

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Mikroalga

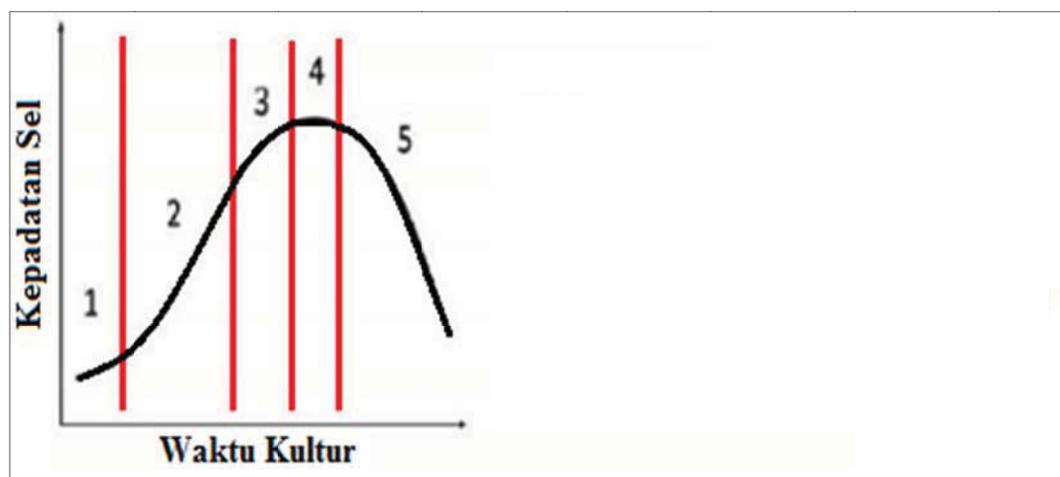
Mikroalga merupakan organisme air fotoautotropik uniseluler atau multiseluler (Biondi and Tredici, 2011). Mikroalga memiliki ukuran sel antara 3 - 30  $\mu\text{m}$ , dengan bentuk yang beragam seperti bulat, elips, silinder. Mikroalga tidak seperti tumbuhan pada umumnya, mikroalga tidak memiliki akar, batang dan daun sejati, sehingga mikroalga termasuk dalam filum Thallophyta.

Secara komersial biomassa mikroalga yang kaya gizi dimanfaatkan sebagai sumber pangan potensial untuk larva ikan maupun udang, serta pemanfaatan hidrokarbon digunakan sebagai alternatif bahan bakar alami (biofuel). Selain itu, mikroalga berperan sebagai bioremediasi yaitu untuk mengatasi pencemaran lingkungan dengan cara memanfaatkan limbah sebagai media hidupnya, yang mana di dalam media tersebut masih terdapat senyawa-senyawa organik yang menjadi sumber nutriennya (Kawaroe *et al.*, 2010). Sel mikroalga termasuk mikroorganisme eukariotik, yang dikelompokkan ke dalam sembilan divisi yaitu Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, dan Chlorophyta (Barsanti and Gualtieri, 2006).

#### 2.2. Laju Pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.

Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Sampai saat ini kepadatan sel digunakan secara luas untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga

(Isnansetyo dan Kurniastuty 1995). *Nannochloropsis* sp mempunyai waktu generasi yang sangat cepat. Dalam waktu yang sangat singkat *Nannochloropsis* sp mampu memperbanyak sel secara cepat. Pertumbuhan mikroalga dibagi dalam lima fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian (Fogg, 1975). Kurva pertumbuhan mikroalga *Nannochloropsis* sp dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Kurva Laju Pertumbuhan Mikroalga (*Nannochloropsis* sp) (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

#### a. Fase Lag

Dimulai setelah penambahan inokulum ke dalam media kultur hingga beberapa saat sesudahnya. Pada fase ini peningkatan paling signifikan terlihat pada ukuran sel karena secara fisiologis fitoplankton menjadi sangat aktif. Proses sintesis protein baru juga terjadi dalam fase ini. Metabolisme berjalan tetapi pembelahan sel belum terjadi sehingga kepadatan sel belum meningkat karena fitoplankton masih beradaptasi dengan lingkungan barunya.

