



SKRIPSI - TK 141581

**PENGARUH KADAR NITROGEN DALAM
SUBSTRAT TERHADAP PRODUKTIVITAS LIPID
MIKROALGA *Botryococcus braunii* TERMUTASI UV-
B**

**Oleh :
Dinar Resti Megarani
2315 106 022**

**Regine Generis
2315 106 023**

**Dosen Pembimbing :
Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**



FINAL PROJECT - TK 141581

**THE EFFECT OF NITROGEN LEVELS ON LIPID
PRODUCTIVITY OF MICROALGAE *Botryococcus*
braunii UV-B RAYS MUTATED**

**By :
Dinar Resti Megarani
2315 106 022**

**Regine Generis
2315 106 023**

**Advisor :
Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2018**

LEMBAR PENGESAHAN

“Pengaruh Kadar Nitrogen Dalam Substrat Terhadap Produktivitas Lipid Mikroalga *Botryococcus braunii* Termutasi UV-B”

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Departemen Teknik Kimia Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

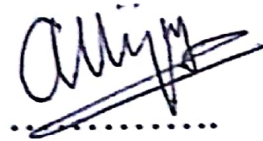
Oleh :

Dinar Resti Megarani
Regine Generis

NRP. 2315106022
NRP. 2315106023

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
(Pembimbing)
2. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng
(Penguji I)
3. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
(Penguji II)
4. Hakun Wirawasista A., S.T., M.MT., Ph.D
(Penguji III)


.....


.....


.....



PENGARUH KADAR NITROGEN DALAM SUBSTRAT TERHADAP PRODUKTIVITAS LIPID MIKROALGA *Botryococcus braunii* TERMUTASI UV-B

Nama / NRP :

- 1. Dinar Resti Megarani NRP. 2315 106 022**
- 2. Regine Generis NRP. 2315 106 023**

Dosen Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

ABSTRAK

Mikroalga *B.braunii* adalah bahan baku penghasil lipid yang cukup potensial. Mutasi dengan menggunakan sinar UV-B merupakan metode untuk meningkatkan produktivitas mikroalga. Pengurangan kadar nitrogen dalam nutrien dan lama waktu kultur dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap produktivitas lipid dan *lipid content* mikroalga *B.braunii*.

Variabel nitrogen dalam substrat dibuat dengan komposisi NaNO_3 100 mg/L dan NaNO_3 0,03 mg/L. Prekultur dilakukan selama 6 hari dengan pemberian nutrien normal setiap 24 jam. Tahap selanjutnya adalah kultur mikroalga yang dilakukan selama 7 hari dan 20 hari dengan pemberian nutrien sesuai variabel. Kondisi operasi meliputi penambahan aerasi sebanyak 2,5 L/menit, CO_2 sebanyak 50 mL/menit dan siklus pencahayaan (terang : gelap) 24 jam : 0 jam. Pertumbuhan mikroalga dihitung dengan menggunakan metode *counting chamber* setiap 24 jam. Untuk mendapatkan lipid digunakan ekstraksi menggunakan n-heksan.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa kadar nitrogen dalam nutrien sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kadar lipid mikroalga *B.braunii*. Mikroalga *B.braunii* alami dengan nutrien normal memberikan pertumbuhan sel paling pesat dibanding mikroalga *B.braunii* termutasi UV-B. Produktivitas biomassa dan lipid sangat ditentukan oleh pertumbuhan jumlah sel dan massa sel mikroalga *B.braunii*. Produktivitas biomassa tertinggi dihasilkan *B.braunii* alami dengan normal nutrien waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 0,235 (mg/mL)/hari. Produktivitas lipid paling tinggi dihasilkan oleh *B.braunii* mutasi UV-B rendah nitrogen waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 0,09 (mg/mL)/hari. *Lipid content* paling besar yaitu *B.braunii* alami dan mutasi UV-B

rendah nitrogen waktu kultur 20 hari sebesar 67,42% dan 70,03%. *B.braunii* alami memberikan produktivitas biomassa tertinggi. Produktivitas lipid tertinggi dihasilkan oleh *B.braunii* mutasi UV-B, hal ini menunjukkan bahwa perlakuan mutasi UV-B mampu meningkatkan produktivitas lipid. Hasil analisa GC menunjukkan kandungan asam lemak bebas (FFA) dan Monoacylglycerol (MAG) lebih besar dibandingkan komponen lainnya. Kandungan FFA dan MAG untuk variable rendah nitrogen yang terbesar adalah *B.braunii* mutasi dengan waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 22,54 % dan 38,289 sementara kandungan Triacylglycerol (TAG) sebesar 1,006%

Kata kunci : Mikroalga, *Botryococcus braunii*, nitrogen, mutasi, UV-B

THE EFFECT OF NITROGEN LEVELS ON THE LIPID PRODUCTIVITY OF MICROALGAE *Botryococcus braunii* UV-B RAYS MUTATED

Name / NRP :

1. Dinar Resti Megarani NRP. 2315 106 022

2. Regine Generis NRP. 2315 106 023

Advisor : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

ABSTRACT

B.braunii is a microalgae that currently being tested for its ability because of high lipid content. UV-B radiation is a method to increase productivity of microalgae. Reduced levels of nitrogen in nutrients and duration of culture were conducted to determine the effect on lipid productivity and lipid content of *B. braunii*.

The nitrogen variables in substrate were prepared with the composition of NaNO₃ 100 mg/L and NaNO₃ 0,03 mg/L. Pre-cultivation microalgae *B.braunii* in 6 days with normal nutrient every 24 hour. Cultivation time done in 7 days and 20 days with nitrogen in NaNO₃ varied, aeration addition 2,5 L/min, CO₂ addition 50 mL/min and a light cycle ratio (light: dark) is 24 hours : 0 hours. Microalgae growth is calculated with *counting chamber* every 24 hours. Extraction of lipid using n-hexane to obtain the lipid in *B.braunii*.

It was found that the effect of nitrogen content in nutrients influenced the growth and lipid content of *B.braunii*. The natural *B. braunii* with normal nutrients provides the most rapid cell growth compared to UV-B mutation. The productivity of biomass and lipids is determined by the growth of cells and the mass of cells *B.braunii*. The highest biomass productivity was produced by natural *B.braunii* with normal nutrient at 7 days cultivation time which 0,235 (mg / mL) /day. The highest productivity of lipids produced by *B.braunii* UV-B mutation low nitrogen at 7 days cultivation which 0,09 (mg / mL) /day. The largest lipid content was natural *B.braunii* and UV-B mutation with low nutrient at 20 days cultivation time were 67,42% and 70,03%. Natural *B.braunii* provide the highest biomass productivity. The highest lipid productivity was generated by *B.braunii* UV-B mutations. Indicating of this result, UV-B mutation can increase the productivity of lipids. The

result of GC analysis showed that free fatty acid content (FFA) and Monoacylglycerol (MAG) were bigger than other components. The content of FFA and MAG for the largest variable of low nitrogen is *B.braunii* UV-B mutation with 7 days cultivation time which 22,54% and 38,289 while Triacylglycerol content (TAG) equal to 1,006%.

Keywords: Microalgae, Botryococcus braunii, nitrogen, mutation, UV-B, harvesting time

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan Laporan Skripsi berjudul **PENGARUH KADAR NITROGEN DALAM SUBSTRAT TERHADAP PRODUKTIVITAS LIPID MIKROALGA *Botryococcus braunii* TERMUTASI UV-B**. Dalam kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa
2. Orang tua dan keluarga yang selalu mendukung kami.
3. Bapak Juwari, S.T., M. Eng., Ph.D, selaku Ketua Departemen Teknik Kimia FTI-ITS.
4. Bapak Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D, selaku Sekretaris Departemen Teknik Kimia FTI-ITS.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng, selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia Departemen Teknik Kimia FTI ITS dan selaku dosen pembimbing.
6. Ibu Dr. Lailatul Qadariah, S.T., M.T. selaku Koordinator Program Studi S1 Departemen Teknik Kimia FTI-ITS.
7. Bapak Gunawan selaku Laboran Laboratorium Teknologi Biokimia.
8. Seluruh dosen, staf, dan karyawan Teknik Kimia FTI-ITS.
9. Rekan-rekan mahasiswa Laboratorium Biokimia.

Penulis menyadari bahwa selama penyusunan Laporan Skripsi ini masih banyak kekurangan yang perlu disempurnakan. Oleh karena itu, kritik dan saran tetap kami harapkan demi tercapainya kesempurnaan dalam penyusunan Laporan Skripsi ini. Akhir kata, semoga Laporan Skripsi ini dapat bermanfaat dan menjadi berkat bagi semua pihak.

Surabaya, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	I-1
I.2 Rumusan Masalah	I-3
I.3 Tujuan Penelitian	I-4
I.4 Manfaat Penelitian	I-4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Potensi Mikroalga dan Bahan Baku Sebagai Biodiesel	II-1
II.2 Faktor-Faktor Pertumbuhan Mikroalga	II-2
II.3 <i>Botryococcus braunii</i>	II-4
II.4 Mutasi Genetika	II-8
II.5 Sinar Ultraviolet (UV)	II-9
II.6 Cara Mengukur Pertumbuhan Mikroalga dengan Metode <i>Counting Chamber</i>	II-10
II.7 Ekstraksi Lipid	II-11
II.8 Lipid	II-12
II.9 Analisa Gas <i>Chromatography</i> (GC)	II-13
II.10 Penelitian Sebelumnya	II-14
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
III.1 Variabel Penelitian	III-1
III.1.1 Kondisi Operasi	III-1
III.1.2 Variabel Penelitian	III-1
III.2 Waktu dan Tempat Penelitian	III-2
III.3 Bahan dan Alat Penelitian	III-2
III.3.1 Bahan Penelitian	III-2

III.3.2 Alat Penelitian.....	III-2
III.4 Kondisi Operasi Penelitian	III-4
III.5 Analisa Penelitian	III-5
III.6 Data yang Dihasilkan	III-5
III.7 Gambar Alat Kultur	III-5
III.8 Tahapan Metode Penelitian.....	III-6
III.8.1 Sterilisasi Bahan dan Alat	III-6
III.8.2 Membuat Nutrien Walne dengan Penurunan Kadar Nitrogen dalam NaNO ₃	III-6
III.8.3 Pre Kultur Mikroalga <i>Botryococcus</i> <i>braunii</i>	III-8
III.8.4 Proses Mutasi Mikroalga dengan Sinar UV-B	III-8
III.8.5 Penambahan CO ₂ dan Siklus Pencahayaannya.....	III-8
III.8.6 Pengukuran Intensitas Cahaya.....	III-10
III.8.7 Analisa Jumlah Sel Mikroorganisme dengan Metode <i>Counting Chamber</i>	III-10
III.8.8 Ekstraksi Lipid	III-11
III.8.9 Analisa GC (<i>Gas Chromatography</i>).....	III-13
III.9 Diagram Alir Penelitian.....	III-13
III.9.1 Pre Kultur Mikroalga <i>Botryococcus</i> <i>braunii</i>	III-13
III.9.2 Pembuatan Nutrien Walne dan Vitamin Mikroalga	III-14
III.9.3 Mutasi Mikroalga dengan Sinar UV-B...	III-14
III.9.4 Penambahan CO ₂ , Siklus Pencahayaannya Dan Variabel Kadar Nitrogen	III-15
III.9.5 Diagram Alir Pengukuran Intensitas Cahaya.....	III-16
III.9.6 Diagram Alir Ekstraksi Lipid	III-16
III.9.7 Analisa GC	III-17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Pre-Kultur <i>B.braunii</i> Alami	IV-1

IV.2 Mutasi <i>B.braunii</i> Alami dan Mutasi Menggunakan Lampu UV-B	IV-2
IV.3 Pre-Kultur <i>B.braunii</i> Alami dan Termutasi UV-B	IV-3
IV.4 Pengaruh Kadar Nitrogen Dalam Nutrien dan Pengaruh Waktu Kultur	IV-5
IV.4.1 Pertumbuhan Sel <i>B.braunii</i> Alami dan Termutasi UV-B Dengan Rendah Nitrogen dalam Nutrien Waktu Kultur 7 Hari dan 20 Hari	IV-5
IV.4.2 Perubahan pH selama 7 Hari dan 20 Hari	IV-9
IV.4.3 Produktivitas Biomassa Variabel Kadar Nitrogen dalam Substrat dan Waktu Kultur	IV-11
IV.4.4 <i>Lipid Content</i> dan Produktivitas Lipid Variabel Kadar Nitrogen dalam Substrat dan Waktu Kultur	IV-14
IV.5 Analisa GC (<i>Gas Chromatography</i>)	IV-18
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan	V-1
V.2 Saran	V-2
DAFTAR PUSTAKA	xiii
DAFTAR NOTASI	xvii
APPENDIKS	A-1

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	<i>Botryococcus braunii</i>	II-5
Gambar II.2	Perhitungan Jumlah Bakteri dengan Hemasitometer	II-11
Gambar II.3	Kandungan Asam Lemak Berbagai Jenis Mikroalga.....	II-3
Gambar III.1	Rangkaian Alat Kultur Mikroalga	III-5
Gambar III.2	Desain Alat Kultur Tampak Atas	III-6
Gambar III.3	Instalasi Alat Mutasi UV-B	III-8
Gambar III.4	Desain Alat untuk Penambahan CO ₂	III-8
Gambar III.5	Alat <i>Lux Meter</i>	III-10
Gambar III.6	Penentuan Titik Hitung pada Hemasitometer.....	III-11
Gambar III.7	Rangkaian Alat Ekstraksi <i>Soxhlet</i>	III-12
Gambar III.8	Rangkaian Alat Distilasi	III-12
Gambar IV.1	Kurva Pertumbuhan <i>B.braunii</i> Per-Kultur 6 Hari	IV-1
Gambar IV.2	Kurva pertumbuhan <i>B.braunii</i> Alami dan Termutasi UV-B Selama 7 hari	IV-4
Gambar IV.3	Grafik Pertumbuhan Sel <i>B.braunii</i> Alami dan Mutasi UV-B dengan Variabel Normal Nitrogen dan Rendah Nitrogen Dalam Nutrien Waktu Kultur 7 Hari dan 20 hari	IV-8
Gambar IV.4	Grafik Perbandingan Konsentrasi Biomassa Variabel kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur	IV-13
Gambar IV.5	Grafik Perbandingan Produktivitas Lipid Variabel Kadar Nitrogen Nutrien dan Waktu Kultur	IV-15
Gambar IV.6	Grafik Perbandingan <i>Lipid Content</i> Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur.....	IV-15

Gambar IV.7	Hasil Analisa GC Lipid <i>B.braunii</i> Alami dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari.....	IV-19
Gambar IV.8	Hasil Analisa GC Lipid <i>B.braunii</i> Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari	IV-20
Gambar IV.9	Hasil Analisa GC Lipid <i>B.braunii</i> Alami dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari.....	IV-21
Gambar IV.10	Hasil Analisa GC Lipid <i>B.braunii</i> Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari	IV-22

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Kandungan Lipid pada Berberapa Jenis Mikroalga.....	II-6
Tabel II.2	Kandungan Asam Lemak pada Beberapa Jenis Mikroalga.....	II-7
Tabel II.3	Tabel Propertis Total Lipid <i>Botryococcus braunii</i>	II-2
Tabel IV.1	Jumlah Sel <i>B.braunii</i> Selama Pre-Kultur 6 Hari.....	IV-1
Tabel IV.2	Jumlah Sel <i>B.braunii</i> Sebelum dan Sesudah Mutasi Menggunakan Sinar UV-B.....	IV-2
Tabel IV.3	Jumlah Sel <i>B.braunii</i> Alami dan Termutasi UV-B Selama 7 Hari Kultur.....	IV-3
Tabel IV.4	Pertumbuhan Sel <i>B.braunii</i> Alami dan Termutasi UV-B Variabel Waktu Kultur 7 Hari dan 20 Hari Dengan Normal Nitrogen dan Rendah Nitrogen Dalam Nutrien.....	IV-6
Tabel IV.5	Perubahan pH Kultur Selama 7 Hari dan 20 Hari.....	IV-10
Tabel IV.6	Perhitungan Konsentrasi Biomassa Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur.....	IV-12
Tabel IV.7	Perhitungan <i>Lipid Content</i> dan Produktivitas Lipid Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur.....	IV-16
Tabel IV.8	Komposisi Senyawa Lipid <i>B.braunii</i> Alami Dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari.....	IV-19
Tabel IV.9	Komposisi Senyawa Lipid <i>B.braunii</i> Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari.....	IV-20
Tabel IV.10	Komposisi Senyawa Lipid <i>B.braunii</i> Alami Dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari.....	IV-21

Tabel IV.11 Komposisi Senyawa Lipid <i>B.braunii</i> Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari	IV-22
--	-------

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang dua pertiga wilayahnya adalah lautan dan mempunyai garis pantai terpanjang di dunia yaitu $\pm 80.791,42$ km (www.energi.lipi.go.id). Di dalam lautan terdapat bermacam-macam makhluk hidup baik berupa tumbuhan air maupun hewan air. Salah satu makhluk hidup yang tumbuh dan berkembang di laut adalah alga. Secara sederhana, alga dikelompokkan ke dalam dua kelompok berdasarkan ukurannya, yaitu mikroalga dan makroalga. Mikroalga merupakan salah satu bahan baku penghasil lipid yang cukup potensial (*Amini, 2010*).

Menurut Verma (2010), mikroalga sebagai sumber energi alternatif memiliki beberapa keuntungan antara lain: (1) Memiliki struktur sel yang sederhana dan kemampuan untuk mengendalikan sel tanpa mengurangi produktivitasnya, (2) Kemampuan berfotosintesis sangat tinggi, sekitar 3-8% sinar matahari mampu dikonversikan menjadi energi dibanding tanaman tingkat tinggi lainnya yang hanya sekitar 0,5%, (3) Memiliki siklus hidup yang pendek ($\pm 1-10$ hari), (4) Kemampuan untuk mensintesis lemak sangat tinggi ($\pm 40-86\%$ berat kering biomassa), (5) Kemampuan bertahan pada kondisi lingkungan yang ekstrim (salinitas tinggi atau lingkungan yang tercemar).

Potensi lipid dalam mikroalga sangat luas, lipid dapat digunakan sebagai bahan bakar alternatif pengganti bahan bakar fosil maupun sebagai perisa alami.

Manipulasi genetika melalui mutagenesis merupakan metode paling efektif untuk meningkatkan produktivitas berbagai mikroorganisme. Selain itu, mutasi pada mikroorganisme dilakukan untuk memperbaiki sifat alami mikroorganisme tersebut. Mikroba yang diradiasi dengan sinar UV-B pada dosis yang tepat akan menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi dibanding yang alami. Hal ini terjadi karena radiasi sinar UV

akan menyebabkan perubahan susunan gen sehingga dihasilkan gen mutan yang dapat menyebabkan peningkatan-peningkatan tertentu pada mikroorganisme (Zul, 2003). Menurut Sharma (2012), dengan kondisi pertumbuhan yang optimal jumlah biomassa yang dihasilkan besar namun kandungannya relatif kecil sehingga untuk mendapatkan kandungan lipid yang tinggi, mikroalga dikondisikan dalam keadaan stress, salah satunya dengan radiasi sinar UV-B. Teori ini telah diuji melalui percobaan oleh Dinny dan Helmi (2016) dimana kandungan lipid pada mikroalga mutan UV-B 1,5 menit 2 kali lipat lebih banyak dibanding mikroalga alami.

