

**Pengaruh PenambahanLimbah *Whey*Tahu terhadap Kelimpahan Sel
dan Kandungan Protein dari Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Produksi
Protein Sel Tunggal**

SKRIPSI

Oleh :

AHFAD ULHIDAYATI

125100501111008

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2016

**Pengaruh Penambahan Limbah *Whey* Tahu terhadap Kelimpahan Sel
dan Kandungan Protein dari Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Produksi
Protein Sel Tunggal**

Oleh :

AHFAD ULHIDAYATI

125100501111008

**sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknologi Pertanian**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

2016



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Tugas Akhir :Pengaruh Penambahan Limbah *Whey* Tahu terhadap
Kelimpahan Sel dan Kandungan Protein dari Mikroalga
Chlorellasp. dalam Produksi Protein Sel Tunggal

Nama Mahasiswa : Ahfad Ulhidayati

NIM : 125100501111008

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Mengetahui,
Dosen Pembimbing

Agustin Krisna Wardani, STP.,M.Si.PhD.

NIP. 19690807 199702 2 001

Tanggal Persetujuan : 25 Juni 2016

LEMBAR PENGESAHAN


Judul Tugas Akhir : Pengaruh Penambahan Limbah *Whey* Tahu terhadap Kelimpahan Sel dan Kandungan Protein dari Mikroalga *Chlorella* sp. dalam Produksi Protein Sel Tunggal

Nama Mahasiswa : Ahfad Ulhidayati
 NIM : 125100501111008
 Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
 Fakultas : Teknologi Pertanian


Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,


Erni Sofia Murtini., STP, MP, PhD
 NIP.19731020 200112 2 001


Kiki Fibrianto, STP, M.Phil, PhD.
 NIP. 19820206 200501 1 001

Dosen Penguji III,


Agustin Krisna Wardani, STP, Msi, PhD.
 NIP. 19690807 199702 2 001

Ketua Jurusan



Dr. Teti Estiasih, S.TP., MP.
 NIP 19701226 200212 2 001

Tanggal Lulus Skripsi :



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Mahasiswa : Ahfad Ulhidayati

NIM : 125100501111008

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Judul Tugas Akhir : Pengaruh Penambahan Limbah *Whey* Tahu terhadap Kelimpahan Sel dan Kandungan Protein dari Mikroalga *Chlorellasp.* dalam Produksi Protein Sel Tunggal

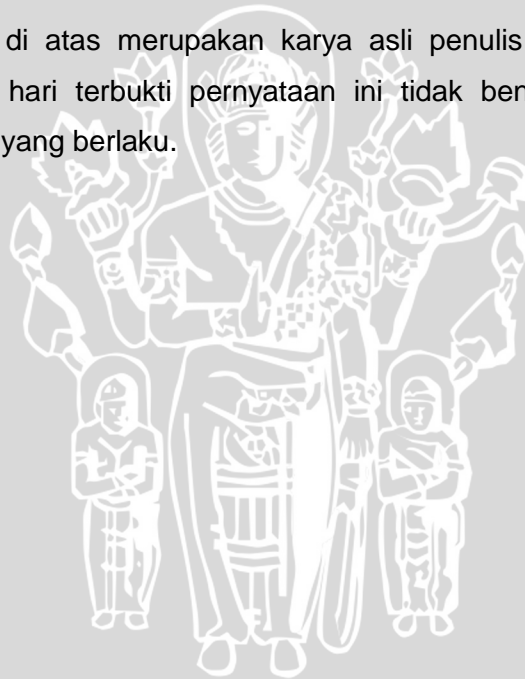
Menyatakan bahwa,

Skripsi dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas. Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, Juli 2016

Pembuat Pernyataan,

Ahfad Ulhidayati



repository.ub.ac.id

AHFAD ULHIDAYATI. 125100501111008. Pengaruh Penambahan Limbah Whey Tahu terhadap Kelimpahan Sel dan Kandungan Protein dari Mikroalga *Chlorella* sp. dalam Produksi Protein Sel Tunggal. Pembimbing: Agustin Krisna Wardani, STP., M.Si., Ph.D

RINGKASAN

Dampak yang ditimbulkan dari kurangnya energi protein yakni menghambat pertumbuhan, tubuh menjadi rentan terhadap penyakit infeksi serta penurunan kecerdasan anak. Mikroalga jenis *Chlorella* sp memiliki kandungan protein sebesar 30-65%, vitamin dan mineral yang berguna bagi kesehatan tubuh. Dengan potensi yang dimiliki oleh *Chlorella* sp. maka dapat dijadikan sebagai sumber protein. Guna untuk menghasilkan produksi protein yang maksimal tujuan dari penelitian kali ini yakni dengan mengkaji pengaruh penambahan limbah whey tahu sebagai kandungan nutrisi berupa nitrogen dalam bentuk nitrat, karbon dan mineral yang dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp terhadap biomassa sel dan kandungan protein total dalam produksi protein sel tunggal.

Rancangan penelitian yang digunakan berupa Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan satu faktor yakni penambahan limbah whey tahu sebanyak 5 level perlakuan (penambahan limbah whey tahu : 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%). Data dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (ANOVA) dan dilakukan uji lanjut untuk menunjukkan beda nyata dengan uji Tukey serta dilakukan pemilihan perlakuan terbaik berdasarkan data kelimpahan sel dan kandungan protein tertinggi.

Hasil penelitian yang diperoleh yakni perlakuan penambahan variasi limbah cair tahu memberikan pengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap kelimpahan sel *Chlorella* sp dan kandungan protein berdasarkan analisis varian. Dari pemilihan perlakuan terbaik yang memberikan kelimpahan sel tertinggi yakni penambahan limbah cair tahu 50% dengan kandungan nitrat 4,605 ppm menghasilkan kelimpahan sel sebanyak $46,7 \times 10^6$ sel/mL dan memiliki kandungan protein sebesar 56,67%. Hasil analisa konsumsi nitrat tertinggi pada media perlakuan menunjukkan batas jumlah batas konsumsi nitrat untuk pertumbuhan *Chlorella* sp yakni $\leq 4,605$ ppm. Hasil pengukuran parameter pertumbuhan berupa pH, suhu, DO (*Dissolved Oxygen*), salinitas menunjukkan kisaran yang optimum untuk pertumbuhan *Chlorella* sp. sehingga bukan merupakan faktor pembatas utama. Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa limbah cair tahu berpotensi dijadikan media pertumbuhan mikroalga dilihat dari hasil penelitian berupa kandungan kelimpahan sel dan proteinnya.

Kata kunci : *Chlorella* sp., Limbah whey tahu, Protein sel tunggal

repository.ub.ac.id

AHFAD ULHIDAYATI. 125100501111008. Effect of Tofu Waste Whey Toward Amount of Cell and Protein Content from Microalgae *Chlorella* sp in Single Cell Protein Production. Agustin Krisna Wardani, STP., M.Si., Ph.D

SUMMARY

*The protein deficiency can inhibit the growth of energy, makes body become susceptible to infectious diseases as well as decreased intelligence. Microalgae type *Chlorella* sp. has protein content of 30-65%, vitamins and minerals which are beneficial to health. The potential of *Chlorella* sp. can be used as a source of protein. The aim of this research was to know the effect of tofu waste whey as growth medium toward the growth of *Chlorella* sp in producing Single Cell Protein (SCP).*

The research method used Randomized Complete Block Design (RCBD) with one factor and 6 level addition of Tofu waste whey (10%, 20%, 30%, 40% and 50%). The data were analyzed using Analysis Of Variance (ANOVA) and conducted a further test to show the real difference with the test of Tukey's as well as the election of the best treatment based on data from the amount of the cell and the highest protein content.

*The results showed that the addition of various tofu waste whey on media cultivation gave significant difference results ($p < 0.05$) in the protein content and amount of cells of *Chlorella* sp. based on the analysis of variance. The best treatment was obtained from cultivation *Chlorella* sp with the addition of 50% tofu waste on media cultivation with the nitrate content 4.605 ppm. It produces the amount of cells of 46.7×10^6 cells / mL and has a protein content of 56.67%. The results of measurements of the growth parameters such as pH, temperature, Dissolved Oxygen (DO) and salinity were not the major limiting factors. Based on this research, it was found that *Chlorella* sp. has a potential to be produced as single cell protein with tofu waste as a growth medium which was seen by the amount of cells and protein.*

Keywords: *Chlorella* sp., Tofu waste whey, Single Cell Protein

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang maha pengasih dan maha penyayang atas segala rahmat dan hidayah-Nya, hingga penulis dapat menyusun Tugas Akhir yang berjudul “Pengaruh Penambahan Limbah *Whey* Tahu terhadap Kelimpahan Sel dan Kandungan Protein dari Mikroalga *Chlorella* sp. dalam Produksi Protein Sel Tunggal”. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknologi pertanian.

Penulis juga menyadari bahwa dalam pembuatan TA ini tidak lepas dari bantuan dan doa restu dari berbagai pihak, oleh karena itu dalam kesempatan ini dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan dan mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kanjeng ayah Dji'in, Kanjeng Ibu Sartini, kakak Rara Fithrah Nur Hanifah dan AdekRaden Rahmad habad R, Raden Hamsah Ashari yang telah mencurahkan segala do'a dan dorongan sehingga penulis mampu menyelesaikan tugas akhir dengan baik.
2. Ibu Agustin Krisna Wardani, STP.,MSi.PhD selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya dan memberikan bimbingan, arahan, ilmu dan pengetahuan kepada penulis.
3. Ibu Dr. Teti Estiasih, STP., MP. selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
4. Dini dan Iqbal selaku rekan tim skripsi seperjuangan yang telah memberikan semangat dan kasih sayang dalam suka dan duka selama menjalani penelitian.
5. Ichal, Nining, Mia, Anggi, Novi, Rabitha dan Sabrina yang telah memberi semangat, dukungan dan doa kepada penulis dalam melaksanakan dan menyelesaikan tugas akhir.
6. Teman – teman Bioteknologi Industri dan Ilmu Teknologi Pangan 2012, ARSC (Agritech Research and Study Club) yang telah memberikan semangat, dukungan dan doa kepada penulis.

Menyadari adanya keterbatasan pengetahuan, referensi dan pengalaman, penulis mengharapkan saran dan masukan demi lebih baiknya TA ini.

Akhirnya harapan penulis semoga TA ini dapat bermanfaat bagi penulis maupun semua pihak yang membutuhkan.

Malang, 26 Mei 2016
Penulis,

Ahfad Ulhidayati

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Merauke, Papua pada tanggal 06 November 1994 dari ayah yang bernama Dji'in dan Ibu Sartini. Penulis merupakan anak kedua dari 4 bersadara dan memiliki seorang kakak perempuan bernama Fitrah Nur Hanifah dan 2 orang adik laki-laki bernama Rahmad Habad dan Hamsah Ashari.

Penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SD INPRES POLDER MERAUKE pada tahun 2006, kemudian melanjutkan ke sekolah menengah tingkat pertama di SMP NEGERI 1 MERAUKE dengan kelulusan tahun 2009 dan menyelesaikan sekolah menengah atas di SMA NEGERI 1 MERAUKE pada tahun 2012.

Pada tahun 2016 penulis telah berhasil menyelesaikan pendidikan di Universitas brawijaya Malang di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian. Pada masa pendidikannya penulis aktif dalam beberapa organisasi di Fakultas Teknologi Pertanian dan kegiatan kepanitian yakni pada tahun 2012-2013 tergabung dalam anggota staff FORKITA Forum Kajian Islam Fakultas Teknologi Pertanian) di departemen syi'ar, anggota muda ESP (English for Specific Purpose) divisi Education dan anggota Committee of Documentation and Multimedia, National Seminar ESP Great Present serta anggota panitia Publikasi, Dekorasi dan Dokumentasi Acara Halal Food Club Universitas Brawijaya. Pada tahun 2013-2014 penulis juga bergabung sebagai anggota FLOLETA UKM SENI Anggota Divisi Tari Tradisional Floleta, Staff ARSC (Agritech Research and Study Club) di bidang Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa dan Wakil Ketua Divisi Acara, panitia Scientific Great Moment 5 (SGM 5) serta Koordinator Divisi Dokumentasi, Dekorasi dan Multimedia AGRIFAST (Agritech Faculty Science Competition). Selanjutnya di tahun 2014-2015 juga bergabung dalam organisasi tingkat universitas yakni sebagai anggota BNC (Brawijaya Nano Club) Anggota Divisi PR-BNC (Public Relation) dan pada organisasi ekernal kampus yakni sebagai anggota MITI (Masyarakat Ilmuan & Teknolog Indonesia) cluster Mahasiswa regional Jawa Timur. Dan di tahun 2014-2015 menjadi sekertaris ARSC (Agritech Research and Study Club) bidang Kepenulisan dan Kompetisi. Pada tahun 2013-2015 penulis juga ikut serta sebagai Supervisor PKM (Program Kreatifitas Mahasiswa) DIKTI. Bidang KC (Karsa Cipta), GT (Gagasan Tertulis), K (Kewirausahaan), dan P (Penelitian) pada unit kelembagaan ARSC (Agritech Research and Study Club), Fakultas Teknologi Pertanian. Selain aktif dalam keorganisasian penulis juga pernah merai beberapa penghargaan lomba yakni Juara III PKM P pada Pekan Ilmiah Mahasiswa Baru pada tahun 2012, Juara II PKM-GT (Program Kreatifitas Mahasiswa-Gagasan Tertulis) dan juara II PKM-P (Program Kreatifitas Mahasiswa-Penelitian) Agritech Faculty Science Competition pada bulan Januari 2014.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
RIWAYAT HIDUP.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Hipotesis.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Protein Sel Tunggal dari Mikroalga (<i>Single Cell Protein</i>).....	4
2.1.1 Proses Pembuatan PST (Protein Sel Tunggal) dari Mikroalga.....	5
2.2 Limbah <i>Whey</i> Tahu.....	10
2.2.1 Karakteristik dan Kandungan.....	11
2.3 Biologi <i>Chlorella sp.</i>	12
2.3.1 Habitat, Klasifikasi dan Morfologi.....	12
2.3.2 Kandungan Nutrisi <i>Chlorella sp.</i> dan Pemanfaatannya.....	13
2.4 Kultur Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	17
2.4.1 Fase Pertumbuhan.....	17
2.4.2 Faktor Pertumbuhan.....	18
2.4.3 Media Kultur.....	20
2.5 Keamanan Pangan untuk Mikroalga.....	22



III. METODE PENELITIAN	23
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	23
3.2 Alat dan Bahan.....	23
3.2.1 Alat.....	23
3.2.2 Bahan.....	23
3.3 Tahapan Penelitian	24
3.3.1 Penelitian Pendahuluan	24
3.3.2 Penelitian Utama	24
3.3.3 Penelitian Tambahan.....	24
3.3.4 Pelaksanaan Penelitian	24
3.4 Pengamatan dan Pengujian	32
3.5 Analisa Data Penelitian	33
3.7 Diagram Alir Proses Penelitian	33
3.7.1. Pembuatan Stok Kultur <i>Chlorella sp.</i>	33
3.7.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	34
3.7.3. Produksi Biomassa Kering <i>Chlorella sp.</i>	34
3.7.4. Pembuatan Media Kultivasi	35
3.7.5. Proses Ekstraksi Menggunakan Sonikator.....	36
3.7.6. Proses Pengujian Kadar Protein <i>Chlorella sp.</i>	37
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1 Penelitian Pendahuluan.....	38
4.1.1 Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	38
4.1.2 Kandungan Nitrat Bahan Baku dan Kontrol	40
4.1.3 Penentuan Penambahan Limbah <i>Whey Tahu</i> sebagai Media.....	40
4.2 Penelitian Utama	42
4.2.1 Kandungan Nitrat pada Medium Kultivasi	42
4.2.2 Pertumbuhan <i>Chlorella sp</i> pada Media Limbah <i>Whey Tahu</i>	43
4.2.3 Pengaruh Perlakuan Limbah <i>Whey Tahu</i> terhadap Kelimpahan Sel.....	45
4.2.4 Karakteristik Media Pertumbuhan.....	48
4.2.4.1 Salinitas.....	48
4.2.4.2 DO (<i>Dissolved Oxygen</i>).....	52
4.2.4.3 Suhu.....	55
4.2.4.4 pH	58
4.2.4.5 Tingkat Konsumsi Nitrat (% Konsumsi Nitrat)	62



4.2.5 Pengaruh Perlakuan Limbah terhadap Kandungan Protein Sel	63
4.2.6 Perlakuan Terbaik	66
4.3 Penelitian Tambahan.....	66
V KESIMPULAN DAN SARAN	68
DAFTAR PUSTAKA.....	69



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Diagram Alir Sederhana Proses produksi PST dari Alga <i>Spirulina sp.</i>	6
Gambar 2.2. Instalasi <i>flat photobioreactor</i>	8
Gambar 2.3. a). Bubuk <i>Spirulina sp.</i> (b). Kapsul Komersial <i>Spirulina sp.</i> (c). Produk Komersial bubuk <i>Spirulina sp.</i>	9
Gambar 2.4. Diagram Alir Proses Produksi Tahu	10
Gambar 2.5. Sel <i>Chlorella sp.</i>	13
Gambar 2.6. Struktur Kimia Klorofil a dan Klorofil b	16
Gambar 2.7. Spektrum Absorbansi Klorofil a dan Klorofil b	16
Gambar 3.1. Proses <i>Pretreatment</i> dan Pasteurisasi Limbah <i>Whey</i> Tahu.....	26
Gambar 3.2. Susunan Peralatan Pembuatan Stok Kultur <i>Chlorella sp.</i>	27
Gambar 3.3. Kultivasi Media Stok Kultur Hari ke 0-hari ke 7.....	27
Gambar 3.4. Rancangan Susunan Peralatan Penelitian Pendahuluan.	29
Gambar 3.5. Rancangan Susunan Peralatan Penelitian Utama.....	30
Gambar 3.6. Rancangan Susunan Peralatan Penelitian Tambahan	30
Gambar 3.7. Perhitungan Sel <i>Chlorella sp</i> menggunakan <i>Haemocytometer</i>	31
Gambar 3.8. Prosedur Produksi Biomassa Kering <i>Chlorella sp</i>	31
Gambar 3.9. Kurva Standar Protein BSA (Bovin Serum Albumin).	32
Gambar 3.10. Diagram Alir Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella sp</i>	33
Gambar 3.11. Diagram Alir Pembuatan Media Kultivasi	34
Gambar 3.12. Diagram Alir Produksi Biomassa Kering <i>Chlorella sp</i>	34
Gambar 3.13. Diagram Alir Proses Ekstraksi Menggunakan Sonikator.....	36
Gambar 3.14. Diagram Alir Proses Pengujian Kadar Protein <i>Chlorella sp</i>	37
Gambar 4.1. Kurva Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella sp</i> dalam Medium Pupuk <i>Walne</i>	38
Gambar 4.2. Perubahan Warna Kultur pada Medium selama Kultivasi Berlangsung.....	39
Gambar 4.3. Grafik Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella sp</i> Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu	41
Gambar 4.4. Pola Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella sp</i> pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50%	43

Gambar 4.5. Tampilan Sel <i>Chlorella</i> sp di bawah Mikroskop pada <i>Haemocytometer</i> Perbesaran 100x.....	45
Gambar 4.6. Medium Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp Pada Penambahan Limbah <i>Whey</i> Tahu 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan kontrol	47
Gambar 4.7. Rerata Nilai Salinitas Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari	48
Gambar4.8. Korelasi antara Salinitas dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu Selama kultivasi.....	51
Gambar 4.9. Rerata Nilai DO (<i>Dissolved Oxygen</i>) Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari	52
Gambar 4.10. Korelasi antara <i>Dissolved Oxygen</i> dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu Selama kultivasi.....	54
Gambar 4.11. Rerata Nilai Suhu Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama Kultivasi	55
Gambar 4.12. Korelasi antara Suhu dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu Selama 10 hari kultivasi	57
Gambar 4.13. Rerata Nilai pH Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari	58
Gambar 4.14. Kadar Nitrat dan % konsumsinya Pada Penambahan Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% pada Awal (hari ke 0) dan Akhir (hari ke-10) Kultivasi.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi Sel Mikroorganisme (%) Berat Kering	4
Tabel 2.2	Produksi SCP dari Mikroorganisme yang Sudah Dikembangkan	5
Tabel 2.3	Perbandingan antara penggunaan sistem <i>open pond</i> dengan sistem <i>photobioreactor</i>	7
Tabel 2.4	Kandungan Unsur Hara pada Limbah Tahu <i>Whey</i> Tahu	11
Tabel 2.5	Uji karakteristik awal limbah <i>whey</i> tahu	12
Tabel 2.6	Perbandingan Kandungan Biomassa pada Telur, Bakteri, Kapang dan Mikroalga.....	14
Tabel 2.7	Perbandingan Komposisi Umum Sumber Makanan Manusia dan Mikroorganisme yang Berbeda.....	15
Tabel 2.8	Komposisi Pupuk Pembiakan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp	21
Tabel 2.9	Mikroalga yang Relevan Untuk Aplikasi Pangan/Pakan dan Informasi Aspek Keamanan.....	22
Tabel 3.1	Data pengukuran kadar BSA standar Metode Biuret	32
Tabel 4.1	Nilai pH, Suhu, Salinitas dan <i>Dissolve Oxygen</i> pada Media Perlakuan	40
Tabel 4.2	Kandungan Nitrat pada Medium Kultivasi	42
Tabel 4.3	Rerata Jumlah Kelimpahan sel Mikroalga <i>Chlorella</i> sp pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50%	44
Tabel 4.4	Selisih Jumlah Kelimpahan Sel pada Perlakuan Penambahan Limbah selama Kultivasi	47
Tabel 4.5	Rerata Nilai Salinitas Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari	49
Tabel 4.6	Rerata Nilai <i>Dissolved Oxygen</i> Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari.....	52
Tabel 4.7	Rerata Nilai Suhu Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari	55
Tabel 4.8	Rerata Nilai pH Pada Penambahan Media Limbah <i>Whey</i> Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari.....	58
Tabel 4.9	Selisih Jumlah Nitrat pada Perlakuan Penambahan Limbah <i>Whey</i> Tahu selama Kultivasi.....	67

Tabel 4.10 Rerata Kandungan Protein Sel *Chlorellas* pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 20%, 60% dan 100% yang Dikultivasi Selama 10 Hari 64

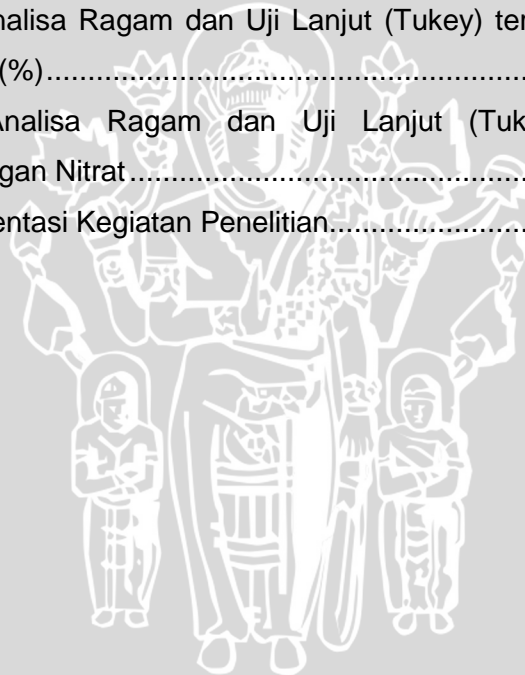
Tabel 4.11 Selisih Jumlah Kandungan Protein pada Perlakuan Penambahan Limbah selama Kultivasi 65

Tabel 4.12 Komposisi Perlakuan Terbaik kultur *Chlorella* sp..... 66



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Analisis Sampel Penelitian.....	76
Lampiran 2.	Perhitungan N-Nitrat Media Perlakuan.....	77
Lampiran 3.	Pengukuran Kualitas media	78
Lampiran 4.	Metode Ekstraksi Menggunakan Sonikator	79
Lampiran 5.	Metode Analisis Nutrisi Biomassa Mikroalga.....	79
Lampiran 6.	Data Kelimpahan Sel Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella</i> sp	80
Lampiran 7.	Data Pengamatan Penelitian Pendahuluan.....	81
Lampiran 8.	Data Pengamatan Penelitian Utama	82
Lampiran 9.	Data Analisa Ragam dan Uji Lanjut (Tukey) terhadap Selisih Kelimpahan Sel.....	88
Lampiran 10.	Data Analisa Ragam dan Uji Lanjut (Tukey) terhadap Selisih Protein (%).....	88
Lampiran 11.	Data Analisa Ragam dan Uji Lanjut (Tukey) terhadap Kandungan Nitrat.....	89
Lampiran 12.	Dokumentasi Kegiatan Penelitian.....	90



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kekurangan Energi Protein (KEP) adalah keadaan kurang gizi yang disebabkan oleh rendahnya konsumsi energi dan protein dalam makanan sehari-hari sehingga tidak memenuhi Angka Kecukupan Gizi (AKG) (Mollet dan Rolwland, 2002; Young, 2000). Dampak Kekurangan Energi Protein (KEP) pada anak-anak yakni dapat menghambat pertumbuhan, tubuh menjadi rentan terhadap penyakit infeksi serta penurunan kecerdasan anak. Sedangkan pada orang dewasa dapat menurunkan produktifitas kerja dan derajat kesehatan serta menjadi rentan terhadap serangan penyakit (Kotilainen, *et al.* 2006; Roberfroid, 2000a, 2000b).

Di Indonesia sendiri hal ini dapat dilihat dari masih tingginya anak balita di daerah Nusa Tenggara Timur mengalami kekurangan gizi yakni sebanyak 21.134 anak (Kompas, 2015). Kekurangan gizi di Indonesia terbesar disebabkan karena kurangnya energi protein (Muhardi, 2015). Kekurangan protein dalam tubuh menyebabkan penyakit kwasiorkor. Penyakit ini ditandai dengan pengecilan otot, perubahan mental, infeksi, anemia, serta gangguan pada kulit. Asalan inilah yang juga menjadi dasar suatu penyebab serius masalah gizi buruk-kurang di Indonesia (Nigam dkk, 2009). Tingginya prevalensi gizi buruk-kurang pada balita dan anak-anak yang terus berlanjut mengakibatkan penurunan kualitas sumber daya manusia dimasa depan.

Protein merupakan salah satu yang berperan penting dalam peningkatan gizi masyarakat Indonesia namun beberapasumber protein baik nabati maupun hewani masih terbatas pada harga yang tinggi. Harga daging, ikan, protein nabati yang harganya mulai melambung tinggi juga dipengaruhi oleh proses produksinya. Sumber protein membutuhkan waktu produksi yang lama seperti daging sapi dan telur (Makmur, 2010). Selain itu juga memiliki daya simpan yang jauh lebih pendek daripada bahan pangan nabati bila dalam keadaan segar (kecuali telur). Pada sumber protein nabati seperti sereal dan kacang-kacangan memiliki umur kurang dari satu tahun dan merupakan tanaman musiman (Sumaryanto, 2009). Selain itu pengaruh perubahan iklim yang terjadi saat ini mengakibatkan perubahan pola tanam, perubahan pola hujan sehingga waktu kapan akan terjadi musim kering atau musim hujan sulit diprediksi, munculnya

hama atau penyakit tanaman yang tidak terprediksi dan lainnya (Limbongan dan Soplanit, 2007). Hasil penelitian sejauh ini menemukan sumber protein lain yang memiliki kandungan protein tinggi lebih dari protein hewani dan nabati, proses produksi cepat serta tidak dipengaruhi oleh musim maupun iklim serta kemudahan dalam penyimpanan dan pendistribusiannya yakni Protein Sel Tunggal (Hadiyanto dkk., 2012).

Protein Sel Tunggal (PST) merupakan sel kering atau biomassa mikroorganisme seperti khamir, bakteri, dan ganggang yang dapat digunakan sebagai sumber protein untuk pangan dan pakan (Wuryastuti, 1992; Naiola, 1998; Madigan et al., 2000). PST merupakan salah satu alternatif untuk pemenuhan kebutuhan protein di masa depan, karena selain mengandung protein tertentu, juga mengandung karbohidrat, lemak, vitamin, mineral, dan nutrisi lain yang dibutuhkan manusia (Kuswardani dan Wijajaseputra, 1998; Amaria dkk., 2001). *Chlorella* sp. merupakan jenis ganggang hijau yang mengandung protein tinggi berkisar 40-50% dan sumber mikronutrien serta senyawa bioaktif berupa klorofil total 20-30 mg/g (Becker, 2007). Beberapa mikroalga seperti *Spirulina* sp, *Chlorella* sp. dipilih sebagai sumber bahan makanan masa depan oleh Internasional Association of Applied Microbiology dikarenakan mempunyai kadar protein yang sangat tinggi. Selain mengandung protein tinggi *Chlorella* sp juga mengandung senyawa bioaktif berupa klorofil yang merupakan kandungan zat warna hijau didalam sel digunakan untuk proses fotosintesis dalam menghasilkan energi. Penelitian dari Netherlands Cohort Study menyatakan bahwa dengan mengkonsumsi klorofil dapat menurunkan risiko terkena kanker (Balder et al., 2006).

Budidaya *Chlorella* sp secara umum menggunakan media air laut dan sejumlah nutrisi. Pemenuhan kebutuhan nutrisi untuk *Chlorella* sp. sangat bergantung pada ketersediaannya dalam medium kultur. Jenis pupuk yang banyak dipilih masyarakat dalam kultur *Chlorella* sp. adalah jenis PA (Pro Analisis) yang sudah distandarkan seperti pupuk Walne, Guillard, dll. Mahalnya harga pupuk jenis PA menjadi dasar pencarian pupuk alternatif pada kultur *Chlorella* sp. yang mampu menghasilkan nutrisi serta kepadatan sel yang tinggi, dengan harga yang ekonomis dan mudah diperoleh oleh masyarakat. Salah satu contohnya adalah media limbah *whey* tahu.

Limbah *whey* tahu dapat dijadikan media pertumbuhan mikroalga, karena masih mengandung nutrisi yang bermanfaat bagi mikroalga. Limbah tersebut

mengandung unsur makro terutama nitrat dan fosfat dalam jumlah yang tinggi yakni Nitrat (25,355 ppm) dan dilengkapi pula dengan unsur mikro berupa mineral seperti Fe, Mg, Zn yang dapat berperan sebagai *growth factor* dalam pertumbuhan alga (Widianingsih, 2011). Peningkatan pola konsumsi masyarakat terhadap tahu dari tahun 2009 sebanyak 6050 ton dan ditahun 2013 mencapai 7.039 ton sejalan dengan meningkatnya limbah yang dihasilkan (Survei Sosial Ekonomi, 2013). Sehingga potensi pemanfaatan limbah *whey* tahu sangatlah menjanjikan. Melalui penelitian ini diharapkan dapat menanggulangi pencemaran oleh limbah pangan dan peningkatan biomassa *Chlorella* sp sebagai sumber PST.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah limbah *whey* tahu dapat dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan *Chlorella* sp.?
2. Apakah penambahan limbah *whey* tahu berpengaruh terhadap kelimpahan sel dan kandungan protein *Chlorella* sp.?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui potensi limbah *whey* tahu yang dapat dimanfaatkan sebagai substrat pertumbuhan *Chlorella* sp.
2. Mengetahui penambahan limbah *whey* tahu berpengaruh terhadap kelimpahan sel dan kandungan protein *Chlorella* sp.?

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Pemanfaatan limbah *whey* tahu sebagai media pertumbuhan mikroalga sehingga mengurangi dampak pencemaran lingkungan.

1.5 Hipotesis Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Limbah *whey* tahu dapat dimanfaatkan sebagai nutrisi pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp.
2. Penambahan limbah *whey* tahu berpengaruh terhadap kerapatan sel mikroalga *Chlorella* sp.

3. Penambahan limbah *whey* tahu berpengaruh terhadap jumlah kandungan protein yang dihasilkan



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein Sel Tunggal (*Single Cell Protein*)

Istilah *Single Cell Protein* (SCP) atau sering disebut Protein Sel Tunggal (PST) menurut Somaye (2008) didefinisikan sebagai isolat protein atau semua komponen sel mikroorganisme yang mengandung nilai nutrisi baik karena kandungan protein yang tinggi, lemak dan vitamin serta mengandung asam – asam amino esensial yang lengkap. Sementara menurut Hadiyanto (2012) PST merupakan protein mikroorganisme kering seperti ganggang, bakteri, ragi, kapang dan jamur tingkat tinggi yang ditumbuhkan pada suatu sistem kultur tertentu untuk digunakan sebagai sumber protein pangan manusia maupun ternak.

Tabel 2.1. Komposisi Sel Mikroorganisme (%) Berat Kering

Komponen (%)	Mikroalga	Bakteri	Kapang	Khamir
Protein	40-60	50-65	30-45	45-55
Lemak	7-20	1-3	2-8	2-6
Abu	8-10	3-7	9-14	5-9,5
Lemak	7,0-20	1,5-3,0	2-8	2,0-6
Asam Nukleat	3,0-8,0	8,0-16	7-10	6,0-12
Toksin	-	Endotoksin dari bakteri gram negatif	-	Mycotoksin dari banyak spesies

(Sumber : Becker, 2007 dan Nasser dkk, 2011)

Penggunaan mikroorganisme yang dibiakkan untuk produksi protein sel tunggal memiliki beberapa syarat yakni; memiliki sifat tidak menyebabkan penyakit terhadap manusia, nilai gizinya baik, kandungan asam nukleat yang rendah dan tidak menghasilkan bahan beracun atau toksin sehingga aman untuk dikonsumsi (Bhalla, *et al.*, 2007). Berdasarkan **Tabel 2.1** dapat dilihat komponen sel kering beberapa mikroorganisme yang mana keuntungan mikroalga sebagai sumber protein sel tunggal salah satunya tidak menghasilkan toxin. Selain itu kandungan asam nukleat yang rendah dibandingkan sumber mikroorganisme lainnya yakni 3-8% dari batas produk PST yang komersial yakni tidak lebih dari 8,5%. Kelebihan asam nukleat pada manusia akan mengakibatkan timbulnya gangguan pencernaan, ginjal, asam urat, dan gangguan kulit (Durmaz, 2007). Hal ini menjadi dasar penggunaan mikroalga karena lebih efisien karena tidak diperlukan *treatment* dalam menurunkan kadar asam nukleat serta kemudahan

dalam produksi protein dibanding dengan yang bersumber dari hewani dan sumber mikroorganisme lain. Selain itu juga berdasarkan penelitian yang terdulu penggunaan mikroorganisme tertentu dapat memberikan dampak positif dan negatif seperti dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2.2. Produksi SCP dari Mikroorganisme yang Sudah dikembangkan

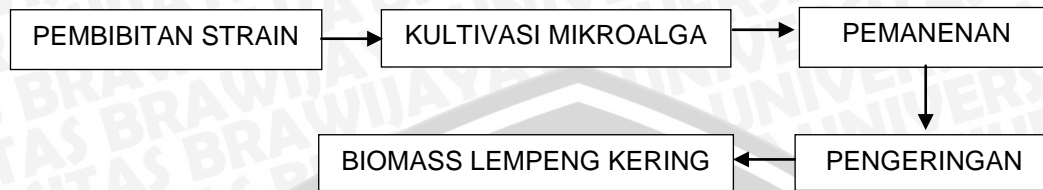
Jenis	Keterangan	Sumber
Bakteri	Penerimaan bakteri sebagai pangan manusia dan ternak sangat rendah, ukuran sel bakteri sangat kecil sehingga separasi biomassa sulit, selain itu kandungan asam nukleat bakteri lebih tinggi dibanding mikroorganisme yang lain.	Bhalla, et al., 2007
Kapang	Beberapa mikroorganisme juga memproduksi toksin yang berbahaya, misalnya aflatoksin oleh beberapa kapang, serta kandungan asam nukleat tinggi dan separasi biomassa sulit.	Manfaati, 2010
Khamir	Penerimaan sebagai pangan manusia dan ternak sangat rendah, kandungan asam nukleat tinggi, separasi biomassa sulit serta kandungan protein kasar lebih rendah serta waktu regenerasi yang lebih lama dibanding bakteri	(Somaye, et al.,2008)
Mikroalga	Kandungan asam nukleat rendah hanya sekitar 5%, ukuran sel ganggang lebih besar sehingga lebih mudah dipanen, tdk membutuhkan lahan yang luas, substrat pertumbuhannya sangat sederhana serta penerimaan produksi PST oleh manusia dan ternak lebih baik	(Qian et al., 2009).