**b. Fase Logaritmik (Eksponensial)**

Fase ini dimulai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan yang meningkat secara intensif. Bila kondisi kultur optimum maka laju pertumbuhan pada fase ini dapat mencapai nilai maksimal dan pola laju pertumbuhan dapat digambarkan dengan kurva logaritmik. Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), *Nannochloropsis* sp dapat mencapai fase ini dalam waktu 5-7 hari.

**c. Fase Penurunan**

Pembelahan sel tetap terjadi pada fase ini, namun tidak seintensif fase sebelumnya, sehingga laju pertumbuhan juga mengalami penurunan dibandingkan fase sebelumnya. Pada fase ini, tetap terjadi pertumbuhan sel namun laju pertumbuhannya menurun. Hal ini dikarenakan terjadinya kompetisi yang sangat tinggi di dalam media hidup karena zat makanan yang tersedia tidak sebanding dengan jumlah populasi akibat dari penambahan yang sangat cepat pada fase eksponensial sehingga hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan makanan yang cukup dan dapat tumbuh serta membelah.

**d. Fase Stasioner**

Pada fase ini laju reproduksi dan laju kematian relatif sama. Penambahan dan pengurangan jumlah fitoplankton seimbang sehingga kepadatannya relatif tetap (stasioner). Hal ini disebabkan oleh menipisnya zat makanan atau menumpuknya metabolit beracun dalam medium sehingga pertumbuhan terhambat. Akan tetapi dalam kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner, yaitu adanya kehilangan sel-sel yang baru melalui pertumbuhan dan pembelahan.

#### **e. Fase Kematian**

Fase ini ditandai dengan laju kematian yang lebih besar daripada laju reproduksi sehingga jumlah sel mengalami penurunan secara geometrik. Penurunan kepadatan sel fitoplankton ditandai dengan perubahan kondisi optimum yang dipengaruhi oleh suhu, cahaya, pH media, ketersediaan hara, dan beberapa faktor lain yang saling terkait satu sama lain.

### **2.3. Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga**

Kultivasi mikroalga dalam kondisi yang sesuai dengan jenisnya dilakukan agar dapat menghasilkan biomassa yang melimpah. Menurut Bold and Wynne (1985), perkembangbiakan *Nannochloropsis* sp dalam kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: media, salinitas, derajat keasaman (pH), temperatur, intensitas cahaya, dan kandungan CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> terlarut.

#### **a. Media Kultur dan Unsur Hara**

Media merupakan tempat hidup bagi mikroalga dengan menyediakan sumber nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Media ini harus disesuaikan dengan jenis mikroalga yang akan dikultivasi. Nutrisi yang dibutuhkan mikroalga terdiri atas makronutrisi dan mikronutrisi. *Nannochloropsis* sp tumbuh pada media yang mengandung cukup unsur hara, seperti nitrogen, fosfor, kalium. Nutrisi yang diperlukan alga dalam jumlah besar adalah karbon, nitrogen, fosfor, sulfur, natrium, magnesium, kalsium. Sedangkan unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah relatif sedikit adalah besi, tembaga (Cu), mangan (Mn), seng (Zn), silikon (Si), boron (B), molibdenum (Mo), vanadium (V) dan kobalt (Co) (Chumadi *et al.*, 1992 dalam Chalid *et al.*, 2010).

## **b. Salinitas**

Salinitas termasuk dalam salah satu faktor yang berpengaruh terhadap mikroalga dalam mempertahankan tekanan osmotik yang baik antara protoplasma organisme dengan air sebagai lingkungan hidupnya. Beberapa jenis mikroalga mengalami perubahan salinitas pada media kultivasinya dari lingkungan bersalinitas rendah ke tinggi akan memperlambat laju pertumbuhannya. Beberapa mikroalga memiliki kemampuan yang dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang tinggi tetapi ada juga yang dapat tumbuh pada kisaran salinitas yang rendah. Mikroalga *Nannochloropsis* sp mempunyai toleransi yang cukup tinggi terhadap kadar garam (salinitas) lingkungan tempat hidupnya (Sachlan, 1982). Beberapa spesies *Nannochloropsis* sp air laut dapat mentolerir kondisi lingkungan yang relatif bervariasi. *Nannochloropsis* sp air laut dapat tumbuh baik pada salinitas 15-35 ppt (Hirata, 1981 dalam Purnamawati *et al.*, 2013). Sementara menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), *Nannochloropsis* sp air laut paling optimal tumbuh pada salinitas 25-28 ppt.

