

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Biota Uji

Biota uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga hijau jenis *Nannochloropsis* sp yang di peroleh dari stok murni Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Selanjutnya dilakukan penghitungan kepadatan sel pada stok awal yang selanjutnya akan digunakan untuk inokulasi awal kultur.

3.1.2. Wadah Uji

Wadah uji yang digunakan adalah botol kaca bervolume 500 ml sebanyak 6 buah. Sebelum digunakan wadah uji terlebih dahulu disterilkan. Media uji yang digunakan berupa air laut dan pupuk Walne.

3.1.3. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan yang digunakan untuk sterilisasi alat dan bahan, pengkulturan mikroalga skala laboratorium, pembuatan media kultur, pengukuran kepadatan sel, pengukuran kualitas air serta peralatan ekstraksi. Peralatan yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Peralatan yang digunakan dalam Penelitian

| No. | Nama Alat | Jumlah | Kegunaan |
|------------|------------------|---------------|-----------------|
| 1 | Botol 500 ml | 6 buah | Wadah kultur |

| | | | |
|----|--------------------|---------|----------------------------|
| 2 | Aerator | 1 buah | Suplai udara |
| 3 | Aluminium foil | 1 roll | Membungkus alat |
| 4 | Gelas ukur | 1 buah | Mengukur volume air |
| 5 | Hand counter | 1 buah | Alat bantu hitung |
| 6 | Haemocytometer | 1 buah | Menghitung kepadatan sel |
| 7 | Plastik wrap | 1 lusin | Menutup media kultur |
| 8 | Lampu TL | 1 buah | Sumber cahaya |
| 9 | Filter holder | 1 buah | Penyaring biomassa |
| 10 | Mikroskop | 1 buah | Mengamati kepadatan sel |
| 11 | Kertas pH | 1 buah | Mengukur pH air |
| 12 | Refraktometer | 1 buah | Mengukur salinitas air |
| 13 | DO meter | 1 buah | Mengukur DO dan suhu media |
| 14 | Pipet tetes | 1 buah | Mengambil sampel |
| 15 | Pipa plastik | 3 meter | Saluran udara |
| 16 | Selang aerasi | - | Saluran udara |
| 17 | Cuvet | 6 buah | Tempat mengukur absorbansi |
| 18 | Sentrifuge | 1 buah | Pengendap |
| 19 | Spatula | 1 buah | Pengambil ekstrak kering |
| 20 | Timbangan analitik | 1 buah | Menimbang sampel |
| 21 | Vial | 15 buah | Tempat sampel |
| 22 | Vortex | 1 buah | Homogenitas sampel |
| 23 | Tissue | 7 roll | Membersihkan alat |
| 24 | Kertas label | 1 set | Memberi label pada sampel |
| 25 | Blower | 2 buah | Suplai udara |
| 26 | Mortar | 1 buah | Penghalus sampel |

| | | | |
|----|------------------|----------|---|
| 27 | Kompor | 1 buah | Pemanas |
| 28 | Autoclaf | 1 buah | Sterilisasi tekanan tinggi |
| 29 | Kapas | 1 bugkus | Menyaring media kultur (air laut) |
| 30 | Oven | 1 buah | Pengering endapan sampel |
| 31 | Spektrofotometer | 1 buah | Menganalisa panjang gelombang bahan uji |

3.1.4. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan yang digunakan untuk desinfeksi alat dan media kultur, pengkulturan mikroalga skala laboratorium, pembuatan media kultur, dan analisa pigmen karotenoid dan klorofil. Bahan yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

| No. | Nama Bahan | Kegunaan |
|-----|--------------------|---------------------------------|
| 1 | Alkohol 70% | Sterilisasi alat dan lingkungan |
| 2 | Air laut steril | Pembuatan media |
| 3 | Aquades | Pembuatan media |
| 4 | Klorin 60 ppm | Sterilisasi air laut |
| 5 | Pupuk Walne | Suplai nutrient |
| 6 | Natrium thiosulfat | Netralisasi chlorine |
| 7 | NaOH | Pengendap sel mikroalga |
| 8 | Aseton | Pelarut |
| 9 | Magnesium carbonat | Zat pereaksi |

3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental laboratoris, yaitu salah satu cara yang digunakan untuk mencari hubungan sebab-akibat antara dua faktor atau lebih yang dilakukan oleh peneliti dengan menghilangkan faktor yang tidak berpengaruh atau tidak mendukung (Arikunto, 1993).

