



TUGAS AKHIR - SB - 184830

**KANDUNGAN LIPID DAN MORFOLOGI  
*Skeletonema costatum* PADA MEDIA CEKAMAN  
NUTRIEN N DAN Si**

**WAHYU OSI DIANA PUTRI  
NRP. 0131154000034**

**Dosen Pembimbing:  
Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si  
Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T**

**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2019**





TUGAS AKHIR - SB - 184830

KANDUNGAN LIPID DAN MORFOLOGI  
*Skeletonema costatum* PADA MEDIA CEKAMAN  
NUTRIEN N DAN Si

WAHYU OSI DIANA PUTRI  
NRP. 0131154000034

Dosen Pembimbing:  
Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si  
Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T

DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2019





FINAL PROJECT - SB - 184830

## LIPID CONTENT AND MORPHOLOGY OF *Skeletonema costatum* ON NUTRIENT N AND Si STRESS

WAHYU OSI DIANA PUTRI  
NRP. 01311540000034

Supervisor:  
Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si  
Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T

BIOLOGY DEPARTEMENT  
FACULTY OF SCIENCE  
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
SURABAYA 2019



## LEMBAR PENGESAHAN

### KANDUNGAN LIPID DAN MORFOLOGI *Skeletonema costatum* PADA MEDIA CEKAMAN NUTRIEN N DAN Si

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains pada  
Departemen S-1 Biologi  
Fakultas Sains  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**WAHYU OSI DIANA PUTRI**  
NRP. 0131154000034

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Kristatnti Indah Purwani, S.Si, M.Si..........(Pembimbing 1)

Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T..........(Pembimbing 2)

Surabaya, 21 Mei 2019



Mengetahui:  
Kepala Departemen Biologi  
Dr. Dewi Hidayati, S.Si, M.Si  
NIP. 1969121199802 2 001





KANDUNGAN LIPID DAN MORFOLOGI *Skeletonema costatum*  
PADA MEDIA CEKAMAN NUTRIEN N DAN Si

**Nama Mahasiswa : Wahyu Osi Diana Putri**  
**NRP : 0131154000034**  
**Departemen : Biologi**  
**Dosen Pembimbing : Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si**  
**Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T**

Abstrak

*Skeletonema costatum adalah mikroalga diatom yang dapat dijadikan sebagai salah satu kandidat biodiesel kerana memiliki kandungan TAGs sebesar 8% dari berat kering dengan doubling time 0,340 sel/hari. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh cekaman nutrien N dan Si terhadap kandungan lipid dan morfologi S. costatum. Metode diawali dengan uji pendahuluan kultur S. costatum dengan kosentrasi nutrien N dan Si yang berbeda, lalu diukur kepadatan sel dengan Haemocytometer untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Parameter pengamatan pada penelitian ini meliputi analisis kandungan lipid secara kuantitatif menggunakan metode soxhlet dan secara kualitatif menggunakan mikroskop fluorescence, serta pengamatan morfologi S. costatum menggunakan SEM. Rancangan yang digunakan adalah RAL kemudian dianalisis menggunakan ANOVA one way ( $\alpha=0,05$ ) dan dilanjutkan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cekaman nutrien N dan Si berpengaruh terhadap kandungan lipid dan morfologi S. costatum. Semakin sedikit jumlah nutrien N dan Si pada media pertumbuhan maka kandungan lipid total S. costatum semakin meningkat, dimana perlakuan N3Si2 (10,25%) dan N2Si2 (6,75%) berbeda signifikan dengan kontrol (1,75%). Kandungan lipid TAGs ditunjukkan dengan adanya pendaran warna kuning pada perlakuan N3Si2. Hasil pengamatan morfologi S. costatum pada perlakuan N3Si2 terjadi perubahan ukuran panjang sel S. costatum yakni 3,9  $\mu\text{m}$  70% lebih kecil dari ukuran normal pada kontrol 10,7  $\mu\text{m}$ .*

*Kata kunci: Cekaman Nutrien (N dan Si), Lipid Total, Morfologi, Skeletonema costatum, dan TAGs*



LIPID CONTENT AND MORPHOLOGY OF *Skeletonema costatum*  
ON NUTRIENT N AND Si STRESS

**Name** : Wahyu Osi Diana Putri  
**NRP** : 0131154000034  
**Departement** : Biology  
**Lecturer** : Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si  
Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T

Abstract

*Skeletonema costatum* is a diatom microalgae that can be used as one candidate for biodiesel because it has a TAGs 8% lipid content of dry weight with doubling time 0.340 cells/day. This study aims to determine the effect of N and Si nutrients on the lipid content and morphology of *S. costatum*. The method begins with a preliminary test of *S. costatum* culture with different concentrations of nutrient N and Si, then measured cell density with *Haemocytometer* for making growth curves. The observation parameters in this study included analysis of quantitative lipid content using the soxhlet method and qualitatively using fluorescence microscopy, and morphological observations of *S. costatum* using SEM. The design used was RAL and then analyzed using one way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) and continued by the Tukey test. The results showed that nutrient N and Si stress proved the lipid content and morphology of *S. costatum*. The less amount of nutrients N and Si in the growth media, the total lipid content of *S. costatum* increased, while the management of N3Si2 (10.25%) and N2Si2 (6.75%) differed significantly from the control (1.75%). The lipid content of TAGs was approved by the presence of a yellow color on N3Si2 administration. Morphological observations of *S. costatum* on the implementation of N3Si have changed the size of the *S. costatum* cell length, which is 3.9  $\mu\text{m}$  70% smaller than the normal size of the control 10.7  $\mu\text{m}$ .

Key words: Morphology, *Skeletonema costatum*, Stress Nutrient (N and Si), Total Lipid, and TAGs.



## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur dipanjatkan kepada kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tugas Akhir dengan judul **Kandungan Lipid dan Morfologi *Skeletonema costatum* Pada Media Cekaman Nutrien N dan Si** di Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Pada penyusunan Tugas Akhir ini tidak lepas dari berbagai pihak. Atas berbagai bimbingan, pada kesempatan ini penulis menghaturkan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk menyelesaikan proposal Tugas Akhir hingga selesai.
2. Ibu Kristanti Indah Purwani, S.Si, M.Si dan Ibu Ir. Endang Purwanti Setyaningsih, M.T selaku dosen pembimbing.
3. Ibu Nur Hidayatul Alami, S.Si, M.Si dan Bapak Dr. Nurul Jadid, M.Sc selaku dosen penguji.
4. Ibu Tutik Nurhidayati, S.Si, M.Si yang telah membimbing dan memberikan dana dalam penyelesaian proyek Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) Kementerian Ristek Dikti 2018.
5. Bapak dan Ibu anggota Laboratorium Pakan Alami dan seluruh pegawai Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP), Situbondo, Jawa Timur.
6. Kedua orang tua, anggota Laboratorium Biosains dan Teknologi Tumbuhan, serta teman-teman angkatan 2015 yang sangat membantu dan memberikan dukungan baik moril maupun materil.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tugas Akhir ini masih jauh dari ideal. Saran dan kritik membangun akan sangat berarti bagi penulis. Penulis berharap Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca.

Surabaya, 20 Mei 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	vii
Abstrak .....	ix
Abstract .....	xi
KATA PENGANTAR.....	xiii
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xix
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxiii

### BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat.....	4

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga .....	5
2.2 <i>Skeletonema costatum</i> .....	7
2.3 Penelitian Cekaman Nutrien N dan Si Pada <i>S. costatum</i> .....	9
2.4 Nitrogen (N) .....	10
2.5 Silika (Si) .....	11
2.6 Fase Pertumbuhan <i>Skeletonema costatum</i> .....	13
2.7 Faktor yang mempengaruhi Pertumbuhan.....	14
2.8 Komposisi Kimia Mikroalga .....	17
2.9 Metabolisme Lipid.....	17
2.10 Lipid Total.....	19
2.11 Nile Red.....	20

2.12 Produksi Biodiesel.....	22
2.13 Metode Ekstraksi Lipid .....	22
2.14 Pengamatan Morfologi Mikroalga .....	24

### BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	27
3.2 Metode yang digunakan .....	27
3.2.1 Sterilisasi Alat dan Bahan Kultur .....	27
3.2.2 Persiapan Pupuk dalam Kultur <i>S. costatum</i> .....	28
3.2.3 Penentuan Waktu Starter <i>S.costatum</i> .....	28
3.2.4 Penentuan Waktu Panen <i>S. costatum</i> .....	29
3.2.5 Perlakuan Penelitian .....	30
3.2.6 Pemanenan Biomassa <i>S. costatum</i> .....	30
3.2.7 Parameter Pengamatan .....	30
3.2.7.1 Analisis Kandungan Lipid <i>S. costatum</i> .....	31
3.2.7.1.1 Analisis Kandungan Lipid Total (Kuantitatif).....	31
3.2.7.1.2 Analisis Kandungan Lipid TAGs (Kualitatif) .....	31
3.2.7.2 Pengamatan Morfologi <i>S. costatum</i> .....	32
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....	32
3.3.1 Rancangan Penelitian .....	32
3.3.2 Analisis Data .....	33

### BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kurva Pertumbuhan <i>S. costatum</i> .....	35
4.2 Kandungan Lipid <i>S. costatum</i> .....	38
4.2.1 Hasil Kandungan Lipid Total <i>S. costatum</i> (Kuantitatif).....	38
4.2.2 Hasil Kandungan TAGa <i>S. costatum</i> (Kualitatif).....	41
4.2.3 Korelasi Kandungan Lipid Total dan Kandungan TAGs ...	44
4.3 Hasil Pengamatan Morfologi <i>S. costatum</i> .....	45



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	49
5.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN .....	65



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Rata-rata Biodiesel dari Berbagai Jenis Tumbuhan .....	6
Tabel 3.1 Komposisi Pupuk Diatom .....	28
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Parameter Morfologi <i>S. costatum</i> .....	46
Tabel 6.1 Data Pengukuran Kurva Pertumbuhan <i>S. costatum</i> Jam ke 0-78 .....	65
Tabel 6.2 Ukuran Morfologi <i>S. costatum</i> .....	66
Tabel 6.3 Hasil Pengamatan Morfologi <i>S. costatum</i> .....	67
Tabel 6.4 Hasil Pengamatan Kandungan TAGs <i>S. costatum</i> .....	69
Tabel 6.4 Rata-rata Ukuran Morfologi <i>S. costatum</i> .....	71



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Reproduksi <i>S. costatum</i> .....	7
Gambar 2.2 Morfologi <i>S. costatum</i> .....	9
Gambar 2.3 Sintesis TAGs pada Cekaman Nitrogen .....	11
Gambar 2.4 Struktur Sel Diatom dan Uptake Silicic Acid .....	12
Gambar 2.5 Kurva Pertumbuhan Populasi <i>S. costatum</i> .....	14
Gambar 2.6 Struktur TAGs.....	18
Gambar 2.7 Sintesis TAGs.....	18
Gambar 2.8 Jalur Sintesis TAGs.....	19
Gambar 2.9 Struktur Kimia Nile Red.....	20
Gambar 2.10 Mekanisme Pewarnaan Nile Red.....	21
Gambar 2.11 Transesterifikasi.....	22
Gambar 2.12 Peralatan Soxhlet.....	23
Gambar 2.13 SEM Schematic Overview.....	24
Gambar 3.1 Ruang Haemocytometer .....	29
Gambar 3.2 Skema Prosedur Penelitian .....	32
Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan <i>S. costatum</i> .....	35
Gambar 4.2 Grafik Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan Lipid Total <i>S. costatum</i> .....	38
Gambar 4.3 Hasil Pengamatan Kandungan TAGs <i>S. costatum</i> ....	42
Gambar 4.4 Hasil Pengamatan Morfologi <i>S. costatum</i> .....	45



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data pengukuran Kurva Pertumbuhan <i>S. costatum</i> ...	65
Lampiran 2. Ukuran Morfologi <i>S. costatum</i> .....	66
Lampiran 3. Hasil Pengamatan Morfologi <i>S. costatum</i> .....	67
Lampiran 4. Hasil Pengamatan Kandungan TAGs <i>S. costatum</i> ...	69
Lampiran 5. Rata-rata Ukuran Morfologi <i>S. costatum</i> .....	71
Lampiran 6. Pengukuran Kansungan Lipid Total <i>S. costatum</i> .....	72
Lampiran 7. Hasil Analisis ANOVA Lipid Total <i>S. costatum</i> .....	73
Lampiran 8. Hasil Analisis ANOVA Panjang <i>S. costatum</i> .....	74
Lampiran 9. Hasil Analisis ANOVA Lebar <i>S. costatum</i> .....	75
Lampiran 10. Hasil ANOVA Panjang Spina <i>S. costatum</i> .....	76
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian.....	77
Lampiran 12. Biodata Penulis.....	93





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Energi alternatif yang dapat dimanfaatkan dalam memenuhi kebutuhan energi dan mengatasi masalah kelangkaan sumber energi adalah biodiesel. Biodiesel merupakan sumber energi yang potensial untuk menggantikan bahan bakar solar karena bersifat *biodegradable*, *renewable* dan ramah lingkungan (Wahyuni dkk, 2011). Salah satu bahan baku penghasil biodiesel yang cukup potensial adalah mikroalga (Yanuhar, 2016). Mikroalga mempunyai prospek yang sangat baik untuk dikembangkan sebagai salah satu kandidat bahan baku penghasil biodiesel. Hal ini dikarenakan mikroalga memiliki kemampuan tumbuh dengan cepat, kemampuan berfotosintesis tinggi berkisar 3-8%, siklus hidup yang pendek ( $\pm 1-10$  hari), kemampuan mensintesis lemak yang tinggi ( $\pm 40-86\%$  berat kering biomassa), mampu bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim, serta tidak memerlukan area yang luas untuk kegiatan produksi (Amini & Sulilowati, 2010).

Mikroalga lebih efisien dalam produksi minyak untuk biodiesel dibandingkan dengan tanaman tingkat tinggi, hal ini dikarenakan mikroalga memiliki struktur seluler yang lebih sederhana sehingga kemampuan untuk mengkonversi energi matahari dalam proses fotosintesis lebih efisien (Kawaroe dkk, 2012). Dimana mikroalga mampu menghasilkan minyak 200 kali lebih banyak yakni 136.900 L (70% kandungan lipid) dibandingkan dengan tanaman penghasil minyak (kelapa sawit, jarak pagar, dll) dalam satuan luas lahan yang sama (Barqi, 2015). Salah satu kelompok mikroalga yang memiliki kandungan lipid tertinggi yakni mikroalga diatom. Salah satu contoh spesies dari kelompok mikroalga diatom yakni *S. costatum*. *Skeletonema costatum* direkomendasikan menjadi salah satu kandidat bahan baku biodiesel karena memiliki kandungan lipid *triacylglycerides* (TAGs) sebesar 8% dari berat kering (Junda dkk, 2015). Selain itu keuntungan

mikroalga *S. costatum* yakni memiliki laju pertumbuhan relatif cepat dengan *doubling time* 0,340 sel/hari (Abdulgani, 2007).

Akumulasi lipid mikroalga mempunyai kecenderungan meningkat dalam kondisi tercekam (Barqi, 2015). Hal ini dikarenakan pada kondisi tercekam mikroalga mengubah jalur biosintesis lipid struktural menuju pembentukan lipid simpanan dalam bentuk *triacylglycerides* (TAGs) sebagai pertahanan sel (Schuhmann *et al*, 2011). Kandungan lipid pada mikroalga cenderung memiliki proporsi yang berbanding terbalik pada laju pertumbuhan dan kondisi lingkungan yang bervariasi (Katili, 2012). Oleh karena itu untuk menghasilkan jumlah lipid yang tinggi dapat diinduksi dengan mengubah kondisi pertumbuhan, umumnya dengan perlakuan cekaman nutrisi N dan Si pada medium pertumbuhan (Thao *et al*, 2017).

Perlakuan cekaman nutrisi N dapat meningkatkan produksi lipid dengan mengubah jalur metabolisme protein struktural ke bentuk asetil co-A, dimana asetil co-A berperan sebagai prekursor pembentukan lipid simpanan untuk pertahanan sel (Nur, 2014; Widyaningsih dkk, 2012). Sedangkan perlakuan cekaman Si dapat meningkatkan produksi lipid yang berperan sebagai osmoproteksi untuk mempertahankan turgiditas sel dalam kondisi defisiensi Si, hal ini dikarenakan Si merupakan elemen yang dibutuhkan mikroalga diatom untuk pembentukan dinding sel (Umiatun *et al*, 2017). Selain itu menurut Chen *et al* (2014) jika terjadi pembatasan terhadap suplai nutrisi pada *S. costatum* baik makronutrien (N) dan mikronutrien (Si) dapat menyebabkan perubahan morfologi *S. costatum*, salah satunya ditunjukkan pada perubahan ukuran sel (Balzano *et al*, 2010). Menurut Sumeru & Anna (1992) sel *S. costatum* yang tercekam akan mengalami perubahan ukuran sel 70% lebih kecil dari bentuk normal. Dimana sel normal *S. costatum* berbentuk kotak cincin perifer tubular dengan ukuran panjang sel 4-15  $\mu\text{m}$ , lebar sel 3,5-10  $\mu\text{m}$ , dan panjang spina 3-8  $\mu\text{m}$  (Joint *et al*, 2007; Naik *et al*, 2010; Paasche, 1980).

Penelitian ini menggunakan komposisi nutrisi hasil terbaik dari penelitian sebelumnya (Ferdianto, 2018) yakni untuk

hasil kepadatan sel tertinggi pada perlakuan N3Si2 menggunakan  $\text{KNO}_3$  (cekaman nutrisi N) sebesar 0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (cekaman nutrisi Si) sebesar 15 gr/l. Sedangkan untuk hasil kandungan TAGs (kualitatif) tertinggi pada perlakuan N2Si2 menggunakan  $\text{KNO}_3$  (cekaman nutrisi N) sebesar 37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (cekaman nutrisi Si) sebesar 15 gr/l. Akan tetapi hasil yang diperoleh dari penelitian sebelumnya mengenai kandungan lipid total (kuantitatif) dan morfologi belum diketahui, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan lipid dan morfologi *S. costatum* terhadap pengaruh media cekaman nutrisi N dan Si.

## 1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang akan dibahas pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh cekaman nutrisi N dan Si terhadap kandungan lipid dan morfologi *Skeletonema costatum*?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah

1. Kultur murni *Skeletonema costatum* dan air laut yang digunakan pada penelitian diperoleh dari BPBAP (Balai Perikanan Budidaya Air Payau) Situbondo, Jawa Timur.
2. Komposisi pupuk diatom yang digunakan adalah hasil terbaik dari penelitian Ferdianto (2018) yakni N3Si2 ( $\text{KNO}_3$  0 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l) dan N2Si2 ( $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l).
3. Parameter pengamatan morfologi *S. costatum* yang diamati meliputi panjang, lebar, dan panjang spina pada satu sel tiap koloni dengan 3 kali pengulangan.
4. Faktor lingkungan yaitu suhu, pH, dan salinitas diatur pada awal inokulasi, perubahannya selama kultur diabaikan.

## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh cekaman nutrisi N dan Si terhadap kandungan lipid dan morfologi *Skeletonema costatum*.

### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai data dasar untuk mengetahui kandungan lipid dan perbedaan susunan morfologi *Skeletonema costatum* dengan perlakuan cekaman nutrisi N dan Si. Sehingga dapat dijadikan sebagai salah satu kandidat bahan baku biodiesel.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Mikroalga**

Mikroalga adalah mikroorganisme uniseluler yang memiliki kemampuan berfotosintesis dan hidup mengapung di perairan tawar ataupun laut (Yanuhar, 2016; Widiyanto *et al*, 2014). Mikroalga menjadi bagian penting dalam ekosistem laut, hal ini dikarenakan mikroalga berperan sebagai produsen primer bagi organisme laut seperti ikan, udang, kerang, dll (Ackman, 2000). Menurut Rajvanshi & Sharma (2012), mikrolaga dikelompokkan menjadi 4 yakni Bacillariophyceae (alga diatom), Chlorophyceae (alga hijau), Cyanophyceae (alga biru-hijau), dan Chrysophyceae (alga pirang). Mikroalga membutuhkan nutrisi untuk menunjang pertumbuhannya, dimana nutrisi tersebut berupa bahan anorganik, mikronutrien (Fe, Zn, Cu, Si, Mg, Mo, Co, B, dan lain-lain) dan makronutrien (N, P, K, C, S, dan Ca) (Pratiwi, 2015).

