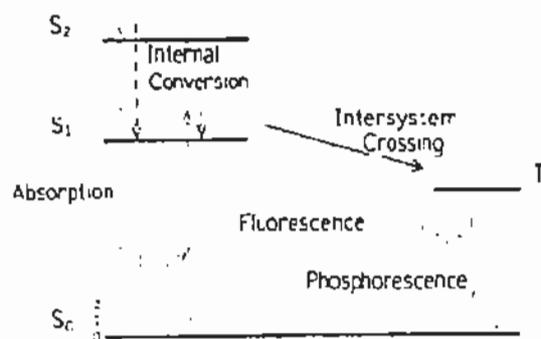


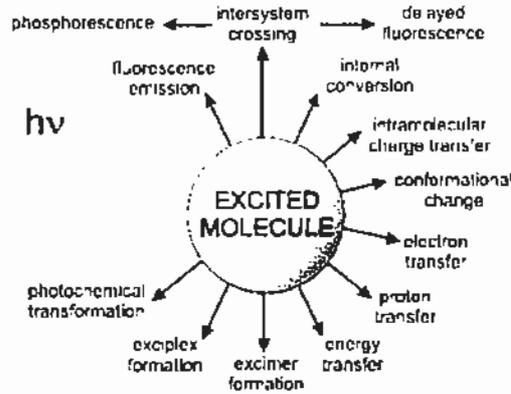
## BAB II LANDASAN TEORI

### 2.1 Prinsip Fluoresensi

Fluoresensi adalah proses emisi cahaya akibat eksitasi suatu sumber cahaya yang berenergi tinggi pada suatu atom atau molekul. Emisi cahaya terjadi akibat adanya proses absorpsi energi cahaya dari atom sehingga mengakibatkan terjadinya kondisi eksitasi atom dan selanjutnya kembali ke kondisi semula dengan mengemisikan energi cahaya (de-eksitasi). Proses fluoresensi merupakan proses transisi tingkat energi atom atau molekul secara elektronik dari keadaan tereksitasi (*excited states*) menuju keadaan dasar (*ground states*). Ilustrasi sederhana transisi tersebut bisa dijelaskan pada diagram Jablonski sebagaimana pada Gambar 2.1. Jika suatu atom atau molekul mengabsorpsi energi cahaya sebesar  $h\nu_A$  maka elektron-elektron pada  $S_0$  akan bertransisi ke tingkat energi yang lebih tinggi yakni  $S_1$  atau  $S_2$ . Waktu yang dibutuhkan untuk proses tersebut adalah kurang dari 1ps. Pada kondisi  $S_1$ , atom akan mengalami konversi internal atau relaksasi dalam waktu yang sangat singkat yakni sekitar 0,1ns. Setelah itu atom-atom akan kembali menuju ke tingkat energi dasar  $S_0$  untuk mencapai keadaan suhu yang setimbang (*thermally equilibrium*) dengan cara mengemisikan sejumlah energi cahaya  $h\nu_B$ . Emisi fluoresensi dalam bentuk spektrum yang lebar terjadi akibat transisi dari  $S_1$  menuju ke sub-tingkat energi  $S_0$  yang bervariasi atau kondisi keadaan dasar vibrasi atom yang bertingkat-tingkat pula yakni tingkat energi vibrasi 0, 1, dan 2 berdasarkan prinsip Frank-Condon [31].

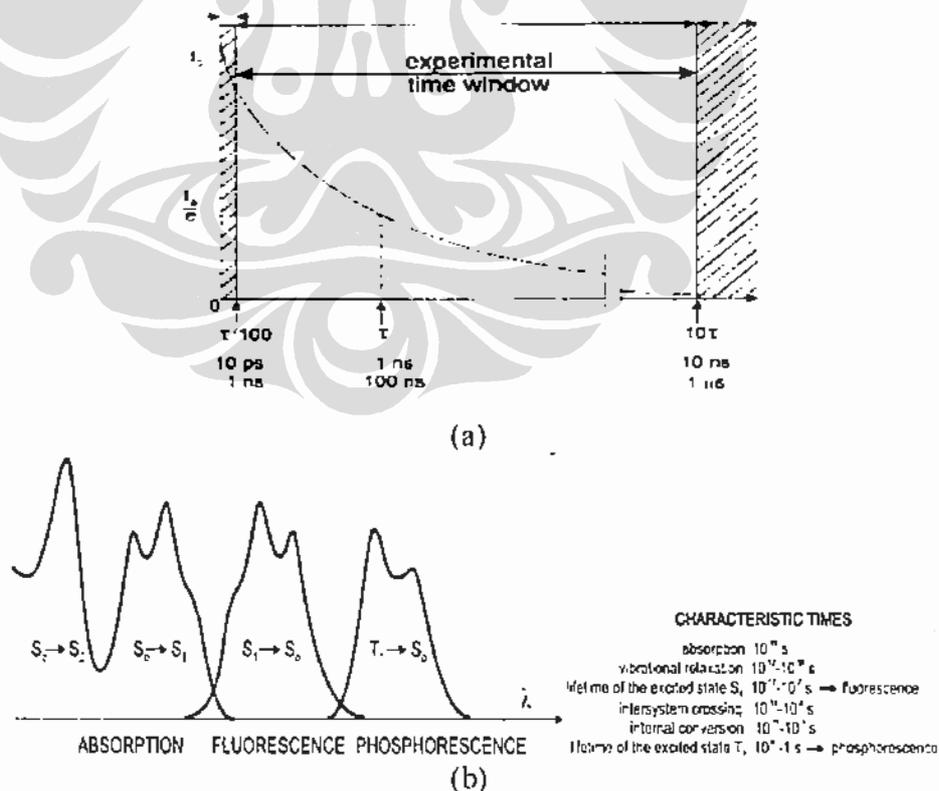


Gambar 2.1 Proses fluoresensi pada diagram Jablonski [31]



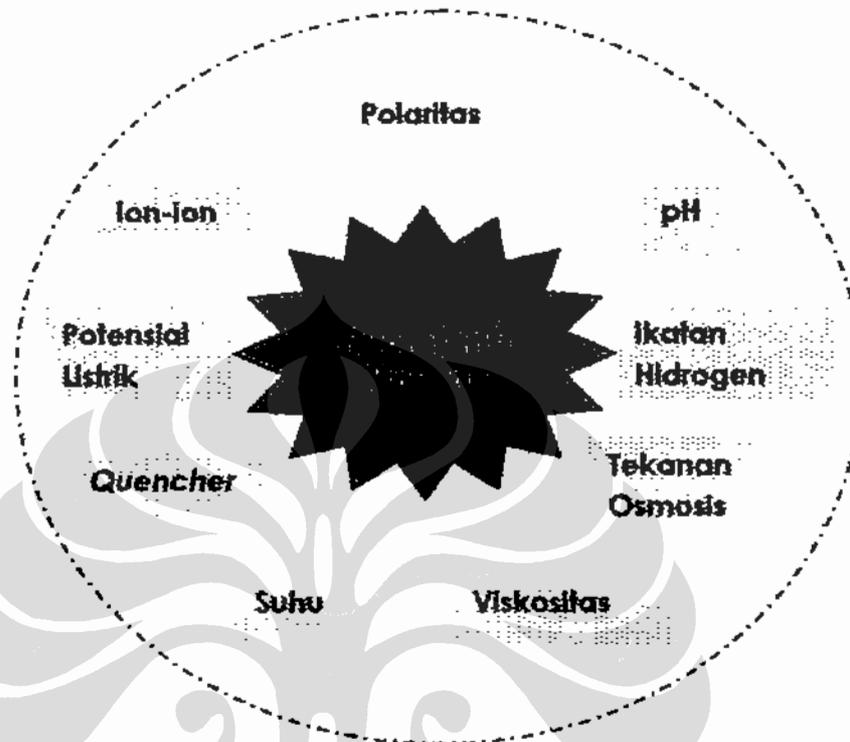
Gambar 2.2. Kemungkinan transisi de-eksitasi pada molekul [32].

