

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Nannochloropsis oculata*

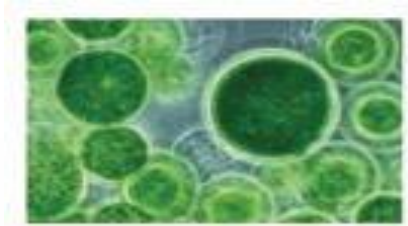
Nannochloropsis oculata merupakan mikroalga dengan yang hidup di lautan dan juga terdapat di air tawar dan air payau. Mikroalga *N. oculata* memiliki beberapa kandungan pigmen seperti astaxanthin, zeaxanthin, dan canthaxanthin. Mikroalga *N. oculata* terbukti cocok sebagai penghasil *biofuel* karena memiliki kadar lipida 28,7 % dari berat kering terutama asam lemak tak jenuh. *N. oculata* merupakan mikroalga laut uniseluler yang memiliki peranan sebagai sumber makanan penting dan zat aditif untuk organisme laut. *N. oculata* mengandung protein karbohidrat dan kadar klorofil yang tinggi (Qian, dkk 2013).

Mikroalga *N. oculata* merupakan mikroalga dengan sel berwarna kehijauan tidak motil dan tidak berflagel. Selnya berukuran kecil dan berbentuk bola. *N. oculata* merupakan yang populer untuk rotifer, dan artemia (Kawaroe, 2010).

Mikroalga ini dapat tumbuh baik pada kisaran pH 8-9,5 dan intensitas cahaya 100-1000 lux. *N. oculata* bersifat kosmopolit dapat tumbuh pada salinitas 0-35 ppt. Salinitas optimum untuk pertumbuhannya adalah 25-35 ppt, dan suhu 25-30⁰C merupakan kisaran suhu optimal.

Klasifikasi *N. oculata* menurut Adehoog dan Simon (2001) dalam Anon dkk.(2009) adalah sebagai berikut :

- Filum : Chlorophyta
- Kelas : Eustigmatophyceae
- Ordo : Eustigmales
- Famili : Eustigmaceae
- Genus : *Nannochloropsis*
- Spesies : *Nannochloropsis oculata*



Gambar 2.1 Sel *Nannochloropsis oculata*

(Sumber : Qian, dkk., 2013)

Mikroalga *Nannochloropsis* spp. dapat bertahan dengan salinitas 20 %. Mikroalga ini, memiliki tingkat viabilitas yang lebih tinggi saat perlahan meleleh setelah *crypreservasi* menggunakan kecepatan pendinginan 16°C /menit. Kondisi pertumbuhan optimum dari mikroorganisme ini juga diperkirakan pada 21°C . Asam lemak yang terkandung dalam *Nannochloropsis* sebanyak 42,315 % merupakan palmitoleate. Menurut hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Kawaroe dkk (2009), kandungan senyawa asam lemak *Nannochloropsis* spp. diantaranya adalah asam kapriat (0,30%), Asam laurat (0,99%), Asam myristat (7,06%), Asam palmitat (23,07%), Asam oleat (12,25 %), Asam palmitoleat (42,32%) dan Asam linoleat (2,47%).

2.2 Faktor-faktor Pertumbuhan

Menurut Kawaroe dkk (2010) pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan antara lain temperatur (suhu), kualitas dan kuantitas nutrien (unsur hara), intensitas cahaya, derajat keasaman (pH), aerasi (sumber CO_2) dan salinitas.

2.2.1 Suhu

Suhu optimal untuk kultivasi mikroalga antara $24\text{-}30^{\circ}\text{C}$, dan bisa berbeda-beda bergantung lokasi, komposisi media yang digunakan serta jenis mikroalga yang dikultivasi. Namun sebagian besar mikroalga dapat mentoleransi antara $16\text{-}35^{\circ}\text{C}$, suhu dibawah 16° dapat memperlambat pertumbuhan dan suhu diatas 35°C dapat menimbulkan kematian pada beberapa spesies mikroalga. Suhu optimal bagi pertumbuhan mikroalga adalah $25\text{-}40^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Nutrien (Unsur Hara)