Radiasi sinar UV-B mempengaruhi *lipid content* pada fitoplankton. Skerratt et al (1998) menguji radiasi sinar UV-B terhadap beberapa fitoplankton, diantaranya *Odontella weissflogii*, *Chaetoceros simplex*, *Phaeocystis antarctica*. Radiasi UV-B pada *P. antarctica* meningkatkan total lipid, trigliserol dan konsentrasi free fatty acid. Konsentrasi lipid pada *C. Simplex* juga mengalami peningkatan dengan radiasi UV-B dalam konsentrasi tinggi.

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang mampu menggunakan energi matahari untuk menggabungkan air dengan CO₂ untuk membuat suatu biomassa. Telah dilakukan studi mengenai pemanfaatan gas CO₂ terhadap pertumbuhan serta produktivitas lipid pada mikroalga jenis *Chlorella vulgaris*, disebutkan dalam kondisi nutrisi normal produktivitas lipid meningkat seiring dengan meningkatnya kadar CO₂ yang diberikan (Widjaja, 2009). Pada penelitian lain juga disebutkan pada mikroalga jenis *Botryococcus braunii* saat diberi asupan tambahan gas CO₂ sekitar 2-20% tidak memperlihatkan suatu hambatan yang berarti dalam pertumbuhannya, sehingga dapat dikatakan rentang tersebut merupakan rentang yang optimal untuk mempertahankan pertumbuhan mikroalga pada tingkat tertentu (Yaming Ge, 2010).

Intensitas cahaya dan siklus pencahayaan menjadi faktor yang menentukan pertumbuhan mikroalga. Semakin besar

intensitas cahaya dan semakin lama siklus pencahayaan menyebabkan meningkatnya konsentrasi biomassa dan ukuran koloni mikroalga *Botryococcus braunii* (Zhang, 1998).

Konsentrasi nitrogen juga berpengaruh untuk meningkatkan total lipid dalam mikroalga. Penurunan kadar nitrogen dalam substrat pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan masa inkubasi 17 hari menunjukkan bahwa produktivitas lipid mikroalga mengalami peningkatan. Selain itu, penurunan kadar nitrogen dalam substrat mengubah komposisi lipid dari *free fatty acid rich lipid* menjadi lipid dengan banyak kandungan TG, yang nantinya sangat penting untuk proses produksi biodiesel (Widjaja, 2009). Penelitian lain menyebutkan bahwa efek penurunan kadar nitrogen dalam *Botryococcus braunii* dapat mengakibatkan peningkatan komposisi TG dari 8% menjadi 25% dari total lipid yang terkandung (Zhila, 2004).

Berbagai studi telah dilakukan untuk meneliti pengaruh kadar nitrogen dalam substrat terhadap produktivitas lipid mikroalga. Akan tetapi belum ada hasil mengenai pengaruh kadar nitrogen dalam substrat terhadap produktivitas lipid pada mikroalga *Botryococcus braunii* termutasi UV-B. Sehingga, hal tersebut yang mendasari penelitian kami dengan judul:

Pengaruh Kadar Nitrogen Dalam Substrat Terhadap Produktivitas Lipid Mikroalga *Botryococcus braunii* Termutasi UV-B

I.2 Rumusan Masalah

1. Mikroalga penghasil lipid banyak ditemukan seperti *Botryococcus braunii* namun pemanfaatnya belum maksimal.
2. Radiasi dengan menggunakan sinar UV-B berpotensi untuk meningkatkan pertumbuhan sel dan *lipid content* mikroalga.
3. Belum ada laporan mengenai pengaruh kadar nitrogen dalam substrat, CO₂ dan siklus pencahayaan terhadap

produktivitas lipid dan *lipid content Botryococcus braunii* termutasi UV-B.

I.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh mutasi sinar UV-B terhadap pertumbuhan dan produktivitas lipid mikroalga *Botryococcus braunii*.
2. Mengetahui pengaruh kadar nitrogen dalam substrat terhadap produktivitas lipid dan *lipid content* mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan yang telah termutasi sinar UV-B.
3. Mengetahui pengaruh waktu kultur terhadap produktivitas lipid dan *lipid content* mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan yang telah termutasi sinar UV-B.

I.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat mengetahui pengaruh kadar nitrogen dalam substrat terhadap produktivitas lipid dan *lipid content* mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan yang telah termutasi UV-B.
2. Dapat mengetahui pengaruh waktu terhadap produktivitas lipid dan *lipid content* mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan yang telah termutasi UV-B.
3. Dapat dihasilkannya kandungan lipid yang optimum pada mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan termutasi UV-B yang nantinya digunakan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Potensi Mikroalga dan Bahan Baku Sebagai Biodiesel

Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik uniseluler yang menggunakan energi matahari dan karbondioksida untuk memproduksi biomassa. Karena mikroalga tumbuh dalam suspensi berair, sehingga memiliki akses yang lebih efisien terhadap air, CO₂, dan nutrisi lainnya (Widjaja, 2009). Meskipun mikroalga sebagai spesies perairan yang membutuhkan air dalam jumlah yang banyak, namun mikroalga tahan terhadap perairan dengan kondisi yang berkualitas rendah, sehingga air limbah dan air laut dapat digunakan di Indonesia sebagai media budidaya dan daur ulang selama proses berlangsung. Ini merupakan salah satu keuntungan lingkungan yang didapat dari budidaya mikroalga (Su, 2015).

Mikroalga merupakan organisme mikroskopik, uniseluler dan fototropik yang dibagi dalam 3 kategori yaitu Diatoms (*Bacillariophyceae*), *Green algae (Chlorophyceae)* dan *Golden algae (Chrysophyceae)*. Diatoms merupakan bentuk kehidupan dominan yang ada dalam fitoplankton dan mewakili kumpulan terbesar penghasil biomassa di bumi. Alga hijau (*green algae*) banyak ditemukan di air tawar daripada di air laut. *Golden algae* mirip dengan diatoms dan menghasilkan minyak dan karbohidrat (Bharathiraja, 2015).

Mikroalga merupakan sumber biomassa yang dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel. Mikroalga termasuk dalam kelompok mikroorganisme fotosintetik eukariotik dan prokariotik, dengan struktur sederhana yang memungkinkan mereka tumbuh dengan cepat (Faried, 2017). Lipid mikroalga merupakan salah satu komposisi yang berpotensi untuk produksi biodiesel berkelanjutan karena mikroalga memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dan lebih efisien dalam fotosintesis daripada tumbuhan yang lain (Wu, 2013). Beberapa

jenis mikroalga dapat memproduksi hidrokarbon hingga 30-70% berat kering. Mikroalga memiliki kandungan lipid 20-50% bahkan sampai 80%, sehingga mikroalga menjadi sumber potensial untuk biodiesel (Chisti, 2007).

II.2 Faktor-Faktor Pertumbuhan Mikroalga

Faktor pertumbuhan mikroalga mempengaruhi hasil biomassa maupun jenis produk yang diinginkan. Budidaya mikroalga membutuhkan kondisi lingkungan yang sesuai. Untuk peningkatan produktivitas mikroalga maka diperlukan media biakan yang sesuai. Untuk mengoptimalkan perkembangbiakan mikroalga, ada beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga antara lain :

1. Suhu

Temperatur menjadi parameter pertumbuhan mikroalga yang cukup penting karena didasarkan pada tempat tumbuhnya, baik dalam iklim tropis maupun sub tropis. Suhu optimum dan sesuai untuk pertumbuhan mikroalga antara 20-24°C. Namun pada spesies mikroalga tertentu mudah beradaptasi terhadap pertumbuhan pada suhu yang tinggi antara 25-50°C (Fariad, 2017). Suhu dalam media kultur akan mempengaruhi pertumbuhan mikroalga dan produktivitas lipidnya. Mikroalga *B. braunii* memiliki suhu optimal pertumbuhan pada 25-30 °C, dan suhu maksimum pertumbuhan pada 32 °C (Ruangsomboon, 2012).

2. Cahaya

Cahaya merupakan salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Cahaya digunakan mikroalga sebagai sumber energi untuk melakukan proses fotosintesis yang dapat diperoleh langsung dari sinar matahari atau sinar lampu. Intensitas cahaya juga mempengaruhi perkembangbiakan mikroalga. Intensitas cahaya yang rendah menyebabkan penurunan berat kering mikroalga sedangkan intensitas

cahaya yang terlalu tinggi menyebabkan kerusakan struktur kimia pada proses fotosintesis. (*Ruangsonboon, 2012*).

Semakin dalam medium mikroalga, intensitas cahaya yang dibutuhkan juga semakin tinggi. Intensitas cahaya sering disebutkan dalam satuan $\text{microEinsteins/m}^2\text{s}$ atau setara dengan satu mol *photons*. Beberapa satuan lain seperti $\text{micromol/m}^2\text{s}$, Lux dan W/m^2 juga digunakan. Sebagian besar mikroalga tidak dapat tumbuh dengan baik dalam keadaan pencahayaan yang konstan, karena membutuhkan waktu istirahat untuk menyimpan makanan. Terkadang dilakukan manipulasi durasi pencahayaan *light/dark* (L/D) antara lain 16:8, 14:10 atau 12:12 waktu pencahayaan (*Hadiyanto, 2012*).

3. pH

Sebagian besar mikroalga tumbuh pada kondisi pH normal antara 6-8. Akan tetapi beberapa mikroalga jenis *Cyanobacteria* seperti *Spirulina platensis* hanya dapat tumbuh pada kondisi alkali atau basa. Sementara *Chlorella* secara umum dapat hidup dalam kondisi pH antara 7-8 (*Hadiyanto, 2012*).

4. Karbondioksida (CO_2)

CO_2 digunakan oleh mikroalga untuk proses fotosintesis seperti tumbuhan berklorofil yang lainnya. Menurut penelitian Ugwu et al (2008) tentang transfer massa CO_2 pada medium mempengaruhi laju pertumbuhan mikroalga. Namun tingginya kadar CO_2 dalam medium juga dapat mempengaruhi pH. Kong et al (2010) melakukan penelitian dan mendapatkan hasil bahwa semakin tinggi kadar CO_2 diatas 33% dari komposisi udara normal, laju pertumbuhan mikroalga menjadi terhambat. (*Hadiyanto, 2012*). Konsentrasi CO_2 di udara hanya sekitar 0,03% dan tidak cukup bagi pertumbuhan mikroalga sehingga diperlukan penambahan

CO₂ murni pada proses kultur mikroalga (*Yaming Ge, 2011*).

5. Nitrogen

Mikroalga dapat memanfaatkan sumber nitrat, ammonia atau nitrogen organik seperti urea. Secara garis besar nitrogen mempengaruhi pertumbuhan dari sel mikroalga seperti kandungan lipid dan protein. (Becker, 2003). Nitrogen adalah unsur fungsional dan struktural pembentuk protein dalam sel alga dan menyumbang 7-20 % berat kering sel. Defisiensi nitrogen dalam kultur alga meningkatkan biosintesis dan akumulasi lipid. Keterbatasan nitrogen dapat dianggap sebagai tekanan lingkungan yang efisien untuk meningkatkan akumulasi lemak (Kalla, 2016). Pada kondisi dimana kadar nitrogen kecil, maka produksi lipid pada sel akan bertambah banyak, keadaan ini biasa disebut *Nitrogen Starvation* (*Eugenia, 2003*).

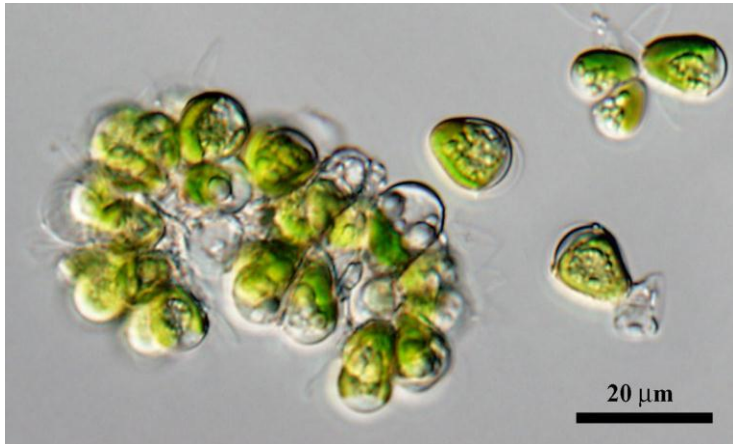
6. Salinitas

Salinitas merupakan faktor lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan komponen biokimia mikroalga. Mikroalga *B. braunii* dapat tumbuh pada kisaran 0-25 ppt dan tumbuh subur pada 10 ppt. Dalam penelitian lebih lanjut dikemukakan bahwa kelimpahan dan laju pertumbuhan *B. braunii* tertinggi terjadi pada salinitas 5 ppt yaitu dengan kelimpahan 6,9 log sel/mL dan laju pertumbuhan 1,9/hari (*Sri Amini, 2010*).

II.3 *Botryococcus braunii*

Mikroalga yang dapat diolah menjadi biodiesel salah satunya adalah *Botryococcus braunii*. *B. braunii* adalah mikroalga sel tunggal berwarna hijau dari kelas *Chlorophyceae* yang hidup di lingkungan air tawar sampai air laut. Kandungan klorofil *B. braunii* mencapai $\pm 1,5\%$ - $2,8\%$ terdiri dari klorofil a, b, c yang akan terlihat berwarna hijau-coklat kekuningan. *B. braunii*

memiliki inti sel dengan ukuran $\pm 15\text{-}20\ \mu\text{m}$ dan berkoloni, bersifat non-motil dan setiap pergerakannya sangat dipengaruhi oleh arus perairan (Saputro, 2015).



Gambar II.1 *Botryococcus braunii*

Botryococcus braunii kaya hidrokarbon hingga mencapai 15–76% berat kering. Hidrokarbon rantai panjang dalam bentuk minyak dari spesies ini dikenal dengan nama *botryococcene* dan sangat potensial sebagai sumber energi atau biodiesel. Kandungan lipid spesies *Botryococcus braunii* dapat melebihi kandungan lipid pada tanaman lainnya seperti kelapa, jarak, dan sawit. Kandungan lipid yang tinggi mengindikasikan kandungan senyawa asam lemak bebas (*free fatty acid*) yang tinggi dalam mikroalga. Semakin banyak kandungan FFA dalam suatu bahan, maka semakin besar pula biodiesel yang dihasilkan (Sri Amini, 2014).

Tabel II.1 Kandungan Lipid pada Beberapa Jenis Mikroalga

Jenis Mikroalga	Kandungan Lipid (% berat kering)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

(Chisti, 2007)

Kandungan lipid pada mikroalga dapat melebihi 80% berat biomassa kering. Kandungan lipid 20-50% adalah yang paling umum, dengan kandungan lipid *Botryococcus braunii* yang merupakan salah satu yang terbesar yaitu 20-75% berat kering. Produktivitas lipid yaitu massa lipid yang dihasilkan per satuan volume mikroalga per hari, tergantung tingkat pertumbuhan mikroalga, adalah salah satu faktor dalam memproduksi biodiesel (Chisti, 2007).

Tabel II.2 Kandungan Asam Lemak pada Beberapa Jenis Mikroalga

Jenis asam lemak	Kandungan asam lemak (%)						
	<i>Chlorella sp</i>	<i>Dunaliella sp</i>	<i>Nannocloropsis</i>	<i>Porphyridium</i>	<i>Spirulina sp</i>	<i>Tetraselmis</i>	<i>B. braunii</i>
As. miristat (C14:0)	6,71	8,12	87,35	6,90	11,64	5,37	3,04
As. palmitat (C16:0)	5,95	6,43	20,05	6,04	10,34	6,82	14,11
As. stearat (C18:0)	4,25	8,21	16,68	7,82	8,74	2,17	9,06
As. oleat (C18:1)	24,27	64,20	101,50	26,64	32,76	24,21	14,04
As. linoleat (C18:2)	5,58	32,48	49,02	10,76	21,27	21,07	0,27

(Sri Amini, 2010)

Lipid mikroalga memiliki kandungan asam lemak bebas (FFA) yang cukup tinggi. Jenis *fatty acid* yang terdapat pada lipid *B. braunii* didominasi oleh asam oleat dan palmitat. Melalui proses esterifikasi dan transesterifikasi biomassa, lipid mikroalga dapat diubah menjadi biodiesel (Faried, 2017). Berikut adalah properti total lipid di dalam mikroalga *Botryococcus braunii* :

Tabel II.3 Tabel Propertis Total Lipid *Botryococcus braunii*

Propertis	Nilai
<i>Hydrocarbon content</i>	22,6 wt %
<i>Total lipid content</i>	51,5 wt %
<i>Saponification value</i>	184
<i>Free fatty acids</i>	9,7 wt %
<i>Ester value</i>	163
<i>Iodine value</i>	92
<i>Carotenes and pigments</i>	8,2 wt %
<i>Ash content</i>	0,0001 wt %

<i>Moisture (wt%)</i>	0,019
<i>Average molecular weight of total lipid fraction</i>	920 g/mol

(Faried, 2017)

Proses kultur dapat menghasilkan bervariasi komposisi dan kadar lipid mikroalga yang bergantung pada kondisi seperti suhu, nutrisi, dan intensitas cahaya. Suhu adalah salah satu faktor paling penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan jenis asam lemak yang diproduksi oleh mikroalga. Banyak jenis mikroalga dengan peningkatan asam lemak tak jenuh pada suhu yang cenderung rendah dan peningkatan asam lemak jenuh suhu yang tinggi. Produktivitas biomassa, kandungan lipid, dan produktivitas lipid adalah beberapa parameter utama yang dapat mempengaruhi kelayakan ekonomi mikroalga untuk produksi biodiesel.

II.4 Mutasi Genetika

Mutasi dapat terbentuk dari pengaruh fisik dan kimia, tetapi juga oleh kesalahan yang kebetulan terjadi pada replikasi atau rekombinasi DNA. Diantara mutagen fisik yang perlu disebutkan adalah penyinaran ionisasi. Molekul-molekul tersebut mampu bereaksi secara ekstrim dan dapat merusak DNA. Juga sinar UV, gelombang pendek punya pengaruh mutagenik yang menyerang sel kulit. Perubahan kimia yang paling sering akibat UV adalah pembentukan dimer timin. Dua basa timin yang berdampingan saling berikatan secara kovalen membentuk anyaman seperti jala. Hal ini menyebabkan kesalahan dalam pembacaan DNA pada replikasi dan transkripsi. Teknik mutasi tidak begitu sulit. Sel-sel yang akan dimutasi dilarutkan pada larutan yang mengandung mutagen atau dipaparkan pada radiasi selama beberapa menit, kemudian dibersihkan.

Teknik mutasi tidak begitu sulit. Sel-sel yang akan dimutasi dilarutkan pada larutan yang mengandung mutagen atau dipaparkan pada radiasi selama beberapa menit, kemudian

dibersihkan. Hasil mutasi dapat dideteksi dengan cara mengamati berbagai sifat morfologi, sifat fisiologis seperti ketahanan terhadap perubahan lingkungan, kemampuan mengolah substrat atau kemampuan menghasilkan metabolit tertentu (*Smith, 1992*).

