

## BAB 5

### PEMBAHASAN DAN PENDAPAT

#### 5.1. Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp.

Mikroalga kelompok Chlorophyceae seperti *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. memiliki kemampuan fotosintesis dan menghasilkan berbagai senyawa organik, salah satunya adalah lipid. *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. tumbuh baik di wilayah perairan seperti air tawar maupun air laut dan pada tempat-tempat lembab lainnya. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh cahaya, suhu, pH, jumlah O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub>, dan nutrien-nutrien tertentu seperti nitrogen, fosfor, dan kalium.

Kultur mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. berasal dari Sinar Mas Culture Collection (SMCC) yang kemudian diperbanyak di laboratorium bioteknologi di PT SMART Tbk menggunakan media Bold Basal (BBM) yang mengandung makronutrien dan mikronutrien untuk pertumbuhan mikroalga. Makronutrien tersebut diantaranya adalah unsur N, P, K, Na, Mg, dan Ca. Sedangkan mikronutrien diantaranya adalah Fe, Mn, Zn, Co, dan lain sebagainya. Tingkat pH pada media diatur hingga mencapai pH 6,7-7,0 agar sesuai dengan pertumbuhan mikroalga.

*Palm Oil Mill Effluent* (POME) yang diambil dari pengolahan kelapa sawit Sungai Buaya Mill (SBYM) ini adalah produk samping dari proses pengolahan minyak kelapa sawit yang mengandung unsur-unsur yang sangat mirip dengan media standar BBM. Unsur-unsur tersebut diantaranya adalah makronutrien N, P, K, Na, Mg, dan Ca dan juga mikronutrien Fe, Mn, Zn, dan lain-lain yang membuat POME berpotensi untuk menjadi media alternatif penumbuh mikroalga. POME memiliki pH rendah, sehingga perlu dilakukan penyesuaian pH agar sesuai untuk pertumbuhan mikroalga. Penyesuaian pH ini dilakukan dengan penambahan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dengan konsentrasi 3M secara perlahan menggunakan pipet hingga pH mencapai 6,7-7,0.

Berdasarkan Coronado-Reyes et al., (2022), dalam proses kultivasi mikroalga, jumlah O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> di dalam larutan harus selalu diperhatikan. Pada saat sel mikroalga bertambah, kandungan oksigen di dalam larutan akan berkurang secara kontinu. Oleh karena itu, digunakan sistem aerasi agar kadar O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> tetap terkondisi dan terjaga. Untuk menjaga kebersihan udara yang masuk dan menghindari terjadinya kontaminasi

dari udara, digunakan filter steril pada ujung-ujung selang agar udara yang masuk tetap steril dan digunakan kapas untuk menyangga selang agar tetap terpasang dengan baik pada botol. Kultur mikroalga yang tumbuh dengan baik ditandai dengan warna hijau yang semakin pekat serta pertumbuhannya tidak terkontaminasi bakteri maupun jamur (**Gambar 5. 1**). Kultur mikroalga yang didominasi oleh kontaminan bakteri ditandai oleh adanya buih pada kultur, sementara kultur yang terkontaminasi jamur akan ditumbuhi hifa jamur di permukaan larutan atau berbentuk bulat di dalam larutannya.



**Gambar 5. 1.** Mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang Telah Dikultivasi Selama 14 Hari

## 5.2. Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. Pada Media *Bold Basal Medium* (BBM) dan *Raw POME 10%* (RP10)

Mikroalga yang telah siap diperbanyak berasal dari kultur induk yang memiliki kerapatan sel setidaknya  $1 \times 10^6$  sel/mL dan diinokulasikan sebanyak 20% dari volume total larutan. Kultur induk *Chlorella* sp. yang digunakan pada penelitian memiliki kerapatan sel  $5,85 \times 10^6$  sel/mL, sedangkan kultur induk *Chlorococcum* sp. yang digunakan memiliki kerapatan sel  $5,60 \times 10^6$  sel/mL. Masing-masing mikroalga diinokulasi sebanyak 200 mL ke dalam 800 mL media sehingga volume total larutan ketika dikultivasi adalah 1000 mL atau 1 L. Kemudian kultur dikultivasi di bawah cahaya lampu dengan intensitas 2500 lux selama 14 hari. 14 hari adalah waktu yang diperlukan

oleh *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. untuk mencapai fase stasioner. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke 0, 8, 9, 10, 11, dan 14 untuk dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer.