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu satu perlakuan dengan taraf perlakuan salinitas dan masing-masing taraf perlakuan dilakukan 3 pengulangan. Perlakuan yang dipakai adalah perbedaan salinitas dalam media kultur. Perlakuan tersebut diantaranya adalah :

Perlakuan A : Kultur *Nannochloropsis* sp dengan salinitas 30 ppt

Perlakuan B : Kultur *Nannochloropsis* sp dengan salinitas 35 ppt

3.2.2 Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu:

1. Persiapan penelitian, yang terdiri dari: sterilisasi alat, bahan dan ruangan; pembuatan media kultur.
2. Pelaksanaan penelitian, yang terdiri dari : pengkulturan *Nannochloropsis* sp dengan perlakuan; pengamatan pertumbuhan dan pengukuran kualitas media; pemanenan biomassa; analisa kandungan pigmen karotenoid dan klorofil; dan pengolahan data.

3.2.2.1. Pesiapan Penelitian

a) Desinfeksi Alat, Bahan dan Tempat

Alat, bahan dan tempat yang akan digunakan untuk penelitian harus di desinfeksi terlebih dahulu. Desinfeksi alat dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% agar bakteri yang menempel pada alat tersebut mati.

Air laut yang akan digunakan di desinfeksi terlebih dahulu dengan menambahkan kaporit ke dalam 6 liter air laut yang sudah melalui tiga penyaring dan diaerasi selama 1 x 24 jam. Setelah 1 x 24 jam ditambahkan Na-Thiosulfat, dan tetap diberikan aerasi sampai bau kaporit dan Na-Thiosulfat menghilang. Kemudian air laut direbus dengan menggunakan autoklaf selama \pm 60 menit untuk mematikan bakteri yang terdapat pada air laut tersebut. Kemudian disterilkan dengan sinar UV selama \pm 1 jam.

Desinfeksi tempat atau ruangan yang akan digunakan dilakukan dengan cara membersihkan tempat yang akan digunakan untuk mengkultur *Nannochloropsis* sp. Selain itu membersihkan seluruh ruangan seperti menyapu dan mengepel ruangan dengan larutan desinfeksi. Setelah seluruh tempat sudah dibersihkan, lalu dilakukan penyemprotan dengan larutan alkohol 70% dan kemudian ruangan di tutup selama 1 jam.

b) Pembuatan Media Kultur

Stok air laut yang sudah di sterilisasi sebanyak 6 liter dengan salinitas awal 35 ppt kemudian diencerkan hingga didapatkan salinitas yang sesuai dengan perlakuan. Pembuatan air laut dengan salinitas yang

diinginkan untuk kultur skala laboratorium (30 ppt dan 35 ppt), pengenceran ini dilakukan dengan rumus sebagai berikut (Gunawan, 2004)

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

Keterangan:

V_1 : Volume air laut (Liter)

V_2 : Volume air yang diinginkan (Liter)

M_1 : Salinitas air laut awal (ppt)

M_2 : Salinitas air yang diinginkan (ppt)