UV-B adalah faktor lingkungan yang memiliki efek penting pada pertumbuhan dan perkembangan, biomassa, fotosintesis, pigmen, protein dan DNA, aktivasi enzim pada mikroalga. Mikroalga membentuk mekanisme perlindungan khusus untuk mengakomodasi radiasi UV-B yang disempurnakan. Mutasi dengan menggunakan radiasi UV-B dapat memiliki dua efek pada mikroalga, di satu sisi mikroalga rusak akibat radiasi sinar UV-B tetapi disisi lain mikroalga menunjukkan mekanisme perlindungan atau pertahanan untuk mengakomodasi pemaparan terhadap peningkatan radiasi UV-B. Radiasi sinar UV-B mempengaruhi pertumbuhan, kelangsungan hidup, pigmentasi, metabolisme, dan fotosintesis dalam mikroalga. Efek ini sebagian karena dampak langsung radiasi UV-B pada protein membran, DNA, enzim, atau pigmen. Peningkatan UV-B umumnya menurunkan kadar klorofil, dimana peningkatan radiasi UV-B menyerap banyak komponen dalam mikroalga. Penurunan fotosintesis, terutama pada dosis UV-B yang lebih tinggi disebabkan oleh efek langsung yaitu efek pada fotosistem dan efek tidak langsung yaitu penurunan efek. Penurunan pigmen klorofil dan fotosintesis menghasilkan biomassa yang lebih rendah. (*Xue, 2005*).

II.5 Sinar Ultraviolet (UV)

Sinar Ultraviolet (UV) merupakan salah satu sinar dengan daya radiasi yang dapat bersifat letal bagi mikroorganisme. Sinar UV mempunyai panjang gelombang 4-400 nm dengan efisiensi tertinggi untuk pengendalian mikroorganisme pada 365 nm. Salah satu sifat sinar UV adalah daya penetrasi yang sangat rendah. Selapis kaca tipis sudah mampu menahan sebagian besar sinar UV. Oleh karena itu, sinar UV hanya dapat efektif untuk mengendalikan mikroorganisme pada permukaan yang terpapar

langsung oleh sinar UV, atau mikroba berada di dekat permukaan medium yang transparan (www.litbang.depkes.go.id, 2006). Gelombang Ultraviolet dibagi menjadi 3, yaitu:

- UV-A

Panjang gelombang dari Ultraviolet ini 315 - 400 nm. Namun pada kisaran 380-400 nm, sinar ini tampak oleh mata, sebab pada kisaran tersebut, masih disebut cahaya ungu (violet). Dari semua jenis Ultraviolet, UV-A memiliki energi paling kecil namun memiliki panjang gelombang terpanjang.

- UV-B

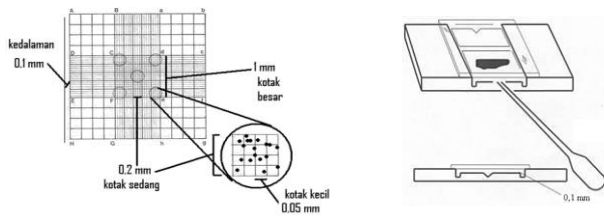
Panjang gelombang dari gelombang ini antara 280-315 nm. Kemampuan membunuh mikroorganisme sudah dapat dilakukan pada UV jenis ini. Namun tidak sempurna, artinya mikroorganisme masih dapat berkembang biak walaupun terjadi cacat pada bagian tubuhnya. Kemampuan UV-B ini hanya sampai merusak dinding sel mikroorganisme.

- UV-C

Memiliki panjang gelombang antara 100-280 nm. Bersifat germicidal. Namun, atmosfer bumi tidak dapat ditembus oleh UV jenis ini. Hal ini dikarenakan foton pada UV-C akan berinteraksi dengan Oksigen (O₂).

II.6 Cara Mengukur Pertumbuhan Mikroalga dengan Metode *Counting Chamber*

Salah satu cara menentukan konsentrasi sel suatu mikroorganisme adalah dengan menggunakan metode *counting chamber*. Metode ini menggunakan alat hemasitometer dan mikroskop. Hemasitometer merupakan alat yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah sel dalam milimeter kubik (mm³) dimana sel yang akan diukur harus diencerkan terlebih dahulu. Penentuan jumlah sel menggunakan alat ini dilakukan dengan meletakkan hemasitometer pada meja obyek mikroskop dan dengan menggunakan perbesaran obyektif, dapat dihitung jumlah sel yang ada (*Benson, 2001*).



Gambar II.2 Perhitungan Jumlah Sel dengan Hemasitometer

Langkah awal dalam metode ini adalah dengan membuat seri pengenceran sampel yang selanjutnya jumlah koloni sampel diamati menggunakan mikroskop. Dalam melakukan penghitungan ini, mula-mula hemasitometer dibersihkan dengan aquadest agar pengamatan dapat dilakukan dengan jelas. Kemudian meneteskan setetes suspensi sampel pada hemasitometer, lalu ditutup dengan *deck glass*. Setelah itu meletakkan hemasitometer pada meja obyek mikroskop dan dilakukan pengamatan dengan perbesaran obyektif 100x. Posisi hemasitometer dan pencahayaan mikroskop diatur hingga terlihat garis-garis dan kotak-kotak hemasitometer. Kemudian menentukan 5 kotak untuk menghitung jumlah sel pada kotak-kotak tersebut. Jumlah mikroorganisme dalam sampel ditentukan dengan mengalikan jumlah koloni yang teramati dengan faktor pengenceran.

II.7 Ekstraksi Lipid

Metode ekstraksi lipid bisa dilakukan dengan beberapa cara seperti berikut:

- Metode Ekstraksi

Minyak dari alga dapat di ekstrak dengan menggunakan larutan kimia, misalnya dengan menggunakan benzena, ether, dan heksana. Penggunaan larutan kimia heksana lebih banyak digunakan sebab harganya tidak terlalu mahal. Menurut Amini (2005), larutan heksana dapat digunakan langsung untuk mengekstraksi minyak dari alga. Setelah proses ekstraksi, larutan ekstrak yang terdiri

dari campuran heksan dan minyak kemudian dipisahkan dengan menggunakan distilasi sederhana yang menggunakan kondensor.

- Metode Mekanik

Metode mekanik terdiri dari metode pengepresan (*expeller/press*) dan *ultrasonic-assisted extraction*. Pada metode pengepresan (*expeller/press*) alga yang sudah siap panen dikeringkan terlebih dahulu untuk mengurangi kadar air yang masih pada biomassa. Selanjutnya dilakukan pengepresan biomassa dengan alat pengepres untuk mengekstraksi minyak yang terkandung dalam alga. Dengan menggunakan alat pengepres ini, dapat di ekstraksi sekitar 70–75% minyak yang terkandung dalam alga. Pada prinsipnya metode *ultrasonic-assisted extraction* menggunakan reaktor ultrasonik. Gelombang ultrasonik digunakan untuk membuat gelembung kavitasi (*cavitation bubbles*) pada material larutan. Ketika gelembung pecah dekat dengan dinding sel maka akan terbentuk gelombang kejut dan pancaran cairan (*liquid jets*) yang akan membuat dinding sel pecah. Pecahnya dinding sel akan membuat komponen di dalam sel keluar bercampur dengan larutan (Sri Amini, 2010).

II.8 Lipid

Lipid adalah biomolekul yang tidak larut dalam air, karena lipid merupakan molekul yang memiliki gugus non polar. Lipid dapat larut di dalam pelarut organik non polar seperti benzena, eter, heksana, dan metanol. Lipid dapat dikelompokkan berdasarkan struktur dan karakteristik non polar menjadi lemak (*fat*), lilin, fosfolipid, sfingolipid, glikolipid, eikosanoat, steroid, lipoprotein, dan vitamin yang larut dalam lemak. Lipid juga dikelompokkan berdasarkan gugus polar dan non polar. Lipid yang hanya mengandung gugus non polar disebut lipid non polar atau lipid netral, sebagai contoh kelompok lemak (*fat*). Lipid non polar berperan dalam metabolisme, khususnya sebagai cadangan

energi. Lipid yang mengandung gugus polar dan non polar disebut gugus polar, sebagai contoh fosfolipid. Lipid berperan di dalam membran sel dan membran organel untuk melindungi isi sel dan organel dari lingkungan luar sel.

Triasilgliserol (TAG) merupakan lipid yang terdiri atas gliserol polihidroksi alkohol dan asam karboksilat berantai panjang (asam lemak) dan banyak ditemukan di alam. Triasilgliserol yang banyak mengandung asam lemak jenuh, berbentuk padat pada suhu ruang, dan memiliki titik cair tinggi disebut lemak. Triasilgliserol yang banyak mengandung asam lemak tidak jenuh, berbentuk cair pada suhu ruang, dan memiliki titik cair rendah disebut minyak. Lipid yang umumnya diakumulasi oleh mikroorganisme adalah TAG, karena TAG merupakan komponen utama cadangan energi dalam sel. Monoasilgliserol (MAG) adalah esterifikasi pada satu gugus hidroksil gliserol gliserol, sedangkan diasilgliserol (DAG) merupakan esterifikasi pada dua gugus hidroksil gliserol.

Sebagian besar lipid tersusun atas asam lemak. Asam lemak umumnya merupakan asam monokarboksilat berantai lurus dengan jumlah atom karbon sebanyak 4-36. Asam lemak dapat dibagi menjadi dua berdasarkan ada tidaknya ikatan rangkap karbon-karbon, yaitu asam lemak jenuh dan tidak jenuh. Asam lemak jenuh tidak memiliki ikatan rangkap karbon-karbon. Asam lemak tidak jenuh memiliki ikatan rangkap karbon-karbon. Menurut Ratledge (2002) lipid mikroorganisme lebih banyak mengandung asam lemak tidak jenuh. Asam lemak jenuh tidak dapat mengalami proses penambahan atom hidrogen pada rantai hidrokarbon atau hidrogenasi. (Suryani, 2008).

II.9 Analisa Gas Chromatography (GC)

Gas Chromatography merupakan salah satu metode pemisahan yang paling penting dan paling ekonomis dibanding semua metode pemisahan yang lain. Rentang aplikasi dari GC meliputi analisis gas alam sampai produk petroleum berat (rantai karbon sampai C130), oligosakarida, lipid, dan lain-lain. Analisa

GC (*Gas Chromatography*) merupakan teknik pemisahan yang didasarkan pada distribusi dari komponen untuk dipisahkan menggunakan sistem 2 fase yaitu solid atau liquid (fase diam) dan gas (fase bergerak).

Dalam melakukan analisa, sampel diinjeksikan melalui injector dan komponen yang menguap dibawa menuju ke kolom, dimana pemisahan terjadi. Kolom diletakkan dalam oven dan temperatur bisa dijaga konstan (*isothermal operation*) atau diprogramkan (*temperature-programmed operation*). Setelah pemisahan, berkas komponen meninggalkan kolom dan terekam sebagai fungsi waktu (kromatogram) oleh alat pendeteksi. Hasil *residence time* dari komponen dapat digunakan untuk penafsiran secara kualitatif atau identifikasi komponen. Respon detektor sebanding dengan jumlah komponen sampel yang dipisahkan dan memberikan informasi kuantitatif terhadap komposisi campuran (*Gunzler, 2001*).

II.10 Penelitian Sebelumnya

- Arief Widjaja, pada tahun 2009 melakukan penelitian berjudul *Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae Chlorella vulgaris*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga seperti kadar konsentrasi CO₂, pengurangan nitrogen, waktu pemanenan, serta jenis ekstraksi yang digunakan. Kadar konsentrasi CO₂ yang digunakan yaitu 0 mL/menit; 20 mL/menit; 50 mL/menit; dan 200 mL/menit. Mikroalga yang telah ditambahkan CO₂ kemudian dikultur selama 15 hari dan dilakukan analisa *Optical Density* (OD) setiap 24 jam.

Berdasarkan hasil percobaan, dapat disimpulkan bahwa mikroalga dengan penambahan kadar konsentrasi CO₂ memiliki nilai *Optical Density* (OD) yang cenderung lebih tinggi dibanding mikroalga alami (tanpa penambahan CO₂), dan nilai *Optical Density* (OD) yang

paling baik ditunjukkan oleh penambahan kadar CO₂ sebanyak 50 mL/menit.

- Zul, Delita, dkk pada tahun 2003, melakukan penelitian berjudul **Mutagenesis pada *Kluyveromyces marxianus* T-2 penghasil Inulinase Ekstraselular dengan Sinar Ultra Violet**. Penelitian dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama merupakan mutagenesis *K. marxianus* T-2 dengan sinar uv berpanjang gelombang 254 nm pada berbagai jarak dan waktu radiasi. Panjang gelombang 254 nm dipilih karena penyerapan maksimum DNA terjadi pada panjang gelombang tersebut. Tahap kedua adalah produksi inulinase ekstraselular dari mutan *K. marxianus* T-2 yang diperoleh dari tahap pertama.

Hasil percobaan yang didukung dengan analisis statistik menunjukkan bahwa mutagenesis telah menyebabkan pertumbuhan mutan lebih baik dibandingkan tipe liar. Mutagenesis dengan sinar UV pada *K.marxianus* T-2 menyebabkan penurunan persentase sel hidup, peningkatan pertumbuhan diameter koloni mutan, aktivitas spesifik inulinase ekstraselular, dan penambahan berat kering sel.

Diameter koloni terbesar (8,66 mm), aktivitas spesifik inulinase ekstraselular tertinggi (0,094 U/mg), dan berat kering sel tertinggi (2,37 mg/mL) dihasilkan oleh mutan *K. marxianus* T-2 yang diradiasi pada jarak 30 cm dengan waktu 60 detik.

- Jennifer et al, pada tahun 1998 melakukan penelitian berjudul ***Effect of UV-B on Lipid Content of Three Antarctic Marine Phytoplankton***. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perubahan spesies terutama kadar lipid dan komposisi terhadap penyinaran sinar UV-B baik yang rendah maupun tinggi terhadap 3 fitoplankton antartika. Hasil yang didapat bahwa pada fitoplankton laut kadar lipid per sel nya meningkat ketika

disinari UV-B tingkat tinggi yang disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi *free fatty acid* dan mungkin menunjukkan degradasi lipid yang kompleks selama proses penyinaran UV-B tingkat tinggi.

- Rao, A. Ranga,dkk, pada tahun 2012,melakukan penelitian berjudul ***Cultivation of green alga Botryococcus braunii in Raceway, Circular Ponds Under Outdoor Conditions and Its Growth, Hydrocarbon Production.*** Penelitian ini menggunakan Metode mikro stain alga yaitu strains *B.braunii* yang diperoleh dari pembudidayaan *B. braunii* yang diperoleh dari pembudidayaan dari UTEX culture. Kemudian inokulasi 25% *Botryococcus braunii* (panjang 1,13 m; lebar 0,6 m; lebar 0,3 m) di bawah kondisi agitasi 15 rpm.

Proses kulvitasi dilakukan selama 18 hari serta digunakan Analisa Estimasi Volum *B. braunii* hasil sisa ekstrak dengan methanol di ulang-ulang. Kemudian membaca absorbansi ekstrak pada 645 dan 661,5 nm.

Dapat disimpulkan bahwa *Botryococcus braunii* akan memproduksi hidrokarbon dan seluruhnya untuk memperbaiki metode pengolahan dan memfokuskan pengolahan *Botryococcus braunii* dibawah kondisi pertumbuhan.

- Mukti Mulyawan dan Eny Setyowati, pada tahun 2015 melakukan penelitian berjudul **Pengaruh Mutagen Sinar UV-B dan HNO₂ terhadap Pertumbuhan Mikroalga *Botryococcus braunii*.** Pada penelitian ini, dilakukan mutasi terhadap *B.braunii* dengan mutagen HNO₂ dan sinar UV-B. Mutasi dengan sinar UV-B dilakukan dengan beberapa variabel *exposure time*, yaitu 1,5 menit, 3 menit, dan 30 menit. Untuk mutasi dengan HNO₂ pada *B.braunii* dilakukan dengan cara menambahkan HNO₂ sebanyak 20 ml pada media tumbuh mikroalga (perbandingan 1:1 untuk HNO₂ dan mikroalga alami).

Lalu ditambahkan air laut sebanyak 80 ml dengan perbandingan 1:4.

Dapat disimpulkan bahwa mutagenesis dapat menaikkan produktivitas jumlah sel. Dari semua variabel mutasi, proses mutasi UV-B dengan lama paparan 1,5 menit merupakan dosis terbaik yang dibuktikan dengan produktivitas sel yang lebih baik jika dibandingkan dengan variabel lama paparan yang lain.

- Galih Hariseno dan Alfi Nuristiandari, pada tahun 2015 melakukan penelitian yang berjudul **Pengaruh Mutagen HNO₂ dan Sinar UV-B terhadap Pertumbuhan dan Produktivitas Lipid Mikroalga**. Pada penelitian ini dilakukan mutasi terhadap *Botryococcus braunii* dan *Chlorella vulgaris* dengan menggunakan sinar UV-B dan HNO₂. Penelitian ini menggunakan prosedur yang sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Mukti 2015 dengan hasil yang serupa dimana dosis paparan UV-B selama 1,5 menit merupakan yang terbaik. Akan tetapi untuk mikroalga *Chlorella vulgaris* tidak menunjukkan adanya peningkatan produktivitas sel setelah dilakukan mutasi dibanding sel alaminya.
- Muhammad Helmi Faisal dan Dinny Amrina Maharani, pada tahun 2016 telah melakukan penelitian yang berjudul **Pengaruh Kadar CO₂ terhadap Pertumbuhan dan Produktivitas Lipid Mikroalga *Botryococcus braunii* Termutasi UV-B**. Variabel waktu paparan sinar UV-B sama dengan yang dilakukan Mukti Mulyawan dan Eny Setyowati pada tahun 2015, sedangkan variabel konsentrasi CO₂ yang digunakan yaitu 0 mL/menit, 50 mL/menit dan 200 mL/menit.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Penambahan CO₂ pada mikroalga mutan mempunyai tingkat pertumbuhan sel lebih baik dibanding penambahan CO₂ pada mikroalga alami dan produktivitas

lipid paling tinggi dihasilkan oleh mikroalga mutan 1,5 menit sebesar 0,340 (mg/mL)/hari. Hal ini menunjukkan bahwa mutagen UV-B dengan *exposure time* 1,5 menit merupakan mutagen yang paling efektif untuk meningkatkan produktivitas lipid.

- Cecilia dan Wahyu Dwi Kristian, pada tahun 2017 telah melakukan penelitian yang berjudul **Pengaruh Siklus Pencahayaan terhadap Pertumbuhan dan Produktivitas Lipid Mikroalga *Botryococcus braunii* Termutasi UV-B dan Alami**. Penelitian ini menggunakan variabel siklus pencahayaan (terang : gelap) yaitu 12 jam : 12 jam ; 16 jam : 8 jam ; dan 24 jam : 0 jam. Sedangkan variabel mikroalga yang digunakan yaitu *Botryococcus braunii* yang telah termutasi UV-B dan alami.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa siklus pencahayaan (terang : gelap) 24 : 0 jam memiliki pertumbuhan sel paling pesat pada mikroalga alami daripada siklus pencahayaan 12 : 12 jam pada mikroalga mutan dan produktivitas lipid paling tinggi dihasilkan oleh mikroalga alami variabel 24 : 0 jam. Hal ini menunjukkan bahwa siklus pencahayaan 24 : 0 jam pada mikroalga alami merupakan mikroalga yang paling efektif untuk meningkatkan pertumbuhan sel dan produktivitas lipid.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kadar nitrogen terhadap pertumbuhan dan produktivitas lipid mikroalga *Botryococcus braunii* termutasi UV-B dan alami. Penelitian diawali dengan melakukan proses prekulturan mikroalga, kemudian melakukan mutasi menggunakan sinar UV-B, dilanjutkan dengan perlakuan kondisi operasi berupa aerasi udara, penambahan CO₂ dan siklus pencahayaan optimum dari penelitian sebelumnya serta perlakuan variabel pemberian nutrient dengan kadar nitrogen normal dan penurunan kadar nitrogen dalam nutrient dengan waktu kultur selama 7 hari dan 20 hari. Kemudian dilakukan pemanenan, pemisahan biomassa mikroalga dari media kultur dengan bantuan *centrifuge* dan ekstraksi lipid. Untuk mengetahui kandungan asam lemak bebas dan trigliserida (FFA dan TG) yang dihasilkan oleh mikroalga dilakukan analisa GC (*Gas Chromatography*).

