

# PENGARUH KOMBINASI CEKAMAN NITROGEN DAN FOTOPERIODE TERHADAP BIOMASSA, KANDUNGAN KUALITATIF TRIASILGLISEROL DAN PROFIL ASAM LEMAK MIKROALGA *Nannochloropsis* sp.

Dini Ermavitalini<sup>1</sup>; Sumarni Dwirejeki<sup>2</sup>; Sri Nurhatika<sup>1</sup>; Triono Bagus Saputro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

<sup>2</sup> Alumni Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

## Abstract

*Biodiesel is a promising alternative fuel obtained from plant oils and animal fats through esterification with alcohol. Nannochloropsis sp. is a high (90%) marine triacylglycerol (TAG) producing microalgae under stress conditions. Production of lipid TAG and fatty acid composition of Nannochloropsis sp. can be engineered with abiotic stress. This study aims to examine the effect of nitrogen stress and photoperiod on biomass, chlorophyll content, fatty acid profile, and qualitative content of TAG. Nannochloropsis sp. cultivated from starter cultures were then treated in variations of nitrogen stress (N100, N75, N50, N25 and N0) with bright photoperiods: dark (12:12; 16: 8 and 24: 0) as a two-factor complete randomized study design. Data retrieval of all research parameters is carried out at the final exponential stage. The results showed the interaction of the two factors did not affect the biomass of Nannochloropsis sp. but it affects the chlorophyll content of chlorophyll content P14 (N100, 16: 8) of 7.367 mg / L not significantly different from treatment P6 (N25, 24: 0) of 3.339 mg / L and treatment P15 (N100, 24: 0) of 5,665 mg / L. All treatment combinations show the TAG content qualitatively with Nile Red staining. The observation of fatty acid profiles with GCMS showed that treatment P14 (N100, 16: 8) contained more varied fatty acids compared to P1 (N0, 12:12), P2 (N0, 16: 8), P8 (N50, 16: 8) , P10 (N75, 12:12) which consists of lauric acid, hexanoic acid, palmitic acid, linoleic acid, oleic acid, stearic acid, eicosanoic acid.*

Keyword : *Nannochloropsis* sp., interaction of nitrogen stress and photoperiod, biomass, chlorophyll, fatty acid.

## Abstrak

*Biodiesel adalah bahan bakar alternatif menjanjikan yang diperoleh dari minyak tumbuhan dan lemak binatang melalui esterifikasi dengan alkohol. Nannochloropsis sp. merupakan mikroalga laut penghasil lipid triasilgliserol (TAG) tinggi (90%) pada kondisi cekaman. Produksi lipid TAG dan komposisi asam lemak Nannochloropsis sp. dapat direkayasa dengan cekaman abiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh stres nitrogen dan fotoperiode terhadap biomassa, kandungan klorofil, profil asam lemak, dan kandungan kualitatif TAG. Nannochloropsis sp. dikultivasi dari kultur starter kemudian diperlakukan dalam variasi cekaman nitrogen (N100, N75, N50, N25 dan N0) dengan fotoperiode terang :*

gelap (12:12; 16:8 dan 24:0) sebagai rancangan penelitian acak lengkap dua faktor. Pengambilan data semua parameter penelitian dilakukan pada tahap eksponensial akhir. Hasil penelitian menunjukkan interaksi kedua faktor tidak mempengaruhi biomassa *Nannochloropsis* sp. tetapi mempengaruhi kandungan klorofil yaitu kandungan klorofil P14 (N100, 16: 8) sebesar 7.367 mg /L tidak berbeda secara signifikan dengan perlakuan P6 (N25, 24: 0) sebesar 3,339 mg / L dan perlakuan P15 (N100, 24: 0) sebesar 5,665 mg/L. Semua kombinasi perlakuan menunjukkan kandungan TAG secara kualitatif dengan pewarnaan Nile Red. Hasil pengamatan profil asam lemak dengan GCMS menunjukkan perlakuan P14 (N100, 16: 8) mengandung asam lemak lebih bervariasi dibandingkan dengan P1 (N0, 12:12), P2 (N0, 16: 8), P8 (N50, 16 : 8), P10 (N75, 12:12) yang terdiri dari asam laurat, asam heksanoat, asam palmitat, asam linoleat, asam oleat, asam stearat, asam eikosanoat.

Kata kunci : *Nannochloropsis* sp., interaksi cekaman nitrogen dan fotoperiode, biomassa, klorofil, TAG, asam lemak

## I. Pendahuluan

Krisis energi saat ini terjadi karena tingginya tingkat konsumsi energi masyarakat meliputi bidang industri, transportasi dan rumah tangga. Pemenuhan kebutuhan energi masyarakat Indonesia hampir seluruhnya berasal dari bahan bakar fosil. Di sisi lain sumber energi fosil di Indonesia dan dunia pada umumnya sangat terbatas ketersediaannya saat ini, sehingga sumber energi alternatif dibutuhkan untuk menggantikannya yaitu salah satunya biodiesel [1]. Biodiesel dapat diperoleh dari minyak bekas, tumbuhan atau lemak binatang melalui proses esterifikasi dengan alkohol [2]. Bagaimanapun, sumber lipid dari tumbuhan seperti minyak jarak (*Jatropha curcas*), minyak sawit (*Elaeis guineensis*) serta beberapa lipid hewani masih memiliki kendala untuk dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel akibat adanya kapasitas oksidasi yang rendah pada temperatur rendah [3] dan kecepatan pertumbuhan tanaman dan hewan yang relatif lambat [4]. Untuk

mengatasi keterbatasan tersebut, mikroalga atau fitoplankton dapat digunakan sebagai alternatif sumber bahan baku biodiesel [5]. Salah satu mikroalga laut yaitu *Nannochloropsis* sp. memiliki kandungan lipid mencapai 12.0-53.0 % per gram berat kering biomassa akan tetapi pada kondisi cekaman, kandungan lipid *Nannochloropsis* sp. akan mampu mencapai 90 % per gram berat kering [5]; [6] , sangat lebih tinggi dibandingkan kandungan lipid tanaman Jarak sebesar 35 % per gram berat kering [7] dan tanaman sawit sebesar 75.6 % per gram berat kering [8]. Mikroalga memproduksi banyak *polyunsaturates fatty acid* (PUFA), dimana semakin tinggi kandungan PUFA akan mengurangi kestabilan oksidasi dan nilai cetane biodiesel yang dihasilkan. Di lain pihak, PUFA memiliki titik cair yang lebih rendah dibandingkan *monounsaturated fatty acid* (MUFA) dan asam lemak jenuh sehingga biodiesel dari mikroalga akan lebih baik pada cuaca dingin dibandingkan jenis bahan baku alami yang lain [3]. Dengan