Pupuk walne yang digunakan merupakan penyedia nutrisi dari *C. vulgaris*. Kandungan pupuk walne dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Nutrisi Pupuk Walne pada Media Kultur *Nannochloropsis* sp

| Komponen | Jumlah |
|----------------------------------|---------------|
| NH ₄ NO ₃ | 100 gr |
| NaH ₂ PO ₄ | 20 gr |
| H ₃ BO ₃ | 33,6 gr |
| NaEDTA | 45 gr |
| FeCl ₂ | 1,3 gr |
| MnCl ₂ | 0,36 gr |
| Vitamin B ₁₂ | 0,001gr |
| Larutan Trace Metal | 1 ml |
| Aquades | 1000 ml |

Sumber: Andersen, 2005 *dalam* Widianingsih *et al*, 2008

3.2.2.2. Pelaksanaan Penelitian

a) Kultur *Nannochloropsis* sp dengan Salinitas yang berbeda

Stok kultur *Nannochloropsis* sp selanjutnya di kultur dengan medium yang masing-masing berbeda salinitasnya, yaitu 30 ppt dan 35 ppt. Sebanyak 6 botol kultur masing-masing bervolume 500 ml. Pupuk walne yang terdapat dalam setiap media kultur sebanyak 0,5 ml. Media kultur dihomogenkan dengan menggunakan aerasi sedang. Kepadatan awal stok *Nannochloropsis* sp berjumlah $6896,67 \times 10^4$ sel/ml. Pada penelitian setiap toples kultur awal diinokulasikan mikroalga *Nannochloropsis* sp dengan kepadatan 10^6 sel/ml. Penentuan kepadatan awal kultur dilakukan dengan menggunakan rumus yang digunakan Gunawan (2004).

$$V1 = \frac{V2 \times M2}{M1}$$

Keterangan: V1 = volume inokulum yang diinginkan

V2 = volume medium kultur

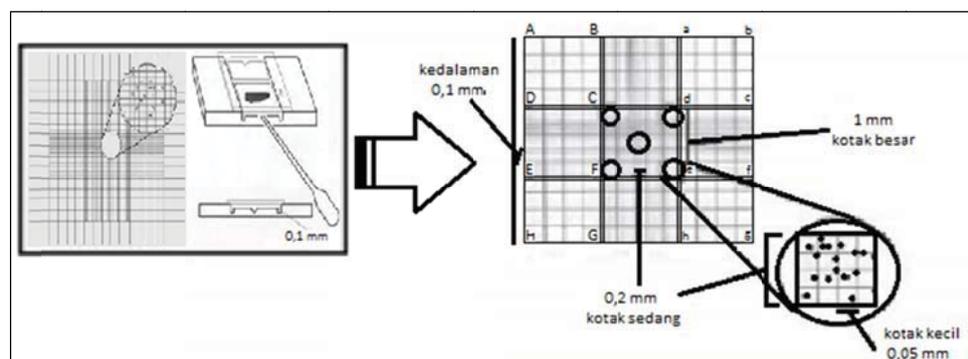
M1 = kepadatan stok (sel/ml)

M2 = kepadatan sel yang diinginkan

Ulangan sebanyak 3 kali pada setiap taraf perlakuan. Semua wadah kultur diletakkan dibawah lampu tabung (TL) dengan intensitas cahaya sebesar 4000 lux, dengan suhu 20-25°C. Wadah A_{1,2,3} mendapatkan perlakuan dengan salinitas 30 ppt. Wadah B_{1,2,3} mendapatkan perlakuan dengan salinitas 35 ppt. Pengkulturan *Nannochloropsis* sp dengan salinitas yang berbeda ini dilakukan selama 10 - 14 hari hingga mencapai fase stasioner.

b) Pengamatan Pertumbuhan dan Pengukuran Kualitas Air Media

Pertumbuhan mikroalga ini dapat dilihat dengan cara menghitung jumlah kepadatan sel setiap harinya. Pengamatan pertumbuhan *Nannochloropsis* sp dilakukan setiap 24 jam sekali yaitu pada pukul 14.00 WIB. Penghitungan kepadatan sel ini dilakukan dengan menggunakan alat *haemocytometer* dan alat bantu hitung yaitu *hand counter*. Kepadatan *Nannochloropsis* sp yang akan dihitung kepadatannya diteteskan dengan menggunakan pipet tetes pada bagian parit yang melintang hingga penuh. Penetesan dilakukan secara hati-hati agar tidak terjadi gelembung udara dibawah gelas penutup. Selanjutnya *Haemocytometer* tersebut diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x dan dicari bidang yang berkotak-kotak. Untuk mengetahui kepadatan selnya dengan cara menghitung sel *Nannochloropsis* sp yang terdapat pada kotak bujur sangkar yang mempunyai sisi 1 mm.