Melalui penelitian –penelitian yang sudah dilakukan, ternyata protein sel tunggal dari *Chlorella sp.* bermanfaat untuk memelihara kebugaran, membantu menurunkan berat badan, menurunkan kolesterol, serta membantu mengatasi beberapa penyakit, seperti : diabetes melitus, hipertensi, gangguan pencernaan, anemia, melindungi kerusakan ginjal akibat toksin dan lainnya (Round, 1973 dalam Wahyudi, 2009). Di negaramaju, *Chlorella sp.* adalah makanan sehat yang paling digemari karena 3 hal, yaitu : mengandung protein tinggi (62-68%), kaya vitamin B dan pigmen, serta merupakan sumber energi yang dapat dipergunakan langsung dalam bentuk glikogen. Perkembangan terakhir tengah dilakukan penelitian tentang antibiotik yang dihasilkan *Chlorella*(dikenal sebagai *chlorellin*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada manusia atau hewan.

2.1.1 Proses Pembuatan PST (Protein Sel Tunggal) dari Mikrolga

Mikroalga saat ini masih digunakan oleh masyarakat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral, dan lebih dikenal sebagai pangan fungsional. Jika di bandingkan dengan protein bersel tunggal yang bersumber dari mamalia, mikroalga lebih unggul di bidang efisiensi dan kemudahan dalam produksinya.

Proses produksi protein sel tunggal dari mikroalga itu sendiri terdiri beberapa tahapan diantaranya seperti pada **Gambar 2.1.** (Bhalla *et al.*, 2007) Berikut penjelasannya :



Gambar 2.1. Diagram Alir Sederhana Proses produksi PST menggunakan Algae *Spirulina sp* (Sumber :Bhalla *et al.*, 2007)

1. Pembibitan Strain

Menurut Bhalla *et al* (2007) pada proses pembibitan strain diawali dengan kultur volume 10 ml dalam tabung reaksi dengan merupakan kultur tahap pertama diperoleh dari hasil kultur media agar. Hasil dari kultur tabung reaksi dijadikan bibit kultur berikutnya pada skala laboratorium maupun intermediet pada wadah berukuran 50 ml, 100 ml, 500 ml dan seterusnya sampai 500 L. Media kultur ini menggunakan air laut steril berasal dari *purefilter* UV 1 mikron dan *catridge* filter 5 μ m. Pengambilan bibit melalui koloni yang tumbuh dan berkembang di media agar dipindahkan menggunakan jarum ose, masukkan dalam tabung reaksi berisi air laut steril sebagai media kultur. Sumber nutrisinya menggunakan pupuk komersil seperti *Walne*, *Benneck*, *F/2* dan lainnya. Fase pertumbuhan mikroalga yang baik adalah 7-8 hari. Cahaya yang digunakan berasal dari lampu dengan intensitas cahaya 1000-2000 lux dan diinkubasikan pada suhu 23°C. Selama masa kultur stok bibit dalam tabung reaksi harus dikocok setiap hari dengan tujuan untuk menghindari terjadinya pengendapan fitoplankton dan difusi udara untuk meningkatkan kelarutan CO₂ (Cahyaningsih, 2010).

2. Kultivasi Mikroalga

Teknik budiaya mikroalga yang paling sering digunakan yakni *Open ponds system* dan *photobioreactor system* (Tokusoglu, 2006). Sistem budidaya yang paling cocok dalam pembuatan protein sel tunggal skala massal untuk konsumsi manusia yakni menggunakan *photobioreactor system*. Sistem budidaya dengan menggunakan *photobioreactor* dikembangkan untuk mengatasi permasalahan

kontaminasi dengan sistem tertutup. Menurut Bhalla *et al.*, (2007) perlu diperhatikan jelas bahwa produksi PST untuk manusia haruslah terhindar dari kontaminasi baik dari fitoplanton lain, maupun dari zooplankton sehingga diperoleh kultur tunggal mikroalga dengan spesies tertentu. *Photobioreactor* memiliki rasio luas permukaan dan volume yang besar. Produktivitas mikroalga menggunakan *photobioreactor* dapat mencapai 13 kali lipat total produksi dengan menggunakan sistem *open raceway ponds* (Grima, 2003). Perbandingan antara penggunaan sistem *open ponds* dengan sistem *photobioreactor* dapat dilihat pada **Tabel 2.3**

Tabel 2.3 Perbandingan antara penggunaan sistem open pond dengan sistem photobioreactor.

Faktor	Open Pond	Photobioreactor
Ruang yang dibutuhkan	Tinggi	Rendah
Kehilangan air	Sangat tinggi	Rendah
Kehilangan CO ₂	Tinggi	Rendah
Konsentrasi O ₂	Rendah	Tinggi, terjadi <i>build up</i>
Temperatur	Bervariasi	Membutuhkan pendingin
Pembersihan	Tidak perlu	Perlu
Kontaminasi	Tinggi	Tidak ada
Kualitas biomassa	Bervariasi	Tergantung produksi
Evaporasi	Tinggi	Tidak ada
Biaya pemanenan	Tinggi	Lebih rendah
Kebutuhan energi (W)	4000	1800

(sumber : Harun dkk., 2010)

Kultur mikroalga *Spirulina sp* secara massal dilakukan skala volume 1 – 100 ton. Menurut Bhalla *et al* (2007) melaporkan dalam pembuatan PST secara massa volume 12 ton dari *Spirulina sp* dilakukan pada *photobioreactor* tipe *plate-flat photobioreactor* berbahan gelas (**Gambar 2.2**). Tipe *plate-flat photobioreactor* lebih disukai karena: (i) konsumsi energi lebih rendah dan kapasitas transfer massa tinggi; (ii) efisiensi fotosintesis tinggi; dan (iii) tidak terdapat ruang yang tidak terkena cahaya (Tokusoglu, 2006). Proses kultivasi menggunakan media air laut dengan pencahayaan sinar matahari untuk proses fotosintesis sebagai pertumbuhan sel. Media air laut yang optimal digunakan kadar garam 25 ppt dan diperkaya dengan pemberian pupuk komersil (Urea, TSP dan ZA atau FeCl₃). Perbandingan pupuk komersil yang digunakan terdiri dari Urea 150 ppm, NPK 10 ppm, ZA 10 ppm dan FeCl₃ 3 ppm. (Amini, 2010). Pengisian air laut agar steril melalui pipa inlet yang diberi *filter bag* berukuran 10 mikron sebagai penyaring air laut pada flat. Pengisian bibit menggunakan pompa celup dan selang spiral 1 inch sebanyak 2 ton sehingga volume total dalam bak 12 ton. *Treatment* air laut

dengan larutan kaporit 50-150 ppm, diaerasi kuat agar kaporit tercampur merata sehingga dapat mematikan organisme-organisme patogen, setelah 1 jam matikan aerasi agar *chlor* tidak mudah menguap, biarkan selama 24 jam. Menetralkan kandungan kaporit dalam media maka ditambahkan Natrium thiosulfat 25 ppm. Setelah 15 menit media netral dilakukan pemupukan. Media kultur yang telah netral dari kandungan kaporit dapat digunakan untuk kultur. Stater atau bibit *Spirulina sp* yang digunakan berasal dari kultur skala *intermediet*. Pemeliharaan bibit selama 7 hari.



Gambar 2.2. Instalasi *flat photobioreactor*;
(Sumber : Grima, 2003)

3. Pemanenan

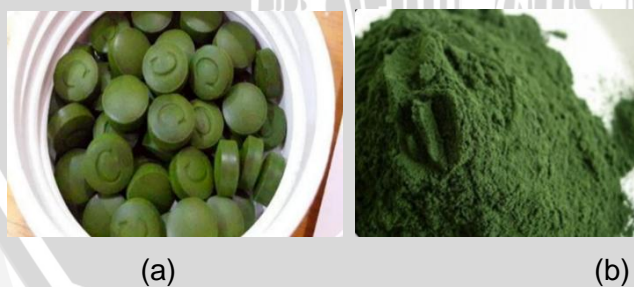
Pemanenan Mikroalga umumnya dilakukan pada umur mikroalga 5 – 7 hari pemeliharaan pada fase eksponensial (fase pertumbuhan). Bila kultur lebih dari 15 hari mikroalga mengalami fase stasioner atau fase menuju kematian dengan diketahui bahwa kepadatan sel didalam kultur sudah mempunyai nilai yang sama atau tetap kemudian menurun menuju fase kematian (Prabowo, 2009). Teknik yang banyak diaplikasikan untuk proses pemanenan mikroalga adalah flokulasi, sentrifugasi, dan filtrasi. Kinerja teknik pemanenan secara kuantitatif dapat dievaluasi menggunakan beberapa parameter antara lain: laju pemisahan air, kandungan padatan pada lumpur mikroalga, dan yield dari proses (Tokusoglu, 2006).

Pemanenan mikroalga *Spirulina sp* menurut Bhalla *et al* (2007) yakni dilakukan dengan menggunakan metode filtrasi kontinu akan lebih mudah digunakan karena hanya membutuhkan energi lebih kecil dibanding sentrifugasi dan tidak memerlukan bahan-bahan kimia, mudah dibersihkan dan disterikan,

dan kontaminasi mikroorganisme atau pengotor lainnya dapat dihindari dengan mudah sehingga akan memperkecil biaya produksi dan aman dikonsumsi.

4. Pengeringan

Biomassa mikroalga sesudah dipanen dapat disimpan atau *preservation* dengan metode pengeringan langsung dengan matahari atau dapat dikeringkan pada ruangan ber AC (Effendi, 2003). Pengeringan dengan sinar matahari langsung dan terlalu lama dapat merubah warna dari biomassa mikroalga. Proses *preservation* lainnya yakni dengan metode seperti *freeze drying*, *vacuum drying*, *continuous culture*, dan *imobilisation*, serta *encapsulation* (Prabowo, 2009). Pengeringan mikroalga dengan menggunakan alat *vacuum drying* hasilnya cukup bagus dan tidak merubah warna (Rostini, 2007). Menurut Bhalla *et al.*, (2007) Biomassa basah mikroalga *Spirulina sp* yang diperoleh dikeringkan menggunakan alat *freeze drying* yang menggunakan prinsip pengeringan pada suhu rendah sehingga kandungan nutrisi tidak rusak akibat suhu tinggi. Hasil yang diperoleh dari pengeringan ini berupa biomassa kering *Spirulina sp* bisa sebagai sumber protein sel tunggal. Biomassa kering ini dapat diproses lagi menjadi bubuk untuk menyeragamkan ukuran kemudian melalui proses pengemasan secara aseptis menjadi produk makanan sehat, *Super food*, Pakan tambahan dalam sebuk atau di olah lebih lanjut menjadi bentuk kapsul atau tablet seperti pada **Gambar 2.4**



(c)

Gambar 2.3. a). Bubuk Spirulina sp. (b). Kapsul Komersial Spirulina sp. (c). Produk Komersial bubuk Spirulina sp.

(Sumber : *International Algae Competition*, 2015 dan Spolaore *et al.*,2006)

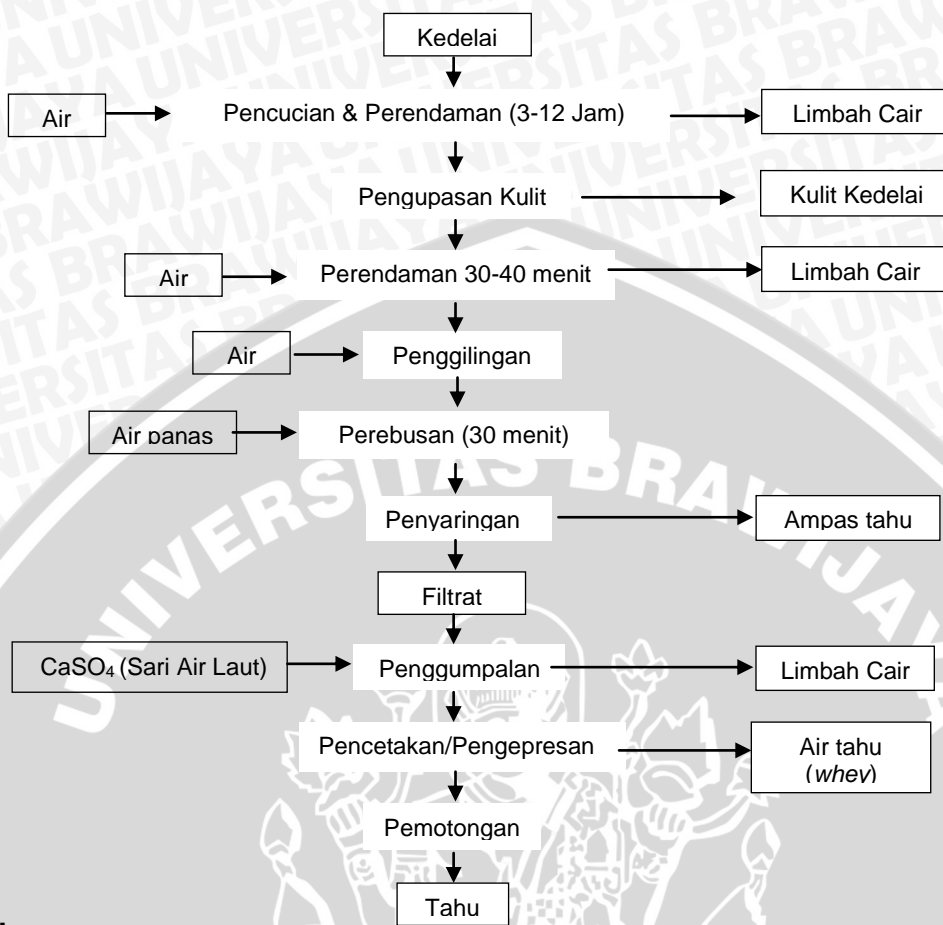
2.2 Limbah *Whey* tahu

Pelaksanaan dan pengendalian limbah harus diupayakan pemanfaatannya agar mempunyai keuntungan atau nilai tambah. Limbah industri tahu merupakan produk buangan dari pabrik pengolahan tahu yang terdiri dari limbah padat dan cair. Limbah padat tahu (ampas tahu) sudah digunakan sebagai bahan baku untuk makanan ikan (Ekawati *et al.*, 1999 *dalam* Jamil, 2001), sedangkan limbah *whey* tahu telah digunakan sebagai pupuk untuk fitoplankton (Jamil, 2001).

Limbah *whey* tahu merupakan limbah pangan yang mengandung senyawa organik, dan tidak beracun. Limbah *whey* tahu mengandung nutrisi berupa protein, karbohidrat dan lipid yang tingkat pencemarannya sangat tinggi (Sulistyo *et al.*, 2007). Limbah *whey* tahu dihasilkan dari proses perendaman kedelai, pencucian kedelai dan peralatan proses produksi tahu, perebusan, penyaringan, pengepresan dan pencetakan tahu, oleh karena itu limbah *whey* yang dihasilkan jumlahnya banyak (KLH, 2006 *dalam* Kaswinarni, 2007). Proses produksi tahu



dan limbah yang dihasilkan secara rinci dapat dilihat pada **Gambar**



2.1.

Gambar 2.4. Diagram Alir Proses Produksi Tahu
(Sumber : Hadiyanto, 2012)

Proses penanganan air limbah secara biologis terdiri dari campuran mikroorganisme yang mampu memetabolisme komponen - komponen organik. Kelompok mikroorganisme tersebut adalah Bakteri, Fungi, *Algae*, *Protozoa*, *Rotifera*, *Crustacea*, dan Virus (Metcalf and Eddy, 1979 dalam Kaswinarni, 2007). Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya, limbah *whey* tahu mengandung nutrisi yang bisa menjadi pupuk fitoplankton.

2.2.1 Karakteristik dan Kandungan Limbah *Whey* Tahu

Terdapat dua hal yang perlu diperhatikan dari limbah industri tahu yakni karakteristik fisika dan kimia. Karakteristik kimia meliputi bahan organik, bahan anorganik dan gas. Sedangkan karakteristik fisika meliputi padatan total, warna, bau, dan suhu. Suhu buangan industri tahu berasal dari proses pemasakan

kedelai. Suhu limbah *whey* tahu pada umumnya 80°C sampai 100°C. Pembuangan limbah ke perairan akan mampu meningkatkan suhu air sehingga akan mempengaruhi kehidupan biologis, kerapatan air, viskositas, tegangan permukaan kelarutan oksigen dan gas lain (BPPT, 2002).

Tabel 2.4. Kandungan Unsur Hara pada Limbah Tahu *Whey*

Nama unsur Hara	Kandungan unsur Hara (ppm)
Fe	3,52
Mn	0,35
Si	9,1
Cu	2,64
Zn	1,97
Mo	6,48
N _{total}	28,26
P	2,8
K	750,20
Mg	4,50

Sumber : Jamil, 2001

Senyawa-senyawa organik yang terkandung di dalam air buangan tersebut dapat berupa 40-60% protein, 25-50% karbohidrat, dan 10% lemak (Nurhasan dan Pramudyanto, 2003; Sugiharto, 2004). Kandungan unsur hara pada limbah tahu *whey* dapat dilihat pada **Tabel 2.4**. Tingginya kandungan (N-total) jika masuk ke lingkungan perairan akan meningkatkan total nitrogen di perairan tersebut sehingga dapat mengganggu ekosistem. Jumlah kandungan (N-total) pada limbah tahu sebesar 226,06 sampai 434,78 mg/l dan masih terbillang tinggi dari batas yang dianjurkan (Bappeda Medan 2003). Air limbah industri tahu sifatnya cenderung asam dengan pH 4 – 5 (BPPT, 2002), pada keadaan asam ini akan terlepas zat-zat yang mudah menguap. Hal ini mengakibatkan limbah cair industri tahu mengeluarkan bau busuk. Berdasarkan hasil penelitian Myrasandri dan Syafila (2011) terhadap karakteristik air buangan pabrik tahu yakni dapat dilihat pada **Tabel 2.5**(Bappeda Medan, 2003).

Tabel 2.5. Uji karakteristik awal limbah *whey* tahu

Parameter	Satuan	Nilai
pH	-	5,435
Zat Organik	mg/L KmnO ₄	9,449
BOD	mg/L	6,586
COD terlarut	mg/L	8,640
NTK	mg NH ₃ -N / L	297,5
Ammonium	mg NH ₃ -N / L	11,2
Nitrat	mg/L	25,355
Nitrit	mg/L	0,0313
Total Phospat	Mg PO ₄ ³⁻ -P/L	2,0322
Alkalinitas Total	mg/L CaCO ₃	860

Asiditas Total	mg/L CaCO ₃	1270
VSS	mg/L	150
TSS	mg/L	2350

Sumber : Myrasandri dan Syafila, 2011

2.3 Biologi *Chlorella* sp

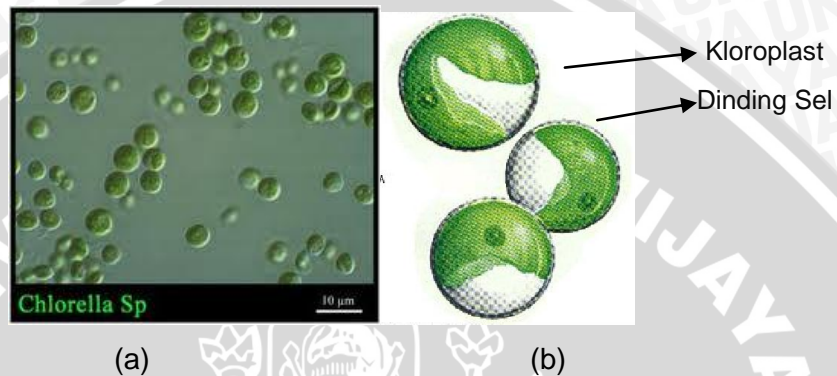
2.3.1 Habitat, Klasifikasi dan Morfologi

Berdasarkan habitat hidupnya *Chlorella* bersifat kosmopolit yakni tersebar hidup di air tawar, payau ataupun laut (Nigam *et al.*, 2011). Prabowo (2009) mengategorikan *Chlorella* sp dalam kelompok alga hijau yang memiliki jumlah genera sekitar 450 dan jumlah spesies lebih dari 7.500. Nama *Chlorella* diberikan karena kandungan zat hijau (klorofil) yang dimilikinya sangat tinggi, bahkan melebihi jumlah yang dimiliki oleh beberapa tumbuhan tingkat tinggi. *Chlorella* termasuk organisme autotrof fotosintetik yang mempunyai kemampuan untuk melakukan fotosintesis dengan sumber energi matahari. Taksonomi *Chlorella* sp menurut Vashishta (1979) dalam Wahyudi (2000) sebagai berikut :

Divisio	: Chlorophyta
Class	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Familia	: <i>Chlorellaceae</i>
Genus	: <i>Chlorella</i>
Spesies	: <i>Chlorella</i> sp

Mikroalga *Chlorella* termasuk tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau berkelompok, berbentuk bulat atau elips tidak mempunyai batang, akar, cabang dan daun serta berukuran 2-8 µm dan beberapa spesies mencapai ukuran 10-12 µm seperti pada **Gambar 2.2**. Sel *Chlorella* mengandung 60-68% protein, lemak serta vitamin A, B, D, E dan K disamping terdapat pigmen hijau (klorofil) yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis (Sachan, 1982 dalam Rostini, 2007). Sel *Chlorella* sp memiliki protoplast yang dikelilingi oleh membran selektif, sedangkan diluar membran sel terdapat dinding tebal yang terdiri dari selulosa dan pektin. Pada bagian tengah sel terdapat suatu lempengan pipih letaknya parietal yang disebut kloroplas (Vashita, 1970 dalam Rostini, 2007). Kloroplas terdiri dari lamella-lamella fotosintetik yang berbentuk bulan sabit dan mempunyai suatu pirenoid sentral yang dibatasi oleh suatu lempengan tepung. Kloroplas umumnya berbentuk bulan sabit, cangkir atau lonceng yang terletak di tepi seperti pada **Gambar 2.6**

(b). Rongga kloroplas mengandung sitoplasma yang tidak berwarna. Sel *Chlorella sp.* berwarna hijau karena mengandung klorofil a dan b dalam jumlah yang besar. Selain itu juga mengandung pigmen lain yaitu karoten dan xantofil (Rostini, 2007). Pigmen yang menyerap energi matahari adalah klorofil a, sedangkan pigmen karoten merupakan pigmen tambahan (*secondary pigment*) artinya pigmen tersebut dapat pula menyerap energi matahari untuk fotosintesis, namun selanjutnya energi tersebut diteruskan ke pigmen klorofil.



Gambar 2.5. (a). Sel *Chlorella sp.* ukuran 10 µm. (b). Ilustrasi Sel *Chlorella sp.* (Sumber : Rostini, 2007 dan (<http://www.Rbgsyd.nsw.gov.au>, 2012))

2.3.2 Kandungan Nutrisi *Chlorella sp.* dan Pemanfaatannya

1. Protein

Mikroalga sebagai sumber protein maupun sebagai sumber pangan telah lama diketahui, dan berdasarkan informasi serta penelitian para ahli, mikroalga yang berbasis pangan tidak memberi efek negatif bagi tubuh meski dikonsumsi secara rutin dalam jangka waktu lama maupun singkat. Beberapa kurun dekade belakangan ini mikroalga dapat dijumpai di pasaran dalam bentuk tablet, kapsul, minuman kaleng, permen, dan dicampur dalam pangan lain untuk meningkatkan nilai nutrisi dan rasanya. Mikroalga yang sering dijumpai adalah dari jenis *Spirulina*, *Arthosphira*, *Chlorella*, dan *D. Salina*.

Tabel 2.6. Perbandingan Komposisi Umum Sumber Makanan Manusia dan Mikroorganisme yang Berbeda

Nama Spesies	Komposisi biomassa (% bobot kering)		
	Protein	Karbohidrat	Lipid
Bakteri	47-86	2-36	1-39
Kapang	13-61	25-69	1-30
Kedelai	37	30	20
Nasi	8	77	2
Daging	43	1	34
Susu	26	38	28

Telur	49	3	45
<i>Spirulina platensis</i>	46-70	8-14	4-9
<i>Nannochloropsis sp</i>	52-56	16-20	11-28
<i>Chlorella sp</i>	51-68	12-17	14-22

Sumber : Becker, 2007

Tabel 2.6 menunjukkan perbandingan kadar protein, karbohidrat dan lipid dari mikroalga yang diproduksi komersial dibanding sumber makanan lain. pada tabel dapat dilihat bahwa *Chlorella*sp berpotensi untuk dijadikan sumber protein dilihat dari kandungan proteinnya dibanding dengan sumber protein lainnya seperti telur, dan daging. *Chlorella* merupakan salah satu hasil produksi pangan terbesar dengan lebih dari 40 produsen di dunia. *Chlorella* digunakan sebagai sumber pangan karena kaya akan protein, selain itu juga dapat digunakan sebagai senyawa aditif. Salah satu produsen *Chlorella* terbesar adalah Taiwan *Chlorella Manufacturing and Co*, dengan produk 400 ton biomassa kering per tahun menggunakan sistem pembiakan photobioreaktor (Harun, 2009).

Protein yang terdapat dalam *Chlorella sp* terdiri dari asam amino esensial. Pada **Tabel 2.7** dapat dilihat kandungan asam amino esensial *Chlorella sp*. Asam amino pada *Chlorella*sp. ini tidak bisa di disintesis didalam tubuh manusia, sehingga membutuhkan sumber asam amino dari luar tubuh. Asam amino ini dibutuhkan oleh tubuh dalam banyak hal, misalnya membantu pertumbuhan, regenerasi sel, dan menjaga gula dalam darah. Selain kandungan itu juga terdapat pula sporopollenin yang dapat berguna mengikat racun dan mengikat logam-logam berat serta pestisida (Spolaore, 2006).

Tabel 2.7. Presentase Asam Amino Esensial pada *Chlorella*sp.

Asam Amino Esensial	Presentase dalam berat kering (%)
Isoleucine	2,01
Leucine	4,14
Lysine	3,29
Methionine	2,04
Phenylalanine	2,57
Threonine	2,42
Tryptophan	0,80
Valine	3,00

Sumber : <http://www.Chlorellahellas.com/what.htm>

2. Lipid

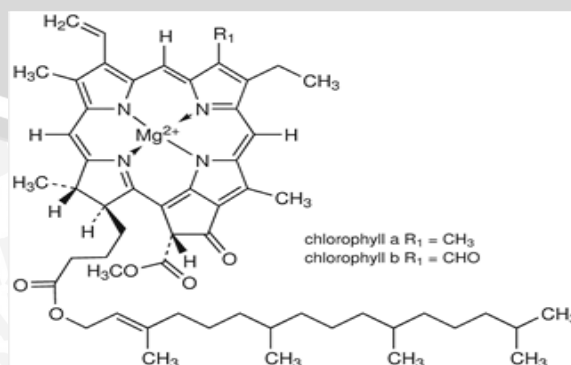
Lipid yang terdapat dalam sel mikroalga banyak dimanfaatkan sebagai *biofuel* atau biodiesel. Lipid yang terdapat pada mikroalga diperkirakan dapat mencapai 200 kali dibanding dengan tumbuhan besar penghasil minyak, seperti kelapa sawit dan jarak pagar (Rachmaniah, 2010). Lipid dalam sel *Chlorella sp* dapat dikelompokkan menjadi tiga, yaitu : lemak netral, glikolipid (tersimpan dalam membran), dan lemak polar (tersimpan dalam membran plasma). Lemak – lemak netral inilah yang dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan *biofuel* dan biodiesel.

3. Klorofil

Pemanfaatan mikroalga selain sebagai sumber pangan juga sangat menjanjikan untuk digunakan sebagai sumber nutrisi berupa klorofil. Klorofil merupakan zat warna hijau yang terkandung dalam sel mikroalga hijau seperti *Chlorella sp*. Klorofil dalam mikroalga tersusun atas lebih dari satu jenis klorofil, seperti klorofil-a, klorofil-b, klorofil-c, -d dan -e. klorofil-a adalah klorofil primer yang hampir dijumpai di sebagian besar mikroalga, dan merupakan satu satunya klorofil yang dimiliki mikroalga jenis *Cyanobacteria* serta *Rhodophyta*. Beberapa mikroalga dapat menghasilkan pigmen selain dari pigmen hijau yang dihasilkan dari proses fotosintesis. Beberapa pigmen yang umum digunakan dalam industri adalah klorofil, phycobiliprotein dan karotenoid.

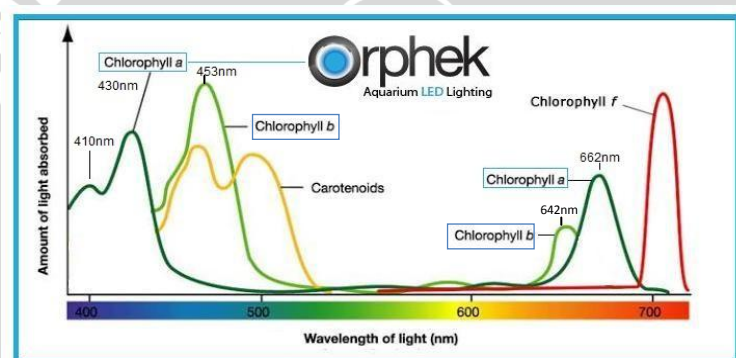
Mikroalga *Chlorella sp*. memiliki jumlah kandungan klorofil terbesar dibanding semua tumbuhan hijau, yang dapat mencapai enam kali dibanding klorofil pada bayam dan lima kali dibanding mikroalga *Spirulina sp*. Klorofil yang terkandung dalam *Chlorella sp*. adalah klorofil a dan klorofil b dengan jumlah masing – masing sebesar $\pm 5\text{mg/L}$ dan $\pm 2,5\text{ mg/L}$ (Qian *et al.*, 2009). Secara struktur, kedua macam klorofil ini berbeda pada gugus cabang pada cincin utamanya.

Gambar 2.7 adalah perbandingan struktur kedua macam klorofil tersebut.



Gambar 2.6 Struktur Kimia Klorofil a dan Klorofil b
(Sumber : <http://www.chm.bris.ac.uk/>)

Kedua jenis klorofil ini saling membantu dalam proses fotosintesis. Klorofil a sebagai pigmen fotosintesis utama dapat menangkap cahaya dengan panjang gelombang 430 nm (biru) dan 622 nm (merah). Klorofil a banyak dihasilkan untuk proses fotosistem I. Pada fotosistem I dalam keadaan sedikit cahaya, klorofil b akan lebih banyak dibentuk untuk meningkatkan kemampuan fotosintesis dengan menangkap gelombang pada panjang 453 nm dan 642 nm. **Gambar 2.8** menunjukkan perbandingan absorbansi kedua klorofil tersebut. Dilain sisi senyawa turunan dari klorofil juga dapat digunakan sebagai produk kesehatan. (Ferruzi & Blakeslee, 2007). Penelitian dari Netherlands Cohort Study menyatakan bahwa dengan mengkonsumsi klorofil dapat menurunkan risiko terkena kanker (Balder *et al.*, 2006).



Gambar 2.7 Spektrum Absorbansi Klorofil a dan Klorofil b
Sumber : http://www.chm.bris.ac.uk/motm/chlorophyll/chlorophyll_h.htm

2.4 Kultur Mikroalga *Chlorella sp*

2.4.1 Fase Pertumbuhan

Mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai waktu generasi yang sangat cepat. Oleh karena itu dalam waktu yang relatif singkat, perbanyakan sel akan terjadi sangat cepat, terutama jika tersedia cahaya sebagai sumber energi, walaupun dalam jumlah minimal (Suriawira, 2008). Apabila sejumlah kecil *Chlorella sp* diinokulasikan dalam medium kultur terbatas dan jumlah sel *Chlorella sp* dihitung sebagai fungsi waktu, maka pola pertumbuhan berdasarkan jumlah sel dapat

dikelompokkan menjadi 5 fase yaitu fase adaptasi (*lag phase*), fase eksponensial (*log phase*), fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian (Pelczar dan Chan, 2008). Berikut penjelasannya :

1. Fase adaptasi (*lag phase*)

Fase ini terjadi setelah pemberian inokulum ke dalam media kultur. Fase tunda yang terjadi disebabkan oleh penyesuaian lingkungan yang baru sebelum memulai pembiakan (pembelahan sel). Penyesuaian dalam hal ini berarti suatu masa ketika sel-sel kekurangan metabolit dan enzim akibat keadaan yang tidak menguntungkan dalam pembiakan sebelumnya.

2. Fase pertumbuhan logaritmik (*log phase*)

Pada fase ini sel membelah dengan cepat, sel-sel berada dalam keadaan stabil, dan jumlah sel bertambah dengan kecepatan konstan. Hal ini tergantung pada beberapa hal salah satunya ketika zat makanan dalam pembenihan mulai habis, maka hasil metabolisme beracun yang akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.

3. Fase penurunan laju pertumbuhan

Pada fase ini, laju pertumbuhan sel menurun akibat adanya kompetisi yang tinggi dalam media hidup, dan zat makanan yang tersedia dalam media tidak mencukupi kebutuhan populasi yang bertambah dengan cepat pada fase eksponensial. Akibatnya hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan cukup nutrisi untuk tumbuh dan membelah.

4. Fase stasioner

Pada fase ini jumlah sel cenderung konstan. Hal ini disebabkan oleh habisnya nutrisi dalam medium atau karena menumpuknya hasil metabolisme yang beracun sehingga mengakibatkan pertumbuhan berhenti. Dalam kebanyakan kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner, dimana adanya kehilangan sel yang lambat karena kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel yang baru melalui pembelahan. Bila hal ini terjadi maka jumlah sel akan bertambah secara lambat meskipun jumlah sel hidup tetap.

5. Fase kematian (*death phase*)

Pada fase ini jumlah populasi menurun. Jumlah sel yang mati per satuan waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan.