demikian diperlukan rekayasa untuk menghasilkan komposisi asam lemak jenuh dan asam lemak monounsaturated pada mikroalga sekaligus meningkatkan jumlah triasilgliserol untuk menghasilkan biodiesel yang unggul dalam pemrosesan dan aplikasinya. Rekayasa metabolisme yang dapat menginduksi peningkatan triasilgliserol dan perubahan komposisi asam lemak pada mikroalga antara lain cekaman pengurangan nutrisi berupa nitrogen dan fosfor, cekaman temperatur, cekaman osmotik, cekaman salinitas dan pH, cekaman logam berat, perubahan intensitas cahaya, siklus terang/gelap dan paparan radiasi sinar UV dan sinar gamma [9]. Dengan adanya cekaman tersebut maka sel mikroalga akan mengubah kemampuan pertumbuhan biomassa menjadi penyimpanan lipid netral triasilgliserol yang merupakan prekursor dalam pembuatan biodiesel sebagai bentuk pertahanan terhadap kondisi lingkungan yang tidak ideal [10]. Hal ini terjadi sebagai akibat perubahan jalur biosintesis lipid yang mengarahkan pada pembentukan dan akumulasi lipid netral dalam bentuk TAG sebagai bentuk pertahanan pada kondisi cekaman abiotik [11]. Ketika pertumbuhan sel berjalan melambat karena keterbatasan nutrisi, maka kumpulan akseptor elektron utama pada proses fotosintesis yaitu NADP<sup>+</sup> menjadi habis. Fotosintesis sendiri sangat dikontrol oleh cahaya dan tidak bisa dihentikan seketika, maka kondisi habisnya NADP<sup>+</sup>

akan mengakibatkan situasi yang berbahaya bagi sel yang dapat merusak komponen sel. Sehingga NADPH akan dikonsumsi dari sintesis asam lemak dan mengakibatkan terjadi peningkatan asam lemak yang akan disintesis menjadi TAG menggantikan NADP<sup>+</sup> di kondisi yang terbatas [12]. Cekaman fotoperiode dapat meningkatkan kandungan lipid mikroalga dan mempengaruhi fotosintesis dalam produksi biomassa. Kondisi ketersediaan cahaya dibutuhkan saat pembentukan ATP dan NADPH, sedangkan kondisi gelap berpengaruh pada sintesis biokimia meliputi pembentukan protein, karbohidrat dan lemak [9]. Berdasarkan paparan di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah menguji pengaruh kombinasi perlakuan cekaman ketersediaan nitrogen dan fotoperiode terhadap biomassa, kandungan klorofil, kandungan kualitatif TAG dan profil asam lemak *Nannochloropsis* sp.

## 1. Metode Penelitian

### 1.1 Tahap persiapan

Kultur *Nannochloropsis* sp. didapatkan dari Laboratorium Pakan Alami Balai Budidaya Perikanan Air Payau (BBPAP) Situbondo dengan kepadatan 10<sup>7</sup> sel/mL. Media yang digunakan dalam kultur mikroalga *Nannochloropsis* sp. adalah air laut buatan [13] yang telah difilter dan disterilisasi menggunakan autoklaf dan

diatur kondisi salinitas pada 30-32 ppt [14] ; [15], pH 7-8. Semua alat gelas termasuk selang plastik aerator disetrilisasi dengan menggunakan autoklaf. Pupuk Conway dibuat berdasarkan formula yang dimodifikasi oleh [16]. Disiapkan 5 jenis pupuk Conway berdasarkan persentase cekaman nutrient nitrogen ( $\text{NaNO}_3$ ) [17] yaitu N100 atau cekaman nitrogen 0% (100 gram/L), N75 atau cekaman nitrogen 25 % (75 gram/L), N50 atau cekaman nitrogen 50 % (50 gram/L), N25 atau cekaman nitrogen 75 % (25 gram/L) dan N0 atau cekaman nitrogen 100 % (0 gram/L).

### 1.2 Tahap penentuan waktu starter kultur *Nannochloropsis* sp.

Waktu starter ditentukan pada setengah fase eksponensial kultur *Nannochloropsis* sp. yang ditumbuhkan pada kondisi medium tanpa cekaman yaitu  $\text{NaNO}_3$  100 % (100 gram/L) [18]. Kultivasi penentuan waktu starter dilakukan dengan memasukkan 10% kultur *Nannochloropsis* sp. ke dalam medium pertumbuhan optimal *Nannochloropsis* sp. dengan kondisi pH 7, salinitas 30 ppt, fotoperiode 16 terang : 8 gelap dan suhu 28 °C. Setiap 24 jam dilakukan pengukuran OD dengan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 680 nm yang

direpresentasikan sebagai jumlah sel. Kultivasi dilakukan sampai dengan fase kematian yang ditandai dengan terjadinya penurunan nilai OD yang terukur. Hasil pengukuran OD diplot sebagai sumbu Y dan waktu dalam satuan hari diplot sebagai sumbu X. Dari grafik yang dihasilkan akan dapat ditentukan kapan waktu pengambilan starter dilakukan.

### 1.3 Tahap penentuan waktu panen kultur *Nannochloropsis* sp.

Waktu panen kultur *Nannochloropsis* sp. ditentukan pada fase eskponensial akhir, dimana pada saat eksponensial akhir sel secara aktif mengakumulasi makromolekul seperti lipid, karbohidrat dan protein [19]; [20]. Kultivasi dilakukan dengan memasukkan 10 % kultur starter *Nannochloropsis* sp. Kultivasi pada penentuan waktu panen dilakukan pada setiap perlakuan dimana secara keseluruhan terdapat 15 perlakuan dari kombinasi faktor konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  (N0, N25, N50, N75 dan N100) dan faktor fotoperiode terang:gelap (12:12; 16:8 dan 24:0). Perlakuan tersebut adalah perlakuan P1 (N0,12:12), P2 (N0,16:8), P3 (N0,24:0), P4(N25, 12:12), P5(N25, 16:8), P6(N25, 24:0), P7(N50,12:12), P8(N50, 16:8), P9(N50, 24:0), P10(N75, 12:12),

P11(N75, 16:8), P12(N75, 24:0), P13(N100, 12:12), P14(N100,16:8) dan P15(N100,24:0). Setiap ph medium perlakuan diatur pada ph 7, salinitas 30 ppt dan suhu ruang 28 °C. Setiap 24 jam dilakukan pengukuran OD dengan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 680 nm yang direpresentasikan sebagai jumlah sel. Kultivasi dilakukan sampai dengan fase kematian yang ditandai dengan terjadinya penurunan nilai OD yang terukur. Hasil pengukuran OD diplot sebagai sumbu Y dan waktu dalam satuan hari diplot sebagai sumbu X. Dari grafik yang dihasilkan akan dapat ditentukan kapan waktu panen dilakukan pada setiap perlakuan.

#### 1.4 Tahap perlakuan

Setelah diketahui waktu starter dan panen, tahap selanjutnya adalah perlakuan yang sesungguhnya. Terdapat 15 perlakuan sama seperti perlakuan tahap penentuan waktu panen. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 45 unit percobaan. Kultivasi dihentikan sampai waktu panen yaitu fase eksponensial akhir yang didapatkan pada tahap 2.3 pada setiap perlakuan.

#### 1.5 Pengambilan data

Parameter yang diamati dalam penelitian ini antara lain : biomassa, kandungan klorofil, kandungan TAG secara kualitatif dan profil asam lemak *Nannochloropsis* sp. Semua parameter diambil pada masa panen yaitu pada fase eksponensial akhir sebelum kultur memasuki fase stationer.