Unsur hara yang dibutuhkan mikroalga terdiri dari mikronutrien dan makronutrien. Makronutrien antara lain C (Karbon), H (hidrogen), N (nitrogen), P (fosfor), K(kalium), S (sulfur), Mg (magnesium) dan Ca (Kalsium). Setiap unsur hara makro dan mikro ini mempunyai fungsi pada pertumbuhan mikroalga. Unsur N dalam medium kultur berfungsi untuk membentuk protein, lemak dan hijau daun (klorofil). Unsur P untuk membentuk senyawa DNA dan RNA, unsur K memperkuat organ mikroalga, memperlancar metabolisme dan penyerapan makanan, unsur S berperan dalam pembentukan asam amino dan vitamin, unsur Ca berperan membantu dinding sel, mengatur permeabilitas membran, unsur Mg berperan dalam pembentukan klorofil, pembentukan karbohidrat, lemak dan vitamin. Sedangkan mikronutrien yang dibutuhkan antara lain adalah Fe, Cu, Zn, Cl, Mo, dan B. Unsur Fe biasanya diberikan dalam bentuk senyawa dan berfungsi sebagai penyangga kestabilan pH medium dan berperan dalam pembentukan klorofil, Mn berperan sebagai aktivator enzim, unsur Zn berperan sebagai aktivator enzim dan penyusunan klorofil, unsur Cu berperan sebagai bagian enzim fenolase, laktase dan aksorbat oksidase, unsur B berfungsi dalam translokasi karbohidrat, sebagai aktivator dan inaktivator zat pengatur tumbuh, unsur Cl berperan sebagai ion yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim, Mo berperan dalam membentuk enzim reduktase, sintesis asam aksorbat dan ikut dalam metabolisme fosfor. Selain itu mikroalga juga memerlukan mikronutrien organik berupa unsur vitamin yang menunjang pertumbuhannya, antara lain biotin, Cobalamin (B12) dan Thiamin (Kawaroe, 2010).

2.2.3 Intensitas Cahaya

Intensitas cahaya yang diperlukan bergantung volume kultivasi dan densitas mikroalga. Intensitas cahaya untuk kultivasi pada erlenmeyer adalah 1.000 lux, sedangkan untuk intensitas cahaya 5.000-10.000 lux diperlukan untuk volume kultivasi yang lebih besar.

2.2.4 Aerasi

Aerasi dibutuhkan untuk mencegah terjadinya sedimentasi pada sistem kultivasi mikroalga, selain itu juga untuk memastikan bahwa semua sel mikroalga mendapat cahaya dan nutrisi yang sama dimanapun berada, untuk menghindari stratifikasi suhu dan tercampurnya air dengan suhu berbeda, dan untuk meningkatkan pertukaran cahaya antara medium kultivasi dan udara.

2.2.5 Salinitas

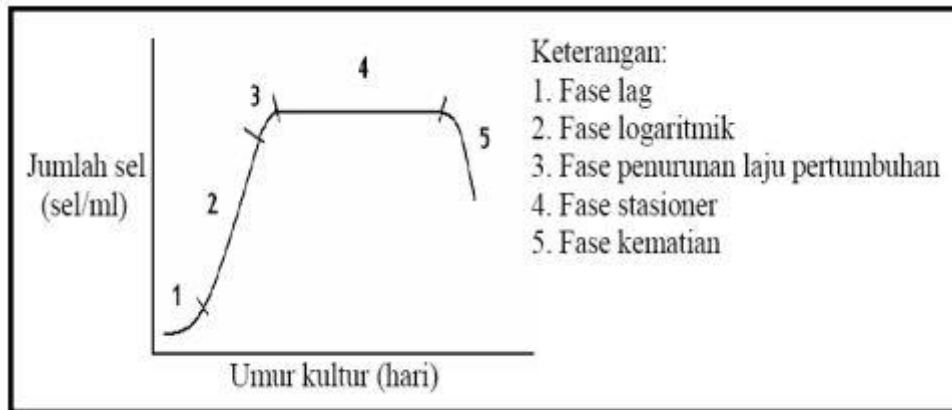
Salinitas air adalah salah satu faktor yang berpengaruh terhadap organisme air dalam mempetahankan tekanan osmotik yang baik antara protoplasma organisme dengan air sebagai lingkungan hidupnya. Beberapa jenis mikroalga yang mengalami perubahan salinitas akibat pemindahan dari lingkungan bersalinitas rendah ke lingkungan yang bersalinitas tinggi akan mendapat hambatan dalam proses fotosintesis.

