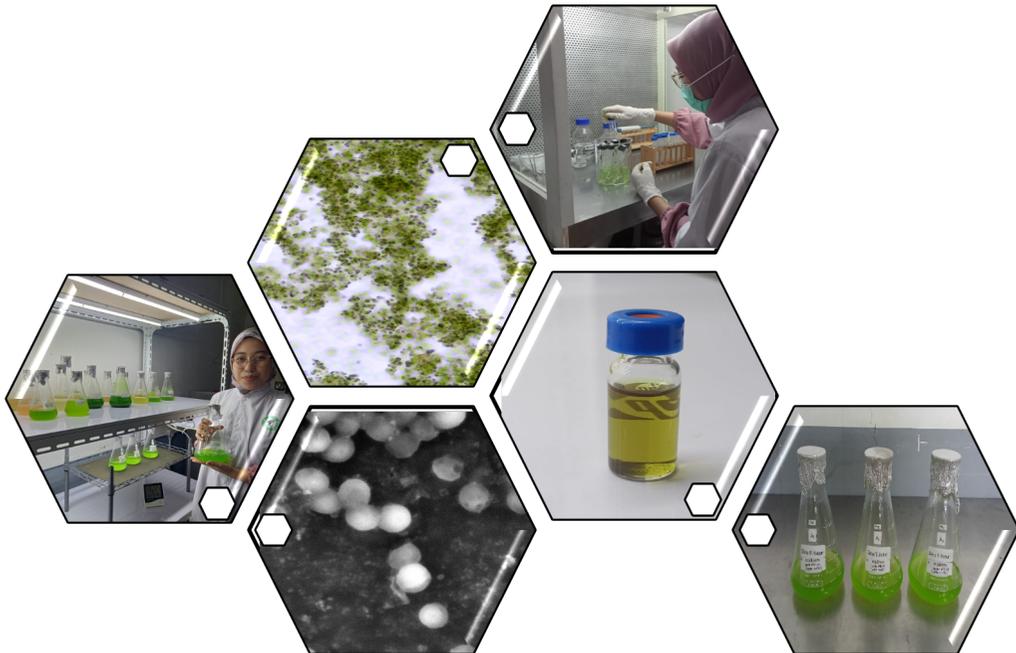


**EVALUASI MIKROALGA TERMOFILIK *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1
SEBAGAI BAHAN BAKU BIODIESEL**

**EVALUATION OF THERMOPHILIC MICROALGAE *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1
AS BIODIESEL FEEDSTOCKS**



**NUR ZAKIYAH RAMADANI
L012221036**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUASI MIKROALGA *TERMOFILIK* *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1
SEBAGAI BAHAN BAKU BIODIESEL**

Nur Zakiyah Ramadani

L012221036



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUASI MIKROALGA *TERMOFILIK Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 SEBAGAI
BAHAN BAKU BIODIESEL**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi Magister Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh

NUR ZAKIYAH RAMADANI
L012221036

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

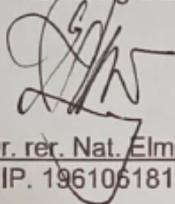
EVALUASI MIKROALGA *TERMOFILIK Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 SEBAGAI
BAHAN BAKU BIODIESELNUR ZAKIYAH RAMADANI
L012221036Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada tanggal 14 Oktober
2024 dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Pada

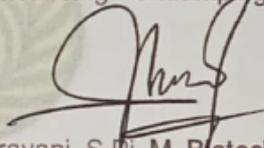
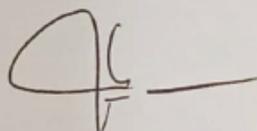
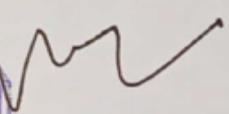
Program Studi Magister Ilmu Perikanan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan
Universitas Hasanuddin
Makasar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama

Dr. rer. Nat. Elmi Nurhaidah Zainuddin, DES.
NIP. 196106181988032001

Pembimbing Pendamping

Indrayani, S.Pi. M. Botech. Stu., Ph.D.
NIP. 197412232001122001Ketua Program Studi
Magister Ilmu Perikanan,Dr. Ir. Badraeni, M.P.
NIP. 196510231991032001Dekan Fakultas Ilmu Kelautan dan
Perikanan, Universitas Hasanuddin
Prof. Safuddin, S.Pi., MP., Ph.D.
NIP. 197506112003121003

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "**Evaluasi Mikroalga *Termofilik Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 Sebagai Bahan Baku Biodiesel**" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr. rer. Nat. Elmi Nurhaidah Zainuddin, DES. sebagai Pembimbing Utama dan Indrayani, S.Pi. M. Biotech, Stu., Ph.D. sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. **Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Biodiversitas Volume 25, halaman 3339-3349 Tahun 2024 Doi: 10.13057/biodiv/d250956 sebagai artikel dengan judul "Evaluation of a newly isolated thermophilic microalga *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 as biodisel feedstocks".** Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.



Makassar, 14 Oktober 2024

NUR ZAKIYAH RAMADANI
NIM. L012221036

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT berkat, rahmat taufik, hidayah dan nikmat yang telah diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul "**Evaluasi Mikroalga *Termofilik Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 Sebagai Bahan Baku Biodiesel**" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister pada Program Studi Ilmu Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada baginda Rasulullah SAW beserta keluarga dan para sahabat-sahabat yang senantiasa mendoakan kita semua dalam kebaikan. Penulis menyadari bahwa dalam proses penulisan Skripsi ini banyak mengalami kendala, namun berkat bantuan, bimbingan, kerjasama dari berbagai pihak dan berkah dari Allah SWT sehingga kendala-kendala yang dihadapi tersebut dapat diatasi. Oleh karena itu, sudah sepantasnya penulis dengan penuh hormat mengucapkan terima kasih dan mendoakan semoga balasan terbaik kepada :

1. Dr. rer. Nat. Elmi Nurhaidah Zainuddin, DES. Selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan masukan, saran, motivasi dan bimbingan kepada penulis dalam Menyusun tesis ini.
2. Indrayani S.Pi., M. Biotech. Stu.Ph.D selaku Pembimbing pendamping yang telah memberikan arahan, bimbingan dan bantuan yang sangat luar biasa kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
3. Dr. Ir. Badraeni, M.P. Ir. Muhammad Iqbal Djawad, M,Sc., Ph.D. dan Dr. Ir. Hasni Yulianti Aziz, M.P selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini.
4. Dr. Ir. Badraeni, MP selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Perikanan yang telah memberikan banyak bantuan sejak penulisan proposal hingga penyelesaian tesis ini.
5. Prof. Safruddin, S.Pi., MP., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan
6. Kedua Orang tua saya yakni Ibunda Masnah dan Ayahanda Alm. Tahang yang telah banyak berkorban untuk penulis, yang senantiasa memotivasi, mendoakan penulis dalam menggapai mimpi-mimpi dan dicita-cita penulis.
7. Alm. Bapak Sultan, terima kasih telah mengantarkan saya sampai sekarang ini, walaupun tidak bisa mengantarkan saya sampai wisuda tapi saya ikhlas maafkan saya karena tidak menyelesaikan studi sebelum Bapak Kembali kepangkuan Allah SWT, hanya doa dan salam rindu yang bisa kupanjatkan untuk mu, tenang dan Bahagia disana, aku disini akan berusaha ikhlas dan tegar.
8. Bapak Dr. H. Ruslan M.Pd dan Ibu Prof. Hj. Lu'mu Taris selaku orang tua saya selama saya sekolah di Makassar yang senantiasa memberikan dukungan, motivasi dan kasih sayang yang tidak pernah putus.
9. Bunda Dra. A. Wahidah, Tante Rappe kakak Hamrah, A.Md.Aud., S.Pd, Hasnaeni dan Tasnia senantiasa mendoakan dan menyemangati serta keluarga besar yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang senantiasa melimpahkan doanya.
10. Sriwahyufita S.P, Kakak Asrina Awaliyah, S.Pd dan Kakak Muhammad Ridwan S.Ds, yang telah menjadi saudara tempat bertukar pikiran dan saling menolong satu sama lain.

11. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Program magister Ilmu Perikanan Fakultas ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.
12. Teman dan sahabat dekat yang setia memberikan semangat dan motivasi dan dukungan kepada penulis.
13. Fiah, aura, alya, ifa, desy dan tasya yang telah membantu dalam proses penelitian dan pengamatan dilaboratorium.
14. Kepada sahabat seperjuangan saya Tikawati, S.Pi., M.Si, Tuty Taskiyah Mustari, S.Pi., M.Si, dan Nur Asmi Kama, S.Pi., M.Si, yang senantiasa memberikan motivasi, saran dan dukungan yang tak ternilai dalam penyusunan naskah ini.
15. Kawan-kawan seperjuangan Satu angkatan Magister Ilmu Perikanan Angkatan 2022 yang selalu menyemangati, memberikan uluran tangan selama penulis berjuang menyelesaikan program magister ini.
16. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini hingga selesai.

Semoga semua kebaikan yang telah diberikan oleh Bapak dan Ibu serta semua pihak yang telah membantu dalam Penyusunan tesis ini, penulis mendoakan semoga mendapat balasan yang berlipat ganda dan menjadi amal sholeh dihadapan Allah SWT dan semoga apa yang telah ditulis oleh penulis dapat memberikan manfaat bagi kita semua. Akhir kata dengan sagala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan kritik yang sifatnya membangun demi kesempurnaan tesis ini. Amiin Ya Rabbal Alamin.

Makassar, 14 Oktober 2024

Nur Zakiyah Ramadani

ABSTRAK

NUR ZAKIYAH RAMADANI. **Evaluasi Mikroalga Termofilik *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 Sebagai Bahan Baku Biodiesel** (Dibimbing oleh Elmi Nurhaidah Zainuddin dan Indrayani)

Latar Belakang. Mikroalga mengandung lipid dan asam lemak yang dapat digunakan sebagai energi alternatif biodiesel. Upaya peningkatan produktivitas lipid pada mikroalga dapat dilakukan dengan mengkondisikan mikroalga pada kondisi stres tertentu. Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang dapat merangsang produksi lipid pada mikroalga. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh perbedaan suhu terhadap pertumbuhan, biomassa, produktivitas lipid dan komposisi asam lemak mikroalga *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 dan mengevaluasi potensi mikroalga sebagai bahan baku biodiesel. **Metode.** Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental dengan rancangan acak lengkap yang terdiri dari 3 jenis perlakuan yakni Suhu Ruang Kultur 25-28°C, suhu ruang kamar 30-35°C dan suhu ruang pengering 38-48°C, dengan masing-masing 3 ulangan sehingga diperoleh 9 unit percobaan dimana *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 awalnya dikultur pada tiga kondisi suhu yang berbeda yaitu suhu ruang kultur (25-26°C), suhu ruang sekitar (28-32°C) dan suhu ruang pengering (32-48°C) (fase I). Pada fase II, kultur dipindahkan ke kondisi suhu yang lebih rendah dan diinkubasi selama 3 hari. Parameter yang diukur adalah kepadatan sel, laju pertumbuhan spesifik, produktivitas biomassa, kandungan lipid, produktivitas lipid dan komposisi asam lemak. **Hasil.** Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua perlakuan dapat tumbuh pada semua kondisi perlakuan yang diujikan. Laju pertumbuhan spesifik dan produktivitas biomassa tertinggi dicapai pada perlakuan suhu ruang pengering sebesar 0,790 hari⁻¹ dan 0,166 gL⁻¹.d⁻¹, masing-masing. Produktivitas lipid tertinggi (0,0674 gL⁻¹.d⁻¹) diperoleh pada suhu ruang kultur. Setelah perubahan suhu, hasil lipid, kandungan lipid dan produktivitas lipid semua perlakuan meningkat. Analisis asam lemak menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 terdiri dari asam palmitat, asam linolenat, dan asam linoleat. **Kesimpulan.** Berdasarkan pertumbuhan, biomassa, komposisi lipid dan asam lemak, maka *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 berpotensi sebagai bahan baku biodiesel.

