

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Hipotesis terhadap pertumbuhan pada *Nannochloropsis* sp.
 H_0 : Salinitas tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.
 H_1 : Salinitas berpengaruh terhadap pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.
- b. Hipotesis terhadap pigmen klorofil *Nannochloropsis* sp.
 H_0 : Salinitas tidak berpengaruh terhadap kadar klorofil *Nannochloropsis* sp.
 H_1 : Salinitas berpengaruh terhadap kadar klorofil *Nannochloropsis* sp.

Kaidah pengambilan keputusan :

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

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Biota Uji

Biota uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga *Nannochloropsis* sp. yang di peroleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Kultur murni *Nannochloropsis* sp. dilakukan penghitungan kepadatan sel sebagai stok awal yang selanjutnya akan digunakan sebagai stater dalam penelitian.

3.2.2. Wadah Uji

Wadah uji yang digunakan adalah botol kaca bervolume 500 ml. Sebelum digunakan wadah uji terlebih dahulu dicuci dan disterilkan. Media uji yang digunakan berupa air laut perbedaan salinitas dengan penambahan pupuk Walne.

3.2.3. 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	15 buah	Wadah kultur
2	Aerator	15 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	4 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	Kompore	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

3.2.4. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan desinfektan, bahan kultur mikroalga, dan analisa pigmen 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

3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental laboratoris. Sebagai variabel independent adalah perlakuan perbedaan salinitas yaitu 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt. Sedangkan sebagai variabel dependent adalah jumlah sel dan nilai absorbansi klorofil.

3.3.1. 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 15 ppt

Perlakuan B : Kultur *Nannochloropsis* sp. dengan salinitas 20 ppt

Perlakuan C : Kultur *Nannochloropsis* sp. dengan salinitas 25 ppt

3.3.2. Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu:

1. Persiapan penelitian, yang terdiri dari: sterilisasi alat, bahan dan ruangan,serta 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 klorofil; dan pengolahan data.

3.3.2.1. 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 32 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 ± 60 menit untuk mematikan bakteri yang terdapat pada air laut tersebut. Kemudian disterilkan dengan sinar UV selama ± 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 formalin 20% dan kemudian ruangan di tutup selama 1 jam.

b) Pembuatan Media Kultur

Stok air laut yang sudah di sterilisasi sebanyak 32 liter dengan salinitas awal 34 ppt kemudian diencerkan hingga didapatkan salinitas yang sesuai dengan perlakuan. Pembuatan air laut dengan salinitas yang diinginkan untuk kultur skala laboratorium (15 ppt, 20 ppt, 25 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 Pupuk Walne

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

3.3.2.2. 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 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt. Sebanyak 15 botol kultur masing-masing bervolume 500 ml. Pupuk walne yang terdapat dalam setiap media kultur sebanyak 50 μ l. Media kultur dihomogenkan dengan menggunakan aerasi sedang. Kepadatan awal stok *Nannochloropsis* sp. berjumlah 10^8 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)

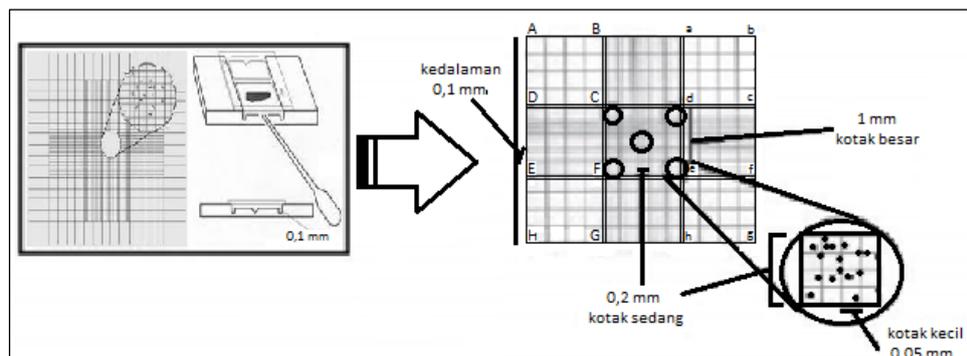
M2 = kepadatan sel yang diinginkan

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 15 ppt. Wadah B_{1,2,3} mendapatkan perlakuan dengan salinitas 20 ppt. Wadah C_{1,2,3} mendapatkan perlakuan dengan

salinitas 25 ppt. Pengkulturan *Nannochloropsis* sp. dengan salinitas yang berbeda ini dilakukan selama 10 hingga 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 *C. vulgaris* yang akan dihitung kepadatannya ditetaskan 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 2. 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 Klorofil *Nannochloropsis* sp.

Kandungan klorofil diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Metode penentuan kadar klorofil mengikuti metode

Parsons *et al.*,(1984). Pelarut aseton digunakan karena pelarut ini bersifat polar sehingga dapat melarutkan klorofil yang bersifat 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)

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.

Pemanenan 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.

3.4. Analisa Data

Data hasil pengamatan biomassa, 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 normalitas untuk mengetahui distribusi data tersebar normal atau tidak.

Dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui sama tidaknya variasi dua distribusi atau lebih. Setelah itu dilakukan analisis varian (ANNOVA) satu arah. Analisis ini berfungsi untuk membedakan rerata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya. Setelah mendapatkan analisa ANNOVA akan dilakukan uji lanjut Tukey apabila nilai signifikansi ($p < 0,05$). Uji lanjut tersebut dilakukan untuk mengetahui perbedaan antar variabel yaitu dengan membandingkan data dua kelompok sampel yang jumlahnya sama (Fowler *et al.*, 1998 *dalam* Manullang *et al.*, 2012).