Namun jika sebelum transisi dari  $S_1$  ke  $S_0$  terjadi *intersystem crossing* yaitu saat di  $S_1$  terjadi konversi spin ke *triplet state* yang pertama ( $T_1$ ) maka transisi dari  $T_1$  ke  $S_0$  akan mengakibatkan terjadinya fosforesensi dengan emisi cahaya  $h\nu_p$  dalam selang waktu sekitar  $1\mu s - 1s$  seperti ditunjukkan pada Gambar 2.2. Disamping itu dihasilkan pula emisi energi cahaya yang relatif lebih rendah (panjang gelombang yang lebih panjang) dibandingkan dengan fluoresensi (Gambar 2.3.a-b).



Gambar 2.3 (a) Diagram *lifetime* fluoresensi dan fosforesensi [32].  
(b) Spektrum fluoresensi dengan fosforesensi [32].

Fluoresensi pada molekul dipengaruhi oleh beberapa kondisi fisis yakni polaritas, ion-ion, potensial listrik, suhu, tekanan, derajat keasaman (pH), jenis ikatan hidrogen, viskositas dan *quencher* (penghambat de-eksitasi) (Gambar 2.4).



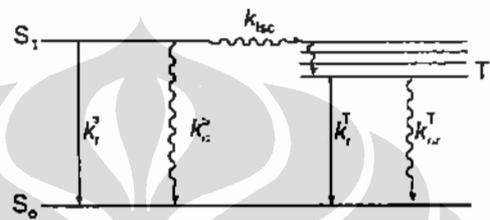
Gambar 2.4 Kondisi fisis yang mempengaruhi proses fluoresensi pada molekul [31].

Kondisi-kondisi fisis tersebut mempengaruhi proses absorpsi energi cahaya eksitasi yang pada gilirannya berpengaruh pada proses de-eksitasi molekul sehingga menghasilkan karakteristik intensitas dan spektrum emisi fluoresensi yang berbeda-beda [31-33].

## 2.2 Parameter Fluoresensi

Intensitas fluoresensi adalah jumlah foton (dalam mol atau ekuivalensinya dalam Einstein, 1 Einstein = 1 foton mol) yang diemisikan per unit waktu (s) per unit volume larutan (l). Arti fisisnya adalah bahwa intensitas fluoresensi terjadi dalam selang waktu transisi (*lifetime*) dan dalam unit volume larutan (medium) yang tereksitasi. Intensitas fluoresensi tersebut merupakan hasil emisi de-eksitasi

sehingga mengacu dari penjelasan sub-bab sebelumnya, *lifetime* pada  $S_1$  akan berpengaruh terhadap besarnya intensitas fluoresensi. Seperti ditunjukkan pada Gambar 2.5,  $k_r$  adalah konstanta kecepatan radiasi  $S_1 \rightarrow S_0$  (transisi dari  $S_1$  ke  $S_0$ ),  ${}^T k_{nr}$  adalah konstanta kecepatan non radiasi  $T_1 \rightarrow S_0$  (transisi dari  $T_1$  ke  $S_0$ ) yang terjadi setelah proses *internal crossing system*  $S_1 \rightarrow T_1$ .  $k_{ic}$  adalah konstanta kecepatan proses *internal conversion* (bersifat non radiatif) dari  $S_1 \rightarrow S_0$  yang terjadi setelah transisi  $S_2 \rightarrow S_1$ , dan  ${}^T k_r$  adalah konstanta kecepatan radiatif transisi  $T_1 \rightarrow S_0$  yang terjadi setelah proses *internal crossing system*  $S_1 \rightarrow T_1$ .



Gambar 2.5 Diagram *lifetimes* proses transisi energi.

Jika sejumlah molekul  $A$  menyerap energi cahaya maka akan terjadi eksitasi hingga ke tingkat energi  $S_1$  dan ketika kembali ke tingkat energi  $S_0$ , molekul tersebut akan mengemisikan radiasi atau melepaskan energi non radiasi (fonon atau energi panas) dengan laju eksitasi seperti dirumuskan sebagai berikut:

$$-\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = (k_r^S + k_{nr}^S)[{}^1A^*] \dots \dots \dots (2.1)$$

Dengan  $A^*$  adalah molekul  $A$  yang tereksitasi. Selanjutnya dengan mengintegrasikan persamaan 2.1 terhadap waktu  $t$  diperoleh jumlah konsentrasi molekul yang tereksitasi dalam waktu  $t$  detik adalah :

$$[{}^1A^*] = [{}^1A] \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \dots \dots \dots (2.2)$$

$\tau_S$  adalah *lifetime* pada  $A^*$  di  $S_1$ , yang didefinisikan sebagai :

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \dots \dots \dots (2.3)$$

Molekul  $A^*$  akan mengemisikan foton akibat laju konstanta radiasi  $k_r$  yang mengikuti persamaan 2.4.



Jika molekul  $A$  di eksitasi oleh pulsa cahaya  $\delta(t)$  maka respon intensitas fluoresensinya  $i_F(t)$  adalah intensitas yang mengalami penurunan secara eksponensial sebagaimana persamaan 2.5.

$$i_F(t) = k_r^S [^1A^*] = k_r^S [^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \dots\dots\dots(2.5)$$

Secara analitis dari persamaan 2.3 dan 2.4 dapat diketahui bahwa laju konstanta radiasi dan non-radiasi berpengaruh terhadap intensitas fluoresensi sehingga hubungan antara kedua konstanta tersebut dapat dinyatakan sebagai efisiensi kuantum fluoresensi  $\Phi_F$ . Arti fisisnya adalah rasio jumlah foton yang diemisikan dengan jumlah foton yang diserap, dituliskan sebagai berikut:

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_S \dots\dots\dots(2.6)$$

$$\Phi_F = \frac{\tau_S}{\tau_r} \dots\dots\dots(2.7)$$

Dalam kondisi tunak perubahan laju molekul yang tereksitasi adalah konstan sehingga bisa dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$-\frac{d[^1A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r^S + k_{nr}^S) [^1A^*] \dots\dots\dots(2.8)$$

Dengan  $k_a \alpha N_0$  adalah jumlah foton yang diserap per unit volume (L) per satuan detik (s). Karena jumlah molekul adalah konstan, sehingga intensitas fluoresensi dalam kondisi tunak adalah:

$$i_F = k_r^S [^1A^*] = \alpha I_0 \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = \alpha I_0 \Phi_F \dots\dots\dots(2.9)$$

