

**PENGARUH KONSENTRASI PENAMBAHAN SODIUM NITRAT DAN SODIUM FOSFAT PADA MEDIA GUILLARD TERHADAP KONSENTRASI BIOMASSA MIKROALGA *Nannochloropsis* sp.**

Ida Bagus Gede Brahmantara<sup>1</sup>, A. A. Made Dewi Anggreni<sup>2</sup>, Ida Bagus Wayan Gunam<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UNUD

<sup>2</sup> Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UNUD

Email: ibbrahmantara@yahoo.com<sup>1</sup>

Email koresponden: dewianggreni@unud.ac.id<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

The aim of this study was to understand the effect of sodium nitrate and sodium phosphate concentration on Guillard medium to yields of biomass, and also to determine the best concentration of sodium nitrate and sodium phosphate to produce the highest yields of biomass on marine microalgae *Nannochloropsis* sp. Determining the effects of sodium nitrate and sodium phosphate on biomass was performed using Response Surface Methodology (RSM). The concentrations of sodium nitrate and sodium phosphate on Guillard medium affects the yields of biomass on marine microalgae *Nannochloropsis* sp. The optimum concentration of sodium nitrate and sodium phosphate to produce the highest yields of biomass were 178.14 g/l and 13.34 g/l respectively, with biomass concentration of  $8.00 \times 10^7$  cell/ml.

Keywords: Guillard, *Nannochloropsis* sp., sodium nitrate, sodium phosphate

**PENDAHULUAN**

Daerah perairan di Indonesia yang sebagian besar adalah laut, memiliki keanekaragaman hayati yang sangat melimpah. Salah satu keanekaragaman hayati tersebut adalah mikroalga. Mikroalga adalah organisme tumbuhan paling primitif berukuran renik (seluler) yang umumnya dikenal dengan fitoplankton dengan kemampuan fotosintesis layaknya tumbuhan tingkat tinggi yang ada di daratan. Mikroalga dikenal sebagai pakan ternak, bahan baku industri farmasi, kosmetika dan antibiotik. Hal ini dikarenakan kandungan kimia yang di kandung seperti protein, lemak, asam lemak tak jenuh, pigmen dan vitamin (Kawaroe *et al.*, 2010).

*Nannochloropsis* sp. atau lebih umum dikenal dengan nama *Chlorella* air laut adalah fitoplankton dengan ukuran 4 - 6  $\mu\text{m}$  (Tjahjo *et al.*, 2002). *Nannochloropsis* sp. merupakan jenis alga hijau (*Chlorophyta*) yang memiliki sel berwarna kehijauan, tidak bermotil, dan tidak berflagel. Selnya berbentuk bola (Hu dan Gao, 2006).

Susunan bahan baik bahan alami maupun bahan buatan yang digunakan untuk perkembang dan perkembangbiakan mikroba dinamakan media. Media Guillard merupakan salah satu media yang sering digunakan dalam perkembangbiakan dan pertumbuhan mikroalga. Faktor nutrisi adalah salah satu faktor penting yang perlu diperhatikan dalam pertumbuhan fitoplankton. Pertumbuhan dan perkembangan fitoplankton memerlukan berbagai nutrisi yang diabsorpsi dari luar (media). Nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroalga terdiri dari makronutrisi dan mikronutrisi. Makronutrisi yang dibutuhkan antara lain C, H, N, P, K, S, Mg, dan Ca, sedangkan mikronutrisi yang dibutuhkan antara lain adalah Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mo, Bo, Vn, dan Si (Kawaroe *et al.*, 2010).