Kata kunci: Bahan Baku Biodiesel, *Chlorella sorokiniana*, Asam Lemak, Lipid, *Termofilik*

ABSTRACT

NUR ZAKIYAH RAMADANI. **Evaluation of Thermophilic Microalgae *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 as Biodiesel Feedstocks** (Supervised by Elmi Nurhaidah Zainuddin and Indrayani)

Background. Microalgae contain lipids and fatty acids that can be used as alternative energy for biodiesel. Efforts to increase lipid productivity in microalgae can be done by conditioning the microalgae in certain stress conditions. Temperature is one of the environmental factors that can stimulate lipid production in microalgae. **Objectives.** This study aims to analyze the effect of temperature differences on the growth, biomass, lipid productivity and fatty acid composition of microalgae *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 and evaluate the potential of microalgae as biodiesel raw materials. **Methods.** The method used in this study was an experimental method with a completely randomized design consisting of 3 types of treatments, namely Culture Room Temperature 25-28°C, room temperature 30-35°C and drying room temperature 38-48°C, with 3 replications each so that 9 experimental units were obtained where *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 was initially cultured at three different temperature conditions, namely culture room temperature (25-26°C), ambient room temperature (28-32°C) and drying room temperature (32-48°C) (phase I). In phase II, the culture was transferred to a lower temperature condition and incubated for 3 days. The parameters measured were cell density, specific growth rate, biomass productivity, lipid content, lipid productivity and fatty acid composition. **Results.** The results showed that all treatments could grow in all treatment conditions tested. The highest specific growth rate and biomass productivity were achieved at room temperature of 0.790 day⁻¹ and 0.166 gL⁻¹.d⁻¹, respectively. The highest lipid productivity (0.0674 gL⁻¹.d⁻¹) was obtained at room temperature. After the temperature change, the lipid yield, lipid content and lipid productivity of all treatments increased. Fatty acid analysis showed that the microalgae *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 consisted of palmitic acid, linolenic acid, and linoleic acid. **Conclusion.** Based on growth, biomass, lipid and fatty acid composition, *Chlorella sorokiniana* UNM-IND1 has the potential as a raw material for biodiesel.

Keywords: Biodiesel Raw Material, *Chlorella sorokiniana*, Fatty Acid, Lipids, Thermophilic

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PELIMPAHAN KEASLIAN TESIS	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Kerangka Pikir.....	4
1.6 Kajian Teori.....	5
BAB II METODE PENELITIAN	17
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
2.2 Alat dan Bahan	17
2.3 Prosedur Penelitian.....	18
2.4 Desain Penelitian	22
2.5 Parameter Pengamatan.....	22
2.6 Skema Prosedur Penelitian	25
2.7 Teknik Analisis Data.....	26
BAB III HASIL	27
3.1 Identifikasi Molekuler Mikroalga.....	27
3.2 Suhu.....	29
3.3 Kepadatan sel mikroalga <i>C. sorokiniana</i> UNM-IND1	30
3.4 Laju Pertumbuhan Spesifik (<i>Specific Growth Rate</i>).....	32
3.5 Biomassa	33
3.6 Produktivitas Biomassa.....	33
3.7 Lipid.....	34

3.8	Asam Lemak Mikroalga Isolate UNM IND-01	38
BAB IV PEMBAHASAN	40
4.1	Identifikasi Molekuler Mikroalga	40
4.2	Suhu.....	40
4.3	Pertumbuhan sel mikroalga isolate UNM IND-01	42
4.4	Laju Pertumbuhan Spesifik (<i>Specific Growth Rate</i>)	43
4.5	Biomassa	44
4.6	Produktivitas Biomassa.....	45
4.7	Lipid.....	47
4.8	Asam Lemak Mikroalga Isolate UNM IND-01	48
BAB V PENUTUP	50
5.1	Kesimpulan	50
5.2	Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Komposisi Kimia alga dalam persen berat kering.....	9
2.	Kandungan minyak pada beberapa mikroalga	12
3.	Nama dan fungsi alat yang digunakan pada penelitian	17
4.	Nama dan fungsi Bahan yang digunakan pada penelitian	18
5.	Desain Rancangan Percobaan Perbedaan Suhu.....	22
6.	Komposisi Asam Lemak Mikroalga Isolate UNM IND-01	38

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Kerangka Pikir Penelitian	6
2.	Kurva pertumbuhan mikroalga	8
3.	Prosedur Penelitian	25
4.	Mikroalga isolate UNM-IND1 dilihat pada Mikroskop dan SEM.....	27
5.	Elektroforegram produk PCR mikroalga Isolate UNM IND-01.....	28
6.	Urutan Basa Nukleotida Mikroalga Isolate UNM IND-01 Hasil Sekuensing ..	28
7.	Pohon filogenetik Mikroalga isolate UNM IND-01.....	29
8.	Pengamatan suhu pada ruang kultivasi.....	30
9.	Kurva pertumbuhan mikroalga isolat UNM-IND 01 yang dikultur pada suhu yang berbeda.....	30
10.	Perbedaan warna kultur	32
11.	Laju pertumbuhan spesifik (SGR) Mikroalga Isolate UNM-IND 01 pada suhu yang berbeda.....	32
12.	Biomass mikroalga isolat UNM-IND 01 pada suhu kultur yang berbeda.....	33
13.	Produktivitas Biomassa mikroalga isolate UNM-IND 01	34
14.	Lipid Yield mikroalga isolate UNM-IND 01.....	35
15.	<i>Lipid Content</i> mikroalga isolate UNM-IND 01	36
16.	Produktivitas Lipid Mikroalga Isolate UNM-IND 01.....	37
17.	Hasil Analisis <i>Chromatography-Mass Spectrofotometry</i> (GC-MS) pada minyak mikroalga Isolate UNM IND-01.....	38
18.	Perbedaan warna kultur hari ke-3	43
19.	Minyak Mikroalga Hasil ekstraksi.....	48

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Pengamatan Kepadatan Sel Mikroalga UNM IND-01	57
2.	Pengamatan Laju Pertumbuhan Spesifik (SGR) Mikroalga UNM IND-01	57
3.	Pengamatan Biomassa dan Lipid Mikroalga UNM IND-01	58
4.	Pengamatan Produktivitas Biomassa dan Mikroalga UNM IND-01	59
5.	Pengamatan Produktivitas Lipid Mikroalga UNM IND-01	60
6.	Laju Pertumbuhan Spesifik-One Way Analysis of Variance	61
7.	Biomass Eksponensial fase-One Way Analysis of Variance	61
8.	Biomass Fase Stasioner-One Way Analysis of Variance	62
9.	Produktivitas Biomassa-One Way Analysis of Variance	62
10.	Produktivitas Lipid Fase I-One Way Analysis of Variance	63
11.	Produktivitas Lipid Fase II (H1)-One Way Analysis of Variance	63
12.	Produktivitas Lipid Fase II (H2)-One Way Analysis of Variance	64
13.	Produktivitas Lipid Fase II (H3)-One Way Analysis of Variance	64
14.	Uji GC-MS Komposisi Asam Lemak Mikroalga Isolate UNM IND-01	66
15.	Dokumentasi Kegiatan	68

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini, dunia dihadapkan pada dua krisis yakni ketersediaan minyak bumi yang semakin hari semakin menipis, seiring bertambahnya jumlah penduduk dengan meningkatnya kebutuhan energi diperkirakan cadangan minyak konvensional akan habis. Selain itu penggunaan bahan bakar fosil sebagai sumber energi utama dalam satu abad terakhir telah menimbulkan banyak konsekuensi negatif yakni terjadinya penurunan kualitas lingkungan. Oleh karena itu, ada kebutuhan mendesak untuk mengembangkan sumber energi alternatif untuk mengatasi mitigasi krisis energi yang akan terjadi dengan membuat regulasi tentang pengembangan energi alternatif yang berkelanjutan dan menjanjikan (Makareviciene & Sendzikiene, 2022).

Salah satu bahan bakar alternatif yang berpotensi untuk mengatasi permasalahan bahan bakar fosil adalah biodiesel (Fuad Hossain *et al.*, 2020). Biodiesel merupakan bahan bakar dari minyak nabati dan lemak hewani yang memiliki karakteristik hampir mirip dengan solar sehingga menjadi alternatif untuk bahan bakar diesel (Abbaszaadeh, 2012). Menurut Yeong Hwang *et al.* (2021) biodiesel berkembang karena adanya potensi besar terhadap penerapannya dalam bidang industri, selain lebih efisien, mudah didapatkan, biodiesel juga ramah lingkungan dikarenakan menghasilkan lebih sedikit emisi CO₂, CO, SO₂, karbon, dan hidro karbon dibandingkan bahan bakar diesel dari fraksi minyak bumi, biodiesel tidak memperparah efek rumah kaca karena rantai karbon yang terlibat dalam siklus merupakan rantai karbon yang pendek, hal ini dikarenakan sifat biodiesel yang merupakan bahan bakar yang dapat diperbaharui dan mudah terdegradasi oleh alam. (Pruvost *et al.*, 2018)

Mikroalga saat ini mendapat banyak perhatian sebagai sumber energi alternatif yang potensial. Dibandingkan dengan bahan baku lainnya, mikroalga dikenal sebagai salah satu sumber utama penghasil bahan baku biodiesel untuk energi terbarukan karena kaya akan kandungan minyak. Menurut Chisti (2007), mikroalga dengan kandungan lipid 70% mampu menghasilkan minyak nabati 136.400 L/Ha. Sedangkan kelapa sawit hanya menghasilkan minyak sebanyak 5.950 L/Ha. Selain itu mikroalga dapat dipanen kapan saja sepanjang tahun karena mikroalga mempunyai kelebihan dari pada tumbuhan tingkat tinggi, yaitu mudah untuk dikembangbiakan, mudah beradaptasi dan tidak membutuhkan lahan yang luas, karena sel mikroalga mampu tumbuh dengan cepat sehingga biomassa selnya dapat dipanen dalam waktu singkat yakni 7-10 hari. Salah satu cara yang dilakukan untuk membudidayakan mikroalga dalam jumlah besar dapat dilakukan dengan cara kultivasi. Teknik kultivasi mikroalga dibagi menjadi tiga tahap yaitu skala laboratorium (*indoor*), skala semi-massal (*semi-outdoor*) dan skala massal (*outdoor*) (Gultom, 2018).

Di Indonesia, pengembangan mikroalga sebagai sumber bahan bakar terbarukan terus dilakukan diantaranya dilakukan identifikasi jenis-jenis mikroalga yang tumbuh pada daerah-daerah tropis di Indonesia. Berdasarkan beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, dilaporkan bahwa mikroalga dapat dijumpai diberbagai lingkungan perairan, baik air laut, tawar dan asin. Bahkan dapat dijumpai pada kondisi ekstrim (Rajapaksha *et al.*, 2014).

Salah satu lingkungan ekstrim yang dapat menjadi habitat mikroalga adalah sumber air panas. Mikroalga yang mampu hidup pada kondisi tersebut memiliki keunggulan dari organisme lain yakni mampu menghasilkan enzim yang tahan panas serta resistensi terhadap kontaminan (Goecke *et al.*, 2020). Mikroalga termofilik menarik bagi ahli biologi karena asal genetik biologi dan mungkin beberapa spesies ini lebih berharga dari pada galur yang tersedia secara komersial. Saat ini, minat akan mikroalga yang hidup pada sumber air panas semakin meningkat karena beberapa peneliti menyatakan bahwa isolasi keanekaragaman mikroalga dari habitat ini penting untuk memahami peran mikroalga dalam siklus biogeokimia dan untuk menentukan potensi bioteknologinya salah satunya kandungan lipidnya yang tinggi. (Ancona-Canche *et al.*, 2017).