Intensitas fluoresensi dalam kondisi tunak per jumlah foton yang diserap sebagai fungsi panjang gelombang foton yang diemisikan dapat dinyatakan dalam :

$$\int_0^\infty F_\lambda(\lambda_F) d\lambda_F = \Phi_F \dots\dots\dots(2.10)$$

Atau dapat pula dinyatakan sebagai berikut :

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k F_\lambda(\lambda_F) I_A(\lambda_E) \dots\dots\dots(2.11)$$

Jika persamaan 2.10 disubstitusikan ke persamaan 2.11 maka akan diperoleh :

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k \Phi_F I_A(\lambda_E) \dots\dots\dots(2.12)$$

dengan

$$I_A(\lambda_E) = I_0(\lambda_E) - I_T(\lambda_E) \dots \dots \dots (2.13)$$

dan

$I_F(\lambda_F)$  = intensitas fluoresensi yang diukur pada rentang spektrum panjang gelombang fluoresensi  $\lambda_F$ .

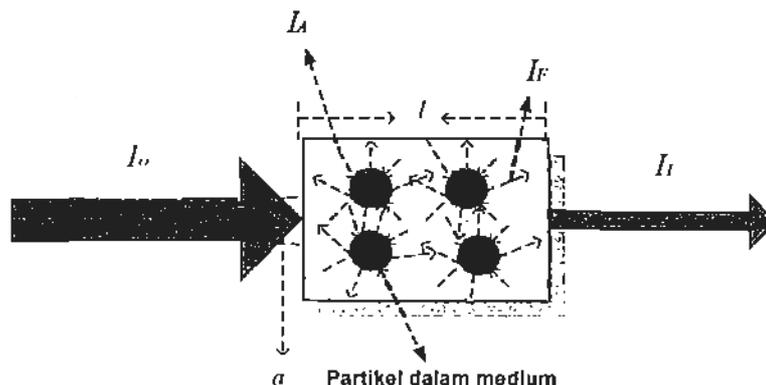
$I_A(\lambda_E)$  = selisih intensitas cahaya yang datang dengan intensitas yang ditransmisikan pada gelombang  $\lambda_E$ .

$I_T(\lambda_E)$  = intensitas eksitasi ditransmisikan.

$I_0(\lambda_E)$  = intensitas cahaya yang datang.

$k$  = konstanta fluoresensi, yang besarnya tergantung pada set up optis antara detektor dengan berkas fluoresensi.

Proses fluoresensi dapat juga terjadi pada partikel dalam suatu medium, dimana hal tersebut terjadi akibat respon terhadap cahaya eksitasi dari elemen-elemen penyusunnya (kumpulan-kumpulan molekul atau atom yang relatif homogen). Perlakuan tersebut menggunakan asumsi bahwa dimensi partikel sedemikian tipis sehingga proses absorpsi terhadap cahaya eksitasi tidak mengalami hambatan atau gangguan [31-34]. Proses fluoresensi pada partikel diilustrasikan pada gambar 2.6 Pada saat cahaya eksitasi  $I_0$  datang menuju medium (dimensi  $lxl$ ) yang berisi partikel-partikel, cahaya tersebut akan diabsorpsi oleh partikel-partikel sebesar  $I_A$  dan cahaya yang diteruskan (tanpa absorpsi) adalah sebesar  $I_T$  sebagaimana mengacu pada persamaan 2.13.  $I_A$  oleh partikel-partikel akan dikonversi menjadi emisi cahaya fluoresensi  $I_F$  oleh faktor efisiensi kuantum  $\phi_F$ , sebagaimana mengacu pada persamaan 2.12.



Gambar 2.6 Proses fluoresensi pada partikel dalam medium.

Untuk dapat menurunkan persamaan intensitas fluoresensi pada partikel dapat dilakukan dengan dengan memanfaatkan hukum *Beer-Lambert*. Dengan hukum tersebut akan didapatkan keterkaitan antara intensitas fluoresensi dan absorbansi pada suatu partikel akibat eksitasi dari suatu sumber cahaya. Intensitas cahaya eksitasi yang ditransmisikan  $I_T(\lambda_E)$ , oleh sejumlah konsentrasi partikel  $N$ , pada luasan medium  $a$ , sepanjang arah rambat cahaya eksitasi  $l$ , dan dapat dituliskan seperti pada persamaan 2.14 [35]:

$$I_T = I_0(\lambda_E) \left( \exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l] \right) \dots\dots\dots(2.14)$$

dengan

- $\varepsilon(\lambda_E)$  = koefisien absorpsi pada panjang gelombang eksitasi (L/[partikel.m])
- $l$  = panjang lintasan optik yang dilewati oleh sumber cahaya (m)
- $N$  = konsentrasi partikel (partikel/L)
- $a$  = luasan berkas cahaya eksitasi yang melewati partikel-partikel dalam medium (m<sup>2</sup>)

Persamaan 2.1.4 menunjukkan bahwa intensitas cahaya eksitasi yang ditransmisikan oleh konsentrasi partikel akan menurun secara eksponensial (tanda minus) akibat absorpsi sepanjang lintasan  $l$  dan luasan berkas sinar eksitasi  $a$ .

Selanjutnya dengan mensubstitusikan persamaan 2.14 ke 2.13 akan didapatkan persamaan intensitas absorpsi cahaya eksitasi pada konsentrasi partikel, yaitu:

$$I_A = I_0(\lambda_E) (1 - \exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l]) \dots\dots\dots(2.15)$$

Berdasarkan konsepsi dari persamaan 2.1.2, bahwa intensitas cahaya fluoresensi yang diemisikan oleh suatu konsentrasi partikel pada suatu volume, adalah sebanding dengan jumlah intensitas cahaya absorpsi yang terkonversi menjadi cahaya fluoresensi. Selanjutnya dengan mensubtitusikan persamaan 2.15 ke 2.12 akan diperoleh intensitas cahaya fluoresensi sebagai fungsi  $\Phi_F$ , yaitu:

$$I_F = k\Phi_F I_0(\lambda_E) (1 - \exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l]) \dots\dots\dots(2.16)$$

Pada persamaan 2.16,  $\Phi_F$  merupakan faktor pengkonversi intensitas cahaya yang diabsorpsi oleh konsentrasi partikel menjadi energi cahaya fluoresensi. Faktor  $\Phi_F$  tergantung dari karakteristik absorpsi dan fluoresensi

partikel dalam medium. Dan nilai dari  $\Phi_F$  dapat diperoleh melalui pendekatan empirik (eksperimen) dan analitik mengacu pada persamaan 2.7 dan 2.10.