2.4.2 Faktor Pertumbuhan

Faktor- faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp* agar dapat tumbuh secara normal dan optimal, yakni sebagai berikut :

1. Cahaya

Intensitas cahaya yang diperlukan untuk fotosintesis alga berkisar 3-30 kilo lux. Pada peristiwa fotosintesis, cahaya matahari terlibat dalam suatu reaksi untuk mengaitkan molekul-molekul kecil seperti H₂O dan CO₂ menjadi molekul-molekul besar dalam bentuk senyawa karbohidrat, protein dan lainnya (Wahyudi 2000). Sementara kejenuhan fotosintesis dapat terjadi pada alga hijau bila intensitas cahanya mencapai 5.000 – 7.500 lux, sedangkan pada tingkat intensitas yang lebih tinggi (>10.000 lux) akan terjadi penghambatan proses fotosintesis pada *Chlorella sp* (Wahyudi, 2009). Batas intensitas cahaya dengan efisiensi penuh pada *Chlorella* adalah 500 *footcandles* (4.300 kilo lux) (Pelczar dan Chan, 2008). Hal ini dapat dipakai sebagai dasar bagi ukuran intensitas cahaya buatan yang dipakai dalam usaha budidaya di laboratorium.

2. Suhu

Suhu merupakan faktor pembatas penting untuk kehidupan organisme, karena setiap mikroorganisme mempunyai kemampuan yang terbatas untuk mentolerir perubahan suhu yang terjadi pada lingkungannya. Organisme akan tumbuh dan berkembang dengan baik pada kondisi suhu optimalnya. Mikroalga *Chlorella sp.* dapat dikatakan mempunyai kemampuan yang tinggi untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan, hal ini terlihat dari habitanya yang amat luas. Wahyudi (2009) mengatakan bahwa *Chlorella sp.* mampu hidup dan tumbuh pada kisaran 5 – 35^oC, tetapi suhu optimal untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* adalah berkisar 23 – 35^oC (Effendi, 2003). Pengaruh suhu terhadap kecepatan metabolisme sel adalah pengaruh suhu secara langsung. Kecepatan metabolisme sel alga meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai dicapai suhu optimal, selanjutnya akan turun kembali jika suhu telah melewati titik optimal (Wahyudi, 2009).

3. Kandungan CO₂ bebas

Karbon dioksida (CO₂) merupakan salah satu gas yang penting bagi kehidupan organisme fotosintetik. Gas ini adalah bahan dasar yang esensial untuk membentuk senyawa organik melalui proses fotosintesis (Wahyudi, 2006). Proses kultivasi *Chlorella sp.* pada umumnya diberikan 1% atau 5% CO₂ didalam media kultur (Effendi, 2003). Pemberian yang berlebihan pada media kultur akan membahayakan kehidupan alga, karena akan menyebabkan terjadinya

penimbunan atau pengendapan ion kalsium menjadi CaCO_3 dari hasil penguraian $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ di bahan organik pada perairan sehingga akan menaikkan pH (Wahyudi, 2009). Terjadinya pengendapan tersebut menyebabkan ion kalsium tidak dapat digunakan secara langsung oleh *Chlorella sp.* untuk keperluan proses pembelahan selnya, sehingga *Chlorella sp.* yang dikultur akan kekurangan kalsium dan berakibat lambatnya laju pertumbuhan dan perkembangbiakan sel.

4. Oksigen terlarut

Oksigen merupakan salah satu unsur yang paling penting bagi semua bentuk kehidupan di bumi, karena berfungsi sebagai pengatur proses metabolisme dan reaksi kimia serta biologi lainnya (Wahyudi, 2009). Mikroalga *Chlorella sp.* membutuhkan oksigen untuk respirasi sel, dimana pada peristiwa respirasi ini akan dihasilkan energi untuk pertumbuhan dan perkembangan sel-selnya. Maka ketersediaan oksigen di lingkungan amat menentukan kehidupan *Chlorella sp.* Oksigen terlarut juga digunakan untuk menguraikan material dasar dan bahan organik yang terdapat dalam perairan. Sedangkan menurut Effendi (2003) biakan alga di laboratorium perlu penyediaan oksigen terlarut yang cukup. Kadar oksigen terlarut 3-5 ppm kurang produktif, 5-7 ppm produktifitasnya tinggi dan diatas 7 ppm sangat tinggi.

5. Derajat keasaman (pH)

Pada umumnya alga hijau apat tumbuh baik pada pH 8-9. Di luar kisaran pH tersebut alga masih bisa hidup, tetapi pertumbuhannya tidak optimal. Sumawidjaja (1973 dalam Wahyudi, 2009) menyatakan untuk mengkultur alga maka perlu diperhatikan pH media, karena pH media amat berpengaruh terhadap laju pertumbuhan alga. Pada saat peningkatan pH yang melewati ambang batas, maka kecepatan tumbuh organisme akan menurun. Kultur *Chlorella sp.* mempunyai kisaran pH optimal antara 6,8 – 9,4. Untuk mencegah terjadinya fluktuasi pH yang ekstrim maka perlu dilakukan penambahan EDTA (*Ethyl Diamine Tetra Acetat*) ke dalam media yang berfungsi sebagai buffer atau penyangga (Wahyudi, 2009).

6. Salinitas

Menurut Wahyudi (2000) kadar garam atau salinitas didefinisikan sebagai zat padat yang terlarut dalam satuan volume air yang dinyatakan dalam ppt (*part per thousand*). Hal yang berhubungan dengan salinitas penting artinya bagi kelangsungan hidup organisme perairan. Sachlan (1980 dalam Wahyudi, 2009) menyatakan bahwa *Chlorella sp.* mempunyai toleransi yang cukup tinggi terhadap

kadar garam (salinitas) lingkungan tempat hidupnya. Hal ini dapat dilihat secara nyata dalam hal lingkungan tempat hidupnya maupun distribusinya. *Chlorella* sp dapat hidup di air tawar, air payau maupun air laut. Sedangkan untuk kultur *Chlorella* sp dapat dilakukan pada media yang mempunyai salinitas berbeda – berbeda mulai dari 0 ppm, (air tawar) sampai 35 ppm.

6. Kandungan nutrisi

Mikroalga *Chlorella* sp. sebagaimana organisme hidup lainnya juga memerlukan nutrisi untuk kelangsungan hidupnya. Menurut Round (1973 dalam Wahyudi, 2009) media kultur bagi alga memerlukan tambahan unsur – unsur hara (Makro nutrisi) yaitu : N, P, K, S, dan Mg. Serta unsur-unsur mikro seperti Si, Cu, MN, Co, Na, Fe, dan Bo. Meskipun demikian untuk masing – masing jenis alga, kebutuhan akan unsur – unsur tersebut tidaklah sama, tergantung pada komposisi kimia yang diperlukan oleh jenis alga yang dikultur. Berkaitan dengan hal tersebut, banyak ahli sepakat bahwa unsur N dan P merupakan dua unsur yang mutlak harus tersedia dalam media kultur alga. Dua unsur ini biasanya terdapat dalam bentuk nitrat dan fosfat, nitrogen merupakan komponen utama pembentuk asam amino yang sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan alga. Bila terjadi kekurangan nitrogen maka mengakibatkan lambatnya pertumbuhan alga tersebut, sedangkan unsur fosfat merupakan penyusun materi genetik (DNA dan RNA) sehingga mutlak diperlukan untuk menjamin kelangsungan perkembangbiakannya (Wahyudi, 2009).

2.4.3 Media Kultur

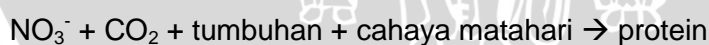
Media kultur adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya (Suriawira, 2008). Media fungsi untuk menumbuhkan mikroba, isolasi, yang dalam pembuatannya harus disterilkan dan menerapkan metode aseptis untuk menghindari kontaminasi pada media. Menurut Pelczar dan Chan (2008) beberapa media berupa pupuk komersial yang sering digunakan secara umum dalam kultivasi mikroalga skala laboratorium yakni *Walne*, *F/2 Guillard*, dan *Benneck* ditampilkan pada **Tabel 2.8** berikut:

Tabel 2.8 Komposisi Pupuk pembiakan mikroalga *Chlorella* sp

Bahan	<i>Benneck</i> (mg/dm ³)	BG-11 (mg/dm ³)	f2 <i>guillard</i> (mg/dm ³)	<i>Walne</i> (mg/dm ³)
NaNO ₃	500	1,5	75	100
Na ₂ EDTA	-	0,001	4,56	45

H ₃ BO ₃	-	2,86	-	33,6
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	-	5	20
FeCl ₃ .6H ₂ O	3-5	-	4,56	1,3
MnCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	0,36
B1	-	-	-	0,1
B12	-	-	0,5	0,005
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	1,81	1801	-
Ferric ammonium citrate	-	0,006	-	-
Na ₂ CO ₃	-	0,02	-	-
Citric Acid	-	0,006	-	-
COCl ₂ .6H ₂ O	-	-	10	0,02
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	-	-	-	0,009
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0,0079	10	0,02
MgSO ₄	100	0,075	-	-
KH ₂ PO ₄	200	0,04	-	-

Pada umum dalam media pertumbuhan, mikroalga memanfaatkan sumber nitrogen untuk proses pertumbuhannya. Nitrogen yang berada perairan berupa nitrogen organik dan nitrogen anorganik. Nitrogen anorganik terdiri dari amonia (NH₃), amonium (NH₄⁺), nitrit (NO₂⁻), nitrat (NO₃⁻), dan molekul nitrogen (N₂) dalam bentuk gas (Effendi, 2003). Nitrogen organik merupakan bentuk nitrogen yang terikat pada senyawa organik, terutama nitrogen bervalensi tiga yang biasanya berupa partikular yang tidak larut dalam air. Nitrogen organik biasa disebut amino atau albuminoid nitrogen. Senyawa tersebut berupa protein, polipeptida, asam amino, urea (N₂NCONH₂), dan senyawa lainnya. Nitrit (NO₂⁻) dan nitrat (NO₃⁻) merupakan bentuk dari nitrogen anorganik yang dimanfaatkan. Nitrat (NO₃⁻) adalah bentuk utama nitrogen di perairan alami karena sangat mudah larut dan bersifat stabil. Nitrat inilah yang merupakan nutrisi utama bagi pertumbuhan tanaman dan alga untuk selanjutnya dikonversi menjadi protein. Proses tersebut dapat dilihat pada persamaan reaksi berikut (Effendi, 2003):



Tumbuhan membentuk protein dari CO₂, H₂O dan senyawa nitrogen (NO₃⁻). Senyawa nitrogen selain yang sudah menjadi ion NO₃⁻ dan NO₄⁺ harus diubah terlebih dahulu menjadi ion agar mudah diserap. Namun, ion yang biasanya paling mudah diserap ialah ion NH₄⁺. Selanjutnya, NH₄⁺ akan bereaksi dengan asam glutamat dan akan menghasilkan senyawa organik utama seperti asam amino, protein, dan klorofil.

2.5 Keamanan Pangan untuk Mikroalga

Keamanan pangan merupakan kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah Aplikasi mikroalga sebagai produk pangan maupun sebagai produk

pakan harus memenuhi aspek keamanan. **Tabel 2.9** menyediakan daftar mikroalga saat ini yang digunakan dalam makanan maupun aplikasi pakan. Beberapa alga telah diberi GRAS (*Generally Recognised as Safe*) oleh FDA (*Food and Drug Administration*). *Chlorella sp* merupakan spesies yang telah mendapatkan GRAS.

Tabel 2.9. Mikroalga yang Relevan untuk Aplikasi Pangan/Pakan dan Informasi Aspek Keamanan

Organisme	Spesies	Aspek Keamanan	Organisme	Spesies	Aspek Keamanan
Cyanobacteria	<i>Spirulina</i>	GRAS	Heterokontophyta	<i>Navicula sp.</i>	NT
	<i>Synechococcus sp.</i>	NT		<i>Nitzschia dissipata</i>	NT
Chlorophyta	<i>Tetraselmis sp</i>	NT	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	NT	
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NT	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	NT	
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	NT	<i>Odontella aurita</i>	NT	
	<i>Dunaliella sp</i>	NT	<i>Skeletonema sp.</i>	NT	
	<i>Chlorococcum sp</i>	NT	<i>Monodus subterraneus</i>	NT	
	<i>Scenedesmus</i>	NT	<i>Nannochloropsis sp.</i>	NT	
	<i>Desmodesmus sp</i>	NT	Haptophyta	<i>Isochrysis sp.</i>	NT
	<i>Chlorella sp</i>	GRAS	Dinophyta	<i>Pavlova sp3</i>	NT
	<i>Parietochloris incisa</i>	NT		<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	GRAS
	Rhodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>			

Keterangan: 1) NT : No Toxic Know, 2) GRAS : *Generally Recognised as Safe* (Christien et al., 2014)

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat pelaksanaan penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2015 – Mei 2016 di Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, laboratorium Bioteknologi Industri Hasil Pertanian, Laboratorium Biokimia Pangan, dan Mikrobiologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang dibutuhkan untuk produksi biomassa *Chorella sp.* yaitu selang (PUSO – PVC EL 3/16 inch), aerator (AMARA BS-410), batu aerasi (Jirifarm (09201) Silinder Asc-09 2x3 Cm), plankton net (Polyamid Nylon PA 6.6 size 2 μ m) kompor listrik, lemari pendingin, toples kaca, lampu Philips 18 watt, kertas platik hitam PE. Sedangkan peralatan untuk analisa antara lain Spektrofotometer (genesys 20), *haemocytometer* (marienfield), pH meter (Eutech Cyberscan pH 110), DO meter (Oakton 300), *handrefractometer salinity* (GrandIndex RHS-28ATC) mikroskop (Olympus CH20), timbangan analitik (metter Toledo), sonikator bath (Elmasonic S60H), pipet volume 1 mL - 10 mL (iwaki pyrex), erlenmeyer 100 mL – 500 mL (iwaki pyrex), beaker glass 25 mL – 100 mL (iwaki pyrex), rak tabung, kuvet, bola hisap, corong kaca, falkon 15 mL, pipet tetes, mikropipet 0,1 – 1 mL (Gilson), mikrotip 0,1 mL – 1 mL.

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini menggunakan biakan murni *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) di Situbondo. Limbah *whey* tahu diperoleh dari UKM di Dusun Gedangan kecamatan Dampit. Air laut diperoleh dari toko aquarium cahaya, vitamin B 12 dan pupuk *walne*(nutrisi)diperoleh dari laboratorium Hidrobiologi FPIK UB. Bahan kimia yang digunakan untuk analisa yaitu: buffer pH 7, buffer pH 4, CuSO₄.2H₂O, Na-K tartat, alkohol 70%, ethanol p.a, akuades, TCA (*Trichloroacetic acid*), NaOH diperoleh dari toko CV. Makmur Sejati dan toko CV. Kridatama, BSA (*Bovin Serum Albumin*) yang diperoleh dari LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati).

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk melihat kurva pertumbuhan *Chlorella* sp sebagai acuan pertumbuhannya, faktor teknis dan faktor eksternal dan lingkungan terhadap pertumbuhan kultur *Chlorella* sp. serta memperkecil rentang penambahan jumlah limbah whey tahu melalui pola pertumbuhannya dan jumlah kelimpahan selnya pada penambahan limbah 20%, 60% dan 100%. Hasil pengamatan dan evaluasi pada penelitian pendahuluan selanjutnya digunakan sebagai acuan untuk melaksanakan penelitian utama.

3.3.2 Penelitian Utama

Penelitian dirancang berdasarkan Rancangan percobaan Acak Kelompok (RAK) dengan satu faktor. Faktor yang digunakan yakni penambahan limbah whey tahu. Faktor ini terdiri dari 5 level perlakuan (penambahan limbah whey tahu : 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%). Pada setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Penelitian utama bertujuan untuk melihat pengaruh penambahan limbah whey tahu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% dengan pembandingan kontrol yakni tanpa penambahan limbah. Parameter utama yang diteliti yakni kelimpahan sel serta kandungan proteinnya. Parameter tersebut dihubungkan dengan kandungan nutrisi berupa nitrat yang terkandung didalam limbah whey tahu sebagai persentase konsumsi nutrisi. Pada kontrol sebagai pembandingan digunakan sumber nutrisi yang berasal dari pupuk komersil yakni *walne*.

3.3.3 Penelitian Tambahan

Tahap penelitian tambahan bertujuan sebagai uji tambahan untuk hasil media perlakuan terbaik. Media perlakuan terbaik penambahan limbah whey tahu 50%. Penambahan ini digunakan untuk kultivasi sel *Chlorella* sp pada skala produksi 5 liter dan diuji kandungan klorofilnya.

3.3.4 Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan dan Sterilisasi Alat serta Bahan Kultur

a. Persiapan dan Sterilisasi Alat

Sterilisasi peralatan yang terbuat dari gelas seperti erlenmeyer, toples, tabung reaksi, gelas beker, dan gelas ukur, pipet volume kemudian disterilkan dengan *autoclave*. Sebelum digunakan peralatan dicuci dan disikat dengan detergen kemudian dibilas air tawar, tunggu kering, setelah itu ditutup rapat kapas, dibungkus kertas, diikat dan bungkus lagi dengan plastik. Setelah itu diatur rapi dalam *autoclave*, *autoclave* ditutup rapat dan dioperasikan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, selama 30 menit (Fadilla, 2010).

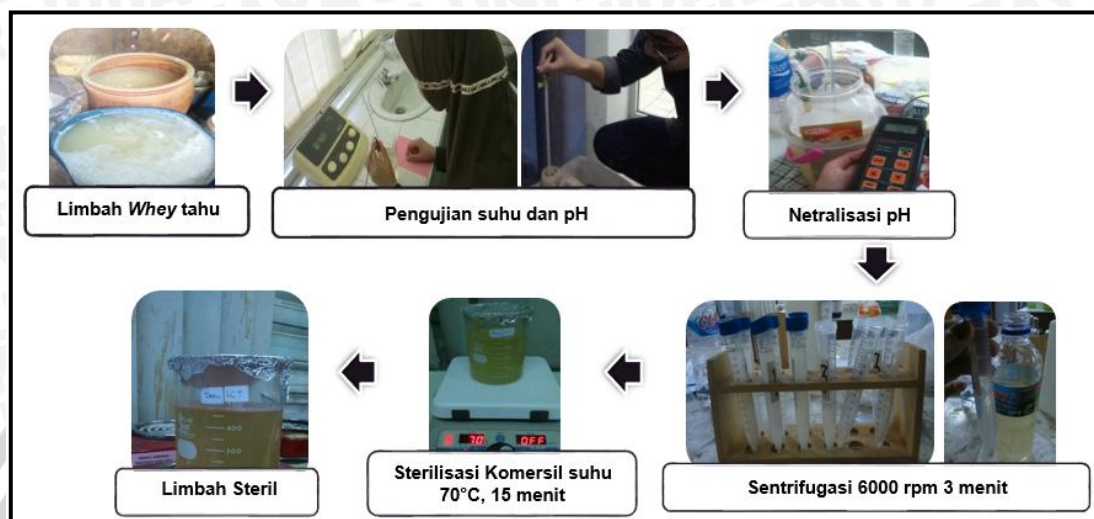
Sterilisasi peralatan selain gelas seperti selang, batu aerasi, sambungan selang, pengatur udara, tutup toples serta yang berbahan plastik dilakukan perendaman dengan perbandingan kaporit dan air tawar 1:100 selama 24 jam (BPAP, 2015). Selanjutnya dibersihkan dengan air tawar, lalu dilakukan perebusan dalam air selama 15 menit hingga mendidih (Maf'ulah, 2004). Pengeringan peralatan setelah pencucian dilakukan dengan meniriskannya diatas meja yang telah disemprotkan alkohol sebelumnya (Fadilla, 2010).

b. Persiapan dan Sterilisasi Bahan Kultur

Persiapan media kultivasi mikroalga diawali dengan persiapan pupuk *walne* untuk kultivasi mikroalga. Tempat penyimpanan bahan-bahan kimia biasanya disediakan khusus agar tidak menimbulkan kontaminasi dengan benda-benda sekitarnya. Media yang digunakan sebagai medium kultur yakni air laut dan limbah *whey* tahu. Persiapan media air laut yang digunakan dalam penelitian berasal dari penyedia komersial dengan salinitas awal sebesar 34 ppt. Sterilisasi air laut terlebih dahulu dilakukan untuk memperkecil jumlah kontaminan berupa mikroorganisme lain yang terdapat didalamnya. Proses sterilisasi air laut yakni air disaring menggunakan *plankton net* mesh size 2 mikron, selanjutnya di *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Manfaati, 2010). Air laut diukur salinitasnya menggunakan *hand refraktometer*. Salinitas air yang diinginkan yakni 34 ppt, jika salinitas air masih tinggi harus diturunkan. Penurunan ini dilakukan dengan menambahkan aquades steril sebanyak 10%, kemudian dilakukan sterilisasi lagi hingga salinitas yang diinginkan (Fadilla, 2010).

Penyiapan limbah *whey* tahu sebagai medium kultur berasal dari proses pengendapan tahu di Dusun Gedangan, kecamatan Dampit, Kabupaten Malang. Karakteristik awal limbah ketika di ambil yakni suhunya 83°C dan pH 4,5. Limbah *whey* tahu sebelumnya *dipretreatment* yakni di netralisasi menggunakan NaOH hingga pH 7 lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000

rpm selama 3 menit untuk menghilangkan kotoran atau kontaminasi fisik seperti batu kerikil, sisa endapan tahu dan lainnya. Selanjutnya limbah dipasteurisasi suhu 70°C selama ± 15 menit (Dianursantia, 2014). **Gambar 3.1** merupakan prosedur persiapan dan pasteurisasi limbah *whey* tahu.



Gambar 3.1 Proses Pretreatment dan Pasteurisasi Limbah *Whey* Tahu

2. Kondisi Operasi dalam proses Kultivasi

Berikut ini kondisi operasi menurut BPPL (2013) dan BPAP Situbondo (2014) :

- Cahaya** : Cahaya yang digunakan berasal dari sumber lampu TL (Philips) dengan intensitas cahayanya optimal untuk mikroalga *Chlorella* sp yakni 2500 lux. Penyinaran dilakukan secara terus-menerus selama 24 jam.
- Karbondioksida** : Karbondioksida disuplai dari CO_2 terlarut yang terdapat dalam limbah *whey* industri tahu, dan CO_2 yang ada di udara bebas.
- pH** : pH awal dalam media pertumbuhan *Chlorella* sp adalah sekitar 7-8
- Suhu** : Suhu yang baik untuk pertumbuhan *Chlorella* sp. adalah $25\text{-}35^{\circ}\text{C}$.
- Aerasi** : Aerasi diberikan terus menerus, mulai penebaran bibit (inokulasi) sampai kegiatan kultur selesai. Besarnya aerasi adalah 50 mL/detik.
- Salinitas** : Salinitas yang baik untuk pertumbuhan *Chlorella* sp. adalah 30-34 ppt.
- Dissolved Oxygen** : kelarutan oksigen yang baik yakni lebih dari 5-7 mg/L.

3. Persiapan dan Pembuatan Stok Kultur

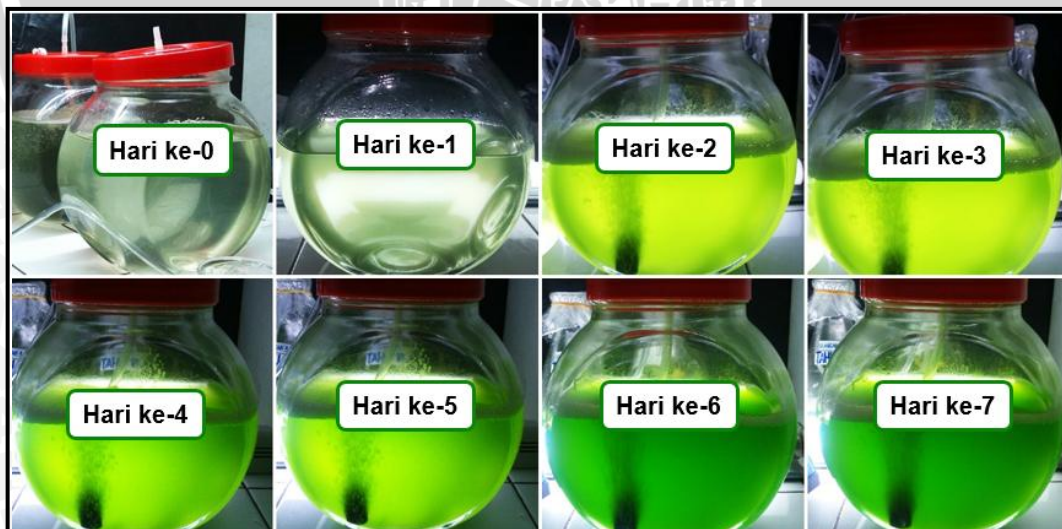
Kultur murni *Chlorella* sp. yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari BPAP Situbondo sebanyak 600mL. Sehingga perlu dilakukan perbanyakan atau

stok kultur *Chlorella sp.* Pembuatan stok kultur dilakukan pada volume media 1,5 L dalam wadah toples kaca. Mikroalga dikultivasi pada media air laut serta sumber nutrisinya berasal dari pupuk *walne* dan vitamin B12.



Gambar 3.2 Susunan Peralatan Pembuatan Stok Kultur *Chlorella sp* pada Volume 1,5L
Keterangan : (a). Plastik Penutup; (b) Selang Aerasi; (c) Lampu TL 18 watt; (d) Aerator

Kondisi pertumbuhan dibuat seoptimum mungkin seperti pada penjelasan no.2. Sumber cahaya berasal dari 1 lampu TL 18 Watt, tanpa adanya AC sehingga suhunya mengikuti suhu ruang 25-30°C (BPAP, 2014). Aerasi disalurkan dari aerator melalui selang menuju toples yang tersusun pada rak kultur setelah melewati pengatur debit udara dan selang aerasi. Susunan peralatan stok kultur dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.3 Kultivasi Media Stok Kultur Hari ke 0-hari ke 7

Pembuatan stok kultur mikroalga dengan perbandingan antara kultur, air laut yakni 1:10 (BPAP, 2014). Sedangkan untuk pupuk *walne* dan

vitamin perbandingannya yakni sebanyak 1 mL dalam 1 L air laut steril. Selanjutnya dikultivasi selama 8 hari. Selama kultivasi pertumbuhan ditandai dengan adanya perubahan warna dari bening menjadi kehijauan (**Gambar 3.3**). Pada akhir kultivasi jumlah sel berkisar antara 10^4 - 10^5 sel/mL. Media dipanen dengan cara memasukkan ke dalam botol-botol steril dan dimasukkan ke dalam refrigerator dengan suhu berkisar 12-17°C untuk memperlambat proses pertumbuhannya atau dengan kata lain sel mengalami dormansi (Widianingsih dkk, 2011).

4. Pembuatan Media Kultivasi

a. Media Kultivasi Penelitian Pendahuluan

Media kultivasi pada penelitian pendahuluan berupa variasi limbah *whey* tahu yakni 20%, 60%, 100% dan kontrol. Berikut ini komposisi media pertumbuhan yang digunakan untuk kultivasi dalam erlenmeyer 500 mL dengan volume 300 mL :

Medium 1 (20%) : 60 mL Limbah *Whey* Tahu + 240 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium 2 (60%) : 180 mL Limbah *Whey* Tahu + 120 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium 3 (100%) : 300 mL Limbah *Whey* Tahu + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium Kontrol : 300 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 Pupuk *walne* + 0,3 mL Vitamin

b. Media Kultivasi Penelitian Utama

Media kultivasi pada penelitian utama berupa variasi limbah *whey* tahu yakni 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan kontrol. Penambahan variasi tersebut didasarkan pada penelitian pendahuluan. Berikut ini komposisi media pertumbuhan yang digunakan untuk kultivasi dalam erlenmeyer 500 mL dengan volume 300 mL :

Medium 1 (10%) : 30 mL Limbah *Whey* Tahu + 270 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium 2 (20%) : 60 mL Limbah *Whey* Tahu + 240 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium 3 (30%) : 90 mL Limbah *Whey* Tahu + 210 mL Air laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium 4 (40%) :120 mL Limbah *Whey* Tahu + 180 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

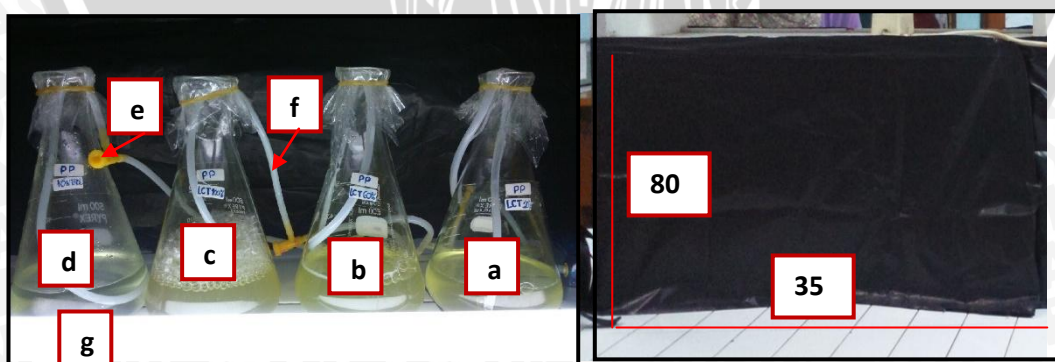
Medium 5 (50%) :150 mL Limbah *Whey* Tahu + 150 mL Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 mL Vitamin

Medium Kontrol:300 Air Laut + 30 mL Bibit + 0,3 Pupuk *walne* + 0,3 mL Vitamin

5. Perancangan Susunan Peralatan

Susunan peralatan kultur penelitian dilakukan dalam ruangan tertutup. Lokasinya berada di Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan, Universitas Brawijaya. Berdasarkan **Gambar 3.4** merupakan susunan peralatan diruangan kultur secara tertutup. Ruang kultur berbentuk persegi panjang berukuran 80x35x35cm. Ruang tersebut didesain mengikuti paramater lingkungan pertumbuhan mikroalga *Chlrorella* sp yakni sumber cahaya berasal dari 1 lampu TL 18 Watt, tanpa adanya AC sehingga suhunya mengikuti suhu ruang 25-30°C(BPAP, 2014). Serta untuk mengintensitaskan cahaya ruang kultur diberi penutup plastik hitam. Selama kultivasi media akan diberi aerasi yang disalurkan dari aerator melalui selang steril menuju gelas-gelas kultur (media kultur) yang tersusun pada rak setelah melewati pengatur debit udara dan selang aerasi kemudian ditutup rapat dengan plastik steril (**Gambar 3.4**). Perancangan susunan peralatan untuk penelitian pendahuluan hampir sama dengan penelitian utama hanya pada penelitian utama jumlah media yakni sebanyak 6 buah beserta kontrol. Susunan peralatan pada tiap tahap penelitian sebagai berikut :

a. Penelitian Pendahuluan

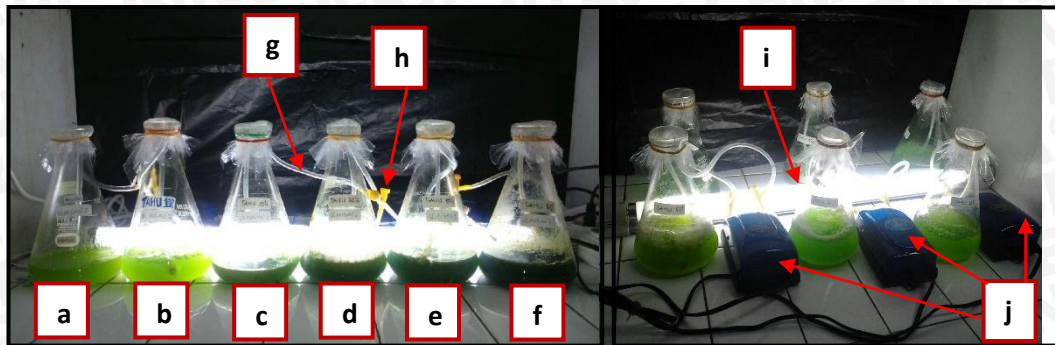


Gambar 3.4. Rancangan Susunan Peralatan Penelitian Pendahuluan

Keterangan : (a)Medium limbah *Whey* Tahu 20%; (b) Medium limbah *Whey* Tahu 60%; (c) Medium limbah *Whey* Tahu 100%; (d) Medium Kontrol; (e) Pengatur udara; (f) Selang Aerasi; (g) Lampu TL 18 watt



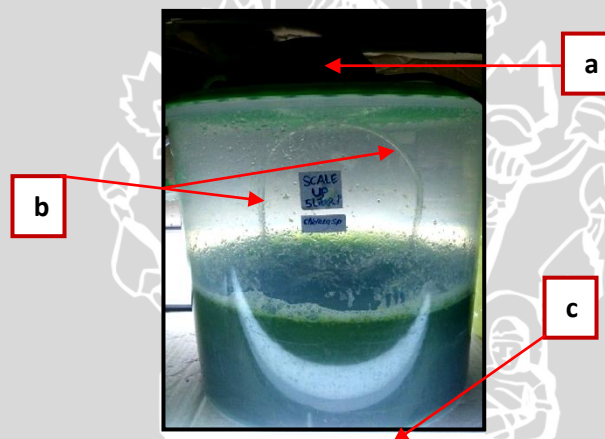
b. Penelitian Utama



Gambar 3.5. Rancangan Susunan Peralatan Penelitian Utama

Keterangan : a) Medium Kontrol; (b) Medium limbah *Whey* Tahu 10%; (c) Medium limbah *Whey* Tahu 20%; (d) Medium limbah *Whey* Tahu 30%; (e) Medium limbah *Whey* Tahu 40%; (f) Medium limbah *Whey* Tahu 50%; (g) Selang Aerasi; (h) Pengatur udara; (i) Lampu TL 18 watt; (j) Aerator;

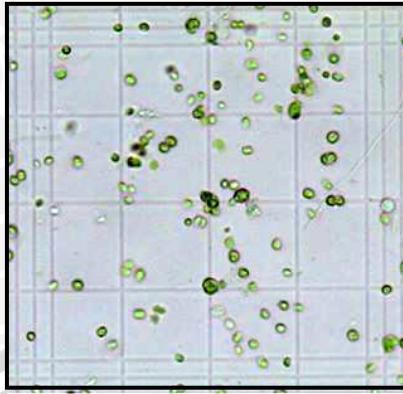
c. Penelitian Tambahan



Gambar 3.6. Rancangan Susunan Peralatan Penelitian Tambahan
Keterangan : (a). Aerator; (b) Selang Aerasi; (c) Lampu TL 18 watt

6. Pengkultivasi Sel *Chlorella* sp. pada Media Perlakuan

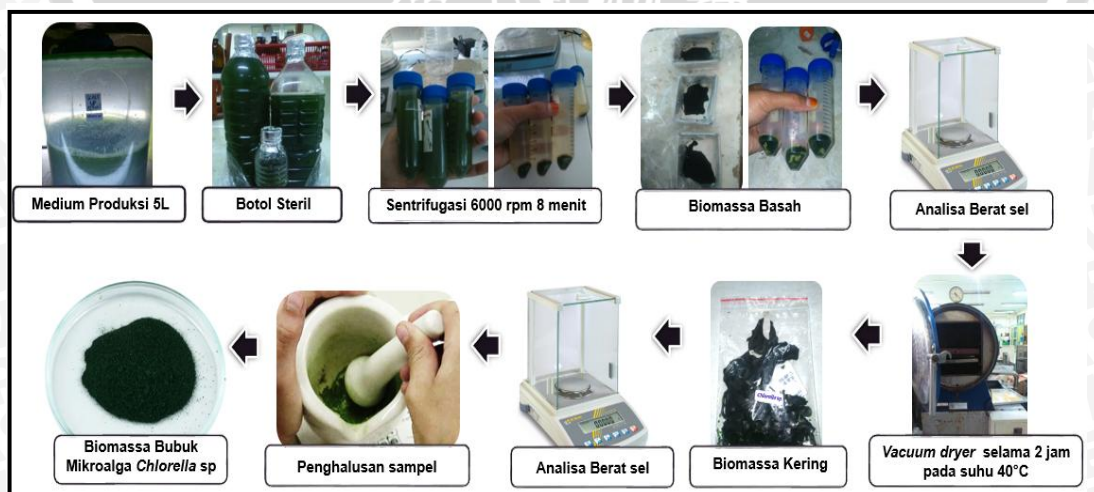
Penginkulasi sel *Chlorella* pada limbah *whey* tahu diambil dari sub kultur yang sudah dilakukan. Isolat *Chlorella* sebanyak 10% dari Stok kultur kemudian dimasukkan ke dalam limbah *whey* tahu, dimana kelimpahan sel/mLnya 10^6 . Perhitungan sel *Chlorella* menggunakan *Haemocytometer* (Sutomo, 2005). Sel *Chlorella* sp. yang dihitung adalah seluruh sel yang hidup, yakni berbentuk bulat telur, berwarna hijau, dan tidak pecah (Shen *et al.*, 2009). Perhitungan sel dapat dilihat pada **Gambar 3.7** dibawah :



Gambar 3.7.Perhitungan Sel *Chlorellasp* menggunakan *Haemocytometer*
Keterangan : Perbesaran Mikroskop 100x

7. Produksi Biomassa Kering *Chlorellasp*.(Modifikasi Yusandi, 2010; Tokusoglu, 2006; Rahman, 2008)

Tahap penelitian tambahan bertujuan sebagai uji tambahan untuk hasil perlakuan terbaik. Media perlakuan terbaik yang diperoleh dari hasil penelitian yakni pada penambahan limbah *whey* tahu 50%. Penambahan ini digunakan untuk kultivasi sel *Chlorellasp* pada skala 5 liter. Mikroalga dikultivasi sesuai dengan kondisi optimumnya. Kultur mikroalga yang telah mencapai fase stasioner pada hari ke 10 dipanen dengan teknik sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 8 menit. Biomassa basah yang diperoleh ditimbang dan dikeringkan menggunakan *vacuum dryer*. Biomassa yang telah kering ditimbang, dihaluskan menggunakan mortar lalu disimpan didalam desikator. Sehingga diperoleh serbuk mikroalga *Chlorella sp.* yang akan dianalisa kandungan senyawa bioaktif berupa klorofil. **Gambar 3.8** merupakan prosedur produksi biomassa kering *Chlorellasp*.