Gambar 4. Penghitungan Kepadatan Sel dengan *Haemocytometer* (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Perhitungan kepadatan sel menggunakan rumus sebagai berikut (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995):

$$\text{Kepadatan sel} = \frac{\text{N dalam 4 blok}}{\text{Jumlah blok (4)}} \times 10^4 \text{ (sel/mL)}$$

Keterangan :

N : Jumlah sel mikroalga yang teramati

Laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp dihitung dengan menggunakan rumus menurut Hirata *et al.*, (1981) sebagai berikut:

$$k = \left(\frac{\text{Log} \left(\frac{N_i}{N_o} \right)}{t_i - t_o} \right) \times 3,22$$

Keterangan : k = Laju pertumbuhan

No = Kepadatan awal (To)

Ni = Kepadatan pada waktu t

to = Waktu awal

ti = Waktu pengamatan.

3,22 adalah nilai konstanta

Pengukuran kualitas air media selama kultivasi meliputi suhu, DO dan pH. Pengukuran kualitas air ini dilakukan setiap 24 jam sekali pada pukul 14.00 WIB. Pengukuran suhu dan DO dilakukan dengan alat DO meter, salinitas dengan refraktometer dan pH dengan menggunakan kertas pH.

c) Analisis Karotenoid dan Klorofil *Nannochloropsis* sp

Kandungan klorofil dan karotenoid diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Metode penentuan kadar klorofil mengikuti metode Parsons *et al.*,(1984). Pelarut aseton digunakan karena pelarut ini bersifat semi polar sehingga dapat melarutkan karotenoid dan klorofil yang

bersifat non polar (Suarsa *et al.*, 2011). Sebanyak 30 – 50 ml kultur *Nannochloropsis* sp disaring dengan menggunakan filter holder dan dibantu dengan vacum pump. Filter hasil penyaring diambil dan masukkan kedalam kuvet. Kemudian tambahkan 10 ml aseton ke dalam kuvet yang telah berisi sampel kemudian sampel diinkubasi selama \pm 12 jam dalam suhu 20°C. Hancurkan sampel (filter) dengan menggunakan alat vortex. Sentrifugasi larutan tersebut dengan putaran 4000 rpm selama 30 menit. Ambil cairan yang bening (supernatan), kemudian ukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 664 nm, 647 nm, dan 663 nm.

Kadar klorofil-a dan klorofil-b dihitung dengan menggunakan rumus Parsons *et al.*, (1984):

$$\text{Klorofil a} = \frac{\{(11,85 \times E_{664}) - (1,54 \times E_{647}) - (0,08 \times E_{630})\} \times V_e}{V_s \times d}$$

$$\text{Klorofil b} = \frac{\{(21,03 \times E_{647}) - (5,43 \times E_{664}) - (2,66 \times E_{630})\} \times V_e}{V_s \times d}$$

Keterangan :

Klorofil-a dan klorofil-b (mg/L)

E664 = Absorbansi 664 nm – absorbansi 750 nm

E647 = Absorbansi 647 nm – absorbansi 750 nm

E630 = Absorbansi 630 nm – absorbansi 750 nm

V_e = Volume ekstrak aseton (ml)

V_s = Volume sampel air yang di saring (lt)

d = Lebar diameter kuvet (1 cm)