Kandungan lemak (lipid) dan asam lemak (*fatty acid*) yang ada di dalam mikroalga merupakan sumber energi yang dimanfaatkan sebagai bahan baku biodiesel. Dalam lipid mikroalga dapat kita jumpai unsur asam lemak jenuh yang berperan dalam proses pembuatan biodiesel. (Fan *et al.*, 2021). Oleh karena itu, sangat penting untuk menggunakan kondisi kultivasi untuk mencapai kinerja produksi lipid terbaik dari spesies mikroalga.

Menurut (Gultom, 2018) upaya untuk meningkatkan produkstivitas lipid dalam mikroalga, dapat dilakukan dengan cara mengkondisikan mikroalga dalam keadaan stress (tekanan) tertentu. Hal ini disebabkan dalam keadaan stress, mikroalga terstimulasi untuk mensintesis lipid lebih banyak dari keadaan normalnya sebagai bentuk mekanisme mikroalga dalam melakukan perlindungan diri dan adaptasi terhadap kondisi di lingkungan tumbuhnya (Widianingsing, *et al.*, 2011). Salah satu kondisi stress pada mikroalga adalah Perbedaan suhu selama kultivasi sebagai bentuk stress (tekanan) yang diberikan pada mikroalga (Indrayani *et al.*, 2017).

Suhu memiliki pengaruh signifikan terhadap kandungan lipid mikroalga karena dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produktivitas biomassa. Gómez-Loredo *et al.*, (2021) mengungkapkan bahwa suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan laju pertumbuhan mikroalga, seperti *Chlorella sorokiniana* pada suhu 30°C-42°C, tetapi dapat mempengaruhi keseimbangan komposisi sel dan penurunan kualitas biomassa. Namun, penelitian oleh Wijffels *et al.* (2020) menyatakan bahwa suhu yang lebih rendah pada beberapa spesies mikroalga, seperti *Nannochloropsis* pada suhu 15°C-26°C dapat meningkatkan produktivitas biomassa dan kualitas lipid. Suhu kultur yang berbeda juga dapat mempengaruhi komposisi asam lemak dalam biomassa mikroalga.

Suhu merupakan faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap proses metabolisme dan fotosintesis. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Gong *et al.*, (2015) suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Perubahan suhu berpengaruh terhadap proses kimia, biologi dan fisika, peningkatan suhu dapat menurunkan kelarutan bahan dan dapat menyebabkan peningkatan kecepatan metabolisme dan respirasi mikroalga, peningkatan suhu dapat merangsang aktivitas molekul dan meningkatkan laju difusi serta laju fotosintesis.

Melihat keanekaragaman dan potensi yang dimiliki oleh mikroalga serta belum diketahuinya suhu terbaik dalam pertumbuhan mikroalga yang diisolasi dari sumber air panas yakni mikroalga isolate UNM IND-01 yang menghasilkan kandungan lipid yang

tinggi serta akan dilakukan pengamatan lebih lanjut terhadap pengaruh perbedaan suhu terhadap produksi asam lemak untuk potensi biodieselnnya.

Maka penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu optimal mikroalga yang dikultur pada 3 kondisi suhu yang berbeda yakni suhu ruang kultur 25°C, suhu ruang 30°C dan suhu ruang pengering 38°C dalam memproduksi lipid dan asam lemak serta mengidentifikasi kondisi terbaik untuk pertumbuhan sel dan akumulasi lipid mikroalga isolate UNM IND-01, serta mengevaluasi potensi penggunaan biomassa mikrolaga yang dihasilkan sebagai bahan baku biodiesel.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan Latar belakang diatas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana pertumbuhan mikroalga isolate UNM IND-01 yang dikultivasi pada kondidi suhu kultur yang berbeda?
2. Bagaimana pengaruh perbedaan suhu kultur terhadap produktivitas biomassa mikroalga isolate UNM IND-01?
3. Bagaimana pengaruh perbedaan suhu kultur terhadap produktivitas lipid mikroalga isolate UNM IND-01?
4. Bagaimana komposisi asam lemak mikroalga isolate UNM IND-01 yang potensial untuk pembuatan biodisel?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah :

1. Menganalisis pertumbuhan mikroalga isolate UNM IND-01 yang dikultivasi pada kondisi suhu kultur yang berbeda.
2. Menganalisis pengaruh perbedaan suhu kultur terhadap produktivitas biomassa mikroalga isolate UNM IND-01.
3. Menganalisis pengaruh perbedaan suhu kultur terhadap produktivitas lipid mikroalga isolate UNM IND-01.
4. Menganalisis komposisi asam lemak mikroalga isolate UNM IND-01 yang potensial untuk pembuatan biodisel.

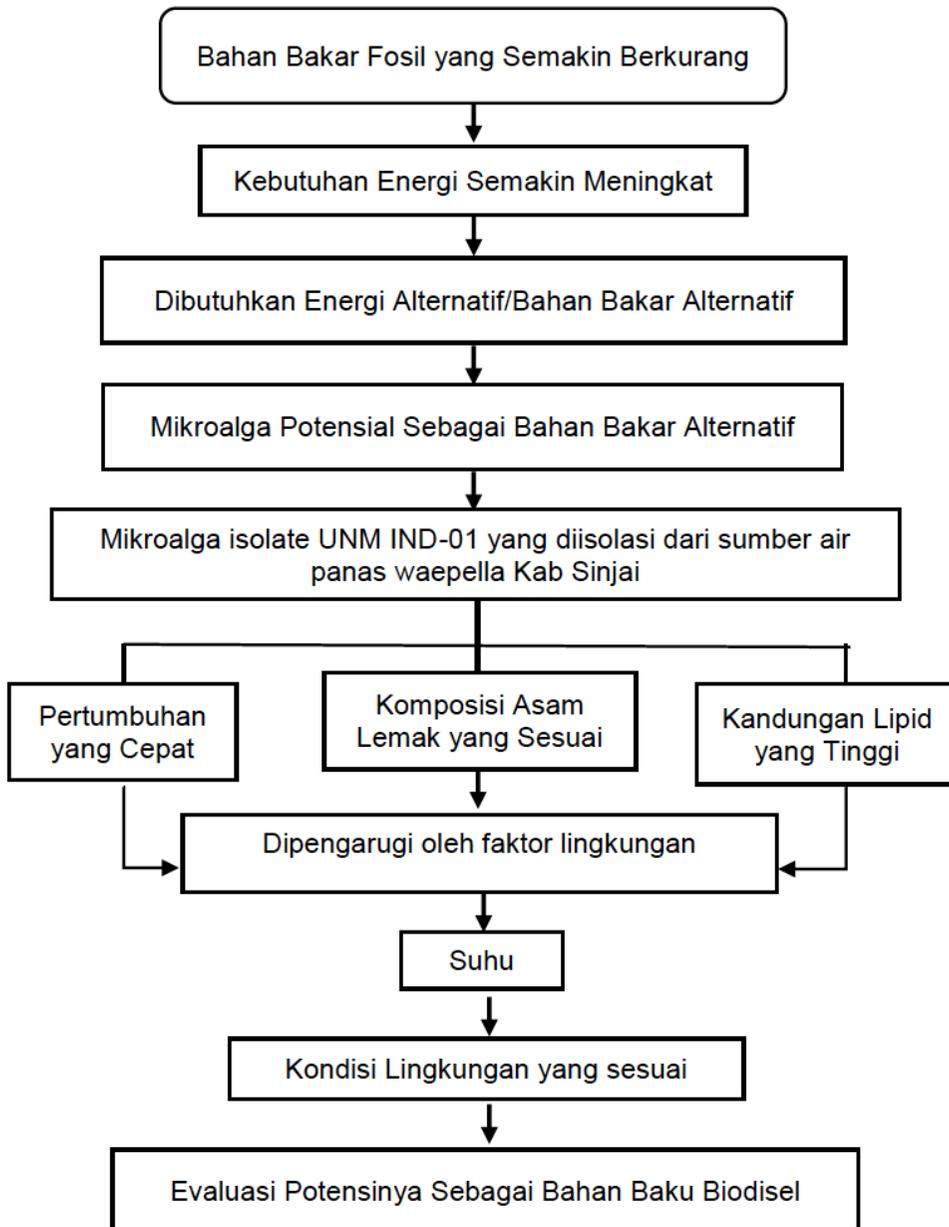
1.4 Manfaat Penelitian

Adapun kegunaan dalam penelitian ini yakni :

1. Memberi wawasan baru bagi penulis dan masyarakat mengenai pemanfaatan mikroalga sebagai alternatif pengganti bahan bakar.
2. Dapat digunakan sebagai referensi atau rujukan dalam pembuatan industri biodiesel dari mikroalga dalam skala besar.
3. Sebagai referensi bagi penulis selanjutnya yang mengkaji dan meneliti tentang pembuatan biodiesel.

1.5 Kerangka Pikir

Secara sistematis kerangka pikir dalam penelitian ini dapat digambarkan pada skema dibawah ini.



Gambar 1.1 Kerangka Pikir Penelitian

1.6 Kajian Teori

1.6.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik prokariotik atau eukariotik yang dapat ditemukan di semua ekosistem baik akuatik maupun terestrial. Mikroalga menjadi salah satu alternatif sumberdaya alam terbarukan yang dapat digunakan untuk produksi biodiesel. Mikroalga menjadi tumbuhan dengan tingkat pertumbuhan tercepat di dunia. Jika dilihat dari kandungan minyaknya maka beberapa spesies mikroalga berpotensi sebagai sumber biodiesel (Tabel 1). dengan bantuan radiasi matahari, mikroalga dapat mengubah karbondioksida menjadi biofuel, makanan, dan zat bioaktif yang bernilai tinggi (Christi, 2007). Produksi biodiesel dengan menggunakan alga sebagai sumber biomasnya ini termasuk sumber biofuel generasi ke-tiga Bersama dengan mikroorganisme lain seperti yeast dan fungi. Mikroalga menjadi salah satu fitoplankton yang paling menarik di bidang bioteknologi kelautan kerana memiliki manfaat yang begitu banyak bagi kehidupan umat manusia. (Rafaelina *et al.*, 2016).

Mikroalga memiliki kemampuan khusus untuk menghasilkan biota sel dalam bentuk murni dan dapat tumbuh dengan baik di daerah dimana tanaman tidak biasa tumbuh. Hasil produk mikroalga sebagian mempunyai sifat ekstraseluler dan berasal dari metabolit antibiotik sederhana hingga kompleks, pigmen, toksin dan beberapa produk lainnya. Selain digunakan untuk bahan makanan dan pertanian, mikroalga memproduksi metana dengan cara melauai proses anaerobic biomasnya, turunan minyak nabatinya menghasilkan biodiesel serta biohydrogen dari proses fotosintesisnya (Baqi *et al.*, 2022).

Mikroalga dapat dijadikan sebagai alternatif pengembangan dan sangat potensial dijadikan sebagai bahan baku biodiesel karena memiliki keuntungan yang tidak dimiliki beberapa jenis tanaman sumber biodiesel lain. Beberapa keuntungan tersebut menurut Gikonyo (2014) adalah sebagai berikut.