Gambar 3.8. Prosedur Produksi Biomassa Kering *Chlorella* sp

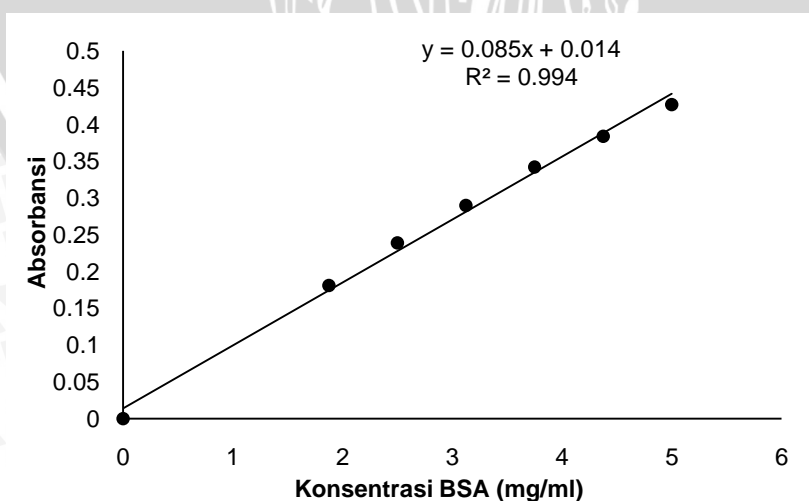
3.4 Pengamatan dan Pengujian

Pengamatan yang dilakukan meliputi parameter pertumbuhan yakni suhu DO, pH, salinitas (Danang, 2009). Proses pengamatan kelimpahan sel dilakukan dengan metode pengujian yakni kelimpahan sel yang akan diamati dengan mikroskop dan *haemocytometer* (Fadilla, 2010), suhu dan oksigen terlarut menggunakan DO meter, salinitas menggunakan *Handrefractometer*, pH menggunakan pH meter (Danang, 2009). Pengamatan dan pengujian parameter pertumbuhan ini berlangsung selama proses kultivasi setiap harinya. Kemudian juga dilakukan pengukuran parameter pertumbuhan lainnya berupa kandungan nitrat yang terkandung dalam media berdasarkan metode spektrofotometri. Pengujian nitrat dilakukan di akhir pada tiap-tiap media perlakuan dan media kontrol. Selanjutnya yang paling utama adalah penggunaan metode Biuret untuk mengukur kandungan protein yang terkandung dalam sel (Harun, 2009). Berikut adalah kurva standar protein BSA (Bovin Serum Albumin) yang digunakan :

Tabel 3.1 Data pengukuran kadar BSA standar Metode Biuret

Kadar standar BSA (mg/ml)	Absorbansi
0	0
1,875	0,181
2,5	0,239
3,125	0,290
3,75	0,342
4,375	0,384
5	0,427

Kurva Standar BSA (Bovin Serum Albumin)



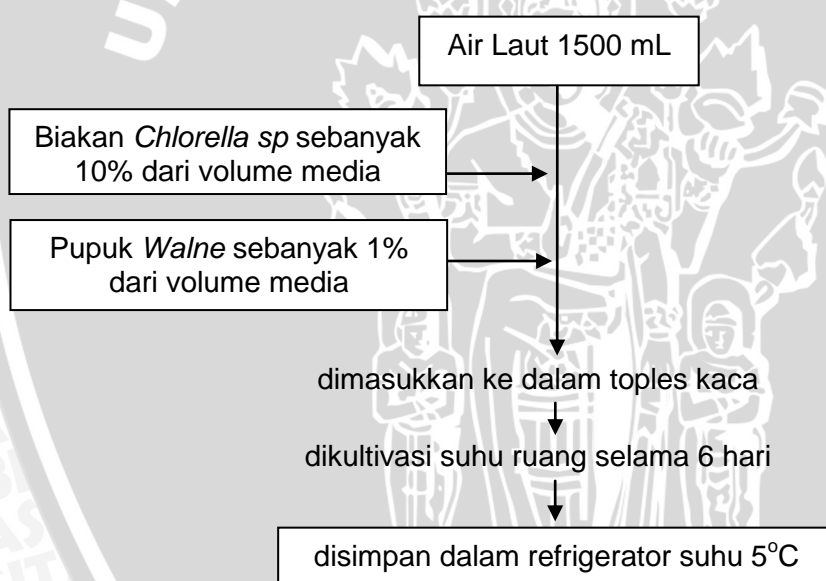
Gambar 3.9 Kurva Standar Protein BSA (Bovin Serum Albumin)

3.5 Analisis Data Penelitian

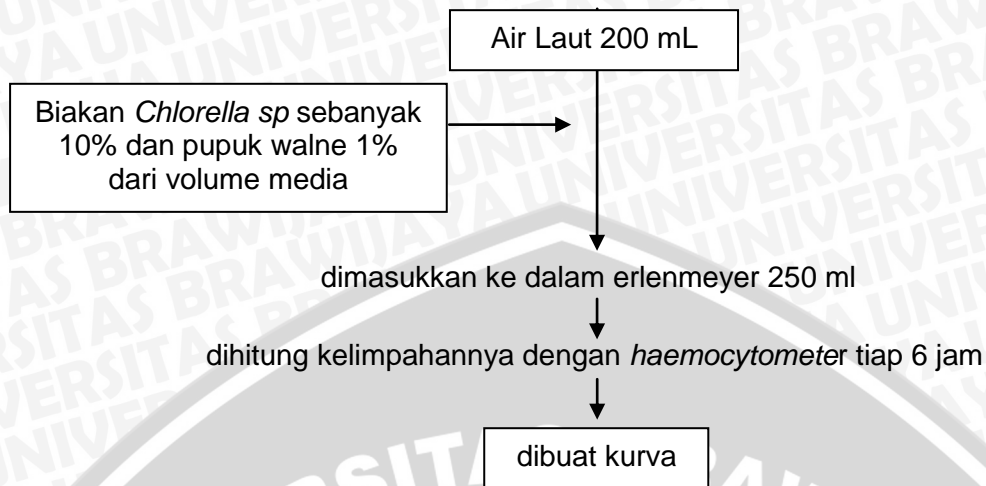
Analisis data dilakukan berdasarkan studi literatur terutama dari penelitian terdahulu. Data kelimpahan sel, protein *Chlorella sp* serta parameter konsumsi nitrat yang diperoleh dianalisis menggunakan Analysis of Variance (ANOVA). Jika hasil berbeda nyata maka dilanjutkan dengan menggunakan uji TUKEY pada taraf kepercayaan 95% (Converti *et al.*, 2009). Selanjutnya untuk melihat hubungan antar variabel dan keeratan hubungannya menggunakan kurva regresi untuk melihat pengaruh parameter pertumbuhan *Chlorella sp* berupa suhu, pH, salinitas, DO (*Dissolved Oxygen*), % konsumsi nitrat terhadap pertumbuhan sel di tiap penambahan limbah *whey* tahu.

3.7 Diagram Alir Proses Penelitian

3.7.1 Pembuatan Stok Kultur *Chlorella sp*

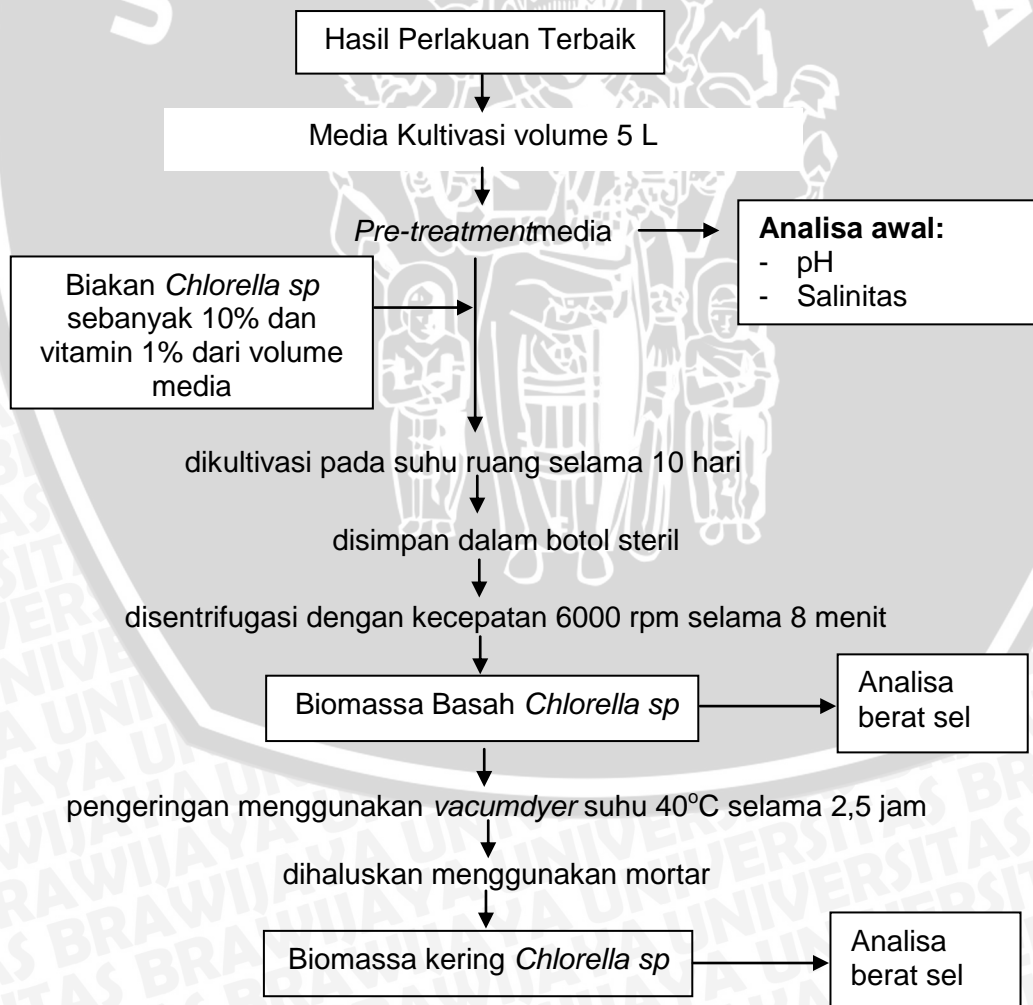
**Gambar 3.10** Diagram Alir Pembuatan Stok Kultur *Chlorella sp* (Modifikasi Sari dan Manan, 2012)

3.7.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp*



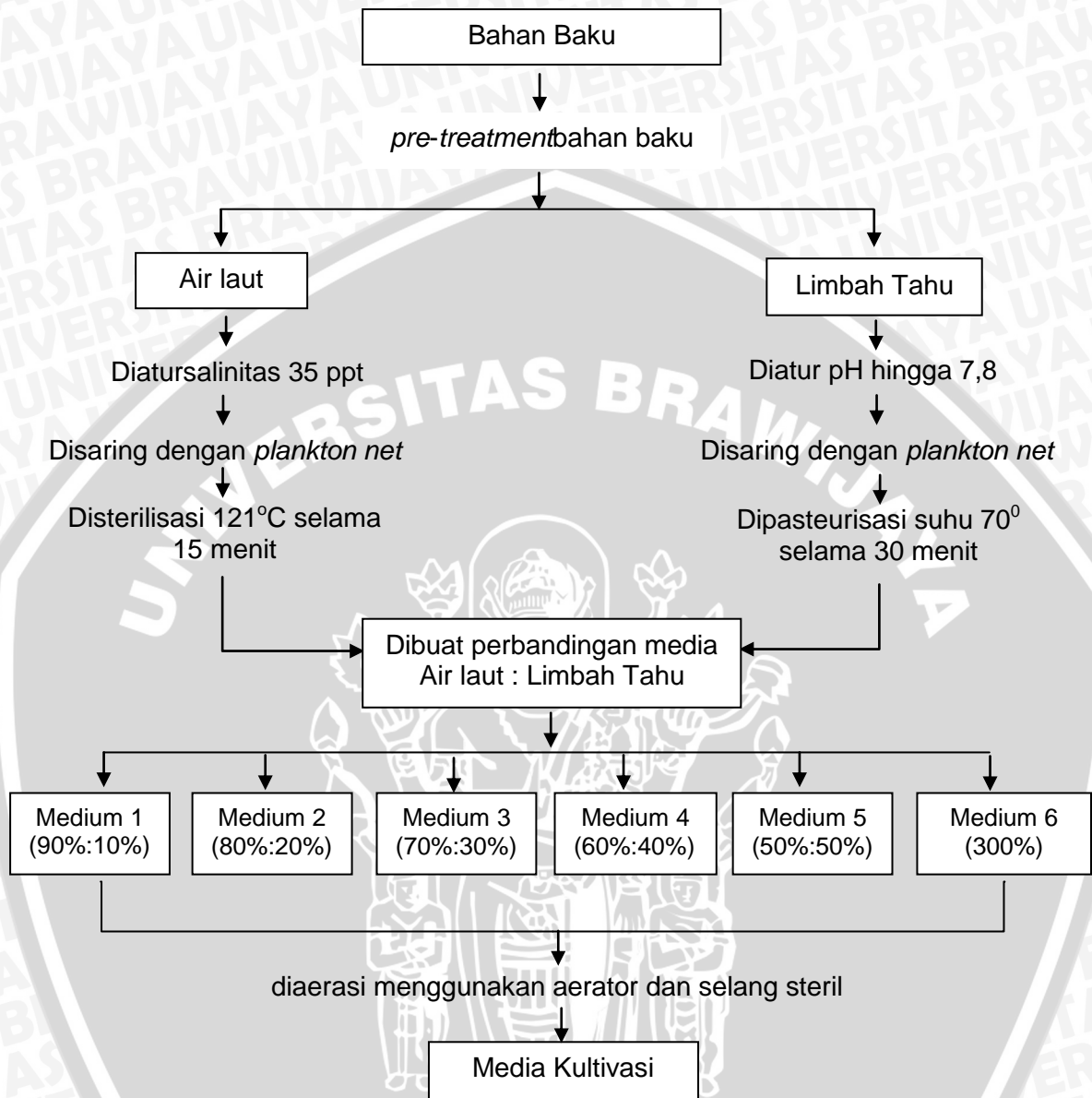
Gambar 3.11 Diagram Alir Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp* (Modifikasi Sari dan Manan, 2012)

3.7.3 Produksi Biomassa Kering *Chlorella sp*



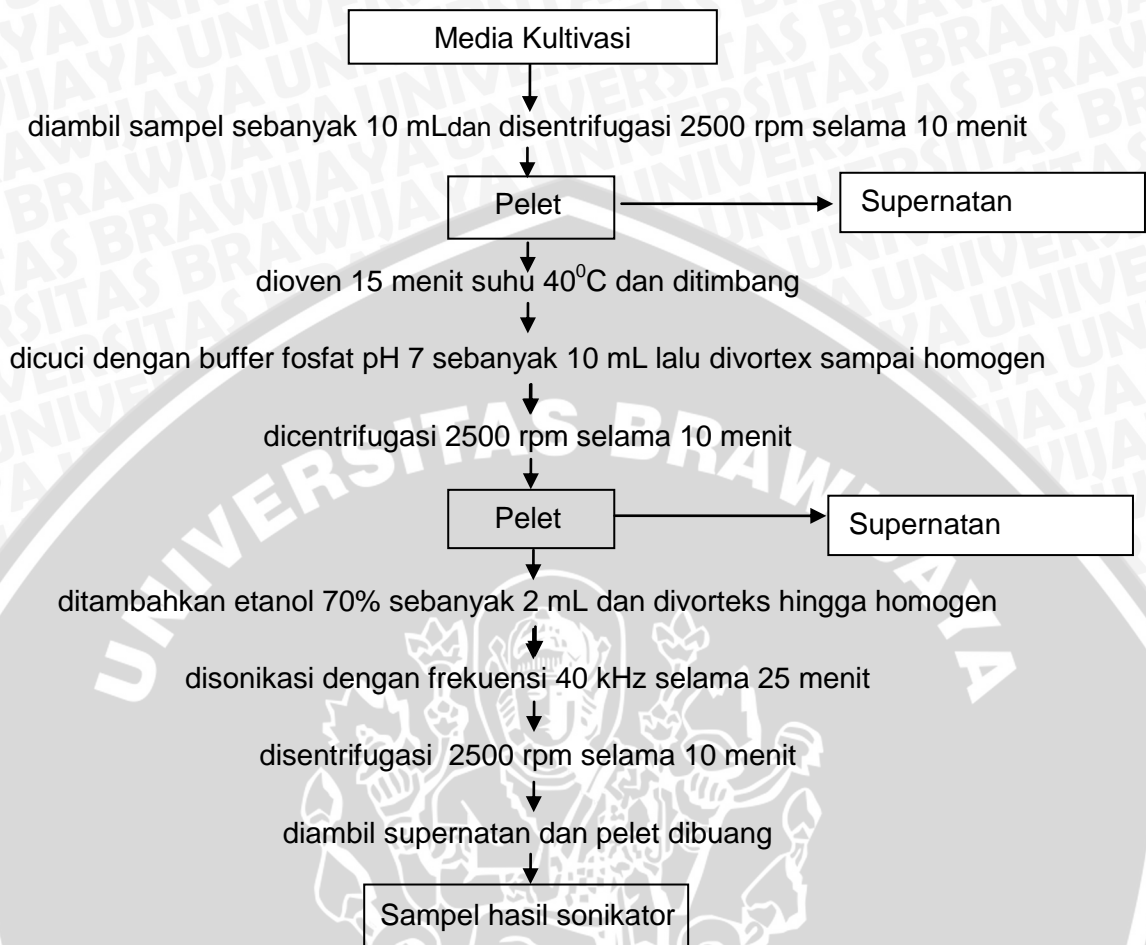
Gambar 3.12 Diagram Alir Produksi Biomassa *Chlorella sp* (Modifikasi Yusandi, 2010; Tokusoglu, 2006; Rahman, 2008)

3.7.4 Pembuatan Media Kultivasi



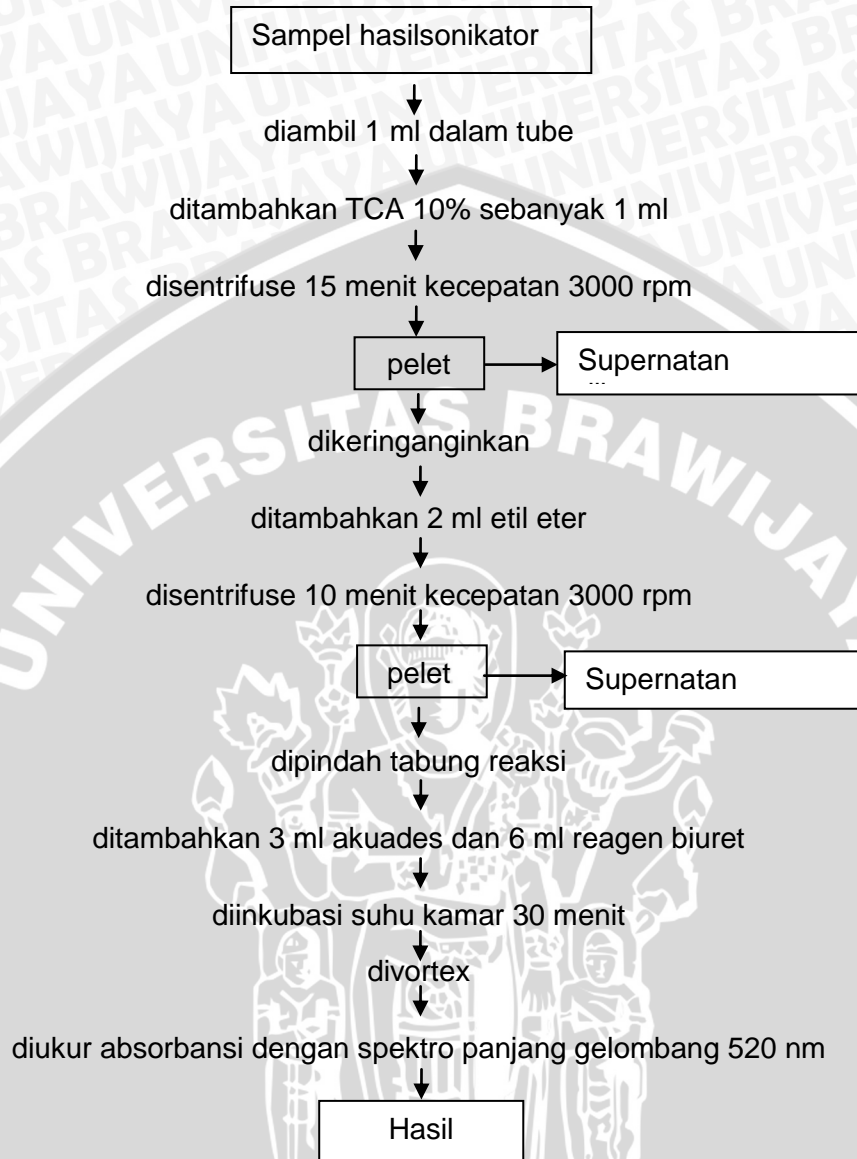
Gambar 3.13 Diagram Alir Pembuatan Media Kultivasi (Modifikasi Sari dan Manan, 2012; Arifin, 2012; Darsono, 2007; Fadilla, 2010)

3.7.4 Proses Ekstraksi Menggunakan Sonikator



Gambar 3.14 Diagram Alir Proses Ekstraksi Menggunakan Sonikator (Koelman, 2005; Sani dkk, 2014; King, 2014)

3.7.6 Proses Pengukuran Protein *Chlorella* sp



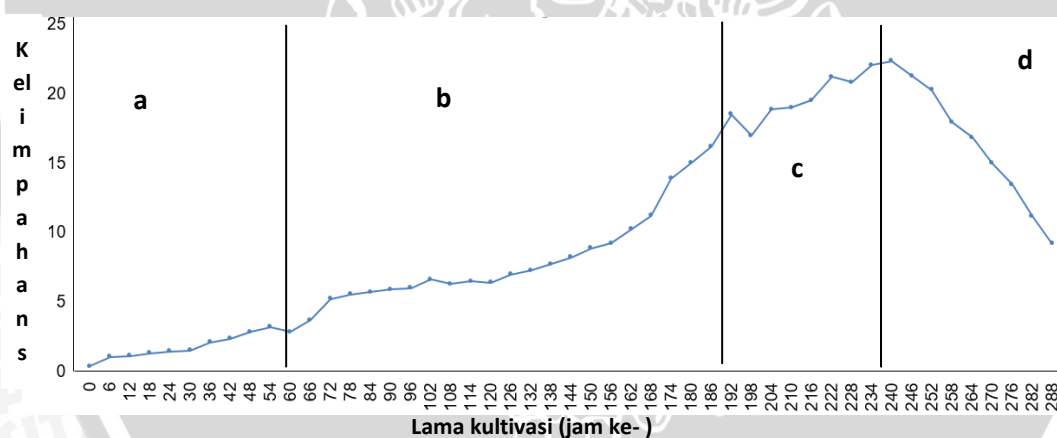
Gambar 3.15 Diagram alir Pengukuran Protein *Chlorella* sp. (Modifikasi Purba, 2007)

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan

4.1.1 Pertumbuhan *Chlorellasp*

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan diperoleh data kelimpahan sel selama 288 jam (12 hari) yang dikultur dalam medium kontrol (pupuk *walne*) (Lampiran 6) selanjutnya data kelimpahan sel dibuat grafik pertumbuhan pertumbuhan. Berdasarkan **Gambar 4.1** pola pertumbuhan pada jam ke 0 hingga jam ke60 kultur berada dalam fase adaptasi hal ini dilihat dari jumlah sel yang masih rendah. Fase adaptasi yang terjadi disebabkan oleh penyesuaian lingkungan yang baru sebelum memulai pembiakan (pembelahan sel) sehingga di tandai dengan jumlah peningkatan sel yang rendah perjamnya. Penyesuaian dalam hal ini berarti suatu masa ketika sel-sel kekurangan metabolit dan enzim akibat keadaan yang tidak menguntungkan dalam pembiakan sebelumnya (Pelczar dan Chan, 2008).



Gambar 4.1. Pertumbuhan Mikroalga *Chlorellasp* dalam Medium Pupuk *Walne*
Keterangan : (a) Fase adaptasi; (b) Fase Logaritmit; (c) Fase Stasioner; (d) Fase *Death*

Fase adaptasi berjalan dengan baik pada jam ke 66 hingga jam ke192, dimana sel *Chlorellasp* dapat memanfaatkan nutrisi lebih optimal dalam media kultur yang ditandai dengan selisih peningkatan kelimpahan sel yang semakin tinggi hingga $14,85 \times 10^6$ sel/mL. Peningkatan sel dikarenakan pada fase tersebut pertumbuhan berada di fase logaritmik. Selanjutnya sel akan mengalami fase stasioner yang terjadi yakni pada jam ke 192 hingga jam ke240 dengan selisih peningkatan jumlah sel yakni $5,38 \times 10^6$ sel/mL. Pada pergantian fase ini

pertumbuhan sel mulai lambat karena kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel yang baru melalui pembelahan. Bila hal ini terjadi maka jumlah sel akan bertambah secara lambat meskipun jumlah sel hidup tetap (Amini, 2010). Fase yang terakhir yakni fase *death* yang terjadi pada jam ke 246 hingga jam ke 288, pada fase ini selisih jumlah kelimpahan sel bernilai negatif yakni -7,69 artinya terjadi penurunan jumlah sel. Jumlah sel yang mati per satuan waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan (Arifin, 2012).



Gambar 4.2 Perubahan Warna Kultur pada Medium selama Kultivasi Berlangsung

Proses kultivasi yang berlangsung ditandai dengan terjadinya perubahan fisik medium kultivasi, dimana pada jam ke 0 hingga jam ke 282 medium kultur terjadi perubahan warna dari bening, hijau pudar hingga kehijauan (**Gambar 4.2**). Menurut Agustini dan Kabinawa (1993), kadar klorofil meningkat sejalan dengan waktu kultur. Hal ini diduga karena terjadi proses perbanyakan sel selama kultivasi ditandai dengan kenaikan biomassa perharinya hingga mencapai fase stasioner (**Gambar 4.1**). Pernyataan ini di perkuat oleh Effendi (2003) menyatakan bahwa mikroalga hijau *Chlorella* yang termasuk organisme renik air, memiliki karakteristik seperti tumbuhan tingkat tinggi pada umumnya yakni menggunakan proses fotosintesis untuk menghasilkan makanan dengan memanfaatkan cahaya. Proses fotosintesis ini diperlukan suatu senyawa berupa klorofil atau zat berwarna hijau yang akan berperan dalam menangkap sumber cahaya. Warna hijau pada kultur menandakan bahwa pigmen fotosintesis (klorofil) ini yang dominan dalam sel mikroalga tersebut (Sze, 1993).

4.1.2 Kandungan Nitrat Bahan Baku dan Kontrol

kandungan nitrat didalam limbah *whey* tahu sebesar 9,21 ppm dan kontrol berupa pupuk komersil (walne) sebesar 0,91 ppm(Lampiran 4 no. 4). Nitrogen merupakan sumber penting untuk penyusunan asam amino, amida, nukleotida, dan nukleo protein, serta essensial untuk pembelahan sel sehingga nitrogen juga penting untuk pertumbuhan (Gardneretal.,1991). Asam glutamat berfungsi sebagai bahan dasar dalam biosintesis asam amino yaitu sebagai penyusun utama dari makromolekul protein. Asam glutamat juga dapat menjadi prekursor cincin porfirin untuk pembentukan klorofil (Suharja dan Sutarno,2009).

4.1.3 Penentuan Penambahan Limbah *Whey* Tahu sebagai Media Kultivasi

Pertumbuhan *Chlorellasp* pada medium perlakuan memiliki beberapa faktor pendukung pertumbuhannya yakni suhu, pH, salinitas, danDO (*Dissolved Oxygen*). Faktor pertumbuhan *Chlorellasp* diamati tiap hari yang yang kemudian di tercatat seperti pada **Tabel 4.1** berikut :

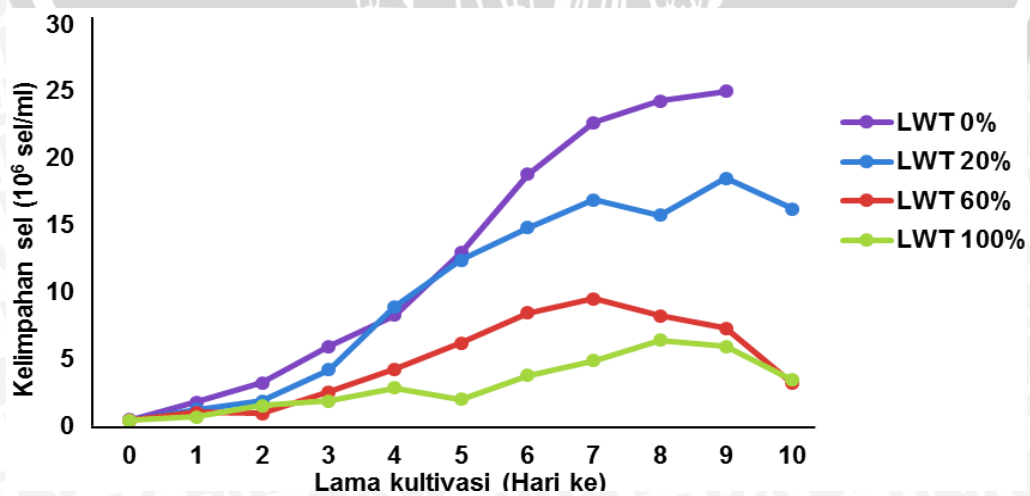
Tabel 4.1 Nilai pH, Suhu, Salinitas dan *Dissolve Oxygen* pada Media Perlakuan

Penambahan Limbah <i>Whey</i> Tahu	Parameter			
	pH	Suhu (°C)	Salinitas (ppt)	Dissolve Oxygen (mg/L)
Penelitian				
0% (Kontrol)	8,2 – 8,99	25,2 – 27,6	34 – 39	6,46 – 6,91
20%	7,46 – 9,46	26,1 – 27,6	34 – 39	6,26 – 6,91
60%	8,48 – 8,96	25,2 – 27,4	34 – 40	6,37 – 6,96
100%	8,43 – 9,95	25,3 – 27,6	34 – 39	6,09 – 6,88
Kisaran Opimal	7 – 9	25 – 28	30 – 35	> 3
	(Effendi, 2003)	(Budiman, 2007)	(Effendi, 2003)	(Effendi, 2003)

Berdasarkan **Tabel 4.2** dapat dilihat bahwa kisaran nilai keasaman (pH) media kultur *Chlorellasp.* pada penelitian pendahuluan berkisar antara 7-9. Menurut Hladka (1971) pH pertumbuhan yang optimum bagi *Chlorellasp* berkisar antara 6,5-9,3 sementara Neilsan (1995) menyatakan bahwa rentang perubahan pH medium kultur antara 5,5-8,5 termasuk pada rentang pH perairan dengan produktivitas optimum. Parameter selanjutnya yakni suhu. Suhu media kultur pada tiap penambahan limbah yakni 25,2–27,6. Nilai tersebut masih dalam kisaran nilai pH optimalnya. Menurut Budiman (2007) kisaran suhu yang tepat untuk pertumbuhan sel *Chlorellasp* yakni 25-28°C. Hal ini juga diperkuat oleh Hladka (1971) menyatakan rentang suhu optimal pertumbuhan *Chlorellasp.* adalah 23-28°C. Parameter berikutnya yakni salinitas atau kadar garam yang

terlarut didalam media pertumbuhan. Berdasarkan hasil pengamatan pada tiap media kultur nilai salinitas yang terukur cukup tinggi berkisar antara 34 – 40 ppt. Effendi (2003) menyatakan bahwa salinitas yang optimal untuk pertumbuhan *Chlorellasp.* berkisar antara 30 – 35 ppt. Namun, pada data pengamatan terdapat perbedaan nilai dengan rentang optimalnya selama kultivasi yakni dari salinitas 34-40 ppt di akhir kultivasi. Menurut Hirata (1981) rentang toleransi untuk mikroalga *Chlorellasp* yaitu 15-50 ppt. Parameter yang terakhir adalah *dissolved oxygen (DO)* atau oksigen terlarut yang terkandung pada tiap media perlakuan dan kontrol. Nilai DO media tiap penambahan limbah berbeda-beda tiap harinya, namun masih dalam kisaran 6,09 - 6,69 mg/L. Menurut Effendi, 2003 kisaran optimum kebutuhan oksigen yang terukur untuk pertumbuhan mikroalga yakni >3 ppm. Sehingga Kisaran nilai DO pada penelitian ini memiliki kondisi yang baik untuk perkembangbiakan dan pertumbuhan mikroalga *Chlorellasp.* Berdasarkan hasil pengukuran parameter tersebut maka faktor perubahan temperatur, salinitas, DO dan pH pada kultur masih berada dalam kondisi yang memungkinkan *Chlorellasp* dapat tumbuh dengan baik dan bukan menjadi faktor pembatas utama pertumbuhan kultur.