III.1 Variabel Penelitian

III.1.1 Kondisi Operasi

1. Intensitas cahaya 6.000 lux, jarak 3 cm dari wadah mikroalga.
2. Siklus pencahayaan (gelap: terang) = 24 jam : 0 jam
3. *Flowrate* CO₂ murni = 50 mL/min
4. Aerasi udara = 2,5 L/min
5. Suhu 30 °C

III.1.2 Variabel Penelitian

1. Mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan termutasi UV-B.
2. Nutrient Walne normal dengan komposisi NaNO₃ 100 mg/L.
Nutrient Walne penurunan kadar nitrogen dengan komposisi NaNO₃ 0,03 mg/L.
3. Waktu kultur : 7 hari dan 20 hari.

III.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2017 – Desember 2017. Proses budidaya kultur mikroalga, analisa jumlah sel, ekstraksi lipid dan analisa GC (*Gas Chromatography*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Jurusan Teknik Kimia, ITS Surabaya. Pengukuran kadar salinitas air laut dilakukan di Laboratorium Teknologi Air dan Konsultasi Industri, Departemen Teknik Kimia ITS Surabaya.

III.3 Bahan dan Alat Penelitian

III.3.1 Bahan Penelitian

1. Bibit mikroalga *Botryococcus braunii* (Balai Budidaya Air Payau Situbondo, Jawa Timur).
2. *Aquadest*.
3. Air laut (Situbondo Surabaya).
4. Nutrien Walne normal, yang memiliki komposisi per 1 Liter pelarut mengacu pada Isnansetyo & Kurniastuty (1995): 100 mg/L NaNO_3 , 45 mg/L Na_2EDTA ; 33,6 mg/L H_3BO_3 ; 20 mg/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,3 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,36 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/L Vitamin B1; 0,005 mg/L Vitamin B12.
Dan nutrient walne dengan penurunan kadar nitorgen yang memiliki komposisi per 1 Liter pelarut: 0,03 mg/L NaNO_3 , 45 mg/L Na_2EDTA ; 33,6 mg/L H_3BO_3 ; 20 mg/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,3 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,36 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg/L Vitamin B1; 0,005 mg/L Vitamin B12.
5. Gas CO_2 (Aneka Gas, Sidoarjo).
6. Pelarut n-hexan.

III.3.2 Alat Penelitian

- **Perlengkapan Dasar**
 1. Erlenmeyer 500 mL
 2. *Beaker glass* 5 L
 3. Pipet ukur 10 mL

4. Pipet tetes
 5. Corong kaca
 6. Kertas pH
 7. Gelas ukur 100 mL
- **Kultur Mikroalga**
 1. *Autoclave* (Astell Scientific, Inggris)
 2. Aerator
 3. Lampu *Fluorescent* Putih 21 W (Glorious TS, China)
 4. Lux Meter Lutron LX-105 (Taipei, Taiwan)
 - **Mutasi**
 1. Lampu UV-B 20 W (Evaco F 20T0 GL – Prancis)
 2. *Petridish*
 - **Peralatan Perhitungan Jumlah Sel**
 1. *Biological Microscope* (Novel, China)
 2. Hemasitometer (Brand – Jerman)
 - **Ekstraksi dan Pemisahan Lipid**
 1. *Centrifuge* (Hermle, Jerman)
 2. Botol *Centrifuge*
 3. *Analitical Balance* (Ohaus, China)
 4. *Round Bottom Flask* 500 mL (Schott Duran)
 5. Ekstraktor *Soxhlet* (Brand Germany)
 6. *Condensor reflux*
 7. *Filter Paper* (Whatman)
 8. Oven (Sheldon, USA)
 9. *Hot plate* 34530 (Snijders)
 10. Labu distilasi 500 mL (Iwaki Pyrex)
 11. *Condensor liebig*
 - **Analisa GC**
 1. Shimadzu GC-2010
 2. Kolom Agilent ZB-5HT

III.4 Kondisi Operasi Penelitian

Tahap I : Kultur *Botryococcus braunii* Alami dan Termutasi UV-B

1. Mikroalga *Botryococcus braunii* berasal dari Balai Budidaya Air Payau, Situbondo
2. Kondisi tumbuh *Botryococcus braunii* termutasi UV-B
 - Volume masing-masing 500 mL
 - Salinitas air laut dalam chloride 15600 mg/l
 - Suhu (27 – 31 °C)
 - Intensitas cahaya 6.000 lux
 - Waktu kultur 7 hari dan 20 hari
3. Kondisi operasi penambahan udara aerasi, CO₂, siklus pencahayaan dan penurunan kadar nitrogen
 - Mikroalga *Botryococcus braunii* alami dan termutasi UV-B masing-masing sebanyak 500 mL
 - Penambahan kadar CO₂ = 50 mL/menit
 - Rasio pencahayaan terang : gelap = 24 : 0 jam
 - 0,5 ml Nutrien Walne normal dan 0,5 ml Nutrien Walne dengan penurunan nitrogen dalam NaNO₃ setiap 24 jam
 - Waktu kultur : 7 hari dan 20 hari

Tahap II : Ekstraksi Lipid

1. Kondisi operasi ekstraksi *soxhlet*
 - Waktu ekstraksi : 6 jam
 - Pelarut : n-heksan 150 mL
 - Suhu operasi : 70 °C
 - Menggunakan air pendingin dengan suhu 10-15 °C
2. Kondisi operasi distilasi
 - Suhu operasi : 70 °C
 - Waktu distilasi : 2 jam

- Menggunakan air pendingin dengan suhu 10-15 °C

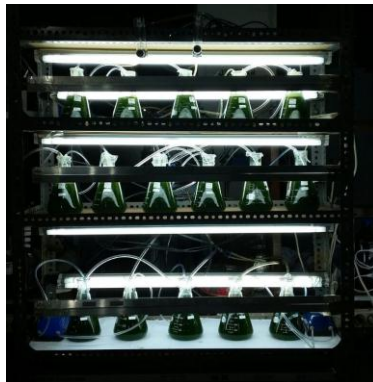
III.5 Analisa Penelitian

- a. Analisa kadar salinitas air laut menggunakan metode argentometri.
- b. Analisa intensitas cahaya menggunakan *lux meter*.
- c. Pengecekan pH menggunakan kertas pH (tiap 24 jam).
- d. Analisa jumlah sel dengan metode *counting chamber* (tiap 24 jam).
- e. Analisa kandungan lipid menggunakan GC (*Gas Chromatography*).

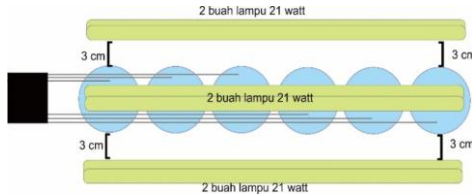
III.6 Data yang Dihasilkan

- Pertumbuhan *Botryococcus braunii*
- Perubahan pH
- Perbandingan sel akhir dan sel awal
- Perbandingan sel akhir mutan dengan sel akhir alami
- Perbandingan biomassa dari *Botryococcus braunii*
- Kandungan lipid dari *Botryococcus braunii*
- Analisa kuantitatif lipid menggunakan GC

III.7 Gambar Alat Kultur



Gambar III.1 Rangkaian Alat Kultur Mikroalga



Gambar III.2 Desain Alat Kultur Tampak Atas

Desain alat kultur pada penelitian ini, mikroalga ditempatkan pada *beaker glass* ukuran 500 mL yang ditutup menggunakan *plastic wrap* bening untuk menghindari kontaminasi. Diberikan sirkulasi udara (dari aerator melalui selang-selang) di dalamnya. Lampu *fluorescence* dipasang pada posisi atas, depan dan belakang dari wadah mikroalga dengan jarak 3 cm.

III.8 Tahapan Metode Penelitian

III.8.1 Sterilisasi Bahan dan Alat

Air laut yang digunakan untuk kultur sebanyak 250 mL pada setiap media kultur dituangkan dalam *beaker glass* berukuran 500 mL, kemudian disegel dan disterilisasi dengan *autoclave* pada temperatur 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15-20 menit, begitu pula dengan alat-alat yang akan digunakan seperti erlenmeyer ukuran 500 mL tempat media kultur, *petridish* serta alat-alat lain disterilisasi dengan cara yang sama.

III.8.2 Membuat Nutrien Walne dengan Penurunan Kadar Nitrogen dalam NaNO_3

Dengan mengacu pada Isnansetyo & Kurniastuty (1995), untuk mempermudah penimbangan dan penggunaan nutrien maka perlu dibuat dalam fasa liquid/ cair. Nutrien biasanya dibuat dengan penggunaan standar 1 mL/L, sehingga konsentrasi semua bahan nutrien harus 1000/ 1 kali. Oleh karena itu setiap bahan penyusun dikalikan dengan 1000, sehingga didapatkan komposisi bahan untuk walne sebagai berikut: 0,03 mg/L NaNO_3 , 45 mg/L

Na₂EDTA; 33,6 mg/L H₃BO₃; 20 mg/L NaH₂PO₄.2H₂O; 1,3 mg/L FeCl₃.6H₂O; 0,36 mg/L MnCl₂.4H₂O.

Untuk pembuatan vitamin dibuat dalam 100 mL, sehingga masing-masing bahan larutan vitamin dikalikan 1000. Komposisi larutan vitamin menjadi: 0,1 mg/L Vitamin B1, 0,005 mg/L Vitamin B1.

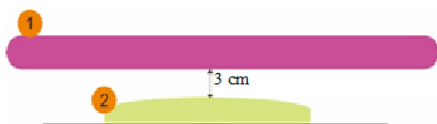
III.8.3 Pre-Kultur Mikroalga *Botryococcus braunii*

Wadah media kultur yang digunakan untuk budidaya mikroalga *B.braunii* adalah *beaker glass* berukuran 500 mL, dengan menggunakan rangkaian alat seperti pada **Gambar III.1**. Sebelum digunakan, semua alat-alat yang akan digunakan telah disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C untuk membunuh mikroorganisme.

Langkah pertama adalah mengocok secara perlahan bibit mikroalga yang terdapat dalam botol sampai homogen (tidak ada mikroalga yang menempel pada dinding botol). Selanjutnya menuangkan 250 mL bibit mikroalga ke dalam *beaker glass* berukuran 500 mL secara perlahan kemudian mencampur 250 mL air laut dengan bibit mikroalga.

Selanjutnya memasukkan *sparger* aerator ke dalam *beaker glass* yang berfungsi untuk sirkulasi udara sehingga terjadi secara kontinyu. Lampu 21 watt dipasang sebanyak 2 buah pada sisi depan, belakang, dan dibagian atas *beaker glass* dengan jarak masing-masing 3 cm. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Widjaja (2009). Lampu diatur dengan keadaan 24 jam terang dan 0 jam gelap, dengan intensitas cahaya lebih dari 6000 lux atau sekitar 77,08 µE/m²s (Zhang and Kojima, 1998).

III.8.4 Proses Mutasi Mikroalga dengan Sinar UV-B



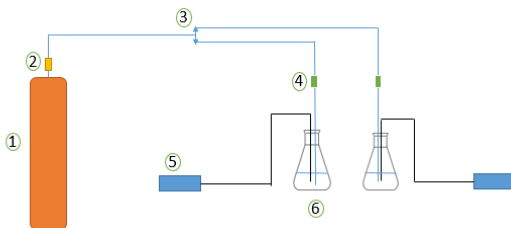
Gambar III.3 Instalasi Alat Mutasi UV-B

Keterangan :

1. Lampu UV-B
2. *Petridish* berisi mikroalga *B.braunii* dengan volume 75 mL
Ukuran *petridish*: diameter 9,4 cm kedalaman 1,7 cm

Mengacu pada Zul (2003), mutasi dilakukan dengan lampu UV-B germicidal dengan perlakuan di dalam ruang yang digelapkan. Selama radiasi berlangsung, tutup *petridish* dibuka agar transmisi sinar UV-B tidak terhalang. Sebelum dimutasi menggunakan UV-B, mikroalga diambil sampel untuk dianalisa jumlah sel awal. Selanjutnya mikroalga diberi paparan sinar UV-B dengan posisi sinar UV-B lurus di atas sel target dengan jarak 3 cm selama 3 menit. Untuk mengetahui jumlah sel yang bertahan hidup dari proses mutasi UV-B, kembali dilakukan analisa *counting chamber*.

III.8.5 Penambahan CO₂ dan Siklus Pencahayaan



Gambar III.4 Desain Alat untuk Penambahan CO₂

- Keterangan :
- | | |
|---------------------------|---------------|
| 1. Tabung CO ₂ | 4. Rotameter |
| 2. Regulator | 5. Aerator |
| 3. Splitter | 6. Erlenmeyer |

Mengacu pada penelitian Wahyu dan Cecil (2017), gas CO₂ murni dengan flowrate 50 mL/ min ditambahkan pada media kultur mikroalga *B. Braunii* alami dan termutasi UV-B. Menurut Tasic (2016), kandungan CO₂ di udara sangat kecil yaitu sekitar 0,03% atau sekitar 300 ppm, sehingga dibutuhkan penambahan kadar CO₂ agar pertumbuhan mikroalga dapat tumbuh optimal. Penambahan konsentrasi CO₂ dilakukan dengan menggunakan selang yang terhubung pada tabung gas CO₂. Pengaturan *rate* CO₂ diatur dengan menggunakan *flowmeter*. Siklus pencahayaan dilakukan agar mikroalga dapat mengalami pertumbuhan secara maksimal. Rasio pencahayaan terang dan gelap yaitu 24 : 0 jam. Variabel pengurangan kadar nitrogen dalam nutrisi dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan dan produktivitas lipid mikroalga *B.braunii* yang termutasi UV-B dan alami. Sedangkan variabel waktu kultur bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan yang paling optimal dari mikroalga *B.braunii* yang termutasi UV-B dan alami selama 7 hari dan 20 hari. Variabel waktu kultur, penambahan CO₂, siklus pencahayaan dan penurunan kadar nitrogen dalam nutrisi dilakukan analisa dengan perhitungan *counting chamber* setiap 24 jam. Selain itu juga dilakukan pengujian pH menggunakan kertas pH setiap 24 jam.

III.8.6 Pengukuran Intensitas Cahaya



Gambar III.5 Alat *Lux Meter*

Pengukuran intensitas cahaya dengan menggunakan *Lux meter*. Prinsip kerja alat ini yaitu menempelkan bagian lampu *detector* pada seperangkat lampu yang akan diukur intensitasnya sesuai dengan kondisi yang digunakan (dalam hal ini jarak yang diambil adalah 3 cm dari lampu). Kemudian tekan tombol power pada posisi angka 1 dan tekan lux serta atur range cahaya yang terdeteksi pada layar *Light meter*. Dengan *range* A = 0-1999, B = 2000-19990, C= 20000-50000.

III.8.7 Analisa Jumlah Sel Mikroorganisme dengan Metode *Counting Chamber*

Sebelum menghitung jumlah sel, diperlukan pengenceran yang bertujuan mempermudah pengamatan dengan metode *counting chamber*. Sebanyak 1 mL sampel mikroalga diambil menggunakan pipet ukur, lalu diencerkan dengan *aquadest* hingga 10 mL.

Langkah selanjutnya adalah meneteskan suspensi sampel secukupnya pada hemasitometer dengan menggunakan pipet tetes lalu ditutup dengan *deck glass*. Jika jumlah sel dalam 1 persegi kecil lebih dari 10 sel dan dalam 1 persegi besar lebih dari 100 sel, maka sampel perlu diencerkan kembali. Setelah itu meletakkan hemasitometer pada meja objek mikroskop. Menentukan penetapan 5 titik dari 16 kotak terkecil pada hemasitometer seperti pada gambar dibawah ini:

A				B
		C		
D				E

Gambar III.6 Penentuan Titik Hitung pada Hemasitometer

Hasil perhitungan jumlah sel setiap titiknya di rata – rata. Kemudian jumlah sel/mL dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{jumlah sel/ mL} = \frac{\text{jumlah sel tiap kotak}}{0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} \times \frac{1000}{1} \times \text{faktor pengenceran}$$

III.8.8 Ekstraksi Lipid

Menurut Widjaja (2009), langkah pertama untuk ekstraksi lipid adalah penyaringan mikroalga. Proses ini diawali dengan menimbang massa botol *centrifuge* yang berisi kultur mikroalga, selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 8500 rpm selama 15 menit pada suhu 20 °C hingga diperoleh endapan. Setelah diperoleh endapan, *supernatant* hasil *centrifuge* dibuang dan endapan disaring kembali dengan *filter paper*, serta menggunakan alat *vacuum pump*. Sebelum digunakan, *filter paper* ditimbang dahulu untuk mengetahui massa awal *filter paper*. Setelah penyaringan, massa *filter paper* dan alga basah ditimbang kemudian dilakukan proses pengeringan mikroalga menggunakan oven dengan suhu 60 °C selama 2 jam. Setelah 2 jam massa *filter paper* dan mikroalga kering kembali ditimbang.



Gambar III.7 Rangkaian Alat Ekstraksi *Soxhlet*

Sampel selanjutnya ditumbuk dengan mortar dan diekstrak dengan menggunakan ekstraksi *soxhlet* seperti pada **Gambar III.7** dengan menggunakan pelarut n-heksan. Pelarut yang digunakan adalah 150 mL pelarut dalam setiap ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan selama 6 jam hingga warna pelarut menjadi bening.

Campuran n-heksan dan lipid yang terekstrak kemudian dipisahkan dengan cara distilasi seperti pada **Gambar III.8** di bawah ini. Distilasi dilakukan selama 2 jam dengan menggunakan labu distilasi dan kondensor *liebig*. Suhu operasi distilasi dijaga 70 °C.