##### a. Parameter biomassa

Analisa biomassa dilakukan dengan menyaring biomassa *Nannochloropsis* sp. dari 100 ml kultur usia panen [21] ; [20] , menggunakan kertas saring Whatmann 41. Sebelum digunakan untuk menyaring, kerats saring ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui berat kertas saring. Kertas saring bersama biomassa *Nannochloropsis* sp. selanjutnya dikeringkan di dalam oven sampai mencapai berat kering yang konstan. Selisih antara berat kering kertas saring bersama biomassa dengan berat kering kertas saring saja adalah biomassa [22]. Biomassa dinyatakan dalam satuan gram/100 ml.

##### b. Parameter kandungan klorofil

Sampel sebanyak 4 ml diambil dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan sel dimasukkan dalam 4 ml air destilasi untuk menghilangkan garam pada biomassa, kemudian

disentrifugasi. Pencucian dalam air destilasi dilakukan 2 kali [23]. Sampel disuspensikan dalam 4 ml pelarut etanol, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm [23]. Supernatan diambil untuk diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang selombang ( $\lambda$ ) 645 nm dan 665 nm dan 630 nm. Blanko yang digunakan berupa etanol 96% sebagai pembanding [24].

Perhitungan kadar klorofil menggunakan rumus Strickland and Parsons [25] : Klorofil a =  $11,6 E_{665} - 1,31 E_{645} - 0,14 E_{630}$   $\mu\text{g/ml}$

c. Parameter kandungan TAG secara kualitatif

Analisis kandungan triasilgliserol secara kualitatif berupa pendaran warna dilakukan dengan metode Nile Red Fluorometry [26]. Stok Nile Red dibuat dengan cara melarutkan 1 mg serbuk Nile Red ke dalam 10 ml aseton [27]. Biomassa mikroalga yang akan diwarnai, disiapkan dan diwarnai dalam 0.5 ml larutan Nile Red dan diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dalam suhu 4°C selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm [28]. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menggunakan air distilat dengan bantuan sentrifuge. Mikroalga yang telah diwarnai selanjutnya diamati di

atas gelas obyek dan dilakukan pengamatan di bawah mikroskop fluoresense dengan panjang gelombang 450-496 nm [29] ; [30]. Pendaran warna kuning- oranye terang yang terlihat menunjukkan adanya kandungan TAG dalam sel mikroalga secara kualitatif [31].

d. Parameter profil asam lemak

Profil asam lemak dilakukan dengan metode Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). Biomassa mikroalga dikonsentrasikan dengan sentrifugasi selama 7 menit pada 5400 rpm. Biomassa dikeringkan kemudian digerus dengan mortar dan pestel. Ekstraksi dilakukan dengan melarutkan 2 gram mikroalga dalam 75 ml pelarut n-hexane [32]. Mikroalga dilarutkan dalam n-hexane dan dimasukkan dalam tabung derivatisasi. Sampel diuapkan hingga kering dan ditambahkan 1 ml NaOH 2%, kemudian ditutup rapat, divorteks kemudian dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sampel ditambahkan 1 ml BF<sub>3</sub> dalam metanol, ditutup rapat, divorteks, dipanaskan pada suhu 90°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan 1 ml n-hexana, divorteks selama 2 menit dan didiamkan hingga

terbentuk 2 fase yang terpisah. Fasa n-hexane (lapisan atas) diambil hingga volume 1  $\mu$ L dan dimasukkan dalam vial GC untuk dianalisa. Identifikasi asam lemak dilakukan dengan membandingkan hasil puncak yang muncul di kromatogram GCMS, asam lemak dihitung dengan membandingkan luas puncak masing-masing komponen asam lemak terhadap luas total dari keseluruhan puncak yang muncul di kromatogram GC-MS, dan dinyatakan dalam presentase [33].

## II. Hasil dan Pembahasan

Mikroalga *Nannochloropsis* sp. pada penelitian ini memiliki waktu starter pada hari ke-6 berdasarkan grafik pertumbuhan (data tidak ditampilkan). Waktu starter adalah waktu dimana sel membelah secara aktif serta dapat melakukan metabolisme secara maksimal sebelum memasuki fase stasioner maupun kematian sel [34] ; [18]. Starter digunakan sebagai bibit untuk pembuatan kultur baru atau untuk produksi massal mikroalga [35].

Pada penentuan waktu panen didapatkan waktu panen kultur hari ke-6 pada perlakuan P1 (N0, 12:12), P2 (N0, 16:8). Waktu panen kultur hari ke-8 yaitu pada perlakuan P4 (N25, 12:12), P5 (N25, 16:8). Waktu panen kultur hari ke-9 yaitu pada

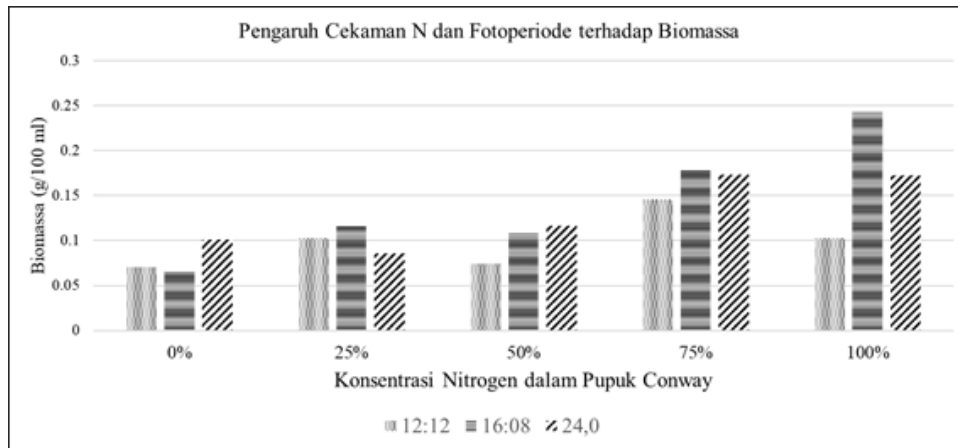
perlakuan P7 (N50, 12:12), P13 (N100, 12:12). Waktu panen kultur hari ke-10 yaitu pada perlakuan P3 (N0, 24:0), P6 (N25, 24:0), P8 (N50, 16:8), P10 (N75, 12:12), P11 (N75, 16:8), P12 (N75, 24:0). Waktu panen kultur hari ke-11 yaitu pada perlakuan P14 (N100, 16:8). Waktu panen kultur hari ke-12 yaitu pada perlakuan P9 (N50, 24:0), P15 (N100, 24:0). Berdasarkan jumlah selnya, mikroalga pada perlakuan pemberian nitrogen 100% memiliki nilai OD (pertumbuhan) yang paling tinggi dibandingkan dengan kultur dengan nitrogen dalam pupuk 75%, 50%, 25% dan 0%. Hal ini berkaitan dengan ketersediaan nutrisi untuk tumbuh serta ketersediaan cahaya untuk fotosintesis dan metabolisme sel lainnya. Pada nitrogen yang terpenuhi, sel mikroalga memiliki laju reproduksi yang tinggi sehingga sel yang terbentuk lebih banyak [21] yang ditunjukkan dengan nilai OD pada spektrofotometer yang lebih tinggi.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, pemberian nitrogen mempengaruhi pertumbuhan *Nannochloropsis* sp. dimana tanpa pemberian nitrogen dengan fotoperiode gelap yang lebih panjang, kultur *Nannochloropsis* sp. memiliki waktu panen yang singkat. Hal ini sesuai dengan literatur yang mengatakan bahwa, kekurangan nitrogen pada alga dapat mempersingkat fase eksponensial alga tersebut [36], sedangkan pemberian nitrogen yang sesuai dan