Faktor utama yang diduga memberikan pengaruh paling besar terhadap pola pertumbuhan *Chlorellasp* pada penelitian pendahuluan adalah penambahan limbah yang digunakan. Pengaruh penambahan limbah *whey* tahu yang berbeda pada masing-masing kultur mempengaruhi jumlah kelimpahan sel yang dihasilkan. Bentuk grafik pola pertumbuhan *Chlorellasp* pada medium penambahan limbah *whey* tahu 20%, 60%, dan 100% di tunjukkan pada **Gambar 4.3.**



Gambar 4.3. Grafik Pertumbuhan Mikroalga *Chlorellasp* Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 20%, 60%, 100% dan kontrol (0%)
Keterangan : LWT (Limbah *Whey* Tahu)

Berdasarkan pola pertumbuhan pada **Gambar 4.3** bahwa pada perlakuan pendahuluan penambahan limbah *whey* tahu sebagai media pada jumlah yang tinggi (100%) memiliki pertumbuhan sel yang kurang maksimal terlihat dari rendahnya jumlah sel yang terhitung yakni $6,41 \times 10^6$ sel/mL. Sedangkan kelimpahan sel tertinggi terdapat pada penambahan limbah 20% yakni mencapai $18,5 \times 10^6$ sel/mL. Pada penambahan limbah *whey* tahu 60% terlihat bahwa jumlah sel tertingginya jauh lebih rendah dibanding penambahan limbah *whey* tahu 20% dan lebih tinggi dibanding penambahan limbah 100% yakni $9,5 \times 10^6$ sel/mL. Data Kelimpahan sel kultur *Chlorellasp.* pada tiap penambahan dapat dilihat pada (Lampiran 7). Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian pendahuluan untuk menentukan penambahan yang sesuai untuk dijadikan rentang penambahan pada penelitian utama yakni penambahan limbah *whey* tahu 20% dengan mengambil batas atas penambahan limbah 10% dan batas bawah sebesar 50% dan diperoleh 5 level perlakuan penambahan limbah sebesar 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% yang akan diteliti pada penelitian utama. Perlakuan tersebut dilakukan untuk melihat pengaruh pertumbuhan sel *Chlorellasp* dalam menghasilkan kandungan protein yang tinggi.

4.2 Penelitian Utama

4.2.1 Kandungan Nitrat pada Medium Kultivasi

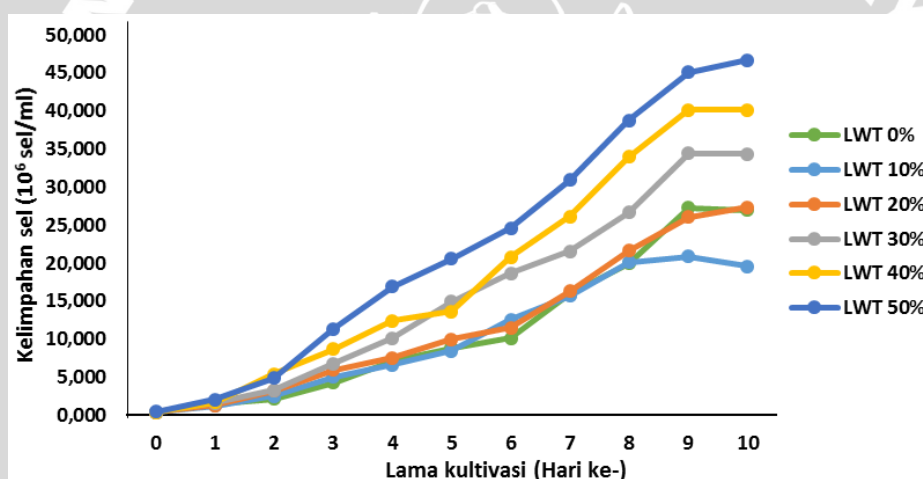
Variasi medium kultivasi yang digunakan yakni berupa penambahan limbah *whey* tahu dan medium kontrol dengan penambahan pupuk komersil *walne* sebagai sumber nutrisinya. Parameter kandungan nutrisi yang digunakan yakni sumber nitrogen berupa senyawa nitrat. Berdasarkan **Tabel 4.2** merupakan hasil uji nitrat pada media perlakuan dan medium kontrol (Pupuk komersil *walne*) diperoleh data kandungan nitrat sebagai berikut :

Tabel 4.2 Kandungan Nitrat pada Medium Kultivasi

Penambahan Limbah <i>Whey</i> Tahu	Nitrat (ppm)
(Kontrol)	1,9
10%	0,921
20%	1,842
30%	2,768
40%	3,684
50%	4,605

4.2.2 Pertumbuhan *Chlorella* pada Media Limbah *Whey* Tahu

Pengaruh penambahan variasi limbah *whey* tahu yang berbeda yakni 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% serta kontrol pada masing-masing medium kultur mempengaruhi jumlah kelimpahan sel yang dihasilkan sehingga membentuk pola pertumbuhan yang berbeda pula. Bentuk grafik pola pertumbuhan *Chlorella* pada medium penambahan limbah *whey* tahu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% di tunjukkan pada **Gambar 4.4**. Pola pertumbuhan didasarkan pada jumlah sel selama proses kultivasi yang dikelompokkan menjadi 5 fase yaitu fase adaptasi (lag phase), fase eksponensial (log phase), fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian (Pelczar dan Chan, 2008).



Gambar 4.4. Grafik Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella* pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%
Keterangan : LWT (Limbah *Whey* Tahu)

Fase awal ditandai dengan fase adaptasi atau penyesuaian sel dengan kondisi lingkungannya. Pada penambahan limbah *whey* tahu 10%, 20%, 30%, 40%, 50% adaptasi sel berlangsung cepat mulai dari hari ke 0 atau setelah pemberian kultur ke dalam tiap medium. Hal ini terlihat dari bentuk grafik pertumbuhan (**Gambar 4.4**) yang terus naik tiap harinya pada hari ke 0 hingga hari ke 2 di setiap medium, namun berdasarkan rerata pertumbuhan sel pada **Tabel 4.3** tingkat kenaikan jumlah selnya masih rendah. Menurut Black (2002) yang mempengaruhi lamanya fase adaptasi yakni jumlah inokulum awal dan media pertumbuhannya. Diduga bahwa jumlah sel awal inokulum yang semakin tinggi akan mempercepat

fase adaptasi. Pada penelitian ini jumlah sel awal yang ditambahkan yakni kisaran $3 - 5 \times 10^5$ sel/mL. Berdasarkan kurva pertumbuhan sebelumnya (**Gambar 4.1**) dimana pada kisaran tersebut sel sudah berada dalam fase logaritmit sehingga tidak memerlukan waktu lama dalam beradaptasi. Selain itu pengaruh faktor lingkungan sebelumnya dengan kondisi lingkungan yang baru tidak jauh berbeda sebelumnya yakni salinitas media 35 ppt, suhunya $23-25^{\circ}\text{C}$, pH 7-8, DO (*Dissolved Oxygen*) 5-7 mg/L dan intensitas cahaya 2500 lux sehingga sel tidak memerlukan waktu adaptasi yang lama.

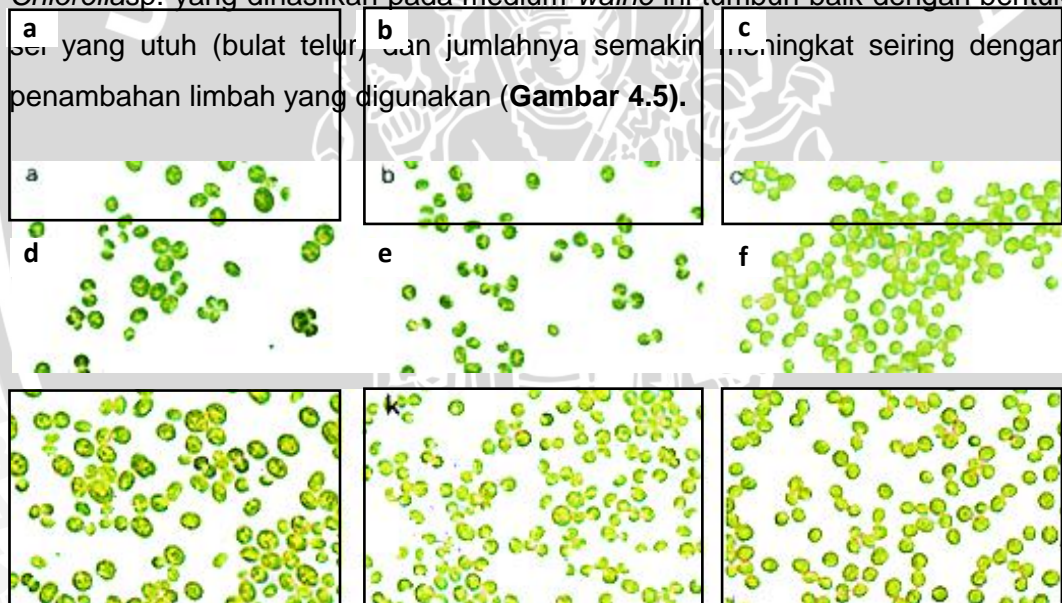
Tabel 4.3. Rerata Jumlah Kelimpahan sel Mikroalga *Chlorellasp* pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50%

Lama kultivasi (Hari ke)	Rerata Jumlah Kelimpahan Sel					
	LWT 0%	LWT 10%	LWT 20%	LWT 30%	LWT 40%	LWT 50%
0	0,40±0,11	0,41±0,09	0,38±0,13	0,37±0,09	0,43±0,05	0,503±0,02
1	1,48±0,44	1,24±0,17	1,31±0,46	1,66±0,30	1,70±0,90	2,083±0,77
2	2,16±0,12	2,54±0,13	3,25±1,91	3,28±1,69	5,43±2,99	4,890±1,81
3	4,30±1,24	5,07±1,02	5,99±1,38	6,77±1,62	8,70±2,42	11,350±2,04
4	7,21±0,90	6,66±1,45	7,58±0,34	10,13±2,00	12,45±2,98	16,923±2,12
5	8,87±2,55	8,50±2,60	9,97±0,93	14,93±2,54	13,67±3,26	20,59±1,22
6	10,16±2,67	12,57±3,11	11,54±1,04	18,67±0,75	20,85±1,31	24,60±3,08
7	15,95±3,66	15,73±3,13	16,33±0,72	21,60±2,52	26,16±3,23	30,98±4,19
8	19,98±4,17	20,11±2,18	21,67±4,07	26,70±2,56	33,96±3,26	38,80±1,47
9	27,26±1,84	20,92±0,83	26,03±1,63	34,47±3,46	40,14±1,01	45,12±2,60
10	27,00±2,01	19,58±0,47	27,33±0,51	34,36±2,78	40,16±2,18	46,70±2,80

Keterangan : LWT (Limbah *Whey* Tahu)

Fase selanjutnya yakni fase logaritmit. Berdasarkan **Tabel 4.3** kultivasi hari ke 3-8 di medium penambahan limbah *whey* tahu 20%, 30%, 40% dan 50% memberikan peningkatan jumlah sel yang semakin tinggi tiap harinya. Pada **Tabel 4.3** Rerata kelimpahan sel *Chlorellasp* tertinggi terlihat pada media penambahan limbah 50% sebanyak $46,7 \times 10^6$ sel/mL diikuti penambahan limbah 40% sebanyak $40,1 \times 10^6$ sel/ml, kemudian penambahan 30% sebanyak $34,4 \times 10^6$ sel/ml selanjutnya penambahan 20% sebanyak $27,3 \times 10^6$ sel/ml dan terendah pada penambahan limbah *whey* tahu 10% sebanyak $20,9 \times 10^6$ sel/ml. Jika dibandingkan dengan kontrol atau penambahan pupuk komersil (*walne*) memiliki kelimpahan sel sebanyak $27,3 \times 10^6$ sel/ml yang jumlahnya jauh lebih tinggi dibanding penambahan limbah 10%. Pada fase ini sel telah beradaptasi dengan baik, sel dapat memanfaatkan nutrisi secara lebih optimal dalam media kultur sehingga pembelahan sel terjadi dengan cepat yang ditandai dengan jumlah sel yang berlipat ganda (Qian *et al.*, 2009). Namun pada medium penambahan

limbah *whey* tahu 10% fase logaritmit terjadi lebih cepat yakni pada hari ke 3-7. Perbedaan fase hari yang terjadi diduga karena pada penambahan limbah 10% sebagai nutrisi yang berada didalam medium sudah mulai habis yang ditandai pertumbuhan sel yang rendah. Menurut Black (2002) akhir fase logaritmit kecepatan sel mulai menurun dikarenakan nutrisi didalam medium sudah berkurang atau adanya hasil metabolisme yang memungkinkan beracun atau dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Berikutnya pertumbuhan sel memasuki fase stasioner, dimana pada tiap medium memiliki pola fase yang cenderung berbeda harinya. Medium penambahan limbah *whey* tahu 10% berlangsung pada hari ke 8, sementara pada medium lainnya terjadi pada hari ke 9. Pada fase ini jumlah sel tetap namun ukuran sel menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis (Darsono, 2007). Hal ini ditunjukkan dengan kenaikan jumlah sel pada tiap medium yang rendah dibanding dengan kenaikan jumlah sel pada fase logaritmit (**Gambar 4.4**). Sel *Chlorellasp.* yang dihasilkan pada medium *walne* ini tumbuh baik dengan bentuk



sel yang utuh (bulat telur), dan jumlahnya semakin meningkat seiring dengan penambahan limbah yang digunakan (**Gambar 4.5**).

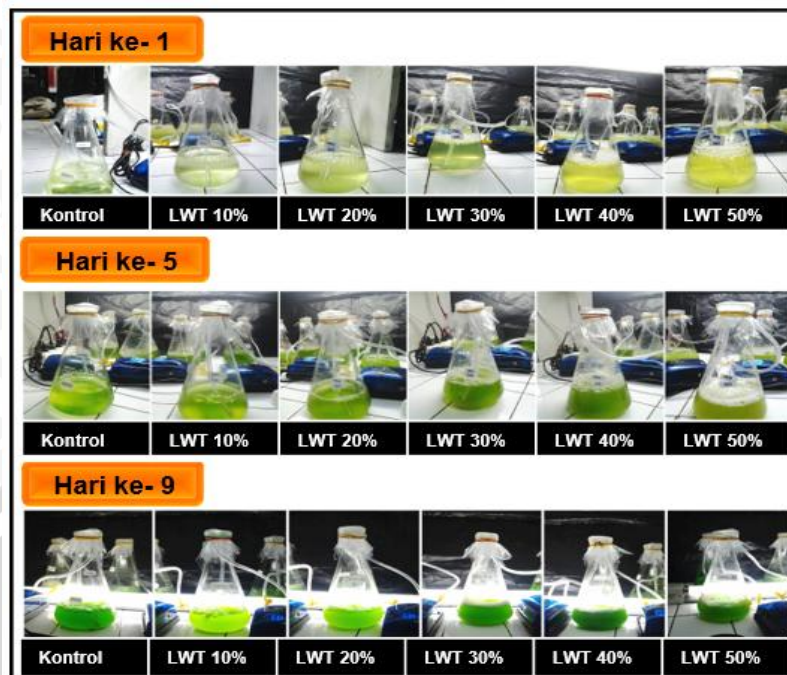
Gambar 4.5. Tampilan Sel *Chlorellasp* dibawah Mikroskop pada *Haemocytometer* Perbesaran 100x. **Keterangan :** (a). Limbah *Whey* Tahu 0%; (b).Limbah *Whey* Tahu 10%; (c). Limbah *Whey* Tahu 20%; (d) Limbah *Whey* Tahu 30%; (e).Limbah *Whey* Tahu 40%; (f) Limbah *Whey* Tahu 50%.

4.2.3 Pengaruh Penambahan Limbah *Whey* Tahu terhadap Kelimpahan Sel *Chlorellasp.*

Pola pertumbuhan sel *Chlorellasp* Secara umum mengalami kenaikan per harinya pada tiap perlakuan penambahan media, namun memiliki perbedaan

kelimpahan sel yang dihasilkan. Berdasarkan hasil analisa ragam yang dilakukan terhadap kelimpahan sel *Chlorella sp* (**Lampiran 9**) diperoleh nilai P-value < 0,05 untuk perlakuan penambahan limbah *whey* tahu, sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan variasi limbah *whey* tahu memberikan pengaruh yang nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap kelimpahan sel mikroalga *Chlorellas*p. Hal ini diduga karena pengaruh nitrat sebagai sumber Nitrogen yang terkandung dalam media. Hal ini dibuktikan pada data hasil pertumbuhan terendah diperoleh *Chlorellas*p dalam media limbah *whey* tahu 10% dengan kadar nitrat sebesar 0,921 ppm yakni $20,9 \times 10^6$ sel/mL. Sedangkan untuk penambahan limbah 50% dengan nutrisi nitrat 4,605 ppm, merupakan pertumbuhan *Chlorellas*p yang terbaik untuk pembentukan biomassa sel sebanyak $46,7 \times 10^6$ sel/mL. Pada medium kontrol 0% atau penambahan pupuk komersil (*walne*) kelimpahan yang jauh lebih rendah yakni $27,3 \times 10^6$ sel/mL. Diduga *Chlorellas*p memiliki batas toleransi nitrat yang mana kandungan ion nitrat didalam medium yang berlebih mengakibatkan pertumbuhan *Chlorellas*p menjadi terganggu. Dugaan ini diperkuat oleh Nybakken (1992) bahwa nitrat merupakan salah satu unsur yang diperlukan mikroalga dalam jumlah besar dan bisa menjadi faktor pembatas dalam pertumbuhan mikroalga jika kadarnya terlalu tinggi (0,3-0,4 ppm). Hal ini dibuktikan oleh perlakuan penelitian pendahuluan dengan variasi penambahan limbah 20%, 60% dan 100% memiliki kandungan nitrat yakni 1,842 ppm, 5,526 ppm dan 9,21 ppm. Data kelimpahan sel yang diperoleh pada penambahan limbah 100% memiliki kepadatan sel terendah dibanding konsentrasi 60% dan juga 20%.

Peran nitrat lainnya yakni merupakan senyawa yang dibutuhkan dalam pembentukan klorofil, dimana klorofil sangat dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Karena nutrisi nitrogen diturunkan maka pembentukan klorofil menjadi rendah akibatnya proses fotosintesis menjadi terhambat. Hal ini ditunjukkan dari perubahan fisik warna media kultur akibat pigmen klorofil yang dihasilkan. Laju fotosintesis berjalan baik yang ditandai dengan menurunnya transparansi pada media atau meningkatnya pigmentasi *Chlorellas*p kultur dan secara visual media kultur tampak hijau (Ekawanti, 2010).



Gambar 4.6. Medium Kultivasi Mikroalga *Chlorellasp* Pada Penambahan Limbah Whey Tahu 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan kontrol (0%)
Keterangan : LWT (Limbah Whey Tahu)

Berdasarkan **Gambar 4.6** terjadi perubahan warna media kultur selama proses kultivasi dari warna bening menjadi hijau. Warna hijau yang dihasilkan berbeda pada tiap medium. Pada medium kultivasi 10% memiliki warna hijau yang jauh lebih muda dibanding media kultivasi 30%, 40%, 50% dan juga kontrol. Hal ini diduga karena Terhambatnya proses fotosintesis mengakibatkan pertumbuhan mikroalga menjadi terhambat sehingga jumlah sel yang dihasilkan pun rendah (Darsono, 2007). Hasil data kelimpahan sel yang diperoleh pada medium penambahan limbah 10% dan 20% jauh lebih rendah dibanding medium penambahan limbah 30%, 40%, 50% dan juga kontrol. Dalam mengetahui pada perlakuan penambahan limbah wheytahu manakah yang paling tinggi pengaruhnya maka dilakukan uji lanjut (Tukey) pada tingkat kepercayaan 95%.

Tabel 4.4 Selisih Jumlah kelimpahan sel pada Perlakuan Penambahan Limbah selama Kultivasi

Penambahan Limbah	Selisih Kelimpahan Sel
0%	28,00 ± 1,089 (d)
10%	21,14±0,466(e)
20%	26,95±0,392(d)
30%	34,56±4,228(c)
40%	40,23±0,582(b)
50%	46,19±1,188(a)

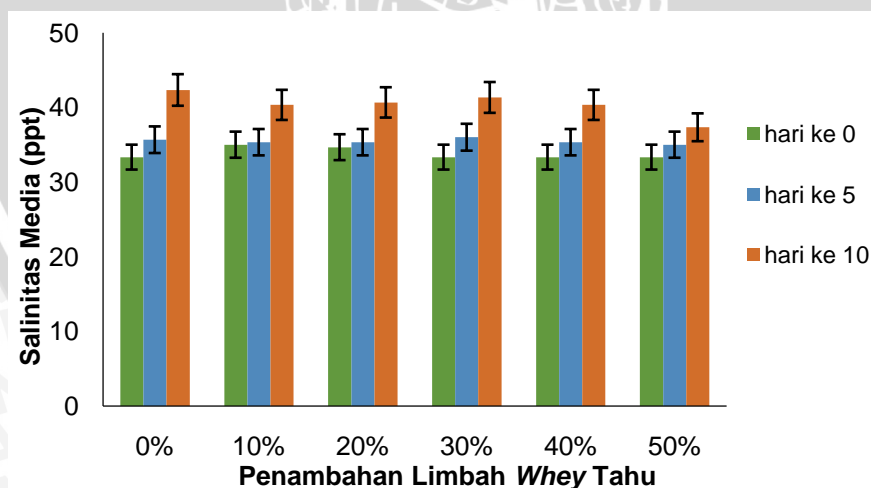
Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada setiap kolom menunjukkan pengaruh berbeda nyata ($\alpha = 0,05$) dari nilai terbesar hingga terkecil.

Data **Tabel 4.4** merupakan hasil uji lanjut metode Tukey ($\alpha = 0,05$) yang menunjukkan hasil bahwa perlakuan penambahan limbah yang paling memberikan pengaruh sangat nyata atau paling besar terhadap kelimpahan sel yakni penambahan limbah *whey* tahu sebesar 50%. Hasil kelimpahan sel yang diperoleh memiliki jumlah paling tinggi jika dibandingkan dengan penambahan limbah sebesar 10%, 20%, 30% dan 40% (**Tabel 4.4**). Data analisa uji lanjut dapat dilihat pada Lampiran 9. kelimpahan sel yang paling tinggi menunjukkan penambahan limbah *whey* tahu yang terbaik. Penambahan limbah terbaik yakni pada media dengan penambahan limbah 50%. Hal ini diduga karena semakin tinggi penambahan limbah *whey* tahu yang ditambahkan maka sumber nutrisi berupa nitrat yang terkandung semakin banyak sehingga selama kultivasi berlangsung mengalami perombakan nutrisi ditandai dengan semakin meningkatnya pertumbuhan sel (Myrasandri dan Syafila, 2011).

4.2.4 Karakteristik Media Pertumbuhan

4.2.4.1 Salinitas

Analisis salinitas dilakukan untuk melihat pengaruh salinitas media terhadap pertumbuhan mikroalga *Chlorellasp* selama proses kultivasi. Proses kultivasi ditandai dengan adanya penurunan kenaikan salinitas dalam media. Perubahan kandungan salinitas ini dapat dilihat pada **Gambar 4.7**.



Gambar 4.7. Rerata Nilai Salinitas Medium Perlakuan Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% pada Hari ke 5 hingga hari ke 9

Tabel 4.5 Rerata Nilai Salinitas Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari

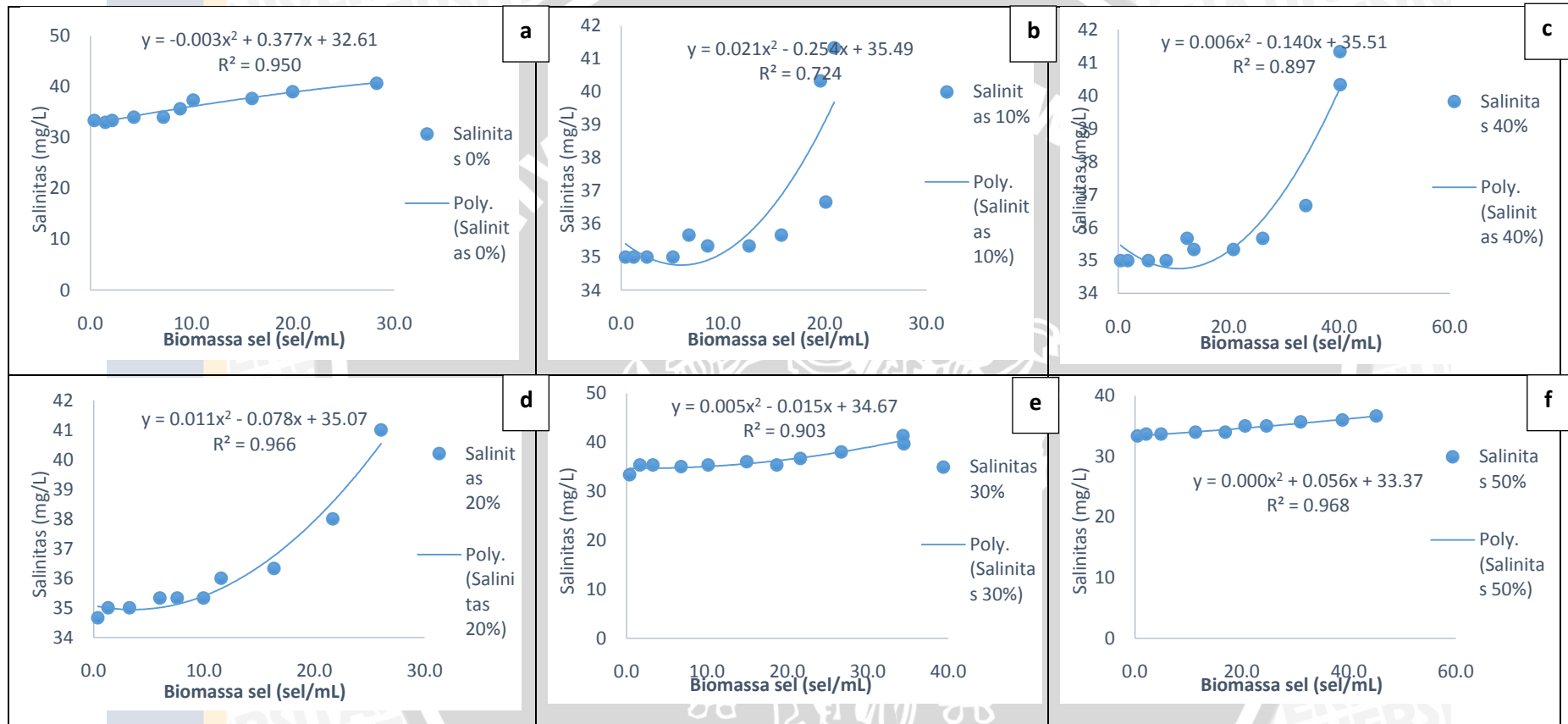
Lama Kultivasi (Hari)	Rerata Salinitas Setiap Medium Penambahan Limbah					
	0%	10%	20%	30%	40%	50%
0	33	35	35	33	33	33
1	33	35	35	35	34	34
2	33	35	35	35	35	34
3	34	35	35	35	35	34
4	34	36	35	35	34	34
5	36	35	35	36	35	35
6	37	35	36	35	36	35
7	38	36	36	37	36	36
8	39	37	38	38	38	36
9	41	41	41	40	39	37
10	42	40	41	41	40	37

Rerata pola salinitas tiap media kultur selama kultivasi mengalami peningkatan pada rentang 33-42 ppt hingga hari ke 10 penelitian secara bertahap (**Gambar 4.7 dan Tabel 4.5**). Rentang salinitas ini termasuk dalam rentang salinitas yang masih tergolong baik bagi pertumbuhan sel *Chlorellasp.* (Hirata, 1981 *in* Rostini, 2007). Menurut Balai Budidaya Perairan Air Payau (2014) salinitas kultur *Chlorellasp.* yakni berkisar 30-35 ppt. Kenaikan salinitas rata-rata kultur *Chlorellasp.* terjadi secara bertahap pada hari 1-5, kemudian naik pada selang hari 5-6 dari sekitar 35 ppt hingga 36 ppt kemudian kembali naik secara bertahap hingga mencapai rentang 40 ppt di hari ke 10 kultivasi. Perubahan rata-rata salinitas diikuti dengan terbentuknya dua kelompok kultur yang memiliki kecenderungan arah yang berbeda. Kelompok pertama yakni menunjukkan pertumbuhan sel yang terus meningkat hingga kultivasi hari ke 10 seiring dengan kenaikan nilai salinitas yakni pada media penambahan limbah 20% 40% dan 50% (**Tabel 4.5**). Kenaikan salinitas hingga 37 ppm memiliki pertumbuhan sel tertinggi yakni pada penambahan limbah *whey* tahu 50% mencapai $46,7 \times 10^6$ sel/mL. Sedangkan salinitas tertinggi hingga 41-42 ppm yakni pada penambahan limbah 10% dan juga kontrol diikuti pertumbuhan sel yang paling rendah di banding media penambahan limbah lainnya. Kelompok kedua menunjukkan pertumbuhan yang relatif menurun seiring dengan kenaikan salinitas rata-rata pada kultivasi hari ke 10 yakni pada media penambahan limbah 10% dan 30%, penurunan jumlah biomassa sebesar $1,32 \times 10^6$ sel/mL dan $0,14 \times 10^6$ sel/mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kondisi salinitas rata-rata yang sama, yang paling mempengaruhi pertumbuhan sel *Chlorellasp.*

Kenaikan nilai salinitas yang tinggi dapat disebabkan oleh penguapan air laut dalam media, dimana untuk penambahan limbah *whey* tahu yang cenderung

sedikit dengan campuran air laut yang lebih banyak menyebabkan air laut mudah mengalami penguapan diakibatkan oleh sumber cahaya dari lampu TL kultur yang menyala 24 jam selama 10 hari kultur. Penguapan air laut dalam medium kultur dipercepat oleh gerakan gelembung udara aerasi didalam gelas kultur. Indikasi penguapan yang menghasilkan garam ditemukan di atas permukaan mulut gelas kultur pada akhir kultur. Secara umum sebaran salinitas pada media kultur adalah merata antara kultur media 0% (kontrol), 10% hingga 50%. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa salinitas tidak menjadi faktor pembatas utama pertumbuhan *Chlorellasp.* selama penelitian berlangsung.

Menurut hasil kurva korelasi antara salinitas dan kenaikan kelimpahan sel ditunjukkan oleh grafik pada **Gambar 4.8**. Pada grafik perlakuan variasi penambahan limbah *whey* secara umum tiap media menunjukkan hasil analisis adanya korelasi positif. Korelasi positif ini ditunjukkan oleh persamaan y dengan rerata koefisien determinasi (R^2) (Sugiyono, 2007). Besar kecilnya nilai koefisien determinasi mempengaruhi besarnya pengaruh yang dihasilkan. Pada **Gambar 4.8** nilai R terkecil yakni pada penambahan limbah 10% menghasilkan nilai koefisien determinasi (R^2)= 0,5763, sementara yang tertinggi yakni pada penambahan limbah 50% dengan yang dapat diartikan nilai koefisien determinasi (R^2)= 0,9638. Hal ini menunjukkan bahwa besarnya kadar salinitas dalam medium limbah 10% memberi pengaruh terhadap naik turunnya jumlah kelimpahan sel sebesar 58%, sedangkan 42% disebabkan oleh faktor lain. Keeratan hubungan ini dikategorikan sedang. Sedangkan pada hasil koefisien determinasi tertingginya sebanyak 96% dan 4% disebabkan oleh faktor lain sehingga di kategorikan memiliki keamatan yang sangat kuat. Secara umum keseluruhan tiap medium memiliki nilai R dari yang keamatannya sedang hingga sangat kuat. Berdasarkan nilai pada tiap perlakuan tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa salinitas memberikan pengaruh yang besar terhadap kelimpahan sel *Chlorellasp.*



Gambar 4.8. Korelasi antara Salinitas dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu Selama 11 hari kultivasi

Keterangan : (a). Limbah *Whey* Tahu 0%; (b).Limbah *Whey* Tahu 10%; (c). Limbah *Whey* Tahu 20%; (d) Limbah *Whey* Tahu 30%; (e).Limbah *Whey* Tahu 40%; (f) Limbah *Whey* Tahu 50%;

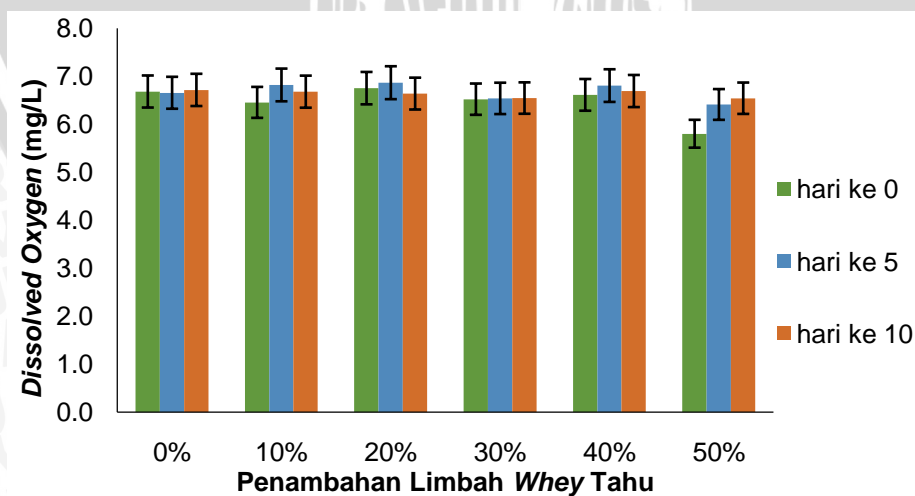
4.2.4.2 DO(Dissolved Oxygen)

Analisis DO (*Dissolved Oxygen*) dilakukan untuk melihat pengaruh DO media terhadap pertumbuhan mikroalga *Chlorella* selama proses kultivasi. Proses kultivasi ditandai dengan adanya penurunan dan kenaikan DO dalam media. Perubahan kandungan DO ini dapat dilihat pada **Gambar 4.9**

Tabel 4.6 Rerata Nilai *Dissolved Oxygen* Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari

Lama Kultivasi (Hari)	Rerata DO Setiap Medium Penambahan Limbah					
	0%	10%	20%	30%	40%	50%
0	6,7	6,5	6,8	6,5	6,6	5,8
1	6,7	6,6	6,7	6,4	6,4	5,9
2	6,7	6,9	6,7	6,5	6,6	5,9
3	6,7	6,6	6,6	6,5	6,7	6,4
4	6,7	6,7	6,6	6,5	6,5	6,4
5	6,7	6,8	6,9	6,5	6,8	6,4
6	6,7	6,6	6,5	6,5	6,5	6,4
7	6,6	6,8	6,6	6,8	6,8	6,7
8	6,8	6,8	6,7	6,7	6,7	6,5
9	6,7	6,6	6,6	6,5	6,8	6,4
10	6,7	6,7	6,6	6,5	6,7	6,5

Berdasarkan **Tabel 4.6** rerata rentang nilai DO media tiap penambahan limbah berbeda-beda tiap harinya, namun masih dalam kisaran 5-6 mg/L. Menurut Effendi, 2003 kisaran optimum kebutuhan oksigen yang terukur sebagai *dissolved oxygen* untuk pertumbuhan mikroalga yakni >3 ppm. Sehingga Kisaran nilai DO pada penelitian ini memiliki kondisi yang baik untuk perkembangbiakan dan pertumbuhan mikroalga *Chlorella*.