- a. Mikroalga memiliki struktur sederhana, tetapi memiliki efisiensi fotosintesis yang tinggi. Mikroalga mampu meningkatkan biomasnya menjadi 2 kali lipat dalam waktu 24 jam.
- b. Mikroalga memiliki ketersediaan dan keberagaman yang tidak dimiliki tanaman penghasil tanaman penghasil minyak yang lain dengan demikian. Adanya hambatan terkait iklim atau kondisi geografis lain dapat diminimalisasi. Mikroalga dapat ditumbuhkan pada lingkungan air tawar, danau air asin dengan eutrofikasi, laut, tanah tepian gurun, bahkan kondisi ekstrem sekali gus.
- c. Mikroalga dapat menggunakan nutrisi yang terkandung dalam air limbah, seperti nitrogen, fosfor dan logam berat.
- d. Mikroalga dapat mengikat CO₂ dalam jumlah besar dalam proses fotosintesis. Mengurangi emisi gas rumah kaca (CO₂ *recycling*)
- e. Produksi dan penggunaan biodiesel dari mikroalga dapat berkontribusi pada kondisi near zero net CO₂ pada atmosfer.
- f. Mikroalga juga memproduksi berbagai produk seperti protein, polisakarida, pigmen, pakan ternak, pupuk dan lain-lain.

Berbagai keuntungan yang dapat diperoleh tersebut menunjukkan bahwa pemanfaatan biomassa mikrolaga sebagai sumber energi dapat menjadi solusi penyediaan energi di masa depan. Namun demikian, tahap komersialisasi atau produksi biomassa mikroalga skala industri masih menghadapi banyak tantangan. Beberapa yang

cukup signifikan adalah tingginya biaya produksi dan efisiensi yang rendah. Dalam rangka mencari jalan keluar atas tantangan tersebut, berbagai penelitian, terutama yang berkaitan dengan peningkatan produksi biomassa dan minyak, serta mengurangi biaya produksi pada proses downstream terus dilakukan (Yeh *et al.*, 2012).

1.6.2 Habitat Mikroalga

Mikroalga adalah salah satu jenis organisme yang dapat tumbuh pada rentang kondisi yang luas dipermukaan bumi. Mikroalga biasanya ditemukan pada tempat-tempat yang lembab atau benda-benda yang sering terkena air dan banyak hidup pada lingkungan berair di permukaan bumi. Mikroalga dapat hidup hampir di semua tempat yang memiliki cukup sinar matahari, air dan karbon-dioksida.

Mikroalga kebanyakan hidup di air, karena 70% permukaan bumi terdiri dari air, maka diperkirakan banyaknya karbon yang terfiksasi melalui fotosintesis oleh mikroalga sama jumlahnya seperti flora daratan. Mikroalga mempunyai peranan penting bagi organisme lain. Kemampuan bertahan hidup pada kondisi tertentu juga terdapat pada beberapa jenis mikroalga. Hal ini disebabkan oleh adanya lapisan musilagenous yang dapat melindungi dari pengaruh kondisi lingkungan yang ekstrim. Mikroalga yang sering dijumpai pada perairan air tawar dengan penyebaran yang sangat luas pada umumnya adalah mikroalga dari divisi *Xhlorophyta*, sedangkan pada perairan yang ekstrim banyak dijumpai mikroalga divisi *Cyanophyta* (Hariyanti, 1994).

Dalam pertumbuhannya mikroalga sangat bergantung pada komposisi nutrisi pada mediannya. Mikroalga dapat tumbuh pada media air laut, maupun air tawar yang mengandung nutrisi yang cukup lengkap bagi pertumbuhannya. Intensitas cahaya yang diterima oleh mikroalga juga sangat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Lama penyinaran dan Panjang gelombang yang digunakan untuk fotosintesis berguna untuk pembentukan senyawa karbon organik. Namun kebutuhan cahaya masing-masing alga berbeda tergantung dari kedalaman kultur dan kepadatannya. (Khoo *et al.*, 2023)

1.6.3 Fase-fase Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dalam medium dapat dilihat dari bertambahnya jumlah sel, jumlah sel dapat diketahui dengan cara menghitung dengan menggunakan alat haemocytometer dan mikroskop dan hasilnya ditunjukkan dengan satuan kepadatan sel/ml, selain itu juga dapat diketahui dari konsentrasi biomassa berat kering per ml yang diperoleh dengan cara disentrifugasi kemudian dikeringkan, (Duong *et al.*, 2012) ada empat fase pertumbuhan mikroalga yaitu:

1.6.3.1 Fase lag

Fase lag adalah fase adaptasi mikroalga dalam medium baru. Pada tahap ini mikroalga membutuhkan waktu untuk menyesuaikan diri karena lingkungan inokulum (bibit) cenderung berbeda dari lingkungan sebelumnya. Selama masa adaptasi, sel alga lebih sensitif terhadap nutrisi, temperatur, dan kondisi yang berbeda dari kondisi aslinya. (Ramdanawati, 2018)

Fase ini dimulai setelah penambahan inokulan ke dalam media kultivasi hingga beberapa saat setelahnya. Metabolisme berjalan tetapi pembelahan sel belum terjadi sehingga kepadatan sel belum meningkat karena mikroalga masih beradaptasi dengan lingkungan barunya. Lamanya fase lag tergantung pada umur inokulum, Sel alga dapat sewaktu waktu memiliki pertumbuhan sel yang semakin menurun, bahkan mati, apabila tidak beradaptasi dengan baik. (Razzak *et al.*, 2022)

1.6.3.2 Fase Eksponensial

Fase ini dimulai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan yang meningkat secara intensif. Bila kondisi kultivasi optimum maka laju pertumbuhan pada fase ini dapat mencapai nilai maksimum, kecepatan pertumbuhan mikroalga dapat dihitung berdasarkan kenaikan biomassa dan selisih waktu yang dibutuhkan. Kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) adalah salah satu indikasi penting sel berhasil melalui fase adaptasi. Durasi fase eksponensial bergantung pada volume inokulum, kecepatan pertumbuhan, medium, dan kondisi lingkungan untuk mensupport pertumbuhan alga. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya priode pertumbuhan yang cepat, sel membelah dengan laju konstan, aktivitas metabolik konstan, dan keadaan pertumbuhan seimbang anantara supply makanan dan kenaikan mikroalga. Pada fase ini merupakan fase terbaik dilakukan pemanenan biomassa sehingga hasil yang didapatkan akan maksimum.

1.6.3.3 Fase Penurunan Laju Pertumbuhan

Fase ini ditandai oleh pembelahan sel tetap terjadi, namun tidak seintensif pada fase sebelumnya sehingga laju pertumbuhannya pun menjadi menurun dibandingkan fase sebelumnya. Penurunan pertumbuhan secara umum dipengaruhi oleh biomassa yang telah mencapai tahap populasi maksimum, sehingga kebutuhan makanan pada medium menjadi berkurang. Selain itu fase penurunan pertumbuhan mikroalga dapat dipengaruhi oleh sumber cahaya, dan akumulasi oksigen yang dihasilkan dari reaksi fotosintesis. Akumulasi oksigen dapat mempengaruhi keasaman sel. Sedangkan jumlah sel yang semakin banyak dapat menghalangi cahaya masuk ke medium. (Fuad Hossain *et al.*, 2020)

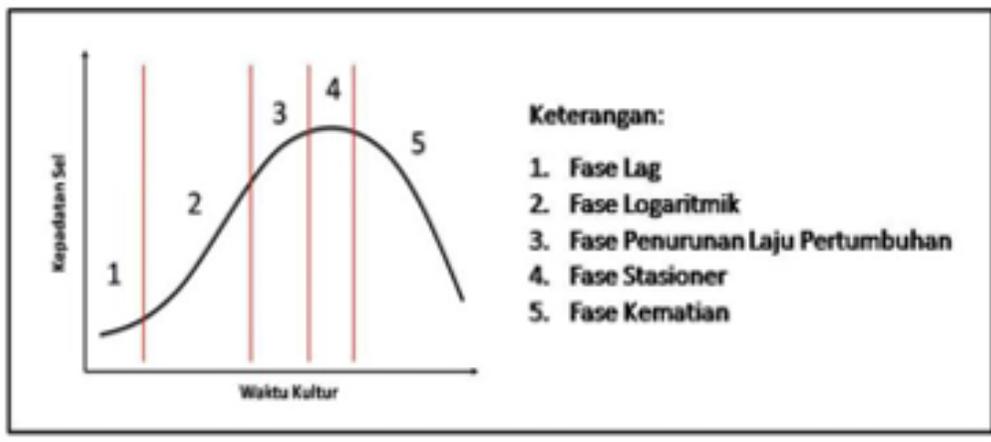
1.6.3.4 Fase Stasioner

Fase stasioner adalah fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan mikroalga, atau kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) menjadi nol. Pada Fase ini ditandai oleh laju reproduksi dan laju kematian relatif sama sehingga peningkatan jumlah sel tidak lagi terjadi atau tetap sama dengan sebelumnya (stasioner). Dimana pada fase ini, terjadi akumulasi racun akibat metabolisme mikroalga, kekurangan nutrisi, dan perubahan kondisi lingkungan. Kurva kelimpahan yang dihasilkan dari fase ini adalah membentuk suatu garis datar, garis ini menandai laju produksi dan laju kematian sebanding.

1.6.3.5 Fase Kematian

Fase ini ditandai dengan angka kematian yang lebih besar dari pada angka pertumbuhannya sehingga terjadilah penurunan jumlah kelimpahan sel dalam wadah

kultivasi. Nutrisi semakin menipis (bahkan habis), cadangan makanan dalam tubuh sel menjadi berkurang, dan penumpukan racun semakin meningkat. Pada fase ini sel yang mati bahkan dapat lisis (pecah) dan larut ke dalam medium sehingga terjadi perubahan kondisi media seperti warna, pH dan temperature dalam medium. (Pruvost *et al.*, 2018). Kurva pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada gambar 1.2



Gambar 1.2 Kurva Pertumbuhan Mikroalga (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995)

1.6.4 Komponen Utama Biomassa Mikroalga

Komponen utama yang terkandung pada mikroalga diantaranya lipid, protein, karbohidrat. Secara kuantitatif, biomassa mikroalga alga terdiri dari 20-30% karbohidrat, 10-20% lemak, dan 40-60% protein. Serta berisi sejumlah kecil asam nukleat dan pigmen seperti karotenoid. (Xu *et al.*, 2023). Untuk kepentingan tertentu, beberapa peneliti berhasil memanipulasi angka kuantitatif dari setiap komponen untuk meningkatkan salah satunya. Sebagai contoh, jika selama kultivasi suplai nitrogen direduksi atau ditiadakan, mikroalga cenderung menghasilkan lemak lebih banyak dari pada karbohidrat. (Razzak *et al.*, 2022)

Lemak merupakan unsur ketiga yang terdapat di dalam organisme hidup. Lemak terdapat pula pada sel-sel organ vegetative tumbuhan di dalam protoplasma. Lemak adalah salah satu bentuk lipid yang merupakan bentuk simpanan dari karbon, hydrogen, dan oksigen. Perbedaan komposisi lipid pada mikroalga seringkali memperlihatkan sebagai variasi pada lingkungan atau kondisi media biakan.