Persamaan 2.16 tersebut merupakan fungsi  $I_F$  yang membentuk hubungan eksponensial sebagai fungsi dari  $I_A$  dan  $I_T$ . Untuk itu guna lebih menyederhanakan fungsi eksponensial tersebut, dilakukan dengan menggunakan deret *Mc Laurin* dan diperoleh persamaan 2.17.

$$\exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)I] = [1 - Na\varepsilon(\lambda_E)I] \dots\dots\dots(2.17)$$

Dengan mensubstitusikan persamaan 2.17 ke persamaan 2.16 diperoleh bentuk persamaan yang lebih sederhana, yakni:

$$I_F = k\Phi_F I_0(\lambda_E) [Na\varepsilon(\lambda_E)I] \dots\dots\dots(2.18)$$

Kesebandingan  $I_F$  dengan  $I_0$  pada persamaan 2.18 dapat dinyatakan dalam bentuk:

$$\frac{I_F}{I_0} = k\Phi_F Na\varepsilon(\lambda_E)I \dots\dots\dots(2.19)$$

Persamaan 2.19 disebut sebagai sebagai intensitas fluoresensi yang ternormalisasi.

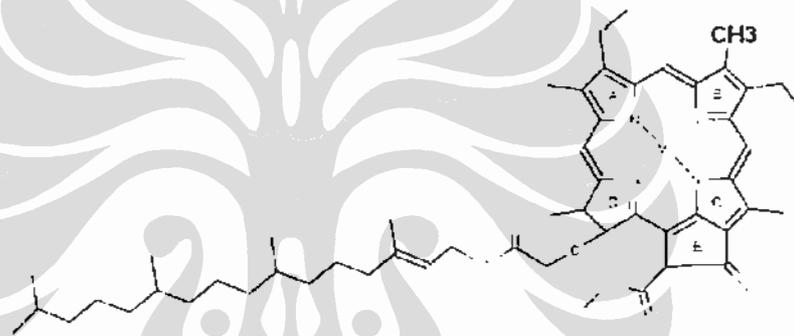
### 2.3 Fluoresensi pada Fitoplankton

Proses fluoresensi pada fitoplankton terjadi akibat adanya pigmen-pigmen khusus yang dimilikinya. Pigmen tersebut dikategorikan dalam tiga jenis yaitu klorofil, karotenoid, dan ficobiliprotein, yaitu berupa molekul-molekul organik yang terdiri dari ikatan karbon-hidrogen. Keberadaan dan komposisi ketiga jenis pigmen inilah yang berperan memberikan ciri khas pewarnaan pada setiap fitoplankton. Selain memberikan ciri khas pewarnaan, setiap kandungan pigmen mempunyai fungsi biologis yang unik dan khas pula, terkait dengan fungsi metabolisme dan fisiologis. Secara fisis dengan adanya pigmen tersebut akan terjadi interaksi dengan cahaya, yaitu proses absorpsi energi cahaya untuk dilangsungkan proses fotosintesis.

Fluoresensi terjadi ketika molekul-molekul penyusun pigmen tersebut menyerap cahaya eksitasi yang mengakibatkan tingkat energi molekul tersebut meningkat dari keadaan dasar menjadi keadaan tereksitasi. Dalam kondisi tereksitasi molekul-molekul pigmen tersebut mengalami relaksasi dalam waktu

yang singkat yang selanjutnya kembali ke tingkat energi dasar semula dengan melepaskan radiasi energi cahaya fluoresensi.

Secara umum jenis klorofil-a terdapat pada semua ordo fitoplankton (*Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Chlamydomonas* spp., dll). Struktur molekul klorofil-a seperti ditunjukkan pada gambar 2.7. Klorofil-a tersebut memberikan ciri khas warna dominan hijau kebiru-biruan pada seluruh dimensi sel fitoplankton. Sebagai contoh *Chlorella* sp. yang memiliki ukuran setiap sel sekitar 2,5 – 12  $\mu\text{m}$  akan tampak kehijauan seutuhnya seperti ditunjukkan pada Gambar 2.8. Disamping itu pada klorofil-a, dilangsungkan proses fotosintesis, yang dihasilkan makanan, energi serta oksigen dari proses fiksasi karbondioksida dengan bantuan energi cahaya seperti ditunjukkan dalam skema-Z pada Gambar 2.9.



Gambar 2.7 Struktur molekul klorofil-a [36].

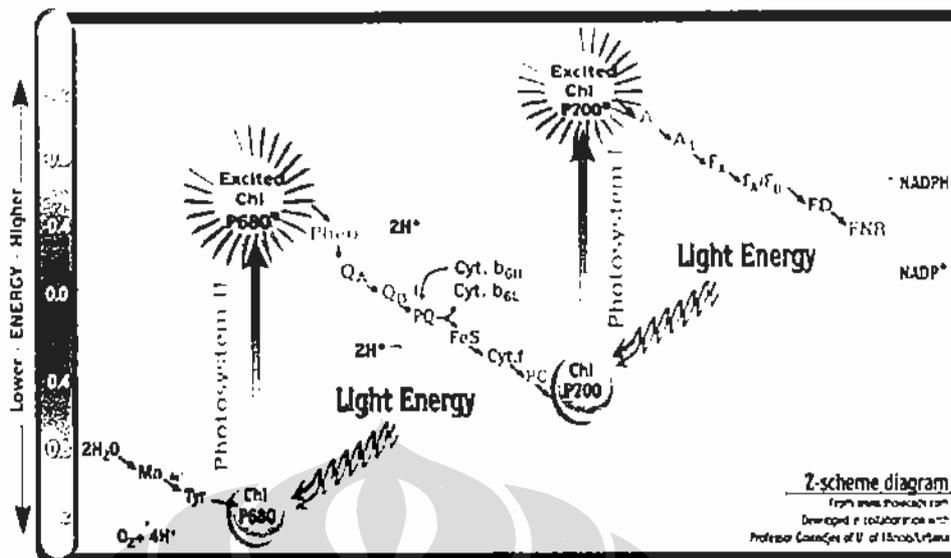


(a)



(b)

Gambar 2.8 a. Kultur b. Dimensi *Chlorella* sp.

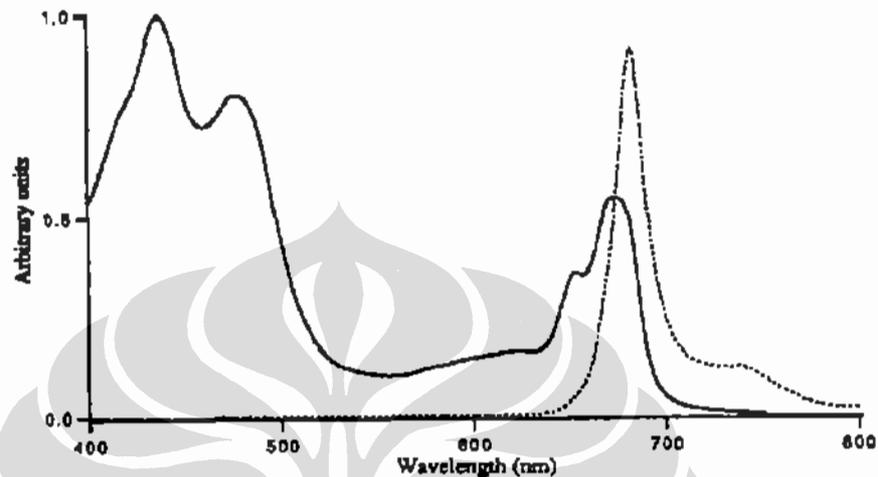


Gambar 2.9 Proses fotosintesis berdasarkan skema-Z [37].