Metode yang digunakan untuk analisis kandungan karotenoid sama dengan metode yang digunakan untuk menganalisa kandungan klorofil, namun panjang gelombang yang digunakan pada analisa karotenoid adalah berkisar 470-750 nm. Setelah nilai absorbansinya didapatkan, maka kadar

karotenoidnya dapat diketahui dengan rumus Lichtentaher and Wellburn (1985) dalam Dere (1998) :

$$\text{Karotenoid (mg/L)} = \frac{(1000 A_{470} - 2,270 (11,75 A_{662} - 2,350 A_{645}) - 81,4 (18,61 A_{645} - 3,960 A_{662}))}{227}$$

d) Pemanenan Biomassa *Nannochloropsis* sp

Pemanenan dilakukan saat mikroalga mencapai fase stasioner dimana mencapai kepadatan maksimum sebelum akhirnya mengalami kematian. Fase ini mengalami pengurangan sejumlah besar nutrisi dalam media dan akumulasi senyawa-senyawa beracun sisa metabolisme (Prihantini *et al.*, 2007). Pemanenan biomassa *Nannochloropsis* sp dilakukan pada saat kultur mencapai fase stasioner. Hal ini berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Setyaningsih *et al.*, (1997) yang menunjukkan bahwa pemanenan *Chlorella* pada fase stasioner menghasilkan aktivitas tertinggi terhadap pertumbuhan *Sacharomyces cereviceae* dibandingkan pemanenan pada fase lag, log, dan awal kematian. Menurut Sutomo (2005), adanya perbedaan waktu untuk mencapai fase stasioner dan kepadatan sel dapat disebabkan oleh perbedaan faktor nutrisi selama masa kultivasi.

Pemanenan ini dilakukan dengan metode flokulasi. Penggunaan flokulan kimia mampu mengendapkan biomassa sebanyak 80% (Andrews *et al.*, 2008 dalam Amini dan Susilowati, 2010). Penggunaan flokulan mampu menghasilkan sebesar 1–3% (Ludwig, 2006 dalam Amini dan Susilowati, 2010). Pemanenan *Nannochloropsis* sp ini dilakukan dengan metode flokulasi yaitu metode pengendapan dengan

bahan kimia NaOH dengan perbandingan 1,8 L mikroalga ; 1,8 gr NaOH. Pengendapan dilakukan selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pemisahan biomassa dengan cairan jernih. Selanjutnya dilakukan pencucian biomassa dengan air tawar untuk menghilangkan kadar garam (Amini dan Susilowati, 2010). Kemudian dilakukan pemisahan endapan biomassa dengan air tawar. Pengeringan dilakukan selama 3 – 4 hari pada suhu ruangan 18 – 22°C.

3.3 Analisa Data

Data hasil pengamatan biomassa, kandungan karotenoid dan kandungan klorofil diolah dengan menggunakan Ms. Excel dan dibuat dalam bentuk grafik maupun tabel. Data tersebut diolah dengan menggunakan *software* SPSS 16 dengan melakukan pengujian independent sampel t test (Fowler *et al.*, 1998 dalam Manullang *et al.*, 2012).

3.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Hipotesis terhadap laju pertumbuhan pada *Nannochloropsis* sp

H₀ : Salinitas tidak berpengaruh terhadap laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp

H₁ : Salinitas berpengaruh terhadap laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp

- b. Hipotesis terhadap pigmen (klorofil dan karotenoid) *Nannochloropsis* sp

H₀ : Salinitas tidak berpengaruh terhadap kandungan klorofil *Nannochloropsis* sp

H₁ : Salinitas berpengaruh terhadap kandungan klorofil *Nannochloropsis* sp

Kaidah pengambilan keputusan :

- Jika $\text{sig} (p < \alpha)$ maka terima H_1 dan tolak H_0 ($\alpha = 0,05$)
- Jika $\text{sig} (p \geq \alpha)$ maka terima H_0 dan tolak H_1 ($\alpha = 0,05$)