Potensi biodiesel dari mikroalga dapat menjadi solusi alternatif untuk mengganti bahan bakar solar. Tumbuhan seperti kelapa sawit, jarak, dan kacang-kacangan membutuhkan lahan yang sangat luas untuk menghasilkan minyak dalam mencukupi kebutuhan solar di Indonesia. Hal ini dapat menjadi kendala apabila diimplementasikan di Indonesia karena luasan lahan hutan semakin berkurang setiap tahunnya. Oleh karena itu mikroalga dapat menjadi salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut, dimana mikroalga mampu menghasilkan minyak 200 kali lebih banyak yakni 136.900 L (70% kandungan lipid berdasarkan biomassa berat kering) dibandingkan dengan tanaman penghasil minyak (kelapa sawit, jarak pagar, dll) dalam satuan luas lahan sesuai dengan Tabel 2.1 (Barqi, 2015)

Tabel 2.1. Rata-rata Biodiesel dari Berbagai Jenis Tumbuhan dan Mikroalga serta Satuan Lahan yang Diperlukan (Chisti, 2007).

No.	Tumbuhan	Produksi Minyak (L/Ha)	Luas Lahan yang diperlukan (Ha)
1.	Jagung	172	1540
2.	Kedelai	446	294
3.	Canola	1190	223
4.	Jarak	1892	140
5.	kelapa	2689	99
6.	Sawit	5950	45
7.	Mikroalga	136.900	2

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan bahwa, mikroalga memiliki potensi yang sangat besar sebagai penghasil bahan baku biodiesel dibandingkan dengan tanaman tingkat tinggi lainnya. Hal ini dikarenakan penggunaan dan pengembangan mikroalga memiliki beberapa keuntungan sebagai sumber energi alternatif menurut Amini & Sulilowati (2010) yakni diantaranya:

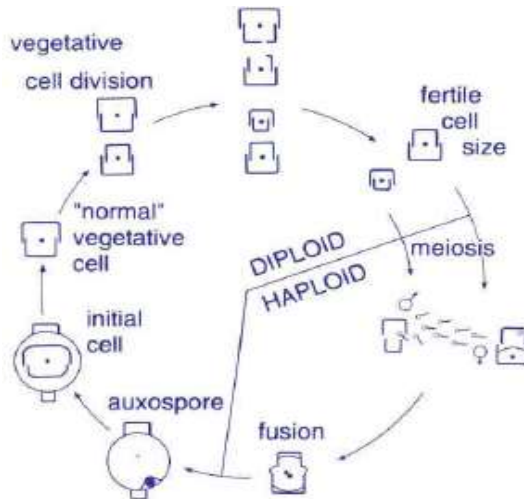
- a) Memiliki struktur sel yang sederhana (uniseluler)
- b) Kemampuan berfotosintesis yang tinggi, dimana 3-8% sinar matahari yang dapat dikonversi menjadi energi dibanding dengan tanaman tingkat tinggi lainnya yang hanya sekitar 0,5%.
- c) Memiliki siklus hidup yang pendek ( $\pm 1-10$  hari).
- d) Memiliki kemampuan yang tinggi dalam mensintesis lemak ( $\pm 40-86\%$  berat kering biomassa).
- e) Memiliki kemampuan bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim (salinitas tinggi).
- f) Tidak banyak membutuhkan pupuk dan nutrisi.
- g) Tidak bersaing dengan produk pangan.

Kandungan lipid mikroalga mencapai 15-77% dari bobot kering biomasanya bergantung dengan jenis spesies mikroalga (Spolaore *et al*, 2006). Kandungan lipid tertinggi dari mikroalga terdapat pada awal fase eksponensial sampai awal fase stasioner.

Produktivitas lipid pada mikroalga yang tinggi, digunakan untuk memproduksi biodiesel (Weldy & Heusemann, 2007).

## 2.2 *Skeletonema costatum*

*Skeletonema costatum* merupakan salah satu jenis mikroalga unisel filamen yang memiliki struktur sel berbentuk kotak cicin perifer yang terdiri atas *epitheca* (bagian yang lebih besar) dan *hypotheca* (bagian yang lebih kecil) yang bertangkup menjadi satu (*frustula*). Bagian *hypotheca* memiliki pola khas yang tersusun atas silikon oksida ( $\text{SiO}_2$ ) (Armanda, 2013). Secara morfologi, sel *S. costatum* mempunyai ukuran panjang 4-15  $\mu\text{m}$ , lebar 3,5-10  $\mu\text{m}$ , dan panjang spina 3-8  $\mu\text{m}$  (Joint *et al.*, 2007; Naik *et al.*, 2010; Paasche, 1980). Antara sel yang satu dengan sel lainnya dihubungkan dengan spina sehingga membentuk untaian rantai yang panjang (7-9 sel/filamen) (Fitriani dkk, 2018).



(Valestrand *et al.*, 2018).

Gambar 2.1 Reproduksi *Skeletonema costatum*

Perkembangan *S. costatum* terbagi menjadi dua cara, yaitu secara aseksual (vegetatif) dan secara seksual (generatif). Secara aseksual yaitu dengan mengadakan pembelahan sel (*binary fission*)

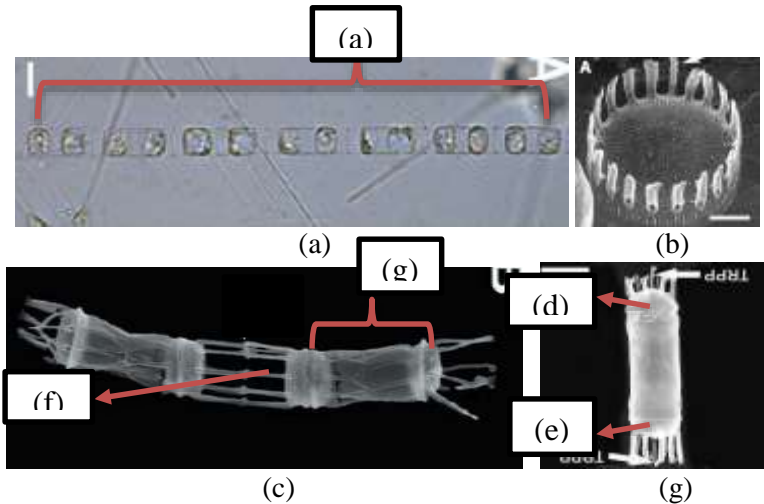
secara terus menerus apabila kondisi media hidupnya terpenuhi. Pembelahan sel *S. costatum*, yaitu protoplasma terbagi menjadi dua bagian yang disebut *epitheca* dan *hypotheca*, masing-masing bagian ini akan membentuk *epitheca* dan *hypotheca* baru yang ukurannya lebih kecil dari ukuran induknya. Pembelahan sel yang berulang-ulang mengakibatkan ukuran sel *S. costatum* semakin mengecil. Disaat ukuran sel telah mencapai 7  $\mu\text{m}$ , maka reproduksi *S. costatum* berubah menjadi reproduksi secara seksual melalui pembentukan axospora. Mula-mula *epitheca* dan *hypotheca* ditinggalkan dan menghasilkan auxospora tersebut. Axospora akan membentuk *epitheca* dan *hipotheca* baru yang tumbuh menjadi sel vegetatif normal yang ukurannya besar. Setelah itu, sel vegetatif tersebut akan melakukan pembelahan sel lagi hingga membentuk seperti rantai (Fitriani dkk, 2017).

Kelebihan *S. costatum* yakni mudah dikembangbiakkan dan memerlukan waktu yang relatif lebih singkat dalam pemeliharaannya dibandingkan dengan mikroalga jenis lain yakni *doubling time* 0,340 sel/hari (Abdulgani, 2007). Selain itu komposisi kimia yang terkandung pada *S. costatum* yaitu protein 59%, lipid 8%, dan karbohidrat 33% (Junda dkk, 2015). Karetinoid dan diatomin merupakan pigmen yang paling dominan pada *S. costatum* (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). *Skeletonema costatum* tumbuh optimum pada salinitas 17-25 ppt, pH 7,5-8, dan suhu 25-27°C. (Supriyantini, 2013).

Klasifikasi *Skeletonema costatum* sebagai berikut:

- Kingdom : Chromista
- Divisi : Chrysophyta
- Kelas : Bacillariophyceae
- Ordo : Thalassiosirales
- Famili : Skeletonemaceae
- Genus : Skeletonema
- Spesies : *Skeletonema costatum* (Kumar & Prabu, 2014).





Gambar 2.2. Morfologi *Skeletonema costatum*

Keterangan: (a) Rantai Sel *S.costatum* pada Mikroskop Cahaya (b) Pola Struktur Frustula (c) Morfologi *S. costatum* pada SEM (d) *Epitheca* (e) *Hypotheca* (f) Spina (penghubung antar sel) (g) Satu sel *S. costatum* (Sarno & Kooistra, 2005; Jung *et al*, 2009).

### 2.3 Penelitian Cekaman Nutrien (N dan Si) *S. costatum*

Penelitian mengenai pengaruh cekaman nutrien N terhadap pertumbuhan dan kandungan lipid total *S. costatum* telah dilakukan oleh (Candra, 2015). Pada penelitian tersebut kultur mikroalga diberi pupuk diatom dengan konsentrasi N berbeda yakni 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Hasil dari penelitian tersebut menyatakan bahwa pertumbuhan *S. costatum* ditunjukkan dengan kepadatan sel tertinggi pada perlakuan kontrol (0%) yakni 2.404.000 sel/ml, dan kepadatan sel terendah pada perlakuan tanpa nitrogen (100%) yakni 1.326.133 sel/ml. Penurunan konsentrasi N pada media berpengaruh terhadap kandungan lipid total *S. costatum* terjadi pada media tanpa nitrogen sebesar 0,692% dan terjadi penurunan pada media dengan konsentrasi N 75%, 50%, dan 25% sebesar 0,019% dibandingkan dengan kontrol 0,024 %. Sedangkan penelitian mengenai pengaruh cekaman nutrien Si terhadap pertumbuhan dan kandungan lipid total *S. costatum* telah dilakukan oleh (Pratiwi, 2010). Pada penelitian tersebut kultur mikroalga

diberi pupuk diatom dengan konsentrasi Si berbeda yakni 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Hasil dari penelitian tersebut menyatakan bahwa pertumbuhan *S. costatum* ditunjukkan dengan kepadatan sel tertinggi pada perlakuan kontrol (0%) yakni 107.900 sel/ml, dan kepadatan sel terendah pada perlakuan tanpa Si (100%) yakni 56.230 sel/ml. *Skeletonema costatum* yang dicekam Si 75% menghasilkan kandungan lipid total tertinggi yakni 3,46% dan terendah pada perlakuan cekaman Si 100% sebesar 2,25%.

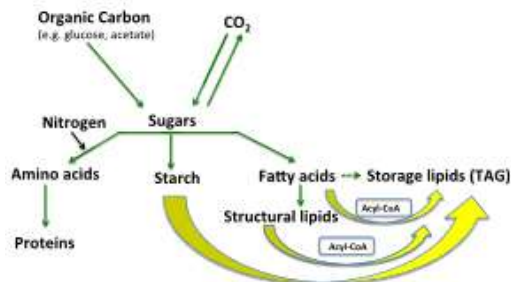
Penelitian mengenai pengaruh cekaman nutrisi N dan Si terhadap pertumbuhan dan kandungan TAGs *S. costatum* telah dilakukan oleh (Ferdianto, 2018). Pada penelitian tersebut mikroalga diberi pupuk diatom dengan konsentrasi N dan Si berbeda yakni 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Hasil dari penelitian tersebut menyatakan bahwa pertumbuhan mikroalga *S. costatum* menghasilkan kepadatan sel tertinggi terdapat perlakuan N3Si2 ( $\text{KNO}_3$  0 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l) dengan kepadatan 96.500 sel/ml, sedangkan perlakuan N2Si2 ( $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  0 gr/l) menghasilkan kepadatan sel terendah yakni 59.500 sel/ml. Sedangkan *S. costatum* yang memiliki kandungan TAGs (kualitatif) tertinggi pada perlakuan N2Si2 ( $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l) ditunjukkan dengan pendaran warna kuning-oranye, sedangkan kandungan TAGs terendah terdapat pada perlakuan N2Si3 ( $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  0 gr/l) serta perlakuan N3Si3 ( $\text{KNO}_3$  0 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  0 gr/l) ditunjukkan dengan pendaran warna merah.

## 2.4 Nitrogen (N)

Nitrogen merupakan unsur penting bagi pertumbuhan mikroalga. Saat fase ini terjadi tiga proses penting yakni pembelahan sel, pemanjangan sel, dan diferensiasi sel. Nitrogen merupakan bagian penting dari protein, protoplasma, klorofil, dan asam nukleat dalam sel mikroalga. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), amonia ( $\text{NH}_4^+$ ), urea organik, dan nitrit merupakan bentuk nitrogen yang biasa digunakan oleh sebagian besar mikroalga. Backer (2004) menjelaskan bahwa kebutuhan nitrogen untuk mikroalga diatom adalah 5-59  $\mu\text{M}$ , namun bisa sangat bervariasi. Kebanyakan

medium mengandung nitrat atau amonium sebagai sumber nitrogennya (Nurfajarwati, 2006). Ketika kondisi media pertumbuhan dengan kandungan nitrogen rendah, proses fotosintesis tetap berjalan meskipun lajunya menurun sampai nitrogen sel berada dibawah ambang batas kritis. Ketika dalam kondisi defisiensi N maka mikroalga akan membatasi pertumbuhan karena tidak ada pembentukan protoplasma baru. Aliran karbon hasil fotosintesis dialihkan dari jalur sintesis protein ke sintesis lemak atau karbohidrat (Adetola, 2011).

Nitrogen merupakan unsur makronutrien yang dapat mempengaruhi kegiatan metabolisme sel yaitu proses transportasi, katabolisme, asimilasi, dan khususnya biosintesis protein. Biosintesis protein menyebabkan terjadinya reaksi enzimatik yang dapat mengkonversi lipid struktural menjadi lipid simpanan dalam kondisi tercekam, sehingga dalam kondisi defisiensi nitrogen dapat memicu akumulasi lipid simpanan dalam bentuk TAGs (lipid netral) sebagai bentuk pertahanan diri dari stress jangka panjang (Ma *et al*, 2016).



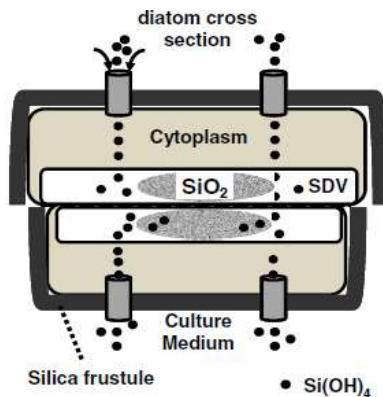
Gambar 2.3 Sintesis TAGs pada Cekaman Nitrogen (Goncalves *et al*, 2016).

## 2.5 Silika (Si)

Silika (Si) merupakan nutrien yang banyak dimanfaatkan oleh mikroalga kelas Bacillariophyceae (Diatom) untuk pertumbuhan dan perkembangannya yakni sebagai salah satu sumber elemen untuk pembentukan komposisi frustula pada

lapisan dinding sel Bacillariophyceae dalam proses asimilasi (Triswano, 2011). Sumber utama silika terlarut di laut yaitu dari sungai dan aktivitas vulkanik di bawah laut dalam bentuk  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (DeMaster, 1981).

Silika (Si) merupakan bahan utama pembentuk dinding sel Bacillariophyceae (Diatom) sehingga Si menjadi kebutuhan vital. Dinding sel yang bersilikat ini merupakan bentuk adaptasi Bacillariophyceae sebagai mikroalga yang bisa melekat di substrat (bentonik) selain sifatnya yang planktonik (Sudiharjo, 2002). Frustula merupakan eksoskeleton yang dibentuk melalui proses yang disebut biosilikifikasi. Biosilikifikasi merupakan proses menyerap silikon terlarut dan mengendapkannya dalam bentuk silikon oksida amorf ( $\text{SiO}_2$ ) dan membentuk frustula. Setiap frustula diatom terdiri dari 2 katup tumpang tindih (*epitheca* dan *hypotheca*). Ketika diatom bersiap untuk membelah diri, maka silikon dalam bentuk  $\text{Si}(\text{OH})_4$  diangkut melalui dinding sel dan masuk ke dalam sitoplasma melalui protein transport silikon (Gambar 2.4).  $\text{Si}(\text{OH})_4$  dalam sitoplasma diangkut ke *Silicon Deposition Vesicle* (SDV) dan dipolimerisasi ke dalam bentuk frustula diatom baru yaitu silika amorf ( $\text{SiO}_2$ ). Ketika pembentukan frustula baru telah komplet maka diatom siap membelah (Jeffryes *et al*, 2013).



Gambar 2.4 Struktur Sel Diatom, Penyerapan dan Uptake Silicic Acid (Jeffryes *et al*, 2013).

Manipulasi metabolisme silikon dapat mempengaruhi morfologi dan metabolisme lipid, termasuk *triacylglycerides* (TAGs) pada mikroalga *S. costatum*. Hal ini dikarenakan dalam kondisi defisiensi Si, maka akan terjadi perubahan ukuran sel 70% lebih kecil dari bentuk normal. Dimana sel normal *S. costatum* berbentuk kotak cicin perifer tubular dengan ukuran panjang sel 7-15  $\mu\text{m}$ , lebar sel 3,5-10  $\mu\text{m}$ , dan panjang spina 3-8  $\mu\text{m}$  (Joint *et al*, 2007; Naik *et al*, 2010; Paasche, 1980).

## 2.6 Fase Pertumbuhan *Skeletonema costatum*

Pertumbuhan adalah suatu proses bertambahnya jumlah dan volume sel. Secara normal *S. costatum* ini bereproduksi secara aseksual, yaitu dengan pembelahan sel. Pembelahan sel yang terjadi berulang-ulang ini akan mengakibatkan ukuran sel menjadi lebih kecil secara berangsur-angsur hingga generasi tertentu (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). Pertumbuhan sel *S. costatum* terdiri atas 4 fase yakni sebagai berikut:

### 1. Fase *Lag*

Fase *lag* disebut juga fase adaptasi. Pada fase ini, sel diatom beradaptasi dengan medium dan lingkungan kulturnya (suhu, salinitas, dan pH). Pada fase adaptasi ini, diatom sudah mulai memanfaatkan nutrisi yang ada, meskipun belum optimum, sehingga beberapa enzim yang terkait pembelahan selnya juga belum tersintesis dengan optimal. Lama tidaknya fase *lag* ini sangat tergantung pada viabilitas sel diatom. Bila sel inokulum adalah sel yang masih muda (artinya diambil dari kultur yang dalam keadaan fase eksponensial, bukan fase stasioner atau kematian), berarti sel ini masih viabel untuk membelah (Fogg & Thake, 1987). Sel-sel yang viabel akan lebih cepat beradaptasi. Sehingga sel-sel viable pada fase *lag* ini menjadi lebih singkat, dan sebaliknya, sel-sel tua akan melalui fase ini lebih lama untuk beradaptasi (Armanda, 2013).