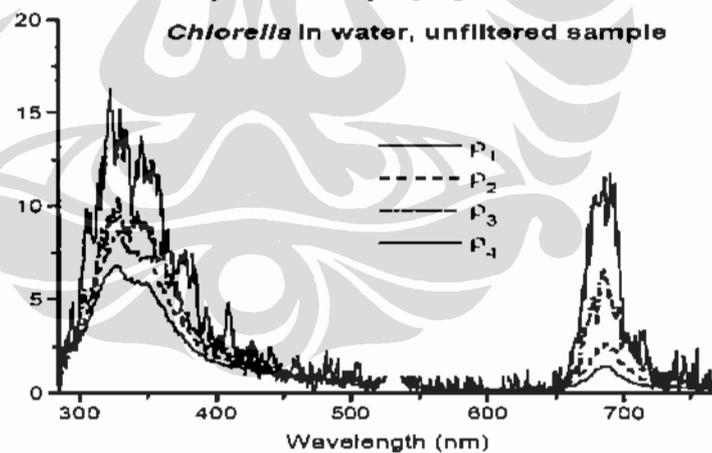
Proses fotosintesis di klorofil-a yang terjadi secara alamiah pada fitoplankton dapat dijelaskan menurut model skema-Z, di mana akibat penyinaran cahaya matahari akan menimbulkan proses eksitasi. Proses fotosintesis terjadi secara terpisah pada unit-unit kerja fotosintesis (*PSU/Photosynthetic Unit*). Unit kerja tersebut adalah *PSU-I* dan *PSU-II* yang dibedakan berdasarkan tingkat absorpsi maksimal terhadap intensitas cahaya pada panjang gelombang tertentu. *PSU-II* secara dominan menyerap intensitas pada panjang gelombang 680nm sedangkan *PSU-I* pada 700nm. Sehingga dengan absorpsi tersebut mengakibatkan klorofil-a mengalami eksitasi yang selanjutnya berfluoresensi. Karakteristik spektrum fluoresensi yang dihasilkan akibat eksitasi secara alamiah dengan sinar matahari tersebut seperti ditunjukkan pada Gambar 2.10. Dengan rentang absorpsi pada fitoplankton yang diukur dari 400nm - 750nm (garis tebal) maka akan dihasilkan emisi spektrum fluoresensi dari 625nm - 800nm (garis putus-putus). Daerah absorpsi tersebut disebut sebagai *Photosynthetically Active Region (PAR)* yakni spektrum cahaya yang dibutuhkan oleh klorofil untuk berfotosintesis. Dapat dikatakan bahwa emisi fluoresensi terjadi secara alamiah sebagai akibat adanya proses fotosintesis.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui karakteristik fluoresensi yang terjadi sebagai akibat adanya klorofil-klorofil pada fitoplankton

[36-38]. Dengan mengetahui karakteristik fluoresensi tersebut, dapat dilakukan identifikasi jenis dan komposisi pigmen-pigmen yang dikandung oleh fitoplankton. Hasil pengukuran spektrum fluoresensi diperoleh dengan menggunakan sinar laser sebagai sumber cahaya eksitasi, seperti ditunjukkan pada Gambar 2.11.



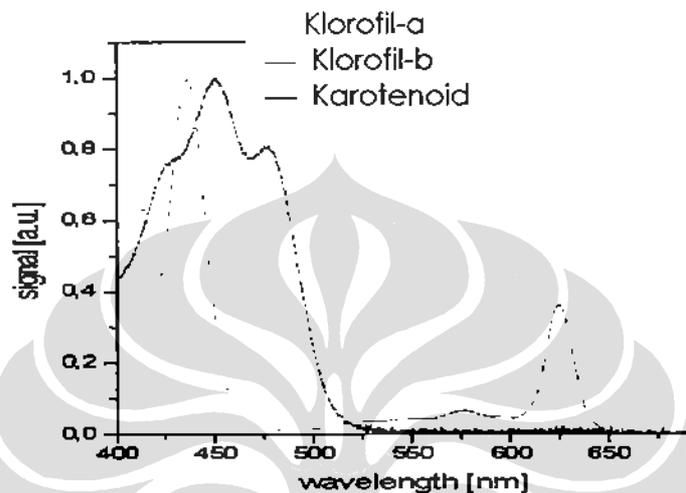
Gambar 2.10 Spektrum absorpsi (garis tebal) dan emisi fluoresensi klorofil-a (garis putus-putus) pada fitoplankton (*Chlamydomonas* sp.) [39].



Gambar 2.11 Emisi fluoresensi klorofil-a (garis putus-putus) pada *Chlorella* sp. galur asing yang dieksitasi oleh laser 355nm [39].

Penelitian yang dilakukan tersebut telah berhasil mengidentifikasi dan mengkarakterisasi spektrum emisi fluoresensi dari berbagai jenis fitoplankton. Penelitian tersebut dilakukan dengan metode *in-vitro* maupun *in-vivo* untuk mengukur karakteristik spektrum fluoresensi. Dari hasil pengukuran emisi

spektrum fluoresensi dari jenis-jenis pigmen, diketahui bahwa fitoplankton memiliki karakteristik spektrum yang khas. Cahaya fluoresensi pada fitoplankton didominasi oleh klorofil-a, seperti ditunjukkan pada Gambar 2.12. Perbedaan karakteristik spektrum fluoresensi untuk jenis klorofil-a, klorofil-b, dan karotenoid adalah puncak-puncak emisinya terjadi pada rentang 400 – 500 nm dan 600 – 700 nm.

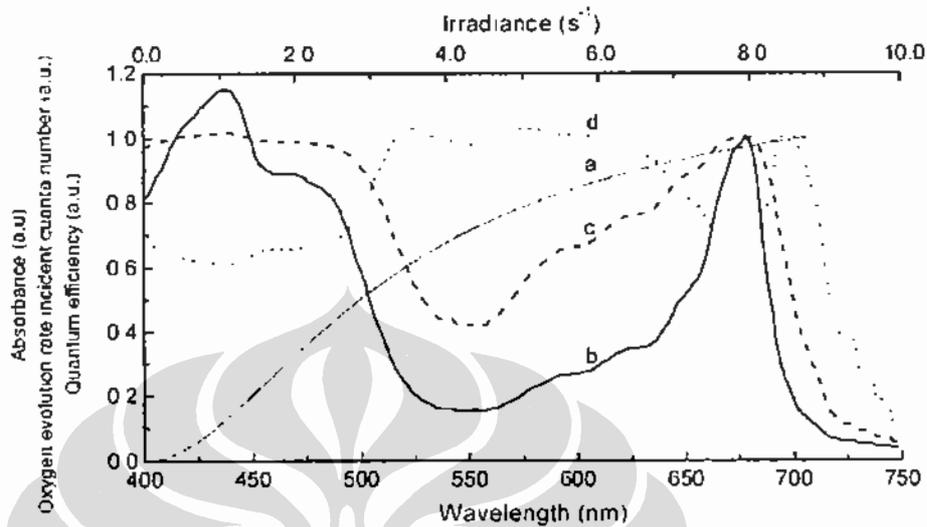


Gambar 2.12 Perbedaan spektrum fluoresensi dari klorofil-a, klorofil-b dan karotenoid pada fitoplankton [40].