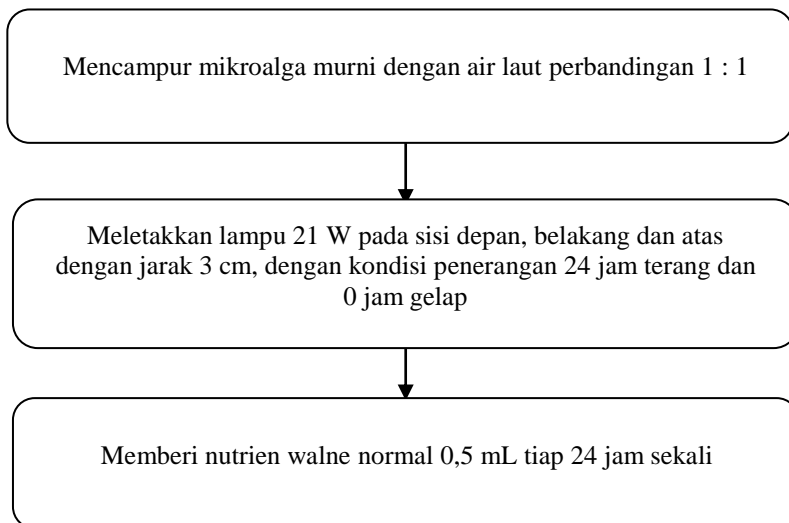
Gambar III.8 Rangkaian Alat Distilasi

III.8.9 Analisa GC (*Gas Chromatography*)

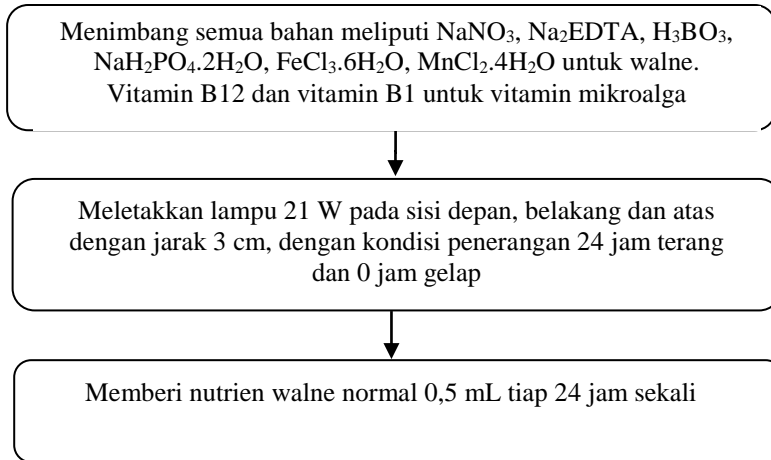
Kandungan trigliserida dan FFA dalam *crude lipid* mikroalga dianalisa menggunakan *Gas Chromatography*. Analisa kuantitatif dilakukan dengan Shimadzu GC-2010 gas chromatography (Kyoto, Japan) yang dilengkapi dengan *flame ionization detector*. Separasi dilakukan dengan ZB-5HT (5%-phenyl)-methylpolysiloxane non-polar *column* (15 m x 0,32 mm i.d.; dengan ketebalan film 0,1 μm). Temperatur injektor dan detector diatur pada suhu 370 °C. Temperatur kolom dimulai pada 80 °C meningkat menuju 305 °C dengan laju 15°C/ menit, kemudian menuju 335 °C dengan laju 5 °C/ menit dan dijaga pada suhu 335 °C selama 5 menit. Selanjutnya, temperatur kolom ditingkatkan menuju 365 °C dengan laju 15 °C/ menit. *Split rasio* 1:50 menggunakan nitrogen sebagai *carrier gas* dengan laju linier 30 cm/ s pada 80 °C. Sampel sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 1mL etil asetat, dan 1 μL sampel diambil dan diinjeksikan ke dalam GC.

III.9 Diagram Alir Penelitian

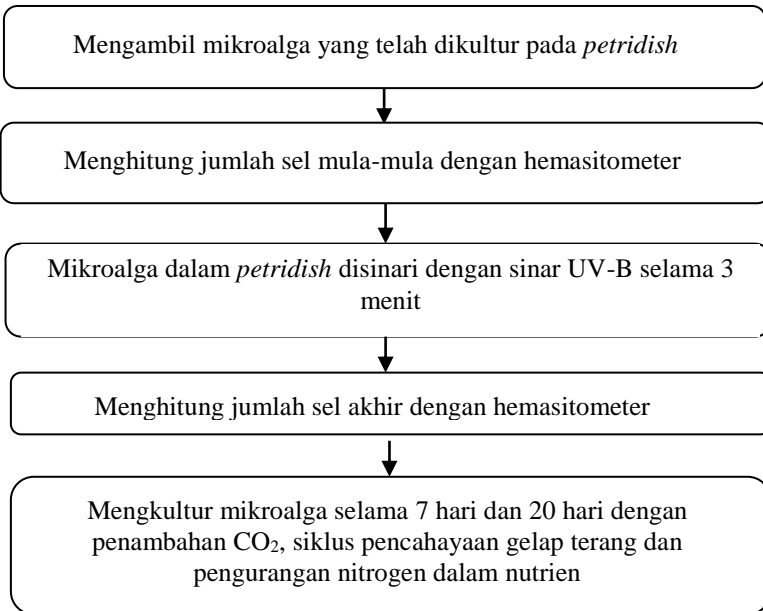
III.9.1 Pre-Kultur Mikroalga *Botryococcus braunii*



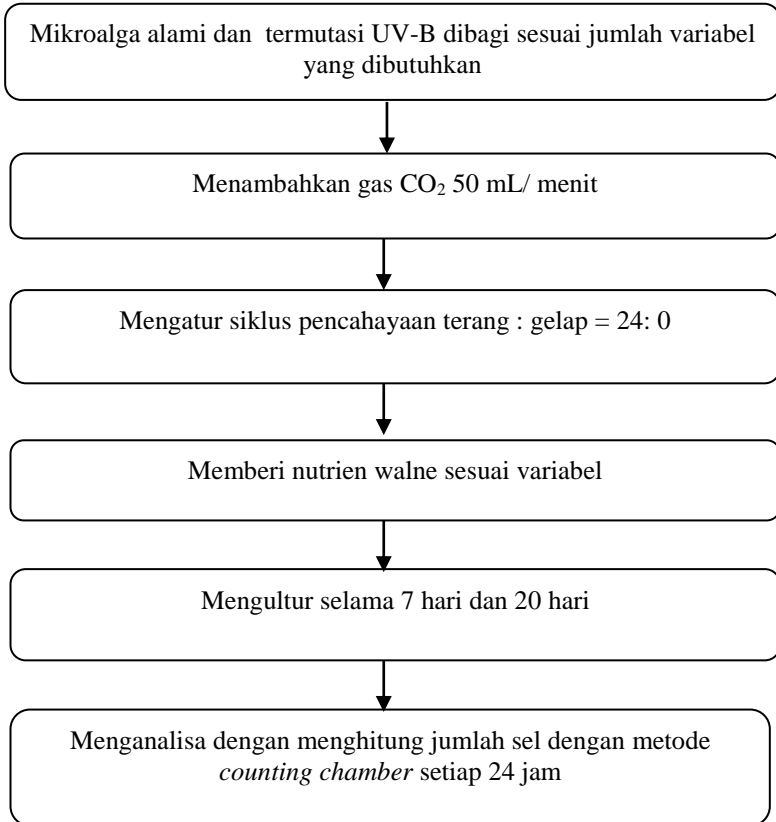
III.9.2 Pembuatan Nutrien Walne dan Vitamin Mikroalga



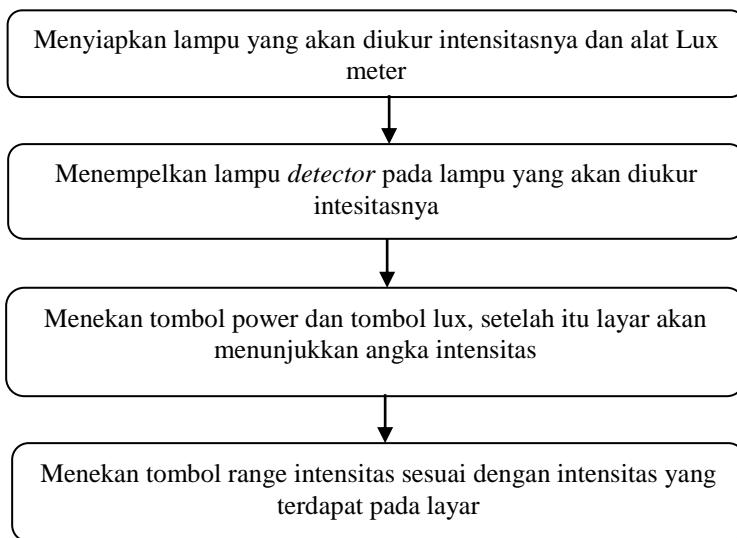
III.9.3 Mutasi Mikroalga dengan Sinar UV-B



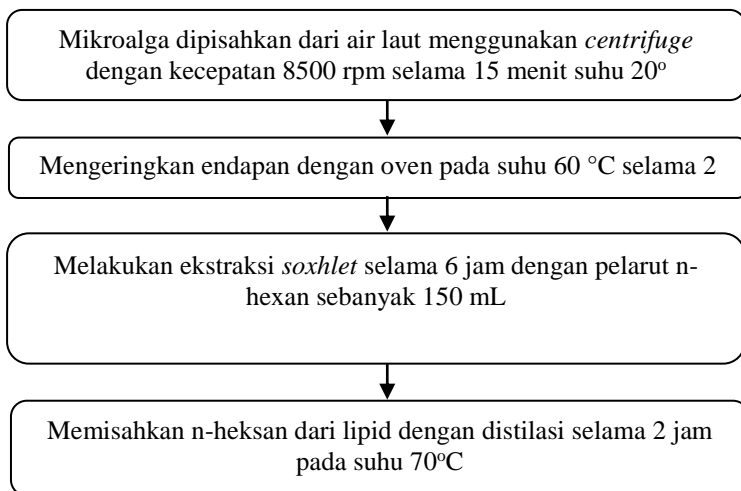
III.9.4 Penambahan CO₂, Siklus Pencahayaan dan Variabel Kadar Nitrogen



III.9.5 Diagram Alir Pengukuran Intensitas Cahaya



III.9.6 Diagram Alir Ekstraksi Lipid



III.9.7 Analisa Gas *Chromatography* (GC)

Sampel lipid dilarutkan dalam etil asetat dengan ratio 0,02 gram lipid / 1 mL etil asetat



Larutan sampel kemudian divorteks selama 20 menit dan diambil sebanyak 1 μ L untuk dimasukkan ke vial GC

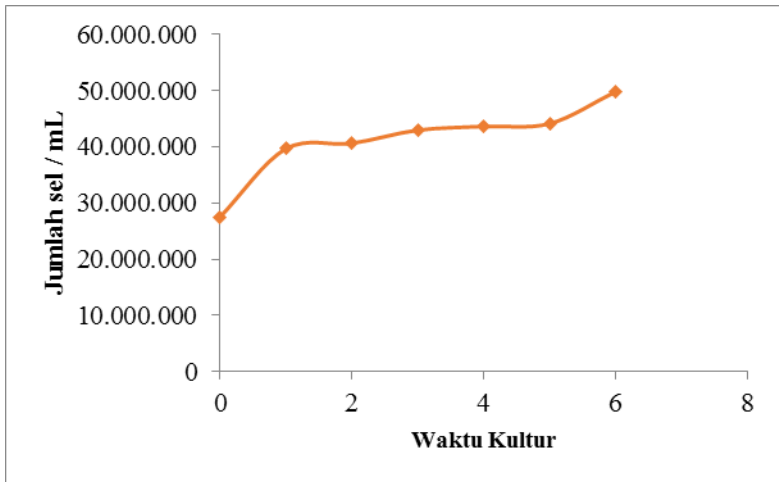
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Pre-Kultur *B.braunii* Alami

Telah dilakukan pre-kultur selama 6 hari pada **Tabel.IV.1**

Tabel. IV.1 Jumlah Sel *B.Braunii* Selama Pre-Kultur 6 Hari

Jam ke	Jumlah Sel (Sel/mL)
0	27.500.000
24	39.666.666
48	40.666.666
72	43.000.000
96	43.666.666
120	44.166.666
144	49.833.333



Gambar IV.1 Kurva Pertumbuhan *B.braunii* Pre-Kultur 6 Hari

Berdasarkan **Tabel IV.1** diketahui bahwa pertumbuhan mikroalga *B.braunii* setiap harinya meningkat dilihat dari jumlah sel dan kurva pada **Gambar IV.1**. Pada perhitungan jumlah sel dengan metode *counting chamber*, hanya sel yang hidup yang

dihitung jumlahnya. Perbedaan sel yang hidup dan mati dapat diketahui pada warna mikroalga. Pada kondisi pertumbuhan optimal mikroalga berwarna hijau tua pekat, sedangkan dalam kondisi pertumbuhan tidak optimal mikroalga berwarna hijau kekuningan, dan pada keadaan mati mikroalga cenderung berwarna kuning. Kultur *B.braunii* alami dengan jumlah sel 49.833.333 sel/mL selanjutnya digunakan sebagai bibit untuk mutasi *B.braunii* dengan menggunakan sinar UV-B.

IV.2 Mutasi *B.braunii* Alami dan Mutasi Menggunakan Lampu UV-B

Perlakuan mutasi dilakukan untuk menghasilkan mutasi mikroalga *B.braunii* yang memiliki karakteristik serupa dengan mutasi yang telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya oleh Cecil-Wahyu (2017) agar hasil produktivitas lipid yang diperoleh nantinya dapat dibandingkan. Karakteristik mutasi serupa yang dimaksud dalam hal ini adalah mutasi yang memiliki persentase kematian sel sebesar 26 – 30%. Jumlah sel *B.braunii* awal dengan jumlah sel yang hidup setelah pemaparan sinar UV-B dan persentase kematiannya disajikan dalam **Tabel IV.2**. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi penurunan persentase sel yang hidup setelah pemaparan sinar UV-B. Sel yang masih hidup setelah pemaparan sinar UV-B disebut sebagai mutasi.

Tabel IV.2 Jumlah Sel *B.braunii* Sebelum dan Sesudah Mutasi Menggunakan Sinar UV-B

Pemaparan Sinar UV-B (Menit)	Run	Jumlah Sel <i>B.braunii</i> (sel/mL)		% Kematian Rata-rata
		Sebelum Mutasi	Setelah Mutasi	
3 Menit	Penelitian sebelumnya	11.833.333	8.666.667	26,29
3 Menit	Run 1	49.833.333	26.500.000	29,76
	Run 2	49.833.333	39.000.000	
	Run 3	49.833.333	39.500.000	

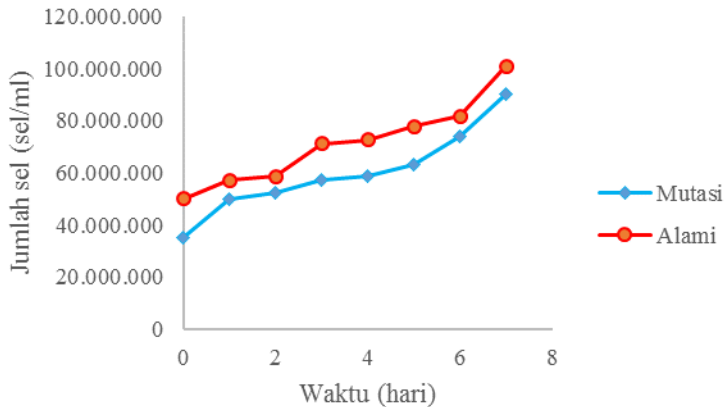
Mutasi dilakukan dengan waktu pemaparan selama 3 menit dengan persentase kematian sel rata-rata sebesar 29,76 % dari 3 kali pengulangan. Waktu pemaparan selama 3 menit dipilih berdasarkan kesimpulan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Cecil-Wahyu (2017) dimana waktu pemaparan 3 menit merupakan waktu pemaparan terbaik jika dibandingkan dengan waktu pemaparan 1,5 menit dan 30 menit. Sinar UV-B memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan, kelangsungan hidup, pigmentasi, metabolisme maupun fotosintesis dari mikroalga. Peningkatan radiasi UV-B secara umum akan menurunkan kandungan klorofil dan menurunkannya fotosintesis (efek pada fotosistem). Penurunan kandungan klorofil dan fotosintesis ini menghasilkan biomassa yang lebih rendah (Xue *et al*, 2005).

IV.3 Pre-Kultur *B.braunii* Alami dan Termutasi UV-B

B.braunii yang telah dimutasi selanjutnya dilakukan kultur atau pengembangbiakkan *B.braunii* alami dan termutasi UV-B selama 7 hari dan dilakukan *counting chamber* setiap hari. Hasil pertumbuhan sel *B.braunii* alami dan termutasi UV-B selama 7 hari disajikan dalam **Tabel IV.3** berikut :

Tabel IV.3 Jumlah Sel *B.braunii* Alami dan Termutasi UV-B Selama 7 Hari Kultur

Hari ke	Jumlah Sel <i>B.braunii</i> (sel/mL)	
	Alami	Mutasi UV-B
0	49.833.333	35.000.000
1	57.000.000	49.833.333
2	58.500.000	52.333.333
3	71.000.000	57.166.667
4	72.500.000	58.666.667
5	77.666.667	63.000.000
6	81.666.667	73.833.333
7	100.833.333	90.166.667



Gambar IV.2 Kurva Pertumbuhan *B.braunii* Alami dan Termutasi UV-B Selama 7 Hari

Pada perhitungan jumlah sel dengan metode *counting chamber*, hanya sel yang hidup yang dihitung jumlahnya. Hal ini dapat diketahui pada warna mikroalga. Pada kondisi pertumbuhan optimal, mikroalga berwarna hijau tua pekat sedangkan mikroalga akan berwarna hijau kekuningan bila kondisi pertumbuhannya tidak optimal dan cenderung berwarna kuning bila mati.

Berdasarkan **Tabel IV.3** dan **Gambar IV.2** diatas dapat dilihat bahwa pertumbuhan sel *B.braunii* alami dan mutasi mengalami peningkatan setiap harinya. Pertumbuhan sel *B.braunii* alami pada hari ke 0 dengan jumlah sel sebesar 49.833.333 sel/mL dan pada hari ke 7 naik menjadi 100.833.333 sel/mL. Sedangkan pertumbuhan sel *B.braunii* mutasi UV-B menunjukkan pertumbuhan yang cukup signifikan pada hari ke 0 sebesar 35.000.000 sel/mL dan pada hari ke 7 naik menjadi 90.166.667 sel/mL.

IV.4 Pengaruh Kadar Nitrogen Dalam Nutrien dan Pengaruh Waktu Kultur

IV.4.1 Pertumbuhan Sel *B.braunii* Alami dan Termutasi UV-B Dengan Rendah Nitrogen dalam Nutrien Waktu Kultur 7 Hari dan 20 Hari

Nitrogen merupakan unsur fungsional dan struktural pembentuk protein dalam sel alga dan menyumbang 7-20% berat kering sel. Defisiensi nitrogen dalam kultur alga adalah meningkatkan biosintesis dan akumulasi lipid. Keterbatasan nitrogen dapat dianggap sebagai tekanan lingkungan yang efisien untuk meningkatkan akumulasi lipid. Mikroalga dapat memanfaatkan sumber nitrat, ammonia, atau nitrogen. Secara garis besar nitrogen mempengaruhi pertumbuhan dari sel mikrolaga seperti kandungan lipid dan protein. Pada kondisi dimana kadar nitrogen kecil, maka produksi lipid pada sel akan bertambah banyak, keadaan ini biasa disebut *Nitrogen Starvation*.

Pada tahap ini mikroalga *B.braunii* alami dan termutasi UV-B dikultur selama 7 hari dan 20 hari, kemudian ditambahkan nutrien dengan kadar nitrogen dalam nutrien yang berbeda yaitu 100 mg/L untuk kadar normal nitrogen dan 0,03 mg/L untuk rendah nitrogen dalam nutrien. Mikroalga *B.braunii* alami dan termutasi UV-B yang dikultur selama 7 hari dan 20 hari kemudian dilakukan perhitungan jumlah selnya setiap hari untuk mengetahui pertumbuhan sel yang ditandai dengan semakin keruhnya warna media kultur mikroalga. Dalam analisa perhitungan jumlah sel digunakan metode *counting chamber* dengan menggunakan hemasitometer dan mikroskop.