## **c. Derajat Keasaman (pH)**

Nilai pH medium kultur merupakan faktor pengontrol yang menentukan kemampuan biologis mikroalga dalam memanfaatkan unsur hara. Nilai pH yang terlalu tinggi misalnya, akan mengurangi aktifitas fotosintesis fitoplankton (De La Noue dan De Pauw, 1988 dalam Nur'aenah, 2011). Nielsen (1955) menyatakan bahwa pH yang sesuai untuk perkembangbiakan *Nannochloropsis* sp berkisar antara 4,5-9,3 dan kisaran optimum untuk *Nannochloropsis* sp laut berkisar antara 7,8-8,5. Mikroalga jenis ini sangat tahan terhadap lingkungan asam sampai pada

pH 2. Semakin tinggi kerapatan sel pada media kultur menyebabkan kondisi media kultur meningkat tingkat kebasannya (pH semakin tinggi) dan hal tersebut menyebabkan meningkatnya  $\text{CO}_2$  terlarut dalam media kultur (Wijanarko *et al.*, 2008).

#### **d. Intensitas Cahaya**

Cahaya menjadi sumber energi yang dibutuhkan mikroalga, baik berupa sinar matahari langsung ataupun dari pencahayaan lampu. Cahaya memiliki pengaruh terhadap sel mikroalga, sebagian besar dalam proses fotosintesis dan photoadaptation. Dalam proses ini, sel-sel alga akan mengalami perubahan dinamis dalam komposisi biokimia sel, biofisik maupun sifat fisiologis untuk meningkatkan fotosintesis dan pertumbuhan mikroalga.

*Nannochloropsis* sp merupakan mikroorganisme autotrof fotosintetik, yang berarti memerlukan cahaya sebagai sumber energinya. Pada peristiwa fotosintesis, cahaya matahari terlibat dalam suatu reaksi untuk mengaitkan molekul-molekul kecil seperti  $\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{CO}_2$  menjadi molekul-molekul besar dalam bentuk senyawa karbohidrat. Menurut Oh-Hama dan Miyachi (1988), bahwa intensitas cahaya saturasi untuk *Nannochloropsis* sp berada pada intensitas 4000 lux. Hal ini menunjukkan bahwa setelah titik intensitas tersebut dicapai, maka fotosintesis tidak lagi meningkat sehubungan dengan peningkatan porsi intensitas cahaya (Basmi, 1995).

#### **e. Temperatur**

Temperatur atau suhu merupakan salah satu faktor pembatas untuk kelangsungan hidup organisme, karena setiap organisme mempunyai kemampuan

yang terbatas untuk mentolerir perubahan suhu yang ada dilingkungannya. Temperatur juga mempengaruhi komposisi biokimia dalam sel mikroalga. Peningkatan suhu hingga batas tertentu akan merangsang aktifitas molekul, meningkatnya laju difusi dan juga laju fotosintesis (Sachlan, 1982).

Suhu di bawah 16°C dapat menyebabkan kecepatan perkembangbiakan *Nannochloropsis* sp turun, sedangkan suhu di atas 36°C dapat menyebabkan kematian (Taw, 1990). Menurut Sutamihardja (1975), menyatakan bahwa *Nannochloropsis* sp. mampu hidup pada suhu berkisar 5- 35°C, tetapi optimal dengan suhu 23 – 30°C. Kecepatan metabolisme alga meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai dicapai suhu optimal, dan akan turun kembali jika suhu melewati batas optimal.