2.2.6 Derajat Keasaman (pH)

Menurut (Boyd 1990), kesetimbangan karbonat akan bertindak sebagai pH *buffer* (penyangga). Dalam keadaan basa, ion bikarbonat akan membentuk ion karbonat dan melepaskan ion hidrogen yang bersifat asam, sehingga keadaan menjadi netral. Sebaliknya dalam keadaan terlalu asam, ion karbonat akan mengalami hidrolisis menjadi ion bikarbonat dan melepaskan ion hidrogen oksida yang bersifat basa. Rata-rata pH untuk kultivasi sebagian besar spesies mikroalga antara 7-9, dengan optimum rata-rata pH berkisar antara 8,2-8,7.

2.3 Fase-Fase Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dalam medium ditunjukkan oleh bertambahnya jumlah sel, jumlah sel tersebut dapat diketahui dengan cara dihitung dengan menggunakan metode Turbidimetri (berdasarkan kekeruhan) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm, selain itu juga dapat diketahui konsentrasi biomassa berat kering per ml yang diperoleh dengan cara disentrifugasi kemudian dikeringkan, ada empat fase pertumbuhan mikroalga (Hadi, 2012) yaitu:



Gambar 2.2 Fase Pertumbuhan Mikroalga

(Sumber: Dori, 2011).

2.3.1 Fase lag

Fase awal pertumbuhan dan laju pertumbuhan spesifik berada pada sub-medium, pada fase ini terjadi penyesuaian lingkungan karena terjadinya perubahan konsentrasi nutrisi dari inokulum sehingga menjadi kultur yang lebih besar.

2.3.2 Fase logaritmik atau eksponensial

Fase ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan dan mulai untuk tumbuh dan berkembang mengikuti deret eksponensial atau logaritmik selama masih terdapat nutrisi dan faktor-faktor lain yang menunjang pertumbuhan.

2.3.3 Fase stasioner

Fase ketika pembelahan sel mulai berkurang dimana ketersediaan nutrisi sudah mulai berkurang, dan kondisi lingkungan sudah tidak optimal, pada periode ini terjadi akumulasi zat-zat metabolisme sekunder seperti polisakarida, lipid dan zat bioaktif lainnya. Kepadatan biomasa pada fase stasioner lebih tinggi dibandingkan fase logaritmik. Saat fase stasioner, kepadatan sel menjadi konstan dan maksimum. Hal ini disebabkan karena berkurangnya nutrisi dan intensitas cahaya akibat bayangan dari populasi selnya sendiri, sehingga laju pertumbuhan setara dengan laju kematian.

2.3.4 Fase kematian

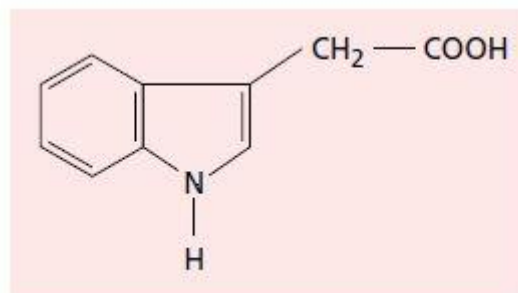
Fase ketika jumlah sel menurun drastis dikarenakan habisnya nutrisi, munculnya kontaminan dan lingkungan yang sudah tidak mendukung.

2.4 *Indole Acetic Acid (IAA)*

Indole Acetic Acid merupakan salah satu hormon tumbuh yang berperan untuk memacu pertumbuhan sepanjang sumbu longitudinal. Hal spesifik yang terlihat berupa peningkatan pembesaran sel yang berlangsung ke segala arah secara isodiametrik. Auksin juga berperan dalam pembelahan dan pembentangan sel (Wattimena, 1991; Wijayati, 2005).