Nitrat ( $\text{NO}_3$ ) adalah bentuk utama nitrogen di perairan alami dan merupakan nutrisi utama bagi pertumbuhan tanaman dan alga. Nitrat digunakan oleh mikroalga untuk melangsungkan metabolisme dan bereproduksi. Fosfat ( $\text{PO}_4$ ) merupakan salah satu unsur hara (nutrisi) yang dibutuhkan oleh organisme perairan, berperan dalam transfer energi ADP (Adenosine Diphosphate) menjadi ATP (Adenosine Triphosphate) yang terjadi dalam mitokondria sel (Bergman, 1999). Di laut, fosfor dijumpai dalam keadaan terlarut dan tersuspensi atau terikat di dalam sel organisme dalam air (Munandar, 2004). Keberadaan fosfat di dalam air akan terurai menjadi senyawa ionisasi, antara lain dalam bentuk ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Hu dan Gao (2006) telah melakukan penelitian terhadap pengaruh konsentrasi nitrat (50, 100, 150 g/l) dan fosfat (10, 20, 30 g/l) terhadap produksi biomassa *Nannochloropsis* sp. pada media f/2. Hasil biomassa yang optimum pada konsentrasi nitrat 100 g/l dan fosfat 20 g/l. Loberto (2011) melakukan optimasi konsentrasi nitrat (80, 100, 120 g/l) dan fosfat (10, 20, 30 g/l) pada media Walne.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat pada media Guillard terhadap konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. dan untuk menentukan konsentrasi sodium nitrat dan fosfat terbaik untuk menghasilkan konsentrasi biomassa sel tertinggi.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan, Laboratorium Analisis Pangan, Laboratorium Biokimia dan Nutrisi, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai dari bulan April – Agustus 2015.

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus Pioneer), *autoclave* (Tommy), selang aerasi, lampu TL (Phillips), *aerator* (Boyu S-4000 b), tutup silikon, mikroskop (Cole Parmer), kaca preparat, *haemocytometer* (Neubauer Improved), *cover glass* (Matsumita glass), toples plastik, botol kaca 1 liter, *hand counter* (Joyko), *thermometer* (Iwaki), pH meter, lux meter, oven (Ecocell), baskom, corong plastik, plastik 2,5 kg (Rajawali), *digital salt meter* (ATC), spatula, erlenmayer (Pyrex), gelas beaker (Pyrex), pipet mikro, lemari pendingin (Sharp), pipet volume (Iwaki), pipet tetes (Iwaki), penjepit logam, kapas, *tissue*, *aluminium foil* (Klin Pak), cawan petri, desikator, pisau, dan gunting.

Kultur mikroalga *Nannochloropsis* sp. yang digunakan pada penelitian ini diambil dari Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana, sedangkan air laut yang digunakan diambil dari Pantai Pandawa, Badung – Bali. Bahan – bahan pembuatan media Guillard, antara lain:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_8\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah *Central Composite Design* (CCD). Metode *response surface* digunakan untuk melihat pengaruh perlakuan penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat terhadap konsentrasi biomassa yang dihasilkan. Optimasi konsentrasi penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat terhadap konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. dilakukan dengan *Central Composite Design* (CCD) pada *Response Surface Methodology* (RSM). Bentuk

perlakuan dan kode perlakuan serta rancangan percobaan dengan sistem pengkodean dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Perlakuan dan Kode Perlakuan Biomassa *Nannochloropsis* sp.

Perlakuan	Kode perlakuan				
	-1,414	-1	0	1	1,414
Konsentrasi NaNO <sub>3</sub> (g/l)	29,3	50	100	150	170,7
Konsentrasi NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	0,86	5	15	25	29,14

Tabel 2. Rancangan Percobaan dengan Sistem Pengkodean

No	Kode konsentrasi NaNO <sub>3</sub>	Kode Konsentrasi NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Konsentrasi NaNO <sub>3</sub> (g/l)	Konsentrasi NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)
1	-1	-1	50	5
2	1	-1	150	5
3	-1	1	50	25
4	1	1	150	25
5	-1,414	0	29,3	15
6	1,414	0	170,7	15
7	0	-1,414	100	0,86
8	0	1,414	100	29,14
9	0	0	100	15
10	0	0	100	15
11	0	0	100	15
12	0	0	100	15
13	0	0	100	15

**Pelaksanaan penelitian**

**1. Persiapan dan sterilisasi alat dan bahan**

Sterilisasi peralatan media dilakukan dengan *autoclave* pada suhu 115°C selama 30 menit, dan sterilisasi peralatan dari plastik menggunakan *waterbath* pada suhu 100°C (Kawaroe *et al.*, 2010). Air laut disterilisasi dengan menggunakan klorin dengan perbandingan klorin dan air laut 0,06 ml/l air laut dan dinetralkan dengan menggunakan Na-tiosulfat dengan perbandingan 0,02 gr/l air laut (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