#### **f. Kandungan CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> Terlarut**

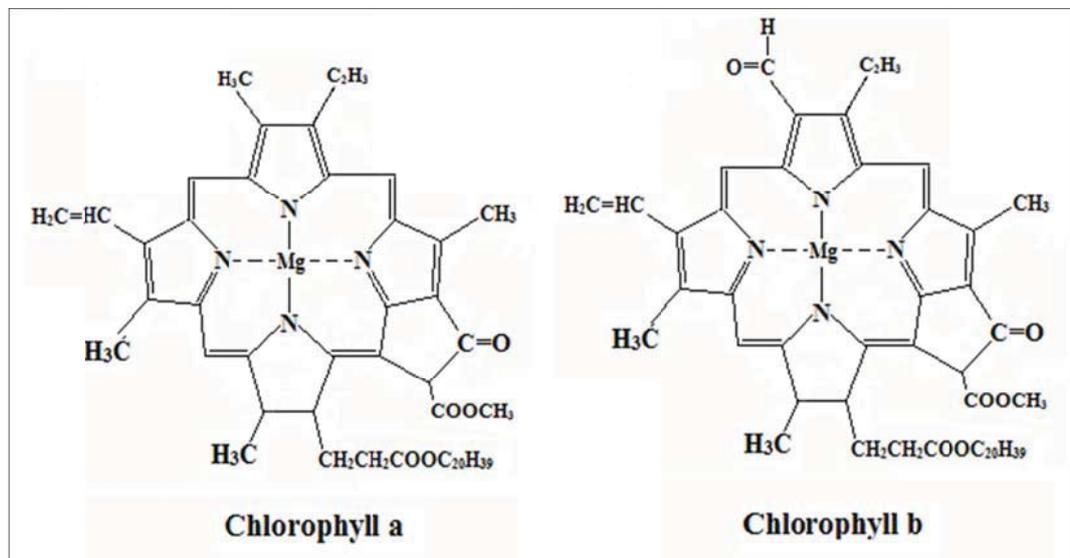
Karbondioksida (CO<sub>2</sub>) merupakan salah satu gas yang sangat penting bagi kelangsungan hidup organisme fotosintetik. Karbondioksida (CO<sub>2</sub>) diperlukan oleh fitoplankton untuk membantu proses fotosintesis. Kekurangan CO<sub>2</sub> bebas akan merugikan organisme produsen seperti fitoplankton dan tumbuhan air yang akan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan organisme tersebut. Adanya CO<sub>2</sub> yang terdapat dalam perairan dapat digunakan untuk mengetahui tingkat pencemaran yang terjadi di dalam perairan tersebut. Karbondioksida dengan kadar 1-2% biasanya sudah cukup digunakan dalam kultur fitoplankton dengan intensitas cahaya yang rendah. Kadar CO<sub>2</sub> yang berlebih dapat menyebabkan pH kurang dari batas optimum sehingga akan berpengaruh terhadap perkembangbiakan fitoplankton (Taw, 1990).

Oksigen merupakan salah satu faktor pembatas yang sangat penting bagi semua bentuk kehidupan di bumi. Oksigen akan larut dalam air karena dipengaruhi oleh suhu, tekanan parsial gas-gas yang ada di udara maupun air, kadar garam, serta adanya senyawa yang mudah teroksidasi dalam air. Bagi organisme akuatik seperti mikroalga, oksigen sangat dibutuhkan untuk proses respirasi.

#### **2.4. Klorofil**

Klorofil merupakan salah satu pigmen yang terdapat pada *Nannochloropsis* sp. Nama klorofil berasal dari bahasa Yunani yakni *chloros* (hijau kekuningan) dan *phylon* (daun). Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen klorofil) yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> dan sinar matahari untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan pertambahan sel, bergerak atau berpindah dan reproduksi (Pranayogi, 2003 dalam Chalid *et al.*, 2010).