Hasil perhitungan sel masing-masing mikroalga digunakan untuk mengetahui tingkat pertumbuhan mikroalga serta perbandingan antara kedua media yang digunakan. Jumlah sel mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang terdapat pada masing-masing kultur pada hari ke-0, yaitu pada hari ketika kultur baru diinokulasi ke dalam media BBM dan RP10 adalah  $0,06 \times 10^7$ ;  $0,09 \times 10^7$ ;  $0,13 \times 10^7$ ; dan  $0,23 \times 10^7$  sel/mL. Kemudian sel di dalam kultur terus bertambah hingga pada hari ke-14 masing-masing jumlah selnya menjadi  $0,56 \times 10^7$ ;  $2,68 \times 10^7$ ;  $1,08 \times 10^7$ ; dan  $1,83 \times 10^7$  sel/mL. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa ada perbedaan secara signifikan pada jumlah sel mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10 dan berdasarkan uji lanjut Duncan diperoleh bahwa hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan *Chlorella* RP10. Hasil ini menunjukkan potensi raw POME sebagai media pertumbuhan mikroalga yang lebih baik.

Jumlah sel mikroalga yang tumbuh pada media RP10 lebih banyak dibandingkan dengan media BBM. Hal yang sama juga terjadi pada kultur *Chlorococcum* sp. Jumlah sel yang ditumbuhkan pada media RP10 mengalami kenaikan yang cepat seiring berjalannya waktu. Namun, pada mikroalga yang ditumbuhkan pada media BBM pertumbuhan selnya lebih lambat. Kecepatan sel mikroalga-mikroalga tersebut dapat dilihat melalui hasil perhitungan tingkat pertumbuhan spesifik dan *doubling time* (dt).

*Chlorella* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM memiliki rata-rata tingkat pertumbuhan spesifik 0,21 sel/hari, sedangkan *Chlorella* sp. yang ditumbuhkan pada media RP10 memiliki rata-rata tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi, yaitu 0,56 sel/hari. Oleh karena itu, *Chlorella* sp. yang ditumbuhkan pada media RP10 membutuhkan waktu lebih cepat untuk menggandakan sel, yaitu 1,26 hari. *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM memiliki rata-rata tingkat pertumbuhan 0,05 sel/hari, sedangkan pada media RP10 memiliki rata-rata tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi, yaitu 0,44 sel/hari. Oleh karena itu, *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media RP10 membutuhkan waktu lebih cepat untuk menggandakan sel, yaitu 1,58 hari. Hasil analisis sidik ragam data dan uji lanjut menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa

terdapat perbedaan yang signifikan terhadap tingkat pertumbuhan antara *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10. Tingkat pertumbuhan pada media RP10 lebih baik dibandingkan dengan tingkat pertumbuhan pada media BBM. Hasil pengamatan dan perhitungan di atas menunjukkan bahwa bahwa *Raw* POME yang berasal dari SBYM memiliki potensi untuk menjadi media tumbuh mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang lebih baik dibandingkan dengan media BBM.

### 5.3. Pemanenan Biomassa Mikroalga

Kultur mikroalga yang sudah dikultivasi selama 14 hari dan tumbuh dengan baik ditandai dengan warna kultur hijau pekat yang menunjukkan telah bertambahnya sel di dalam larutan. Kultur mikroalga yang telah mencapai fase stasioner di hari ke-14 dipanen biomasanya menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 9500 rpm selama 10-15 menit. Sel-sel mikroalga akan mengendap di bagian bawah tabung, sementara supernatan yang merupakan sisa larutan media dibuang. Sel-sel mikroalga yang sudah dipanen dari 1 l kultu kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* selama  $\pm 1 \times 24$  jam hingga biomasanya benar-benar kering. Biomassa yang sudah kering dan benar-benar terbebas dari cairan ditimbang bobot keringnya. Bobot biomassa kering yang diperoleh dari *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10 masing-masing sebesar 0,4838 g dan 0,9554 g. Sedangkan pada *Chlorella* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10 masing-masing sebesar 0,5031 g dan 0,8465 g.

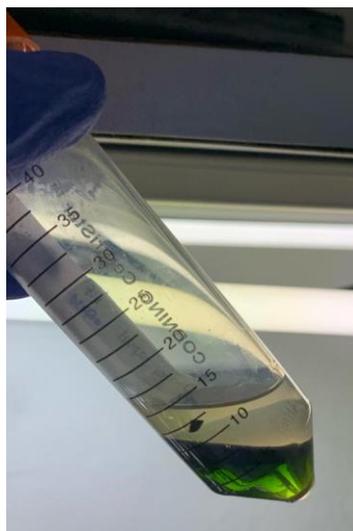
Hasil analisis sidik ragam data dan uji lanjut menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan terhadap bobot biomassa kering antara *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10. bobot biomassa pada media RP10 lebih besar dibandingkan dengan bobot biomassa kering pada media BBM. Namun, tidak ada perbedaan bobot biomassa kering yang signifikan diantara kedua jenis mikroalga tersebut.