**2. Pembuatan media Guillard**

Pembuatan media Guillard terdiri dari pembuatan larutan *trace element*: (Jati *et al.*, 2012), pembuatan media Guillard (Jati *et al.*, 2012), dan pembuatan *vitamin mix* (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Larutan *trace element* menggunakan  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 g),  $(\text{NH}_4)_8\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,63 g),  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,98 g),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,6 g), yang dilarutkan dengan *aquadest* hingga 100 ml. Pembuatan media Guillard menggunakan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (sesuai perlakuan),  $\text{NaNO}_3$  (sesuai perlakuan),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (10 g),  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (50 g),  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,36 g),  $\text{FeCl}_3$  (2,9 g), *Trace element solution* (1 ml) dan dilarutkan dengan *aquadest* hingga 1000 ml. *Vitamin mix* menggunakan Vitamin B1 (0,2 g) yang dilarutkan dengan *aquadest* 200 ml, diambil 25 ml dan dicampur dengan Vitamin B12 (0,1 g) yang dilarutkan kembali dengan *aquadest* 250 ml.

### **3. Pembuatan starter *Nannochloropsis* sp.**

Pembuatan starter *Nannochloropsis* sp. pada media Guillard bertujuan memperpendek fase adaptasi pada volume media yang lebih besar. Penelitian ini menggunakan starter *Nannochloropsis* sp. sebanyak 2 l yang akan digunakan untuk memproduksi biomassa. Pembuatan starter dilakukan dengan perbandingan air laut dan starter *Nannochloropsis* sp. sebesar 70:30. Intensitas cahaya yang digunakan sebesar 1300 lux, suhu 30°C, salinitas 31‰, dan pH 8,1 selama proses kultivasi.

### **4. Kultivasi *Nannochloropsis* sp. untuk optimasi sodium nitrat dan sodium fosfat dalam produksi biomassa**

Proses kultivasi dilakukan pada volume 6 l dengan kepadatan awal sebesar  $5,00 \times 10^4$  sel/ml (Widianingsih, 2011). Media Guillard ditambahkan sebanyak 1 ml/l (sesuai perlakuan) (Jati *et al.*, 2012), dan vitamin ditambahkan 1 ml/l kultur (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995) dan diberi aerasi terus menerus selama proses kultivasi. Setelah 11 hari dilakukan analisis pengaruh konsentrasi biomassa.

### **5. Produksi Biomassa *Nannochloropsis* sp.**

Proses produksi biomassa dilakukan dengan cara yang sama dengan proses pembuatan starter, dengan volume 20 l. Setelah 11 hari inokulasi, biomassa dipanen dengan metode flokulasi (pengendapan) menggunakan tawas. Perbandingan penggunaan tawas dengan kultur yaitu 0,15 g/l kultur (Kawaroe *et al.*, 2010). Pencucian dilakukan berulang-ulang sampai kadar garamnya mencapai 0,0‰, selanjutnya endapan yang didapat dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C, kecepatan 100 rpm, dan tekanan 50 Mbar.

**Variabel yang diamati**

Variabel yang diamati adalah konsentrasi biomassa pada hari ke 11 kultivasi menggunakan *haemocytometer* (Isnanstyo dan Kurniastuti, 1995).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Optimasi Konsentrasi Nitrat dan Fosfat Biomassa *Nannochloropsis* sp.**

Penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat pada media Guillard memberi pengaruh terhadap konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. Konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. dengan perlakuan penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat pada media Guillard terhadap konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data hasil pengujian konsentrasi sodium nitrat dan sodium fosfat terhadap konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp.