Berdasarkan susunan kimianya, klorofil tersusun dari sebuah cincin porifin yakni suatu tetra pirola yang saling dihubungkan melalui suatu jembatan metin dan sebuah rantai hidrokarbon yang disebut fitol. Seluruh atom N pada cincin porfirin terkoordinasi pada ion Mg<sup>2+</sup> dan bagian fitolnya terhubung dengan cincin porfirin melalui sebuah gugus ester (Senge *et al.*, 2014). Struktur kimia klorofil disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Struktur kimia Klorofil-a dan Klorofil-b (Depari *et al.*, 2009).

Klorofil-a merupakan bentuk spesifik dari klorofil yang digunakan dalam fotosintesis oksigenik. Klorofil-a dan klorofil-b hanya dapat larut pada pelarut organik. Klorofil-a mudah larut dalam etil alkohol, etil eter, aseton, kloroform, dan karbon bisulfida dan berwarna hijau biru dalam pelarut-pelarut tersebut. Klorofil b dapat larut dalam pelarut yang sama meskipun tidak semudah klorofil-a dan berwarna hijau dalam pelarut yang sama. Klorofil-a dan klorofil-b mempunyai komposisi yang hampir sama. Komposisi klorofil-a adalah  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  sedangkan klorofil-b adalah  $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ , masing-masing dengan atom Mg sebagai pusat. Perbedaan keduanya adalah terletak pada gugus  $CH_3$  pada klorofil-a yang disubstitusi dengan  $HC=O$  pada klorofil-b. Klorofil-a mempunyai berat molekul 893 dan klorofil-b 907 (Riyono, 2007).

Klorofil menyerap cahaya merah, biru, dan ungu, serta merefleksikan cahaya hijau yang menyebabkan tumbuhan memperoleh ciri warnanya. Klorofil menyerap sinar pada panjang gelombang biru (420-460 nm), panjang gelombang

merah (650-700 nm) dan meneruskan/memantulkan sinar pada panjang gelombang hijau (~500 nm) (Mlodzinska, 2009). Namun menurut Gross (1991), dalam proses fotosintesis, klorofil berperan sebagai penangkap cahaya, transfer energi dan dalam konversi cahaya serta dapat menyerap panjang gelombang maksimum antara 400-700 nm.

Pigmen klorofil ini terletak di kloroplas dan memanfaatkan cahaya yang diserap sebagai energi untuk reaksi-reaksi cahaya dalam proses fotosintesis. Keberhasilan fungsi klorofil tidak hanya dari kemampuannya dalam menyerap cahaya pada penyinaran yang terus berubah dan pemanfaatan maksimal dari energi cahaya pada transpor elektron fotosintesis, namun klorofil juga memiliki kemampuan untuk melindungi kloroplas dari kelebihan cahaya dengan menghilangkannya dalam bentuk panas atau radiasi fluoresen (Nishio, 2000).

Klorofil disintesis di dalam daun dan berperan untuk menangkap cahaya yang jumlahnya berbeda untuk tiap spesies. Sintesis klorofil dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti cahaya, gula atau karbohidrat, air, temperatur, faktor genetik, unsur-unsur hara seperti N, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, S dan O (Hendriyani dan Setiari, 2009).

Kompleks proteinklorofil merupakan komponen fotosintesis yang penting (Van der Mescht *et al.*, 1999 *dalam* Nio dan Banyo, 2011). Radiasi cahaya yang diterima dalam proses fotosintesis diabsorpsi oleh klorofil dan pigmen tambahan yang merupakan kompleks proteinklorofil. Selanjutnya energi radiasi akan ditransfer ke pusat reaksi fotosistem I dan II yang merupakan tempat terjadinya perubahan energi cahaya menjadi energi kimia (Li *et al.*, 2006 *dalam* Nio dan

Banyo, 2011). Dua mekanisme yang terlibat dalam pembentukan kompleks proteinklorofil adalah distribusi klorofil yang baru disintesis dan redistribusi klorofil yang sudah ada. Klorofil b adalah hasil biosintesis dari klorofil a dan berperan penting dalam reorganisasi fotosistem selama adaptasi terhadap kualitas dan intensitas cahaya. Oleh sebab itu hilangnya klorofil a dan b berpengaruh negatif terhadap efisiensi fotosintesis (Van der Mescht *et al.*, 1999 dalam Nio dan Banyo, 2011).