Tabel 1.1 Komposisi Kimia alga dalam persen berat kering

Alga	Komposisi Kimia (% berat kering)			
	Protein	Karbohidrat	Lemak	Asam Nukleat
<i>scenedemus obliquus</i>	50-50	10-17	12-14	3-6
<i>scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedemus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>chlamydomonas rhein</i>	18	17	21	-
<i>chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>chlorella pyrenodosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	10-57	9-11	-
<i>Spirulina plantensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrical</i>	43-50	25-30	4-1	-

Sumber : Becker, 1994

1.6.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga

Kultivasi mikroalga harus dilakukan dalam kondisi yang optimal agar proses fotosintesis yang meliputi reaksi terang dan reaksi gelap dapat berlangsung secara maksimal. Sejatinya, fotosintesis merupakan serangkaian tahapan yang bertujuan untuk menghasilkan karbohidrat melalui reduksi molekul CO₂ (reaksi gelap) dengan memanfaatkan NADPH dan ATP yang dihasilkan dari interaksi biofisika-kimia antara pigmen mikroalga dengan cahaya (reaksi terang) (Praharyawan *et al.*, 2021)

Kondisi optimal kultivasi mikroalga diharapkan dapat memfasilitasi terjadinya reaksi terang dan reaksi gelap secara maksimal. Kondisi kultivasi mikroalga meliputi beberapa factor antara lain :

1.6.5.1 Intensitas Cahaya

Suplai cahaya menjadi faktor penting dalam pertumbuhan mikroalga karena dibutuhkan dalam proses fotosintesis. Seperti halnya semua tanaman, mikroalga juga melakukan proses fotosintesis, yaitu mengasimilasi karbon anorganik untuk dikonversi menjadi materi organik. Oleh karena itu intensitas cahaya memegang peranan yang sangat penting, namun intensitas cahaya yang diperlukan tiap alga untuk dapat tumbuh secara maksimum berbeda-beda. Intensitas cahaya yang diperlukan tergantung volume dan densitas alga (Irianto, 2011).

Cahaya matahari yang diperlukan oleh mikroalga dapat diganti dengan lampu TL. Penggunaan cahaya yang berasal dari lampu TL karena didasari oleh kebutuhan intensitas cahaya dimana jika cahaya pada lampu TL dapat diatur sesuai dengan intensitas yang dibutuhkan. Selain itu lampu TL mempunyai kestabilan intensitas cahaya jika dibandingkan dengan cahaya yang bersumber dari cahaya matahari (Lo *et al.*, 2023)

Menurut Lavens Sogeloss (1996) dalam Kawaroe (2010) intensitas cahaya yang diperlukan bergantung volume kultivasi dan densitas mikroalga. Semakin tinggi densitas dan volume kultivasi semakin tinggi pula intensitas cahaya yang diperlukan. Intensitas cahaya yang diperlukan untuk kultivasi pada erlemenyer adalah 1000 lux, sedangkan untuk volume kultivasinya lebih besar diperlukan intensitas cahaya 500-10.000 lux.

Penelitian ini menggunakan pencahayaan gelap terang, dikarenakan Sebagian besar mikroalga tidak dapat tumbuh dengan baik dalam keadaan pencahayaan yang konstan, karena membutuhkan waktu istirahat untuk menyimpan makanan. Terkadang dilakukan manipulasi pencahayaan liht dark (L/D) antara lain 16:8, 14:10 atau 12:12 waktu pencahayaan.

Istilah pencahayaan gelap-terang dalam penelitian ini adalah mikroalga yang diluminasi dengan cahaya tampak dengan mengatur kondisi terang selama 12 jam dan kondisi gelap selama 12 jam, sehingga menyerupai kondisi alam (periode cahaya matahari). Cahaya berperan penting dalam pertumbuhan mikroalga, tetapi kebutuhannya bervariasi yang disesuaikan dengan kedalaman kultur dan kepadatannya. (Chou *et al.*, 2019)

1.6.5.2 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Suhu menjadi parameter pertumbuhan mikroalga yang cukup penting karena didasarkan pada tempat tumbuhnya, baik dalam iklim tropis maupun sub tropis. Sebagian besar algae dapat tumbuh pada suhu antara 15 sampai 40°C. Namun pada umumnya suhu optimal dalam kultur mikroalga berkisar antara 20-30°C. Pada suhu di bawah 16°C dapat menyebabkan kecepatan pertumbuhan turun, sedangkan pada suhu diatas 35°C, beberapa mikroalga dapat mati atau lysis (pecah) bahkan menimbulkan kematian pada beberapa spesies mikroalga (Kowaroe, 2010).

Seperti kebanyakan mikroorganisme, kecepatan pertumbuhan mikroalga meningkat secara eksponensial dengan meningkatnya suhu, dengan dibatasi oleh suhu optimumnya. Suhu adalah pertimbangan utama ketika melakukan budidaya outdoor saat kemampuan untuk mengotrol suhu sangat terbatas dan sering ditentukan oleh suhu lingkungan. Budidaya mikroalga biasanya tumbuh dengan fluktuasi suhu sehingga 20°C antara siang dan malam. Fluktuasi ini yang menyulitkan budidaya mikroalga untuk bias

mengendalikan kecepatan pertumbuhan pada nilai optimumnya. Namun, pada suhu lebih rendah dari pada kisaran optimum, mikroalga tetap dapat hidup selama air tidak membeku. Pada kondisi gelap tidak ada cahaya, mikroalga sebaiknya tidak dibudidayakan pada suhu tinggi karena mikroalga mudah mati pada kondisi tersebut (Rajapaksha *et al.*, 2014)

1.6.5.3 Nutrisi

Mikroalga membutuhkanberagam nutrisi anorganik untuk meningkatkan produktivitas nya. Nutrisi ini termasuk makronutrien, mikronutrien dan vitamin. Pada kebanyakan kultur, makronutrien utama adalah nitrogen dan fosfor dengan rasio N/P sebesar 16. Sedangkan mikronutrien untuk unsur-unsur tertentu yang dibutuhkan dalam jumlah kecil seperti besi, mangan, selenium, seng, kobalt dan nikel. Selain nutrisi-nutrien tersebut, mikroalga juga membutuhkan kombinasi dari beberapa vitamin (Indrayani & Haslianti, 2018). Berdasarkan studi-studi yang telah dilakukan, beberapa vitamin yang dibutuhkan oleh mikroalga adalah vitamin B₁₂ (Cobalamin), vitamin B₁ (*thiamine*) dan vitamin B₇ (*biotin*).

1.6.6 Lipid Mikroalga

Lemak adalah bahan baku paling menarik untuk produksi biofuel karena densitas energinya yang tinggi dan mudah ditingkatkan menjadi biodiesel. Lipid yang dihasilkan oleh mikroalga dapat dikelompokkan menjadi dua kategori, yakni yang bersifat polar yang tersusun oleh asam lemak bebas, glikolipid, dan fosfolipid, sementara lemak netral tersusun atas trigliserida dan juga monogliserida, digliserida, dan sterol. Secara umum, di bawah kondisi pertumbuhan yang optimum, sebagian besar alga menghasilkan lemak yang bersifat polar. Ketika berada pada kondisi dengan tingkat stress yang tinggi, maka alga akan menghasilkan lemak netral dalam jumlah yang lebih sebesar 77% dari berat kering biomasnya dengan 80% dari 77% berat kering tersebut adalah lemak netral (Yilmaz Cankilic & Arik Berk, 2016).

Produktivitas lipid dapat ditingkatkan dengan penerapan factor stress eksternal dan dianggap sebagai strategi kelangsungan hidup mikroalga dalam kondisi buruk. Seperti kekurangan nutrisi, paparan bahan kimia, perubahan salinitas, suhu, pH atau radiasi (4, 39, 46). Komposisi lipid yang mengandung asam lemak sangat berbeda diantara spesies.(Hidajatiningtyas *et al.*, 2011)

Banyak penelitian yang sudah dilakukan untuk karakteristik profil asam lemak dari beragam spesies alga karena perbedaan Panjang rantai akan menghasilkan karakteristik *biofuel* ataupun nutrisi yang berbeda. Asam lemak dibedakan menjadi asam lemak jenuh dan tidak jenuh. Asam lemak jenuh adalah rantai asam lemak yang tidak memiliki satu pun ikatan rangkap. Asam lemak yang sering terdapat di dalam alga adalah C16:0, C18:2 atau C18:3. Namun beberapa spesies mampu menghasilkan asam lemak tidak jenuh dengan rantai yang sangat Panjang sehingga mendapatkan perhatian sebagai sumber nutrisi potensial (Yilmaz Cankilic *et al.*, 2016).

Tabel 1.2 Kandungan minyak pada beberapa mikroalga

Jenis Mikroalga	Kandungan Minyak (%berat kering)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-27
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizozhytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Sumber: Christi, Y (2007)

1.6.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Lipid Mikroalga

Produksi lipid dipengaruhi secara kualitatif dan kuantitatif oleh beberapa kondisi lingkungan. Menurut Bajpai (1993), parameter seperti unsur hara atau komposisi media, intensitas cahaya, suhu, salinitas dan pH, aerasi, waktu inkubasi dan umur kultur berperan penting dalam biosintesis dan akumulasi lipid.

1.6.7.1 Unsur Hara

Media pertumbuhan mikroalga, harus memiliki beberapa nutrisi esensial yang diperlukan untuk keberlangsungannya untuk melakukan fotosintesis dan memperbanyak sel mikroalga. Nutrisi esensial tersebut yakni sumber karbon, sumber nitrogen, ion kalium, magnesium, natrium, kalsium sulfat, klorida, mikroelemen, vitamin dan agen penkelat (Vonshak 1986). Menurut Lane (2021) setidaknya ada 3 nutrisi yang paling esensial yang dibutuhkan oleh mikroalga, yakni Karbon (C), Nitrogen (N) dan Fosfor (P). rasio ketiga elemen tersebut dalam biomassa mikroalga berkisar 106:16:1 (C:N:P), yang dikenal sebagai rasio Redfield (Daneshvar *et al.* 2021).

Media pertumbuhan alga dapat diklasifikasikan ke dalam 2 kelompok, yaitu makronutrisi dan mikronutrisi. Makronutrisi adalah senyawa yang dibutuhkan dalam jumlah besar untuk pertumbuhan sel alga dan kapang yaitu C, H,O,N, P,K dan Mg. Unsur mikronutrisi terdiri dari Fe, Mn, Zn, Cu, Ca dan Na, yang mana unsur tersebut berfungsi sebagai katalis selama proses biosintesis sel. Unsur mikronutrisi dibutuhkan dalam jumlah sangat kecil tetapi harus ada dan untuk menstabilkan fungsi mikronutrisi biasanya ditambahkan senyawa sitrat. Walaupun unsur mikronutrisi dibutuhkan dalam jumlah

yang sangat kecil, namun unsur-unsur tersebut harus tetap ada dalam medium. Unsur hara anorganik utama yang dibutuhkan untuk tumbuh dan berproduksi adalah N dan P (Chou *et al.*, 2019).