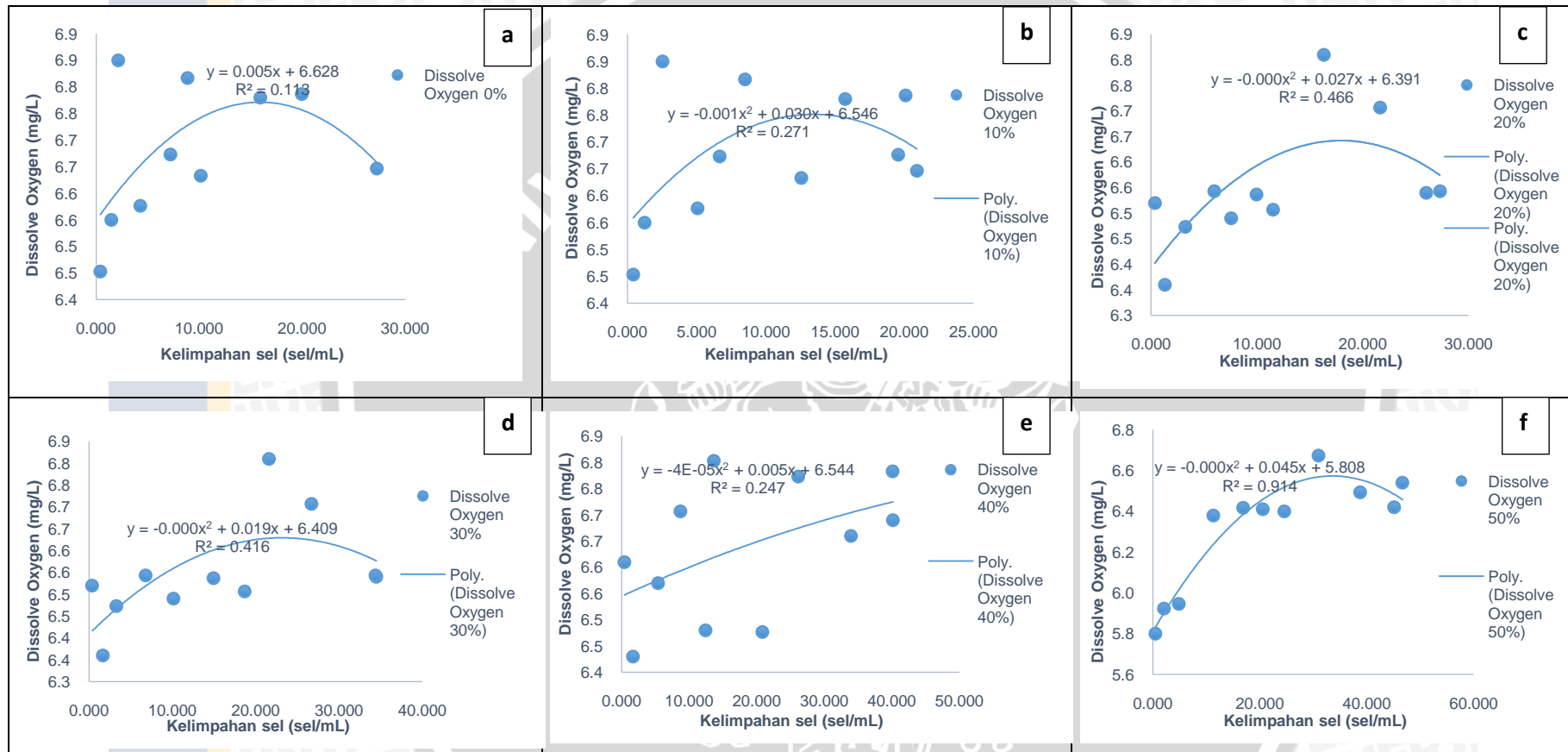
Gambar 4.9. Rerata Nilai DO (Dissolved Oxygen) Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari

Kenaikan yang terjadi pada tiap medium diduga karena pasokan O_2 yang dihasilkan pada proses fotosintesis cukup tinggi. Pertumbuhan mikroalga ditandai dengan terjadinya proses fotosintesis. Proses fotosintesis ini memerlukan CO_2 sebagai sumber energi. CO_2 diperoleh dari proses aerasi menggunakan aerator yang menyuplai udara dari luar. Setelah mikroalga memanfaatkan CO_2 maka akan memproduksi energi dan juga O_2 (Danang, 2009). Pengukuran oksigen ini menandakan aktivitas kehidupan mikroalga. Sumber oksigen yang terdapat dalam media limbah tersebut juga dapat diperoleh dari hasil proses fotosintesis pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp. atau tumbuhan hijau dan proses difusi dari udara, serta hasil proses kimiawi dari reaksi-reaksi oksidasi. Menurut Becker (2007) Nilai DO yang berbeda-beda disebabkan oleh sel yang tidak motil sehingga distribusi aerasi tidak merata, maka oksigen yang diterima tidak sama.

Menurut hasil kurva korelasi antara DO dan kenaikan kelimpahan sel ditunjukkan oleh grafik pada **Gambar 4.10**. Pada grafik perlakuan variasi penambahan limbah *whey* secara umum tiap media menunjukkan hasil analisis adanya korelasi positif. Korelasi positif ini ditunjukkan oleh persamaan y dengan rerata koefisien determinasi (R^2) (Sugiyono, 2007).. Besar kecilnya nilai koefisien determinasi mempengaruhi besarnya pengaruh yang dihasilkan. Pada **Gambar 4.10** nilai R terkecil yakni pada penambahan limbah 10% menghasilkan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,1334, sementara yang tertinggi yakni pada penambahan limbah 50% dengan yang dapat diartikan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,6483. Hal ini menunjukkan bahwa besarnya kadar DO dalam medium limbah 10% memberi pengaruh terhadap naik turunnya jumlah kelimpahan sel sebesar 13%, sedangkan 87% disebabkan oleh faktor lain. Keeratn hubungan ini dikategorikan sangat rendah. Sedangkan pada hasil koefisien determinasi tertingginya sebanyak 64% dan 36% disebabkan oleh faktor lain sehingga dikategorikan memiliki keeratn yang kuat. Namun keseluruhan tiap medium memiliki nilai R dari yang keeratannya sangat rendah dan rendah hanya pada penambahan limbah *whey* tahu 50% yang memiliki keeratn yang kuat. Berdasarkan nilai pada tiap perlakuan tersebut, maka diduga bahwa DO memberikan pengaruh yang besar terhadap kelimpahan sel *Chlorella* sp. hal ini diperkuat oleh bahwa sumber oksigen yang terdapat dalam media limbah tersebut dapat diperoleh dari hasil proses fotosintesis pertumbuhan mikroalga

Chlorellasp (Darsono, 2007). yang ditandai dengan kelimpahan sel yang lebih tinggi dibanding dengan medium yang lainnya.



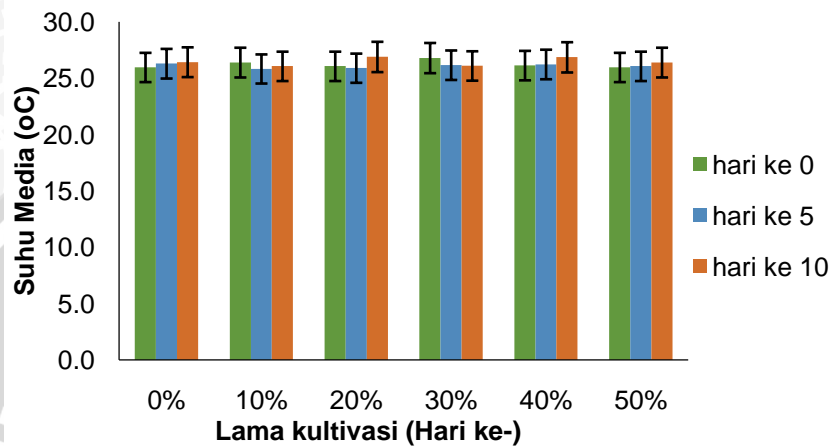


Gambar 4.10 Korelasi antara *DissolvedOxygen* dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu Selama 11 hari kultivasi

Keterangan : (a). Limbah *Whey* Tahu 0%; (b).Limbah *Whey* Tahu 10%; (c). Limbah *Whey* Tahu 20%; (d) Limbah *Whey* Tahu 30%; (e).Limbah *Whey* Tahu 40%; (f) Limbah *Whey* Tahu 50%

4.2.4.3 Suhu

Analisis suhu dilakukan untuk melihat pengaruh suhu media terhadap pertumbuhan mikroalga *Chlorellasp* selama proses kultivasi. Proses kultivasi ditandai dengan perubahan suhu pada rentang 25-27°C dalam medium. Perubahan suhu yang terjadi ini dapat dilihat pada **Gambar 4.11**.



Gambar 4.11. Rerata Nilai Suhu Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari

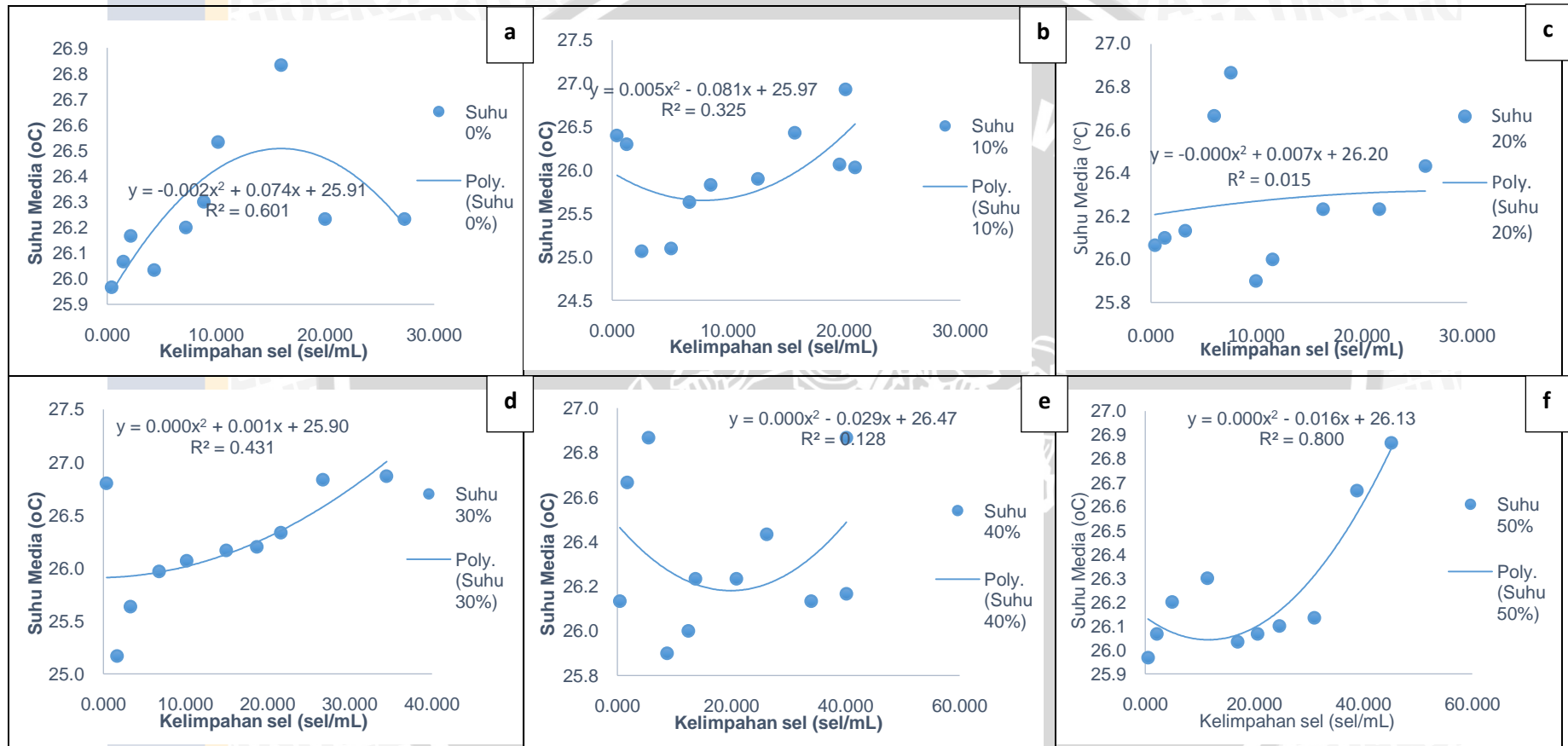
Tabel 4.7Rerata Nilai Suhu Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari

Lama Kultivasi (Hari)	Rerata Suhu Setiap Medium Penambahan Limbah					
	0%	10%	20%	30%	40%	50%
0	26	26	26	27	26	26
1	26	27	27	26	26	25
2	26	27	26	27	27	27
3	27	27	26	25	26	28
4	26	25	26	26	25	25
5	26	26	26	26	26	27
6	27	24	24	26	26	26
7	27	26	26	26	25	25
8	26	25	24	25	25	26
9	27	25	26	27	26	26
10	27	26	26	26	26	26

Rerata suhu medium yang tercatat selama kultivasi Berdasarkan **Tabel 4.7** berkisar antara 25-27°C dan tergolong dalam rentang temperatur optimum pertumbuhan sel *Chlorellasp.* untuk kultur laboratorium (Hladka, 1971). Suhu diatas dari 36°C akan menyebabkan jenis fitoplankton tertentu mati, sedangkan apabila suhu kurang dari 16°C akan menyebabkan kecepatan dari pertumbuhan fitoplankton menurun. Jika dibandingkan dengan jumlah biomassa selama proses kultivasi peningkatan suhu perharinya diikuti dengan peningkatan jumlah biomassa. Oh-Hama dan Miyachi (1992) menyatakan bahwa suhu

mempengaruhi aktivitas fisiologi membran tilakoid pada kloroplas sehingga mempengaruhi kecepatan transpor elektron dalam proses fotosintesis. Enzim-enzim yang bekerja dalam proses fotosintesis pun hanya dapat bekerja pada suhu optimalnya. Umumnya laju fotosintesis meningkat seiring dengan meningkatnya suhu hingga batas toleransi enzim (Tadayoshi, 2009).

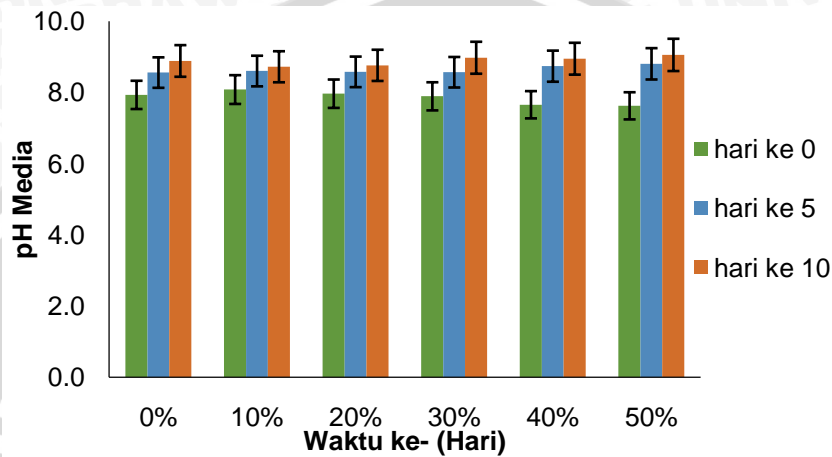
Menurut hasil grafik korelasi antara suhu dan kenaikan kelimpahan sel ditunjukkan pada **Gambar 4.12**. Pada grafik perlakuan variasi penambahan limbah *whey* secara umum tiap media menunjukkan hasil analisis adanya korelasi positif. Korelasi positif ini ditunjukkan oleh persamaan y dengan rerata koefisien determinasi (R^2) (Sugiyono, 2007). Besar kecilnya nilai koefisien determinasi mempengaruhi besarnya pengaruh yang dihasilkan. Pada **Gambar 4.12** nilai R pada tiap medium berbeda-beda. Nilai R terkecil yakni pada penambahan limbah 40% menghasilkan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,0041, sementara yang tertinggi yakni pada penambahan limbah 50% dengan yang dapat diartikan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,57. Hal ini menunjukkan bahwa besarnya kadar suhu dalam medium limbah 10% memberi pengaruh terhadap naik turunnya jumlah kelimpahan sel sebesar 0,41%, sedangkan 99,59% disebabkan oleh faktor lain. Keeratan hubungan ini dikategorikan sangat rendah. Sedangkan pada hasil koefisien determinasi tertingginya sebanyak 57% dan 43% disebabkan oleh faktor lain sehingga di kategorikan memiliki keeratan yang sedang. Secara umum keseluruhan tiap medium memiliki nilai R dari yang kekeeratannya sangat rendah hingga sedang. Berdasarkan nilai pada tiap perlakuan tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa suhu tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap kelimpahan sel *Chlorella* sp.



Gambar 4.12. Korelasi antara Suhu dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah Whey Tahu Selama 11 hari kultivasi
Keterangan : (a). Limbah Whey Tahu 0%; (b).Limbah Whey Tahu 10%; (c). Limbah Whey Tahu 20%; (d) Limbah Whey Tahu 30%; (e).Limbah Whey Tahu 40%; (f) Limbah Whey Tahu 50%

4.2.4.4 pH

Analisis pH dilakukan untuk melihat pengaruh pH media terhadap pertumbuhan mikroalga *Chlorella* selama proses kultivasi. Proses kultivasi ditandai dengan kenaikan pH dalam media. Perubahan kenaikan pH yang terjadi ini dapat dilihat pada **Gambar 4.13**



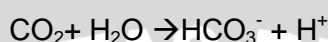
Gambar 4.13. Rerata Nilai pH Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari
Keterangan : LWT (Limbah *Whey* Tahu)

Tabel 4.8 Rerata Nilai pH Pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%,20%, 30%, 40% dan 50% Selama 10 Hari

Lama Kultivasi (Hari)	Rerata pH Setiap Medium Penambahan Limbah					
	0%	10%	20%	30%	40%	50%
0	7,9	8,1	8,0	7,9	7,7	7,6
1	8,2	8,3	8,4	8,2	8,1	8,1
2	8,3	8,4	8,5	8,4	8,4	8,3
3	8,4	8,6	8,5	8,4	8,5	8,5
4	8,5	8,6	8,6	8,7	8,7	8,8
5	8,6	8,6	8,6	8,6	8,7	8,8
6	8,5	8,6	8,6	8,9	8,7	8,8
7	8,8	8,4	8,6	8,7	8,7	8,6
8	8,6	8,4	8,7	8,6	8,5	8,8
9	8,7	8,5	8,7	8,7	8,8	8,9
10	8,9	8,7	8,8	9,0	9,0	9,1

Rerata nilai pH yang tercatat selama kultivasi hari ke 0 hingga hari ke 10 yaitu dari kisaran pH 7 menjadi pH 9 (**Lampiran 8**). Berdasarkan **Tabel 4.8** menunjukkan bahwa medium kultur secara perlahan berubah menjadi basa. Pada proses kultivasi awal atau hari ke-0 memiliki pH awal dalam kisaran 7 pada tiap medium kultur. Sebaran pH mulai meningkat pada hari ke-1 dan umumnya selama 10 hari pH berada pada nilai 8, kemudian kembali meningkat menjadi 9

pada hari ke 11. Menurut Hladka (1971) pH pertumbuhan yang optimum bagi *Chlorellasp* berkisar antara 6,5-9,3 sementara Neilsan (1995) meyakini bahwa rentang perubahan pH medium kultur antara 5,5-8,5 termasuk pada rentang pH perairan dengan produktivitas optimum. Kenaikan pH diduga karena proses fotosintesis yang terjadi pada mikroalga dimana pada proses fotosintesis diperlukan CO₂. Gas ini dibutuhkan sebagai carbon source-nya dan didapatkan dalam bentuk senyawa bikarbonat yang terbentuk dari reaksi air dengan CO₂ terlarut dalam media hidupnya (ekstra selular) sebagai berikut (Wijanarko, 2004) :



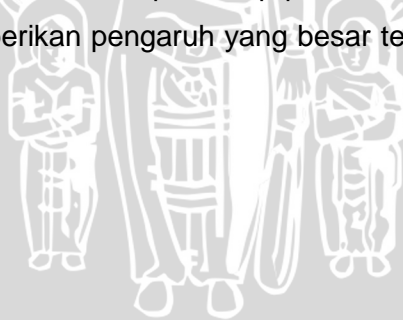
Senyawa bikarbonat ini yang kemudian diserap oleh sel *Chlorella*. Proses metabolisme yang terjadi dalam sel selanjutnya adalah reaksi antara bikarbonat tersebut dan air yang terdapat dalam sel (Siklus Calvin) membentuk senyawa organik seperti glukosa dan ion OH⁻ menggunakan energi ATP dan NADPH dari konversi cahaya pada reaksi terang, sebagaimana tergambar pada persamaan reaksi berikut (Wijanarko, 2004)

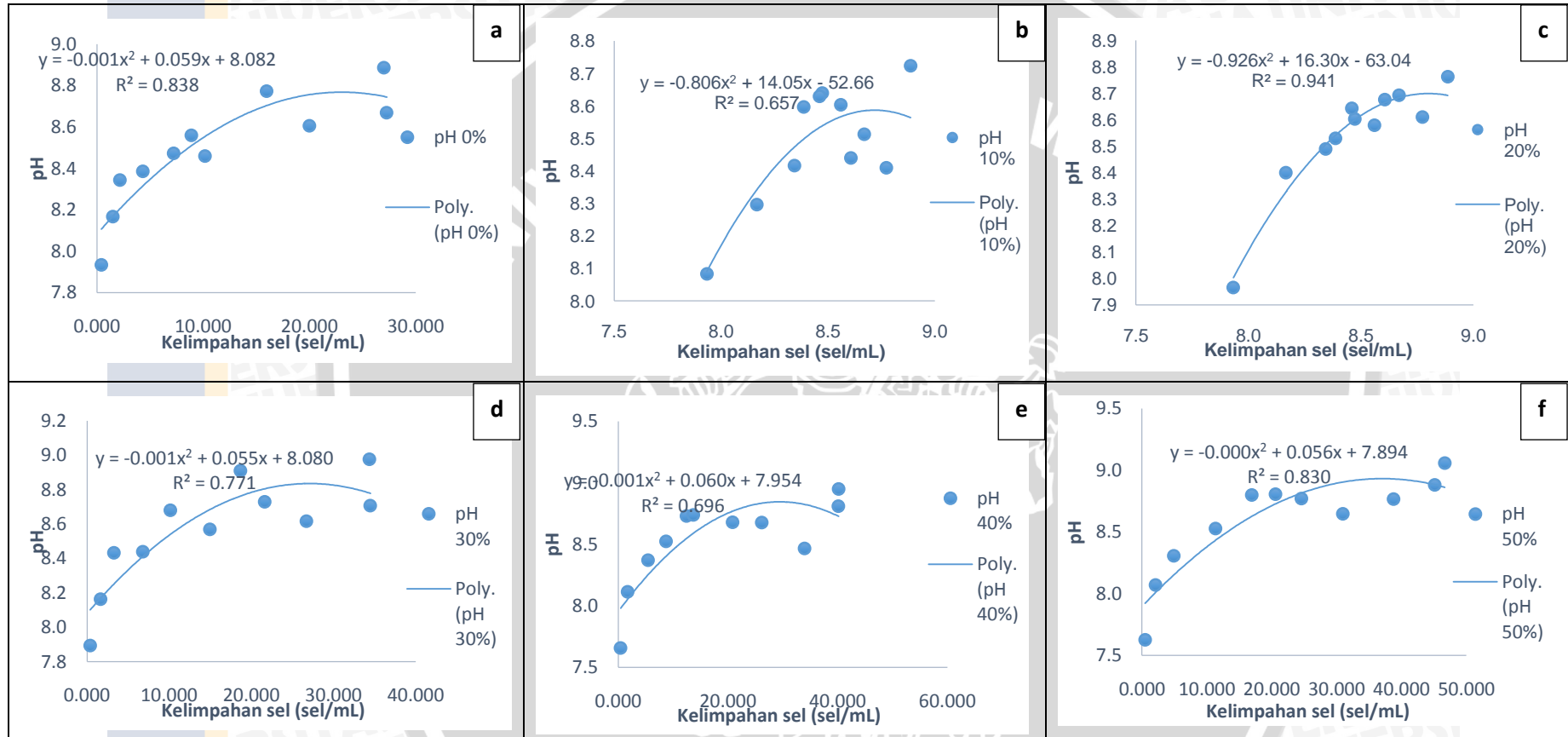


Akumulasi metabolit OH⁻ di tiap harinya dari hasil fotosintesis yang menyebabkan terjadinya kenaikan pH pada medium pertumbuhan. Pernyataan di atas juga diperkuat oleh Goldman & Horne (1983 dalam Wahyudi, 2009), peningkatan nilai pH ini terjadi karena adanya aktivitas fotosintesis dari mikroalga, pada saat dilakukan fotosintesis yang menggunakan CO₂, karbonat (CO₃⁻) dan bikarbonat (HCO₃⁻). Penyerapan CO₂ bebas dan bikarbonat ini dapat menyebabkan penurunan konsentrasi CO₂ terlarut sehingga akan meningkatkan nilai pH (Sze, 1993).

Menurut De La Noue dan De Pauw (1988) nilai pH optimum, minimum dan maksimum tiap mikroalga berbeda-beda, variasi pH dapat mempengaruhi kemampuan biologis mikroalga dalam memanfaatkan nutrisi dalam medium kulturnya, dan dapat mempengaruhi fisiologis sel mikroalga. Berbeda dengan perlakuan yang menggunakan limbah *whey* tahu, pada perlakuan kontrol positif (medium pupuk *walne*) pH menunjukkan nilai netral, yaitu 7 hingga hari ke-8 dan peningkatan pH berlanjut hingga pH bernilai 9. Peningkatan nilai pH dapat terjadi karena penguraian protein dan persenyawaan nitrogen lain seperti Nitrat (NO₃⁻), Amonium (NH₄⁺), dan Nitrit (NO₂⁻) (darley, 1982).

Menurut hasil grafik korelasi antara pH dan kenaikan kelimpahan sel ditunjukkan pada **Gambar 4.14**. Pada grafik perlakuan variasi penambahan limbah *whey* secara umum tiap media menunjukkan hasil analisis adanya korelasi positif. Korelasi positif ini ditunjukkan oleh persamaan y dengan rerata koefisien determinasi (R^2) (Sugiyono, 2007). Besar kecilnya nilai koefisien determinasi mempengaruhi besarnya pengaruh yang dihasilkan. Pada **Gambar 4.14** nilai R terkecil yakni pada penambahan limbah 10% menghasilkan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,5148, sementara yang tertinggi yakni pada penambahan limbah 40% dengan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,8355 diikuti penambahan limbah 50% dengan nilai (R^2) = 0,8309. Hal ini menunjukkan bahwa besarnya nilai pH dalam medium limbah 10% memberi pengaruh terhadap naik turunnya jumlah kelimpahan sel sebesar 51%, sedangkan 49% disebabkan oleh faktor lain. Keeratan hubungan ini dikategorikan sedang. Sedangkan pada hasil koefisien determinasi tertinggi di dapati pada konsentrasi 40% dan 50%. Pada penambahan limbah 40% memberikan pengaruh sebanyak 84% dan 16% disebabkan oleh faktor lain sehingga di kategorikan memiliki keeratan yang sangat kuat. Penambahan limbah 50% sebanyak 83% sedangkan 49% disebabkan oleh faktor lain, keeratan hubungan ini dikategorikan kuat. Secara umum keseluruhan tiap medium memiliki nilai R dari yang kekuatannya sedang hingga sangat kuat. Berdasarkan nilai pada tiap perlakuan tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa pH memberikan pengaruh yang besar terhadap kelimpahan sel *Chlorellasp.*

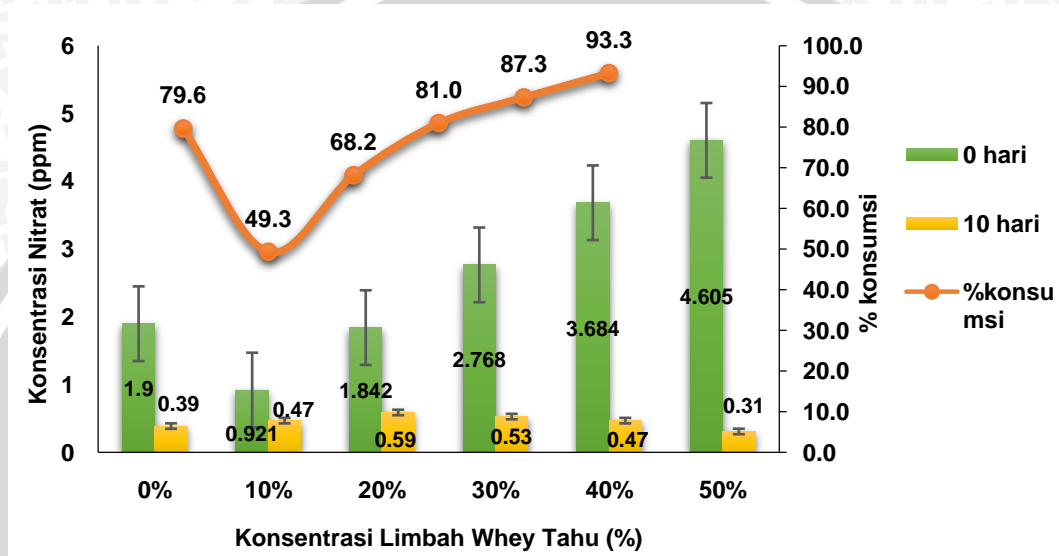




Gambar 4.14. Korelasi antara pH dan Kelimpahan Sel pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu Selama 10 hari kultivasi
Keterangan : (a). Limbah *Whey* Tahu 0%; (b).Limbah *Whey* Tahu 10%; (c). Limbah *Whey* Tahu 20%; (d) Limbah *Whey* Tahu 30%; (e).Limbah *Whey* Tahu 40%; (f) Limbah *Whey* Tahu 50%

4.2.4.5 Tingkat Konsumsi Nitrat (% Konsumsi Nitrat)

Analisis kimia nitrat (NO_3^-) dilakukan untuk melihat konsumsi dari pemanfaatan nitrat selama proses kultivasi mikroalga *Chlorella* sp dilakukan diakhir kultivasi. Proses kultivasi ditandai dengan adanya penurunan kandungan nitrat dalam media. Perubahan kandungan nitrat ini dapat dilihat pada **Gambar 4.12**.



Gambar 4.15. Kadar Nitrat dan % konsumsinya Pada Penambahan Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% pada Awal (hari ke 0) dan Akhir (hari ke-10) Kultivasi

Dari hasil analisa ragam yang dilakukan terhadap kandungan nitrat (**Lampiran 11**) diperoleh nilai P-value < 0,05 untuk perlakuan penambahan limbah *whey* tahu, sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan limbah *whey* tahu memberikan pengaruh yang nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap persentase konsumsi nitrat dalam media. Berdasarkan **Gambar 4.15** persentase konsumsi nitrat terbesar yakni pada medium penambahan limbah *whey* tahu 50% yakni mencapai 93,3% dan terendah pada penambahan *whey* 10% yakni 49,3%. Pada **Gambar 4.15** kadar nitrat dalam media limbah *whey* tahu semakin meningkat dari 0,921-4,605 diikuti penambahan limbah 10%-50% ke dalam media pertumbuhan. Perbandingan media pertumbuhannya yakni 1 : 100 (limbah *whey* tahu : air laut). Penambahan limbah *whey* tahu sebesar 30%, 40% dan 50% memiliki persentase konsumsi nitrat yang lebih banyak dari penambahan limbah 10% dan 20% dengan pembanding yakni kontrol atau penambahan pupuk komersil (*walne*) dapat dilihat dari **Tabel 4.9**. Hal ini menunjukkan bahwa

konsumsi nitrat tertinggi oleh *Chlorellaspyakni* pada penambahan media limbah *whey* tahu 50%. Berdasarkan tinjauan proses sintesisnya, penggunaan nitrat oleh *Chlorellasp.* dalam konsentrasi yang tinggi justru dapat menghambat fiksasi CO₂ dalam fotosintesis karena nitrat dan CO₂ berkompetisi untuk hidrogen (H₂) (Hladka, 1971).

Tabel 4.9 Selisih Jumlah Nitrat pada Perlakuan Penambahan Limbah *Whey* Tahu selama Kultivasi

Penambahan Limbah <i>whey</i> tahu	Selisih Nitrat	% Konsumsi
0%	1,513 ± 0,015 (d)	79,6
10%	0,454 ± 0,059 (f)	49,3
20%	1,255 ± 0,015 (e)	68,2
30%	2,241 ± 0,064 (c)	81,0
40%	3,217 ± 0,042 (b)	87,3
50%	4,295 ± 0,036 (a)	93,3

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada setiap kolom menunjukkan pengaruh berbeda nyata ($\alpha = 0,05$) dari nilai terbesar hingga terkecil.

Data **Tabel 4.9** merupakan hasil uji lanjut Tukey ($\alpha = 0,05$) yang menunjukkan hasil bahwa penambahan limbah *whey* tahu memberikan pengaruh nyata terhadap selisih kadar nitrat awal yang ditambahkan ke dalam media dan di akhir proses kultivasi. Mikroalga *Chlorellaspm* memanfaatkan nitrat dalam limbah sebagai nutrisi pertumbuhan dan menghasilkan biomassa yang lebih banyak. Sehingga konsumsi nitrat terbesar yakni pada penambahan media limbah 50% sebesar 93,3% dengan kandungan nitrat 4,2950 mg/L. Nilai terendah yakni pada penambahan limbah 10%. Hal ini diduga karena nutrisi nitrat yang rendah sehingga pertumbuhan sel pun rendah. Hal ini diperkuat oleh pernyataan (Damayanti, 2007) dimana kandungan nutrisi yang rendah menyebabkan sel tidak dapat tumbuh dengan optimal untuk mengkonsumsi nutrisi yang menyebabkan tingkat produksi sel rendah.