### 2. Fase *Log* (Eksponensial)

Pada fase *log*, jumlah sel mengalami peningkatan secara cepat. Puncak pertumbuhan populasi diatom terjadi pada fase ini. Pada fase ini menunjukkan bahwa sel telah berhasil beradaptasi

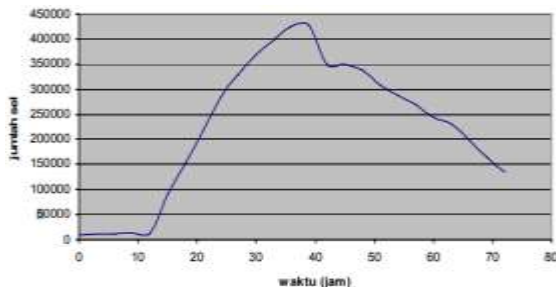
dan pemanfaatan nutrisi pada media kultur sangat optimal (Armanda, 2013). Selain pada fase eksponensial akhir, sel mikroalga berada dalam kondisi yang paling optimal, sehingga kandungan nutrisi dalam selnya sangat tinggi (Duong *et al*, 2012).

### 3. Fase *Stationer*

Pada fase *stationer*, pertumbuhan populasi diatom cenderung stasioner, artinya jumlah antara sel yang membelah dan sel yang mati seimbang. Penurunan pertumbuhan populasi ini karena terjadinya penurunan kecepatan perkembangan secara bertahap hal ini dipengaruhi ketersediaan nutrisi pada media tumbuh semakin berkurang (Triswanto, 2011).

### 4. Fase *Death*

Pada fase *death*, ditandai dengan penurunan jumlah sel *S. costatum* lebih besar daripada pada fase stasioner. Penurunan jumlah sel ini dikarenakan seluruh sel secara alami mengalami kematian. Faktor yang mempercepat fase kematian ini adalah semakin berkurangnya nutrisi, semakin banyaknya metabolit sekunder diatom yang dapat menghambat pertumbuhan sel secara alami, dan umur mikroalga (Armanda, 2013). Selain itu pada fase ini terjadi kompetisi antar individu dalam memanfaatkan unsur hara, ruang, dan cahaya (Fauziah & Hatta, 2015).



Gambar 2.5 Kurva Pertumbuhan *S.costatum* (Abdulgani dkk, 2008).

## 2.7 Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan

Kultivasi mikroalga *S. costatum* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti faktor eksternal (lingkungan) dan nutrisi yang dapat

mempengaruhi laju pertumbuhan dan metabolisme mikroalga. Faktor-faktor tersebut adalah :

a. pH (Derajat Keasaman)

Variasi pH dalam media kultur dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan kultur mikroalga yakni salah satunya mempengaruhi fisiologi sel. Hal ini dikarenakan pH mempengaruhi kelarutan dan ketersediaan ion mineral yang dapat menyebabkan kinerja enzim menjadi tidak optimal, kondisi tersebut menyebabkan proses fotosintesis dan pertumbuhan mikroalga menjadi terhambat. Kisaran pH optimum untuk kultur *S. costatum* yakni 7,5-8 (Anggraeni & Sandhi, 2015).

b. Salinitas

Salinitas dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Tinggi rendahnya salinitas akan mempengaruhi tekanan osmotik sel mikroalga. Hampir semua jenis mikroalga dapat tumbuh optimal pada salinitas di bawah habitat asal (Anggraeni & Sandhi, 2015). *Skeletonema costatum* mampu tumbuh pada kisaran salinitas yang luas yaitu 15-34 ppt dan salinitas optimum untuk pertumbuhan yakni berkisar 20-30 ppt (Supriyantini, 2013).

c. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga terhadap proses fisika, kimia, dan biologi. Peningkatan suhu dapat menurunkan suatu kelarutan bahan dan dapat menyebabkan peningkatan kecepatan metabolisme dan respirasi mikroalga di perairan. Secara umum suhu optimal dalam kultur mikroalga berkisar antara 20-24°C. Suhu dalam kultur diatur sedemikian rupa bergantung pada media yang digunakan. Suhu di bawah 16°C dapat menyebabkan pertumbuhan menurun, sedangkan suhu di atas 36°C dapat menyebabkan kematian (Anggraeni & Sandhi, 2015). *Skeletonema costatum* hidup pada suhu 3-34°C dengan suhu optimum 25-27°C (Uddin & Zafar, 2007).

d. Cahaya

Cahaya merupakan sumber energi dalam proses fotosintesis yang berguna untuk pembentukan senyawa karbon organik.

Intensitas cahaya sangat menentukan pertumbuhan mikroalga yaitu dilihat dari lama penyinaran dan panjang gelombang yang digunakan untuk fotosintesis. Cahaya berperan penting dalam pertumbuhan mikroalga. tetapi kebutuhannya bervariasi yang disesuaikan dengan kepadatan kulturnya (Anggraeni & Sandhi, 2015). Tingkat pertumbuhan *S. costatum* meningkat dengan intensitas cahaya yang berlanjut sampai 500 sampai 10.000 lux dan menurun pada intensitas melebihi 10.000 lux (Uddin & Zafar, 2007).

e. CO<sub>2</sub>

Karbondioksida diperlukan oleh mikroalga untuk membantu proses fotosintesis. Karbondioksida dengan kadar 1-2% biasanya sudah cukup digunakan dalam kultur mikroalga dengan intensitas cahaya yang rendah. Kadar karbondioksida yang berlebih dapat menyebabkan pH kurang dari batas optimum sehingga akan berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga (Anggraeni & Sandhi, 2015).

f. Nutrien

Mikroalga memperoleh nutrien dari air laut yang sudah mengandung unsur hara yang cukup lengkap. Namun pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat mencapai optimum dengan mencampurkan air laut dengan nutrien yang tidak terkandung dalam air laut tersebut. Nutrien tersebut dibagi menjadi makro nutrien dan mikro nutrien. Unsur makro nutrien terdiri atas N, P, K, C, dan Ca. Unsur mikro nutrien terdiri atas Fe, Zn, Si, Cu, Mg, Mo, Co, B, dan lainnya (Anggraeni & Sandhi, 2015).

g. Aerasi

Aerasi dalam kultivasi mikroalga digunakan dalam proses pengadukan media kultur. Pengadukan sangat penting dilakukan bertujuan untuk mencegah terjadinya pengendapan dan nutrien tersebar dengan baik sehingga mikroalga dalam kultur mendapatkan nutrien yang merata, mencegah stratifikasi suhu, serta meningkatkan pertukaran gas dari udara ke media (Anggraeni & Sandhi, 2015).



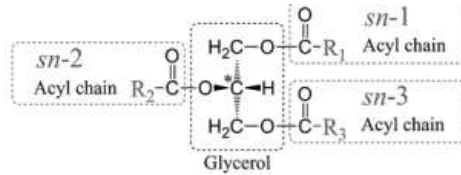
## 2.8 Komposisi Kimia Mikroalga

Mikroalga dapat dijadikan sebagai salah satu sumber makanan dalam bidang akuakultur karena mengandung nilai gizi, serta mampu mensintesis dan mengakumulasi *Polysaturated Fatty Acid* (PUFA) (Gouveia *et al*, 2008). Kandungan maksimum protein mikroalga terjadi pada fase eksponensial, hal ini menunjukkan adanya hubungan antara protein dan karbohidrat yang mencerminkan ketersediaan karbon dan nitrogen di dalam sel mikroalga (Geider *et al*, 1993). Ketika kecepatan pembelahan sel pada kultur mikroalga dibatasi oleh nutrien, maka sel mikroalga akan mengubah metabolismenya dan mengkonversi energi untuk memproduksi substansi cadangan. Dimana pada akhir kultur dengan frekuensi nutrien yang terbatas, maka sintesis protein dan klorofil menurun dan konsentrasi lipid atau karbohidrat meningkat (Costard *et al*, 2012).

Perubahan komposisi kimia mikroalga dipengaruhi oleh kondisi kultur, dimana mikroalga dikultur pada kondisi yang kontras dengan kondisi alaminya maka akan menyebabkan perubahan pada fase pertumbuhannya. Laju pertumbuhan mikroalga berbanding terbalik dengan kandungan lipid pada kondisi lingkungan yang bervariasi (Katili, 2012). Komposisi kimia yang terkandung pada *S. costatum* yaitu protein 59%, lipid 8%, dan karbohidrat 33% (Junda dkk, 2015). Selain itu komposisi asam lemak pada mikroalga yaitu berupa *Monounsaturated Fatty Acids* (MUFAs) dan *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFAs) (Katili, 2012).

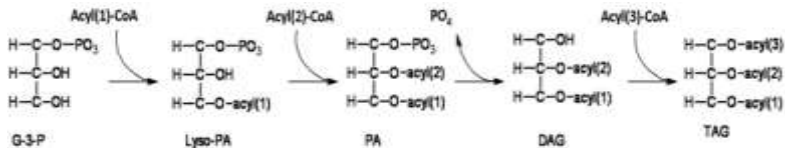
## 2.9 Metabolisme Lipid

*Triacylglycerides* (TAGs) merupakan triester dari gliserol dan asam lemak yang berperan sebagai prekursor produksi biodiesel dan termasuk lipid non polar (Widianingsih dkk, 2012; Hoffman *et al*, 2010). Hidrolisis lemak tiap molekulnya akan menghasilkan gliserol dan 3 asam lemak (Motoyama, 2012).



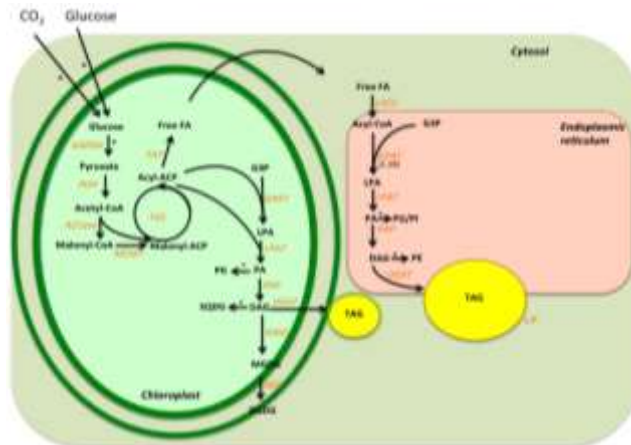
Gambar 2.6 Struktur TAGs (Motoyama, 2012).

Sintesis TAGs terdiri dari menjadi tiga langkah, yakni pembentukan asetil co-A dalam proses fotosintesis, pemanjangan rantai asam lemak, dan pembentukan TAGs (Jeffryes *et al*, 2013). Biosintesis TAG pada mikroalga melalui jalur gliserol langsung dengan enzim *acyl transferase* yang menentukan komposisi asil TAG. Asam lemak yang diproduksi di kloroplas secara berurutan Acyl-CoA ditambahkan ke glycerol-3-pospat oleh enzim *glycerol-3-pospat acyl transferase* untuk membentuk lyso-PA, selanjutnya terbentuk *phosphaditic acid* (PA) oleh enzim *lyso-phosphaditic acid acyl transferase*. *Phosphaditic acid* (PA) mengalami defosforilasi oleh enzim spesifik *phosphaditic acid phosphatase* yang mengkatalisis pembentukan diasilgliserol (DAG). Pada tahap akhir, asetil co-A ditambahkan ke rantai diasilgliserol yang dikatalisis oleh enzim *diacylglycerol acyl transferase* untuk membentuk triasilgliserol (TAGs) (Hu *et al*, 2008).



Gambar 2.7 Sintesis TAGs (Jeffryes *et al*, 2013).

Pada saat mikroalga kekurangan unsur Si, maka akan terjadi peningkatan produksi asam lemak, sehingga pembentukan TAGs melalui jalur gliserol-3-fosfat meningkat pula. TAGs ditransfer ke sitoplasma kemudian akan menjadi vesikel lipid untuk menyimpan karbon dan energi (Jeffryes *et al*, 2013).



Gambar 2.8 Jalur Sintesis Lipid (Ma *et al*, 2016).

## 2.10 Lipid Total

Lipid adalah senyawa yang tidak larut dalam air, hal ini dikarenakan lipid merupakan molekul non polar, sedangkan air merupakan molekul polar akan tetapi lipid dapat larut dalam pelarut organik non polar seperti kloroform, heksana, eter, benzene, toluen, dan methanol (Boyer, 2002). Lipid disintesis dari karbohidrat dan protein, karena dalam metabolisme ketiga zat tersebut bertemu di dalam siklus Krebs. Pertemuan di dalam siklus Krebs berlangsung melalui pintu gerbang utama siklus Krebs yaitu asetil co-A, sehingga senyawa lipid, karbohidrat, dan protein dapat saling mengisi sebagai senyawa pembentuk semua zat tersebut, dimana lipid dapat dibentuk dari protein dan karbohidrat, karbohidrat dapat dibentuk dari lipid dan seterusnya (McSween *et al*, 2003; Katili, 2012).

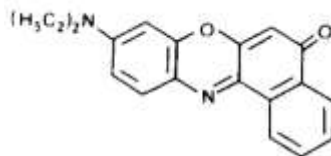
Sintesis lipid dari karbohidrat dimulai dari penguraian glukosa menjadi piruvat sehingga menghasilkan gliserol. Tahap kedua glukosa diubah menjadi gula fosfat kemudian menjadi asetil co-A sehingga menghasilkan asam lemak. Gliserol dan asam lemak jika digabungkan akan menghasilkan lipid (Campbell *et al*, 2002). Sintesis lipid dari protein diawali dengan perubahan protein menjadi asam amino dengan bantuan *enzim protease*, sebelum

terbentuk lemak asam amino mengalami deaminasi terlebih dahulu, setelah itu memasuki daur Krebs. Banyak jenis asam amino yang langsung ke asam piruvat sehingga menghasilkan asetil co-A. Asam amino, serin, alanin, valin, leusin, isoleusin dapat terurai menjadi asam piruvat, selanjutnya asam piruvat menjadi gliserol sehingga menghasilkan *fosfogliseraldehid*. *Fosfogliseraldehid* dengan asam lemak akan mengalami esterifikasi membentuk lipid (Campbell *et al*, 2002).

Lipid dalam mikroalga merupakan komponen yang tersusun dari lipid netral dan lipid polar (Solovchenko, 2012). Lipid netral terdiri dari TAGs, *waxe ester*, hidrokarbon, sterol, dan *Free Fatty Acids* (FFA). Sedangkan lipid polar terdiri dari fosfolipid, glikolipid, dan karotenoids (Wiyarno dkk, 2009). Bentuk lemak terbesar yang terkandung dalam sel mikroalga adalah *triacylglycerides* (TAGs) yang dapat mencapai 80% dari total keseluruhan lemak. TAGs ini merupakan lemak yang terpenting dari mikroalga karena merupakan jenis minyak yang dapat digunakan sebagai bahan baku untuk produksi biodiesel. Lemak mikroalga biasanya merupakan ester yang terdiri dari gliserol dan asam lemak dengan panjang rantai C14-C22 (Katili, 2012).

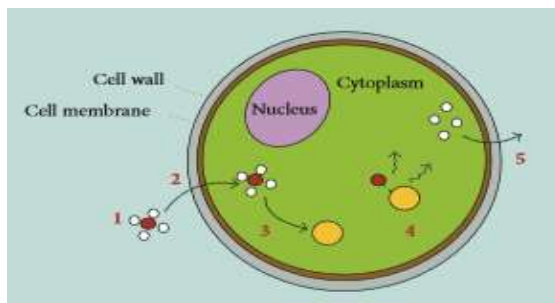
### 2.11 Nile Red

Nile Red adalah pewarna benzophenoxazone yang tidak larut dalam air, warna dapat berubah ketika bereaksi dengan lipid yang hidrofobik. Pewarna ini sangat *fluorescent* pada pelarut organik namun tergantung dari hidrofobisitas relatif dari pelarut. Pendaran warna dari nile red berkisar dari kuning hingga merah keemasan (Greenspan *et al*, 1985). Lipid netral termasuk hidrokarbon dan trigliserida berwarna kuning sedangkan lipid polar berwarna merah (Matsunaga *et al*, 2009).



Gambar 2.9 Struktur Kimia Nile Red (Greenspan *et al*, 1985).

Penambahan pelarut aseton pada Nile Red membantu permeabilitas membran sel sehingga pewarnaan Nile Red dapat masuk ke dalam sel dan jaringan. Mekanisme pewarnaan sel mikroalga *S. costatum* dengan pewarna Nile Red diawali dengan pemisahan Nile Red dari pelarut pembawanya, kemudian penyebaran pewarna dengan pelarut melewati dinding sel dan membran sel menuju ke tetapan lipid, sehingga interaksi antara pewarna dengan lipid menghasilkan pendaran, difusi pelarut pembawa keluar dari sel (Halim *et al*, 2015). Perubahan warna terjadi karena Nile Red bereaksi dengan TAGs yang terkandung dalam sel mikroalga dengan mengubah ligan warna merah dari Nile Red menjadi warna kuning pada TAGs sel mikroalga (Gunawan, 2010, Carman *et al*, 2001). Pewarna Nile Red juga digunakan untuk mewarnai lipid intraseluler netral yaitu TAGs dan ester kolesterol dalam mikroalga dengan panjang gelombang eksitasi 480 hingga 535 nm dan gelombang emisinya pada 570 hingga 600 nm atau mewarnai lipid total dengan panjang gelombang eksitasi yang ditetapkan pada 490 nm dan gelombang emisi 585 nm (Halim *et al*, 2015).



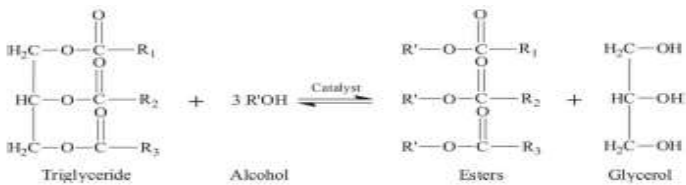
Gambar 2.10 Mekanisme Pewarnaan Nile Red (Halim *et al*, 2015).

Intensitas pendaran warna dipengaruhi oleh kandungan lipid di dalam sel selama kultur di inkubasi. Mikroalga dalam kondisi tercekam menghasilkan lipid lebih banyak, dimana setiap pendaran warna yang dihasilkan menunjukkan adanya akumulasi lipid TAGs pada tiap sel nya. *Skeletonema costatum* yang memiliki akumulasi

TAGs rendah diindikasikan dengan sel berwarna orange, sedangkan akumulasi lipid TAGs tinggi diindikasikan dengan sel berwarna kuning. Semakin kuat pendaran warna kuning maka akumulasi lipid TAGs semakin tinggi (Hu *et al*, 2008).

## 2.12 Produksi Biodiesel

Asam lemak yang bervariasi pada mikroalga salah satunya dapat dimanfaatkan untuk biodiesel. Biodiesel merupakan campuran dari alkali ester dan asam lemak yang diperoleh dari proses transesterifikasi minyak nabati dan hewani (Shahzad *et al*, 2010). Tahapan proses setelah pemanenan mikroalga yakni dilakukan pengeringan dan ekstraksi lipid. Ekstraksi lipid pada mikroalga dapat dilakukan dengan beberapa metode. Ekstraksi tersebut akan lebih efisien apabila menggunakan pelarut organik. Lipid yang diperoleh dari hasil ekstraksi tersebut akan dikonversikan menjadi biodiesel melalui proses transesterifikasi. Reaksi transesterifikasi lipid mikroalga menggunakan alkohol dan katalis. Reaksi transesterifikasi merupakan reaksi kesetimbangan (reversible). Produk samping dari proses transesterifikasi tersebut adalah gliserol. Oleh karena itu diperlukan pemurnian untuk memisahkan gliserol dan sisa-sisa katalis, metanol, dan air sebelum biodiesel dijual secara komersial untuk dimanfaatkan sebagai bahan bakar diesel (Roosmariharso & Soni, 2014).