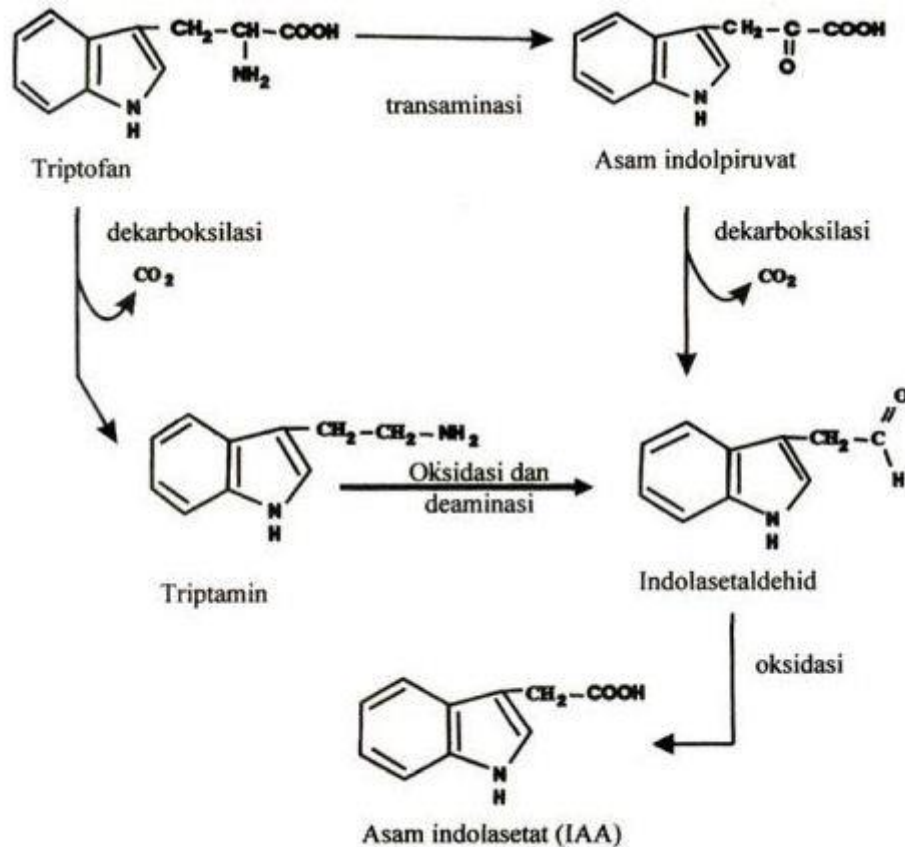
Indole Acetic Acid berfungsi untuk merangsang pertumbuhan dan pemanjangan sel. Hormon *Indole Acetic Acid* merangsang pemanjangan sel dengan berikatan ke suatu reseptor di dalam membran plasma. *Indole Acetic Acid* merangsang pertumbuhan sel dalam konsentrasi tertentu, karena pada konsentrasi yang tinggi *Indole Acetic Acid* dapat menghambat pemanjangan sel (Campbell, 2008).

Indole Acetic Acid juga mengubah ekspresi gen dengan cepat, sehingga menyebabkan sel-sel di daerah pemanjangan menghasilkan protein-protein baru dalam waktu beberapa menit. Beberapa dari protein-protein ini adalah faktor-faktor transkripsi berusia pendek yang menekan atau mengaktivasi ekspresi gen-gen yang lain. (Campbell, 2008).



Gambar 2.3 Struktur *Indole Acetic Acid*

(Sumber : Taiz dan Zeiger., 2002)



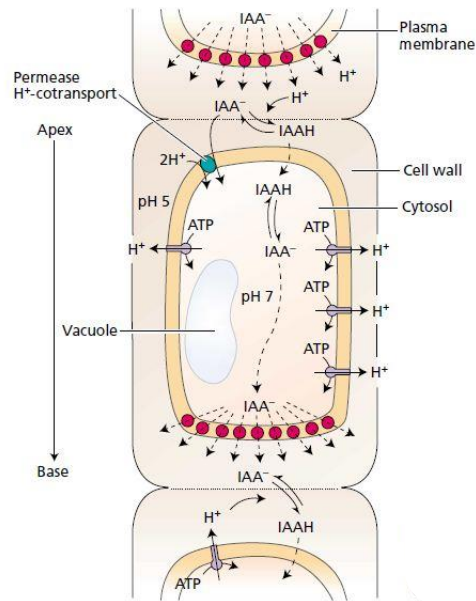
Gambar 2.4 Biosintesis *Indole Acetic Acid*