4.2.5 Pengaruh Penambahan Limbah terhadap Kandungan Protein *Chlorellasp*

Rerata produksi protein pada mikroalga *Chlorellaspy* yang ditumbuhkan dengan media campuran limbah *whey* tahu dan air laut disajikan pada **Tabel 4.10**. Protein yang dihasilkan dari *Chlorellasp* selama kultivasi pada hari ke 2, 4, 6, 7-10 pada perlakuan dengan konsentrasi limbah *whey* tahu 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% cenderung memiliki kandungan protein yang berbeda-beda namun memiliki pola kandungan yang terus meningkat tiap hari (**Tabel 4.10**). Dari hasil analisa ragam yang dilakukan terhadap kandungan protein (**Lampiran 10**) diperoleh nilai

P-value < 0,05 untuk perlakuan penambahan limbah *whey* tahu, sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan variasi penambahan limbah *whey* tahu memberikan pengaruh yang nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap kandungan protein mikroalga *Chlorellasp*.

Tabel 4.10. Rerata Kandungan Protein Mikroalga *Chlorellasp* pada Penambahan Media Limbah *Whey* Tahu 20%, 60% dan 100% yang Dikultivasi Selama 10 Hari

Lama kultivasi (Hari ke)	Rerata Kandungan Protein pada Medium					
	LWT 0%	LWT 10%	LWT 20%	LWT 30%	LWT 40%	LWT 50%
2	10,57±0,31	10,33±1,85	11,63±0,50	12,30±0,35	14,23±1,31	13,93±0,90
4	15,87±1,30	15,7±2,97	17,3±1,57	18,4±1,51	18,9±1,45	21,13±3,00
6	18,17±0,38	20,87±3,60	21,70±4,98	25,47±3,08	25,9±4,80	36,37±4,93
7	23,5±1,76	21,2±3,76	30,3±6,04	35,1±4,04	36,7±2,60	41,8±5,273
8	28,2±5,65	25±4,45	31,2±4,23	35,7±4,13	41,9±2,65	49±2,003
9	39,1±44,66	30,2±7,95	35,4±1,78	43,8±3,67	49,5±3,74	55,9±1,27
10	36,9±2,73	32±1,96	34±2,59	43,4±2,17	49,7±2,31	56,70±1,00

Keterangan : LWT (Limbah *Whey* Tahu)

Pada **Tabel 4.10** pada penambahan limbah 10% memiliki rerata kandungan protein yang paling rendah, yakni 31,97% kandungan protein, kemudian diikuti oleh perlakuan dengan penambahan limbah *whey* tahu 20% yaitu 35% kandungan protein, kemudian penambahan limbah *whey* tahu 30% menghasilkan protein sebanyak 43,80%, penambahan limbah *whey* tahu 40% sebanyak 49,6%, dan penambahan limbah *whey* tahu 50% sebanyak 56,67% protein. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa perlakuan limbah *whey* 50% merupakan perlakuan terbaik yang menghasilkan kandungan protein tertinggi di antara perlakuan lainnya termasuk kontrol (penambahan pupuk komersil). *Spirulina* sp. yang ditumbuhkan pada media ekstrak taug (MET) mampu mengakumulasi protein sel antara 6,73-20,99%. Jika dibandingkan kandungan protein yang diperoleh pada penelitian ini (12,39-30,17%), maka persentase protein *Chlorellasp* yang dikultur pada limbah cair karet lebih tinggi daripada protein *Spirulina* sp. yang dikultur pada media ekstrak taug (MET) (Amanatin dan Nurhidayati, 2011).

Variasi protein yang dihasilkan dari perlakuan diatas disebabkan oleh kandungan nutrisi utamanya berupa nitrat dalam limbah *whey* tahu dimana memiliki peran yang sangat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Limbah *whey* tahu yang digunakan dari hasil uji memiliki kandungan nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$) (9,21ppm). Menurut Kaswinarni (2007) limbah *whey* tahu juga mengandung

sumber Nitrogen lain seperti nitrit ($\text{NO}_2\text{-N}$) (0,002 mg/L) dan amoniak (NH_3) (0,671 mg/L). Nitrogen dalam bentuk NO_3 , NO_2 ataupun amonium (NH_3) pada limbah dimanfaatkan oleh *Chlorellasp* untuk keperluan metabolisme sel seperti katabolisme maupun asimilasi khususnya biosintesis protein (Borowizka dan Lesly, 1988).

Hasil analisa persen konsumsi nitrat pada pembahasan sebelumnya (**Tabel 4.9**) dimana kandungan nitrat tertinggi yakni pada medium kultur 50% menyebabkan persentasi biomassa akhir protein dari *Chlorellasp* juga tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat Hu dan Gao (2003) dalam Widianingsih et al., (2008) bahwa tingginya sumber nitrogen pada media kultur dapat meningkatkan biomassa sel dan kandungan protein selama kultivasi. Christmadha et al., (2006) dalam Ernest (2012) menyatakan bahwa mikroalga *Spirulina fusiformis* mengalami penurunan kandungan protein pada media kultur yang kadar nitrogennya rendah.

Tabel 4.11 Selisih Jumlah Kandungan Protein pada Perlakuan Penambahan Limbah selama Kultivasi

Penambahan Limbah	Selisih Protein
0%	33,30± 4,650 (cd)
10%	35,00 ± 4,158(d)
20%	39,13± 19,10 (cd)
30%	44,13± 3,232 (bc)
40%	50,23± 2,926 (ab)
50%	56,67± 1,528 (a)

Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada setiap kolom menunjukkan pengaruh berbeda nyata ($\alpha = 0,05$) dari nilai terbesar hingga terkecil.

Data **Tabel 4.11** merupakan hasil uji lanjut metode Tukey ($\alpha = 0,05$) yang menunjukkan hasil bahwa penambahan limbah *whey* tahu memberikan pengaruh nyata terhadap kandungan protein mikroalga *Chlorellasp*. Perlakuan penambahan limbah *whey* tahu sebesar 50% menghasilkan kandungan protein paling tinggi jika dibandingkan dengan penambahan limbah sebesar 10%, 20%, 30% dan 40%. Sedangkan pada penambahan limbah 10% menunjukkan hasil kandungan protein yang paling rendah. Jika dibandingkan dengan kontrol atau tanpa penambahan limbah memiliki kandungan protein yang lebih rendah di banding penambahan limbah *whey* tahu 50%. Peningkatan kandungan protein yang paling tinggi menunjukkan penambahanlimbah *whey* tahu yang terbaik. Penambahan limbah terbaik yakni pada media dengan penambahan limbah 50%. Hal ini diduga karena semakin tinggi penambahan limbah *whey* tahu yang

ditambahkan maka sumber nutrisi berupa nitrat yang terkandung semakin banyak sintesis protein yang dihasilkan.

Menurut Borowizka dan Lesly (1988) Nitrogen dalam bentuk NO_3 , NO_2 ataupun amonium (NH_3) pada limbah dimanfaatkan oleh *Chlorellasp* untuk keperluan metabolisme sel seperti katabolisme maupun asimilasi khususnya biosintesis protein. Nitrogen merupakan bahan penting untuk penyusunan asam amino, amida, nukleotida, dan nukleo protein (Gardneretal.,1991 dalam Widianingsih *et al.*, 2008). Asam glutamat berfungsi sebagai bahan dasar dalam biosintesis asam amino yaitu sebagai penyusunutama darimakromolekul protein (Suharja dan Sutarno,2009).

4.3.6 Perlakuan Terbaik

Hasil perlakuan terbaik pada penelitian didapatkan dari selisih kelimpahan sel tertinggi dan kandungan protein tertinggi selama kultivasi *Chlorellasp* dapat dilihat pada **Tabel 4.12**.

Tabel 4.12Komposisi Perlakuan Terbaik kultur *Chlorellasp*

Komposisi	Satuan
Komponen media	50% limbah <i>whey</i> tahu : 50% air laut
Kandungan nitrat	4,605 ppm
Lama kultivasi	10 hari
Kelimpahan sel	$42,6 \times 10^6$ sel/mL
Kandungan protein	56,7 %

Penelitian ini menunjukkan nilai kelimpahan sel tertinggi selama kultivasi pada perlakuan penambahanlimbah *whey* tahu 50% dengan kandungan Nitrat 4,605 ppm yang menghasilkan kelimpahan sel *Chlorellasp* sebesar $42,6 \times 10^6$ sel/mL dengan kandungan protein 56,7 %. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian inimenunjukkan bahwa penambahan limbah *whey* tahu memberikan pengaruh terhadap kelimpahan sel serta kandungan protein total dari mikroalga *Chlorellasp*.

4.3 Penelitian Tambahan

Berdasarkan hasil penelitian tambahan yakni produksi biomassa kering mikroalga *Chlorella* sp menghasilkan rendemen sebesar 19,7% berupa biomassa bubuk sebanyak 4,84 mg dari 5 L media kultivasi. Menurut Cahyaningsih, dkk (2009), budidaya *Chlorella* sp pada skala semi massal di BBAP Situbondo menggunakan pupuk komersil (walne), sedangkan menurut Kurniati (2009),

pupuk *Walne* dapat digunakan sebagai medium berbasis pupuk komersial untuk kultur *Chlorella* sp. yang mampu menghasilkan berat biomassa kering tertinggi yaitu sebesar 1,2 mg/L gram dari kelimpahan awal inokulum sebanyak 10^4 sel/ml. Sedangkan pada skala massal bisa mencapai 8,7 mg/Lnya dengan melakukan optimasi di berbagai proses.

Selain menjanjikan sebagai sumber pangan, mikroalga juga dapat digunakan sebagai sumber nutrisi berupa klorofil. Klorofil merupakan zat warna hijau yang terkandung dalam sel mikroalga hijau seperti *Chlorella* sp. Berdasarkan hasil uji mikroalga *Chlorella* sp/ memiliki kandungan klorofil-a 18,4 mg/L, klorofil b 7,5 mg/L. Keunggulan Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki jumlah kandungan klorofil terbesar dibanding semua tumbuhan hijau, yang dapat mencapai enam kali dibanding klorofil pada bayam dan lima kali dibanding mikroalga *Spirulina* sp (Qian *et al.*, 2009). Senyawa klorofil dapat membantu meningkatkan aktifitas unsur-unsur antibodi untuk melawan infeksi yang disebabkan oleh virus, bakteri, maupun parasit, sehingga tubuh memiliki daya tahan yang lebih kuat (Bhalla *et al.*, 2007). Menurut Balder *et al.*, (2006) senyawa phytonutrisi seperti betakaroten, klorofil, xanthofil, phyocianin merupakan zat anti kanker alami serta bekerja untuk membersihkan dan membuang toksin (racun) yang berasal dari bahan pengawet makanan, obat-obatan, cemaran air dan bahan-bahan kimiawi yang menumpuk di dalam darah. Klorofil juga berguna untuk mengurangi aroma tubuh yang tidak sedap. Kandungan zat besi (Fe) yang diperlukan untuk pembentukan darah merah (Beker *et al.*, 2007).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Perlakuan penambahan variasi limbah *whey* tahu memberikan pengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap kelimpahan sel *Chlorellasp*
2. Perlakuan terbaik yang memberikan kelimpahan sel tertinggi yakni penambahan limbah *whey* tahu 50% dengan kandungan nitrat 4,605 ppm menghasilkan kelimpahan sel sebanyak $46,7 \times 10^6$ sel/mL
3. Perlakuan penambahan variasi limbah *whey* tahu memberikan pengaruh sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap kandungan protein
4. Perlakuan terbaik yang memberikan kelimpahan sel tertinggi yakni penambahan limbah *whey* tahu 50% dengan kandungan nitrat 4,605 ppm menghasilkan kandungan protein sebesar 56,67%.
5. Jumlah nitrat yang terkandung dalam media memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan *Chlorella* sp, yang mana kadar nitrat yang paling tepat yakni 4,605 ppm (penambahan limbah 50%) yang menunjukkan pengaruh terhadap kelimpahan (sel/ml) dan kandungan protein total serta jika intraseluler pada *Chlorella* sp.
6. Pengukuran parameter pertumbuhan berupa pH, suhu, DO (*Dissolved Oxygen*), salinitas menunjukkan kisaran yang optimum untuk pertumbuhan *Chlorellasp*. sehingga bukan merupakan faktor pembatas utama.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah dalam mengaplikasikan pada skala produksi masal perlu dilakukan pengujian kadar asam nukleat yang terkandung dalam mikroalga *Chlorellasp* untuk keamanan pangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amini S. 2010. **Teknik Pengembangan Mikroalga**. Badan Litbang Departemen Kelautan Perikanan, Jl. K.S. Tubun, Petamburan VI – Jakarta. Disampaikan pada Forum Knowledge Sharing Badan Litbang ESDM, 30 Nopember 2010.
- Arifin, Farikhah. 2012. **Uji Kemampuan *Chlorella sp.* sebagai Bioremediator Limbah Whey Tahu**. Skripsi. Program S1 Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Balder, H.F., Vogel, J., Jansen, M.C., Weijnenberg, M.P., Van den Brandt, P.A., Westenbrink, S., Van der Meer, R., dan Goldbohm, R.A. 2006. ***Heme and Chlorophyll Intake and Risk of Colorectal Cancer in the Netherlands Cohort Study***. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. Vol 15:717-725.
- Batten, D., Peter C., Greg T., 2011, ***Resource Potential of Algae for Sustainable Biodiesel Production in the APEC***. Presentation at APEC Workshop on Algal Biofuels San Francisco <http://www.egnret.ewg.apec.org/workshops/AlgalBiofuels/David%20Batten.pdf> (10 September 2015).
- Bappeda Medan. 2003. **Penelitian Pencemaran Limbah di Sentra Industri Kecil Tahu di Kec. Medan Tuntungan Kotamadya Dati II Medan**. Laporan Penelitian, Bappeda TK II Medan. Medan.
- Becker, E.W. 2007. ***Micro-algae as Source of Protein***. Biotechnology Advances .Vol. 25:207-210.
- Bhalla, T.C., Sharma, N.N. and Sharma M. 2007. ***Production of Metabolites, Industrial Enzymes, Amino Acids, Organic Acids, Antibiotics, Vitamins and Single Cell Proteins***. National Science Digital Library. India.
- BPPT. 2002. **Teknologi Pengolahan Limbah Tahu Dengan Proses Biofilter Anaerob dan Aerob**. [http://www. Enviro.bppt.go.id/](http://www.enviro.bppt.go.id/) Kel-1. Diakses tanggal 15 Desember 2015
- Cahyaningsih, S., A. N. M. Muchtar, S. J. Purnomo, I. Kusumaningrum, Pujiati, A. Haryono, Slamet, dan Asniar. 2009. **Juknis Produksi Pakan Alami**. Departemen Kelautan dan Perikanan Direktorat Jendral Perikanan Budidaya Balai Budidaya Air Payau Situbondo. 35 hal.

- Chen, Meng., Tang, Haiying. Thomas C, H., K.Y. Simon Ng and Steven O.S. 2011. **Effect of Nutrisis and Growht and Lipid Accumulation in the Green Algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. Vol 102 ppp 1649-1655.nigam.**
- Converti, A., Alessandro A, c., Erika Y.O., Patrizia P., Marco D,B. 2009. **Effect of Temperature and Nitrogen Concentration on the Growthand Lipid Content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for Bioiesel Production.**Chemical Enngening and Processing. 48:1146-1151.
- Damayanti, A., Joni & Ali. 2007. **Analisis Resiko Lingkungan dari Pengolahan Limbah Pabrik Tahu dengan Kayu Apu (*Pistia stratiotes L*).** FTSP-ITS: Semarang.
- Danang Ambar P. 2009. **Optimasi Pengembangan Media untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* pada Skala Laboratorium.** Program Stufi Ilmu dan Teknologi Kelautan. IPB. Bogor.
- Darsono, V. 2007. **Pengolahan Limbah Cair Tahu Secara Aerob dan Anaerob.** Jurnal Teknologi Industri. 11:9-20.
- Dianursantia., Rizkytataa B, T., Gumelara M, T., Abdullah T, H. 2014. **Industrial Tofu Wastewater as a Cultivation Medium of Microalgae *Chlorella vulgaris*.** Conference and Exhibition Indonesia Renewable Energy & Energy Conservation [Indonesia EBTKE CONEX 2013]. Energy Procedia 47(2014) 56 – 61.
- Durmaz, Y. 2007. **Vitamin E (α -tocopherol) Production by Marine Microalgae *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*) in Nitrogen Limitation.** Aquaculture. Vol. 272:717-722.
- El-Baky, Abd. Hanaa H., El-Baz, Farouk K., El-Baroty, G.S. 2003. ***Spirulina* Species as Source of Carotenoids and Alfa-Tocopherol and its Anticarcinoma Factors.** Biotechnology, Vol. 2: 222-240.
- Effendi, H. 2003. **Telaah Kualitas Air.** Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hal. 66-156.
- Ekawati, A.W. 2005. **Introduksi Pemanfaatan Silase Kering Ampas Tahu Sebagai Pakan Buatan Untuk Ikan Mas.** Jurnal Penelitian Perikanan. Volume 4. hal 59-65.

- Fadilla Zahara. 2010. **Pengaruh konsentrasi Limbah Cair Tahu terhadap Pertumbuhan Mikroalga *Scenedemus sp.*** Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Ferruzi, M.G., Blakeslee, J., 2007, ***Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives.*** Nutrition Research, Vol. 27:1-12.
- Fogg, G. E. 1987. ***Algal Cultures and Phytoplankton Ecology.*** The University of Wisconsin Press, Madison.
- Gizinet. 2011. **Laporan Kasus Gizi Buruk 2010 : Menurun.** [Http://gizi.depkes.go.id/laporan-kasus-gizi-buruk2010-menurun.](http://gizi.depkes.go.id/laporan-kasus-gizi-buruk2010-menurun) Diakses tanggal 2 Oktober 2015.
- Grima, E.M., Belarbi, F.G.A., Medina, A.R., Chisti, Y., 2003, ***Recovery of Microalgal Biomass and Metabolites : Process Options and Economics., Biotechnol. Adv.,*** 20, 491-515
- Gunawan. 2010. **Keragaman dan Karakterisasi Mikroalga dari Sumber Air Panas yang Berpotensi Sebagai Sumber Biodiesel.** Tesis. Bogor: Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Hadiyanto., Azim., Maulana. 2012. **Mikroalga: Sumber Pangan dan Energi Masa Depan,** edisi pertama. Undip Press. Semarang.
- Harun, R. 2009. ***Bioprocess Engineering of Mikroalgae to Produce a Variety of Consumer Products.*** Journal Bioprocess.Renew sustain Energy Rev, DOI.10.1016/j.rser.2009.11.004.
- Jamil, S. 2001. **Media Kultur Biomasa *Spirulina sp.*** Tesis. Program Studi Pengelolaan Tanah dan Air. Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya.
- Kaswinarni, F. 2007. **Kajian Teknis Pengolahan Limbah Padat dan Cair Industri Tahu.** Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang. 1-99.
- King, P.M. 2014. ***The Use of Ultrasound on the Extraction of Microalgal Lipids.*** Unpublished PhD Thesis. Coventry: Coventry University.
- Koelman J., Roehm K.H. 2005. ***Color Atlas Biochemistry.*** 2nd ed. Marburg: Thieme.
- Kompas. 2015. 1.918 **Anak Menderita Gizi Buruk di NTT.** Print.kompas.com. Diakses pada 10 Januari 2016.
- Laura, B dan Paolo G. 2006. ***Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.***CRC Press, Boca Raton New York.

- Manfaati, R. 2010. **Kinetika dan Variable Optimum Fermentasi Asam Laktat dengan Media Campuran Tepung Tapioka dan Limbah Cair Tahu oleh *Rhizopus oryzae***. Tesis. Magister Teknik Kimia. UNDIP. Semarang.
- Maf'ulah, H. 2004. **Pengaruh Kadar Pupuk Nitrogen (N-Urea) Terhadap Kandungan Protein dan Lemak Pada *Chlorella sp.*** Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Brawijaya. Malang.
- Margareth, 2012. ***Chlorella sp.*** <http://www.Chlorellahellas.com/what.htm>. Diakses tanggal 13 Oktober 2015.
- Mateos Aparicio I, A., Redondo Cuenca., VillanuevaSuárez M, J., and Zapata Revilla M.A. 2008. ***Soybean, a promising health source***. Nutr Hosp, Vol.23(4):305312.
- MetCalf dan Eddy. 2003. ***Wastewater Engineering : Treatment, Disposal and Reuse***. Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol.06 (3): hal 34-40.
- Michael D. Edgerton. 2009. ***Increasing Crop Productivity to Meet Global Needs for Feed, Food, and Fuel***. Plant Physiology, Vol. 149: 7–13. Olguin McGraw Hill Book Co. New York.
- Nigam, J.N. 1998. ***Single cell Protein from Pineapple Cannery Effluent***. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 14: 693-696.
- Nigam, Subhasha, Monika P.R., and Rupali Sharma. 2011. ***Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of Chlorella pyrenoidosa***. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 7 (3). 126-131.
- Nurhasan., Pramudyanto, B.B. 2003. **Penanganan Air Limbah Tahu**. Yayasan Bina Karya Lestari. Jakarta. <http://www.menlh.go.id/usaha-kecil>. Diakses tanggal 15 Desember 2015.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan., Pelczar, M.F. 2008. **Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2**. UI-press: Jakarta.
- Potvin, G., Zhang, Z. 2010. ***Strategies for High Level Recombinant Protein Expression in Transgenic Microalgae: A Review***. Biotechnology Advance, Vol. 28: 910-918.
- Prabowo, D., A. 2009. **Optimasi Pengembangan Media Pertumbuhan *Chlorella sp.* Pada Skala Laboratorium**. Skripsi. IPB. Bogor.
- Prakash, S., Bhimba, B.V. 2004. ***Pharmaceutical Development of Novel Microalgael Comounds For Mdr Mycobacterium tuberculosis***. Natural product radiance, Vol. 4 (4): 264-269.

- Prihantini, N.B., Putri, B., dan Yuniati, R. 2005. **Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal.** MAKARA, SAINS. Vol. 9, No.1:1-6. Depok: Departemen Biologi Fakultas MIPA, Universitas Indonesia.
- Purba, Michael. 2007. **Kimia Jilid 3.** Erlangga. Jakarta.
- Qian, Haifeng, Jingjing Li, Liwen Sun, Wei Chen, G. Aniel Sheng, Weiping Liu, Zhengwei Fu. 2009. **Combined Effect of Copper an Cadmium on *Chlorella vulgaris* Growth and Photosynthesis-related Gene Transcription.** Aquatic Toxicology 94 (2009) 56-61.
- Rachmaniah, Orchidea, Setyarini R, D., Maulida L. 2010. **Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari *Chlorella sp* dan Prediksinya sebagai Agen Biodiesel.**Seminar Teknik Kimia Shoehadi Reksowardojo, 2010.
- Rahman, M., Setiawan, A. 2008. **Pengujian Kandungan Protein Mikroalga *Spirulina sp.* dalam Media Pupuk.** Modul Praktikum. Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Rishi S., Munir C., 2001, Zein: **The Industrial Protein From Corn.** Industrial Crops and Products, Vol.13:171–192.
- Rostini, I. 2007. **Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chui*) pada Skala Laboratorium.** Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Round, F., E. 1973. **The Biology of The Algae.** 2nd ed Pergamon Press. London.
- Sachan, M. 1980. **Planktonologi.** Fakultas Peternakan dan Perikanan. Undip. Semarang. Dalam Wahyudi, 2009.
- Sartika. 2014. **Kandungan Klorofil dan Lipid *Nannochloropsis oculata* yang dikultur dalam Media Limbah Cair Karet.** Journal Protobiont, vol.3.No.3,hal.25-30.
- Sari I P., Manan A. 2012. **Pola Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada Kultur Skala Laboratorium, Intermediet, dan Massal .** Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan Vol. 4 No. 2.
- Shen Ying., Zhijian Pei., Wenqiao Yuan & Enrong Mao. 2009. **Effect of Nitrogen and Extraction Method on Algae Lipid Yield.** International Journal of Agriculture and Biological Engineering Vol. 2 No 1 pp 51-57.
- Sudjadi, A. dan Rohman. 2004. **Analisis Obat dan Makanan cetakan I.** Yogyakarta: Yayasan Farmasi Indonesia.

- Somaye, F., M.N. Marizieh & N. Lale. 2008. **Single Cell Protein (SCP) Production from UF Cheese When by *Kluyveromyces marxianus***. 18th National Congress on Food Technology, Iran. 16 -18 Oct.
- Spolaore, Pauline, Claire J, C. Duran E., Isambert A. 2006. **Commercial Applications of Microalgae**. Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 101, No. 2, 87-96. 2006 DOI : 10.1263/jbb.101.87.
- Sugiharto. 2004. **Dasar-dasar Pengolahan Air Limbah**. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta
- Sulistyo, Tiarsipeni, dan Adillah. 2007. **Pembuatan Nata dari Limbah Cair Tahu dengan Menggunakan Molases sebagai Sumber Karbon *Acetobacter Xylinum***. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. *Ekulilibrium* Vol. 6 No. 1 Januari 2007: 1-5.
- Sumwidjaja, k. 1973. **Limnologi**. Fakultas Perikanan IPB. Bogor. *Dalam* Wahyudi, 2009.
- Suriawira, U., 2008. **Mikrobiologi Air dan Dasar-Dasar Pengolahan Buangan Secara Biologis**. Alumni:Bandung. Hal 148.
- Survei Sosial Ekonomi. 2013. **Konsumsi Rata-rata per Kapita Setahun Beberapa Bahan Makanan di Indonesia, tahun 2009-2013**. <http://www.pertanian.go.id/Indikator/tabe-15b-konsumsi-rata.pdf>. Diakses tanggal 28 September 2015.
- Sutamihardja, R.T.M. 1975. **Pengetrapan *Chlorell* dan Ganggang lainnya sebagai Penambah Bahan Makanan di Indonesia**. Bull. Biokimia. Dep. Biokimia. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor. *Dalam* Wahyudi, 2009.
- Sutomo. 2005. **Kultur Tiga Jenis Mikroalga (*Tetraselmis sp.*, *Chlorella sp.* dan *Chaetoceros gracilis*) dan Pengaruh Kepadatan Awal Terhadap Pertumbuhan *C. gracilis* di Laboratorium**. *Oseanologi dan Limnologi* 37 : 43-5.
- Tadayoshi, M., Peter, D.G. 2009. **World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections**. *Int. Food and Agribusiness Management Review*, Vol.12 (4): 143-162.
- Tokusoglu, Ö. Dan M.K. Ünäl. 2006. **Biomass Nutrisi Profile of Three Microalgae : *Spirulina plantesis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana***. *J. Food Sci.* Vol 86 (4) : 1144-1148. *Dalam* Wijioseno 2011.
- Thomas R,J. 2012. ***Chlorella***. <http://www.chm.bris.ac.uk>. Diakses tanggal 28 Oktober 2014.

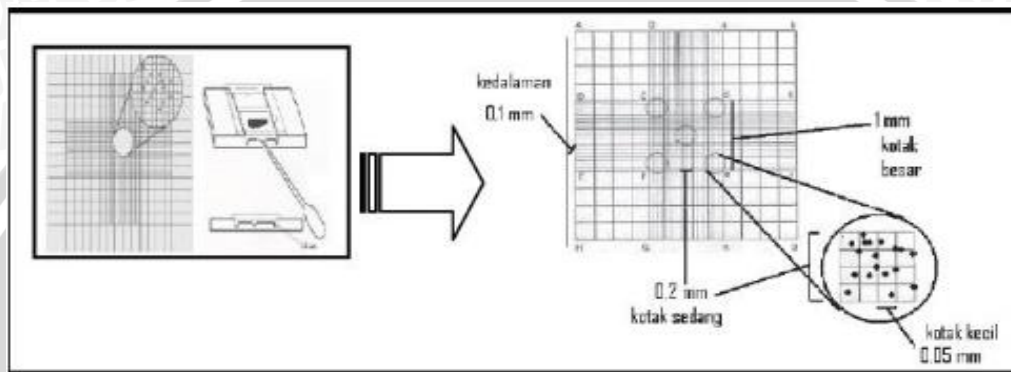
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., dan Hoadley, A., (2010). ***Dewatering of Microalgal Cultures: A Major Bottleneck to Algaebased Fuels***. Journal of Renewable and Sustainable Energy 2, 012701.
- Van Harmelen, T. and Oonk, H., 2006, ***Micro-algae Biofixation Processes: Applications and Potential Contributions to Greenhouse Gas Mitigation Options***.<http://www.fluxfarm.com/uploads/3/1/6/8/3168871/biofixation.pdf> (10 September 2015).
- Wahyudi, P. 2009. ***Chlorella: Mikroalgaie Sumber Protein Sel Tunggal***. Jurnal Sains dan Teknologi vol. 1 No. 5. Hlm 35-41.
- Wargadalam, V. J., 2011, ***Indonesia's Algae Based Biofuel Potentials***. Presentation at APEC Workshop on Algal Biofuels San Francisco, 12 September 2011 <http://www.egnret.ewg.apec.org/workshops/AlgalBiofuels/Verina%20Wargadalam.pdf> (10 September 2015).
- Widianingsih, Retno Hartati., Endrawati H., Ervia Yudiati., Valentina R. 2011. ***Pengaruh Pengurangan Konsentrasi Nutrisi Fosfat dan Nitrat Terhadap Kandungan Lipid Total Nannochloropsis oculata***. Jurnal ilmu kelautan Vol. 16 (1) 24-29. Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK, Universitas Diponegoro. Semarang.
- Wijoseno, T. ***Uji Pengaruh Variasi Media Kultur terhadap Tingkat Perumbuhan dan Kandungan Protein, Lipid, Klorofil dan Karotenoid Mikroalga Chlorela vulgaris butenzorg***. Skripsi. Departemen Teknik Kimia. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok.
- William, E., Ashutosh S., Shiv K. 2011. ***Crops that feed the world 3***. Investing in lentil improvement toward a food secure world. Food Sec., Vol. 3 (2):127–139.
- Yusandi, Fadli. 2010. ***Pengaruh Nitrogen terhadap Kandungan essensial Biomassa Chlorella vulgaris Butenzorg***. Depok. Program Studi Teknik kimia Universitas Indonesia.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Sampel Penelitian

1. Perhitungan jumlah sel *Chlorella sp.*

Penghitungan kelimpahan dari *Chlorella sp.* dengan *Haemocytometer* (**Gambar 3.3**) adalah sebagai berikut: pertama, *Haemocytometer* dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu dengan tissue. Kemudian *cover glass* dipasang pada *Haemocytometer*.



Gambar 3.3. *Haemocytometer*
(Sumber : Fadilla, 2010)

Mikroalga *Chlorella sp.* yang akan dihitung kelimpahannya diteteskan dengan menggunakan pipet tetes pada bagian parit yang melintang hingga penuh. Penetesan dilakukan secara hati-hati agar tidak terjadi gelembung udara dibawah gelas penutup. Selanjutnya *Haemocytometer* tersebut diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 kali dan dicari bidang yang berkotak-kotak. Untuk mengetahui kelimpahan *Chlorella sp.* dengan cara menghitung selyang terdapat pada kotak bujur sangkar yang mempunyai sisi 1 mm. Untuk menghitung jumlah sel dapat menggunakan alat bantu *hand counter*. Nilai kelimpahan sel dapat dihitung pada beberapa bagian *chamber* (perhitungan pada *chamber* kecil) bila kelimpahannya relatif sangat tinggi, maka penghitungan hanya dilakukan pada beberapa *chamber* saja (umumnya 80 *chamber*). Untuk pengambilan data kelimpahan sel dengan kelimpahan relatif tinggi biasanya hanya menggunakan 80 *chamber* kecil. Dengan demikian, kelimpahan sel dapat dihitung dengan menggunakan rumus kelimpahan sel menurut Fadilla (2010) sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Luas } \textit{chamber} \text{ kecil} &= \text{panjang} \times \text{lebar} \\ &= 0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \end{aligned}$$

$$= 0,0025 \text{ mm}^2$$

Volume *chamber* kecil = luas x ke dalaman
 $= 0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$
 $= 0,00025 \text{ mm}^3$

Karena $1 \text{ mL}^3 = 1 \text{ cm}^3$, maka :
 $= 0,00025 \text{ mm}^3$
 $= 0,00000025 \text{ cm}^3$
 $= 25 \times 10^{-8} \text{ mL}$

Sehingga, rumus menghitung jumlah sel/mL dalam *chamber* kecil (80 kotak) :
 $= \text{rata-rata jumlah sel (dari 80 kotak)} / 25 \times 10^{-8} \text{ mL}$
 $= \text{rata-rata jumlah sel (dari 80 kotak)} \times (1/25) \times 10^8$
 $= \text{rata-rata jumlah sel (dari 80 kotak)} \times 4 \times 10^6$

Nilai kelimpahan seldapat dihitung pada *chamber* sedang bila kelimpahannya relatif rendah. Jumlah pengambilan data jika kelimpahan sel relatif rendah, biasanya hanya menggunakan 5 *chamber* ukuran sedang. Dengan demikian, kelimpahan seldapat dihitung dengan menggunakan rumus kelimpahan sel menurut Fadilla (2010) sebagai berikut :

Rata-rata jumlah sel (dari 5 kotak) $\times 25 \times 10^4/\text{mL} = \dots\dots\dots$ sel

Lampiran 2. Perhitungan N-Nitrat Media Perlakuan

N-Nitrat yang akan diukur digunakan sebagai parameter pertumbuhan mikroalga dalam memanfaatkan limbah tahu sebagai sumber N untuk memperbanyak biomassa *Chlorella sp.* Pengujian kandungan Nitrat medium pertumbuhan dilakukan dalam 2 tahap. Berikut ini cara pengukuran kadar N-Nitrat dalam limbah cair tahu (Tim Dosen FPIK, 2015).

a. Pembuatan Reagent :

1) Larutan asam fenodisulfat

Lar.1 : 25 gram fenol dilarutkan dalam 150 mL H₂SO₄, Kemudian dioven 4 jam dengan suhu 100⁰ C

Lar.2 :11,2 mL H₂SO₄ PA ditambahkan 64 mL aquades

Lar.3 : Larutan 2 dimasukkan ke larutan 1

Larutan 3 dioven pada suhu 100⁰ C selama 2 jam

2) Ammonium hydroxide : 500 mL NH₄OH diencerkan dalam 1 liter aquades

b. Prosedur Pengujian :

1) 12,5 mL sampel dituangkan ke dalam cawan porselin



- 2) dipanaskan sampai terbentuk kerak
- 3) didinginkan dan ditambah 0,25 ml asam fenoldisulfonik (dihunakan untuk indikator warna awal nitrat) sebanyak 6-7 tetes dan aduk dengan pengaduk gelas
- 4) encerkan dengan 1ml aquades
- 5) dikerik sampai dengan kerak larut dan ditambahkan NH_4OH (1:1) (untuk pengkondisian suasana basa) sampai terbentuk warna kuning. jika sampai 6 ml belum berwarna kuning, dihentikan
- 6) ditambahkan H_2O sampai volume awal
- 7) dimasukkan dalam kuvet
- 8) diukur dengan menggunakan spektrofotometer (method 353 dan panjang gelombang 410nm).