No.	Konsentrasi Nitrat (g/L)	Konsentrasi Fosfat (g/L)	Konsentrasi Biomassa (sel/ml)
1	50	5	$6,07 \times 10^7$
2	150	5	$8,77 \times 10^7$
3	50	25	$5,14 \times 10^7$
4	150	25	$7,83 \times 10^7$
5	29,3	15	$3,74 \times 10^7$
6	170,7	15	$9,11 \times 10^7$
7	100	0,86	$6,65 \times 10^7$
8	100	29,14	$7,76 \times 10^7$
9	100	15	$7,54 \times 10^7$
10	100	15	$7,28 \times 10^7$
11	100	15	$7,57 \times 10^7$
12	100	15	$7,75 \times 10^7$

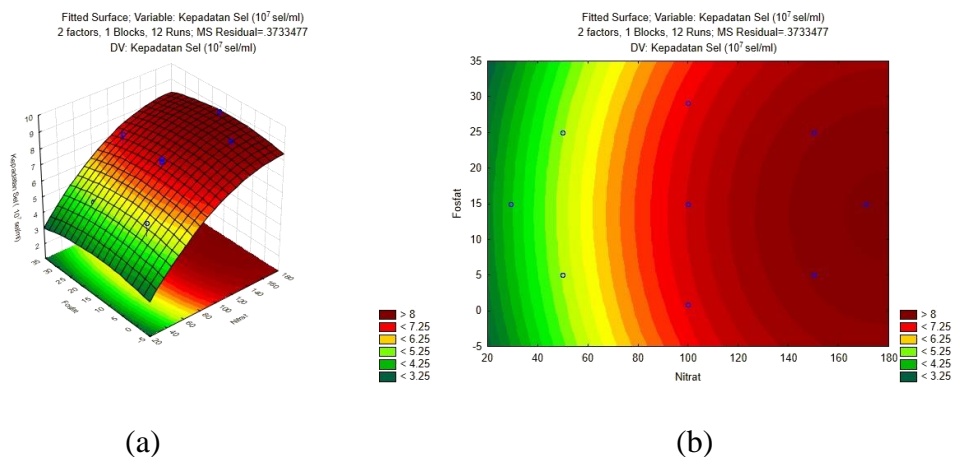
Hasil analisis diperoleh model persamaan regresi produksi biomassa *Nannochloropsis* sp. sebagai berikut:  $Z = 1,965 + 0,074X - 0,00021X^2 + 0,036Y - 0,0013Y^2 - 0,0000049XY + 0$ , dengan koefisien determinasi ( $R^2$ ) = 0,91066 yang dapat diartikan bahwa konsentrasi nitrat dan fosfat memiliki pengaruh sebesar 91,07% terhadap produksi biomassa *Nannochloropsis* sp. dan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain, seperti suhu, pH, salinitas, intensitas cahaya, dan aerasi sebesar 8,93%. Berdasarkan persamaan tersebut, maka diperoleh kombinasi konsentrasi nitrat 178,14 g/l dan fosfat 13,34 g/l yang memberikan pengaruh yang

optimal terhadap produksi biomassa *Nannochloropsis* sp. yaitu sebesar  $8,80 \times 10^7$  sel/ml.

Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) adalah bentuk utama nitrogen di perairan yang merupakan nutrisi utama bagi pertumbuhan tanaman dan algae. Nitrat digunakan oleh mikroalga dalam sintesis protein, pembentukan jaringan sel dan bereproduksi (Minnesota Pollution Control Agency, 2008).

Nitrat dan fosfor merupakan makronutrien yang esensial untuk yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroalga dan bakteri. Kandungan fosfor pada media kultivasi penting bagi pertumbuhan karena mengasimilasi nitrogen dari nitrat, dan berperan dalam transfer energi ADP (Adenosine Diphosphate) menjadi ATP (Adenosine Triphosphate) yang terjadi dalam mitokondria sel (Bergman, 1999).

Grafik *response surface* dan *counter plot* produksi biomassa *Nannochloropsis* sp. dapat dilihat pada Gambar 1. Perbedaan warna pada grafik dan *counter plot* menunjukkan perbedaan konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. pada setiap perlakuan. Warna merah tua pada grafik dan *counter plot* menunjukkan konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp.  $>8$  (lebih dari  $8,00 \times 10^7$  sel/ml), sedangkan warna hijau menunjukkan konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. terendah, yaitu  $<3,25 \times 10^7$  sel/ml.



Gambar 1. Grafik *respon surface*. (a) dan *counter plot* produksi biomassa *Nannochloropsis* sp.