(Sumber : Salisbury dan Ross.,1995)

Jalur biosintesis *IAA* dimulai dari gugus amino bergabung dengan sebuah asam alfa-keto melalui reaksi transaminasi menjadi asam indolpiruvat, kemudian dekarboksilasi indolpiruvat membentuk indolasetaldehid, akhirnya indolasetaldehid dioksidasi menjadi *IAA* (Salisbury dan Ross, 1995).

Berdasarkan penelitian Piotrowska (2013) bahwa pemberian fitohormon auksin *IAA* dapat meningkatkan jumlah pertumbuhan mikroalga *Chlorella Vulgaris* dibandingkan dengan kontrol.

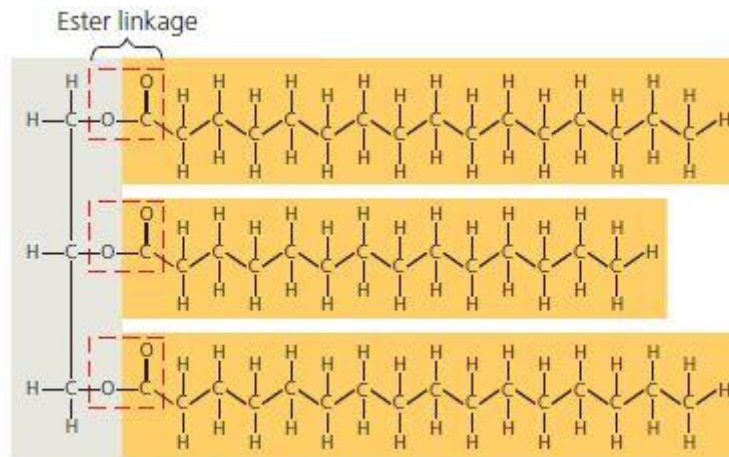
Fitohormon *IAA* dapat meningkatkan pertumbuhan, pembesaran sel, dan pembelahan sel (Park, 2013).



Gambar 2.5 Mekanisme Transpor *Indole Acetic Acid*
 (Sumber : Taiz dan Zeiger., 2008)

2.5 Lipida

Lipida terdiri dari gliserol dan asam lemak. Gliserol adalah sejenis alkohol yang memiliki tiga karbon, yang masing-masing mengandung sebuah gugus hidroksil. Asam lemak memiliki kerangka karbon yang panjang, umumnya 16 sampai 18 atom karbon panjangnya. Salah satu ujung asam lemak itu adalah "kepala" yang terdiri atas suatu gugus karboksil. Gugus fungsional yang menyebabkan molekul ini disebut asam lemak yang berikatan dengan gugus karboksil itu adalah hidrokarbon panjang yang disebut "ekor". Ikatan C-H nonpolar yang terdapat pada ekor asam lemak itu menyebabkan lemak bersifat hidrofobik (Campbell, 2008).



Gambar 2.6 Struktur Lipida

(Sumber : Campbell dkk., 2008)

Dalam pembentukan lipida, tiga asam lemak masing-masing berikatan dengan gliserol melalui ikatan ester, suatu ikatan antara gugus hidroksil dan gugus karboksil. Asam lemak-asam lemak dalam suatu molekul lemak bisa sama ketiga-tiganya (Gambar 2.6) atau bisa terdiri atas dua atau tiga jenis asam lemak yang berlainan.

