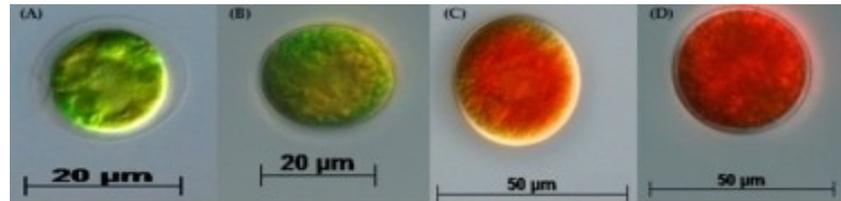


## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Mikroalga *Haematococcus pluvialis*

Mikroalga *H. pluvialis* adalah mikroalga uniseluler yang termasuk dalam alga hijau (*green algae*) kelas Chlorophyceae, memiliki flagela ganda (Biflagellate) terdapat pada habitat di air payau (Wayama dkk., 2013). Struktur Sel *H. Pluvialis* memiliki bentuk yang hampir sama dengan mikroalga hijau unicellular lainnya. Dari siklus hidup *H. pluvialis* terdiri dari 4 tipe yang di bedakan berdasarkan morfologi sel yaitu *macrozoid* (*zoospores*), *microzooids*, *palmella* dan *hematocysts* (*aplanospores/Cyst*) (Shah dkk., 2016). Tipe bentuk morfologi *macrozooids*, *microzooids* dan *palmella* masuk pada fase vegetatif hijau. *Hematocysts* atau *aplanospores* merupakan fase merah *nonmotile* yang mengakumulasi astaxanthin (Shah dkk., 2016). *macrozooids* memiliki ukuran 8- 20  $\mu\text{m}$  bentuk sel bulat, ellipsoidal, atau berbentuk seperti buah pir dengan dua flagela, memiliki ukuran sel panjang yang sama muncul dari ujung anterior, dan kloroplas berbentuk seperti cangkir dengan banyak pirenoid sebagai tempat cadangan makanan, yang tersebar (Gambar 1A) (Shah dkk., 2016). Sel-sel vegetatif yang tumbuh cepat dengan flagel akan bertambah banyak di bawah kondisi kultur yang menguntungkan pada tahap pertumbuhan vegetatif awal. *macrozoid* dapat membelah menjadi 2–32 sel anak melalui mitosis (Wayama dkk., 2013).

Dalam kondisi stress lingkungan, *macrozooids* dapat kehilangan flagela, memperbesar ukuran selnya dan mulai membentuk struktur yang berlapis-lapis di bagian dalam matriks ekstraseluler atau dinding sel primer saat mereka berkembang menjadi palmella (Gambar 1B) dan menjadi sel vegetatif yang berhenti membelah (Shah dkk., 2016). Bila stress lingkungan ini berlanjut maka sel akan berubah dari bentuk palmella (Gambar 1C) menjadi aplanospore (Gambar 1D) yang bersifat aseksual, bentuk sel aplanospora mengandung dua struktur yang berbeda yaitu struktur dinding trilaminar yang tebal dan kaku, yang kedua struktur dinding sel sekunder tahan asetolisis sehingga sel-sel tersebut menjadi tahan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim (Shah dkk., 2016). Aplanospora dewasa; mengakumulasi astaxanthin, yang disimpan di sitoplasma, sehingga menghasilkan warna merah cerah (Shah dkk., 2016). Pada saat kondisi kultur kembali optimal, aplanospora merah dapat germinasi untuk membentuk *zoospora flagellated* untuk memulai siklus pertumbuhan vegetatif baru. Selama gametogenesis, sel aplanospora dapat menghasilkan gamet sampai 64 gamet yang dikenal sebagai *microzooid*. Ukuran *microzooid* lebih kecil ( $<10 \mu\text{m}$ ) dibandingkan dengan *palmella* dan *aplonospore* (20–50  $\mu\text{m}$ ) (Butler dkk., 2017; Butler dkk., 2017; Shah dkk., 2016).



