449	2.315627	7.39	0.592	0.011439	1.968908	7.32
96	0.679	0.012646	2.261768	6.94	0.631	0.011627	2.10019	7.18

Tabel C.2 Data pertumbuhan mikroalga dalam medium 6 mM NaNO₃

jam	9 mM NaNO ₃				Urea			
	OD600	μ	X _{sel} (mg/dm ³)	pH	OD600	μ	X _{sel} (mg/dm ³)	pH
0	0.195	0	0.632527	7.38	0.205	0	0.666189	6.76
4	0.187333	-0.01003	0.606719	7.13	0.179333	-0.03344	0.57979	7.21
8	0.204333	0.005844	0.663945	6.99	0.206	0.000608	0.669555	7.08
12	0.263	0.02493	0.861429	7.22	0.279333	0.025783	0.91641	7.18
16	0.300667	0.027063	0.988222	6.78	0.359333	0.035078	1.185706	7.17
20	0.370667	0.032115	1.223856	6.95	0.399333	0.033339	1.320354	7.12
24	0.39	0.028881	1.288936	7.06	0.402	0.02806	1.32933	6.91
32	0.432	0.024857	1.430316	7.12	0.468667	0.02584	1.553744	6.82
36	0.468667	0.024358	1.553744	6.61	0.490667	0.024243	1.6278	6.89
40	0.399333	0.01792	1.320354	6.36	0.486667	0.021614	1.614335	6.62
44	0.452667	0.01914	1.499885	6.87	0.517333	0.021038	1.717565	7.14
48	0.474	0.018504	1.571697	6.87	0.545333	0.020383	1.811819	6.85
56	0.511333	0.017215	1.697368	6.9	0.540667	0.017318	1.79611	6.92
60	0.476	0.014874	1.578429	6.95	0.536667	0.017185	1.782645	7
64	0.494	0.014524	1.639021	6.86	0.527333	0.015747	1.751227	6.84
68	0.471333	0.012979	1.56272	6.79	0.505333	0.014097	1.677171	6.92
72	0.443333	0.011407	1.468467	6.75	0.535333	0.014116	1.778157	6.72
76	0.452	0.011062	1.49764	6.8	0.532667	0.013262	1.769181	7.06
80	0.461333	0.010764	1.529058	6.72	0.516	0.012146	1.713077	7.01
84	0.457333	0.010148	1.515593	6.68	0.529333	0.011858	1.75796	7.03
88	0.448667	0.009469	1.48642	6.98	0.527333	0.011248	1.751227	7.05
92	0.444	0.008944	1.470711	6.73	0.527333	0.010737	1.751227	6.91
96	0.445333	0.008602	1.475199	6.62	0.505333	0.009807	1.677171	6.85

Lampiran D. Biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Tabel D.1 Data biomassa kering mikroalga dalam medium 3 mM dan 6 mM NaNO₃

Jam	3 mM NaNO ₃					6 mM NaNO ₃				
	Kosong	isi	mg	mg avg	g/L	kosong	Isi	mg	mg avg	g/L
24	29.3627	29.3664	3.7	4.15	0.415	43.7203	43.7252	4.9	4.4	0.44
	48.4692	48.4738	4.6			46.6299	46.6338	3.9		
48	29.4537	29.4566	2.9	2.55	0.255	24.5127	24.516	3.3	3.25	0.325
	23.8451	23.8473	2.2			25.7197	25.7229	3.2		
72	24.5125	24.5161	3.6	3.55	0.355	23.8453	23.8476	2.3	3.2	0.32
	25.7197	25.7232	3.5			29.4534	29.4575	4.1		

Tabel D.2 Data biomassa kering mikroalga dalam medium 9 mM NaNO₃ dan urea

Jam	9 mM NaNO ₃					Urea				
	kosong	isi	mg	mg avg	g/L	kosong	Isi	mg	mg avg	g/L
24	24.5117	24.5143	2.6	2.2	0.22	23.431	23.4335	2.5	3	0.3
	25.7187	25.7205	1.8			23.8422	23.8457	3.5		
48	23.4312	23.435	3.8	3.85	0.385	25.7188	25.7224	3.6	3.85	0.385
	24.512	24.5159	3.9			23.8423	23.8464	4.1		
72	25.719	25.7219	2.9	2.85	0.285	23.8419	23.8447	2.8	2.95	0.295
	29.4539	29.4567	2.8			23.4309	23.434	3.1		

Lampiran E. Kandungan lipid mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Tabel E.1 Data kandungan lipid mikroalga dalam medium 3 mM dan 6 mM NaNO₃