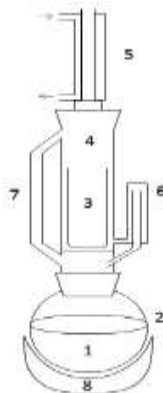
Gambar 2.11 Transesterifikasi (Dehiba *et al*, 2017).

## 2.13 Metode Ekstraksi Lipid

Lipid hasil ekstraksi sangat ditentukan oleh metode ekstraksi dan juga alat yang digunakan. Proses dengan menggunakan metode dan alat yang tepat dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi (Lee *et al*, 2010). Salah satu metode ekstraksi

lipid yang paling efisien untuk menentukan kadar lipid suatu bahan adalah metode soxhlet. Hal ini dikarenakan pelarut yang digunakan dapat digunakan kembali dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi relatif lebih singkat (Sahriawati, 2016). Prinsip kerja metode soxhlet yakni penyaringan yang dilakukan secara berulang-ulang sehingga hasil ekstraksi yang didapat sempurna dan pelarut organik yang digunakan relatif konstan (Kadji *et al*, 2012).

Ekstraksi dengan metode soxhlet dapat dilakukan untuk dengan menggunakan satu atau beberapa macam campuran pelarut. Pelarut yang digunakan dapat berupa heksana. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Li *et al* (2014) menunjukkan bahwa ekstraksi lipid dengan metode soxhlet menggunakan campuran pelarut heksana dan etanol mampu menghasilkan lipid lebih banyak daripada ekstraksi yang hanya menggunakan heksana. Hal ini dikarenakan pelarut heksana dan etanol bersifat non polar dan polar sehingga dapat mengekstrak lipid total (lipid netral dan lipid polar) pada mikrolaga. Penentuan kadar lipid, bahan yang diuji harus cukup kering karena jika masih basah, selain memperlambat proses ekstraksi, air dapat turun ke dalam labu dan akan mempengaruhi dalam perhitungan jumlah lipid total (Budimarwati, 2011).



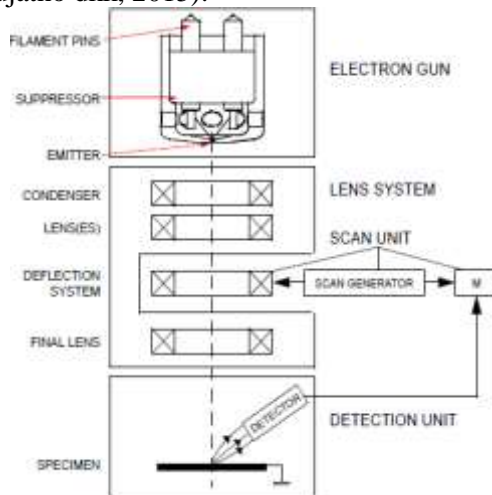
Gambar 2.12 Peralatan Soxhlet (Redfern *et al*, 2014).

Keterangan: 1. Pelarut 2. Labu Lemak 3. Soxhlet Timble 4. Soxhlet Ekstraktor 5. Condensor 6. Sifon 7. Side Arm 8. Heater

## 2.14 Pengamatan Morfologi *Skeletonema costatum*

Pengamatan morfologi *S. costatum* pada penelitian ini menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) INSPECT S50. Komponen utama SEM INSPECT S50 yakni tiga pasang lensa elektromagnetik yang berfungsi memfokuskan berkas elektron menjadi sebuah titik kecil. Pertama, sepasang *scan coil*, semakin kecil berkas difokuskan semakin besar resolusi lateral yang dicapai. Kedua, sumber elektron dimana berupa filamen dari bahan kawat tungsten yang dapat menyediakan berkas elektron yang memiliki energi tunggal (monokromatik), Ketiga, *imaging detector* berfungsi mengubah sinyal elektron menjadi gambar (Sujatno dkk, 2015).

Prinsip kerja SEM yakni pistol elektron (tungsten) yang memproduksi sinar elektron akan difokuskan oleh lensa magnetik menuju ke sampel. Kemudian sinar elektron yang terfokus pada sampel akan memindai keseluruhan sampel dengan diarahkan oleh *coil* pemindai. Ketika elektron mengenai sampel maka sampel akan mengeluarkan elektron baru yang akan diterima oleh detektor dan akan dikirim menuju ke monitor membentuk sebuah gambar 2 dimensi (Sujatno dkk, 2015).



Gambar 2.10 SEM Schematic Overview (Dufek, 2010).



Interaksi sampel dan elektron terjadi ketika berkas elektron discan pada permukaan sampel, menyebabkan sebagian besar berkas elektron berhasil keluar yaitu *Backscattered Electrons* (BSE), sebagian kecil elektron masuk ke dalam sampel kemudian memindahkan sebagian besar energi kinetiknya pada elektron tereksitasi ke luar permukaan sampel, yaitu *Secondary Electrons* (SE). Elektron tersebut (SE) akan diterima oleh imaging detektor dan akan dikirim menuju ke monitor. Sehingga terbentuk gambar permukaan sampel dengan baik (Sujatno dkk, 2015).



## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2018 hingga Januari 2019. Kultivasi *S. costatum* dilakukan di Lab Pakan Alami, Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur. Analisis kandungan lipid secara kuantitatif dilakukan di Lab Fundamental, Departemen Kimia, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, dan analisis secara kualitatif dilakukan di RSKI Universitas Airlangga. Pengamatan morfologi *S. costatum* dilakukan di Lab Karakterisasi Material, Departemen Teknik Material, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

### **3.2 Metode yang Digunakan**

#### **3.2.1 Sterilisasi Alat dan Bahan Kultur**

Peralatan kultur mikroalga yang akan disterilisasi meliputi peralatan gelas dan non gelas. Sterilisasi peralatan gelas meliputi botol kultur 500 ml, toples 10 L, gelas ukur, selang aerator, *beaker glass*, pipet volume, pipet tetes, pengaduk, cawan petri, dan *erlenmeyer*, pertama-tama dicuci bersih dengan detergen dan dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya, direndam dengan HCl 0,2% selama 24 jam dan dibilas kembali dengan air mengalir. Setelah bersih, peralatan gelas berukuran kecil disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Sedangkan peralatan gelas berukuran besar, direndam dengan larutan klorin 150 ppm selama 24 jam, dan dikeringkan dibawah sinar matahari (Masithah dkk, 2011). Sterilisasi peralatan non gelas dilakukan dengan merendamnya dalam larutan krolin 40 ppm (Triswanto, 2011).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah air laut dengan kadar salinitas 34 ppt. Sterilisasi air laut dilakukan secara konvensional yakni metode klorinasi, dimana air laut disterilkan menggunakan klorin 60 ppm dan dinetralkan dengan natrium

thiosulfat 30 ppm (Masithah dkk, 2011). Kemudian air laut direbus hingga mendidih dan didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Selanjutnya, dilakukan pengukuran salinitas dengan menggunakan refraktometer. Apabila salinitas air laut kurang dari 34 ppt maka ditambahkan NaCl 20% dan jika salinitas air laut meningkat, maka ditambahkan dengan aquades steril hingga diperoleh salinitas 34 ppt (Supriyantini, 2013).

### 3.2.2 Persiapan Pupuk Diatom dalam Kultur *S. costatum*

Pupuk yang digunakan dalam kultur *S. costatum* adalah pupuk diatom yang diperoleh dari Laboratorium Pakan Alami Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo dengan komposisi sesuai pada Tabel 3.1 yakni  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , EDTA, dan Fe yang dilarutkan dengan aquades hingga 1 L.  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  tidak dicampur dengan keempat senyawa tersebut melainkan dilarutkan dengan aquades hingga 1 L. Dalam 1 L kultur, dibutuhkan 1 ml pupuk diatom yang dicampurkan ke dalam air laut.

Tabel 3.1 Komposisi Pupuk Diatom (Setyaningsih *et al*, 2018)

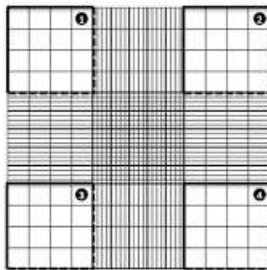
Bahan	Jumlah (gr/l)
$\text{KNO}_3$	75
$\text{PO}_4$	5
EDTA	5
Fe	3,15
$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	30

### 3.2.3 Penentuan Waktu Starter *S. costatum*

Penentuan waktu starter dilakukan dengan pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan bibit *S. costatum* yang diperoleh dari Laboratorium Pakan Alami Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, dimana bibit *S. costatum* dikultur pada media kultur (campuran air laut dengan pupuk diatom). Volume kultur mikroalga dalam pembuatan kurva pertumbuhan untuk pembuatan starter sebanyak 500 ml sehingga bibit *S. costatum* yang dibutuhkan ialah 50 ml dan diinokulasikan ke dalam 445 ml media kultur (air laut yang diberi 0,5 ml pupuk diatom). Selanjutnya, dilakukan pengukuran kepadatan sel *S. costatum* setiap 6 jam

hingga fase kematian menggunakan *haemocytometer* pada ruang W dengan bantuan mikroskop cahaya (perbesaran 400x) (Rudiyanti, 2011). Tujuan pembuatan kurva pertumbuhan melalui pengukuran kepadatan sel adalah untuk mengetahui fase  $\frac{1}{2}$  eksponensial sebagai dasar untuk menentukan waktu starter. Rumus yang digunakan untuk menghitung jumlah sel yakni sebagai berikut:

$$\text{Jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{sel pada ruang W} \times 10^4}{\sum \text{ruang W} (4)}$$



Gambar 3.1 Ruang *Haemocytometer* (Rudiyanti, 2011).

### 3.2.4 Penentuan Waktu Panen *S. costatum*

Penentuan waktu panen dilakukan dengan membuat kurva pertumbuhan *S. costatum* pada media pertumbuhan yang telah diberi pelakuan cekaman nutrisi N dan Si dengan konsentrasi N3Si2 ( $\text{KNO}_3$  0 gr/L dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/L), N2Si2 ( $\text{KNO}_3$  37,5 gr/L dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/L), dan N0Si0 ( $\text{KNO}_3$  75 gr/L dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/L) sebagai kontrol. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan melalui pengukuran kepadatan sel setiap 6 jam hingga fase kematian menggunakan *haemocytometer* pada ruang W dengan bantuan mikroskop cahaya (perbesaran 400x) (Rudiyanti, 2011). Tujuan pembuatan kurva pertumbuhan melalui pengukuran kepadatan sel pada tahap ini adalah untuk mengetahui fase eksponensial akhir kultur *S. costatum* sebagai dasar untuk menentukan waktu pemanenan.

### 3.2.5 Perlakuan penelitian

Perlakuan pada penelitian ini menggunakan 3 macam konsentrasi cekaman nutrien N dan Si, yakni diantaranya:

N0Si0: KNO<sub>3</sub> 75 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 30 gr/l

N3Si2: KNO<sub>3</sub> 0 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 15 gr/l

N2Si2: KNO<sub>3</sub> 37,5 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 15 g/l

Perlakuan dilakukan dalam volume 5 L, sehingga starter *S. costatum* yang dibutuhkan sebanyak 10% dari volume kultur dan pupuk diatom sebanyak 5 ml. Kultur dari masa starter diambil 800 ml (10% dari volume kultur 8 L), lalu dikultur kembali dalam 7,192 L media kultur (kombinasi air laut dan pupuk diatom 8 ml dengan kosentrasi N dan Si sesuai perlakuan hingga masa panen.

### 3.2.6. Pemanenan Biomassa *S. costatum*

Biomassa hasil kultivasi dipanen dengan cara disaring menggunakan 2 lapis kain satin, kemudian diukur biomassa *S. costatum* dengan metode gravimetrik yaitu berdasarkan berat kering (gr) (Vonshak & Torzillo, 2004). Pengukuran biomassa dilakukan dengan menghitung berat basah dan berat kering. Berat basah mikroalga ditimbang menggunakan neraca analitik. Setelah itu mikroalga yang telah ditimbang berat basahnya diletakkan pada cawan porselen. Cawan porselen sebelumnya ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui berat cawan porselen sebelum ditambah oleh mikroalga. Selanjutnya mikroalga pada cawan porselen di keringkan menggunakan oven *MEMMER* dengan suhu 70°C selama 24 jam. Kemudian mikroalga pada cawan ditimbang hingga diperoleh berat keringnya (Darsi dkk, 2012). Rumus perhitungan biomassa sebagai berikut:

$$Kadar\ Air = \frac{(x + y - z)}{y} \cdot 100\%$$

$$Biomassa\ (gr) = (100 - Kadar\ Air)\% \cdot y\ (gr)$$

Keterangan:

x: Berat Penampang

y: Berat Sampel Basah (gr)

z: Berat Sampel Kering (gr)

(Sulaeman dkk, 2005).

### 3.2.7 Parameter Pengamatan

#### 3.2.7.1 Analisis Kandungan Lipid *S. costatum*

##### 3.2.7.1.1 Analisis Kandungan Lipid secara Kuantitatif

Analisis kandungan lipid total secara kuantitatif *S. costatum* dilakukan menggunakan metode soxhlet sebagaimana yang telah dilakukan oleh Abdulgani dkk (2007) dan Li *et al* (2014). Sebanyak 2 gram sampel kering mikroalga dibungkus dalam selongsong kertas kemudian dimasukkan ke dalam alat soxhlet yang telah dihubungkan dengan labu lemak. Selanjutnya, diekstrak dengan pelarut campuran heksana 39 ml dan etanol 13 ml selama  $\pm$  6 jam. Ekstrak lipid dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 24 jam. Lalu didinginkan dan ditimbang. Perhitungan kandungan lipid total menurut Shahidi (2003) sebagai berikut:

$$\text{Kadar lipid total (\%)} = \frac{\text{berat lipid total (gr)}}{\text{berat sampel (gr)}} \times 100\%$$

##### 3.2.7.1.2 Analisis Kandungan Lipid secara Kualitatif

Analisis kandungan lipid (TAGs) secara kualitatif *S. costatum* pada penelitian ini dilakukan menggunakan mikroskop fluoresence dengan pewarnaan Nile Red. Larutan stok Nile Red dibuat dengan cara mencampurkan 1 mg Nile Red ke dalam 10 ml aseton, kemudian disimpan dalam kondisi gelap dan tertutup. Selanjutnya, pewarnaan sel mikroalga dengan Nile Red dilakukan dengan meneteskan 0,2 ml larutan stok Nile Red ke dalam 1 ml mikroalga *S. costatum* pada mikrotube kemudian di vortex hingga homogen dan didiamkan selama 30-40 menit. Selanjutnya sel *S. costatum* dibilas menggunakan aquades dengan perbandingan 1:1 yakni 50  $\mu$ ml mikroalga dan 50  $\mu$ ml aquades. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C, dengan tujuan untuk memisahkan sel mikroalga dengan aquades (Pratiwi dkk, 2015). Setelah disentrifuge, bagian supernatan dibuang sehingga menyisakan bagian natan yang berupa pelet sel mikroalga yang terwarnai. Lalu diambil 30  $\mu$ ml tetes natan hasil sentrifugasi, kemudian diteteskan pada kaca objek. Selanjutnya diamati dan dilihat pendaran warna lipid

intraselulernya pada sel mikroalga dengan menggunakan mikroskop fluoresence dengan panjang gelombang 450-495 nm. Berdasarkan pandangan warna, mikroalga yang memiliki kandungan lipid akan tampak berwarna kuning mengkilat (Cooksey, 1987). Interaksi antara Nile red dengan lipid menyebabkan pewarnaan kuning pada mikroalga. Lipid netral berupa hidrokarbon dan *triacylglycerides* (TAGs) ditandai dengan pembentukan warna kuning, sedangkan lipid polar ditandai dengan warna merah (Susanty, 2017).

### **3.2.7.2 Pengamatan Morfologi *S. costatum***

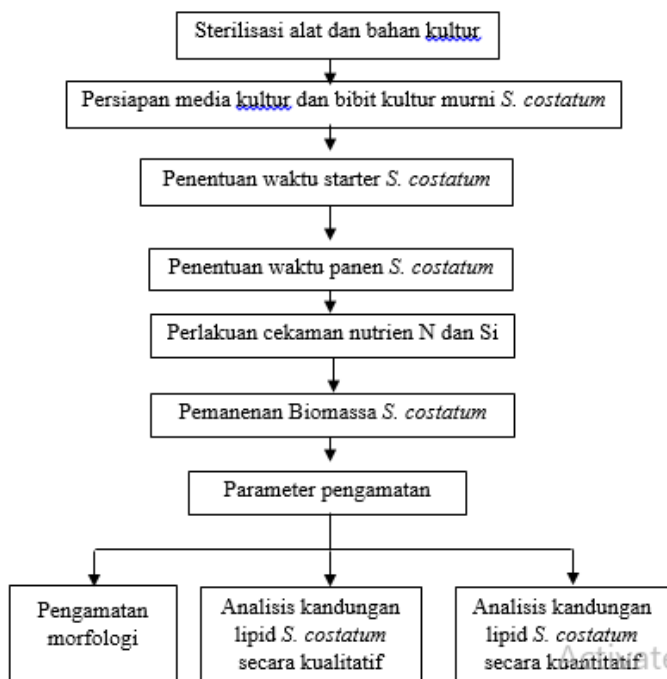
Pengamatan morfologi *S. costatum* masing-masing perlakuan pada penelitian ini dilakukan dua kali pengulangan dan masing-masing pengulangan dilakukan 3 kali pengamatan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) INSPECT S50. Pengamatan morfologi menggunakan SEM terdiri dari beberapa tahapan yakni pertama-tama disiapkan sampel kering mikroalga *S. costatum*. Kemudian sampel sebanyak 1 mg dipasang pada stub dan dilekatkan menggunakan *sputter coater*. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam SEM *chamber* untuk divisualisasikan menggunakan pemindai SEM. Kemudian diamati morfologi *S. costatum* dengan mencari bagian yang ingin diambil gambarnya. Setelah itu gambar bagian yang diinginkan di bidik dan disimpan (Yau *et al*, 2016). Parameter pengamatan morfologi *S. costatum* pada penelitian ini meliputi ukuran panjang, lebar, dan panjang spina.

## **3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

### **3.3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ekperimental ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 1 faktor yang terdiri dari konsentrasi nutrisi N dan Si yang berbeda-beda dalam media pertumbuhan *S. costatum*. Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan dan diantaranya 1 perlakuan sebagai kontrol, dimana masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali pengulangan sehingga terdapat 6 percobaan.





Gambar 3.2 Skema Prosedur Penelitian

### 3.3.2 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan hipotesis sebagai berikut:

- $H_0$  : Pemberian konsentrasi media cekaman nutrien N dan Si yang berbeda tidak berpengaruh terhadap kandungan lipid dan morfologi *S. costatum*
- $H_1$  : Pemberian konsentrasi media cekaman nutrien N dan Si yang berbeda berpengaruh terhadap kandungan lipid dan morfologi *S. costatum*

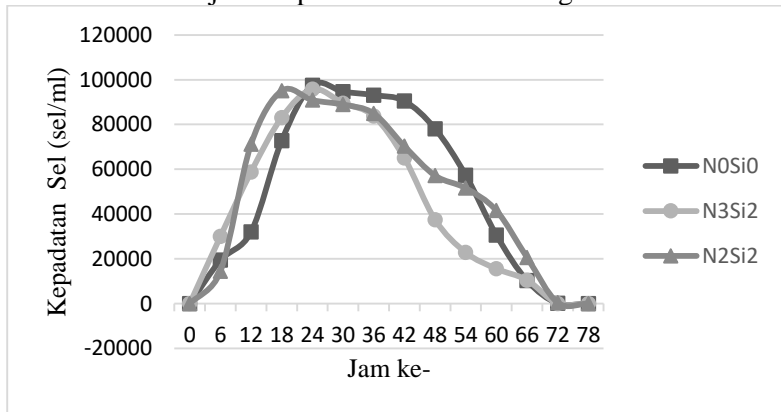
Untuk mengetahui pengaruh perlakuan pada parameter yang diamati yaitu kandungan lipid kuantitatif dilakukan menggunakan minitab dan uji ANOVA *one way* dengan taraf kepercayaan 95%. Selanjutnya, dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji Tukey untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar perlakuan dengan kontrol.