Proses pembentukan klorofil dimulai dari senyawa *glutamat* yang akan diubah menjadi  *$\alpha$ -ketoglutarat* melalui proses deaminasi.  *$\alpha$ -ketoglutarat* diubah menjadi asam amino *laevulinat* melalui proses transaminase yang dibantu oleh ATP dan NADPH. Pada asam amino *laevulinat* berturut-turut terjadi pelepasan air,  $\text{NH}_3$  dan  $\text{CO}_2$  yang akan membentuk *Protochlorophyllinogen*. Proses pembentukan klorofil berlanjut pada proses penambahan  $\text{Mg}^+$  yang akan menghasilkan *Mg-protophyrin monomethylester*. Mg disinilah yang akan menyebabkan klorofil dapat berfungsi sebagai penyerap cahaya. Klorofil-a akan terbentuk ketika *Mg-protophyrin monomethylester* ditambahkan dengan ion  $\text{H}^+$ . Proses pembentukan klorofil ini sangat dipengaruhi oleh adanya cahaya (Lawlor, 1993).

Proses pembentukan klorofil-b dimulai dari adanya sintesis pada oksidasi metil yang ada pada klorofil-a. Pembentukan klorofil-b dibantu oleh enzim *Chlorophyll a Oxygenase* (CAO). Enzim tersebut berfungsi untuk memindahkan electron yang terdapat pada gugus metil yang ada pada klorofil-a sehingga terbentuk klorofil-b (Tanaka *et al.*, 1998).

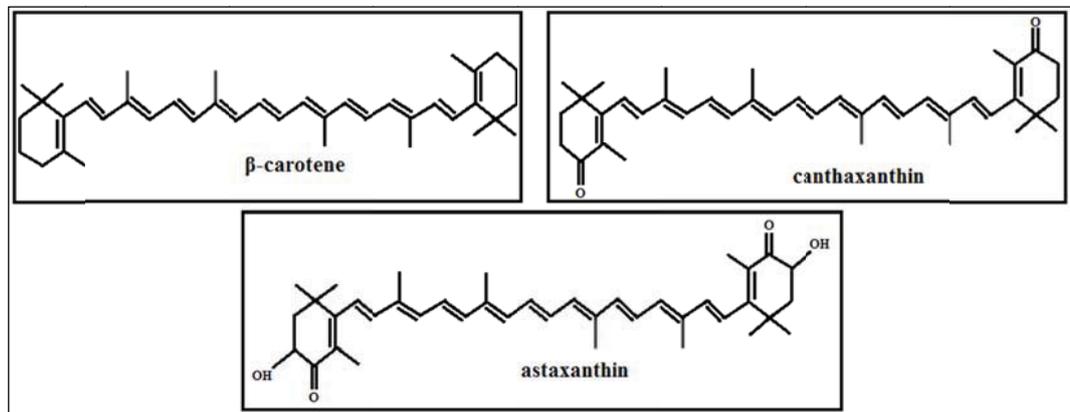
## 2.5. Karotenoid

Karotenoid telah ditemukan di alam yaitu lebih dari 400 karotenoid. Dari jumlah tersebut hanya sedikit yang dimanfaatkan secara komersil, terutama sebagai bahan pewarna alami (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Karotenoid dapat disintesis oleh tanaman, alga, jamur maupun bakteri. Pigmen karoten ini dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan, kecantikan dan tekstil (Dufosse *et al.*, 2005). Pigmen karoten ini digunakan sebagai prekursor vitamin A, saat ini karoten juga telah dikembangkan sebagai efek protektif melawan sel kanker, penyakit jantung, mengurangi penyakit mata, antioksidan, dan regulator dalam sistem imun tubuh (Kurniawan *et al.*, 2010). Selain sebagai provitamin A, karoten juga dimanfaatkan sebagai peningkat daya tahan tubuh dan pengubah metabolisme kanker pada tubuh (Arab *et al.*, 2001; Gross, 1991).