Jam	3 mM NaNO ₃					6 mM NaNO ₃				
	kosong	isi	mg	mg avg	% wt	kosong	isi	mg	mg avg	% wt
24	23.8432	23.8437	0.5	0.55	13.25301	25.7193	25.7197	0.4	0.5	11.36364
	29.4537	29.4543	0.6			24.5121	24.5127	0.6		
48	29.4538	29.454	0.2	0.35	13.72549	23.845	23.8457	0.7	0.9	27.69231
	25.7197	25.7202	0.5			24.5126	24.5137	1.1		
72	25.7196	25.7203	0.7	0.75	21.12676	29.4533	29.4546	1.3	1.35	42.1875
	24.5124	24.5132	0.8			23.8436	23.845	1.4		

Tabel E.2 Data kandungan lipid mikroalga dalam medium 9 mM NaNO₃ dan urea

Jam	9 mM NaNO ₃					Urea				
	kosong	isi	mg	mg avg	% wt	kosong	isi	mg	mg avg	% wt
24	23.8419	23.8424	0.5	0.4	18.18182	24.512	24.5129	0.9	0.9	30
	23.4311	23.4314	0.3			25.7185	25.7194	0.9		
48	23.4312	23.432	0.8	1.1	28.57143	24.5123	24.5131	0.8	1	25.97403
	23.842	23.8434	1.4			25.7182	25.7194	1.2		
72	29.4537	29.4543	0.6	1.15	40.35088	25.7186	25.7195	0.9	0.95	32.20339
	23.4304	23.4321	1.7			23.842	23.843	1		

Lampiran F. Kandungan klorofil mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Tabel F.1 Data kandungan klorofil mikroalga dalam medium 3 mM NaNO₃

jam	3 mM NaNO ₃					6 mM NaNO ₃				
	Abs 645	Abs 663	klorofil a (g/kg)	klorofil b (g/kg)	total klorofil (g/kg)	Abs 645	Abs 663	klorofil a (g/kg)	klorofil b (g/kg)	total klorofil (g/kg)
24	0.106	0.156	4.7073	4.4327	9.14	0.267	0.364	6.3083	6.7360	13.04
	0.127	0.201				0.096	0.15			
48	0.035	0.091	1.8425	13.5515	15.39	0.147	0.347	17.0139	7.5074	24.52
	0.296	0.0531				0.26	0.61			
72	0.105	0.212	5.9645	3.4390	9.40	0.315	0.637	13.6463	7.5139	21.16
	0.077	0.16				0.05	0.128			

Tabel F.2 Data kandungan klorofil mikroalga dalam medium 9 mM NaNO₃ dan urea

jam	9 mM NaNO ₃					Urea				
	Abs 645	Abs 663	klorofil a (g/kg)	klorofil b (g/kg)	total klorofil (g/kg)	Abs 645	Abs 663	klorofil a (g/kg)	klorofil b (g/kg)	total klorofil (g/kg)
24	0.065	0.136	6.5328	2.9430	9.47	0.053	0.13	5.2930	2.1939	7.48
	0.042	0.113				0.06	0.144			
48	0.504	1.118	33.3580	16.5041	49.86	0.105	0.203	5.9627	3.7989	9.76
	0.504	1.118				0.105	0.203			
72	0.065	0.122	19.3775	8.2239	27.60	0.106	0.196	7.5286	4.3074	11.83
	0.333	0.832				0.084	0.194			

Lampiran G. Kandungan klorofil mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg

Tabel G.1 Data kandungan protein mikroalga dalam medium 3 mM dan 6 mM NaNO₃

jam	3 mM NaNO ₃				6 mM NaNO ₃			
	Abs 600	Protein (g)	Protein avg (g)	g/g biomassa	Abs 600	Protein (g)	Protein avg (g)	g/g biomassa
24	0.119	0.5652	0.8012	0.1930	0.124	0.5962	0.6925	0.1573
	0.195	1.0372			0.155	0.7888		
48	0.096	0.4223	0.4316	0.1692	0.111	0.5155	0.5000	0.1538
	0.099	0.4409			0.106	0.4844		
72	0.167	0.8633	0.6956	0.1959	0.149	0.7515	0.6832	0.2135
	0.113	0.5279			0.127	0.6149		

Tabel G.2 Data kandungan protein mikroalga dalam medium 9 mM NaNO₃ dan urea

jam	9 mM NaNO ₃				Urea			
	Abs 600	Protein (g)	Protein avg (g)	g/g biomassa	Abs 600	Protein (g)	Protein avg (g)	g/g biomassa
24	0.129	0.6273	0.5434	0.2470	0.119	0.5652	0.5496	0.1832
	0.102	0.4596			0.114	0.5341		
48	0.179	0.9378	0.9378	0.2436	0.212	1.1428	1.1428	0.2968
	0.179	0.9378			0.212	1.1428		
72	0.233	1.2732	1.2422	0.4358	0.31	1.7515	1.5962	0.5411
	0.223	1.2111			0.26	1.4409		