1) Nitrogen

Nitrogen merupakan unsur penting bagi pertumbuhan alga pada fase vegetative. Saa fase ini terjadi 3 proses penting yaitu pembelahan sel, pemanjangan sel dan tahap diferensiasi sel. Cornisi dan Karidys (1990) menyatakan bahwa nitrogen merupakan bagian penting dari protein, protoplasma, klorofil, dan asam nukleat. Vegetasi tangka rendah maupun tingkat tinggi menyerap N dalam bentuk ammonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-). Organisme berklorofil yang kekurangan nitrogen akan berubah warna selnya menjadi kekuningan karena adanya penghambatan sintesis klorofil. Pemupukan nitrogen yang berlebihan akan mengakibatkan pertumbuhan vegetative yang berlebihan. Kekurangan N juga akan membatasi pertumbuhan karena tidak ada pembentukan protoplasma baru (Gultom, 2018)

2) Fosfor

Fosfor (P) merupakan salah satu unsur makro primer yang dibutuhkan oleh alga. Kekurangan unsur P dapat diamati dari adanya gejala tertundanya pematangan sel. Menurut Bold dan Wynne (1985), fosfor merupakan salah satu unsur yang berperan dalam proses fotosintesis. Fosforilasi adenosine menghasilkan adenosine monofosfat, difosfat, trifosfat (AMP, ADP dan ATP) dimana tanaman menyimpan energinya untuk kelangsungan proses kimia lainnya. Fosfor juga berpengaruh baik pada proses pembelahan sel dan pembentukan lemak organisme. (Park *et al.*, 2019)

1.6.8 Biodiesel dari Mikroalga

Sebagai salah satu bagian dari energi terbarukan, potensi produksi energi dari mikroalga masih terus dikembangkan. Pada dasarnya mikroalga dapat disebut sebagai pabrik yang menggunakan energi matahari untuk mengubah karbon dioksida menjadi senyawa-senyawa yang bermanfaat, termasuk biofuels. Mikroalga dapat memproduksi beberapa jenis biofuels, misalnya metana (dari metabolisme anaerobic), biohydrogen, dan biodiesel. Biodiesel pada umumnya diproduksi dari sumber-sumber nabati maupun hewani. Pada mikroalga, biodiesel diproduksi dari turunan minyak (lipid) yang dihasilkan oleh mikroalga. Selain itu, produksi biodiesel dari mikroalga lebih menjanjikan dibandingkan biodiesel yang diproduksi dari tanaman, yang juga digunakan sebagai kebutuhan pangan. Mikroalga memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan tanaman pangan. (Jumiarni *et al.*, 2021)

Berdasarkan pemaparan dari Demirbas dan Demirbas (2010), minyak yang dihasilkan dari mikroalga diperkirakan memiliki hasil 7 sampai 31 kali lebih besar dari pada minyak dari kelapa sawit. Satu hektar area kultivasi mikroalga dapat memproduksi 10 sampai 100 kali lebih banyak minyak disbanding dengan minyak dari tanaman pangan. Sebagai perbandingan, soybean menghasilkan minyak 450 l/hektar, Canola 1.200 l/hektar, palm 6.000 l/hektar, dan mikroalga dapat menghasilkan hingga 90.000 l/hektar. Sementara siklus pada tanaman pangan membutuhkan 3 bulan (bahkan 3

tahun) untuk produksi, mikroalga dapat memulai memproduksi minyak pada hari ke 3 atau 5 dan dapat dipanen dalam waktu 10-14 hari.

1.6.8.1 Kriteria Mikroalga Sebagai Bahan Baku Biodisel

Berikut kriteria yang perlu dipertimbangkan dalam memilih mikroalga sebagai bahan baku biodisel:

- 1) **Kandungan Lipid yang Tinggi:** mikroalga yang ideal sebagai bahan baku biodisel harus memiliki kandungan lipid yang tinggi karena Lipid adalah komponen utama dalam produksi biodisel oleh karena itu mikroalga dengan kandungan lipid yang tinggi akan menghasilkan lebih banyak lipid untuk diekstraksi. Lipid ini dapat diekstraksi dan diubah menjadi biodisel melalui proses transesterifikasi. Mikroalga dengan kandungan lemak antara 20-50% atau lebih dianggap baik (Ratnawati *et al.*, 2022).
- 2) **Kecepatan Pertumbuhan:** mikroalga yang digunakan sebagai bahan baku biodisel harus memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat akan lebih efisien dalam produksi biodisel. Pertumbuhan yang cepat akan memungkinkan produksi massal mikroalga yang lebih efisien dalam waktu singkat (Mata *et al.*, 2010).
- 3) **Toleransi terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim:** mikroalga yang tumbuh diberbagai kondisi lingkungan, termasuk suhu ekstrim, salinitas tinggi, dan pH yang bervariasi, dianggap lebih cocok sebagai bahan baku biodisel (Amaro *et al.*, 2021). Hal ini penting untuk memungkinkan kultivasi mikroalga dalam berbagai wilayah dan mengurangi keergantungan pada lingkungan tertentu.
- 4) **Ketahanan terhadap penyakit dan serangan organisme lain:** mikroalga yang tahan terhadap serangan penyakit dan organisme lain seperti bakteri, virus dan jamur dianggap lebih ideal sebagai bahan baku biodisel. Hal ini membantu menjaga stabilitas produksi dan mencegah kerugian akibat infeksi atau serangan patogen (Harun *et al.*, 2010)
- 5) **Rasio Karbon ke Nitrogen yang Rendah:** mikroalga dengan rasio C/N yang rendah cenderung menghasilkan lebih banyak lipid. Rasio C/N rendah dapat dicapai melalui manipulasi nutrisi dalam media pertumbuhan mikroalga (Choksi *et al.*, 2021)
- 6) **Kemudahan kultivasi:** mikroalga yang mudah dikultivasi dalam skala besar, baik dalam sistem tertutup (bioreaktor) maupun sistem terbuka (kolam), dianggap lebih sesuai untuk produksi biodisel secara komersial. Mikroalga yang tidak memerlukan nutrisi yang rumit atau kondisi khusus untuk tumbuh dan berkembang (Allen *et al.*, 2010)

1.6.9 Karakteristik Biodisel

Biodisel merupakan campuran metil ester dengan asam lemak rantai panjang yang dihasilkan dari sumber hayati seperti minyak nabati dan lemak hewani. Pada umumnya biodisel disintesis dari ester asam lemak dengan rantai karbon antara C₆-C₂₂. Minyak. Rantai karbon biodisel bersifat sederhana, berbentuk lurus dengan dua buah atom oksigen pada tiap cabangnya (mono alkil ester), sehingga lebih mudah didegradasi

oleh bakteri dibandingkan dengan rantai karbon petrodiesel, yang bersifat lebih kompleks, dengan ikatan rangkap dan banyak cabang.

Biodisel merupakan bahan bakar berwarna kekuningan yang viskositasnya tidak jauh berbeda dengan minyak solar, oleh karena itu campuran biodisel dengan minyak solar dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar kendaraan berbahan bakar minyak solar tanpa merusak atau memodifikasi mesin. Selain itu tenaga dan cara kerja mesin diesel dengan bahan bakar minyak solar juga tidak berubah.

Biodisel tidak mengandung nitrogen atau senyawa aromatik dan hanya mengandung kurang dari 155 ppm sulfur. Biodisel mengandung 11% oksigen dalam persen berat yang keberadaannya mengakibatkan berkurangnya kandungan energi namun menurunkan kadar emisi gas buang yang berupa karbon monoksida (CO), Hidrokarbon (HC), partikel dan jelaga. Kandungan energi biodisel 10% lebih rendah bila dibandingkan dengan solar. Sedangkan efisiensi bahan bakar biodisel lebih kurang atau dapat dikatakan sama dengan solar, yang berarti daya torsi yang dihasilkan proporsional dengan kandungan nilai kalor pembakarannya. Kandungan asam lemak dalam minyak nabati merupakan bahan baku dari biodisel menyebabkan bahan bakar biodisel sedikit kurang stabil dibandingkan dengan solar, kestabilan yang tidak stabil dapat meningkatkan kandungan asam lemak bebas, menaikkan viskositas terbentuknya gums, dan terbentuknya sedimen yang dapat menyumbat saringan bahan bakar.

Biodisel memiliki sifat melarutkan (*solvency*). Hal ini menyebabkan suatu permasalahan, dimana apabila digunakan pada mesin diesel yang sebelumnya telah lama menggunakan solar dan didalam tankinya telah terbentuk kerak dan sedimen, maka biodisel akan melarutkan kerak dan sedimen tersebut, sehingga dapat menyumbat saringan dan saluran bahan bakar. Oleh karena itu apabila kandungan sedimen dan kerak didalam tangki bahan bakar cukup tinggi sebaiknya diganti sebelum digunakan biodisel. Berupa material seperti kuningan, tembaga, timah, dan seng dapat mengoksidasi biodisel dan menghasilkan sedimen, untuk mencegah hal ini maka sebaiknya biodisel terbuat dari bahan stainless steel atau aluminium.

1.6.10 Komposisi Asam Lemak

Asam lemak merupakan asam organik berantai Panjang yang mempunyai gugus karboksil (COOH) dan gugus metil (CH₃). Komposisi asam lemak yang terdapat pada mikroalga adalah asam lemak jenuh/*saturated fatty acid* (SFA), asam lemak tak jenuh tunggal/*monounsaturated fatty acid* (MUFA) dan asam lemak tak jenuh ganda/*polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Asam lemak jenuh adalah asam lemak yang hanya memiliki ikatan tunggal pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak tak jenuh tunggal adalah asam lemak yang memiliki satu ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak yang mengandung dua atau lebih ikatan rangkap disebut lemak tak jenuh jamak (PUFA) (Jacoeb, *et al.*, 2014)

Setiap mikroalga memiliki komposisi asam lemak yang berbeda-beda mikroalga *Bacillariophyceae* didominasi oleh asam palmitat C16:0 (38,87-47,68%), asam palmitoleat C16:1 (0,5-18,61%), C18:2 asam linoleat (1,34-9,65%) dan asam linolenat C18:3 (0,02-25,31%). Komposisi asam lemak *Cyanophyceae* adalah asam palmitat C16:0 (47,33-66,05%), asam stearat C18:0 (9,78-14,16%), asam palmitoleat C16:1 (4,14-12,19%) dan asam oleat (5,13-24,85%) (Hartati, *et al.*, 2013).

Komposisi asam lemak pada mikroalga salah satunya dapat digunakan sebagai biodiesel (Grubišić *et al.*, 2022). Kandungan asam lemak dalam mikroalga yang paling umum adalah asam palmitat (C16:0), asam stearate (C16:0), asam oleat (C18:1), asam linoleate (C18:2) dan asam linolenat (C18:3). Asam lemak yang terkandung di dalam mikroalga memiliki pengaruh terhadap suatu bahan bakar (Grubišić *et al.*, 2022).

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2023 sampai Mei 2024 di Laboratorium Pendidikan Teknologi Pertanian Universitas Negeri Makassar dan Universitas Hasanuddin.

2.2 Bahan dan Alat

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2

Tabel 2.1 Nama dan fungsi alat yang digunakan pada penelitian

Alat	Fungsi
Lampu TL	Sebagai sumber cahaya untuk fotosintesis mikroalga pada media kultur
Mikropipet	Memindahkan larutan dari satu wadah ke wadah lain dengan jumlah yang sangat sedikit
Haecytometer	Menghitung kepadatan sel mikroalga
Handcounter	Memudahkan menghitung jumlah sel mikroalga
Mikroskop	Untuk mengamati objek mikroalga
Erlemeyer 300 ml	Wadah kultivasi mikroalga
Desikator	Menghilangkan air pada mikroalga
Autoclave	Mensterilkan alat dan bahan yang akan digunakan
Oven	Mengeringkan bahan yang akan digunakan
Pinset	Menjepit benda-benda berukuran kecil
Timbangan analitik	Menimbang bahan dengan massa yang kecil
Spatula	Memindahkan dan mengambil bahan yang akan digunakan
Sentrifugasi	Memisahkan cairan dengan partikel terhadap densitas layangnya
Gelas Ukur	Mengukur volume cairan
Cawan	Wadah menimbang bahan atau sampel
Vial	Tempat Menyimpan Larutan Analisis
Tube	Menyimpan sampel lipid
Kulkas	Tempat menyimpan sampel dan bahan analisis lainnya
Hotplate	Memanaskan dan menghomogenkan larutan
Rak Kultur	Menyimpan kultur mikroalga
Timmer Setting	Mengatur Priode Waktu secara otomatis
Vortex	Mencampurkan bahan agar homogen
Water Bath	Mempertahankan suhu air pada kondisi tertentu selama waktu tertentu

Scanning Electron Microscope (SEM)	menghasilkan gambar sampel dengan perbesaran hingga skala tertentu
GCMS-QP2010	Analisis komposisi asam lemak

Tabel 2.2 Nama dan fungsi Bahan yang digunakan pada penelitian

Nama Bahan	Fungsi
Isolate Mikroalga UNM IND-01	Inoculum media kultur
Media Pupuk Pertanian (NPK+Urea)	Media kultur
Aquades steril	Pelarut
Metanol	Pelarut
Cloroform	Pelarut untuk ekstraksi
Toluene Pa	Zat pelarut
H ₂ SO ₄	Zat pelarut
NaCl Pa	Zat pelarut
NaHCO ₃ Pa	Zat pelarut
Kertas Whatman GF/C 25 mm	Menyaring mikroalga
Alcohol 70%	Stelilisasi
Tissu	Pembersih

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Sterilisasi Alat dan Air Media Kultur

Tahap awal yang dilakukan dalam proses kultivasi mikroalga adalah sterilisasi alat dan media kultur yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan ataupun bahan kimia yang dapat mengganggu pertumbuhan mikroalga selama proses kultivasi.