Berdasarkan Gambar 2.12, dapat diketahui bahwa intensitas fluoresensi klorofil-a yang tinggi (maksimal) terjadi pada rentang 400 – 450 nm dan 550 – 700 nm. Intensitas fluoresensi klorofil-b yang tinggi terjadi pada rentang 400 – 475 nm dan 600 – 650 nm, untuk karotenoid terjadi pada 400 – 515 nm. Karakteristik spektrum tersebut memiliki arti penting dalam pengidentifikasian dan penggolongan jenis fitoplankton, karena spektrum tersebut tidak dihasilkan oleh partikel atau bahan lainnya.

Secara analitis yang mengacu pada eksperimen, untuk mendapatkan harga intensitas fluoresensi dari klorofil-a pada fitoplankton, dapat dilakukan dengan menerapkan persamaan 2.19 dalam pendekatan yang spesifik, mengacu pada karakteristik fluoresensinya. Dari persamaan tersebut maka harga  $\Phi_f$  didapatkan melalui pendekatan eksperimental, yaitu melalui karakterisasi emisi fluoresensi ketika merespon sumber cahaya eksitasi pada panjang gelombang tertentu. Untuk itu dalam pencarian harga  $\Phi_f$  dalam penelitian ini menggunakan hasil penelitian yang telah dilakukan pada beberapa jenis fitoplankton. Sebagai contoh harga  $\Phi_f$

pada jenis *Scenedesmus* sp. akan berupa spektrum sebagai fungsi panjang gelombang pada tingkat absorbansi sebesar 0,1 a.u. Harga tersebut diperoleh melalui eksperimen dengan sumber eksitasi lampu halogen.



Gambar 2.13 Spektrum harga  $\Phi_F$  (titik-titik c) pada *Scenedesmus* sp. akibat eksitasi dengan sumber halogen, di mana titik-titik a dan b adalah harga normalisasi absorbansi [41].

# BAB III

## KARAKTERISTIK ABSORPSI DAN FLUORESENSI

### *Chlorella* sp.

*Chlorella* sp. yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari galur lokal Indonesia koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Non Vaskular, Departemen Biologi FMIPA UI. *Chlorella* sp. dikulturkan pada medium *BB* (*bold bassal blanko*). Kondisi fisis pembiakan kultur *Chlorella* sp. adalah sebagai berikut :

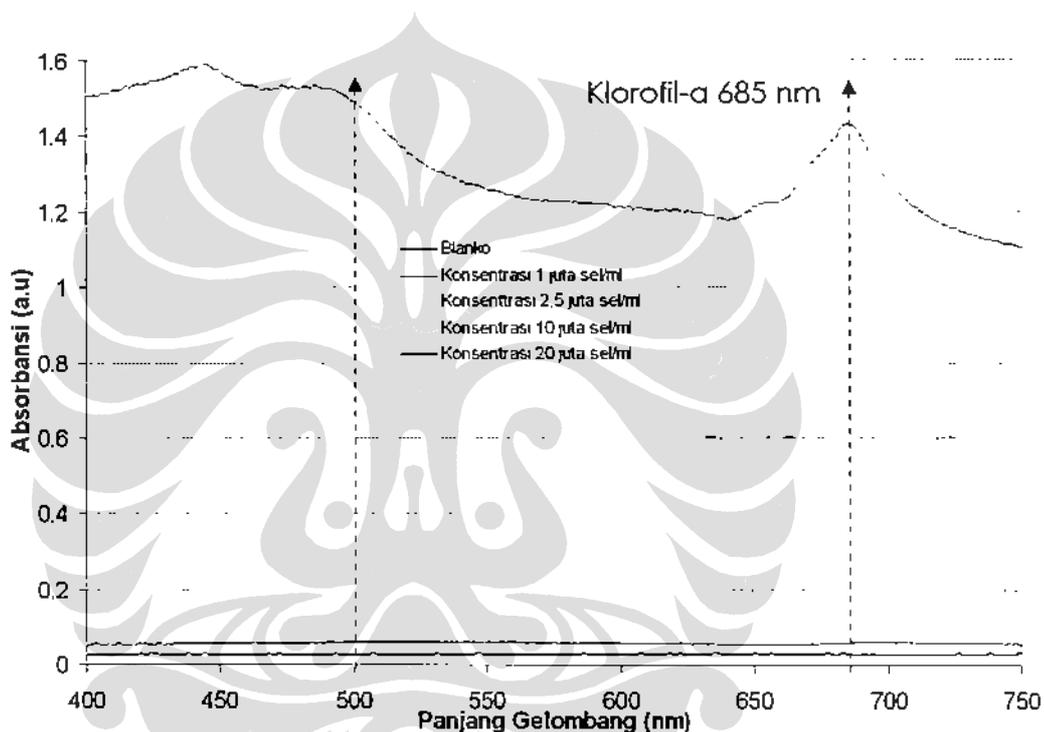
- Tingkat luminasi cahaya yang digunakan sebesar 3000 lumens (sumber cahaya berupa lampu neon; P = 20 Watt) dengan pola penyinaran 16:8, yakni 16 jam penyinaran secara kontinyu dan 8 jam perlakuan kondisi gelap.
- Suhu ruangan kultur di jaga pada kisaran 24 – 26 °C.
- pH kultur berkisar antara 6 – 7.
- *Chlorella* sp. yang digunakan adalah 3,47 – 7,40 µm dengan bentuk bulat.

#### 3.1 Karakteristik Absorpsi *Chlorella* sp.

Untuk mengukur spektrum absorpsi digunakan spektrofotometer *UV-Vis* Shimadzu 2450 yang memiliki dua lengan cahaya. Lengan pertama berfungsi untuk mengukur kultur, sedangkan lengan kedua berfungsi sebagai referensi. Rentang panjang gelombang yang dipindai adalah 400 – 750 nm. Sebagai referensi digunakan cairan medium kultur (disebut air blanko/*bold bassal*). Untuk mendapatkan karakteristik absorpsi digunakan kultur murni *Chlorella* sp. dalam media kultur air blanko. Konsentrasi kultur yang diukur adalah sebesar  $10^3$  sel/ml s/d  $20 \times 10^6$  sel/ml. Hasil pengukuran spektrum absorpsi diantaranya ditunjukkan pada Gambar 3.1.

Pada Gambar 3.1 dapat dilihat bahwa *Chlorella* sp. memiliki spektrum absorbansi yang khas dengan puncak di sekitar 445nm, 487nm, dan 686nm.

