

BAB III

METODE

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2016 - Januari 2017 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati, Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu labu Erlenmeyer 250 ml, 500 ml, dan 1000 ml, botol plastik 600 ml, kaca arloji, tabung reaksi, sikat tabung, rak tabung, spatula, timbangan analitik, spektrofotometer, gelas ukur 10 ml dan 250 ml, *beaker glass* 500 ml dan 100 ml, corong pisah, aerator, selang aerasi, lampu neon 40 Watt, termometer, higrometer, pH indikator, luxmeter, *handcounter*, pipet tetes, kompor listrik, mikroskop, *cover glass*, voutex, sentrifugasi, lumpang dan alu.

Bahan yang digunakan adalah sampel mikroalga strain LIPI jenis *Nannochloropsis oculata*, Medium F/2, heksana, etanol 95%, metanol, flokulan (FeCl_3), dan Aquadest

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yang disusun secara faktorial.

Faktor pertama adalah pemberian konsentrasi IAA yang bervariasi yaitu:

- Konsentrasi IAA 0 ppm (I1)
- Konsentrasi IAA 5 ppm (I2)
- Konsentrasi IAA 10 ppm (I3)
- Konsentrasi IAA 15 ppm (I4)
- Konsentrasi IAA 20 ppm (I5)

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk mengkultur di sterilisasikan menggunakan air, deterjen dan kloroks selama 24 jam. Kemudian di autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 Psi (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

3.4.2 Pembuatan Medium F/2

Medium yang digunakan dalam kultivasi mikroalga yaitu f/2 yang mempunyai komposisinya terdiri atas makronutrien yaitu NaNO_3 , NaH_2PO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2MoO_4 , serta kelompok vitamin terdiri dari vitamin B12 (*Cyanocobalamine*), Thiamine HCL, dan Biotin. Menurut Guliard (1975) pembuatan media F/2 dilakukan dengan cara mencampurkan bahan-bahan kimia tersebut ke dalam air salinitas. Kemudian medium tersebut dihomogenkan setelah itu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan ditutup rapat menggunakan *aluminium foil* setelah itu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

3.4.3 Pembuatan Stok Larutan IAA

IAA yang digunakan masih berbentuk bubuk yang kemudian akan diubah menjadi bentuk larutan. Konsentrasi larutan IAA yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm dan 20 ppm dengan volume penggunaan 1 ml/L. Proses pembuatan stok larutan IAA dimulai dengan penimbangan IAA sebanyak 200 mg lalu dilarutkan dalam 100 ml aquades. Larutan IAA kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer sambil disaring dengan kertas saring. Erlenmeyer yang berisi larutan IAA kemudian ditutup dengan *aluminium foil* lalu disterilkan menggunakan autoklaf kemudian dipindahkan ke gelas ukur sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan yaitu 5, 10, 15, dan 20 mg / l disiapkan dari larutan stok (Ozioko, 2015).

3.4.4 Persiapan Kultur

Kultur *N. oculata* murni yang didapatkan dari koleksi Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, UIN Sunan Gunung Djati Bandung. Kemudian ditumbuhkan kembali dalam medium F/2. Kultur diperbanyak pada media F/2 500

ml, diinkubasi pada suhu $\pm 27^{\circ}\text{C}$, pH $\pm 6-7$, selama 4-7 hari. Kemudian diperbanyak secara berkala dengan cara subkultur setiap periode 5 hari hingga di dapat kultur yang cukup agar dapat digunakan untuk keperluan selama proses penelitian (Dori, 2011).