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kurva Pertumbuhan *Skeletonema costatum*

Pertumbuhan adalah peningkatan ukuran organisme secara permanen yang merupakan hasil dari bertambahnya jumlah dan volume sel (Paramartha *et al*, 2013). Pertumbuhan *S. costatum* juga dipengaruhi faktor lingkungan seperti penambahan atau pengurangan nutrisi pada media kultur. Hasil kurva pertumbuhan *S. costatum* ditunjukkan pada Gambar 4.1 sebagai berikut:



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *S. costatum*.

Keterangan:

N0Si0 :  $\text{KNO}_3$  75 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/l

N3Si2 :  $\text{KNO}_3$  0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

N2Si2 :  $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

Aktivitas pertumbuhan *S. costatum* yang diukur dengan menggunakan *hemocytometer* dan mikroskop cahaya, sehingga dapat memonitoring jumlah sel hidup secara langsung pada ruang W (Rudiyanti, 2011). Pembuatan kurva pertumbuhan *S. costatum* pada Gambar 4.1 bertujuan untuk mengetahui waktu pemanenan. Waktu panen ditentukan berdasarkan fase eksponensial akhir. Hal ini dikarenakan pada fase eksponensial akhir, mikroalga berada dalam kondisi yang paling optimal, sehingga kandungan nutrisi dalam selnya sangat tinggi (Duong *et al*, 2012).

Sel mikroalga *S. costatum* yang teramati berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa fase lag pada perlakuan N0Si0 ( $\text{KNO}_3$  75 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/l) terjadi pada jam ke 0-6, fase eksponensial awal terjadi pada jam ke 12 dan puncak eksponensial terjadi pada jam ke 24 dengan kepadatan 97.500 sel/ml, pada fase ini jumlah sel mengalami peningkatan secara cepat yang diawali dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan secara terus menerus (Armanda, 2013). Kemudian mengalami fase stasioner pada jam ke 30-48 dan terjadi penurunan jumlah sel hingga mencapai fase kematian pada jam ke 48-72. Apabila dibandingkan dengan perlakuan N3Si2 ( $\text{KNO}_3$  0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l) menunjukkan bahwa perlakuan tersebut mengalami peningkatan dari jam ke 0 hingga jam ke 24 (puncak eksponensial) dengan kepadatan sel 95.075 sel/ml, sedangkan pada perlakuan N2Si2 ( $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l) menunjukkan bahwa perlakuan tersebut mengalami peningkatan dari jam ke 0 hingga jam ke 18 (puncak eksponensial) dengan kepadatan sel 95.750 sel/ml. Kemudian kedua perlakuan tersebut mengalami fase stasioner pada jam ke 30-36 dan terjadi penurunan jumlah kepadatan sel hingga mencapai fase kematian pada jam ke 42-72.

Berdasarkan kurva pertumbuhan (Gambar 4.1) dapat disimpulkan bahwa kepadatan sel tertinggi terdapat pada perlakuan N0Si0 yakni 97.500 sel/ml pada jam ke 24 (fase eksponensial). Hal ini dikarenakan pada perlakuan N0Si0 diberikan penambahan nutrisi N ( $\text{KNO}_3$ ) sebanyak 75 gr/l dan nutrisi Si ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) sebanyak 30 gr/l. Penambahan nutrisi N berfungsi untuk pertumbuhan, metabolisme sel alga, dan sebagai unsur dasar pembentukan protein dan asam nukleat (Brown, 1993). Sedangkan kepadatan sel terendah terdapat pada perlakuan N3Si2 yakni 95.075 sel/ml, hal ini menunjukkan bahwa pada perlakuan N3Si2 merupakan keadaan paling tercekam (100%) akibat tidak ada penambahan nutrisi N (0 gr/l) pada media pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan Umiatun *et al* (2017) yang menjelaskan bahwa nitrogen merupakan salah satu unsur makronutrien yang dapat

mempengaruhi kegiatan metabolisme sel yaitu proses transportasi, katabolisme, asimilasi, dan khususnya biosintesis protein (Ma *et al*, 2016). Ketika dalam kondisi defisiensi N maka sel mikroalga cenderung mengubah jalur metabolisme karbon dalam bentuk lipid sebagai bentuk pertahanan dibandingkan untuk proses pertumbuhan selnya (Ahlgren & Hyestrand, 2003). Sedangkan kepadatan sel pada perlakuan N0Si0 (kontrol) lebih tinggi yakni 97.500 sel/ml dibandingkan dengan perlakuan N3Si2 dan N2Si2 yakni 95.075 dan 95.750 sel/ml secara berturut-turut, hal ini dikarenakan pada perlakuan N3Si2 dan N2Si2 dilakukan pengurangan nutrisi Si sebesar 50% dari kontrol yakni 15 gr/l, sehingga menyebabkan penurunan jumlah kepadatan sel mikroalga. Hasil pengamatan kepadatan sel yang telah dilakukan pada penelitian ini berdasarkan Gambar 4.1, menunjukkan bahwa kepadatan sel pada perlakuan N0Si0, N3Si2 dan N2Si2 memiliki jumlah kepadatan sel yang hampir sama dengan hasil pengamatan pada penelitian sebelumnya (Ferdianto, 2018). Hal ini dikarenakan penelitian ini menggunakan komposisi pupuk diatom terbaik untuk kultivasi *S. costatum*, sehingga kepadatan sel tertinggi terdapat pada perlakuan N0Si0 sebagai kontrol yakni 99.250 sel/ml dan perlakuan N2Si2 yakni 96.500 sel/ml sedangkan kepadatan sel terendah pada perlakuan N3Si2 yakni 95.000 sel/ml (Ferdianto, 2018). Hal ini sesuai dengan pernyataan Sheehan *et al* (1998), bahwa pada kondisi tercekam suatu organisme akan membatasi diri untuk proses pertumbuhan, namun lebih diarahkan untuk pertahanan salah satunya dengan meningkatkan produksi lipid, sehingga kepadatan sel akan relatif menurun.

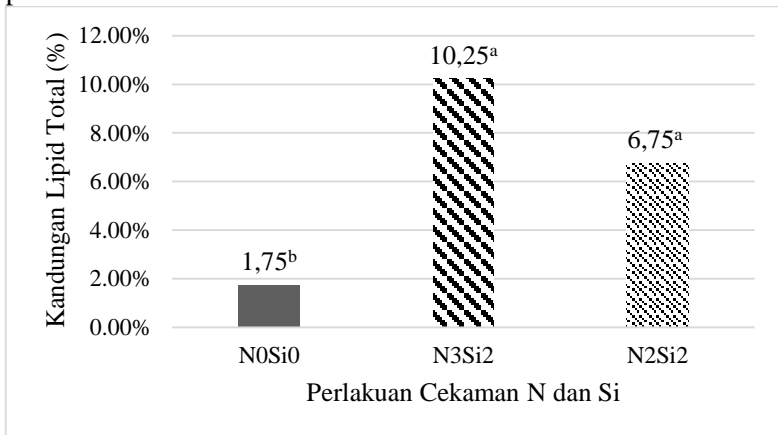
Ketiga perlakuan cekaman N0Si0, N3Si2, dan N2Si2 berdasarkan Gambar 4.1, memiliki pola kurva pertumbuhan *S. costatum* yang hampir sama hal ini dikarenakan ketiga perlakuan tersebut dilakukan pemberian aerasi 24 jam. Pemberian aerasi artinya menambahkan gas pada kultur sehingga sel mikroalga dapat memperoleh nutrisi dalam media kultivasi secara merata (Tan *et al*, 2015). Pemberian aerasi 24 jam merupakan aerasi yang paling optimal untuk meningkatkan laju pertumbuhan pada kultur

mikroalga hal ini dikarenakan aerasi 24 jam dapat meningkatkan kadar oksigen terlarut, dimana oksigen berfungsi untuk metabolisme sel yang dapat menghasilkan energi untuk proses pertumbuhan dan oksidasi bahan organik serta anorganik (Ronda *et al*, 2012). Menurut Afifah & Joni (2010), aerasi lebih dari 24 jam yang diberikan secara terus menerus dapat menyebabkan suplai oksigen yang berlebih dan dapat memberikan tekanan yang lebih besar di dalam sel sehingga dapat menyebabkan lisis bahkan mati. Selain itu, aerasi yang baik untuk *S. costatum* tidak terlalu besar karena dapat memutuskan filamen dan koloni *S. costatum* akan hancur (Fitriani, 2007). Sedangkan apabila aerasi kurang dari 24 jam dapat menyebabkan sel mikroalga kekurangan oksigen dan nutrisi yang terdapat dalam media kultivasi tidak tersebar secara merata sehingga dapat menyebabkan pertumbuhan mikroalga terhambat (Afifah & Joni, 2010).

## 4.2 Kandungan Lipid *S. costatum*

### 4.2.1 Hasil Kandungan Lipid Total *S. costatum* (Kuantitatif)

Hasil ekstraksi lipid total *S. costatum* menggunakan metode soxhlet dari berbagai perlakuan cekaman N dan Si ditunjukkan pada Gambar 4.2 berikut:



Gambar 4.2 Grafik Pengaruh Perlakuan terhadap Kandungan Lipid Total *S. costatum*.

Berdasarkan uji ANOVA *one way* (lampiran 7) yang telah dilakukan menunjukkan bahwa cekaman nutrisi N dan Si berpengaruh terhadap kandungan lipid total *S. costatum*, dimana nilai *p-value* lebih kecil dari nilai  $\alpha$  (0,05). Berdasarkan hasil uji Tukey, diketahui bahwa terdapat 2 pengelompokan yaitu kelompok a) N3Si2 dan N2Si2, dan kelompok b) N0Si0, hal ini menunjukkan bahwa kandungan lipid total *S. costatum* pada perlakuan N0Si0 (kontrol) berbeda signifikan dengan perlakuan N3Si2 dan N2Si2. Sedangkan perlakuan N3Si2 tidak berbeda signifikan dengan perlakuan N2Si2. Ketika terjadi pengurangan jumlah nutrisi N dan Si pada media pertumbuhan berpengaruh terhadap peningkatan kandungan lipid total *S. costatum* pada perlakuan N3Si2 sebesar 10,25% serta perlakuan N2Si2 sebesar 6,75% yang berbeda signifikan dengan kontrol sebesar 1,75%. Hal ini dikarenakan semakin sedikit jumlah nutrisi N dan Si pada media pertumbuhan *S. costatum* maka kondisi pertumbuhan *S. costatum* semakin tercekam sehingga kandungan lipid total semakin tinggi pula sebagai bentuk pertahanan diri terhadap kondisi stress jangka panjang (Ma *et al*, 2016; Jeffreys *et al*, 2015).

Kandungan lipid total perlakuan N3Si2 (10,25%) dan N2Si2 (6,75 %) lebih tinggi dibandingkan dengan N0Si0 (kontrol) yakni 1,75%. Hal ini dikarenakan pada perlakuan N3Si2 dan N2Si2 dilakukan pengurangan nutrisi Si ( $N_2SiO_3$ ) sebesar 50% (15 gr/l) dari kontrol (75 gr/l), dimana nutrisi Si merupakan unsur yang berperan dalam metabolisme lipid termasuk TAGs (prekursor biodiesel) dan unsur yang paling dibutuhkan oleh *S. costatum* untuk sintesis dinding sel (Jeffreys *et al*, 2015). Berdasarkan penelitian Moll *et al* (2014) menunjukkan bahwa pada lingkungan tercekam Si, *S. costatum* akan lebih menggunakan energi seefisien mungkin untuk bertahan hidup daripada untuk pembelahan selnya. Pada kondisi defisiensi Si, pembentukan dinding sel yang berbahan dasar Si menjadi tidak normal karena suplai Si berkurang. Sehingga pembentukan dinding sel/frustula menjadi tidak sempurna. Hal ini berpengaruh terhadap turgiditas sel. Ketika lingkungan tersebut hipertonik sedangkan sel hipotonik maka

dapat membahayakan sel. Ketika lingkungan tersebut hipertonik sedangkan sel hipotonik maka cairan di luar sel akan masuk ke dalam sel secara osmosis sehingga sel diatom mengalami plasmolisis. Oleh karena itu, untuk pertahanan diri, *S. costatum* memproduksi lipid sebagai osmoproteksi.

Sedangkan kandungan lipid total pada perlakuan N2Si2 lebih tinggi yakni 6,75% dibandingkan dengan kontrol (1,75%) dan lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan N3Si2 (10,25%). Hal tersebut dikarenakan pada perlakuan N3Si2 tidak ada penambahan nutrisi N ( $\text{KNO}_3$ ) pada media pertumbuhan *S. costatum* yakni 0 gr/l sehingga pada kondisi tersebut pertumbuhan mikroalga *S. costatum* tercekam nutrisi N 100% sehingga kandungan lipid total yang dihasilkan pun semakin banyak dibandingkan dengan kondisi tercekam nutrisi N 0% (75 gr/l) pada kontrol dan 50% (37,5 gr/l) pada perlakuan N2Si2 (Ma *et al.*, 2016). Hal ini dikarenakan nitrogen (N) merupakan salah satu makronutrien yang mempengaruhi metabolisme sel seperti proses transportasi, katabolisme, asimilasi dan biosintesis protein. Biosintesis protein dapat mengkonversi lipid struktural menjadi lipid simpanan dalam kondisi tercekam. Hal ini dikarenakan aliran karbon hasil fotosintesis dialihkan dari jalur sintesis lipid simpanan sehingga kandungan lipid total pada mikroalga *S. costatum* menjadi semakin banyak sebagai bentuk pertahanan diri dari stress jangka panjang (Gambar 2.3) (Ma *et al.*, 2016).

Selain itu pada kondisi defisiensi N mikroalga *S. costatum*, cenderung mengakumulasi karbon dalam bentuk metabolisme lipid. Kondisi stress nitrogen menyebabkan konsentrasi *nitrat reduktase* menurun. Ada juga penurunan konsentrasi *nitrit reduktase* yang berdampak pada peningkatan konsentrasi *glutamat sintase*, menghasilkan pembentukan glutamat yang berlebihan. Asimilasi nitrogen dalam konversi nitrat menjadi amonium dikatalisis oleh *nitrat reduktase* dan *nitrit reduktase* yang bekerja secara berurutan. Dalam kondisi normal, amonium nitrogen dikatalisis oleh *glutamat dehidrogenase* untuk menghasilkan glutamin. Glutamin akan dibentuk oleh  *$\alpha$ -ketoglutarate* untuk

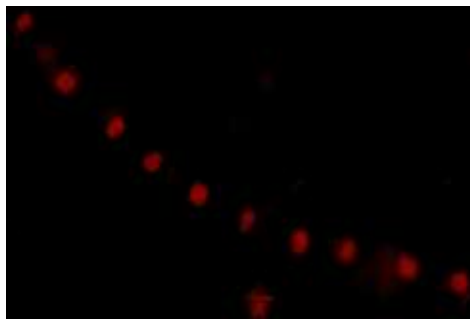


membentuk asam amino. Sedangkan dalam kondisi defisiensi N, amonium yang dikatalisis oleh *glutamat sintase*, glutamat masuk dalam siklus TCA diubah menjadi  $\alpha$ -ketoglutarat. Kemudian  $\alpha$ -ketoglutarate dikonversi menjadi malat dan malat dikonversi menjadi piruvat. Selanjutnya, piruvat dikonversi menjadi asetil co-A. Asetil co-A dalam hal ini sebagai prekursor pembentukan lipid organik seperti asam lemak. Lipid organik merupakan bentuk sistem pertahanan mikroalga dalam kondisi tercekam sebagai sumber karbon (Setyaningsih *et al*, 2017).

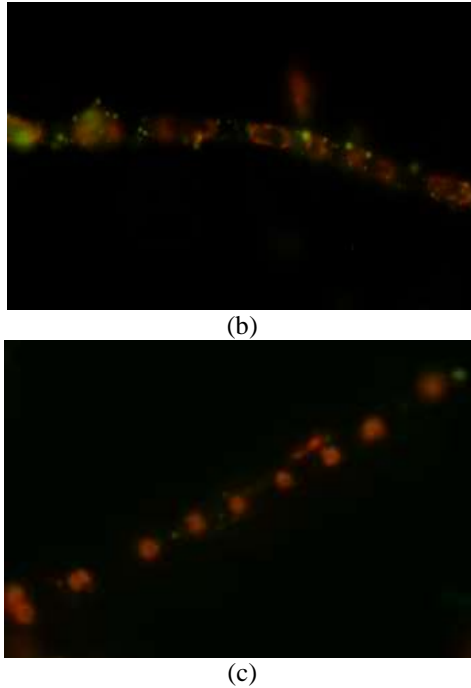
Pada dasarnya mikroalga yang hidup di dalam kondisi lingkungan yang optimal ataupun kurang optimal tetap melakukan sintesis lipid dalam tubuhnya. Hasil dari metabolisme mikroalga dalam kondisi optimal didapatkan kandungan lipid total yang relatif rendah yakni 5-10% dari berat kering. Sedangkan ketika dalam kondisi kurang optimal (tercekam), maka mikroalga akan mengubah jalur metabolisme lipid struktural ke pembentukan lipid organik (10-50%) dari berat kering terutama dalam bentuk TAGs (lipid netral) (Hu *et al*, 2008). Pembentukan lipid organik yang berfungsi sebagai cadangan energi serta pertahanan gangguan di luar sel (Setyaningsih *et al*, 2017).

#### 4.2.2 Hasil Kandungan TAGs *S. costatum* (Kualitatif)

Hasil pengamatan kandungan TAGs menggunakan mikroskop fluoresense dengan panjang gelombang 480 dan eksitasi 525 nm, ditunjukkan pada Gambar 4.3 sebagai berikut:



(a)



Gambar 4.3 Hasil Pengamatan Kandungan TAGs  
(a) N0Si0 (kontrol), (b) N3Si2, dan (c) N2Si2.

Interaksi antara lipid intraseluler pada sel *S. costatum* dan Nile red akan menghasilkan pandaran warna kuning-oranye. Pandaran warna tersebut merupakan reaksi antara sel yang mengandung TAGs dengan pewarna Nile red. Nile red berfungsi untuk mendeteksi adanya TAGs dalam intraseluler sel mikroalga, pandaran warna oranye menandakan bahwa kandungan TAGs dalam mikroalga dalam jumlah sedikit sedangkan pandaran warna kuning menandakan bahwa kandungan TAGs dalam sel mikroalga dalam jumlah banyak. Apabila sel tidak mengandung TAGs maka warna yang terpendar adalah warna merah karena emisi dari klorofil (Halim *et al*, 2015).