Di dalam sel mikroalga, karotenoid berperan sebagai pigmen yang membantu klorofil dalam penyerapan cahaya yang dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Karotenoid menunjukkan absorpsi kuat untuk panjang gelombang biru dan ungu (< 400 nm); memantulkan dan mentransmisikan panjang gelombang hijau kuning (510-600 nm), lembayung, merah (610-700 nm) (Sasmitamihardja dan Siregar, 1996; Lobban dan Harrison, 1997).

Aktivitas antioksidan intrinsik karotenoid merupakan dasar tindakan protektif melawan stres oksidatif, namun tidak semua aktivitas biologis yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menonaktifkan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif diklaim sebagai karotenoid. Karotenoid juga merupakan salah satu antioksidan nonenzimatik bersama dengan vitamin C, vitamin E, dan

asam lipolat dan memainkan peran penting dalam perlindungan terhadap stres oksidatif (Parida and Das, 2005).



**Gambar 3.** Struktur beberapa Senyawa Karotenoid (Borowitzka and Borowitzka, 1988).

Karotenoid merupakan senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid yang tersusun dari senyawa isoprenoid, dengan jalur sintesis seperti pada yaitu melalui tail-to-tail dari 2 molekul geranyl-geranyl diphosphate yang kemudian membentuk kerangka karbon dasar (C-40). Karotenoid dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok karoten dan xantofil. Karoten memiliki kerangka dasar rantai lurus panjang dengan 11 ikatan rangkap terkonjugasinya.

Proses pembentukan karotenoid terjadi di dalam plastid melalui jalur MEP, yang merupakan cabang siklus Calvin. Biosintesis karotenoid berawal dari farnesil pirospat (FPP), yang berasal dari dua prekursor, isopentenil pirospat (IPP) dan dimetilalil pirospat (DMAPP). Secara umum, ada dua jalur untuk mensintesis IPP dan DMAPP yaitu mevalonate (dimulai dengan asetil Ko-A) dan non-mevalonate (dimulai dengan piruvat dan glyceraldehyde-3-pospat). Biosintesis karotenoid pada mikroalga menggunakan jalur non-mevalonate (Yuan

*et al.*, 2006 *dalam* Abidin dan Karwur, 2009). Prekursor isoprena dari karotenoid dan semua terpenoid adalah isopentenil pirofosfat (IPP). IPP diisomerisasi menjadi DMAPP, lalu DMAPP berikatan dengan IPP membentuk C10 geranyl pirofosfat (GPP). GPP bergabung dengan 2 molekul IPP membentuk C15 FPP, FPP bergabung lagi dengan IPP membentuk C20 geranylgeranyl pirofosfat (GGPP). GGPP digunakan untuk membentuk diterpen, seperti karotenoid (Gross, 1991 *dalam* Abidin dan Karwur, 2009).

Tahap unik pertama pada biosintesis karotenoid adalah kondensasi 2 molekul GGPP menjadi fitoen. Senyawa ini dibentuk oleh C40 siklopropana intermediet, prefitoen pirofosfat (PPPP) (Altman *et al.*, 1972 *dalam* Abidin dan Karwur, 2009). Dari fitoen, likopen dapat dibentuk dengan cara dehidrogenasi. Pada tiap tahap proses dehidrogenasi, kromofor diperpanjang oleh 2 ikatan rangkap secara bergantian dari salah satu sisinya. Siklisasi juga terjadi pada karoten yang memiliki minimal ikatan rangkap pada C-7 dan 8. Pemasukan gugus fungsi oksigen, hidroksi, dan epoksi terjadi setelah proses siklisasi yang merupakan tahap akhir dari biosintesis ketika karoten dioksidasi. Perbedaan-perbedaan dalam hal reaksi siklisasi, dehidrogenasi, dan oksidasi menyebabkan perbedaan-perbedaan dalam jenis karotenoid yang dihasilkan (Gambar 3). Enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis ini adalah CrtE, CrtB, CrtL (likopen), CrtY ( $\beta$ -karoten), dan CrtZ (zeaxantin) (Yuan *et al.*, 2006 *dalam* Abidin dan Karwur, 2009).