3.4.5 Kultur *N. oculata*

N. oculata yang telah diperbanyak kemudian dimasukkan ke dalam medium F/2 dan volume kultur 400 ml. Kemudian divariasikan perlakuan penambahan IAA, IAA = 0 mg/L (kontrol), IAA 2 mg/l, IAA4 mg/l, IAA 6 mg/l, IAA8 mg/l, kemudian dikultur dalam ruangan dengan menyesuaikan pH, suhu dan intensitas cahaya. Pencahayaan dilakukan 24 jam kemudian diaerasi menggunakan aerator, setelah itu diamati pertumbuhan *N. oculata* dan kadar lipida *N. oculata*.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga diamati dengan menghitung kepadatan sel mikroalga setiap hari dengan menggunakan metode Turbidimetri (berdasarkan kekeruhan) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

3.5.2 Berat Basah dan Berat Kering

Pemanenan *N. oculata* dilakukan dengan cara sentrifugasi. Sebanyak 200 ml kultur mikroalga disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 3 menit, endapannya diambil dan dimasukkan ke dalam plastik yang sebelumnya telah diketahui beratnya dan kemudian ditimbang, berat biomassa diasumsikan sebagai berat basah, kemudian dikeringkan dalam suhu ruangan selama 48 jam dengan suhu 27°C . Berat mikroalga yang telah kering setelah dikering anginkan kemudian ditimbang kembali dengan timbangan (Salim, 2013).

3.5.3 Pengukuran Kadar Klorofil

Sebanyak 10 ml kultur mikroalga *N. oculata* disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapannya lalu diambil. Endapan diesktraksi dengan menggunakan alkohol 96 % sehingga volume akhir menjadi 5 ml

dan dimasukkan ke dalamnya beberapa butir *glass bead*. Penggunaan *glass bead* bertujuan untuk memecah dinding sel. Suspensi tersebut kemudian divorteks selama 10 menit dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian diambil untuk diukur absorbansinya dengan menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 663 nm dan 645 nm. Kadar klorofil (mg/l) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (Lee, dkk., 2013).

$$\text{Klorofil A (mg/l)} = 13,7 A_{665} - 5,67 A_{649}$$

$$\text{Klorofil B (mg/l)} = 22,9 A_{645} - 4,64 A_{665}$$

$$\text{Klorofil total} = (20,0 A_{649}) + (6,10 A_{665})$$

3.5.4 Kadar Lipida

Pengukuran kadar lipida menggunakan metode Bligh dan Dyer (1959) biomassa kering ditimbang sebanyak 10 mg, lalu diekstraksi dengan 5 ml campuran pelarut kloroform (Cl_3CH), methanol (MeOH), akuades (H_2O) dengan perbandingan (1:20:0,8 v/v/v) kemudian dimasukkan ke dalam botol sentrifugasi 10 ml. Setelah itu sampel disentrifugasi 10 ml yang lain dan ditambah kloroform (Cl_3CH): metanol (MeOH) : air (H_2O) sampai total volume 5,7. Untuk mendapatkan pemisahan fase, sebanyak 1,5 ml akuades ditambahkan kemudian dihomogenkan dan untuk mendapatkan pemisahan fase yang terbaik sampel disentrifugasi. Lapisan hijau kloroform secara hati-hati dipisahkan dengan pipet Pasteur. Bobot lemak ditentukan dengan menuangkan lemak terlarut ke dalam botol kecil (vial) yang telah ditimbang terlebih dahulu, dan dikeringkan. Botol yang berisi lemak kering kemudian ditimbang kembali setelah disimpan selama 24 jam untuk menguapkan pelarutnya. Nilai lipid didapat dari selisih antara berat botol kosong dan berat kosong + lipid (Bligh dan Dyer, 1959). Perhitungan % total lipida mikroalga (Chrismadha, 2006) adalah:

$$\% \text{ Total lipid} = \frac{Dw}{Bw} \times 100$$

Keterangan:

Dw = Bobot Kering lipida (g)

Bw = Biomassa kering yang ditimbang (g)

3.6 Analisis Data

Data-data berupa biomassa dan kadar lipida yang dihasilkan, selanjutnya dianalisis secara statistik. Analisa data yang digunakan adalah uji variansi dan jika terdapat beda nyata pada selang kepercayaan 95% dari perlakuan tersebut, maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji jarak berganda *Duncan*. Sedangkan laju pertumbuhan mikroalga *Nannochloropsis oculata* dihitung menggunakan persamaan regresi kuadratik untuk memperoleh nilai pembelahan sel per hari. Proses pengolahan data menggunakan software SPSS Series 16.0.