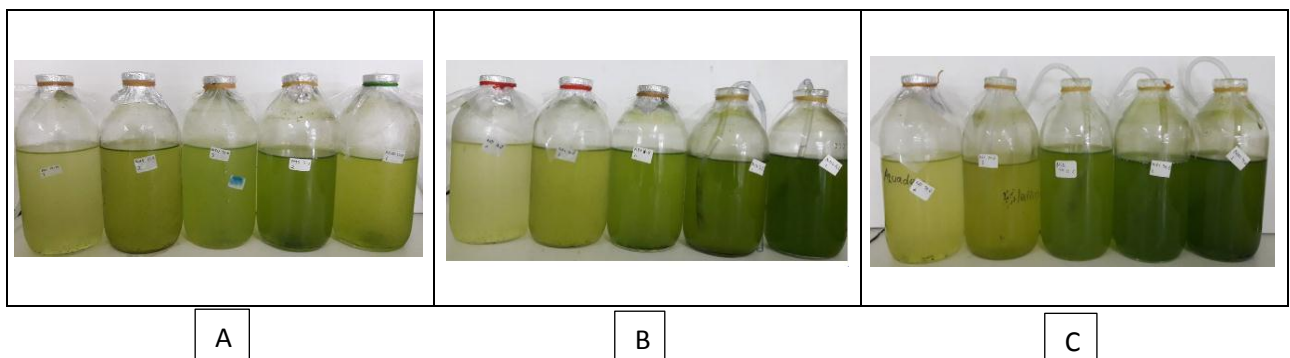
fotoperiode dengan siklus terang yang panjang, kultur *Nannochloropsis* sp. memiliki waktu panen yang lebih lama serta jumlah sel yang lebih banyak karena nutrisi untuk tumbuh sel terpenuhi, sehingga sel dapat membelah sehingga ukuran serta jumlahnya bertambah.

Hasil pengamatan terhadap biomassa menunjukkan bahwa interaksi antara konsentrasi nitrogen dan fotoperiode tidak berpengaruh terhadap biomassa dikarenakan

faktor pertumbuhan mikroalga meliputi nutrisi, aerasi, salinitas, pH, suhu untuk pertumbuhan dari mikroalga tersebut sesuai, sehingga mikroalga memiliki kemampuan untuk mempertahankan hidup dan regenerasi, walaupun jumlahnya lebih sedikit [37]. Sedangkan uji statistik satu faktor menunjukkan bahwa faktor pembatasan nitrogen berpengaruh terhadap biomassa *Nannochloropsis* sp. Berikut adalah diagram hasil penimbangan biomassa *Nannochloropsis* sp. pada berbagai perlakuan.

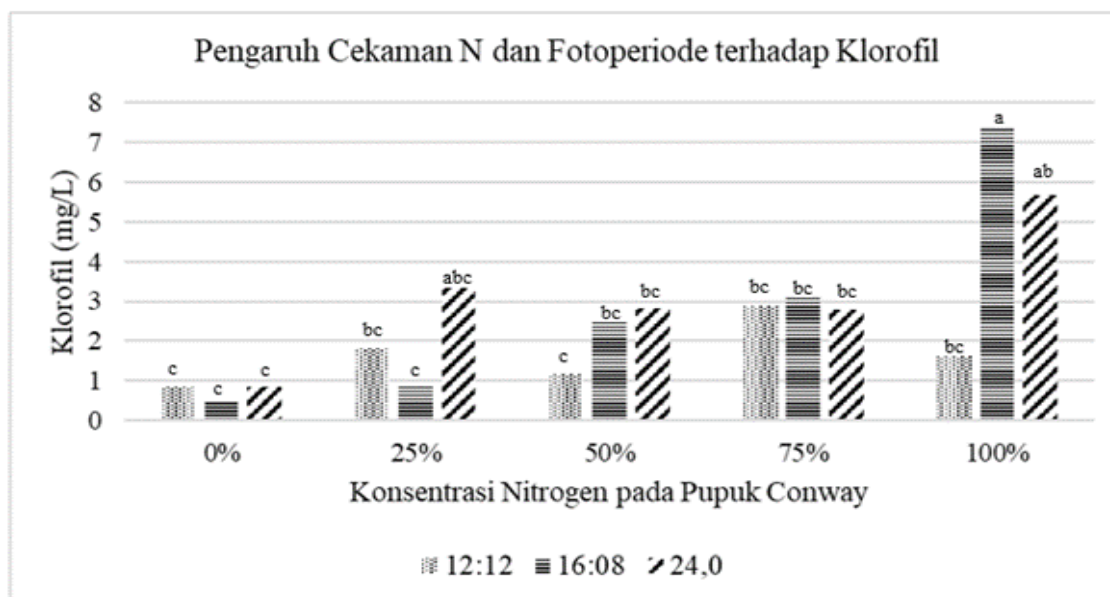


Gambar 1. Diagram pengaruh interaksi cekaman nitrogen dan fotoperiode terhadap biomassa *Nannochloropsis* sp.



Gambar 2. Kultur *Nannochloropsis* sp. pada saat panen. Keterangan : A. Kultur *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan fotoperiode 12:12. B. Kultur *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan fotoperiode 16:8. C. Kultur *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan fotoperiode 24:0





Gambar 3. Diagram pengaruh interaksi cekaman nitrogen dan fotoperiode terhadap kandungan klorofil a *Nannochloropsis* sp. Keterangan : Huruf yang sama di atas diagram batang menunjukkan tidak terdapat perbedaan pengaruh perlakuan secara nyata.

Hasil pengamatan pengaruh interaksi cekaman nitrogen dan fotoperiode terhadap kandungan klorofil a *Nannochloropsis* sp. ditunjukkan pada diagram di atas.