Jumlah sel awal *B.Braunii* alami pada hari ke-0 sebesar 51.000.000 sel/mL, lebih besar jika dibandingkan dengan jumlah sel awal mutasi UV-B. Sehingga kondisi awal jumlah sel *B.braunii* alami harus dibuat sama dengan jumlah sel mutasi UV-B yaitu sebesar 47.250.000 sel/mL dengan pengenceran pada kultur *B.braunii* alami. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan air laut untuk mendapatkan jumlah sel awal yang mendekati jumlah sel awal mutasi UV-B. Tujuan dari membuat

jumlah sel *B.braunii* alami dan mutasi UV-B sama pada hari ke-0 adalah untuk membandingkan laju pertumbuhan sel *B.braunii* alami dan mutasi UV-B dengan mudah. Data pertumbuhan sel mikroalga *B.braunii* alami dan mutasi UV-B setelah dikultur selama 7 hari dan 20 hari dengan pemberian normal nutrisi dan pengurangan kadar nitrogen dalam nutrisi disajikan dalam tabel berikut:

Tabel IV.4 Pertumbuhan Sel *B.braunii* Alami dan Termutasi UV-B Variabel Waktu Kultur 7 Hari dan 20 Hari Dengan Normal Nitrogen dan Rendah Nitrogen Dalam Nutrien

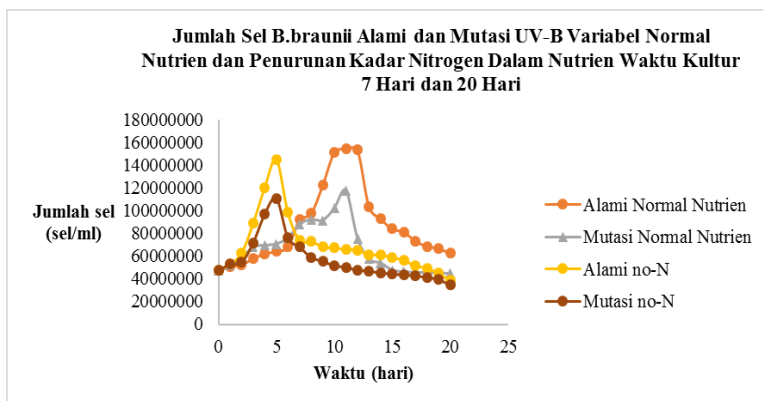
Hari ke	Jumlah sel (10^6 sel/mL) pada Variabel Waktu Kultur 7 dan 20 Hari			
	Alami		Mutasi UV-B	
	Normal nitrogen (N= 100 mg/L)	Rendah nitrogen (N= 0,03 mg/L)	Normal nitrogen (N= 100 mg/L)	Rendah nitrogen (N= 0,03 mg/L)
0	47,250	47,250	47,250	47,250
1	50,500	53,000	51,625	52,750
2	52,375	62,625	58,125	54,500
3	57,875	89,000	67,625	71,625
4	62,000	120,375	69,250	96,875
5	64,250	144,750	70,500	110,500
6	68,000	98,125	75,625	758,75
7	91,750	73,750	87,750	67,875
8	97,375	73,000	91,875	58,875
9	122,250	68,250	91,250	55,375
10	151,000	67,125	101,750	51,625
11	154,250	66,000	117,250	50,125
12	153,250	65,125	75,250	47,625
13	103,000	61,375	57,125	46,875
14	92,625	61,000	53,625	45,125
15	84,000	58,870	47,375	44,375
16	81,125	56,375	46,000	43,375

17	73,250	51,500	45,375	42,750
18	68,500	49,375	45,125	41,250
19	66,625	44,750	44,875	39,375
20	62,500	38,500	44,375	34,500

Berdasarkan **Tabel IV.4** diatas dapat dilihat bahwa pertumbuhan sel *B.braunii* alami dan mutasi UV-B untuk variabel normal nutrien naik secara signifikan setiap harinya sampai hari ke-11 dan mengalami penurunan pada hari ke-12 sampai hari ke-20. Jumlah sel pada hari ke-7 untuk variabel alami sebesar 91.750.000 sel/mL, sedangkan jumlah sel untuk variabel mutasi UV-B sebesar 87.750.000 sel/mL. Variabel alami dan mutasi UV-B mencapai jumlah sel tertinggi pada hari ke-11 yaitu masing-masing sebesar 154.000.000 sel/mL untuk variabel alami dan 170.750.000 sel/mL untuk variabel mutasi UV-B. Jumlah sel akhir pada hari ke-20 variabel alami sebesar 62.500.000 sel/mL dan 44.375.000 sel/mL untuk variabel mutasi UV-B. Penurunan jumlah sel dengan normal nitrogen dari hari ke-12 sampai hari ke-20 tidak sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Helmi-Dinny (2016) dimana sel yang diberi nutrien setiap harinya tidak mengalami penurunan jumlah karena kebutuhan nutrisi yang tercukupi. Penurunan jumlah sel pada penelitian ini diakibatkan terkontaminasinya media kultur oleh kontaminan lain sehingga jumlah sel mengalami penurunan.

Sedangkan untuk variabel alami dan mutasi UV-B dengan rendah nitrogen mengalami kenaikan jumlah sel sampai hari ke-5 dan penurunan jumlah sel terjadi dari hari ke-6 sampai hari ke-20. Variabel alami memiliki jumlah sel pada hari ke-7 sebesar 73.750.000 sel/mL dan 67.750.000 sel/mL untuk variabel mutasi UV-B. Variabel alami dan mutasi UV-B mencapai jumlah sel tertinggi pada hari ke-6 yaitu masing-masing sebesar 144.750.000 sel/mL untuk variabel alami dan 110.500.000 sel/mL untuk variabel mutasi UV-B. Jumlah sel akhir pada hari ke-20 variabel alami sebesar 38.500.000 sel/mL dan 44.500.000 sel/mL untuk variabel mutasi UV-B. Dapat dilihat bahwa variabel rendah

nitrogen berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel. Hal ini sesuai dengan kutipan Chrismada et al (2006) yang menyebutkan bahwa kadar nitrogen yang rendah dalam media kultur dapat menyebabkan penurunan jumlah sel. Kadar nitrogen tersebut terkait dengan hilangnya kemampuan sel untuk membangun struktur fungsional yang terkait dengan unsur hara yang jumlahnya terbatas tersebut.



Gambar IV.3 Grafik Pertumbuhan Sel *B.braunii* Alami dan Mutasi UV-B dengan Variabel Normal Nitrogen dan Rendah Nitrogen Dalam Nutrien Waktu Kultur 7 Hari dan 20 Hari

Gambar IV.3 merupakan grafik perbandingan pertumbuhan sel *B.braunii* alami dan mutasi UV-B untuk kedua variabel yaitu kadar nitrogen dalam nutrien dan waktu kultur, dimana data yang dipaparkan merupakan data rata-rata untuk 2 kali run yang telah dilakukan.

Berdasarkan grafik tersebut dapat dilihat bahwa *B.braunii* alami menunjukkan hasil terbaik untuk pertumbuhan jumlah sel dari semua variabel pada hari ke-7 maupun jumlah sel akhir pada hari ke-20. Jumlah sel akhir *B.braunii* pada hari ke-7 sebesar 95.625.000 sel/ml dan pada hari ke-20 sebesar 62.500.000 sel/mL. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan Helmi-Dinny (2016) yang menyatakan bahwa

mutasi UV-B dengan persentase kematian 29-30% memiliki pertumbuhan sel yang lebih baik dibanding *B.braunii* alami.

IV.4.2 Perubahan pH selama 7 Hari dan 20 Hari Kultur

pH memiliki pengaruh pada pertumbuhan mikroalga. Tiap – tiap spesies mikroalga memiliki nilai minimum pH yang memungkinkan untuk kelangsungan hidupnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Czeslawa (1996), menyimpulkan mikroalga tidak dapat tumbuh optimal pada pH di bawah 4,8 sebab dinding sel mikroalga sudah tidak mampu lagi mempertahankan dirinya untuk bertahan hidup.

Dinding sel mikroalga berfungsi sebagai lapisan buffer atau lapisan untuk menjaga pH dalam tubuh mikroalga. Pada pH asam ($\text{pH} < 7$), mikroalga akan mengkonsumsi karbon dari HCO_3^- (CO_2 yang terlarut di dalam air) untuk membentuk lapisan buffer yang berfungsi melindungi dirinya dari kondisi lingkungannya sehingga mengakibatkan menurunnya kadar CO_2 terlarut dalam air sehingga pH media berangsur – angsur naik.

Pada pH yang terlampau tinggi, mikroalga akan mengkonsumsi CO_2 langsung dari udara. Dalam hal ini CO_2 sangat mudah larut dalam air, akibatnya kadar CO_2 terlarut meningkat dan membentuk H_2CO_3 yang bersifat asam sehingga pH media berangsur – angsur turun (Czeslawa, 1996).

Dalam penelitian ini pH kultur tidak dikontrol, namun tetap diukur setiap harinya menggunakan kertas pH. Perubahan pH selama 7 hari dan 20 hari kultur untuk semua variabel disajikan dalam **Tabel IV.5**.

Tabel IV.5 Perubahan pH Kultur Selama 7 Hari dan 20 Hari

Hari ke	pH Kultur			
	Alami		Mutasi UV-B	
	Normal nitrogen (N= 100 mg/L)	Rendah nitrogen (N= 0,03 mg/L)	Normal nitrogen (N= 100 mg/L)	Rendah nitrogen (N= 0,03 mg/L)
0	8,5	8,5	8,6	8,5
1	8,5	8,3	8,5	8,5
2	8,3	8,3	8,5	8,5
3	8,3	8,3	8,5	8,3
4	8,3	8,2	8,2	8,3
5	8,3	8,2	8,2	8,3
6	8,2	8,1	8,2	8,3
7	8,2	8,1	8,2	8,2
8	8	8,1	8,2	8,1
9	8	8,1	8	8
10	8	8,1	8	8
11	7,6	8,1	8	8
12	7,6	8,1	8	8
13	7,5	8,1	7,6	8
14	7,5	8	7,5	7,5
15	7,5	8	7,5	7,5
16	7,5	7,5	7,2	7,2
17	7,3	7,5	7,2	7,2
18	7,3	7,3	7	7
19	7,3	7,3	7	7
20	7,3	7,3	7	7

Berdasarkan **Tabel IV.5** diatas terlihat bahwa pH kultur turun untuk semua variabel. Penurunan pH untuk semua variabel cenderung sama yaitu dari pH 8,5 pada hari ke-0 menjadi pH 7,2 pada hari ke 20. Namun, terjadinya penurunan pH ini tidak terlalu berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga. Meskipun pH kultur berubah antara 6 – 8, *B.braunii* tetap tumbuh dengan baik

tanpa adanya hambatan tertentu. Telah dilaporkan juga oleh Dayananda et al (2007) bahwa pH kultur tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap *yield* biomassa dan produksi hidrokarbon dari *B.braunii* saat rentang pH 6 – 8,5 (Yaming Ge et al, 2011).

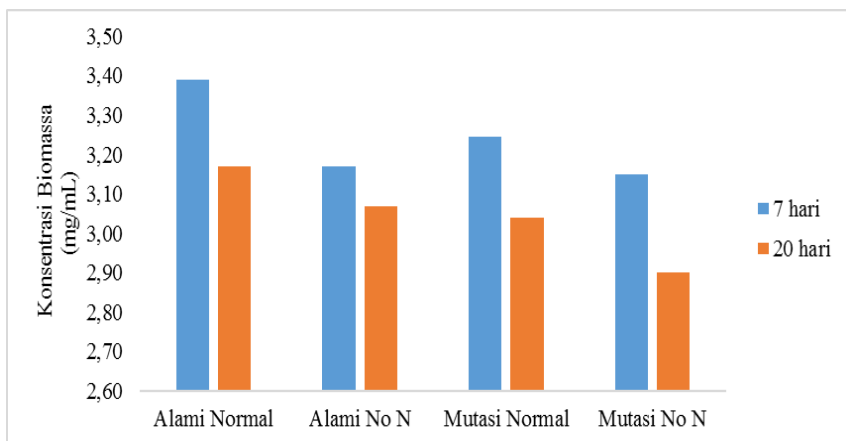
IV.4.3 Produktivitas Biomassa Variabel Kadar Nitrogen dalam Substrat dan Waktu Kultur

Pada tahap ini semua variabel baik variabel kadar nitrogen dalam nutrisi maupun waktu kultur dipanen untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi dan distilasi dimana nantinya akan diperoleh lipid yang berasal dari mikroalga *B.braunii*. Untuk ekstraksi lipid pada tahap ini digunakan biomassa kering mikroalga alami dan mutasi UV-B semua variabel. Ekstraksi lipid dilakukan selama 6 jam dengan menggunakan pelarut n-heksan setelah melalui pre-treatment. Proses pre-treatment meliputi, masing-masing mikroalga disentrifugasi untuk didapatkan endapan alga basah. Selanjutnya mikroalga basah dikeringkan di dalam oven pada suhu 60 °C selama 2 jam, setelah pengeringan biomassa mikroalga kering ditimbang. Berat biomassa *B.braunii* alami untuk normal nitrogen dan rendah nitrogen dalam nutrisi waktu kultur 7 hari berturut-turut sebesar 1,69 gram dan 1,58 gram. Berat mikroalga kering *B.braunii* alami variabel normal nitrogen dan rendah nitrogen dalam nutrisi waktu kultur 20 hari berturut-turut sebesar 1,58 gram dan 1,53 gram. Sedangkan berat mikroalga kering untuk mutasi UV-B variabel normal nitrogen dan rendah nitrogen waktu kultur 7 hari berturut-turut sebesar 1,62 gram dan 1,59 gram. Berat mikroalga kering untuk mutasi UV-B variabel normal nitrogen dan rendah nitrogen dalam nutrisi waktu kultur 20 hari berturut-turut sebesar 1,52 gram dan 1,45 gram. Dari berat kering mikroalga didapatkan konsentrasi biomassa dalam 500 mL volume kultur sehingga massa sel dapat ditentukan. Hasil konsentrasi biomassa dan massa sel untuk semua variabel disajikan dalam **Tabel IV.6** dimana data yang

dipaparkan merupakan data rata-rata untuk 2 kali run yang telah dilakukan.

Tabel IV.6 Perhitungan Konsentrasi Biomassa Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur

Kondisi	Variabel Waktu Kultur	Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien	Konsentrasi Biomassa (mg/mL)	Konsentrasi Sel (sel/mL)	Massa Sel (mg/sel)
Alami	7 Hari	N = 100 mg/L	3,39	91.750.000	$3,694 \times 10^{-8}$
		N = 0,03 mg/L	3,17	73.750.000	$4,298 \times 10^{-8}$
	20 Hari	N = 100 mg/L	3,17	62.500.000	$5,072 \times 10^{-8}$
		N = 0,03 mg/L	3,07	38.500.000	$7,948 \times 10^{-8}$
Mutasi UV-B	7 Hari	N = 100 mg/L	3,24	87.750.000	$3,699 \times 10^{-8}$
		N = 0,03 mg/L	3,18	67.875.000	$4,567 \times 10^{-8}$
	20 Hari	N = 100 mg/L	3,04	44.375.000	$6,850 \times 10^{-8}$
		N = 0,03 mg/L	2,90	34.500.000	$8,405 \times 10^{-8}$



Gambar IV.4 Grafik Perbandingan Konsentrasi Biomassa Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur

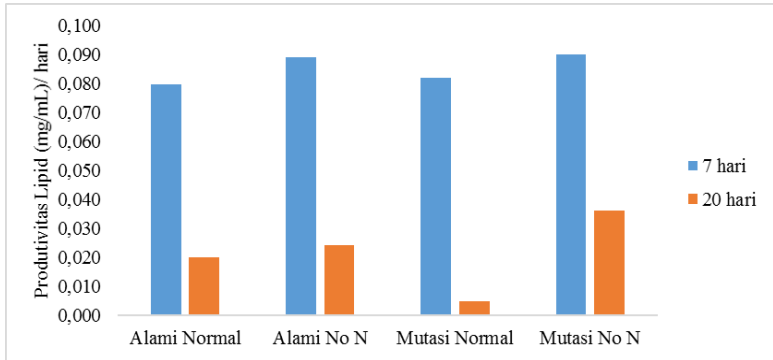
Berdasarkan **Tabel IV.6** dan **Gambar IV.4** dapat dilihat bahwa konsentrasi biomassa tertinggi didapatkan pada variabel normal nitrogen dan waktu kultur 7 hari yang masing-masing sebesar 3,39 mg/mL untuk *B.braunii* alami dan 3,24 mg/mL untuk *B.braunii* mutasi UV-B. Sedangkan konsentrasi biomassa terendah didapatkan pada variabel rendah nitrogen dan waktu kultur 20 hari yang masing-masing sebesar 3,07 mg/mL untuk *B.braunii* alami dan 2,90 *B.braunii* mutasi UV-B. Sedangkan dari semua variabel, konsentrasi biomassa tertinggi didapatkan pada *B.braunii* alami variabel normal nitrogen waktu kultur 7 hari sebesar 3,90 mg/mL. Konsentrasi biomassa yang didapatkan dipengaruhi oleh laju pertumbuhan masing-masing variabel, dimana laju pertumbuhan yang paling baik akan menghasilkan konsentrasi biomassa yang lebih besar. Seperti yang telah disajikan dalam grafik pada **Gambar IV.3** bahwa sel akhir *B.braunii* alami variabel normal nitrogen waktu kultur 7 hari memiliki pertumbuhan sel yang terbaik jika dibanding variabel lainnya.

Dari **Tabel IV.6** diatas juga dapat diketahui massa sel untuk setiap variabel, yang mana jika dibandingkan antara

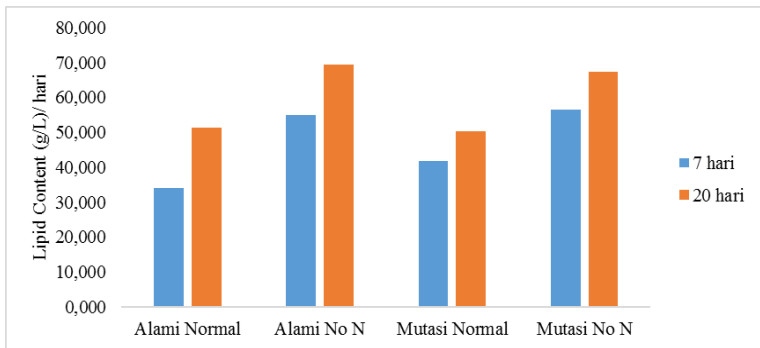
B.braunii alami dan mutasi UV-B akan didapatkan massa sel *B.braunii* alami dengan normal nitrogen dengan waktu kultur 7 hari lebih besar jika dibandingkan dengan variabel lainnya. Sedangkan massa sel terkecil didapat pada *B.braunii* mutasi UV-B variabel rendah nitrogen dengan waktu kultur 20 hari. Mengutip dari Neha Kalla (2016) bahwa pengurangan kadar nitrogen berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhan jumlah sel dan biomassa mikroalga, dimana dalam keadaan rendah nitrogen mikroalga akan mengalami kondisi stress sehingga mengakibatkan penurunan jumlah sel dan produktivitas biomassa.