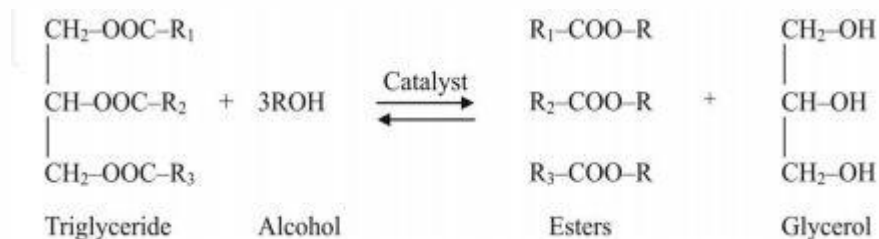
Lipida disintesis dari karbohidrat dan protein, karena dalam metabolisme ketiga zat tersebut bertemu didalam daur Krebs. Pertemuan di dalam daur Krebs berlangsung melalui pintu gerbang utama siklus Krebs, yaitu Asetil Ko-enzim A, sintesis lipida dari karbohidrat dimulai dari penguraian glukosa menjadi piruvat sehingga menghasilkan gliserol, pada tahapan tersebut terjadi pemutusan ikatan fosfat dari ATP, kemudian pembentukan isomerasi glukosa-6-fosfat, kemudian terjadi fosforilasi kedua dibutuhkan ATP kemudian terjadi reaksi pemutusan menjadi 2triosafosfat proses tersebut dikatalis oleh enzim *triosefosfat isomerase*. Pembentukan malonil Ko-A dari asetil Ko-A biasanya sebagai reaksi pertama biosintesis lipida yang dikatalis oleh karboksilase asetil Ko-A. Malonil Ko-A ditransfer ke kofaktor protein. Tahap kedua glukosa diubah menjadi gula fosfat kemudian menjadi asetil ko-A sehingga menghasilkan asam lemak seiringan dengan itu terjadi pula transfer fosfat untuk membentuk kembali ATP. Gliserol dan Asam lemak jika digabungkan akan menghasilkan lipida (Campbell dkk., 2002).

Tabel 1.1 Kadungan lipida mikroalga

Mikroalga	Kandungan Lipida (% Berat Kering)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Chrythecodinium cohni</i>	20
<i>Cylindrotecha</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetracelmis sueica</i>	15-23

(Sumber : Chisty., 2007)

Lipida yang terdapat pada mikroalga dapat digunakan sebagai bahan baku biofuel dan biodiesel. Mikroalga mampu menghasilkan lemak 200 kali lebih banyak dibandingkan dengan tumbuh-tumbuhan penghasil lemak (jarak pagar, kelapa sawit dll) pada kondisi terbaiknya. Semua jenis alga memiliki komposisi kimia sel yang terdiri dari protein, karbohidrat, asam lemak dan asam nukleat (Rachmaniah dkk, 2010).

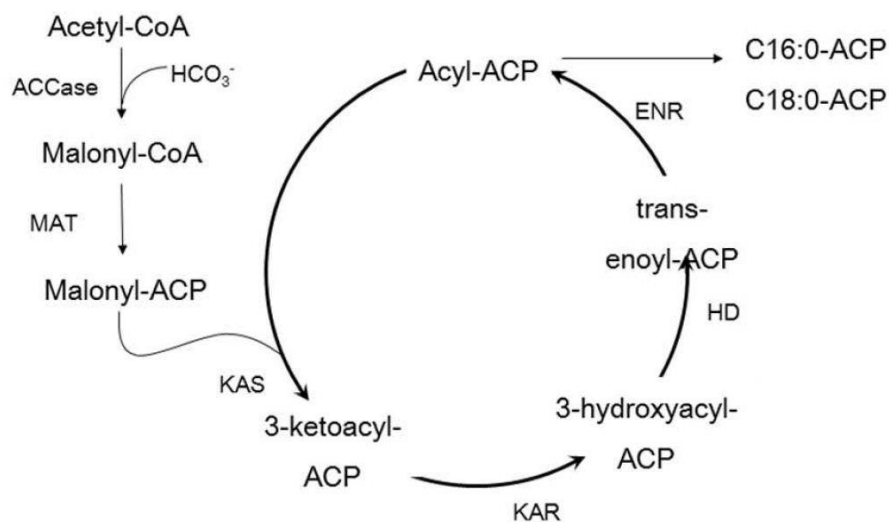


Gambar 2.7 Transerifikasi Lipida

(Sumber : Liu dkk., 2010)

Biodiesel terdiri dari *Fatty Acids Metil Ester* (FAME) yang berasal dari *Triacylglycerol* (TAG) dimana tiga molekul asam lemak akan diesterifikasi dengan molekul gliserol. Dalam membuat biodiesel, trigliserida bereaksi dengan metanol sebagai reaksi yang dikenal sebagai reaksi transesterifikasi atau alkoholisis. Transesterifikasi memproduksi gliserol, *fatty acids metil ester* dan biodiesel. Tahap terjadinya reaksi tersebut yaitu pertama trigliserida akan diubah menjadi digliserida, kemudian menjadi monogliserida dan akhirnya ke gliserol (Chisty, 2007).