Absorbansi merupakan nilai logaritmis dari perbandingan antara intensitas cahaya yang datang dengan intensitas cahaya yang keluar pada kultur. Jika intensitas cahaya yang keluar tersebut kurang dari intensitas cahaya yang datang maka terjadi proses absorpsi pada kultur. Secara fisis hal ini terjadi akibat adanya absorpsi oleh klorofil-a pada fitoplankton. Tampak pula bahwa nilai absorbansi *Chlorella* sp. pada konsentrasi  $20 \times 10^6$  sel/ml lebih tinggi dari konsentrasi  $10 \times 10^6$  sel/ml,  $2,5 \times 10^6$  sel/ml, dan  $10^6$  sel/ml. Sedangkan harga absorbansi blanko adalah paling rendah yakni pada kisaran  $0,02 a.u.$



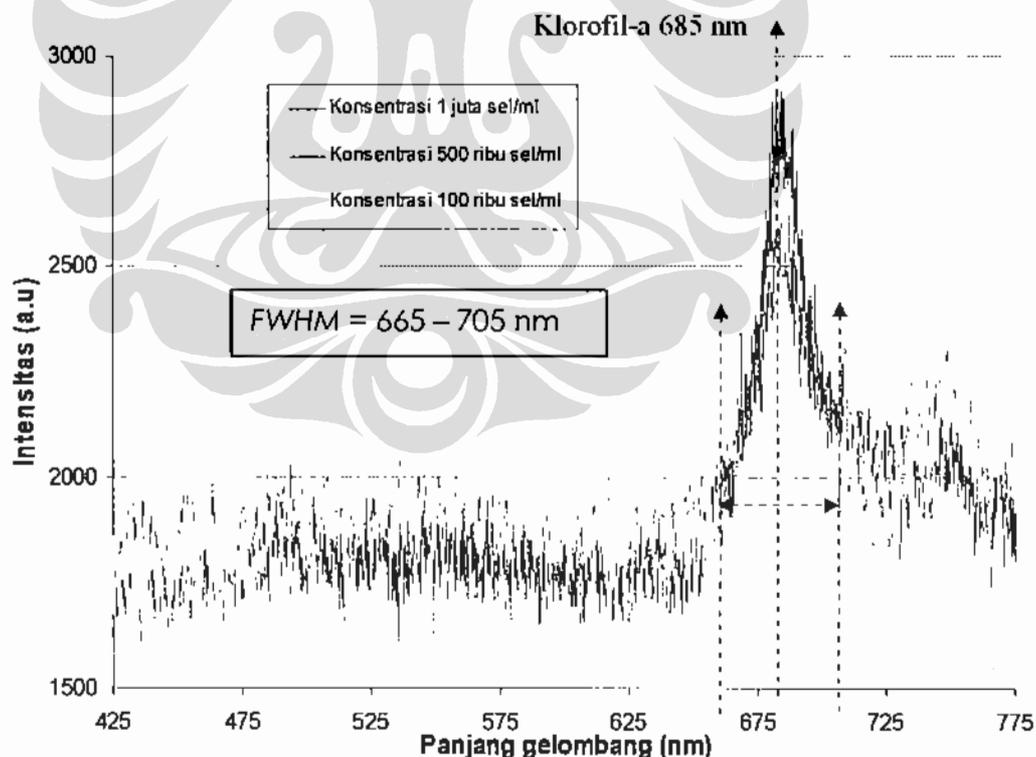
Gambar 3.1 Spektrum absorbansi *Chlorella* sp.

Pada grafik absorbansi (Gambar 3.1), dapat diketahui bahwa mengacu pada referensi [40-42], spektrum tersebut merupakan aktifitas absorpsi dari klorofil-a pada *Chlorella* sp. Klorofil tersebut menyerap intensitas cahaya yang datang secara maksimal pada panjang gelombang sekitar 400 – 500 nm dan 680 – 715 nm [36]. Diketahui pula bahwasanya intensitas penyerapan cahaya pada rentang 400 – 500 nm adalah lebih besar dari rentang 680 – 715 nm. Pengetahuan ini selanjutnya dijadikan dasar dalam memilih sumber cahaya yang tepat untuk menimbulkan emisi fluoresensi pada *Chlorella* sp.

### 3.2 Karakteristik Fluoresensi *Chlorella* sp.

Berdasarkan pengetahuan yang diperoleh pada sub bab 3.1 selanjutnya dilakukan eksperimen untuk mengamati spektrum fluoresensi *Chlorella* sp. Untuk mengukur spektrum fluoresensi digunakan spektrofotometer *Ocean Optics tipe USB-400 FL* yang memiliki satu buah lengan cahaya. Detektor dipasang pada arah tegak lurus dari sumbu optik utama. Sebagai sumber cahaya eksitasi digunakan laser dioda ungu (405nm, 4mJ, 0,5ms). Rentang panjang gelombang pengeksitasi yang dipindai adalah 420 nm – 775 nm. Rentang ini dipilih untuk menghindari ikut terukurnya cahaya pengeksitasi pada sensor spektrofotometer. Langkah-langkah eksperimen adalah sebagai berikut:

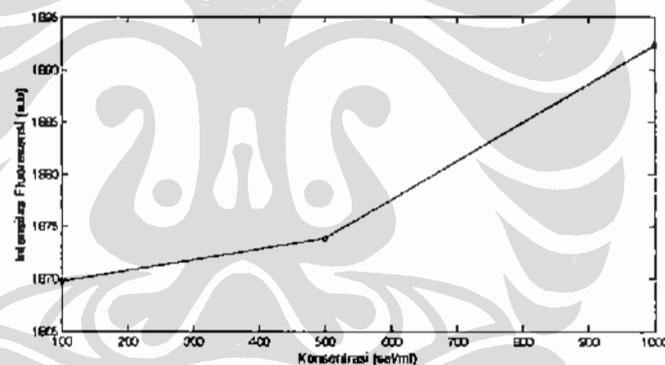
- Mengukur karakteristik fluoresensi *Chlorella* sp. dengan konsentrasi yang bervariasi, yakni pada rentang  $10^2$  -  $10^6$  sel/ml. Hal ini dilakukan untuk mempelajari karakteristik emisi fluoresensi pada *Chlorella* sp. (Gambar 3.2).



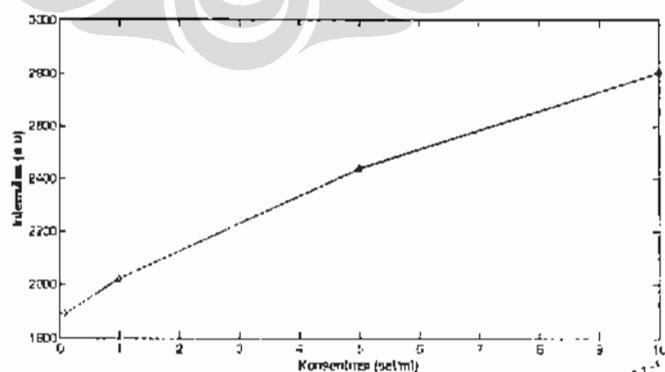
Gambar 3.2 Spektrum fluoresensi kultur *Chlorella* sp. dalam medium *bold basal* (blanko).

Pada Gambar 3.2. dapat dilihat bahwa *Chlorella* sp. memiliki karakteristik fluoresensi yang khas, yaitu terdapat puncak spektrum yang dominan (tinggi/maksimal) di sekitar 685nm pada *FWHM* 665 – 705 nm. Dapat diketahui pula bahwa puncak tersebut tidak bergeser dan meningkat intensitasnya seiring dengan peningkatan konsentrasi sel. Pada rentang 400nm – 640nm terjadi fluktuasi intensitas fluoresensi yang relatif kecil dibandingkan puncak intensitas spektrum. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu [37] karakteristik spektrum tersebut diduga diakibatkan oleh aktifitas fluoresensi klorofil-a.