Kandungan klorofil berbanding lurus dengan kandungan biomassa kultur. Klorofil perlakuan P14 (N100, 16:8) tidak berbeda secara signifikan dengan perlakuan P15 (N100, 24:0) dan P6 (N25, 24:0), namun berbeda secara signifikan dengan perlakuan lain. Pengaruh pemberian nitrogen 100% terhadap klorofil berbeda signifikan dengan pemberian nitrogen 75%, 50%, 25% dan 0%. Berdasarkan hasil uji klorofil dengan perhitungan metode Strickland and Parsons (2014), kandungan klorofil tertinggi yaitu perlakuan nitrogen 100% dengan fotoperiode 16:8 yaitu 7.367143 mg/L dan kandungan klorofil terendah yaitu perlakuan kombinasi nitrogen 0% dan fotoperiode 16:8 sebesar

0.480073 mg/L. Interaksi antara nitrogen dan fotoperiode ini berpengaruh dalam proses pembentukan klorofil dimana nitrogen berperan dalam sintesis asam glutamat sebagai prekursor pembentuk klorofil, sedangkan cahaya berpengaruh dalam aktivasi enzim *phylida reductase* yang berfungsi dalam pengubahan protoklorofilida menjadi klorofilida sehingga dihasilkan klorofil [38]. Konsentrasi nitrogen yang rendah menghambat sintesis protein, sehingga apabila terjadi kekurangan unsur nitrogen akan menyebabkan penurunan kandungan protein, terjadi degradasi komponen sel yang berkaitan dengan sintesis protein termasuk klorofil serta terjadi gangguan *in vivo* pada klorofil serta kloroplas [39]. Fotoperiode mempengaruhi proses pembentukan klorofil dimana cahaya berperan dalam aktivasi induksi gen HSP70

yang berperan dalam penjagaan aktivitas fotosistem II dari kerusakan fotoinhibitor, aktivasi gen ini menstimulasi Mg-Proto dan MgProtoMe menjadi dapat terakses di sisi sitoplasmik dari kloroplas. Cahaya memediasi peningkatan prekursor klorofil di sitoplasma [38].

Pengamatan pengaruh interaksi cekaman nitrogen dan fotoperiode terhadap kandungan TAG secara kualitatif dengan pewarnaan Nile Red, menunjukkan adanya pendaran warna merah hingga kuning-oranye pada berbagai perlakuan. Hal ini menunjukkan terdapat respon berupa kandungan kualitatif TAG yang berbeda beda pada sel mikroalga *Nannochloropsis* sp. yang diperlakukan berbeda beda. Berikut adalah hasil pengamatan pendaran warna sel *Nannochloropsis* sp. dengan pewarnaan Nile Red.

Nile Red berfungsi untuk mendeteksi adanya TAG intraseluler sel mikroalga, warna orange menandakan kandungan TAG dalam mikroalga dalam jumlah sedikit sedangkan warna kuning menandakan kandungan TAG dalam sel mikroalga dalam jumlah banyak. Apabila sel tidak mengandung lipid maka warna yang terpendar adalah warna merah karena emisi dari klorofil [40]. Berdasarkan pengamatan tersebut, pada perlakuan interaksi cekaman nitrogen dan fotoperiode kultur *Nannochloropsis* sp. yang terdiri dari P1 sampai P15 mengandung TAG. Hal ini DOI: <https://dx.doi.org/10.12962/j25493736.v4i1.5089>

dikarenakan pada dasarnya mikroalga mensintesis lipid membran dan asam lemak sebagai ester gliserol, sementara di bawah kondisi tercekam sebagian besar mikroalga menyesuaikan metabolisme dengan pembentukan dan akumulasi lipid dalam bentuk triasilgliserol. Triasilgliserol (TAG) disimpan di sitosol sebagai cadangan energi dan sumber karbon.

Pada saat kekurangan nitrogen sebagai sebuah cekaman, siklus glikosilat dan glukoneogenesis terhambat dan ketersediaan asetil-KoA untuk sintesis lemak meningkat. Konsumsi asetat terjadi karena adanya peningkatan aktivitas dalam asetil KoA sintase dan pengalihan produk menjadi sintesis TAG karena sintesis pati terhambat [41]. Selain nutrisi berupa nitrogen, faktor yang mempengaruhi produksi TAG yaitu faktor fisika berupa cahaya/fotoperiode. Cahaya digunakan sebagai sumber energi untuk fotosintesis dengan mengkonversi karbondioksida dan air menjadi gula, dimana gula dapat terderivatisasi menjadi TAG [42]. Cekaman fotoperiode dapat meningkatkan panen lipid mikroalga serta mempengaruhi fotosintesis untuk produksi biomassa, kondisi terang dibutuhkan dalam fase fotokimia pembentukan ATP dan NADPH sedangkan kondisi gelap mempengaruhi sintesis biokimia molekul untuk pertumbuhan meliputi pembentukan protein, karbohidrat dan lemak [9]. Kondisi cekaman lingkungan tersebut juga dapat menurunkan kecepatan

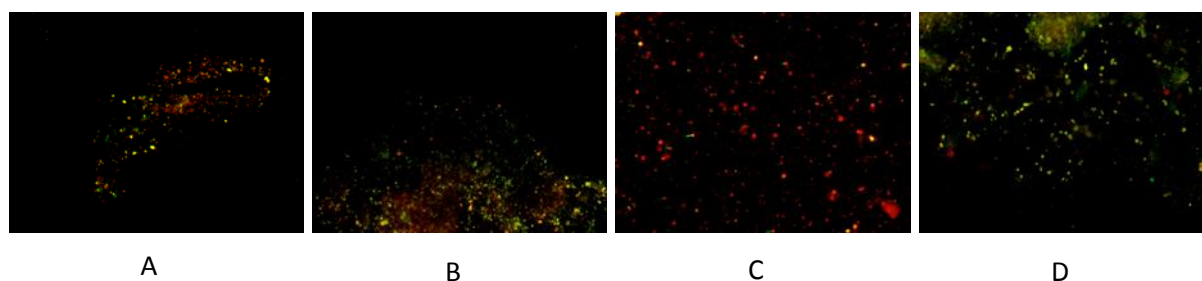
pembelahan sel, sel akan merangkai asam lemak menjadi lipid simpanan berupa triasilgliserol untuk mengisi ketersediaan NADP<sup>+</sup> karena saat nutrisi atau lingkungan tercekam, NADP<sup>+</sup> mengalami penurunan sehingga NADPH yang dihasilkan dari fotosintesis dikonsumsi untuk pembentukan asam lemak [12].

Analisis profil asam lemak dilakukan pada perlakuan P14 (N100, 16:8), P2 (N0, 16:8) dan P8 (N50, 16:8) berdasarkan hasil perhitungan dari biomassa tertinggi, terendah, dan biomassa median kultur *Nannochloropsis* sp. Selain itu pengujian dilakukan pada perlakuan P1 (N0, 12:12) dan P10 (P75, 12:12) berdasarkan pendaran dari pewarnaan TAG dengan Nile Red yang menghasilkan warna kuning yang menunjukkan kandungan TAG pada sel yang tinggi. Berdasarkan hasil pengamatan, *Nannochloropsis* sp. mengandung 2 jenis asam lemak yaitu asam lemak jenuh (*saturated fatty acid*) yang terdiri dari asam laurat (C12:0), asam stearat (C18:0), asam palmitat (C16:0), asam eikosanoat (C20:0)