IV.4.4 *Lipid Content* dan Produktivitas Lipid Variabel Kadar Nitrogen dalam Substrat dan Waktu Kultur

Berdasarkan data produktivitas biomassa, konsentrasi biomassa, jumlah sel, dan massa sel dapat ditentukan *lipid content* dan produktivitas lipid dari mikroalga. *Lipid content* dapat diperoleh dari berat lipid yang dihasilkan dari proses ekstraksi dan berat mikroalga kering, produktivitas lipid dapat diperoleh dari *lipid content* dalam gram per-liter tiap harinya dan produktivitas biomasanya. Data *lipid content* dan produktivitas lipid disajikan pada **Tabel IV.7**, dimana data yang dipaparkan merupakan data rata-rata untuk 2 kali run yang telah dilakukan. Sedangkan perbandingan Produktivitas lipid dan *lipid content* disajikan dalam **Gambar IV.5** dan **Gambar IV.6**



Gambar IV.5 Grafik Perbandingan Produktivitas Lipid Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur



Gambar IV.6 Grafik Perbandingan *Lipid content* Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur

Tabel IV.7 Perhitungan *Lipid Content* dan Produktivitas Lipid Variabel Kadar Nitrogen dalam Nutrien dan Waktu Kultur

Parameter	Satuan	Alami sebelum pre-kultur	Alami				Mutasi			
			7 hari waktu kultur		20 hari waktu kultur		7 hari waktu kultur		20 hari waktu kultur	
			N = 100 mg/L	N = 0,03 mg/L	N = 100 mg/L	N = 0,03 mg/L	N = 100 mg/L	N = 0,03 mg/L	N = 100 mg/L	N = 0,03 mg/L
Jumlah Sel awal	Sel/mL	27.500.000	47.250.000	47.250.000	47.250.000	47.250.000	47.250.000	47.250.000	47.250.000	47.250.000
Jumlah Sel akhir setelah 20 hari	Sel/mL	46.500.000	91.750.000	73.750.000	62.500.000	38.500.000	87.750.000	67.875.000	44.375.000	34.500.000
Δ sel/ hari	(Juta Sel/mL)/hari	3,1	6,357	3,785	0,762	0,437	5,785	3,196	0,143	0,637
Massa sel	10^{-8} mg/sel	5,849	3,694	4,298	5,072	7,948	3,699	4,567	6,850	8,405
Produktivitas Biomassa Harian	(mg/mL)/hari	0,185	0,235	0,163	0,039	0,035	0,214	0,146	0,010	0,054
Lipid Content (<i>Lipid extract</i> /sampel)	% (w/w)	38,23	33,92	54,89	51,42	67,42	41,89	55,97	50,32	70,03
Produktivitas lipid	(mg/mL)/hari	0,071	0,080	0,089	0,003	0,034	0,082	0,090	0,005	0,036

Jumlah sel akhir paling tinggi didapatkan mikroalga *B.braunii* alami dengan normal nitrogen waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 91.750.000 sel/mL, dan jumlah sel akhir paling rendah didapatkan mikroalga mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 20 hari. Pertumbuhan sel per hari paling rendah didapatkan oleh *B.braunii* mutasi dengan normal nitrogen waktu kultur 20 hari jika dibandingkan dengan variabel lainnya yaitu hanya sebesar 0,143 juta sel/mL per hari. Pertumbuhan sel per hari ini lebih rendah dibandingkan pertumbuhan *B. braunii* alami normal nitrogen waktu kultur 7 hari yang mencapai 6,357 juta sel/mL per hari.

Dapat dilihat pada **Tabel IV.7** bahwa pertumbuhan *B.braunii* yang paling baik adalah *B.braunii* alami dengan normal nitrogen waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 91.750.000 sel/mL per hari, akan tetapi *B.braunii* mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 7 hari mempunyai *lipid content* terbesar dengan pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan *B.braunii* alami dengan normal nitrogen waktu kultur 7 hari, yaitu sebesar 3,196 juta sel/mL per hari. Dapat dilihat juga pada variabel lain yaitu *B.braunii* alami dengan rendah nitrogen waktu kultur 7 hari yang memiliki pertumbuhan yang lebih rendah tetapi produktivitas lipid yang lebih tinggi dibandingkan dengan *B.braunii* alami normal nitrogen waktu kultur 7 hari. Sehingga berdasarkan data-data tersebut dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan mikroalga yang lebih baik tidak selalu menghasilkan lipid yang lebih banyak, begitu pula sebaliknya.

Pertumbuhan sel mikroalga paling tinggi yaitu *B.braunii* alami dengan normal nitrogen waktu kultur 7 hari sebesar 6,357 juta sel/ml. Kandungan lipid (Berat *Lipid extract*/ berat sampel) tertinggi yaitu *B.braunii* alami dengan rendah nitrogen waktu kultur 20 hari yaitu sebesar 70,03%. Selain itu kandungan lipid (Berat *Lipid extract*/ berat sampel) tertinggi juga diperoleh oleh *B.braunii* mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 20 hari yaitu sebesar 67,224%. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pengurangan kadar nitrogen dalam nutrisi pada waktu

kultur paling optimum dapat meningkatkan kualitas mikroalga *B.braunii* yang dibuktikan dengan hasil produktivitas lipid dan *lipid content* dari *B.braunii* dengan variabel pengurangan kadar nitrogen dalam nutrien.

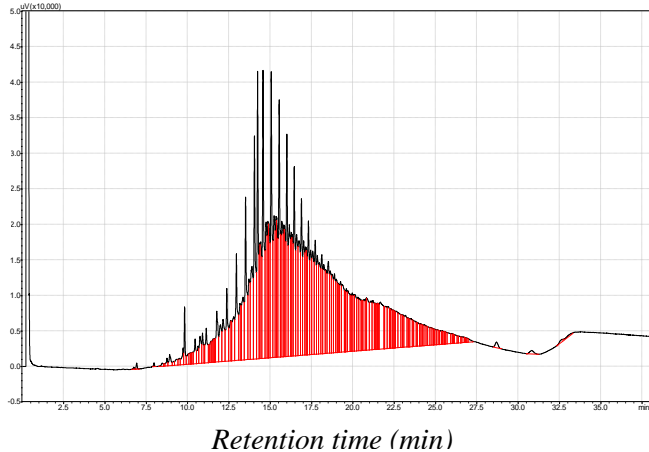
Berdasarkan **Tabel IV.7** Produktivitas lipid paling tinggi dihasilkan oleh *B.braunii* mutasi UV-B dengan variabel rendah nitrogen waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 0,090 (mg/mL)/ hari. Dan disusul oleh *B.braunii* alami dengan rendah nitrogen waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 0,089 (mg/mL)/ hari. Pada kondisi pertumbuhan normal, mikroalga yang memproduksi biomassa dalam jumlah besar belum tentu memiliki produktivitas yang optimal. Sehingga untuk memperoleh produktivitas lipid yang tinggi mikroalga perlu dibuat dalam kondisi stress, dalam hal ini dengan pengurangan kadar nitrogen (*Ruangsomboon, 2015*).

Produktivitas lipid antara *B.braunii* alami dan mutasi UV-B mempunyai selisih yang tidak jauh berbeda yaitu kurang dari 2%. Produktivitas lipid ditentukan dari produktivitas biomassa dikali *lipid content*, sedangkan *lipid content* didapatkan dari massa lipid dibagi massa alga kering. Massa lipid yang dihasilkan tidak selalu bergantung terhadap massa sel. Dalam penelitian ini, massa sel yang tertinggi pada *B.braunii* alami, tetapi untuk massa lipid yang tertinggi pada *B.braunii* mutasi UV-B. Massa lipid yang besar menyebabkan *lipid content* yang besar pula, sehingga produktivitas lipid juga besar.

IV.5 Analisa GC (*Gas Chromatography*)

Analisa GC digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa dari lipid *B.braunii* alami dan mutasi UV-B. Hasil analisa pada *B.braunii* alami dan mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 7 hari serta *B.braunii* alami dan mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 20 hari terlihat pada **Gambar IV.6** berikut.

Intensitas
sinyal



Gambar IV.7 Hasil Analisa GC Lipid *B.braunii* Alami dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari

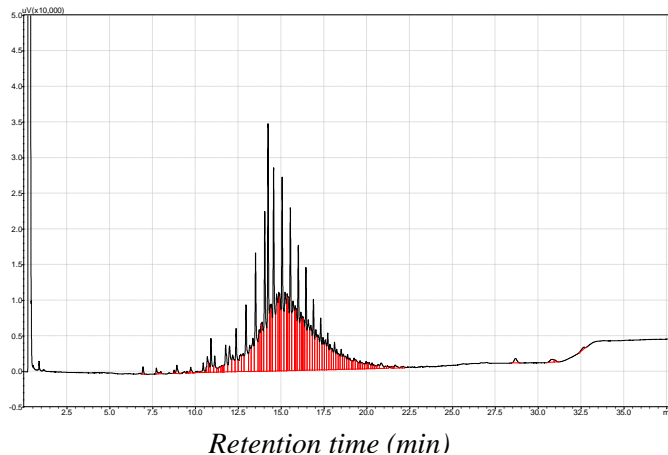
Hasil analisa GC menunjukkan adanya beberapa senyawa yang terkandung dalam lipid *B.braunii* alami seperti yang terdapat pada **Tabel IV.8** berikut.

Tabel IV.8 Komposisi Senyawa Lipid *B.braunii* Alami dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari

No	Nama Komponen	Range Retention Time	% Area
1.	Asam lemak bebas (FFA)	11,009 – 14,126	15,810 %
2.	Monoacylglycerol (MAG)	14,341 – 15,735	19,986 %
3.	Diacylglycerol (DAG)	20,059 – 21,864	9,096 %
4.	Triacylglycerol (TAG)	26,756 – 35,687	1,487 %

Untuk hasil analisa GC pada *B.braunii* mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 7 hari terlihat pada **Gambar IV.7** berikut.

Intensitas
sinyal



Gambar IV.8 Hasil Analisa GC Lipid *B.braunii* Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari

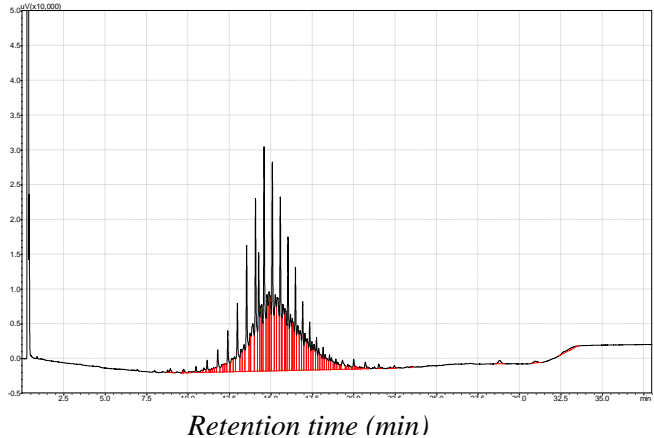
Hasil analisa GC menunjukkan adanya beberapa senyawa yang terkandung dalam lipid *B.braunii* mutasi UV-B seperti yang terdapat pada **Tabel IV.9** berikut.

Tabel IV.9 Komposisi Senyawa Lipid *B.braunii* Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 7 Hari

No	Nama Komponen	Range Retention Time	% Area
1.	Asam lemak bebas (FFA)	11,009 – 14,126	22,544 %
2.	Monoacylglycerol (MAG)	14,341 – 15,735	33,289 %
3.	Diacylglycerol (DAG)	20,059 – 21,864	1,496 %
4.	Triacylglycerol (TAG)	26,756 – 35,687	0,761 %

Sedangkan untuk hasil analisa GC pada *B.braunii* alami dengan rendah nitrogen waktu kultur 20 hari terlihat pada **Gambar IV.8** berikut.

Intensitas
sinyal

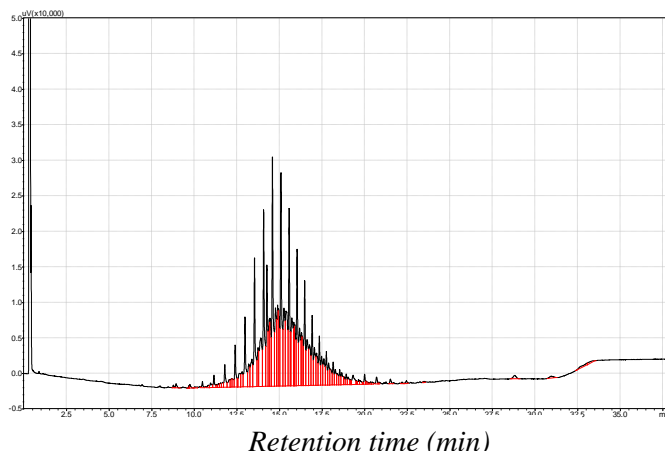


Gambar IV.9 Hasil Analisa GC Lipid *B.braunii* Alami dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari
Hasil analisa GC menunjukkan adanya beberapa senyawa yang terkandung dalam lipid *B.braunii* alami seperti yang terdapat pada **Tabel IV.9** berikut.
Tabel IV.10 Komposisi Senyawa Lipid *B.braunii* Alami dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari

No	Nama Komponen	Range Retention Time	% Area
1.	Asam lemak bebas (FFA)	11,009 – 14,126	22,446 %
2.	Monoacylglycerol (MAG)	14,341 – 15,735	38,289 %
3.	Diacylglycerol (DAG)	20,059 – 21,864	0,631 %
4.	Triacylglycerol (TAG)	26,756 – 35,687	1,006 %

Untuk hasil analisa GC pada *B.braunii* mutasi UV-B dengan rendah nitrogen waktu kultur 20 hari terlihat pada **Gambar IV.9** berikut.

Intensitas
sinyal



Gambar IV.10 Hasil Analisa GC Lipid *B.braunii* Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari

Hasil analisa GC menunjukkan adanya beberapa senyawa yang terkandung dalam lipid *B.braunii* mutasi UV-B seperti yang terdapat pada **Tabel IV.10** berikut.

Tabel IV.11 Komposisi Senyawa Lipid *B.braunii* Mutasi UV-B dengan Variabel Rendah Nitrogen Waktu Kultur 20 Hari

No	Nama Komponen	Range Retention Time	% Area
1.	Asam lemak bebas (FFA)	11,009 – 14,126	20,170 %
2.	Monoacylglycerol (MAG)	14,341 – 15,735	35,992 %
3.	Diacylglycerol (DAG)	20,059 – 21,864	1,298 %
4.	Triacylglycerol (TAG)	26,756 – 35,687	1,906 %

Dari keempat hasil analisa GC di atas, dapat dilihat pada gambar hasil analisa GC menunjukkan *retention time* pada sumbu x dan intensitas sinyal pada sumbu y. Kandungan TAG yang terbesar diantara keempat hasil analisa tersebut adalah *B.braunii* mutasi UV-B dengan variabel rendah nitrogen dalam nutrisi waktu kultur 20 hari. Hasil analisa GC untuk *B.braunii* alami maupun *B.braunii* mutasi UV-B menunjukkan kandungan asam

lemak bebas (FFA) yang lebih besar dibanding kandungan TAG. Jenis FFA yang terdapat pada *B.braunii* didominasi oleh asam oleat (C18) dan asam palmiat (C16). Dalam proses pembuatan biodiesel, komponen lipid yang diperlukan sebagai bahan baku adalah TAG. TAG merupakan substansi yang bersifat *non soluble* dalam air, terbuat dari satu mol gliserol dan tiga mol asam lemak. TAG sering disebut sebagai lipid itu sendiri karena jumlahnya yang sangat dominan dalam total lipid. Akan tetapi pada penelitian ini mikroalga *B.braunii* lebih banyak menghasilkan FFA daripada TAG. Dengan banyaknya komponen FFA, lebih sulit untuk digunakan sebagai bahan baku biodiesel. Akan tetapi ada beberapa proses yang dapat digunakan diantaranya proses esterifikasi menggunakan katalis asam membentuk gliserol dan transesterifikasi menggunakan katalis basa membentuk metil ester. (Ashokkumar, 2014).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan analisa yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan :

1. Kadar nitrogen dalam nutrien sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kadar lipid mikroalga *B.braunii*.
2. Mikroalga *B.braunii* alami dengan nutrien normal memberikan pertumbuhan sel paling pesat dibanding mikroalga *B.braunii* termutasi UV-B.
3. Produktivitas biomassa dan lipid sangat ditentukan oleh pertumbuhan jumlah sel dan massa sel mikroalga *B.braunii*.
4. Produktivitas biomassa tertinggi dihasilkan *B.braunii* alami dengan normal nutrien waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 0,235 (mg/mL)/hari.
5. Produktivitas lipid paling tinggi dihasilkan oleh *B.braunii* mutasi UV-B dengan pengurangan kadar nitrogen dalam nutrien waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 0,09 (mg/mL)/hari.
6. *Lipid content* paling besar yaitu *B.braunii* alami dan mutasi UV-B dengan pengurangan kadar nitrogen dalam nutrien waktu kultur 20 hari sebesar 67,42% dan 70,03%.
7. *B.braunii* alami memberikan produktivitas biomassa tertinggi dibanding *B.braunii* mutasi UV-B, sedangkan produktivitas lipid tertinggi dihasilkan oleh *B.braunii* mutasi UV-B. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan mutasi UV-B mampu meningkatkan produktivitas lipid.
8. Hasil analisa GC menunjukkan kandungan asam lemak bebas (FFA) dan Monoacylglycerol (MAG) lebih besar dibandingkan komponen lainnya. Kandungan FFA dan MAG untuk variable pengurangan kadar nitrogen yang terbesar adalah *B.braunii* mutasi dengan waktu kultur 7 hari yaitu sebesar 22,54 % dan 38,289 sementara kandungan Triacylglycerol (TAG) sebesar 1,006%.

V.2 Saran

Sebagai rekomendasi untuk penelitian kedepannya, perlu dilakukan hal-hal sebagai berikut :

1. Menggunakan metode ekstraksi atau pelarut yang berbeda dari penelitian-penelitian sebelumnya agar diperoleh hasil lipid yang lebih baik.
2. Melakukan kultur dengan kondisi media kultur dan lingkungan kultur yang lebih steril dan bebas dari kontaminan agar tidak menyebabkan penurunan jumlah sel.
3. Melakukan kultur dengan waktu kultur lebih lama agar *strain* lebih pekat dan didapatkan jumlah sel yang tinggi sehingga diperoleh biomassa dan lipid yang lebih banyak.
4. Menggunakan kertas saring dengan ukuran *pore size* lebih kecil daripada ukuran mikroalga agar tidak ada mikroalga yang lolos saat proses penyaringan.
5. Dalam melakukan mutasi menggunakan sinar UV-B, membuat wadah mikroalga yang sesuai dengan bentuk lampu, agar merata dalam pemaparan sinar UV-B.
6. Melakukan analisa PCR untuk mengetahui mutasi yang terjadi pada mikroalga *B.braunii*.
7. Sebelum menganalisa lipid dengan GC sebaiknya mencuci lipid yang dihasilkan dari proses ekstraksi dan distilasi dengan acetone agar kandungan lipid seperti MG dan DG tidak muncul dalam hasil analisa.

DAFTAR PUSTAKA

- Amini, S., et al.** 2014. "Effect of Cell Wall Disruption Treated by using Microwave and Sonicator of *Botryococcus braunii* and *Nannochloropsis* on The Amount of Oil Produced". 41-49.
- Ashokkumar, V., et al.** 2014. "Optimization and Characterization of Biodiesel Production From Microalgae *Botryococcus* Grown at Semi-Continuous System". *Energy Conversion and Management*, 936-946.
- Benson.** 2001. "Microbiological Application". New York: McGraw Hill Publisher.
- Bharathiraja, B., et al.** 2015. "Aquatic Biomass (Algae) as A Future Feedstock for Bio-Refineries: A Review on Cultivation, Processing and Products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 634-653.
- Chrismadha, T., et al.** 2006. "Pengaruh Konsentrasi Nitrogen Dan Fosfor Terhadap Pertumbuhan, Kandungan Protein, Karbohidrat dan Fikosianin Pada Kultur Spirulinafusiformis". Pusat Penelitian Limnologi-LIPI, Bogor.
- Chisti, Y.** 2007. "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology Advances*, 294-306.
- Dayananda, C., et al.** 2007. "Isolation and Characterization of Hydrocarbon Producing Green Alga *Botryococcus braunii* from Indian Freshwater Bodies". *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Fariad, M., et al.** 2017. "Biodiesel Production from Microalgae: Processes, Technologies and Recent". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 894.
- Ge, Y., et al.** 2011. "Growth Characteristics of *Botryococcus braunii* 765 Under High CO₂ Concentration in Photobioreactor". *Bioresource Technology*, 132-133.
- Gunzler, H., et al.** 2001. "Handbook of Analytical Technique". Weinheim: Wiley-VCH.