Selanjutnya ingin diamati hubungan antara intensitas fluoresensi dengan konsentrasi sel. Guna maksud tersebut diplot grafik yang menghubungkan antara intensitas fluoresensi dengan konsentrasi sel dalam semua rentang ( $10^2 - 10^6$  sel/ml) seperti ditunjukkan pada Gambar 3.3. Dapat dilihat dari grafik tersebut, yakni adanya hubungan yang meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi *Chlorella* sp.



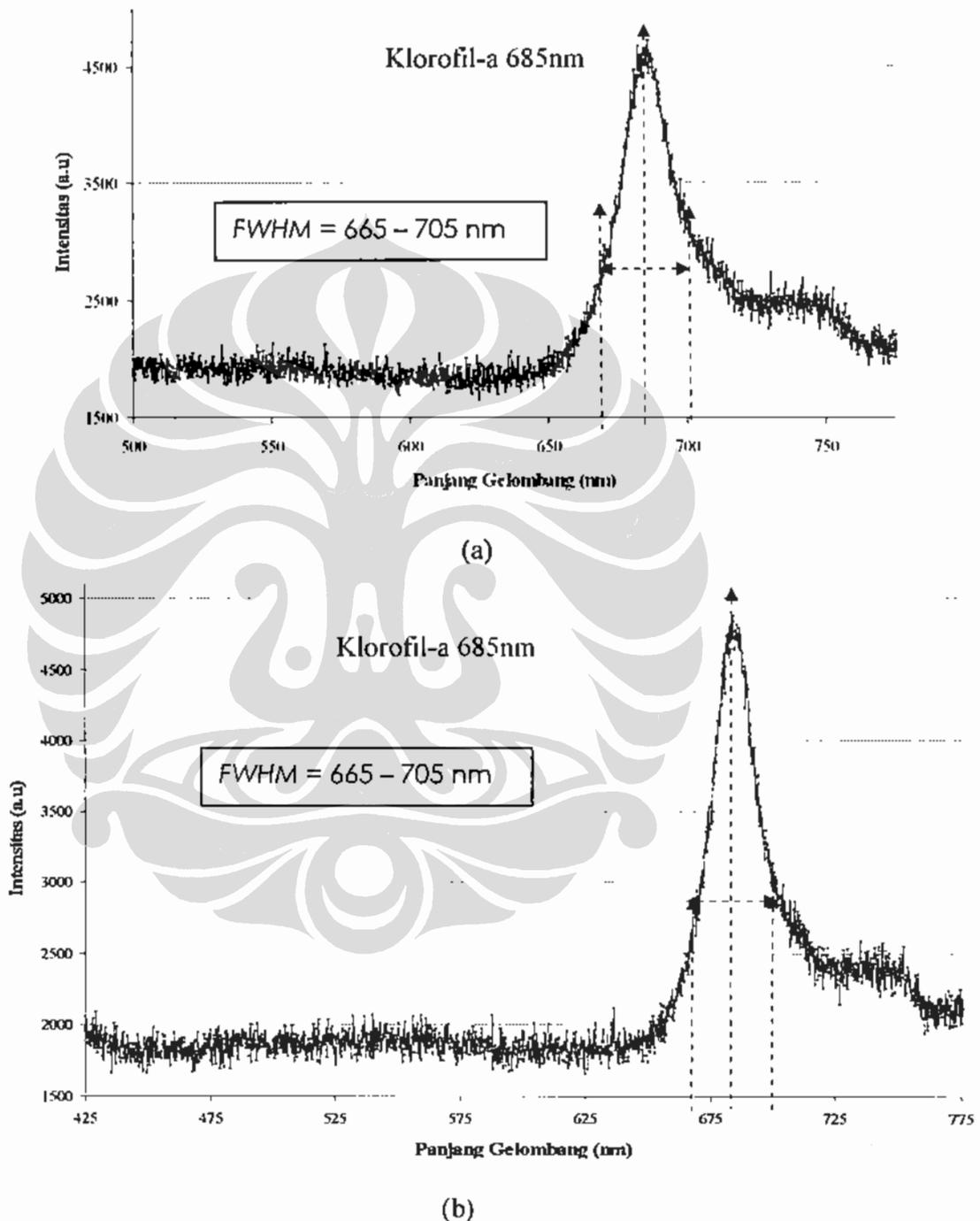
(a)



(b)

Gambar 3.3 Hubungan antara intensitas fluoresensi *Chlorella* sp Dengan konsentrasi sel, pada emisi panjang gelombang 685nm untuk rentang konsentrasi: a.  $10^2 - 10^3$  sel/ml. b.  $10^4 - 10^6$  sel/ml.

- b. Mengukur karakteristik fluoresensi *Chlorella* sp. konsentrasi  $5 \times 10^5$  sel/ml yang tercampur pada air alam. Hal ini dilakukan untuk mengamati sifat fluoresensi pada habitat alami *Chlorella* sp. (Gambar 3.4).



Gambar 3.4 Spektrum fluoresensi. a. air alam (Agathis UI Depok) murni tanpa campuran dengan kultur *Chlorella* sp. b. Campuran air alam dan kultur *Chlorella* sp. konsentrasi  $5 \times 10^5$ .

Pada Gambar 3.4.a ditunjukkan hasil pengukuran spektrum fluoresensi dari air danau murni sebelum dicampur dengan *Chlorella* sp. Tampak bahwa tanpa pencampuran *Chlorella* sp. spektrum telah memiliki puncak yang dominan disekitar 685nm. Hal ini diduga akibat keberadaan plankton-plankton lain yang terlarut dalam air danau tersebut. Untuk membuktikan hal tersebut dilakukan pengamatan mikroskop. Ditunjukkan bahwa air danau mengandung jenis fitoplankton (*Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp, *Chlamydomonas* sp., dll) dalam konsentrasi yang bervariasi dan berbeda-beda untuk ordo tersebut.

Pada Gambar 3.4.b ditunjukkan hasil pengukuran spektrum fluoresensi dari campuran *Chlorella* sp. dengan air danau (perbandingan volume 1:1). Dapat dilihat bahwa puncak spektrum tidak mengalami perubahan kendati *Chlorella* sp. tercampur dengan bahan-bahan lain seperti lumpur, debu, detritus, kotoran, dan lain-lain (organik). Puncak intensitas fluoresensi tetap di sekitar 685nm pada *FWHM* 665 – 705nm. Intensitas fluoresensi yang terukur semakin meningkat pesat, yaitu dari 4550*a.u* (air danau murni/situ Agathis UI Depok) menjadi 4800*a.u*. Hal ini sesuai dengan yang diharapkan yaitu bahwa pencampuran *Chlorella* sp. akan meningkatkan jumlah konsentrasi fitoplankton yang pada gilirannya meningkatkan intensitas fluoresensi.

Selanjutnya hasil analisis karakteristik fluoresensi *Chlorella* sp. dijadikan dasar untuk memilih detektor dan menyusun rangkaian elektronik yang dapat mengukur konsentrasi *Chlorella* sp. Dan selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk memilih filter *bandpass* optik dan tingkat kesensitifan pemindaian intensitas fluoresensi.