Berdasarkan hasil pengamatan pandaran TAGs pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa *S. costatum* yang menghasilkan pandaran

warna kuning terdapat pada perlakuan N3Si2 dan warna kuning-oranye pudar pada perlakuan N2Si2, hal ini dikarenakan pada perlakuan N3Si2 tidak ada penambahan nutrisi N yakni 0 gr/l sedangkan pada perlakuan N2Si2 dilakukan pengurangan jumlah nutrisi N sebesar 50% dari kontrol yakni 37,5 gr/l. Sehingga pada kondisi yang demikian mikroalga *S. costatum* mengalami defisiensi N. Pada kondisi defisiensi N dapat memicu akumulasi TAGs sebagai bentuk pertahanan stress jangka panjang (Ma *et al*, 2016). Selain itu pada saat kekurangan nitrogen, siklus glikoksilat dan glukoneogenesis terhambat dan ketersediaan asetil co-A. Sehingga terjadi pengalihan metabolisme sel dari sintesis protein ke sintesis lipid simpanan (TAGs), hal ini dikarenakan sintesis pati terhambat (Goncalves *et al*, 2016). Sedangkan pada kedua perlakuan tersebut sama-sama dilakukan pengurangan jumlah nutrisi Si sebesar 50% dari kontrol yakni 15 gr/l. Kondisi tersebut mempengaruhi metabolisme lipid termasuk TAGs (Joint *et al*, 2007). Hal ini dikarenakan pada dasarnya mikroalga mensintesis lipid membran dan asam lemak sebagai ester gliserol, sementara di bawah kondisi tercekam sebagian besar mikroalga menyesuaikan metabolisme dengan pembentukan dan akumulasi lipid simpanan dalam bentuk TAGs. TAGs disimpan di sitosol sebagai cadangan energi dan sumber karbon (Hu *et al*, 2008).

Biosintesis TAGs pada mikroalga melalui jalur gliserol langsung dengan enzim *acyl transferase* yang menentukan komposisi asil TAGs (Gambar 2.7). Asam lemak yang diproduksi di kloroplas secara berurutan asetil co-A ditambahkan ke glycerol-3-pospat (G3P) oleh enzim *glycerol-3-pospat acyl transferase* untuk membentuk lyso-PA, selanjutnya terbentuk phosphaditic acid (PA) oleh enzim *lyso-phosphatidic acid acyl transferase*. Phosphaditic acid (PA) mengalami defosforilasi oleh enzim spesifik *phosphaditic acid phosphatase* yang mengkatalisis pembentukan diasilgliserol (DAG). Pada tahap akhir, asetil co-A ditambahkan ke rantai diasilgliserol yang dikatalisis oleh enzim *diacylglycerol acyl transferase* untuk membentuk triasilgliserol (TAGs) (Hu *et al*, 2008).

Sehingga dapat disimpulkan bahwa kandungan TAGs *S. costatum* tertinggi pada perlakuan N3Si2, ditunjukkan dengan adanya pendaran warna kuning. Sedangkan kandungan TAGs pada perlakuan N2Si2 lebih rendah dibandingkan N3Si2 dan lebih tinggi dibandingkan N0Si0 (kontrol), ditunjukkan dengan adanya pendaran warna kuning-oranye pudar, dan kandungan TAGs pada perlakuan N0Si0 sangat rendah, ditunjukkan dengan adanya pendaran warna orange. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hu *et al* (2016), bahwa akumulasi TAGs rendah diindikasikan dengan sel berwarna orange, sedangkan akumulasi TAGs tinggi diindikasikan dengan sel berwarna kuning. Semakin kuat pendaran warna kuning maka akumulasi lipid TAGs semakin tinggi. Pada perlakuan N0Si0 (kontrol) memiliki kandungan TAGs terendah dikarenakan pada perlakuan tersebut tidak terjadi perubahan komposisi media pertumbuhan yakni nutrisi N sebesar 75 gr/l dan nutrisi Si sebesar 30 gr/l, sehingga pertumbuhan mikroalga dalam kondisi normal atau tidak tercekam. Hal ini sesuai dengan literatur yang menjelaskan bahwa mikroalga mampu menghasilkan TAGs dalam jumlah banyak dalam kondisi tercekam, dimana hal tersebut merupakan salah satu bentuk pertahanan diri dari stress jangka panjang (Ma *et al*, 2016).

#### **4.2.3 Korelasi Kandungan Lipid Total dan Kandungan TAGs**

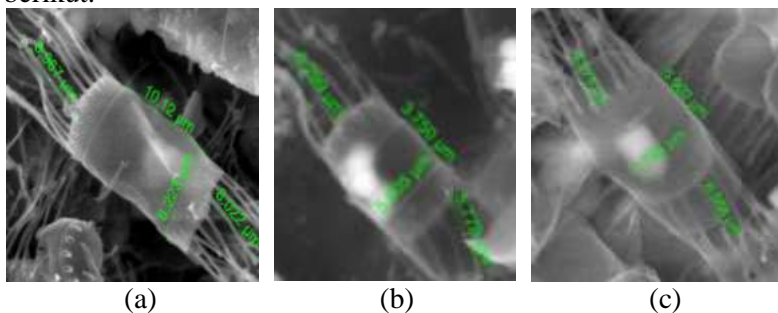
Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa perlakuan N3Si2 memiliki kandungan lipid total tertinggi yakni 10,25% dengan pendaran warna kuning, mengindikasikan kandungan TAGs yang tinggi. Sedangkan pada perlakuan N2Si2 memiliki kandungan lipid total yakni 6,75% dengan pendaran warna kuning-oranye pudar, mengindikasikan bahwa kandungan TAGs pada perlakuan N2Si2 lebih rendah dibandingkan N3Si2 dan lebih tinggi dibandingkan N0Si0 (kontrol). Serta perlakuan N0Si0 (kontrol) memiliki kandungan lipid total terendah yakni 1,75% dengan pendaran warna orange, mengindikasikan kandungan TAGs terendah.

Kondisi tersebut menunjukkan bahwa kandungan lipid total berbanding lurus dengan kandungan TAGs pada *S. costatum*.

Dimana pada kondisi tercekam nutrien N dan Si pada perlakuan N3Si2 ( $\text{KNO}_3$  0 gr/l;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l), *S. costatum* akan mengubah jalur sintesis lipid struktural menjadi lipid organik sebagai bentuk pertahanan. Sehingga dalam kondisi tercekam maka *S. costatum* akan menghasilkan lipid total yang tinggi, dimana semakin tinggi kandungan lipid total maka kandungan TAGs juga semakin tinggi pula ditunjukkan dengan adanya pendaran warna kuning. Hal ini dikarenakan bentuk lipid terbesar yang terkandung dalam sel mikroalga adalah *triacylglycerides* (TAGs) yang dapat mencapai 80% dari total lipid keseluruhan. TAGs ini merupakan lemak yang terpenting dari mikroalga karena merupakan jenis minyak yang dapat digunakan sebagai bahan baku untuk produksi biodiesel. Lemak mikroalga biasanya merupakan ester yang terdiri dari gliserol dan asam lemak dengan panjang rantai C14-C22 (Katili, 2012).

#### 4.3 Hasil Pengamatan Morfologi *S. costatum*

Hasil pengamatan morfologi *S. costatum* menggunakan SEM INSPECT S50 ditunjukkan pada Gambar 4.4 (Lampiran 3) sebagai berikut:



Gambar 4.4 Hasil Pengamatan Morfologi *S. costatum* pada Perlakuan Cekaman N dan Si.

(a) N0Si0 (kontrol), (b) N3Si2, dan (c) N2Si2.

Hasil pengamatan morfologi *S. costatum* berdasarkan parameter pengukuran meliputi ukuran panjang, lebar, dan panjang spina *S. costatum* disajikan pada Tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Parameter Morfologi *S. costatum*.

Perlakuan	Panjang ( $\mu\text{m}$ )	Lebar ( $\mu\text{m}$ )	Spina ( $\mu\text{m}$ )
N0Si0	10,7 <sup>a</sup>	7,35	6,2
N3Si2	3,9 <sup>c</sup>	7,35	6,25
N2Si2	6,9 <sup>b</sup>	7,2	5,8

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan hasil berbeda signifikan berdasarkan Uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%.

N0Si0 :  $\text{KNO}_3$  75 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/l

N3Si2 :  $\text{KNO}_3$  0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

N2Si2 :  $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

Berdasarkan hasil uji ANOVA *one way* masing-masing parameter pengamatan (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa cekaman nutrisi N dan Si berpengaruh terhadap ukuran panjang sel *S. costatum*, dimana nilai *p-value* lebih kecil dari nilai  $\alpha$  (0,05). Hal ini menunjukkan bahwa pengurangan jumlah nutrisi N dan Si pada media pertumbuhan berpengaruh terhadap perubahan ukuran panjang morfologi *S. costatum* (Lampiran 8) sedangkan ukuran lebar dan panjang spina tidak berpengaruh (Lampiran 9 dan 10). Hal ini merupakan mekanisme pertahanan *S. costatum*, ketika kondisi tercekam nutrisi N dan Si, maka *S. costatum* akan mempertahankan struktur dari pola frustula yang terdiri dari lebar dan panjang spina daripada untuk memperpanjang ukuran selnya. Sehingga lebar dan panjang spina *S. costatum* relatif tidak mengalami perubahan ketika dalam kondisi cekaman nutrisi N dan Si pada media pertumbuhan. Hal ini dikarenakan ukuran lebar dan panjang spina mengikuti struktur pola frustula yang terbentuk sebelumnya. Dimana ukuran frustula *S. costatum* pada penelitian ini sesuai dengan ukuran normal (kontrol), karena bibit *S. costatum* yang digunakan dikultivasi pada media pertumbuhan sesuai dengan penambahan pupuk diatom sesuai dengan perlakuan kontrol (tanpa cekaman nutrisi N dan Si) sehingga struktur pola frustula *S. costatum* yang akan membentuk ukuran lebar sel dan panjang spina sama, yang membedakan hanya ukuran panjang saja karena serapan nutrisi yang tidak memenuhi menyebabkan ukuran

sel lebih kecil dibandingkan ukuran normal (Jungandreas *et al*, 2012).

Berdasarkan Tabel 4.1 hasil uji Tukey ukuran panjang *S. costatum*, diketahui bahwa terdapat 3 pengelompokan yaitu kelompok a) N0Si0, b) N2Si2, dan c) N3Si2, hal ini menunjukkan bahwa kedua perlakuan yakni antara perlakuan N3Si2 dan N2Si2 berbeda signifikan dibandingkan dengan kontrol (N0Si0). Artinya masing-masing perlakuan cekaman N0Si0, N3Si2, dan N2Si2 pada media pertumbuhan mempengaruhi ukuran panjang morfologi *S. costatum*. Ukuran panjang pada perlakuan N3Si2 lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan N2Si2 dan N0Si0 (kontrol). Hal ini dikarenakan pada perlakuan N3Si2 tidak dilakukan penambahan nutrisi N ( $\text{KNO}_3$  0 gr/l) dan pengurangan jumlah nutrisi Si ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l) pada media pertumbuhan sehingga pertumbuhan *S. costatum* tercekam nutrisi N 100% dan Si 50%. Pada kondisi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan ukuran panjang 70% lebih kecil yakni 3,975  $\mu\text{m}$  dibandingkan dengan ukuran normal pada N0Si0 (kontrol) yakni 10,718  $\mu\text{m}$  (Sumeru & Anna, 1992). Sedangkan pada kontrol dengan jumlah nutrisi N (75 gr/l) dan Si (30 gr/l) menunjukkan bahwa bentuk sel *S. costatum* yang meliputi ukuran panjang, lebar, dan panjang spina terbentuk secara sempurna, hal ini dikarenakan asupan nutrisi N dan Si pada media pertumbuhan sesuai dengan kebutuhan *S. costatum* (Naik *et al*, 2010).

Hal ini sesuai dengan pernyataan Balzano *et al* (2010), yang menjelaskan bahwa ketika terjadi pembatasan terhadap suplai nutrisi pada media pertumbuhan mikroalga *S. costatum* baik makronutrien (N) dan mikronutrien (Si) dapat menyebabkan perubahan morfologi *S. costatum*, salah satunya ditunjukkan pada perubahan ukuran sel. Ketika dalam kondisi defisiensi nutrisi N (0 gr/l) pada perlakuan N3Si2 maka *S. costatum* akan membatasi pertumbuhan (volume sel) karena tidak ada pembentukan protoplasma baru sehingga ukuran panjang sel relatif lebih kecil dibandingkan dengan kondisi normal. Hal ini dikarenakan aliran karbon hasil fotosintesis dialihkan ke jalur sintesis protein ke

sintesis lipid simpanan sehingga kandungan lipid pada mikroalga *S. costatum* menjadi semakin banyak (Jungandreas *et al*, 2012).

Sedangkan pengaruh cekaman nutrien Si pada *S. costatum* yakni menyebabkan pembentukan dinding sel *S. costatum* yang berbahan dasar Si menjadi tidak normal karena ketersediaan Si berkurang sehingga menyebabkan pembentukan dinding sel bersilika (frustula) menjadi tidak sempurna (Moll *et al*, 2014). Kandungan Si dalam frustula mempengaruhi tebal tipisnya dinding sel mikroalga diatom, sehingga ketersediaan Si berhubungan dengan berat kering. Hal ini sesuai dengan pernyataan Jungandreas *et al* (2012), bahwa 20% dari berat kering sel diatom dibentuk oleh frustula bersilika. Sehingga cekaman nutrien Si pada penelitian ini dapat dikaitkan dengan hasil pengukuran biomassa pada penelitian sebelumnya (Ferdianto, 2018) yang menunjukkan bahwa pada perlakuan N3Si2 dan N2Si2 menghasilkan biomassa lebih rendah yakni 1,2 dan 3,2 gram secara berturut-turut dibandingkan dengan perlakuan N0Si0 (kontrol) menghasilkan biomassa tertinggi yakni 5,5 gram. Hal ini dikarenakan pada perlakuan N3Si2 dan N2Si2 dilakukan pengurangan jumlah nutrien Si setengah dari jumlah normal dari kontrol yakni 15 gr/l, sehingga pada kondisi tersebut pertumbuhan *S. costatum* tercekam nutrien N 50% yang menyebabkan pembentukan dinding sel bersilika (frustula) menjadi tidak sempurna hal ini berpengaruh terhadap penipisan dinding sel. Dinding sel mikroalga diatom berhubungan dengan berat kering biomassa, dimana semakin sedikit kandungan Si pada dinding sel (frustula) maka semakin rendah pula biomassa *S. costatum* yang diperoleh (Jungandreas *et al*, 2012).



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa cekaman nutrisi N dan Si berpengaruh terhadap kandungan lipid dan morfologi *Skeletonema costatum*. Semakin sedikit jumlah nutrisi N dan Si pada media pertumbuhan maka kandungan lipid total *S. costatum* semakin meningkat, dimana perlakuan N3Si2 (10,25%) dan N2Si2 (6,75%) berbeda signifikan dengan kontrol (1,75%). Kandungan TAGs ditunjukkan dengan adanya pendaran warna kuning pada perlakuan N3Si2. Hasil pengamatan morfologi *S. costatum* pada perlakuan N3Si2 terjadi perubahan ukuran panjang sel *S. costatum* yakni 3,9  $\mu\text{m}$  70% lebih kecil dari ukuran normal pada kontrol 10,7  $\mu\text{m}$ .

#### **5.2 Saran**

Saran yang dapat diberikan penulis dalam penelitian ini yaitu perlu dilakukan analisis kuantifikasi kandungan TAGs *Skeletonema costatum* untuk mengetahui jumlah TAGs yang dapat diproduksi sebagai bahan baku biodiesel menggunakan katalis melalui proses transesterifikasi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdulgani, N, Zuhdi, M.F.A, dan Sukesi. 2007. Potensi Mikroalga *Skeletonema costatum*, *Chorella vulgaris*, dan *Spirulina platensis* sebagai Bahan Baku Biodiesel. **Laporan Penelitian**. Surabaya: ITS Press.
- Ackman, R.G. 2000. **Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils**. Florida: CRC Press.
- Adetola, T.G. 2011. Effect Nitrogen, Iron, and Temperature on Yield and Composition of Microalgae. **Thesis**. Stillwater Oklahoma State University.
- Afifah, A.S, dan Joni, H. 2013. Efek aeras dan konsentrasi substrat pada laju pertumbuhan alga menggunakan sistem bioreactor proses batch. **Jurnal Teknik Pomits**. Vol 29(1): 1-5.
- Ahlgren, G, and Hyestrand, P. 2003. Nitrogen Limitation Effect of Different Nitrogen Sources on The Nutritional Quality of Two Fresh Water Organism *Scenedesmus quadricouda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* (Cyanophyceae). **Journal of Phycology**. Vol 39: 906-917.
- Amini, S, dan Sulilowati, R. 2010. Produksi Biodiesel Dari Mikroalga *Botryococcus Braunii*. **Squalen**. Vol 5(1): 23-32.
- Anggraeni, M.D dan Shandi, P.A. 2015. Produksi Biomassa, Lipid Dan Protein Sel Tunggal Mikroalga *Nannochloropsis Sp* Sebagai Suplemen Makanan. **Penelitian Hibah Bersaing**. Bali: Universitas Udayana.
- Armanda, D.T. 2013. Pertumbuhan Kultur Mikroalga Diatom *Skeletonema costatum* Isolat Jepara Pada Medium F/2 Dan Medium Conway. **Bioma**. Vol 2(1): 9-12.

Balzano, S, Dianasarno,, Kooistra, W.H.C.E. 2010. Effect of Salinity on The Growth Rate and Morphology of Ten *Skeletonema* Strains. **Journal of Plankton Research**. Vol 1(1): 1-9.

Barqi, W.S. 2015. Pengambilan Minyak Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Metode Microwave Assisted Extraction. **Jurnal Bahan Alam Terbarukan**. Vol 4(1): 34-41.

Borowitzka, M. A, 1988. **Micro-Algal Biotechnology**. Cambridge University Press. New York.

Boyer, R.F. 2002. **Concept in Biochemistry 2<sup>nd</sup> ed**. New York.: Thomson Learning Inc.

Brown, L, Sprangue, M, Jarvis, E.E, Dunahay, T.G, Roesseer, P.G, and Zeiler, K.G. 1993. **Biodiesel From Aquatic Species**. National Renewable Laboratory. US: Departement of Energy. Colorado Midwest Research Institut.

Budimarwati, C. 2011. **Analisis Lipid Sederhana dan Lipid Kompleks**. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta (UNY) Press.

Candra, V.A. 2015. Pengaruh Penurunan Kosentrasi Nutrien Nitrogen Pada Metabolisme Lipid *Skeletonema costatum*. **Skripsi**. Departemen Biologi. Fakultas Sains. ITS Surabaya.

Campbell, N.A, Reece, J.B, Mitchell, L.G. 2002. **Biologi (edisi ke-5 jilid 1)**. Erlangga. Jakarta.

Chen, G, Zhao, L, Qi, Y, and Cui, Y.L. 2014. Chitosan and Its Deritives Applied in Harvesting Microalgae for Biodiesel Production: An Outlook. **Journal of nanomaterials**. Vol 14: 1-9.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel From Microalgae. **Journal Biotechnology Advances**. Vol 25: 294-306.

Cooksey, K.E, Guckert, J.B, Williams, S.A, and Callis, P.R. 1987. Fluorometric Determination of The Neutral Lipid Content of

Microalgal Cells using Nile Red. **Journal of Microbiological Methods**. Vol 6(6):333-345.

Costard, G.S, Machado, R.R, Barbarino, E, Martino, R.C, and Lourenco, S.O. 2012. Chemical Composition of Five Marine Microalgae that Occur on the Brazilian coast. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**. Vol. 4(9):191-201.

Darsi, R, Supriadi, A, dan Sasanti, A.D. 2012. Karakteristik Kimiawi dan Potensi Pemanfaatan *Dunaliella salina* dan *Nannochloropsis sp.* **Jurnal fishtech**. Vol 1(1): 14-25.

Dehiba, B, Baba, H.M.B,Abi, A.S.D, and El, A. 2017. Biodiesel production from marine microalgae nannochoropsis gaditana by in situ transesterification process. **Africans Journal of Biotechnology**. Vol 16(22): 1270-1277.

DeMaster, D.J. 1981. The Supply and Accumulation of Silica in The Marine Environment. **Geochimia at Cosmochimia Acta**. Vol 45: 1715-1732.

Duong, V.T, Li, Y, Nowak, E, and Schenk, M. 2012. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production. **Journal of Energies**. Vol 5:1835-1849.

Fauziah, and Hatta, M. 2015. The effect of vermicompost with different doses in cultured *Skeletonema costatum*. **Journal Acta Aquatica**. Vol 2(1): 11-17.