Validasi model dilakukan pada penelitian ini dengan membandingkan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. secara aktual dengan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. yang dihasilkan dari persamaan regresi optimum. Validasi

dilakukan untuk mengetahui apakah model regresi yang diperoleh dapat diterima atau tidak. Perbandingan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. secara aktual berdasarkan hasil pengamatan dan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. hasil dari permodelan dapat dilihat pada Tabel 5.

Diperoleh perbandingan konsentrasi biomassa secara aktual dan berdasarkan permodelan, maka selanjutnya dilakukan uji-T untuk mengetahui korelasi antara konsentrasi biomassa aktual dan model. Berdasarkan hasil analisa yang dilakukan, maka diperoleh nilai *t-test* sebesar 0,903 dengan nilai  $P > 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa, tidak ada perbedaan yang nyata antara bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. secara aktual dengan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. yang dihasilkan dari persamaan model optimum pada volume kultivasi 1 liter.

Tabel 5. Perbandingan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. aktual dan bobot biomassa *Nannochloropsis* sp. model

Konsentrasi Nitrat g/l	Konsentrasi Fosfat g/l	Respon Bobot Biomassa <i>Nannochloropsis</i> sp. ( $10^7$ sel/ml)	
		Aktual	Model
170,7	15	8,45	9,22
29,3	15	4,22	3,78

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

- 1) Penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat pada media Guillard yang terbaik memberi pengaruh terhadap konsentrasi biomassa mikroalga *Nannochloropsis* sp.
- 2) Penambahan sodium nitrat dan sodium fosfat yang terbaik pada media Guillard untuk menghasilkan konsentrasi biomassa *Nannochloropsis* sp. yang tertinggi adalah konsentrasi nitrat 178,14 g/l dan fosfat 13,34 g/l dengan jumlah biomassa  $8,00 \times 10^7$  sel/ml.



## Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa yang terkandung dalam mikroalga *Nannochloropsis* sp

## DAFTAR PUSTAKA

- Hu, H. & K. Gao. 2006. Response of Growth and Fatty Acid Compositions of *Nannochloropsis* sp. to Environmental Factors Under Elevated CO<sub>2</sub> Concentration. *Biotechnol Lett.* 28:987–992.
- Isnansetyo, A. Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytopankton dan Zooplankton Pakan Alami 2 untuk Pembenihan Organisme Laut. Yogyakarta: Kanisius.
- Jati, F. J. Hutabarat, dan V.E. Herawati. 2012. Pengaruh Penggunaan Dua Jenis Media Kultur Teknis yang Berbeda Terhadap Pola Pertumbuhan, Kandungan Protein dan Asam Lemak Omega 3 EPA (*Chaetoceros gracilis*). *Journal of Aquaculture Management and Technology.* 1 (1): 221-235.
- Kawaroe, M., Prartono, T., Sannuddin, A., Sari, D. W., & Augustine, D. (2010). Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar. Bogor: IPB Press.
- Minnesota Pollution Control Agency. 2008. Nutrients: Phosphorus, Nitrogen Sources, Impact on Water Quality – A General Overview. *Water Quality/Impaired Water* 3 (22): 1-2.
- Munandar, B. 2014. Pengukuran Konsentrasi Fosfat Terlarut. Jurusan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sheehan, J, Dunahay, T, Beneman, J, Rosseler, P. 1998. A Look Book at The U.S. Departement Of Energy’s Aquatic Species Program – Biodiesel of Algae. The National Renewable Energy Laboratory, A National Laboratory of The U.S. Departement of Energy.
- Sudarmadji, S, Haryano, & B, Suhardi. 1997. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Yogyakarta. Liberty.
- Tjahjo W, Lydia Erawati dan Hanung S. 2002. Budidaya Phytoplankton & Zooplankton. Balai Budidaya Laut Lampung. Lampung.
- Widianingsih, Hartati, R, Endrawati, H, Yudiati, E, Iriani, V.R. 2011. Pengaruh Pengurangan Konsentrasi Nutrien Fosfat dan Nitrat Terhadap Kandungan Lipid Total *Nannochloropsis oculata*. *Ilmu Kelautan* 16 (1): 24-29.