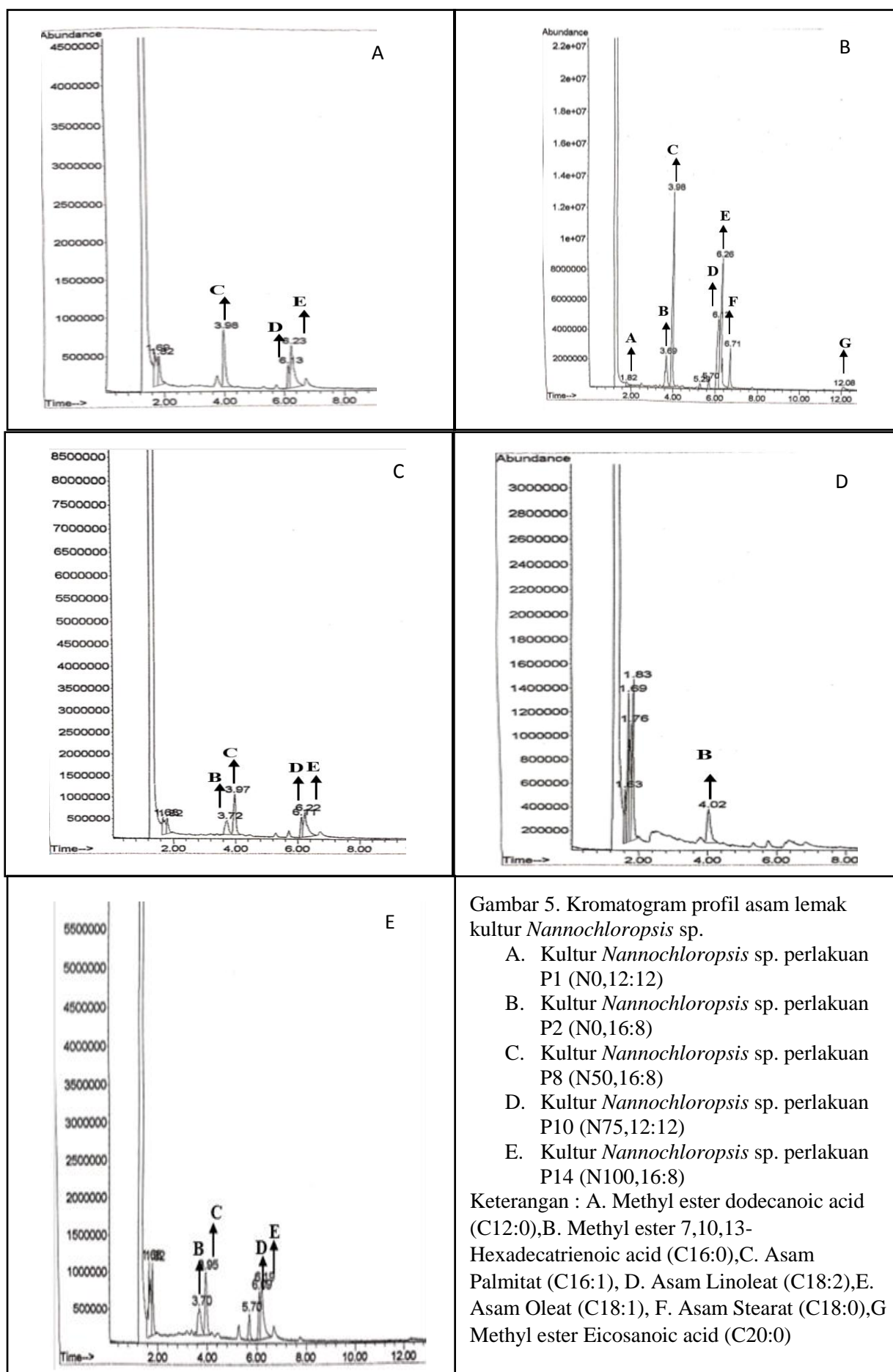
dan asam lemak tak jenuh (*unsaturated fatty acid*) tunggal yang terdiri dari asam oleat (C18:1) serta asam lemak tak jenuh ganda yaitu asam linoleat (C18:2), asam heksadecatratrat (C16:3) [43].

Hasil pengamatan pada semua perlakuan, *Nannochloropsis* sp. mengandung asam palmitat, sedangkan asam laurat, asam stearat dan asam eikosanoat hanya terdapat pada perlakuan P2 (N0, 16:8). Berdasarkan total presentase normalisasi, asam palmitat tertinggi terdapat pada perlakuan P2 (N0, 16:8), presentase terendah pada P10 (N75, 12:12). Berdasarkan hasil tersebut, pada berbagai perlakuan dapat digunakan sebagai bahan biodiesel karena mengandung asam lemak dengan rantai C16-C18 seperti palmitat yang memiliki karakter dapat meningkatkan stabilitas oksidatif, melumasi mesin dan mempengaruhi viskositas dalam pembakaran [44].

Hasil retensi waktu serta presentase komposisi berbagai jenis asam lemak pada kromatogram hasil GC-MS, ditunjukkan pada tabel 1.



Gambar 4. Pendaran warna sel *Nannochloropsis* sp. dengan pewarnaan Nile Red pada perbesaran 100x. A. Sel *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan P1(N0,12:12). B. Sel *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan P3 (N0, 24:0). C. Sel *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan P6 (N25, 24:0). D. Sel *Nannochloropsis* sp. pada perlakuan P10 (N75,12:12).



Gambar 5. Kromatogram profil asam lemak kultur *Nannochloropsis* sp.

- A. Kultur *Nannochloropsis* sp. perlakuan P1 (N0,12:12)
- B. Kultur *Nannochloropsis* sp. perlakuan P2 (N0,16:8)
- C. Kultur *Nannochloropsis* sp. perlakuan P8 (N50,16:8)
- D. Kultur *Nannochloropsis* sp. perlakuan P10 (N75,12:12)
- E. Kultur *Nannochloropsis* sp. perlakuan P14 (N100,16:8)

Keterangan : A. Methyl ester dodecanoic acid (C12:0), B. Methyl ester 7,10,13-Hexadecatrienoic acid (C16:0), C. Asam Palmitat (C16:1), D. Asam Linoleat (C18:2), E. Asam Oleat (C18:1), F. Asam Stearat (C18:0), G. Methyl ester Eicosanoic acid (C20:0)

Tabel 1. Presentase Normalisasi Asam Lemak

Retensi Waktu	Komponen	% Normalisasi				
		P1 N0,12:12	P2 N0, 16:8	P8 N50, 16:8	P10 N75, 12:12	P14 N100, 16:8
1.82	Asam Laurat	-	1.18%	-	-	-
3.69	Asam Heksadekatrionat	-	8.99%	13.38%	-	13.05%
4.02	Asam Palmitat	28.55%	30.53%	26.87%	15.77 %	17.30%
6.13	Asam Linoleat	8.34%	30.53%	10.47%	-	10.19%
6.26	Asam Oleat	31.29%	29.75%	27.31%	-	20.74%
6.7	Asam Stearat	-	6.90%	-	-	-
12.08	Asam Eikosanoat	-	1.26%	-	-	-

Asam lemak yang terbentuk pada perlakuan P2 (N0, 16:8) bervariasi dikarenakan nitrogen sebagai unsur makro pertumbuhan sel jumlahnya terbatas sehingga sel mikroalga mengubah jalur biosintesis karbohidrat menjadi pembentukan asam lemak [12]. Hal ini berkorelasi positif dengan hasil perhitungan biomassa dimana biomassa terendah terdapat pada perlakuan P2 (N0, 16:8) sebesar 0.0658 gram/100 ml dan menghasilkan jenis asam lemak yang lebih bervariasi, hal ini sesuai dengan penelitian yang menyebutkan bahwa perlakuan cekaman nitrogen dapat meningkatkan produksi lipid yang lebih tinggi [45]; [16] karena protein dari mikroalga terpecah menjadi Asetil-KoA yang berperan dalam pembentukan lipid [44]. Asam lemak yang diproduksi dalam sel merupakan bentuk pertahanan sel terhadap cekaman yang diterima oleh sel mikroalga tersebut.