Ferdianto, A. 2018. Pengaruh Cekaman Fisiologis Nutrien N dan Si Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Lipid Mikroalga *S. costatum* sebagai Kandidat Bahan Baku Biodiesel. **Skripsi**. Departemen Biologi. Fakultas Sains. ITS Surabaya.

Fitriani., Fendi, dan Rochmady. 2017. Pengaruh pemberian pupuk anorganik (NPK+Silikat) dengan dosis berbeda terhadap

kepadatan *Skeletonema costatum* pada pembenihan udang windu. **Jurnal Akuakultur**. Vol 1(1): 11-18.

Fogg, G.E. and Thake, B. 1987. **Algal cultures and phytoplankton ecology, 2nd Ed.** England: The University of Wisconsin Press.12-36.

Garcia, J.L.L, and Castro M.D.L. 2004. Ultrasound-assisted Soxhlet Extraction : Anexpeditive Approach for Solid Sample Treatment, Application to The Extraction of Total Fat from Oleaginous Seeds. **Journal of Chromatography**. Vol 1034(2): 42-237.

Geider, R.J, Roche, J.L, Greene, R.M, and Olaizola, M. 1993. Response Of The Photosynthetic Apparantus Of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) To Nitrate, Phosphate, or Iron Starvision. **Journal Physiology**. Vol 29:755-766.

Goncalves, E.C, Wilkie, A.C, Kirst, M, Rathinasabapathi, B. 2016. Metabolic Regulation of Triacylglycerol Accumulation in The Green Algae: Identification of Potential Targets for Engineering to Improve Oil Yield. **Plant Biotechnology Journal**, Vol. 14: 1649-1660.

Gouveia, L, Batista, A.P, Sousa, I, Raymundo, A, and Bandarra, N.M. 2008. **Microalgae in novel foofs product. In: Food Chemistry Research Development.** New york: Nova Science Publishers.

Greenspan, P, Mayer, E.P, Fowler, S.D. 1985. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 100: 965-973.

Haesman, M.P, Sushames, T.M, Diemar, J.A, O'Connor, W.A, and Foulkes, L.A. 2001. Production of Microalga Concentrares for Aquaculture Part 2: Development and Evaluation of Haversting,

Preservation, Storage, and Feeding Technology. **Final Report of FRDC Project**. Vol 93:123-342.

Halim, R, and Webley, P.A. 2015. Nile Red Staining in Microalgal cells: A New Insight Through Statistical Modelling. **International Journal of chemical Engineering**. Vol 20 (15):1-14.

Hoffmann, M.; Marxen, K.; Schulz, R.; Vanselow, K.H. 2010. TFA And EPA Productivities of *Nannochloropsis Salina* Influenced by Temperature and Nitrate Stimuli In Turbidostatic Controlled Experiments. **Marine Drugs**, 8,2526–2545.

Hu, Q, Milton, S, Eric, J, Maria, G, Matthew, P, Michael S, and Darzins, A. 2008. Microalgal Tryacylglycerols as Feedstock for Biofuel Production: Perspectives and and Advances. **The Plant Journal**, Vol. 54: 621-639.

Isnansetyo, A, dan Kurniastuty. 1995. **Teknik kultur Phytoplankton Zooplankton (Pakan alam untuk pembenihan organisme laut )**. Yogyakarta. Kanisius.

Jakubowski. 2012. Lipid Structure. Diunduh dari <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/lipidstructure/ollipidintro1.html> (diakses 26 Maret 2018).

Jeffryes, C, Rosenberger, J, and Rorrer, G.L. 2013. Fed-Batch Cultivation and Bioprocess Modeling of *Cylotella* sp. for Enhanced Fatty Acid Production by Controlled Silicon Limitation. **Alga Research**. Vol 2:16-27.

Joint, I.R, Pomroy, A.J, Robison, G.A, Morris, R.J, and McCartney, M.J. 2007. Morphological Changes in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) during a Spring Bloom in a Marine Ecosystem Enclosure. **British Physiological Journal**. Vol 22(2): 119-124.

Junda, M, Kurnia, N, dan Mis'am, Y. 2015. Pengaruh Pemberian *Skeletonema costatum* dengan Kepadatan Berbeda terhadap Sintasan *Artemia salina*. **Jurnal Bionature**. Vol 16(1): 21-27.

Jung, S.W, Yun, S.M, Lee, S.D, Kim, Y.O, and Lee, J.H. 2009. Morphological Characteristics of Four Species in the Genus *Skeletonema* in Coastal Waters of South Korea. **Journal of Algae**. Vol 24(4): 195-203.

Jungandreas, A, Wagner, H, and Wilhelm, C. 2012. Simultaneous Measurement of the Silicon Content and Physiological Parameters by FTIR Spectroscopy in Diatom with Siliceous Cell Walls. **Plant Cell Physiology**. Vol 53(12): 2153-2162.

Kadji, M.H, Runtuwene, R.J, dan Citraningtyas, G. 2013. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa*). **FARMACON**. Vol 2 (2): 13-19.

Katili, V.R.A. 2012. Komposisi Asam Lemak Mikroalga Jenis *Skeletonema costatum*, *Thalassiora sp*, dan *Chaetoceros garcilis*. **Skripsi**. Bogor. Departemen Ilmu dan Teknologi kelautan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Kawaroe, M, Rachmat, A, dan Haris, A. 2012. Optimalisasi Seleksi Spesies Mikroalga Potensial Penghasil Minyak Mikroalga Untuk Menunjang Kelayakan Ekonomi Produksi Biodiesel. **Prosiding InSINas**. Vol 9(1):1-5.

Kumar, S, and Prabu, V.A. 2014. Culture of the phytoplankton *Skeletonema costatum*, Cleve, 1873. **Journal Curr Microbiology App Science**. Vol 3(1) :129-136.

Lee, J.Y, Chan, Y.S, So, Y.J, Chi-Yong, A, and Hee, M.O. 2010. Comparison of Several Methods for Effective Lipid Extraction from Microalgae. **Bioresource Technology**., Vol 1(1):97-101.



- Li, Y, Horsman, M, Wu, N, Lan, C.Q, and Calero, N.D. 2008. Biocatalysts and Bioreactor Design. **Biotech Prog.** Vol 24:815-820.
- Li, Y, Nghdi, F.G, Garg, S, Adarme-Vega, T.C, Thurecht, K.J, Ghafor, W.A, Tannock, S, and Schenk, P.M. 2014. A comparative Study: The Impact of Different Lipid Extraction Methods on Current Microalgal Lipid Research. **Journal of Microbial Cell Factories.** Vol 13(14):1-9.
- Ma, X. N, Chen, T.P, liu, B.Y, and Feng, C. 2016. Lipid Production From nannochloropsis. **Journal Marine Drugs.** Vol 14(961): 1-18.
- Mahdi, M.Z, Titisari, Y.N, dan Hadiyanto. 2012. Evaluasi Pertumbuhan Mikroalga Dalam medium Pome: Variasi Jenis Mikroalga, medium, dan Waktu Penambahan Nutrien. **Jurnal Teknologi Kimia Industri.** Vol 1(1): 284-291.
- Masithah, E.D, Ariema, N, dan Cahyoko, Y. 2011. Pengaruh Pemberian Bakteri *Bacillus pumilus* Pada Rumen Sapi Sebagai Pupuk Terhadap Pertumbuhan *Dunaliella salina*. **Jurnal Kelautan.** vol 4(1): 82-89.
- Matsunaga, T, Matsumoto, M, Maeda, Y, Sugiyama, H, Sato, R, Tanaka, T. 2009. Characterization of Marine Microalgae, *Scenedesmus* sp. strain JPCCGA0024 toward Biofuel Production,” **Biotechnol. Let.** Vol. 31: 1367-1372.
- Mc Sween, Harry Y, Richardson JR. SM, Uhle ME. 2003. **Geochemistry: Pathways and Processes, 2nd ed.** Columbia University Press. New York.
- Meunier, D. 2001. Particle Dynamics and Sinking Rate of The Marine Diatom *Skeletonema costatum*. **Thesis.** Departement of Enviromental Engineering. University of Western Australia.
- Moll, K.M, Gardner, R.D, Eustance, E.O, Gerlach, R, and Peyton, B.M. 2014. Combining Multipla Nutrient Stresses and Bicarbonate

Addition to Promote Lipid Accumulation in the Diatom RGD-1. **Algal Research**. Vol 5: 7-15.

Motoyama, M. 2012. Structure and Phase Characterization of Triacylglycerols by Raman Spectroscopy. **Bull NARO Inst Livest Grassl Science**. Vol 12: 19-68.

Naik, R.K, Sarno, D, and Kooistra, W.H.C.F. 2010. **Skeletonema (Bacillariophyceae) in Indian Waters : A reappraisal**. India: Hal 4.

Nur, M.M.A. 2014. Potensi Mikroalga Sebagai Sumber Pangan Fungsional di Indonesia. **Jurnal Eksergi**. Vol 9(2):1-6.

Paasche, E. 1980. Silicon Content of Five Marine Plankton Diatom Species Measured with a Rapid Filter Method. **Limnol Oceanography**. Vol 25 93): 474-480.

Paramartha, A.I, Dini, E, dan Siti, E. 2012. Pengaruh Penambahan Kosentrasi ZPT NAA dan BP Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium taurulinum* J. J Smith secara In Vitro. **Jurnal Sains dan Seni ITS**. Vol 1(1): 40-43.

Patil, V, Kallqvist, T, Olsen, E, Vogt, G, and Gislerod, H.R. 2007. Fatty Acid Composition of 12 Microalgae for Possible Use in Aquaculture Feed. **Aquacultur International**. Vol 15:1-9.

Pratiwi, R, Wahyuni, N, dan Alimuddin, A.H. 2015. Uji Fotostabilitas  $TiO_2$ -Klofil dari Mikroalga *Chlorella* sp. **JKK**. Vol 4(3): 59-64.

Pratiwi, S. 2010. Pengaruh Cekaman Fisiologis Nutrien Si terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Lipid Total Mikroalga *Skeletonema costatum*. **Skripsi**. Departemen Biologi. Fakultas Sains. ITS Surabaya.

Pratiwi, S, Nurhidayati, T, Ermavitalini, and Muhibbudin, A. 2015. The Influences of Physiological Stress from Silicon (Si) Nutrien

toward Total Lipid Content at *Skeletonema*. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**. Vol 5(11): 68-71.

Rajvanshi, S, and Sharma, M.P. 2012. Microalgae: A Potential Source of Biodiesel. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**. Vol 2: 49-59.

Redfren, J, Kinninmonth, M, Burdas, D, and Verran, J. 2014. Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties. **Journal of Microbiology & Biology Education**. Vol 15(1):565-566.

Ronda, S.R, Chandra, S.B, Candrika, K, Binot, R, and Prasada, R.A. 2012. Aeration Effect on *Spirulina Plantensis* Grown And Linolenic Acid Production. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol 1:12-20.

Roosmariharso, dan Sony, A.A. 2014. Transesterifikasi Minyak Mikroalga *Scenedesmus sp* untuk Pembuatan Biodiesel. **Jurnal Teknologi dan Manajemen**. Vol 2(2): 49-55.

Rudiyanti, S. 2011. Pertumbuhan *Skeletonema costatum* Pada Berbagai Tingkat Salinitas Media. **Jurnal Saintek Perikanan**. Vol 6(2):69-76.

Sahriawati. 2016. Optimasi Proses Ekstraksi Minyak Ikan Metode Soxhletasi dengan Variasi Jenis Pelarut dan Suhu Berbeda. **Jurnal galung Tropika**. Vol 5(3): 164-170.

Sarno, D, and Kooistra, W.H.C.F. 2005. Diversity In The Genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae) An Assessment of The Taxonomy of *Skeletonema costatum* Like Species With The Description of Four New Species. **Journal Phycol**. Vol 41: 151-176.

Schuhmann, H, Lim, D.K.Y, and Scenk, P.M. 2011. Perspektif on Metabolic Engineering for Increased Lipid Contents In Microalgae. **Journal of Biofuel**. Vol 3:71-83.

Setyaningsih, E.P, Nurhidayati, T, Pratiwi, S, Nurhatika, S, Emavitalini, Muhibuddin, A, Purwani, K.I, Setiawan, E, Chen, F, and Tsai, M.J. 2018. Microalgae Growth and Morphology of *Skeletonema costatum* on Physiological Stress Nutrient Silicon (Si). **Journal of Physics**. Vol 10(28): 1-5.

Setyaningsih, E.P, Nurhidayati, T, Alvionita, V, Nurhatika, S, Ermavitalini, D, Purwani, K.I, Setyawan, E. 2017. Total Lipid and Morphology *Skeletonema costatum* on Nitrogen Nutrition Physiological Stress. **Proceeding of International Conference on Green Technology**. Vol 8(1):187-190.

Shahidi, F. 2003. Extraction and Measurement of Total Lipid. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Vol 7(1): 1-11.

Shahzad, I, Hussain, K, Nawaz, K, and Nisar, M.F. 2010. Review algae as an alternative and renewable resource for biofuel production. **The Biol (E-journal of Life Sciences)**. Vol 1(1): 16-23.

Sheehan, J, Dunahay, T, and Roessler, P. 1998. **A Look Back at The US Department of Energy's Aquatic, Biodiesel from Algae**. Washington National Renewable Energy.

Solovchenko, A.E. 2012. Physiological Role of Neutral Lipid Accumulation in Eukaryotic Microalgae Under Stress. **Russian Journal of Plant Physiology**. Vol 59(2):167-176.

Spolaore, P, Joannis, C.C, Duran, E, and Isambert, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae. **Journal Bioscience and Bioengineering**. Vol 101(2): 87-96.

Sudiharjo. 2002. **Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton**. Lampung: Penerbit Proyek Pengembangan Teknologi Balai Budidaya Laut Lampung.

- Sujatno, A, Salam, R, Bandriyana, dan Dimiyanti, A. 2015. Studi Scanning Electron Microscopy (SEM) Untuk Karakterisasi proses Oksidasi Paduan paduan Zirkonium. **Jurnal Forum Nuklir (JFN)**. Vol 9 (2): 44-50.
- Sulaeman, Suparto, dan Eviati. 2005. **Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, dan Pupuk**. Balai Penelitian Tanah. Bogor.
- Sulistyo, J, and Purwaningsih, S. 2014. Single Cells Fat Extraction Potential to Produce Biodiesel. **Journal Enviroment Technology**. Vol. 15(1): 15-20.
- Sumeru, S.U, and Anna, S. 1992. Lipids and membrane Function in Green Alga. **Biochim, Biophys, Acta**. Vol 1302:17-45.
- Supriyantini, E. 2013. Pengaruh Salinitas Terhadap Kandungan Nutrisi *Skeletonema costatum*. **Buletin Oseanografi Marina**. Vol 2: 51-57.
- Susanty, D. 2017. Isolasi dan Analisis Asam Lemak *Scenedesmus quadricauda* yang diisolasi dari Air Kolam. **Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa**. Vol 7 (1): 23-30.
- Tan, N.T, Yoshimitsu, U, Noridah, O, and Lukman, I. 2015. The effect of aeration rate on the grown of *Scenedesmus quadricauda* in column culture bioreactor. **Journal of The japan Institute of Energy**. Vol 94: 117-180.
- Thao, T.Y, Linh, D.T.N, Si, V.C, Carter, T.W, and Hill, R.T. 2017. Isolation and Selection of Microalgal Strains from Natural Water Sources in Viet Nam with Potential for Edible Oil Production. **Journal of Marine Drugs**. Vol 15 (194). 1-14.
- Triswanto, Y. 2011. Kultivasi Diatom Penghasil Biofuel Jenis *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira sp*, dan *Chaetoceros gracilis* pada Sistem Indoor dan Outdoor. **Skripsi**. Departemen Ilmu dan Teknologi kelautan. Fakultas perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.

Uddin, S.A, and Zafar,M. 2007. Mass Culture of Marine Diatom *Skeletonema costatum* (Grevillege) cleve collected from the bay of Bengal. **Pakistan Journal of Marine Sciences**, Vol. 16(1): 33-38.

Umiatun, S, Carmudi, dan Christiani. 2017. Hubungan antara Kandungan Silika dengan Kelimphan Diatom Benthik di Sepanjang Sungai Pelus Kabupaten Banyumas. **Scripta Biologica**. Vol 491): 61-67.

Valestrand, L. 2018. Seasonal Cycle of Phytoplankton at Drobak with Emphasis on Skeletonema. **Thesis**. Departement of Bioscience Section for Aquatic Biology and Toxicology. University of Solo.

Vonshak, A, and Torzillo, G. 2004. **Environmental Stress Physiology In Handbook od Microalgal Culture**. USA: Blackwell Science.

Wahyuni, S, Kadarwati, S, dan Latifah. 2011. Sintesis Biodiesel dari Minyak Jelantah Sebagai Sumber Energi Alternatif Solar. **Jurnal Sainteknl**. Vol 9 (1):51-62.

Weldy, C.S, and Huesemann, M. 2007. Lipid Production by *Dubaliella salina* in Batch Culture: Effect of Nitrogen Limitation and Light Intensity. **Journal Undergraduete Research U.S. Departement of Energy**. Vol 101: 86-92.

Widiyanto, A, Susilo, B, dan Yulianingsih, R. 2014. Studi Kultur Semi-Massal Mikroalga *Chlorella sp* Pada Area Tambak Dengan Media Air Payau (Di Desa Rayunggumuk, Kec. Glagah, Kab. Lamongan). **Jurnal Bioproses Komoditas Tropis**. Vol. 2(1): 1-7.

Widyaningsih, Retno, H, Endrawati, H, Valentina, R, dan Iriani. 2012. Kandungan Lipid Total *Nannochoropsis oculate* Pada Kultur dengan Berbagai Fotoperiode. **Jurnal Ilmu Kelautan**. Vol 17(3): 119-124.

Wiyarno, B, Yunus, B.M, dan Mel, M. 2009. Oil aglage extraction From *Nannochloropsis* sp: A study of soxhlet extraction and ultrasonic assisted extraction. **Biodiesel Microalgae**. Departement of Chemical Engineering. University Malaysia. Kuala Lumpur.

Yanuhar,U. 2016. **Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata***. Malang: UB Press.

Yau, S.K., Yusoff, F.M., Khong, N.M.H., Foo, S.C., and Lai, J.I. 2016. Improved Pre-treatment Protocol for Scanning Electron Microscopy Coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy Analysis of Selected Tropical Microalgae. **Pertanika Journal Tropical Agriculture Science**. Vol 39 (3): 321 – 342.





## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Data Pengukuran Kurva Pertumbuhan Mikroalga *S. costatum*

Tabel 6.1 Data Pengukuran Kurva Pertumbuhan Mikroalga *S. costatum* Jam ke 0-78.