### 5.4. Bobot Lipid, Produktivitas Lipid, Serta Rendemen Lipid Total Mikroalga

Biomassa kering mikroalga yang diperoleh dari hasil pemanenan diekstraksi menggunakan metode Bligh & Dyer (1959). Menurut Bligh & Dyer (1959) metode ini menggunakan prinsip pemisahan berdasarkan polaritas senyawa menggunakan campuran

larutan metanol-kloroform dan gravimetri. Campuran kloroform dan metanol telah banyak digunakan untuk mengekstrak dan menganalisis lipid. Ekstraksi lipid secara optimal dihasilkan dari jaringan sel yang dihomogenisasi oleh campuran kloroform dan metanol yang bila dicampurkan dengan air akan menghasilkan larutan monofasik. Campuran tersebut kemudian diencerkan dengan air dan/atau kloroform akan menghasilkan sistem bifasik, pada lapisan kloroform akan mengandung lipid dan metanol-air akan mengandung senyawa/zat non lipid. Ekstrak lipid kemudian dapat terpurifikasi ketika lapisan kloroform diisolasi dan diuapkan kloroformnya. Lipid yang terkandung di dalam mikroalga tersimpan di dalam membran sel dan kloroplas. Ketika biomassa kering mikroalga yang telah dicampurkan pelarut metanol-kloroform divortex, sel-sel mikroalga akan hancur sehingga lipid yang terikat dan bersifat nonpolar akan terlarut ke dalam larutan kloroform, sementara zat-zat lain yang bersifat polar akan terlarut di dalam larutan metanol. Tahap maserasi dilakukan agar lipid terekstraksi dengan sempurna. Terlarutnya lipid ke dalam larutan kloroform ditandai dengan lapisan bawah larutan yang berubah menjadi kuning atau hijau.

Setelah melalui proses maserasi selama 24 jam, ditambahkan akuades yang bertujuan untuk meningkatkan polaritas larutan dan menyempurnakan pemisahan (Saini et al., 2021). Larutan kembali divortex kemudian disentrifuse untuk memisahkan antara lapisan lipid-kloroform, biomassa, dan metanol-air. Lapisan lipid-kloroform akan berada di lapisan paling bawah dan dipisahkan secara perlahan menggunakan *syringe* ke wadah yang baru. Lipid terlarut di dalam larutan kloroform, sehingga perlu dilakukan penguapan agar pelarut kloroform teruapkan dan menyisakan lapisan lipid saja. Lipid yang terekstraksi dari mikroalga akan memiliki berwarna hijau oleh zat klorofil yang berasal dari mikroalga itu sendiri (**Gambar 5. 2**).



**Gambar 5. 2.** Lapisan Yang Terbentuk Pada Tahap Ekstraksi Lipid

Bobot lipid yang dihasilkan dari mikroalga yang ditumbuhkan pada media RP10 lebih tinggi dibandingkan dengan bobot lipid yang ditumbuhkan pada media standar BBM. Bobot lipid pada mikroalga *Chlorella* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10 masing-masing adalah 0,0443 g dan 0,2163 g. Sedangkan pada mikroalga *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10 masing-masing adalah 0,0509 g dan 0,2226 g. Melalui hasil bobot lipid yang diperoleh, dapat dihitung tingkat produktivitas lipid dan Rendemen Lipid total yang terdapat dalam mikroalga. *Chlorella* sp. pada perlakuan RP10 memiliki tingkat produktivitas lipid yang lebih tinggi, yaitu 3,0291 mg/L/hari dengan Rendemen Lipid total 26% jika dibandingkan dengan perlakuan standar BBM yaitu 0,6211 mg/L/hari dengan Rendemen Lipid total 9%. Hal serupa juga terjadi pada *Chlorococcum* sp. pada perlakuan RP10 yang memiliki produktivitas lipid lebih tinggi, yaitu 3,1173 mg/L/hari dengan Rendemen Lipid total 24% jika dibandingkan dengan perlakuan standar BBM yaitu 0,7135 mg/L/hari dengan Rendemen Lipid total 11%.

Hasil analisis sidik ragam data dan uji lanjut menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan terhadap bobot lipid, produktivitas, dan Rendemen Lipid total antara *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. yang ditumbuhkan pada media BBM dan RP10. Hasil pada media RP10 lebih baik dibandingkan dengan hasil pada media BBM. Namun, tidak ada perbedaan yang

signifikan diantara kedua jenis mikroalga tersebut. Hasil pengamatan dan perhitungan di atas menunjukkan bahwa bahwa *Raw* POME yang berasal dari SBYM memiliki potensi untuk menjadi media tumbuh mikroalga *Chlorella* sp. dan *Chlorococcum* sp. sebagai penghasil lipid yang lebih baik dibandingkan dengan media BBM.