Mikroalga *Nannochloropsis* sp. mengandung banyak jenis asam lemak

omega-3. Asam lemak alami yang termasuk asam lemak omega-3 adalah asam linoleat (C18), asam eikosapentaenoat atau EPA (C20) dan asam dekosahexanoat atau DHA (C22:6) serta asam arachidoneat atau AA (C20) [44]. Namun pada perlakuan P10 (N75, 12:12) tidak mengandung asam linoleat, pada P1 (N0, 12:12), P2 (N0, 16:8), P8 (N50, 16:8) dan P14 (N100, 16:8) tidak mengandung asam eikosanoat, hal ini berkaitan dengan respon gen pengkode asam lemak serta enzim pembentuk asam lemak tersebut pada sel mikroalga terhadap kombinasi nitrogen dan fotoperiode yang diberikan. Pemberian cekaman nitrogen dan fotoperiode menyebabkan sintesis asam lemak dalam sel bertambah, namun jenis asam lemak yang terbentuk ditentukan oleh enzim-enzim yang terlibat dalam mekanisme biosintesis tersebut.

### III. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa interaksi

antara nitrogen dan fotoperiode tidak berpengaruh terhadap biomassa *Nannochloropsis* sp. namun berpengaruh terhadap kandungan klorofil dimana kandungan klorofil perlakuan P14 (N100, 16:8) sebesar 7,367 mg/L tidak berbeda signifikan dengan perlakuan P6 (N25, 24:0) sebesar 3,339 mg/L dan perlakuan P15 (N100, 24:0) sebesar 5,665 mg/L Berdasarkan uji kualitatif Nile Red, semua perlakuan mengandung triasilgliserol (TAG). Pada uji GC-MS, perlakuan P2 (N0, 16:8) mengandung 7 jenis asam lemak baik asam lemak jenuh maupun tak jenuh.

#### Daftar Pustaka

- [1] Setiaji, S., Nila, T.B., Tety, S., Eko, P., Bebeh, W.N. 2017. Alternatif Pembuatan Biodiesel Melalui Transesterifikasi Minyak Castor (*Ricinus communis*) Menggunakan Katalis Campuran Cangkang Telur Ayam dan Kaolin. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, Vol. 3 (1): 1-10.
- [2] Gerpen, J.V. and Knothe, G.. 2005. *The Biodiesel Handbook*. Champaign : Aocs Press.
- [3] Prakoso, T., Udomsap, P., Tanaka, A., Hirostu, T., Goto, S. 2012. Characteristics of Oxidative Storage Stability of Canola Fatty Acid Methyl Ester Stabilised with Antioxidant. *Journal ITB. Eng. Sci*, Vol. 4: 303-318.
- [4] Maharsyah, T., Musthofa, L., Wahyunato, A.N. 2013. Efektivitas Penambahan Plant Promoting Bacteria (*Azospirillum* sp) dalam Meningkatkan Pertumbuhan Mikroalga (*Chlorella* sp) Pada Media Limbah Cair Tahu Setelah Proses Anaerob. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, Vol. 1 (3): 258-264.
- [5] Kwangdinata, R., Indah, R., Zakir, M. 2013. Produksi Biodiesel dari Lipid Fitoplankton *Nannochloropsis* sp. Melalui Metode Ultrasonik. *Jurnal Marina Chimica Acta*, Vol. 14 (2): 29-36.
- [6] Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review, *Renew. Sustainable Energy Rev*, Vol. 14: 217-232.
- [7] Alamsyah, R., Enny, H.L., Siregar, N.C. 2011. Esterifikasi-Transesterifikasi Dan Karakterisasi Mutu Biodiesel Dari Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* Linn). *J. Kimia Kemasan*, Vol. 33 (1): 124-130.
- [8] Arita, S., Attaso, K., Rangga, S. 2013. Pembuatan Biodiesel Dari Minyak Kelapa Sawit dengan katalis CaO Disinari Dengan Gelombang Mikro. *Jurnal Teknik Kimia*, Vol. 19 (4): 45-52.
- [9] Gammanpila, A.M., Rupasinghe, C.P., Subasinghe. 2015. Light Intensity and Photoperiode Effect On Growth And Lipid Accumulation Of Microalgae

- Chlorella Vulgaris* And *Nannochloropsis* sp. For Biodiesel Production. Proceedings of 12th ISERD International Conference: 51-55.
- [10] Sharma, A. K., Schuhmann, H., Schenk, P.M. 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*.5. 1532-1553
- [11] Schuhmann, H., Lim, D. K.Y., Schenk, P. M., 2011. Perspective on Metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. *Biofuels*. 3. 71-86
- [12] Hu, Q., Milton, S., Eric, J., Maria, G., Matthew, P., Michael S., Darzins, Al. 2008. Microalgal Tryacylglycerols as Feedstock for Biofuel Production: Perspectives and Advances. *The Plant Journal*, Vol. 54: 621-639.
- [13] Nisak, K., Rahardja, B.S., Masithah, E.D. 2013. Studi Perbandingan Kemampuan *Nannochloropsis* sp. Dan *Chlorella* sp. Sebagai Agen Bioremediasi Terhadap Logam Berat Timbal (Pb). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, Vol. 5 (2): 175-180.
- [14] Fogg, G.E. 1987. *Algal Cultured and Phytoplankton Ecology*. 2nd ed. Wisconsin: The University of Wisconsin Press.
- [15] Endrawati, H., Riniatsih, I. 2013. Kadar Total Lipid Mikroalga *Nannochloropsis oculata* yang Dikultur Dengan Suhu yang Berbeda. *Buletin Oseanografi Marina Januari*, Vol. 1: 25-33.
- [16] Widianingsih., Retno, H., H. Endrawati., Valentina, R. Iriani. 2012. Kandungan Lipid Total *Nannochloropsis oculata* pada Kultur dengan Berbagai Fotoperiode. *Jurnal Ilmu Kelautan*, Vol. 17 (3): 119-124.
- [17] Yanti, N., Muhaemin, M., Hudaidah, S. 2014. Pengaruh Salinitas Dan Nitrogen Terhadap Kandungan Protein Total *Nannochloropsis* sp. *Jurnal Rekayasa Dan Teknologi Budidaya Perairan*, Vol. 2 (2): 273-278.
- [18] Widayat, H. 2015. Pemanfaatan Limbah Cair Industri Tahu Untuk Produksi Biomassa Mikroalga *Nannochloropsis* sp Sebagai Bahan Baku Biodiesel. *Jurnal Reaktor*, Vol. 15 (4): 253-260.
- [19] Duong, V.T., Li, Y., Nowak, E., and Schenk, M. 2012. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production. *Energies* 5: 1835-1849.
- [20] Safitri, M.E., Diantari, R., Suparmono., Muhaemin, M. 2013. Kandungan Lemak Total *Nannochloropsis* sp Pada Fotoperiode Yang Berbeda. *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, Vol. 1 (2): 127-134.
- [21] Panggabean, L., Sutomo., Radini, N., Afdal. 2011. Mikroalga Laut Sebagai Produsen Biodiesel. Pusat Penelitian Oseanografi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
- [22] Mahdi, M.Z., Titisari, Y.N., Hadiyanto. 2012. Evaluasi Pertumbuhan Mikroalga