Jam ke-	N0Si0 (sel/ml)	N3Si2 (sel/ml)	N2Si2 (sel/ml)
0	0	0	0
6	19375	30000	14375
12	32000.5	58812.5	71250
18	72812.5	83125	95750
24	97500	95075	90875
30	94687.5	89562	88903.75
36	93125	83750	84937.5
42	90500	65000	70312.5
48	78125	37500	57187.5
54	57375	22817.5	51562.5
60	30625	15562.5	41562.5
66	10312.5	10500	20625
72	87.5	50	437.5
78	0	0	0

Keterangan tabel:

N0Si0 : KNO<sub>3</sub> 75 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 30 gr/l

N3Si2 : KNO<sub>3</sub> 0 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 15 gr/l

N2Si2 : KNO<sub>3</sub> 37,5 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 15 gr/l

     : Fase Eksponensial Akhir

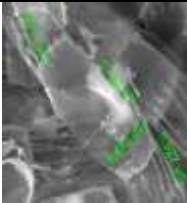
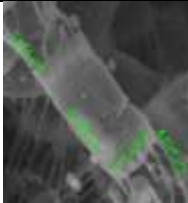
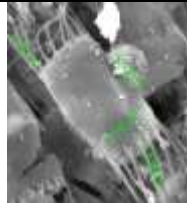

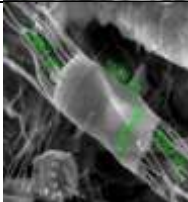
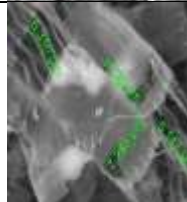
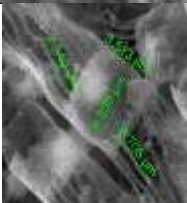
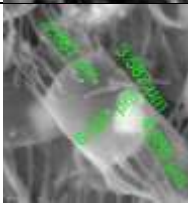
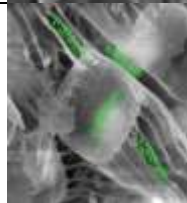
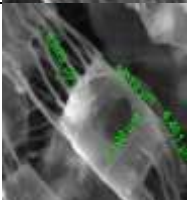
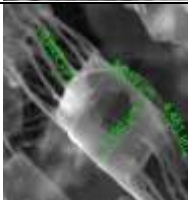
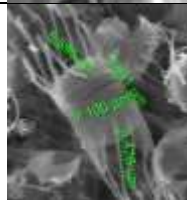
## Lampiran 2 Ukuran Morfologi Mikroalga *S. costatum*

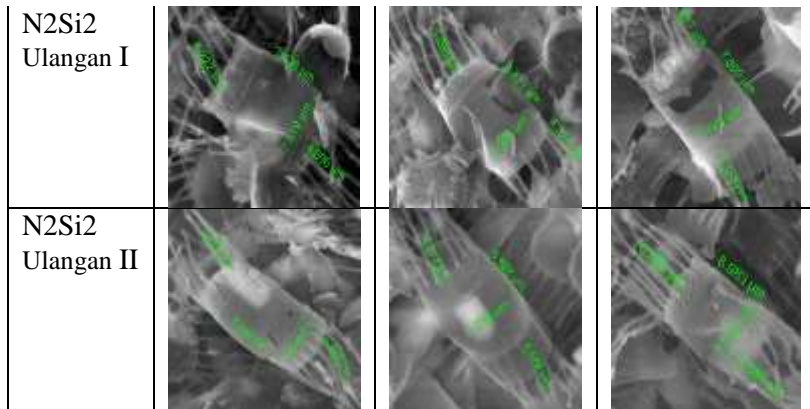
Tabel 6.2 Ukuran Morfologi Mikroalga *S. costatum*.

Perlakuan	Ulang-an	Panjang ( $\mu\text{m}$ )	Lebar ( $\mu\text{m}$ )	Spina Atas ( $\mu\text{m}$ )	Spina Bawah ( $\mu\text{m}$ )	Mean Spina ( $\mu\text{m}$ )
N0Si0 I	1	13,22	6,47	6,26	5,87	6,06
	2	8,218	6,307			
	3	10,45	7,946			
	Mean	10,62	6,9			
N0Si0 II	1	10,92	7,959	7	5,54	6,29
	2	10,12	8,223			
	3	11,38	7,245			
	Mean	10,8	7,8			
N3Si2 I	1	3,513	8,83	6,26	6,32	6,29
	2	3,582	6,537			
	3	3,355	8,826			
	Mean	3,48	8,06			
N3Si2 II	1	3,75	5,805	6,17	6,23	6,20
	2	5,019	7,196			
	3	4,631	7,1			
	Mean	4,46	6,7			
N2Si2 I	1	7,436	7,513	5,04	4,78	4,91
	2	6,471	7,088			
	3	7	7,129			
	Mean	6,96	7,24			
N2Si2 II	1	7,982	6,708	6,1	7,07	6,58
	2	5,902	7,746			
	3	6,983	7,234			
	Mean	6,95	7,22			

### Lampiran 3 Hasil Pengamatan Morfologi *S. costatum* SEM INSPECT S50

Tabel 6.3 Hasil Pengamatan Morfologi *S. costatum*.

Perlakuan	Ulangan Pengamatan		
	1	2	3
N0Si0 Ulangan I			
N0Si0 Ulangan II			
N3Si2 Ulangan I			
N3Si2 Ulangan II			



Keterangan Tabel:

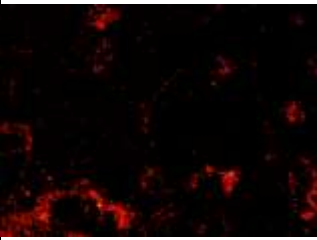
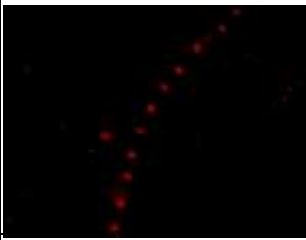

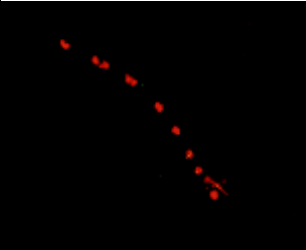
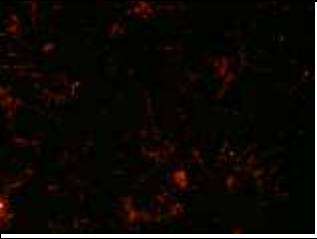

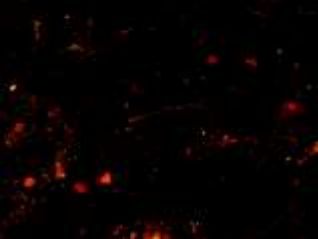
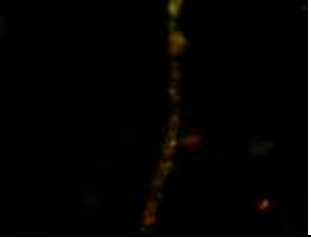
N0Si0 :  $\text{KNO}_3$  75 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/l

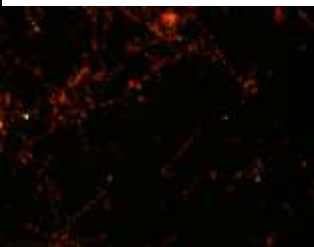

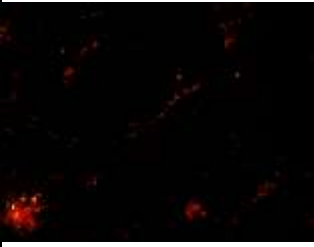
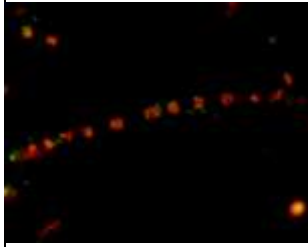
N3Si2 :  $\text{KNO}_3$  0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

N2Si2 :  $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

## Lampiran 4 Hasil Pengamatan TAGs menggunakan Mikroskop Fluoresence

Tabel 6.4 Hasil Kandungan Lipid TAGs *S. costatum* (Kualitatif)

Perlakuan	Gambar Perbesaran	
	100x	400x
N0Si0 Ulangan I		
N0Si0 Ulangan II		
N3Si2 Ulangan I		
N3Si2 Ulangan II		

N2Si2 Ulangan I		
N2Si2 Ulangan II		

Keterangan Tabel:

N0Si0 :  $\text{KNO}_3$  75 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/l

N3Si2 :  $\text{KNO}_3$  0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

N2Si2 :  $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

### Lampiran 5 Rata-rata Ukuran Morfologi *S. costatum*

Tabel 6.5 Rata-rata Ukuran Morfologi *S. costatum*.

Perlakuan	Panjang ( $\mu\text{m}$ )	Lebar ( $\mu\text{m}$ )	Spina Atas ( $\mu\text{m}$ )	Spina Bawah ( $\mu\text{m}$ )	Mean Spina ( $\mu\text{m}$ )
N0Si0 I	10,6	6,9	6,3	5,9	6,1
N0Si0 II	10,8	7,8	7	5,5	6,3
N3Si2 I	3,5	8	6,3	6,3	6,3
N3Si2 II	4,5	6,7	6,2	6,2	6,2
N2Si2 I	6,9	7,2	5	4,8	5
N2Si2 II	6,9	7,2	6,1	7,1	6,6

Keterangan Tabel:

N0Si0 :  $\text{KNO}_3$  75 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  30 gr/l

N3Si2 :  $\text{KNO}_3$  0 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

N2Si2 :  $\text{KNO}_3$  37,5 gr/l dan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  15 gr/l

**Lampiran 6 Hasil Pengukuran Kandungan Lipid Total *S. costatum* (Kuantitatif)**

Tabel 6.6 Pengukuran Kandungan Lipid Total *S. costatum*.

Perlakuan	Berat Lipid Total (gr)	Berat Sampel (gr)	Kandungan Lipid Total (%)
N0Si0 I	0,02	2	1
N0Si0 II	0,05	2	2,5
N3Si2 I	0,19	2	9,5
N3Si2 II	0,22	2	11
N2Si2 I	0,12	2	6
N2Si2 II	0,15	2	7,5

Keterangan Tabel:

N0Si0 : KNO<sub>3</sub> 75 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 30 gr/l

N3Si2 : KNO<sub>3</sub> 0 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 15 gr/l

N2Si2 : KNO<sub>3</sub> 37,5 gr/l dan Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 15 gr/l



## Lampiran 7 Hasil ANOVA Kandungan Lipid Total *S. costatum* (Kuantitatif)

### One-way ANOVA: kandungan lipid versus perlakuan

Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0.05$   
 Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
perlakuan	3	1, 2, 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
perlakuan	2	73.000	36.500	32.44	0.009
Error	3	3.375	1.125		
Total	5	76.375			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.06066	95.58%	92.64%	82.32%

Means

perlakuan	N	Mean	StDev	95% CI
N0Si0	2	1.750	1.061	(-0.637, 4.137)
N3Si2	2	10.250	1.061	( 7.863, 12.637)
N2Si2	2	6.750	1.061	( 4.363, 9.137)

Pooled StDev = 1.06066

### Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

perlakuan	N	Mean	Grouping
N3Si2	2	292.9	A
N2Si2	2	192.8	A
N0Si0	2	50.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## Lampiran 8 Hasil ANOVA Ukuran Panjang Morfologi *S. costatum*

### One-way ANOVA: Panjang versus Perlakuan

Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0.05$   
 Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Perlakuan	3	1, 2, 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Perlakuan	2	136.99	68.497	55.92	0.000
Error	15	18.37	1.225		
Total	17	155.37			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.10675	88.17%	86.60%	82.97%

Means

Perlakuan	N	Mean	StDev	95% CI
N0Si0	6	10.718	1.638	(9.755, 11.681)
N3Si2	6	3.975	0.682	(3.012, 4.938)
N2Si2	6	6.962	0.725	(5.999, 7.925)

Pooled StDev = 1.10675

### Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Perlakuan	N	Mean	Grouping
N0Si0	6	10.718	A
N2Si2	6	6.962	B
N3Si2	6	3.975	C

Means that do not share a letter are significantly different.

## Lampiran 9 Hasil ANOVA Ukuran Lebar Morfologi *S. costatum*

### One-way ANOVA: Lebar versus Perlakuan

Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0.05$   
 Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Perlakuan	3	1, 2, 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Perlakuan	2	0.0736	0.03678	0.05	0.953
Error	15	11.5070	0.76713		
Total	17	11.5805			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.875860	0.64%	0.00%	0.00%

Means

Perlakuan	N	Mean	StDev	95% CI
N0Si0	6	7.358	0.820	(6.596, 8.120)
N3Si2	6	7.382	1.224	(6.620, 8.144)
N2Si2	6	7.236	0.360	(6.474, 7.998)

Pooled StDev = 0.875860

## Lampiran 10 Hasil ANOVA Ukuran Panjang Spina Morfologi *S. costatum*

### One-way ANOVA: Panjang Spina versus Perlakuan

#### Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0.05$   
 Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Perlakuan	3	1, 2, 3

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Perlakuan	2	0.2932	0.1466	0.31	0.755
Error	3	1.4249	0.4750		
Total	5	1.7181			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.689190	17.06%	0.00%	0.00%

#### Means



Perlakuan	N	Mean	StDev	95% CI
N0Si0	2	6.175	0.163	( 4.624, 7.726)
N3Si2	2	6.2450	0.0636	(4.6941, 7.7959)
N2Si2	2	5.745	1.181	( 4.194, 7.296)



Pooled StDev = 0.689190

**Lampiran 11 Dokumentasi Penelitian**




No.	Kegiatan	Gambar
1.	Sterilisasi Alat Kultur	 <p data-bbox="561 571 956 667">Peralatan gelas dan non gelas dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir.</p>  <p data-bbox="561 951 956 1046">Peralatan gelas direndam dengan HCl 0,2% selama 24 jam dan dibilas dengan air mengalir.</p> 

		<p>Selanjutnya peralatan gelas disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.</p>  <p>Peralatan non gelas (selang) direndam dengan klorin 40 ppm selama 24 jam.</p>  <p>Selang yang telah direndam klorin selama 24 jam, dibilas dengan air mendidih. Setelah itu, selang dikeringkan dibawah sinar matahari <math>\pm 3</math> jam.</p>
--	--	---

2.	<b>Sterilisasi Bahan Kultur</b>	 <p>Air laut disterilkan dengan klorin 60 ppm (<math>\pm 30</math> menit).</p>  <p>Air laut dinetralkan menggunakan natrium thiosulfate 30 ppm.</p>  <p>Air laut direbus hingga mendidih dan dimasukkan kedalam botol kultur steril dan didiukur salinitas 34 ppt menggunakan refraktometer.</p>
----	---------------------------------	--




3.	Persiapan pupuk diatom dalam kultur <i>S. costatum</i>	 <p>Pupuk diatom (<math>\text{KNO}_3</math>, <math>\text{PO}_4</math>, EDTA, Fe, &amp; <math>\text{N}_2\text{SiO}_2</math>) ditimbang menggunakan neraca analitik sesuai dengan komposisi pada Tabel 3.1.</p>  <p>Kelima senyawa tersebut dilarutkan dengan aquades 1 L.</p>
----	--	--



4.	Inokulasi bibit <i>S. costatum</i> pada media pertumbuhan	 <p data-bbox="561 472 954 539">Dalam 1 L kultur dibutuhkan 1 ml pupuk diatom.</p>  <p data-bbox="561 818 954 916">Pupuk diatom dimasukkan kedalam botol kultur yang berisi air laut steril.</p>  <p data-bbox="561 1197 954 1289">Bibit <i>S. costatum</i> diinokulasi sebanyak 10% dari volume media kultur.</p>
----	---	--



Kultur mikroalga *S. costatum*  
diaerasi 24 jam.

5.	Pengukuran kepadatan sel <i>S. costatum</i>	 <p>Pengukuran kepadatan sel setiap 6 jam sekali hingga fase kematian menggunakan <i>haemocytometer</i> pada ruang W dengan bantuan mikroskop cahaya (perbesaran 400x).</p>  <p>Selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan untuk menentukan waktu starter (1/2 eksponensial) dan waktu panen (eksponensial akhir).</p>
6.	Pemanenan biomassa <i>S. costatum</i>	




Hasil kultivasi dipanen dengan cara disaring menggunakan 2 lapis kain satin.



Mikroalga *S. costatum* ditimbang berat basah nya, dialasi dengan aluminium foil (telah ditimbang sebelumnya).



Mikroalga *S. costatum* dikeringkan menggunakan oven *MEMMER* suhu 70°C selama 24 jam.

		 <p>Berat kering mikroalga <i>S. costatum</i> ditimbang dengan neraca analitik. Biomassa dihitung menggunakan rumus Sulaeman dkk (2005).</p>  <p>Biomassa mikroalga <i>S. costatum</i> dalam bentuk kering.</p>
7.	Pengamatan morfologi <i>S. costatum</i>	 <p>Morfologi mikroalga <i>S. costatum</i> diamati menggunakan SEM INSPECT S50.</p>



1 mg sampel kering mikroalga *S. costatum* diletakkan pada stub.



Sampel dimasukkan kedalam SEM *chamber* untuk divisualisasikan dengan pemindai SEM.



Morfologi yang tampak pada layar komputer SEM dicari bagian yang diinginkan (panjang, lebar, panjang spina) kemudian dibidik dan disimpan.

8. Pengamatan kandungan lipid *S. costatum* kualitatif



Larutan stok Nile red dibuat dengan mencampurkan 1 mg Nile red ke dalam 10 ml aseton.



Stok Nile red disimpan dalam kondisi gelap dan tertutup.



Pewarnaan sel mikroalga dilakukan dengan meneteskan 0,2 ml stok Nile red ke dalam 1 ml mikroalga *S. costatum*.



Mikroalga *S. costatum* dalam mikrotube divortex hingga homogen dan didiamkan 30-40 menit.



Sel *S. costatum* dibilas dengan aquades, perbandingan 50  $\mu$ l:50  $\mu$ l.



Mikrotube berisi mikroalga *S. costatum* disentrifuge kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, suhu 4°C.








Bagian supernatan dibuang dan bagian natan diwarnai dengan Nile red.



Natan diambil 30  $\mu$ l dan ditetaskan diatas kaca objek.



Pandangan warna lipid intraseluler diamati menggunakan mikroskop fluorescence. Panjang gelombang 450-495 nm.

9.	Pengamatan kandungan lipid <i>S. costatum</i> kuantitatif	 <p>2 gram sampel kering mikroalga <i>S. costatum</i> dibungkus selongsong kertas saring.</p>  <p>Selongsong kertas saring dimasukkan kedalam alat soxhlet yang dihubungkan dengan labu lemak.</p>  <p>Kemudian ditambahkan dengan pelarut heksana 39 ml dan etanol 13 ml.</p>
----	---	--



Setelah itu dipasang kondensor yang dialiri dengan air dan api bunsen dinyalakan.



Proses ekstraksi lipid berlangsung  $\pm 6$  jam.



Lipid hasil ekstraksi di masukkan kedalam *beaker glass* 5 ml (yang sebelumnya telah ditimbang), dilabeli dan ditutup dengan aluminium foil.



Ekstrak lipid dikeringkan dalam oven dengan suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.



Ekstrak lipid ditimbang berat keringnya dengan neraca analitik.



Kemudian dihitung kandungan lipid total sesuai dengan rumus Shahidi (2003).

## Lampiran 12

### Biodata Penulis



Penulis mempunyai nama lengkap Wahyu Osi Diana Putri. Penulis dilahirkan di Surabaya, 15 Maret 1997. Penulis memulai pendidikan dasar di SDN Benowo III, Surabaya pada tahun 2003-2009. Setelah lulus, ia memulai jenjang menengah pertama di MTsN III Surabaya pada tahun 2009-2012. Setelah lulus SMP, penulis melanjutkan ke jenjang menengah atas di SMAN 11

Surabaya pada tahun 2012-2015.

Setelah lulus SMA pada tahun 2015. Penulis melanjutkan jenjang S1 Biologi di Institut teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Selama masa perkuliahan penulis pernah mengikuti beberapa pelatihan diantaranya LKMM Pra-TD FMIPA 2015, Pelatihan Karya Tulis Ilmiah HIMABITS 2015, LKMM TD HIMABITS 2016. Penulis aktif mengikuti organisasi mahasiswa seperti Badan Eksekutif Mahasiswa FMIPA ITS dan Lembaga Minat Bakat ITS sebagai staff periode 2016/2017 serta kegiatan panitia lainnya. Penulis melakukan Kerja Praktek di Puslitbang Perhutani Cepu, Jawa Tengah pada tahun 2018. Ketertarikannya pada dunia biologi terutama Botani mendorongnya untuk lebih mendalami ilmu botani serta menerapkan ilmu tersebut untuk mengembangkann pertanian yang ada di Indonesia.