Lampiran 3. Pengukuran Kualitas media (Salinitas, Oksigen terlarut, suhu dan pH)

a. Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan dengan menggunakan alat *HandRefractometer*. Refraktometer dikalibrasi dengan akuades sampai skala 0 ppt. Pengukuran salinitas dilakukan dengan cara meneteskan sampel air media pemeliharaan pada prisma refraktometer dengan menggunakan pipet tetes. Nilai yang tertera pada skala refraktometer menyatakan salinitas air laut (Danang, 2009).

b. Oksigen Terlarut dan Suhu

Pengukuran oksigen terlarut dilakukan dengan menggunakan DO meter dimana dilengkapi dengan sensor suhu, yaitu dengan cara memasukkan salah satu elemen DO meter ke dalam air sampel, kemudian ditunggu beberapa saat untuk memperoleh kisaran kandungan oksigen terlarut dalam air sampel dan suhu dalam sampel (Danang, 2009).

c. pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Mula – mula ujung elektroda dibilas dengan akuades, kemudian dimasukkan dalam larutan penyangga untuk kalibrasi. Kontrol pada pH meter diatur sampai terbaca pH larutan penyangga. Ujung elektroda dibilas kembali dengan akuades, lalu dimasukkan ke dalam air sample sampai beberapa saat sampai skala

menunjukkan angka yang konstan. Nilai yang terbaca menunjukkan nilai pH (Danang, 2009).

Lampiran 4. Metode Ekstraksi Menggunakan Sonikator

Sonikasi merupakan aplikasi metode gelombang suara frekuensi tinggi yang efektif untuk menghancurkan sel dalam hal ini sel mikroalga *Chlorella sp.* Penghancuran sel dilakukan guna memperoleh protein kasar yang berada didalam organel sel (Koelman, 2005). Proses penghancuran sel diawali dengan mengambil sampel sebanyak 10 mL disentrifugasi 2500 rpm selama 10 menit untuk diambil peletnya. Kemudian dicuci dengan buffer fosfat pH 7 sebanyak 10 mL dikocok dan disentrifugasi kembali. Supernatan dibuang, ditambahkan etanol 70% dengan rasio biomassa sel : pelarut adalah 1:5 (b/v) (Sani dkk, 2014). Campuran biomassa dan pelarut tersebut diekstrak dengan gelombang ultrasonik pada frekuensi 40 kHz selama 20 menit (Araujo *et al.*, 2013 dalam King, 2014).

Lampiran 5. Metode Analisis Nutrisi Biomassa Mikroalga

a. Metode Analisis Klorofil (Arnon's, 1949 dalam)

Pengukuran kandungan klorofil dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan metode modifikasi dari Stermann, 1988. Prinsip metodenya yakni mengukur jumlah klorofil dengan panjang gelombang tertentu. Tahapannya yakni sampel diambil sebanyak 80 mL. Sampel dibagi menjadi delapan bagian masing-masing sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam kuvet sentrifuge ukuran 10 mL. Sampel disentrifuge dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Setelah proses sentrifuge selesai, supernatan dibuang hingga tersisa pelletnya. Pellet tersebut kemudian dijadikan satu dan diekstraksi dengan $MgCO_3$ (untuk mencegah perubahan warna) dan 1 mL aceton 90%. Sampel dihomogenkan secara manual selama kurang lebih 10-15 menit (Masithah dkk, 2011). Sampel yang telah homogen disentrifuge kembali dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit dan diambil supernatan saja yang akan berwarna kehijauan. Kemudian penambahan sedikit pelarut organik hidrofobik dan larutan NaCl dan gojok secara perlahan. Selanjutnya layer atas diambil dan dianalisa kandungan klorofil pada spektrofotometer UV-VIS. Sebelum digunakan, spektrofotometer dikalibrasi terlebih dahulu, sesuai dengan panjang gelombang yang akan digunakan yaitu 664 nm dan 647 nm. Kandungan klorofil dihitung menggunakan rumus Stermann (1988) berikut:

Kandungan klorofil-a dan klorofil-b (larutan aceton 90%) :

- 1) Klorofil-a = $11,93 \times A_{664} - 1,93 A_{647}$
- 2) Klorofil-b = $20,63 \times A_{647} - 5,50 A_{664}$
- 3) Total Klorofil a+b = $7,34 \times A_{664} + 17,76 \times A_{647}$

Sterman (1988) menyatakan bahwa setelah nilai absorban diketahui, selanjutnya nilai absorban dimasukkan ke dalam rumus di bawah ini :

$$\mu\text{g klorofil dalam ekstrak} = (\text{volume dalam ekstrak, mL})(\mu\text{g klorofil mL}^{-1})$$

Berat molekul : chl-a 894, chl-b 908

Lampiran 6. Data Kelimpahan Sel Kurva Pertumbuhan *Chlorella* sp dalam Medium Pupuk *Walne*

Hari	Jam	Rata-rata Kelimpahan	Hari	Jam	Rata-rata Kelimpahan
0	0	0,385		150	8,89
	6	1,045		156	9,23
	12	1,135	7	162	10,26
1	18	1,329		168	11,23
	24	1,45		174	13,9
	30	1,5		180	15,04
	36	2,092	8	186	16,21
2	42	2,348		192	18,55
	48	2,845		198	17,02
	54	3,22		204	18,89
	60	2,845	9	210	19,03
3	66	3,698		216	19,54
	72	5,234		222	21,23
	78	5,56		228	20,86
	84	5,73	10	234	22,11
4	90	5,92		240	22,4
	96	6,021		246	21,3
	102	6,643		252	20,29
	108	6,303	11	258	18
5	114	6,521		264	16,89
	120	6,392		270	15,02
	126	7,01		276	13,5
	132	7,28	12	282	11,2
6	138	7,75		288	9,2
	144	8,23			

Lampiran 7. Data Pengamatan pH, Suhu, DO, Kelimpahan sel, dan Salinitas
 Penelitian Pendahuluan

Parameter	Kosentrasi Limbah Whey Tahu	Lama Kultivasi (Hari ke-)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Biomassa (10⁶ sel/mL)	0%	0,48	1,78	3,25	5,96	8,29	12,95	18,8	22,66	24,3	25	23,8
	20%	0,41	1,22	1,89	4,2	8,9	12,4	14,8	16,9	15,73	18,5	16,2
	60%	0,43	1,02	0,92	2,56	4,23	6,2	8,43	9,5	8,24	7,3	3,2
	100%	0,42	0,67	1,55	1,89	2,86	1,99	3,79	4,9	6,41	5,93	3,44
pH	0%	8,45	8,2	8,54	8,62	8,3	8,96	8,89	8,85	8,95	8,97	8,99
	20%	7,46	8,52	8,48	8,43	8,57	8,69	8,56	8,71	8,92	8,48	9,46
	60%	8,52	8,48	8,57	8,69	8,71	8,96	8,87	8,62	8,7	8,84	8,52
	100%	8,8	8,87	8,43	8,52	8,85	8,87	8,97	9,95	8,98	8,92	8,8
Suhu (°C)	0%	25,2	26,3	26,5	26,9	26,5	26,7	27,5	27,6	27	26,5	26,4
	20%	26,3	26,1	26,5	26,9	26,4	26,7	27,5	27,6	26,5	27	26,8
	60%	25,3	25,6	25,8	26,7	25,2	26,3	27,2	27,3	27,4	26,7	26,2
	100%	26,1	25,3	26,5	26,9	26,7	26,7	27,5	27,6	26,8	27,6	26,5
Salinitas (‰)	0%	35	34	36	35	35	35	36	34	35	37	39
	20%	34	34	34	35	35	35	35	36	37	37	39
	60%	34	34	35	35	35	36	35	35	35	36	40
	100%	35	35	34	35	35	35	35	35	36	36	39
DO (Dissolved Oxygen) (mg/L)	0%	6,95	6,94	6,91	6,74	6,46	6,6	6,52	6,66	6,58	6,59	6,95
	20%	6,54	6,31	6,51	6,91	6,47	6,52	6,46	6,89	6,58	6,26	6,38
	60%	6,96	6,54	6,67	6,6	6,52	6,55	6,58	6,37	6,54	6,45	6,67
	100%	6,42	6,51	6,58	6,83	6,48	6,75	6,39	6,64	6,88	6,71	6,09

Lampiran 8. Data Pengamatan pH, Suhu, DO, Kelimpahan sel, dan Salinitas
 Penelitian Utama

1. Data Pengamatan parameter pH

Ulangan	Lama Kultivasi	Kosentrasi Limbah <i>Whey</i> Tahu					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	0	7,6	8,34	8,47	8,36	7,61	7,46
	1	8,18	8,52	8,58	8,45	8,2	8,35
	2	8,39	8,54	8,62	8,58	8,59	8,5
	3	8,3	8,65	8,66	8,32	8,6	8,65
	4	8,21	8,74	8,73	8,96	8,73	8,78
	5	8,57	8,67	8,63	8,89	8,74	8,92
	6	8,43	8,57	8,59	8,79	8,8	8,87
	7	8,87	8,46	8,69	8,72	8,74	8,77
	8	8,64	8,34	8,57	8,26	8,61	8,66
	9	8,87	8,42	8,68	8,55	8,52	8,85
	10	8,98	8,54	8,53	8,79	8,97	8,95
2	0	7,6	7,81	7,3	7,21	7,13	7,1
	1	7,87	8,13	7,81	7,82	7,57	7,38
	2	8,39	8,34	8,37	8,26	7,61	7,46
	3	8,3	8,52	8,48	8,45	8,2	8,35
	4	8,45	8,54	8,54	8,43	8,57	8,69
	5	8,63	8,62	8,56	8,27	8,58	8,68
	6	8,49	8,71	8,71	8,96	8,46	8,58
	7	8,48	8,54	8,52	8,69	8,64	8,92
	8	8,62	8,53	8,58	8,83	8,55	8,87
	9	8,47	8,46	8,65	8,7	8,7	8,73
	10	8,64	8,62	8,56	8,84	8,74	8,91
3	0	8,6	8,1	8,13	8,11	8,23	8,32
	1	8,45	8,24	8,81	8,22	8,57	8,48
	2	8,25	8,37	8,48	8,46	8,91	8,96
	3	8,56	8,62	8,45	8,55	8,77	8,58
	4	8,76	8,64	8,54	8,65	8,89	8,93
	5	8,48	8,52	8,55	8,55	8,9	8,82
	6	8,46	8,61	8,63	8,98	8,78	8,86
	7	8,97	8,23	8,62	8,78	8,65	8,25
	8	8,56	8,45	8,88	8,76	8,24	8,77
	9	8,67	8,66	8,75	8,87	9,21	9,06
	10	9,04	9,01	9,2	9,3	9,14	9,31
Rerata	0	7,9	8,1	8,0	7,9	7,7	7,6
	1	8,2	8,3	8,4	8,2	8,1	8,1
	2	8,3	8,4	8,5	8,4	8,4	8,3
	3	8,4	8,6	8,5	8,4	8,5	8,5
	4	8,5	8,6	8,6	8,7	8,7	8,8
	5	8,6	8,6	8,6	8,6	8,7	8,8
	6	8,5	8,6	8,6	8,9	8,7	8,8
	7	8,8	8,4	8,6	8,7	8,7	8,6
	8	8,6	8,4	8,7	8,6	8,5	8,8
	9	8,7	8,5	8,7	8,7	8,8	8,9
	10	8,9	8,7	8,8	9,0	9,0	9,1



2. Data Pengamatan parameter Suhu

Ulangan	Lama Kultivasi	Kosentrasi Limbah <i>Whey</i> Tahu					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	0	25,8	26,5	26,9	26,7	26,3	26,1
	1	26,5	26,3	26,4	26,7	25,9	25,7
	2	27	27,4	27,2	26,9	27,1	26,9
	3	29	27,4	27,6	27,3	27,4	29,7
	4	27,8	26,4	27	27,4	26,8	27,6
	5	28,4	27,2	26,9	28,1	28,2	28,4
	6	27,2	27,3	27,4	27,1	27,5	27,5
	7	28	27,9	27,5	26,2	27,9	27,6
	8	27	27,4	27,3	27,6	27,5	27,6
	9	25,6	26,2	26	26,1	26,6	26,6
	10	28,8	27,3	27,9	28,5	28,5	28,8
2	0	26,1	26,3	26,4	26,7	25,9	25,7
	1	25,9	27,2	27,7	26,5	26,2	25,7
	2	26,1	27,2	25,7	27,2	27,2	27,5
	3	27	26,2	26	26,1	26,6	26,6
	4	26,2	24,6	26,2	23,9	23,6	23,1
	5	26	23,8	26,1	26,6	25	25,6
	6	27,9	22,3	21,6	24,3	22,5	23,3
	7	27,9	24,9	25,1	24,9	23,6	23,1
	8	23,1	23,7	22,7	22,4	23,8	24,5
	9	27,5	24,8	26,2	27,3	26,3	27,5
	10	25,4	26,1	24	25,3	24,9	25,3
3	0	26,2	24,1	25,4	27,2	25,2	26,3
	1	25,2	27,4	26,6	25,3	25,2	24,4
	2	24,5	26,5	24,7	26,4	26,3	25,6
	3	25,3	27,2	25,1	22,1	24,4	26,7
	4	24,6	24,3	24,6	26,6	24,6	24,3
	5	24,5	26,5	26,3	23,5	25,1	26,6
	6	25,4	23,3	24,2	27,2	27,3	27,4
	7	25,7	24,9	24,8	25,8	24,6	25,2
	8	26,4	24,1	22,4	24,4	22,3	26,3
	9	26,5	23,7	25,1	27,7	25,6	24,2
	10	27,1	25,9	26,1	25,2	23,5	23,3
Rerata	0	26,0	26,4	26,1	26,8	26,1	26,0
	1	26,1	26,3	26,1	25,2	26,7	26,1
	2	26,2	25,1	26,1	25,6	26,9	26,2
	3	26,0	25,1	26,7	26,0	25,9	26,3
	4	26,2	25,6	26,9	26,1	26,0	26,0
	5	26,3	25,8	25,9	26,2	26,2	26,1
	6	26,5	25,9	26,0	26,2	26,2	26,1
	7	26,8	26,4	26,2	26,3	26,4	26,1
	8	26,2	26,9	26,2	26,8	26,1	26,7
	9	26,2	26,0	26,4	26,9	26,2	26,9
	10	26,4	26,1	26,9	26,1	26,9	26,4

3. Data Pengamatan parameter DO

Ulangan	Lama Kultivasi	Kosentrasi Limbah <i>Whey</i> Tahu					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	0	6,95	6,4	6,96	6,54	6,67	6,08
	1	6,94	6,51	6,41	6,31	6,62	6,11
	2	6,62	6,91	6,74	6,41	6,7	6,04
	3	6,67	6,87	6,77	6,91	6,8	6,21
	4	6,33	6,71	6,46	6,6	6,78	6,47
	5	6,66	6,82	6,89	6,76	6,69	6,52
	6	6,62	6,58	6,59	6,87	6,55	6,56
	7	6,37	6,63	6,42	6,51	6,58	6,66
	8	6,4	6,52	6,32	6,42	6,33	6,35
	9	6,44	6,32	6,26	6,38	6,75	6,39
	10	6,54	6,92	6,59	6,45	6,27	6,3
2	0	6,5	6,63	6,42	6,51	6,58	5,66
	1	6,48	6,69	6,78	6,54	6,42	5,83
	2	6,84	6,72	6,56	6,45	6,34	5,91
	3	6,64	6,32	6,26	6,38	6,75	6,39
	4	6,82	6,88	6,71	6,09	6,33	6,22
	5	6,87	6,86	6,81	6,5	6,91	6,49
	6	6,85	6,34	6,39	6,32	6,21	6,32
	7	6,67	6,81	6,89	6,94	6,76	6,86
	8	7,17	6,92	6,78	6,85	6,99	6,55
	9	6,65	6,81	6,76	6,67	6,73	6,21
	10	6,82	6,57	6,66	6,84	6,86	6,43
3	0	6,59	6,33	6,87	6,51	6,58	5,66
	1	6,8	6,45	6,9	6,23	6,25	5,83
	2	6,62	6,92	6,7	6,56	6,67	5,89
	3	6,64	6,54	6,89	6,34	6,57	6,54
	4	6,82	6,43	6,67	6,78	6,33	6,56
	5	6,43	6,77	6,89	6,35	6,81	6,22
	6	6,6	6,98	6,52	6,33	6,67	6,32
	7	6,72	6,9	6,55	6,98	6,98	6,5
	8	6,89	6,92	6,92	6,85	6,66	6,58
	9	6,86	6,81	6,63	6,57	6,87	6,66
	10	6,78	6,54	6,66	6,34	6,94	6,89
Rerata	0	6,7	6,5	6,8	6,5	6,6	5,8
	1	6,7	6,6	6,7	6,4	6,4	5,9
	2	6,7	6,9	6,7	6,5	6,6	5,9
	3	6,7	6,6	6,6	6,5	6,7	6,4
	4	6,7	6,7	6,6	6,5	6,5	6,4
	5	6,7	6,8	6,9	6,5	6,8	6,4
	6	6,7	6,6	6,5	6,5	6,5	6,4
	7	6,6	6,8	6,6	6,8	6,8	6,7
	8	6,8	6,8	6,7	6,7	6,7	6,5
	9	6,7	6,6	6,6	6,5	6,8	6,4
	10	6,7	6,7	6,6	6,5	6,7	6,5

4. Data Pengamatan parameter Salinitas

Ulangan	Lama Kultivasi	Kosentrasi Limbah Whey Tahu					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	0	35	35	35	35	35	35
	1	35	35	35	36	35	35
	2	35	35	35	36	35	36
	3	37	36	36	35	36	38
	4	36	36	35	36	37	37
	5	37	36	36	35	37	38
	6	38	36	37	35	38	38
	7	38	37	38	36	38	38
	8	39	38	38	36	39	39
	9	40	40	40	38	40	40
	10	40	41	40	40	41	42
2	0	33	35	34	33	33	34
	1	30	35	35	35	32	31
	2	30	35	35	35	35	30
	3	31	35	35	36	34	30
	4	31	36	36	35	30	30
	5	35	35	35	38	35	32
	6	38	35	36	36	35	32
	7	38	35	36	38	35	33
	8	40	36	38	40	38	33
	9	42	42	43	41	39	32
	10	45	40	43	43	40	33
3	0	35	35	35	35	35	35
	1	34	35	35	35	34	35
	2	35	35	35	35	35	35
	3	34	34	35	34	34	34
	4	35	35	35	35	35	35
	5	35	35	35	35	34	35
	6	36	35	35	35	35	35
	7	37	35	35	36	36	36
	8	38	36	38	38	38	36
	9	40	42	40	40	39	38
	10	42	40	39	41	40	37
Rerata	0	34	35	35	34	35	34
	1	33	35	35	35	34	34
	2	33	35	35	35	35	34
	3	34	35	35	35	35	34
	4	34	36	35	35	34	34
	5	36	35	35	36	35	35
	6	37	35	36	35	36	35
	7	38	36	36	37	36	36
	8	39	37	38	38	38	36
	9	41	41	41	40	39	37
	10	42	40	41	41	40	37



5. Data Pengamatan parameter Kelimpahan sel

Ulangan	Lama Kultivasi	Kosentrasi Limbah <i>Whey</i> Tahu					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	0	0,49	0,43	0,48	0,42	0,46	0,5
	1	1,8	1,08	1,82	1,85	2,65	2,32
	2	2,02	2,18	2,2	2,29	4,23	6,32
	3	5,43	4	6,1	5,5	7,4	13,7
	4	7,52	5,07	7,91	8,6	11,45	16,23
	5	10,65	6,4	11	17	14,8	19,8
	6	13,17	12,3	10,4	19,4	20,94	25,1
	7	19,85	19,1	16,7	22,9	24,3	34,4
	8	16,78	22,5	23	24	30,2	37,9
	9	30,22	20,6	27,3	31,2	40,5	42,6
	10	27,9	19,6	28	30,2	39	45,88
2	0	0,28	0,32	0,23	0,27	0,37	0,49
	1	0,98	1,22	1,19	1,82	0,88	1,22
	2	2,23	4	5,45	5,24	8,83	2,85
	3	2,98	6,02	7,32	8,6	11,49	10,06
	4	6,2	7	7,6	12,4	15,8	19,3
	5	5,95	7,7	9,7	15,7	10	22
	6	8,1	9,6	11,8	17,9	19,5	21,3
	7	15,4	15,2	16,8	18,7	24,3	26,3
	8	24,7	19,6	17,1	29,1	35,9	38
	9	28	21,87	24,2	38,1	40,92	47,8
	10	26,1	20,03	27	39,49	41,5	48,21
3	0	0,44	0,49	0,42	0,42	0,46	0,52
	1	1,67	1,41	0,92	1,31	1,57	2,71
	2	2,23	1,44	2,09	2,32	3,23	5,5
	3	4,5	5,2	4,56	6,22	7,22	10,29
	4	7,91	7,9	7,23	9,4	10,1	15,24
	5	10	11,4	9,2	12,1	16,21	19,97
	6	9,2	15,8	12,43	18,7	22,11	27,4
	7	12,6	12,9	15,5	23,2	29,89	32,23
	8	18,45	18,24	24,9	27	35,78	40,5
	9	23,56	20,3	26,6	34,1	39	44,96
	10	27	19,1	26,98	33,4	39,98	46
Rerata	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
	1	1,5	1,2	1,3	1,7	1,7	2,1
	2	2,2	2,5	3,2	3,3	5,4	4,9
	3	4,3	5,1	6,0	6,8	8,7	11,4
	4	7,2	6,7	7,6	10,1	12,5	16,9
	5	8,9	8,5	10,0	14,9	13,7	20,6
	6	10,2	12,6	11,5	18,7	20,9	24,6
	7	16,0	15,7	16,3	21,6	26,2	31,0
	8	20,0	20,1	21,7	26,7	34,0	38,8
	9	27,3	20,9	26,0	34,5	40,1	45,1
	10	27,0	19,6	27,3	34,4	40,2	46,7

6. Data Pengamatan parameter Protein

Ulangan	Lama Kultivasi	Kosentrasi Limbah Whey Tahu					
		0%	10%	20%	30%	40%	50%
1	2	10,5	11,4	11,7	12,1	13	14
	4	14,6	12,3	15,6	16,7	18	21,2
	6	18	18,4	16,2	22	22,1	39,7
	7	21,6	17,3	27,5	39,7	36,8	43,7
	8	23,3	20,5	33,3	31,1	41,8	47,1
	9	44,5	30,5	37,4	40,4	52,7	56,1
	10	40	31,8	36,9	41,4	51	57
2	2	10,9	11,4	12,1	12,7	15,6	13
	4	15,8	17,8	18,7	19,6	18,2	18,1
	6	17,9	19,2	23	26,5	24,3	30,7
	7	25,1	24,8	26,1	33,2	34	35,8
	8	34,4	25,1	26,3	36,9	39,3	48,9
	9	36,6	22,1	33	47,7	50,5	57
	10	35,6	30,1	32	45,7	51	58
3	2	10,3	8,2	11,1	12,1	14,1	14,8
	4	17,2	17	17,6	18,9	20,6	24,1
	6	18,6	25	25,9	27,9	31,3	38,7
	7	23,8	21,5	37,2	32,3	39,2	45,8
	8	27	29,4	33,9	39,1	44,6	51,1
	9	36,3	38	34,6	43,3	45,4	54,5
	10	35	34	33	43,1	47	55
Rerata	2	10,57	10,33	11,63	12,30	14,23	13,93
	4	15,87	15,70	17,30	18,40	18,93	21,13
	6	18,17	20,87	21,70	25,47	25,90	36,37
	7	23,50	21,20	30,27	35,07	36,67	41,77
	8	28,23	25,00	31,17	35,70	41,90	49,03
	9	39,13	30,20	35,00	43,80	49,53	55,87
	10	36,87	31,97	33,97	43,40	49,67	56,67

7. Data Pengamatan parameter Konsumsi Nitrat

Penambahan Limbah (%)	Selisih Kandungan Nitrat			Rerata Selisih	Persen Konsumsi (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	1,53	1,51	1,50	1,51	79,6
10	0,52	0,43	0,41	0,45	49,3
20	1,25	1,24	1,27	1,26	68,2
30	2,27	2,29	2,17	2,24	81,0
40	3,26	3,18	3,20	3,22	87,3
50	4,33	4,26	4,31	4,30	93,3

Lampiran 9. Data Analisa Ragam dan Uji Lanjut (Tukey) terhadap Selisih Kelimpahan Sel

General Linear Model: Selisih Kelimpahan Sel Versus Perlakuan Penambahan Limbah

Factor	Type	Levels	Values
PERLAKUAN	fixed	6	0; 10; 20; 30; 40; 50
KELOMPOK	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for KELIMPAHAN SEL, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
PERLAKUAN	5	1292,34	1292,34	258,47	70,90	0,000
KELOMPOK	2	13,63	13,63	6,81	1,87	0,204
Error	10	36,46	36,46	3,65		
Total	17	1342,42				

S = 1,90936 R-Sq = 97,28% R-Sq(adj) = 95,38%

Unusual Observations for KELIMPAHAN SEL

Obs	KELIMPAHAN SEL	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
4	30,7800	34,3000	1,2729	-3,5200	-2,47 R
10	39,2200	35,7317	1,2729	3,4883	2,45 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

PERLAKUAN	N	Mean	Grouping
50	3	46,19	A
40	3	40,23	B
30	3	34,56	C
0	3	28,00	D
20	3	26,95	D
10	3	21,14	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 10. Data Analisa Ragam dan Uji Lanjut (Tukey) terhadap Selisih Protein (%)

General Linear Model: Kandungan Protein Versus Perlakuan Penambahan Limbah

Factor	Type	Levels	Values
PERLAKUAN	fixed	6	0; 10; 20; 30; 40; 50
KELOMPOK	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for PROTEIN, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
PERLAKUAN	5	1240,16	1240,16	248,03	20,67	0,000
KELOMPOK	2	10,43	10,43	5,22	0,43	0,659
Error	10	120,00	120,00	12,00		

Total 17 1370,59

S = 3,46404 R-Sq = 91,24% R-Sq(adj) = 85,12%
 Unusual Observations for PROTEIN

Obs	PROTEIN	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
14	38,0000	32,5889	2,3094	5,4111	2,10 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

PERLAKUAN	N	Mean	Grouping
50	3	56,67	A
40	3	50,23	A B
30	3	44,13	B C
0	3	39,13	C D
20	3	35,00	C D
10	3	33,30	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 11. Data Analisa Ragam dan Uji Lanjut (Tukey) terhadap Kandungan Nitrat

General Linear Model: Kandungan Nitrat Versus Perlakuan Penambahan Limbah

Factor	Type	Levels	Values
perlakuan	fixed	6	0; 10; 20; 30; 40; 50
kelompok	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for Kandungan Nitrat, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
perlakuan	5	29,4859	29,4859	5,8972	4361,11	0,000
kelompok	2	0,0086	0,0086	0,0043	3,18	0,085
Error	10	0,0135	0,0135	0,0014		
Total	17	29,5081				

S = 0,0367726 R-Sq = 99,95% R-Sq(adj) = 99,92%

Unusual Observations for Kandungan Nitrat

Obs	Kandungan Nitrat	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
10	2,28800	2,23022	0,02452	0,05778	2,11 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method

perlakuan	N	Mean	Grouping
50	3	4,2950	A
40	3	3,2173	B
30	3	2,2413	C
0	3	1,5133	D
20	3	1,2553	E
10	3	0,4543	F

Means that do not share a letter are significantly different

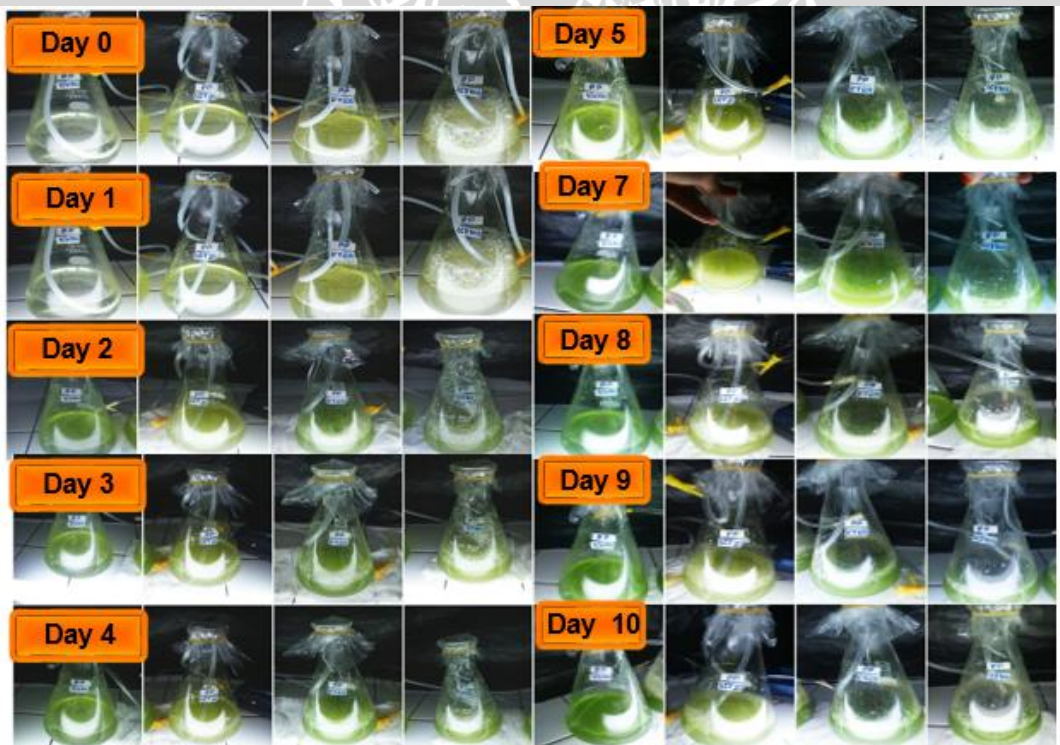
Lampiran 12. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Pengambilan Dan Penyaringan Limbah *Whey* Tahu Di Dusun Gedangan-Dampit



Pennyiapan dan kultivasi pembuatan stok kultur



Penelitian Pendahuluan Pada Rentang Penambahan Limbah 0%. 20%, 60%, 100%

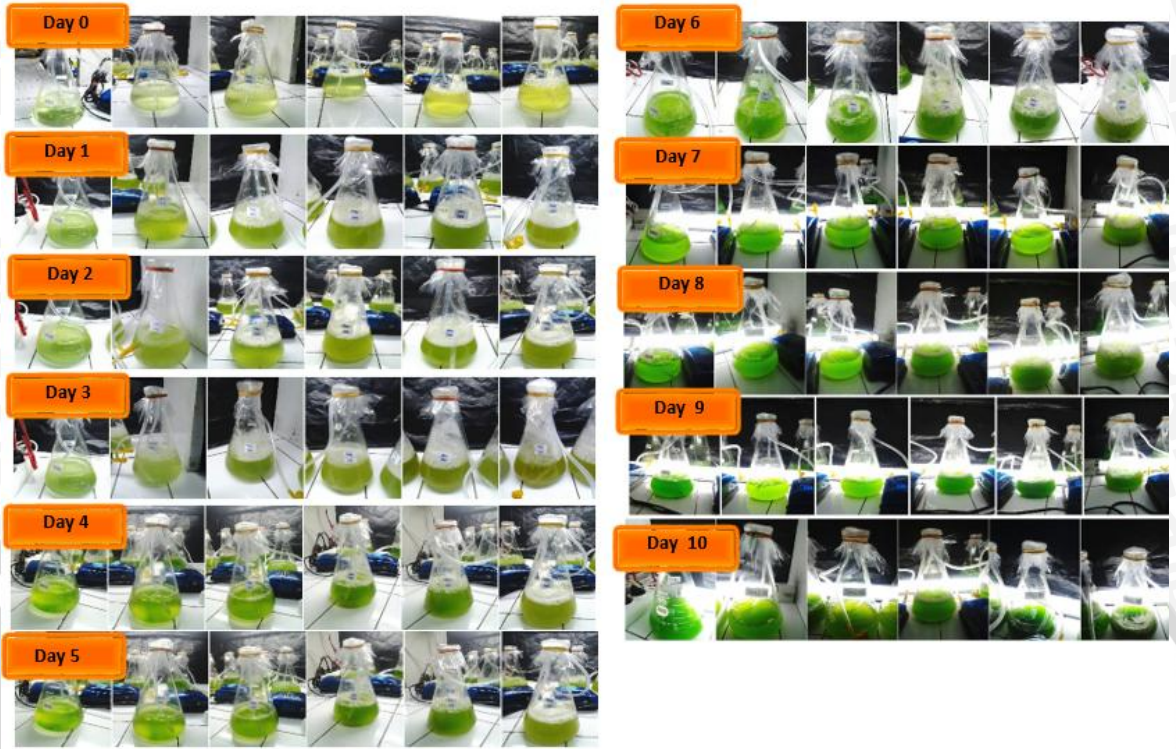


Proses Pengujian Protein

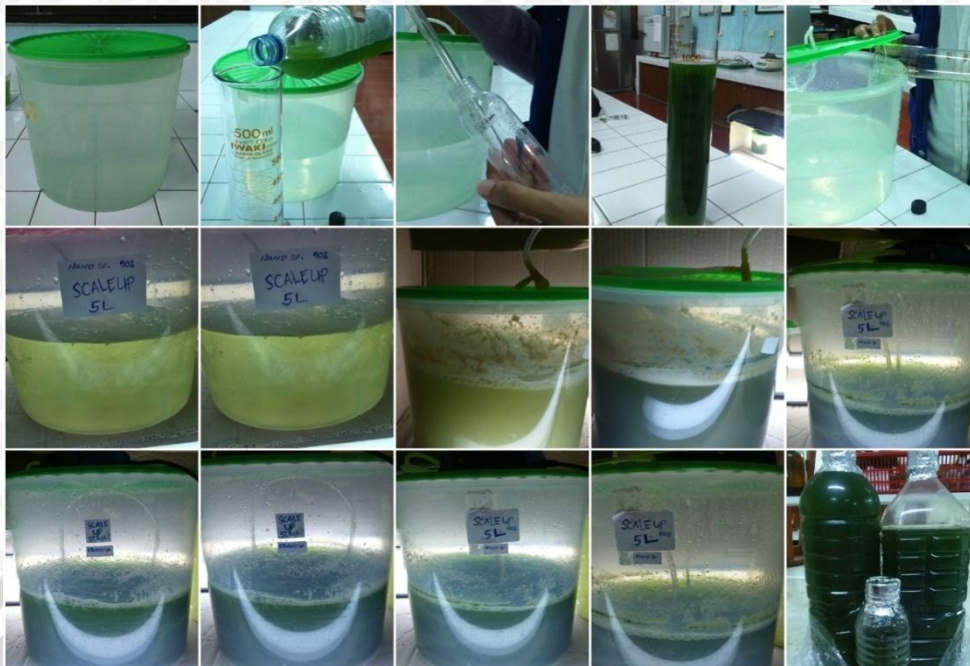


Penyiapan Media Dan Kultivasi Media Kultur

Kultivasi Media Pertumbuhan (Limbah *Whey* Tahu 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%)



Pemanenan Biomassa Mikroalga



Proses Scale Up 5L



Proses Produksi Biomassa Kering Mikroalga



Pengamatan Parameter Pertumbuhan (Ph, DO, Suhu, Salinitas Dan Kelimpahan Sel)