- Dalam Medium Pome: Variasi Jenis Mikroalga, Medium Dan Waktu Penambahan Nutrisit. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, Vol. 1 (1): 284-291.
- [23] Henriques, M., Silva, A., Rocha, J. 2007. Extraction and Quantification of Pigments from a Marine Microalga: A Simple and Reproducible Method. *FORMATEX*: 586-593.
- [24] Pratama, A.J., Laily, A.N. 2015. Analisis Kandungan Klorofil Gandasuli (*Hedychium gardnerianum* Shephard ex Ker-Gawl) pada Tiga Daerah Perkembangan Daun yang Berbeda. *Seminar Nasional Konservasi dan Pemanfaatan Sumber Daya Alam*: 216-219.
- [25] Sartika., Mukarlina., Tri, R.S. 2014. Kandungan Klorofil dan Lipid *Nannochlorosis oculata* yang Dikultur dalam Media Limbah Cair Karet. *Jurnal Probiot*, Vol. 3 (3): 25-30.
- [26] Liu, X. 2014. Quantitative Determination of Lipid Analysis Using Nile Red Fluorometry. Thesis of Applied Science Master. Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies Chemical and Biological Engineering. Kanada: University of Ottawa.
- [27] Storms, Z.J., Cameron, E., Siegler, H., McCaffrey, W. 2014. A Simple and Rapid Protocol for Measuring Neutral Lipids in Algal Cells Using Fluorescence. *Journal of Visualized Experiment*, Vol. 87: 1-7.
- [28] Pratiwi, S., Nurhidayati, T., Ermavitalini, D., and Muhibbudin, A. 2015. The Influences of Physiological Stress from Silicon (Si) Nutrien toward Total Lipid Content at *Skeletonema*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. Vol 5(11): 68-71.
- [29] Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R., Tanaka, T. 2009. Characterization of Marine Microalgae, *Scenedesmus* sp. strain JPCCGA0024 toward Biofuel Production,” *Biotechnol. Let*, Vol. 31: 1367-1372.
- [30] Elumalai, S., Prakasam, V., Selvajaran, R. 2011. Optimization of Abiotic Condition Suitable for The Production of Biodiesel from *Chlorella vulgaris*. *Indian Journal of Sci. and Tech*, Vol. 4: 91-97.
- [31] Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Collis, P.R. 1987. Fluorometric Determination of The Neutral Lipid Content of Microalgal Cells Using Nile Red. *Journal of Microbiol Methods*, Vol. 6: 333-345.
- [32] Hurtado, D.X., Castro, C.L.G., Romero, J.C., Camacho, E.T. 2018. Comparison of Lipid Extraction Methods for The Microalgae *Acutodesmus obliquus*. *Int. J. Agric & Biol Eng*, Vol. 11 (5): 211-217.



- [33] Astuti, J.T., Sriwuryandari, L. 2011. Biodiesel Dari Mikroalga: Perbanyak Biomassa Melalui Penambahan Nutrisi Secara Bertahap. *Bionatura, Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati dan Fisik*, Vol. 12 (3): 160-168.
- [34] Agustin, N.W.S., Afriastini, M., Yoana, M. 2012. Potential of Fatty Acid from Microalgae *Nannochloropsis* sp as Antioxidant and Antibacterial (Thesis). Jakarta: Institut Sains Teknologi Nasional.
- [35] Perumal, P., Prasath, B.B., Santhanam, P., Ananth, S., Devi, A.S., Kumar, S.D. 2012. Isolation and Culture of Microalgae : Workshop on Advances in Aquaculture Technology. Tamil Nadu: Bharathidasan University.
- [36] Muhaemin, M., Practica, F., Dona, R.S., Agustina, T. 2014. Starvasi Nitrogen dan Pengaruhnya Terhadap Biomassa dan Protein Total *Nannochloropsis* sp. *Maspari Journal*, Vol. 6 (2). 98-103.
- [37] Darsi, R., Supriadi, A., Sasanti, A.D. 2012. Karakteristik Kimiawi dan Potensi Pemanfaatan *Dunaliella salina* dan *Nannochloropsis* sp. *Jurnal Fishtech*, Vol. 1 (1): 14-25.
- [38] Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W., Beck, C.F. 1997. Chlorophyll Precursors are Signals of Chloroplast Origin Involved in Light Induction of Nuclear Heat-Shock Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94: 14168-14172.
- [39] Chrismadha, T., Panggabean, L.M., Mardiaty, Y. 2006. Pengaruh Konsentrasi Nitrogen Dan Fosfor Terhadap Pertumbuhan, Kandungan Protein, Karbohidrat Dan Fikosianin Pada Kultur *Spirulina fusiformis*. *Berita Biologi*, Vol. 8 (3):163-169.
- [40] Halim, R., Webley, P.A. 2015. Nile Red Staining for Oil Determination in Microalgal Cells: A New Insight through Statistical Modelling. *International Journal of Chemical Engineering*, Vol. 2015: 1-14.
- [41] Goncalves, E.C., Wilkie, A.C., Kirst, M., Rathinasabapathi, B. 2016. Metabolic Regulation of Triacylglycerol Accumulation in The Green Algae: Identification of Potential Targets for Engineering to Improve Oil Yield. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 14: 1649-1660.
- [42] Cagliari, A., Margis, R., Maraschin, F.S., Loss, G., Pinheiro, M.M. 2011. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in Plant and Algae. *International Journal of Plant Biology*, Vol. 2 (10): 40-52.
- [43] Widianingsih., Retno, H., Hadi, E., Jane, M. 2013. Fatty Acid Composition of Marine Microalgae in Indonesia. *Journal Of Tropical Biology and Conservation*, Vol. 10: 75-82.
- [44] Ma, X. N., Chen, T.P., Liu, B.Y., Feng, C. 2016. Lipid Production from

- Nannochloropsis. *Journal Mar. Drugs*, Vol. 14 (61): 1-18.
- [45] Nur, M.M.A. 2014. Potensi Mikroalga sebagai Sumber Pangan Fungsional di Indonesia. *Jurnal Eksergi*, Vol. XI (2): 1-6.
- [45] Widianingsih., Retno, H., H. Endrawati., Valentina, R. Iriani. 2012. Kandungan Lipid Total *Nannochloropsis oculata* pada Kultur dengan Berbagai Fotoperiode. *Jurnal Ilmu Kelautan*, Vol. 17 (3): 119-124.