Transesterifikasi dikatalisis oleh asam alkali (Fukuda dkk., 2001 ; Meher dkk., 2006) dan enzim lipase (Sharma dkk., 2001). Transesterifikasi memerlukan 3 mol alkohol untuk masing-masing mol trigliserida serta untuk menghasilkan 1 mol gliserol dan 3 mol metil ester. Reaksi yang dihasilkan adalah seimbang. Proses pembentukannya menggunakan 6 mol metanol untuk setiap mol trigliserida. Metanol yang berlebih dari reaksi ini akan didorong ke arah metil ester yaitu ke arah biodiesel (Fukuda dkk., 2001).



Gambar 2.8 Biosintesis Lipida

(Sumber : Liu dkk., 2010)

Biosintesis lipida dimulai dari acetyl CoA yang merupakan dasar rantai asil yang berfungsi sebagai substrat untuk karboksilasi acetyl CoA dan juga substrat untuk reaksi kondensasi awal. Formasi dari malonil CoA dari acetyl CoA umumnya dianggap sebagai reaksi pertama biosintesis asam lemak, yang dikatalisis oleh acetyl CoA carboxylase (ACCase) kelompok malonil. Malonil CoA dipindahkan ke protein co-factor, asil carrier protein (ACP), menghasilkan pembentukan ACM malonil yang masuk ke dalam serangkaian reaksi kondensasi dengan asil ACP, menghasilkan pembentukan (atau acetyl CoA). Reaksi kondensasi pertama dikatalisis oleh ACP-3cetoacyl synthase III (KAS III), membentuk produk empat karbon. KAS I dan KAS II mengkatalisis setiap kondensasi berikutnya setelah kondensasi, produk 3-cetoacyl-ACP berkurang, dan dikurangi lagi dengan 3-ketoacyl-ACP reductase,3-

2.6 Klorofil

Klorofil adalah salah satu senyawa bioaktif yang bermanfaat yang dapat diekstraksi dari biomassa mikroalga. Klorofil mikroalga dapat berguna sebagai pewarna alami yang memiliki antioksidan dan bersifat antimutagenik. Klorofil terdiri dari klorofil a dan klorofil b. Klorofil menyerap cahaya pada spektrum merah dan biru serta memancarkan warna hijau (Hosikian, 2010).

Klorofil merupakan pigmen kehijauan yang mengandung cincin porfirin, molekul bentuk cincin stabil yang dikelilingi oleh elektron bebas. Karena elektron bebas bergerak, maka berpotensi untuk melepaskan elektron dan mendapatkan elektron dengan mudah, sehingga berpotensi menyediakan elektron berenergi untuk molekul lain. Klorofil optimum menyerap cahaya merah pada gelombang 435 nm dan cahaya biru pada gelombang 670 nm. Terdapat beberapa jenis klorofil yang dimiliki oleh mikroalga yaitu klorofil a, klorofil b dan klorofil c pada alga hijau keemasan (Salim, 2005).

Klorofil pada mikroalga merupakan pigmen berwarna hijau untuk proses fotosintesis untuk menghasilkan energi. Klorofil bersifat larut dalam lipida karena keberadaan gugus fitolnya ($C_{20}H_{39}OH$). Klorofil sangat peka terhadap cahaya dan panas. Pemanasan dapat mengakibatkan denaturasi protein sehingga klorofil yang berikatan kompleks dengan protein tidak terlindungi. Pengerjaan klorofil harus dikerjakan diruangan redup cahaya atau gelap yang aman dan sejuk (Walter, 2009).