Sterilisasi alat berbahan gelas juga diautoclave menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Peralatan tersebut sebelumnya dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Setelah kering peralatan yang terbuat dari bahan gelas dibungkus dengan aluminiumfoil agar uap air tidak bisa masuk selama proses sterilisasi.

2.3.2 Pembuatan Media Kultur

Sebelum memulai kultivasi terlebih dahulu dibuat media pertumbuhan mikroalga yang nantinya akan menjadi sumber nutrisi bagi mikroalga yang akan dikultur, media yang digunakan berdasarkan penelitian Nur Zakiyah (2022) yang menjelaskan bahwa media terbaik untuk pertumbuhan mikroalga Isolate UNM IND-01 adalah media Pupuk Urea+NPK masing-masing pupuk yang digunakan yakni urea 0,1 gr, NPK 0,1 gr yang kemudian masing-masing pupuk dimasukkan kedalam botol yang sama kemudian ditambahkan air aqades sebanyak 400 ml. Media yang sudah ditambahkan air selanjutnya dihomogenkan sampai larut kemudian di autoqlave pada suhu 121°C selama 15 menit. (Indrayani, 2020). Adapun komposisi media kultur yang adalah Urea: Nitrogen 46%, NPK : N 16%, P 16%, K 16%.

2.3.3 Skale-Up Inokulum/Starter Mikroalga

Inokulum isolate mikroalga UNM IND-01 yang akan dijadikan sebagai starter untuk proses kultivasi, terlebih dahulu diperbanyak untuk memenuhi kebutuhan starter mikroalga yang akan dikembangkan, dimana awal starter inoculum isolate mikroalga hanya 20 ml, maka untuk memenuhi kebutuhan kultur yang diperlukan, inoculum isolate diperbanyak menjadi 400 ml dengan menambahkan air Tawar dan nutrisi berupa trace element pada media kultur (Indrayani, 2020).

2.3.4 Kultivasi Isolate Mikroalga

Mikroalga dikultur menggunakan erlenmeyer volume 300 mL yang berisi 150 mL media kultur yang diperkaya urea+NPK (Indrayani et al, 2022). Awalnya (Fase I) mikroalga dikultur pada tiga kondisi suhu yang berbeda yaitu suhu ruang kultur 25-28°C), suhu kamar (30-35°C), suhu ruang pengering (37-48°C) pada intensitas cahaya 3500 lux dengan siklus gelap terang masing-masing 12 jam. Kepadatan awal kultur untuk semua perlakuan adalah sama sekitar 100×10^4 sel.mL⁻¹. Kultur dipelihara selama selama 10 hari. Setelah itu dilanjutkan ke fase II dimana kultur dipindahkan ke kondisi suhu yang lebih rendah yaitu kultur yang di ruang pengering dipindahkan ke suhu kamar, kultur di suhu kamar dipindahkan ke suhu ruang kultur sementara kultur yang di ruang kultur dipindah ke lemari pendingin bersuhu 11-12°C. Pada fase II ini, kultur di peliharaan selama 3 hari. Selama periode kultur, kultur diaduk secara manual minimal 3 kali sehari dan dirotasi setiap hari.

Sampling untuk perhitungan kepadatan sel dilakukan setiap hari. Sementara sampling untuk biomas dan lipid dilakukan pada fase eksponensial dan stasioner pada fase I sementara pada fase II, sampling untuk biomas dan lipid dilakukan setiap hari.

2.3.5 Ekstraksi Lipid

Ekstraksi lipid mengacu pada penelitian Indrayani (2017). Ekstraksi lipid mengikuti metode Bligh dan Dyer (1959) sebagaimana yang dimodifikasi oleh Kates dan Volcani (1966), yang diadaptasi oleh (Merz 1994). Yakni 5 mL kultur mikroalga dipanen kemudian difilter dengan kertas Whatman GF/C 25 mm dan disentrifugasi selama 5 menit sampai tersaring mikroalga kering, kemudian kertas Whatman GF/C yang berisi mikroalga dilipat dan dikeringkan dengan tisu lalu dihancurkan kedalam tabung reaksi menggunakan batang kaca, setelah sampel hancur kemudian ditambahkan 1 mL larutan campuran (metanol+Chloroform+air) dengan perbandingan 2:1:0,8 v/v/v) untuk melarutkan ekstraksi lalu dipindahkan kedalam gelas tube. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan campuran untuk membersihkan sisa ekstraksi pada tabung reaksi dan dipindahkan kedalam gelas tube. Selanjutnya tambahkan 3,7 mL larutan campuran kedalam gelas tube setelah itu larutan campuran kedalam gelas tube setelah itu larutan disentrifugasi selama 20 menit pada tekanan 3000 rpm.

Hasil larutan sentrifugasi selanjutnya dipindahkan kedalam gelas tube dan ditambahkan kembali larutan campuran sebanyak 5,7 mL lalu divortex dan disentrifugasi kembali. Setelah itu sampel tersebut digabungkan kedalam gelas tube dan hasil sentrifugasi kemudian ditambahkan larutan 3 mL air+3 mL chloroform lalu divortex agar

larutan tersebut tercampur rata. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam didalam lemari pendingin hingga terbentuk dua lapisan larutan, dimana lapisan bawah berupa lipid yang larut dalam kloroform dan lapisan atas berupa cairan air + methanol. Selanjutnya lapisan atas dikeluarkan dan lapisan bawah yang berupa lipid dipindahkan dalam gelas vial yang telah ditimbang. Kloroform pada sampel lipid dievaporasi dibawah sinar matahari sampai gelas vial yang berisi lipid benar-benar kering lalu ditimbang kembali, dimana hasil dari selisih berat vial berupa berat lipid.

2.3.6 Analisis Asam Lemak

Sampel lipid yang diekstraksi menggunakan metode Bligh dan Dyer digunakan untuk analisis asam lemak mengikuti metode yang diadaptasi oleh Christi (1989). Dimana 1 mL toluena ditambahkan ke dalam sampel lipid sebelum ditambahkan 2 mL (asam sulfat 1,5 % dalam metanol). Sampel kemudian diinkubasi dalam penangas air pada suhu 50°C semalaman. Setelah diinkubasi, sekitar 5 mL (NaCl 5% dalam air deionisasi) ditambahkan ke sampel untuk malarutkan senyawa yang larut dalam air. Fase organik teratas dipindahkan ke dalam vial bersih dan vase air bagian bawah dicuci 2 kali dengan 5 ml Hexana kemudian hasil pencucian digabungkan dalam vial kemudian dicuci dengan 4 mL (NaHCO₃ 2% dalam air deionisasi). Lapisan atas kemudian dipindahkan ke dalam vial yang bersih dan kering. Sampel diuapkan di bawah sinar matahari sampai volume sampel sekitar 300 µL. sampel kemudian dipindahkan ke vial yang lebih kecil yang siap untuk dianalisis menggunakan kromatografi gas.

2.3.7 Operating GC-MC

2.3.7.1 Preparation Sample

± 0.1 mL sample ditambahkan metanol:kloroform (1:1) sebanyak 5 mL. ekstraksi dengan menggunakan sonikator selama 20 menit pada suhu 40° C. Sample dimasukkan ke dalam vial GC-MS.

2.3.7.2 Operating GC-MS Ultra QP 2010 Shimadzu

Kondisi instrumen GC-MS Suhu injektor 250°C dengan mode Splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 14 mL/min dan rasio 1:10. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C, waktu solvent cut 3 menit, 400-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 100°C/min dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 50°C/min sehingga total waktu analisa 36 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan *library* NIST 17 dan Wiley 9.

2.3.8 Identifikasi molekuler

Proses isolasi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant) (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan)*. Kit ini terdiri atas *GP1 buffer*, *GPX1 buffer*, *GP3 buffer* (ditambah dengan isopropanol), *W1 buffer*, *Wash buffer* (ditambah etanol), *elution buffer*

(*pre-heat* pada 60 °C), *RNase A*, kolom filter, kolom GD, dan tabung koleksi berukuran 2 mL.

Isolasi DNA terdiri atas lima tahap yaitu disosiasi sel, lisis, pengikatan DNA, pencucian, dan elusi DNA. Tahap pertama yaitu disosiasi jaringan. 25 mg sampel mikroalga kering dibekukan menggunakan nitrogen cair kemudian digerus hingga menjadi bubuk dan dipindahkan pada tabung mikrosentrifuse 1,5 mL. Pada tahap kedua, lisis, 400 μ L *GPX1 buffer* dicampur dengan 5 μ L *RNase A* pada tabung berisi sampel kemudian dicampurkan dengan vorteks. Campuran diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit dengan dibalik setiap 5 menit. Kemudian 100 μ L *GP2 buffer* ditambahkan pada campuran lalu divorteks, campuran diinkubasi di es selama 3 menit. Kolom filter diletakkan pada tabung koleksi 2 mL, kemudian campuran dipindahkan pada kolom filter. Kolom disentrifugasi (Thermo Fisher, USA) dengan kecepatan 1,000 x g selama 1 menit, setelah itu, kolom filter diambil. Supernatan dipindahkan pada tabung mikrosentrifuse 1,5 mL.

Pada tahap ketiga, pengikatan DNA, *GP3 buffer* (yang telah ditambah isopropanol) ditambahkan sebanyak 1,5x volume supernatan kemudian divorteks selama 5 detik. Kolom GD diletakkan pada tabung koleksi 2 mL, kemudian 700 μ L campuran dipindahkan pada kolom GD. Kolom ini disentrifugasi 16.000 x g selama 2 menit. Cairan pada tabung koleksi dibuang, kemudian sisa campuran *GP3 buffer* dan sampel ditambahkan dan perlakuan diulang.

Tahap keempat, pencucian, pada kolom GD ditambahkan 400 μ L *W1 Buffer* kemudian disentrifugasi 16.000 x g selama 1 menit. Cairan di bawah kolom GD dibuang dan kolom GD dikembalikan pada tabung koleksi. 600 μ L *wash buffer* (ditambah etanol) ditambahkan pada kolom GD dan disentrifugasi 16.000 x g selama 1 menit. Kemudian, cairan di bawah kolom GD dibuang dan kolom GD diletakkan kembali pada tabung koleksi dan disentrifugasi kembali 16.000 x g selama 3 menit. Tahap kelima, elusi DNA. Pada tahap ini, kolom GD dipindahkan pada tabung mikrosentrifuse 1,5 mL dan ditambah dengan *elution buffer pre-heat* pada suhu 60 °C selama 10 menit) pada bagian tengah kolom. Kondisi ini dibiarkan selama 3-5 menit, kemudian disentrifugasi 16.000 x g selama 1 menit.