- Hadiyanto, et al.** 2012. "Mikroalga, Sumber Pangan dan Energi Masa Depan". Semarang: UPT UNDIP Press.
- Isnansetyo, A., et al.** 1995. "Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton". Pakan Alam untuk Pembenihan Organism Laut. Kanisius. Yogyakarta.
- Kalla, N., et al.** 2016. "Effect of Nitrogen, Phosphorus Concentrations, pH and Salinity Ranges on Growth, Biomass and Lipid Accumulation of *Chlorella Vulgaris*". *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 397-405.
- Kawaroe, M., et al.** 2010. "Mikroalga, Potensi dan Pemanfaatannya Untuk Produksi Bio Bahan Bakar". Bogor. IPB Press.
- Lee, S. J., et al.** 1998. "Effects of Harvesting Method and Growth Stage on the Flocculation of the Green Alga *Botryococcus braunii*". *Letters in Applied Microbiology*, 14-17.
- Nalewajko, C., et al.** 1997. "Effect of pH on Growth, Photosynthesis, Respiration, and Copper Tolerance of Three *Scenedesmus* Strains". *Environmental and Experimental Botany*, 153-160.
- Olguín, E., et al.** 2003. "Annual Productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and Nutrient Removal in a Pig Wastewater Recycling Process Under Tropical Conditions". *Journal of Applied Phycology*, 249-257.
- Prastowo, B., et al.** 2014. "Biodiesel Generasi-1 Generasi-2". Jakarta. IAARD Press, 1-9.
- Ruangsomboon, S.** 2012. "Effect of Light, Nutrient, Cultivation Time and Salinity on Lipid Production of Newly Isolated of the Green Microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2". *Bioresource Technology*, 261-265.
- Ruangsomboon, S., et al.** 2017. "Enhanced Growth and Hydrocarbon Production of *Botryococcus braunii* KMITL 2 by Optimum Carbon Dioxide Concentration and Concentration-Dependent Effects on its Biochemical

- Composition and Biodiesel Properties". *Bioresource Technology*, 14-16.
- Saputro, B. R., et al.** 2015. "The Growth of *Botryococcus braunii* Microalgae as a Lipid Producer in a Mixed Medium of Coconut Water and Seawater". *Jurnal Sains dan Matematika*, 94-100.
- Sharma, K. K., et al.** 2012. "High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production". *Energies*, 1533-1535.
- Skerratt, J. H., et al.** 1997. "Effect of UV-B On Lipid Content of Three Antarctic Marine Phytoplankton". *Phytochemistry Vol.94*, 999-1007.
- Smith, R. C., et al.** 1992. "Ozone Depletion: Ultraviolet Radiation and Phytoplankton Biology in Antarctic Waters". *JSTOR*, 952-959.
- Su, Y., et al.** 2015. "Progress of Microalgae Biofuel's Commercialization". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 403.
- Suryani.** 2008. "Penentuan Lipid Dalam Khamir *Rhodotorula* Dari Taman Nasional Gunung Halimun". *Universitas Indonesia*.
- Susilowati, R., et al.** 2010. "Produksi Biodiesel dari Mikroalga *Botryococcus braunii*". *Squalen*, 27.
- Verma, N. M., et al.** 2009. "Prospective of Biodiesel Production Utilizing Microalgae as the Cell Factories : A Comprehensive Discussion". *African Journal of Biotechnology*, 1403.
- Widaja, A., et al.** 2009. "Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris*". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 13-20.
- Wu, L. F., et al.** 2013. "The Effects of Nitrogen Sources and Temperature on Cell Growth and Lipid Accumulation of Microalgae". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1-5.

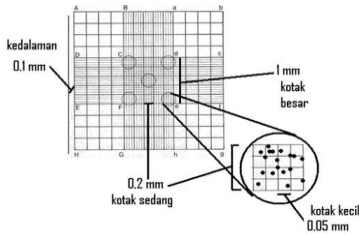
- Xue, L., et al.** 2005. "Effect of Enhanced Ultraviolet-B Radiation on Algae and Cyanobacteria". *Critical Reviews in Microbiology*, 79-89.
- Zhang, K., et al.** 1998. "Effect of Light Intensity on Colony Size of Microalga *Botryococcus braunii* in Bubble Column Photobioreactors. " *Journal of Fermentation and Bioengineering* (86), 573-576.
- Zhila, N.O., et al.** 2004. "Effect of Nitrogen Limiation on the Growth and Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252". *Russian Journal of Plant Physiology*, 311-319.
- Zul, D., et al.** 2003. "Mutagenesis pada *Kluyveromyces Marxianus* T-2 Penghasil Inulinase Ekstraselular dengan Sinar Ultra Violet". *Jurnal Natur Indonesia*, 26.

DAFTAR NOTASI

No	Notasi	Keterangan	Satuan
1.	m	Massa	Gram
2.	V	Volume	mL

APPENDIKS

1. Perhitungan *Counting Chamber*



Dalam analisa *counting chamber* digunakan 5 kotak besar yang tiap kotaknya memiliki luas berukuran $0,04 \text{ mm}^2$. Terlebih dahulu ditentukan 5 kotak yang akan dihitung jumlah sel yang terkandung dalam 5 kotak tersebut.

A				B
		C		
D				E

Contoh perhitungan pre kultur alami

Jam ke	Run	A	B	C	D	E	Total	Jumlah Sel Rata-Rata / Kotak
144	I	18	29	20	31	24	122	24,4
	II	22	17	21	12	11	83	16,6
	III	17	17	21	16	23	94	18,8
Jumlah								59,8

Diketahui :

Faktor pengenceran = 10

Tebal hemasitometer = 0,1 mm

Jumlah sel / kotak = 59,8/3 = 19,93 sel / kotak

Jumlah sel / mm³ = 19,93 $\frac{\text{sel}}{\text{kotak}} \times \frac{1 \text{ kotak}}{0,04 \text{ mm}^2} \times \frac{1}{0,1 \text{ mm}}$ x

10

= 49.833,33 sel / mm³

Jumlah sel / mL = 49.833,33 $\frac{\text{sel}}{\text{mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$

= 49.833.333 sel / mL

Perhitungan pre kultur mikroalga alami dan mutasi selama 7 hari

Jam ke	Mikroalga alami		Mikroalga mutasi	
	Sel/mm ³	Sel/mL	Sel/mm ³	Sel/mL
0	49.833	49.833.333	35.000	35.000.000
24	57.000	57.000.000	49.833	49.833.333
48	71.000	71.000.000	52.333	52.333.333
72	72.500	72.500.000	57.166	57.166.667
96	77.666	77.666.667	63.000	63.000.000
120	81.666	81.666.667	73.833	73.833.333
144	100.833	100.833.333	90.166	90.166.667

2. Persen Kematian

Perlu dilakukan perhitungan persen kematian untuk mengetahui berapa banyak alga yang mati terkena radiasi sinar UV-B

Rumus persen kematian:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{sebelum disinari UVB} - \text{setelah disinari UVB}}{\text{sebelum disinari UVB}} \times 100\%$$

Run ke	Sebelum disinari UV-B	Setelah disinari UV-B	% kematian rata-rata
I	49.833.333	26.500.000	29,76
II		39.000.000	
III		39.500.000	

3. Perhitungan Jumlah Sel dan Pengukuran pH

Pada variabel penambahan CO₂, siklus pencahayaan dan pengurangan kadar nitrogen dilakukan perhitungan jumlah sel dan pengukuran pH. Perhitungan jumlah sel dengan analisa *counting chamber* dan pengukuran pH menggunakan kertas pH

- **Mikroalga *B.braunii* alami**
Variabel normal nutrisi 20 hari kultur

Hari	Jumlah Sel / mL	pH
0	47.250.000	8,5
1	50.500.000	8,5
2	52.375.000	8,3
3	57.875.000	8,3
4	62.000.000	8,3
5	64.250.000	8,3
6	68.000.000	8,2
7	91.750.000	8,2
8	97.375.000	8
9	122.250.000	8
10	151.000.000	8
11	154.250.000	7,6
12	153.250.000	7,6
13	103.000.000	7,5
14	92.625.000	7,5
15	84.000.000	7,5
16	81.12.5000	7,5

17	73.250.000	7,3
18	68.500.000	7,3
19	66.62.5000	7,3
20	62.500.000	7,3

**Variabel pengurangan kadar nitrogen dalam
nutrien 20 hari kultur**

Hari	Jumlah Sel / mL	pH
0	47.250.000	8,5
1	53.000.000	8,3
2	62.625.000	8,3
3	89.000.000	8,3
4	120.375.000	8,2
5	144.750.000	8,2
6	98.125.000	8,1
7	73.750.000	8,1
8	73.000.000	8,1
9	68.250.000	8,1
10	67.125.000	8,1
11	66.000.000	8,1
12	65.125.000	8,1
13	61.375.000	8,1
14	61.000.000	8
15	58.875.000	8
16	56.375.000	7,5
17	51.500.000	7,5
18	49.375.000	7,3
19	44.750.000	7,3
20	38.500.000	7,3

- **Mikroalga *B.braunii* mutasi**
Variabel normal nutrisi 20 hari kultur

Hari	Jumlah Sel / mL	pH
0	47.250.000	8,6
1	51.625.000	8,5
2	58.125.000	8,5
3	67.625.000	8,5
4	69.250.000	8,2
5	70.500.000	8,2
6	75.625.000	8,2
7	87.750.000	8,2
8	91.875.000	8,2
9	91.250.000	8
10	101.750.000	8
11	117.250.000	8
12	75.250.000	8
13	57.125.000	7,6
14	53.625.000	7,5
15	47.375.000	7,5
16	46.000.000	7,2
17	45.375.000	7,2
18	45.125.000	7
19	44.875.000	7
20	44.375.000	7

- **Variabel pengurangan kadar nitrogen dalam**
Nutrien 20 hari kultur

Hari	Jumlah Sel / mL	pH
0	47.250.000	8,5
1	52.750.000	8,5
2	54.500.000	8,5

3	71.625.000	8,3
4	96.875.000	8,3
5	110.500.000	8,3
6	75.875.000	8,3
7	67.875.000	8,2
8	58.875.000	8,1
9	55.375.000	8
10	51.625.000	8
11	50.125.000	8
12	47.625.000	8
13	46.875.000	8
14	45.125.000	7,5
15	44.375.000	7,5
16	43.375.000	7,2
17	42.750.000	7,2
18	41.250.000	7
19	39.375.000	7
20	34.500.000	7

4. Perhitungan Konsentrasi Biomassa

Untuk mengetahui biomassa mikroalga dapat dilakukan analisa biomassa yaitu dengan persamaan berikut :

$$\text{Konsentrasi biomassa} = \frac{\text{massa dry alga (gram)}}{\text{volume kultur (L)}}$$

Konsentrasi biomassa *B.braunii* alami dengan kadar nitrogen normal dalam Nutrien 7 hari kultur

$$\text{Konsentrasi Biomassa} = \frac{\text{massa dry alga (gram)}}{\text{volume kultur (L)}} = \frac{1,695}{0,5} = 3,39$$

g/L = 3,39 mg/mL

Tabel Perhitungan Kosentrasi Biomassa

Kondisi	Waktu Kultur (Hari)	Variabel	Massa dry alga (gr)	Volume kultur (L)	Konsentrasi Biomassa (gr/liter)
Alami	7	Normal Nitrogen	1,69	0,5	3,39
		Rendah Nitrogen	1,58	0,5	3,17
	20	Normal Nitrogen	1,58	0,5	3,17
		Rendah Nitrogen	1,53	0,5	3,07
Mutasi	7	Normal Nitrogen	1,62	0,5	3,24
		Rendah Nitrogen	1,59	0,5	3,18
	20	Normal Nitrogen	1,52	0,5	3,04
		Rendah Nitrogen	1,45	0,5	2,90

5. Perhitungan Produktivitas Biomassa

Rumus perhitungan produktivitas biomassa

$$\text{Produktivitas Biomassa} = \frac{\Delta \text{sel/mL}}{7 \text{ hari}} \times \frac{\text{konsentrasi biomassa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{konsentrasi sel } \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}}\right)}$$

Produktivitas biomassa *B.braunii* alami dengan kadar nitrogen normal dalam Nutrien 7 hari kultur

$$\begin{aligned} &= \frac{\Delta \text{sel/mL}}{7 \text{ hari}} \times \frac{\text{konsentrasi biomassa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{konsentrasi sel } \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}}\right)} \\ &= \frac{(90500000 - 47250000) \text{sel/mL}}{7 \text{ hari}} \times \frac{3,39 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{90500000 \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}}\right)} \\ &= 0,235 \text{ (mg/ml)/hari} \end{aligned}$$

Tabel Perhitungan Massa Sel dan Produktivitas Biomassa

Kondisi	Waktu Kultur (Hari)	Variabel	$\frac{\Delta \text{sel}}{\text{hari}}$ / mL	$\frac{\text{konsentrasi biomassa } (\frac{\text{mg}}{\text{mL}})}{\text{konsentrasi sel } (\frac{\text{sel}}{\text{mL}})}$	Produktivitas Biomassa (mg/mL)
Alami	7	Normal Nitrogen	6.357.143	$3,694 \times 10^{-8}$	0,235
		Rendah Nitrogen	3.785.714	$4,298 \times 10^{-8}$	0,163
	20	Normal Nitrogen	762.500	$5,072 \times 10^{-8}$	0,039
		Rendah Nitrogen	437.500	$7,948 \times 10^{-8}$	0,035
Mutasi	7	Normal Nitrogen	5.785.714	$3,699 \times 10^{-8}$	0,214
		Rendah Nitrogen	3.196.429	$4,567 \times 10^{-8}$	0,146
	20	Normal Nitrogen	143.750	$6,850 \times 10^{-8}$	0,010
		Rendah Nitrogen	637.500	$8,405 \times 10^{-8}$	0,054

6. Perhitungan Konsentrasi Lipid

Kandungan lipid yang diperoleh dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Konsentrasi lipid (\%)} = \frac{\text{massa lipid (gram)}}{\text{massa dry alga (gram)}} \times 100 \%$$

Konsentrasi lipid *B.braunii* alami variabel normal nutrisi 7 hari kultur

$$= \frac{0,57}{1,69} \times 100 \%$$

$$= 33,92 \%$$

Tabel Konsentrasi Lipid

Kondisi	Waktu Kultur (Hari)	Variabel	Massa Lipid (gr)	Massa Alga Kering (gr)	Konsentrasi Lipid (%)
Alami	7	Normal Nitrogen	0,57	1,69	33,92
		Rendah Nitrogen	0,87	1,58	54,89
	20	Normal Nitrogen	0,81	1,58	51,42
		Rendah Nitrogen	1,06	1,53	67,42
Mutasi	7	Normal Nitrogen	0,68	1,62	41,89
		Rendah Nitrogen	0,89	1,59	55,97
	20	Normal Nitrogen	0,76	1,52	50,32
		Rendah Nitrogen	1,07	1,53	70,03

7. Perhitungan Produktivitas Lipid

Produktivitas lipid dapat dihitung dengan persamaan :

<p>Produktivitas Lipid= $\frac{\text{produktivitas biomassa} \frac{\text{g/L}}{\text{hari}} \times \text{konsentrasi lipid}}{100}$</p>

Produktivitas lipid yang diperoleh dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$\begin{aligned}
 &= \frac{0,235 \times 33,923}{100} \\
 &= 0,079 \text{ (g/L)/hari} \\
 &= 0,079 \text{ (mg/mL)/hari}
 \end{aligned}$$

Tabel Perhitungan Produktivitas Lipid

Kondisi	Waktu Kultur (Hari)	Variabel	Produktivitas biomass (mg/mL)/ hari	<i>Lipid content</i>	Produktivitas Lipid (mg/mL)/ hari
Alami	7	Normal Nitrogen	0,235	33,92	0,080
		Rendah Nitrogen	0,163	54,89	0,089
	20	Normal Nitrogen	0,039	51,42	0,002
		Rendah Nitrogen	0,035	70,03	0,024
Mutasi	7	Normal Nitrogen	0,214	41,90	0,082
		Rendah Nitrogen	0,146	55,97	0,090
	20	Normal Nitrogen	0,010	50,33	0,005
		Rendah Nitrogen	0,054	67,24	0,036

(halaman ini sengaja dikosongkan)

RIWAYAT HIDUP



PENULIS I

Dinar Resti Megarani, anak perempuan tunggal dari dua bersaudara lahir di Kediri, pada tanggal 13 Desember 1993.

Penulis mulai mengenyam pendidikan di SD Bangsal IV(2000-2006), SMP Negeri 3 Kediri (2006-2009), SMA Negeri 6 Kediri (2009-2012), D3 Teknik Kimia FTI-ITS (2012-2015), dan S1 Teknik Kimia FTI – ITS (2016-2018).

Selama menjadi mahasiswa di Teknik Kimia FTI-ITS penulis pernah aktif di Himpunan Mahasiswa D3 Teknik Kimia FTI-ITS sebagai Staff Humas (2013-2014).Penulis berharap dengan adanya skripsi ini dapat memberikan informasi, inspirasi serta ilmu pengetahuan bagi orang-orang yang sedang melakukan penelitian, terutama teruntuk mahasiswa ITS. Apabila ingin berdiskusi atau berhubungan dengan penulis mengenai isi skripsi ini, dapat melalui email ke dinarrest13@gmail.comatau via HP/WA 085735810787.



PENULIS II

Regine Generis merupakan anak terakhir dari dua bersaudara yang lahir di Bondowoso. Pendidikan formal yang telah di tempuh antara lain TKK Indra Rini Bondowoso (1997-1999), SD Negeri Dabasah (1999-2005), SMP Negeri 1 Bondowoso (2005-2008), SMA Negeri 2 Bondowoso (2008-2011), D3 Teknik Kimia FTI-ITS (2012-2015), dan S1

Teknik Kimia FTI – ITS (2016-2018).

Selama menjadi mahasiswa Teknik Kimia FTI-ITS penulis aktif dalam berbagai organisasi antara lain Himpunan Mahasiswa D3 Teknik Kimia FTI-ITS sebagai staff HUMAS (2013-2014) dan BEM FTI-ITS sebagai staff Hubungan Luar (2013-2014). Pada tahun (2014-2015) penulis menjabat sebagai Kabiro Kemitraan Departemen Hubungan Luar BEM FTI-ITS. Penulis juga menulis beberapa karya tulis ilmiah dan mengikuti *Business Plan Competition*. Karya tulis ilmiah penulis didanai DIKTI tahun 2013 sebagai PKMK, penulis juga meraih juara 3 pada *International Business Plan Competition* tahun 2014. Serta pengembangan program kreativitas mahasiswa penulis disponsori pada tahun 2015. Pada tahun 2017 penulis juga berhasil menjadi salah satu finalis pada dua lomba karya tulis ilmiah nasional tentang energi alternatif terbarukan. Penulis berharap dengan adanya skripsi ini dapat memberikan informasi, serta ilmu pengetahuan bagi pihak-pihak yang sedang melakukan penelitian serupa, terutama teruntuk mahasiswa ITS. Apabila ingin berdiskusi dengan penulis mengenai skripsi ini, dapat menghubungi melalui reginegeneris@gmail.com atau via HP/ WA 085731751092.