Setelah tahap ekstraksi DNA, dilakukan analisis kuantitas DNA menggunakan Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA (Cheng *et al.*, 2021). Konsentrasi DNA ditentukan dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (A260). Sedangkan kemurnian DNA dari kontaminasi protein, polifenol, dan polisakarida dinilai dengan memperkirakan rasio absorbansi pada A260/A280 dan A260/A230. Rasio A260/A280 mendekati 1,8 secara umum diterima sebagai DNA murni. Rasio A260/A230 secara umum diterima untuk dsDNA adalah 1.8-2.2. Hasil analisis kuantitas DNA digunakan sebagai pedoman pengenceran DNA yang digunakan untuk proses PCR.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR (Bio-rad, USA). Total volume reaksi amplifikasi dalam penelitian ini adalah 40 μ L dengan rincian 20 μ L *My Taq HS Red Mix 2X* (Meredian Bioscience, USA), 0,8 μ L masing-masing primer *forward* dan *reverse* (10 μ M), 16,4 μ L dH₂O, dan 2 μ L template DNA (92 ng/ μ L). Program amplifikasi pada mesin PCR ditentukan sebagai berikut: denaturasi awal (95 °C selama 2 menit), 35

siklus (95 °C selama 15 detik, 54°C selama 15 detik, dan 72°C selama 1 menit), kemudian dilanjutkan dengan ekstensi final dengan 72 °C selama 5 menit.

Amplikon yang dihasilkan dari reaksi tersebut dielektroforesis dalam gel agarosa 1% yang direndam dalam buffer TAE 1x selama 55 menit pada 100V. Kemudian gel dilakukan pewarnaan menggunakan pewarna *Diamond™ Nucleic Acid*. Pita DNA dalam gel difoto menggunakan sistem dokumentasi gel.

2.4 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan metode eksperimental yang dilakukan dengan pengamatan dan analisis kepadatan sel, laju pertumbuhan spesifik, biomass, produktivitas biomassa, produktivitas lipid dan analisis asam lemak untuk potensi biodisel.

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu pengaruh suhu kultur, yang terdiri dari 3 jenis perlakuan yakni Suhu Ruang Kultur 25-28°C, suhu ruang kamar 30-35°C dan suhu ruang pengering 38-48°C, dengan masing-masing 3 ulangan sehingga diperoleh 9 unit percobaan. Desain rancangan percobaan dalam pengamatan ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Desain Rancangan Percobaan Perbedaan Suhu

B1	A1	C1
C3	B2	A3
A2	C1	B2

Keterangan :
 Perlakuan A = suhu ruang kultur (25-28°C)
 Perlakuan B = suhu ruang (30-35°C)
 Perlakuan C = suhu ruang pengering (38-48°C)

2.5 Parameter Pengamatan

Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan dan kandungan lipid mikroalga UNM IND-01 dengan mencatat secara sistematis gejala yang tampak pada subjek penelitian. Dimana parameter utama yang diamati yakni waktu terjadinya fase pertumbuhan sel Mikroalga selama proses penelitian, kemudian mengamati produktivitas biomassa dan produksi lipid nya. Penelitian ini menggunakan beberapa pengujian untuk memperoleh data yang diperlukan. Berikut pengujian yang dilakukan:

2.5.1 Perhitungan Kepadatan Sel Mikroalga

Analisis laju pertumbuhan yang diperoleh dari penelitian didasarkan pada hasil perhitungan kepadatan sel mikroalga, untuk menentukan lama waktu yang diperlukan

mikroalga dalam sekali pembelahan sel. Kepadatan sel dan laju pertumbuhan mikroalga dihitung setiap hari selama masa kultivasi sehingga dapat menggambarkan setiap fase pertumbuhan mikroalga. Laju pertumbuhan menggambarkan kecepatan pertumbuhan sel-sel mikroalga persatuan waktu yang dapat dipakai sebagai tolak ukur untuk mengetahui daya dukung medium atau nutrisi terhadap pertumbuhan dan pembelahan sel mikroalga (Makareviciene & Sendzikiene, 2022).

Untuk mengetahui kepadatan populasi mikrolaga isolate IND-UNM 01. Maka jumlah sel dihitung setiap hari selama masa kultur. Kepadatan populasi sel dihitung dengan menggunakan Haemocytomete

Cara penggunaan *Haemocytomete* yakni dengan cara kultur sel mikroalga yang akan dianalisis kepadatan selnya diteteskan sebanyak 0,1 ml pada bagian parit melintang. Lalu ditutup dengan menggunakan *cover glass*. *Haemocytometer* lalu diletakan di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 kali dan di difokuskan hingga terlihat kotak-kotak tempat perhitungan sel yang terdiri dari enam belas kotak perhitungan. Cara menghitung sel fitoplankton dari sisi kiri kotak kearah kanan kotak dan menghitung sel yang berada di dalam garis atau yang mendekati garis batas bagaian dalam kotak kemudian perhitungan pada blok A, B, C, D dijumlahkan. Menurut Kwangdinata dkk (2013), kepadatan fitoplankton (sel/ml) dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kepadatan fitoplankton (sel/ml)} = \frac{nA + nB + nC + nD}{4} \times 10^4$$

Keterangan:

nA, nB, nC, nD. = Jumlah sel mikroalga pada blok A,B,C, dan D
4 = Jumlah Blok yang dihitung

2.5.2 Perhitungan Laju Pertumbuhan Spesifik (SGR)

Laju pertumbuhan spesifik merupakan parameter yang menggambarkan kecepatan penambahan sel mikroalga per satuan waktu. Laju pertumbuhan spesifik (μ) dihitung dengan menggunakan persamaan berikut

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2 / N_1)}{t_2 - t_1}$$

Dimana N_1 dan N_2 adalah Kepadatan sel pada waktu 1 (t_1) dan 2 (t_2) dalam fase eksponensial.

2.5.3 Penentuan Berat Biomass (DW)

Mikroalga dipanen sebanyak 5 ml menggunakan pipet ukur kemudian di masukan kedalam alat filter vakum selama kurang lebih 5 menit yang telah diberi kertas saring Whatman GF/C 25 mm yang sebelumnya telah ditimbang. Mikroalga yang tersaring pada kertas Whatman dilipat bersamaan dengan kertas Whatman kemudian Filter yang berisi sel mikroalga dikeringkan dalam oven pada suhu 75°C selama 5 jam. Kemudian filter

berisi sel mikroalga dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit kemudian ditimbang kembali setelah dingin. Perhitungan Berat biomass (DW) sel mikroalga mengacu pada standar metode untuk mengukur pertumbuhan mikroalga (Moheimani et al., 2013):

$$DW (g/L^{-1}) = (\text{Berat filter + mikroalga}) - (\text{Berat filter})$$

2.5.4 Produktivitas Biomassa (PB)

Setelah diperoleh hasil perhitungan laju spesifik dan biomass maka selanjutnya dilakukan perhitungan produktivitas biomassa mikroalga dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Indrayani, 2017).

$$PB (g.L^{-1}, L^{-1}. Hari^{-1}) = \text{Laju pertumbuhan spesifik } (\mu) \times DW$$

2.5.5 Perhitungan Lipid Yield (g/L)

Total lipid dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Lipid Yield } (g.L^{-1}) = (\text{Bobot Vial + Lipid Alga}) - \text{Bobot Vial}$$

Kandungan lipid menunjukkan presentasi akumulasi lipid dalam mikroalga berdasarkan berat kering.

2.5.6 Kandungan Lipid (%)

Perhitungan kadar lipid dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Kandungan Lipid } (\%) = \frac{\text{Lipid Yield}}{\text{Berat Biomassa Yield}} \times 100\%$$

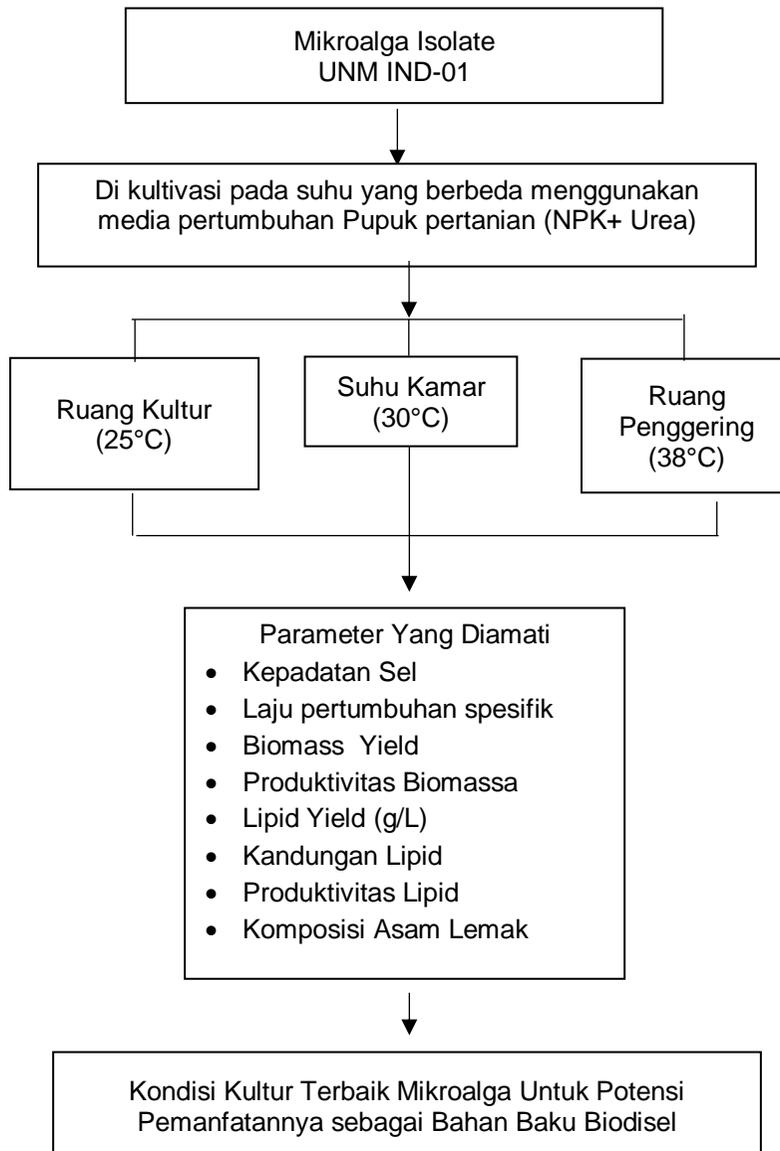
2.5.7 Produktivitas Lipid (PL)

Produktivitas lipid menyatakan pembentukan lipid pada mikroalga dalam satuan massa per volume per satuan waktu. Untuk mendapatkan produktivitas lipid menggunakan rumus :

$$PL (g.L^{-1}, L^{-1}. Hari^{-1}) = \text{Laju pertumbuhan spesifik } (\mu) \times \text{Total Lipid}$$

2.6 Skema Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dapat digambarkan dengan skema seperti dibawah ini.



Gambar 2.1 Prosedur Penelitian

2.7 Teknik Analisis Data

Tahap analisis kandungan lipid dilakukan pada waktu pemanenan mikroalga yang dikultur pada suhu yang berbeda yakni Suhu Ruang Kultur 25-28°C, suhu ruang kamar 30-35°C dan suhu ruang pengering 38-48°C, sedangkan untuk produktivitas biomassa dan produktivitas lipid dilakukan setelah didapatkan dari pengambilan sampel sesuai dengan lama waktu pertumbuhan.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dikumpulkan dan ditabulasi dalam bentuk tabel dan grafik dan diolah secara statistik menggunakan analisis sidik ragam dalam RAL (Rancangan Acak Lengkap).

Analisis varians satu arah (ANOVA) digunakan untuk menganalisis perbedaan signifikan antara perlakuan dan prosedur perbandingan ganda berpasangan (Metode Holm-Sidak) digunakan untuk menguji perbedaan anata kondisi secara tepat. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan Sigma-Plot 14.5 Systat Software Inc., AS.