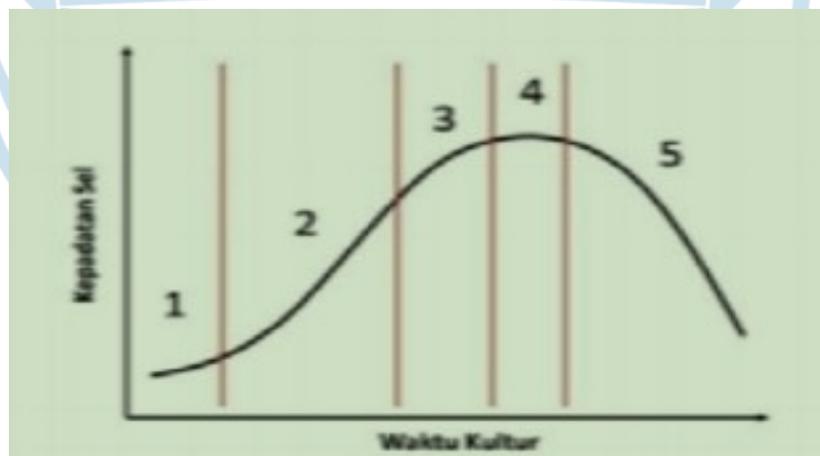
Gambar 1. Morfologi fase *Haematococcus pluvialis* (A) *Macrozooid* hijau. (B) *Palmella* (C) *Palmelloid* tahap akhir dan (D) Fase *aplanospores* (Sumber: Butler dkk., 2017).

## B. Fase Pertumbuhan

Pertumbuhan mikroalga secara umum terbagi menjadi; fase lag (adaptasi), fase log (pertumbuhan), fase stasioner dan fase kematian (Kawaroe, 2010). Fase lag merupakan fase penyesuaian sel pada lingkungan, sel mengalami defisiensi enzim, sehingga harus terjadi proses sintesis agar dapat mendukung berlangsungnya aktivitas biokimia sel (Brock dan Madigan, 2018). Fase log atau eksponensial ini di tandai meningkatnya grafik pertumbuhan, mikroalga aktif membelah sehingga laju pertumbuhan meningkat seiring dengan pertumbuhan jumlah sel mikroalga, mikroalga aktif berfotosintesis untuk menghasilkan protein dan komponen-komponen penyusun plasma sel yang di butuhkan dalam pertumbuhan (Kawaroe, 2010). Fase penurunan pertumbuhan, fase ini masuk kedalam titik puncak eksponensial menuju fase lanjut (Kawaroe, 2010). Fase ini terjadi karena pertumbuhan sel berkurang salah satunya nutrisi yang dipakai untuk pertumbuhan sel mikroalga berkurang (Kawaroe, 2010). Hal ini dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara jumlah sel mikroalga yang terus bertambah dan ketersediaan unsur hara sebagai sumber makanan sel terus

berkurang karena terjadi kompetisi dalam kultur dimana mikroalga yang mendapatkan sumber makanan dapat bertumbuh (Awaliyah dkk., 2019). Penurunan kecepatan pertumbuhan dapat terjadi juga karena bahan penghambat (*inhibitor*) yang terakumulasi hasil metabolisme sel alga (Gunawan, 2010).

Fase stasioner ditandai kurva grafik pertumbuhan mendatar, dikarenakan habisnya nutrisi sehingga mikroalga tidak dapat melakukan pertumbuhan namun mikroalga juga tidak mengalami kematian. Fase terakhir merupakan fase kematian ditandai penurunan grafik pada kurva pertumbuhan mikroalga adalah fase mikroalga tidak memiliki ketahanan hidup pada fase stasioner (Kawaroe, 2010). Gambaran pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 2.

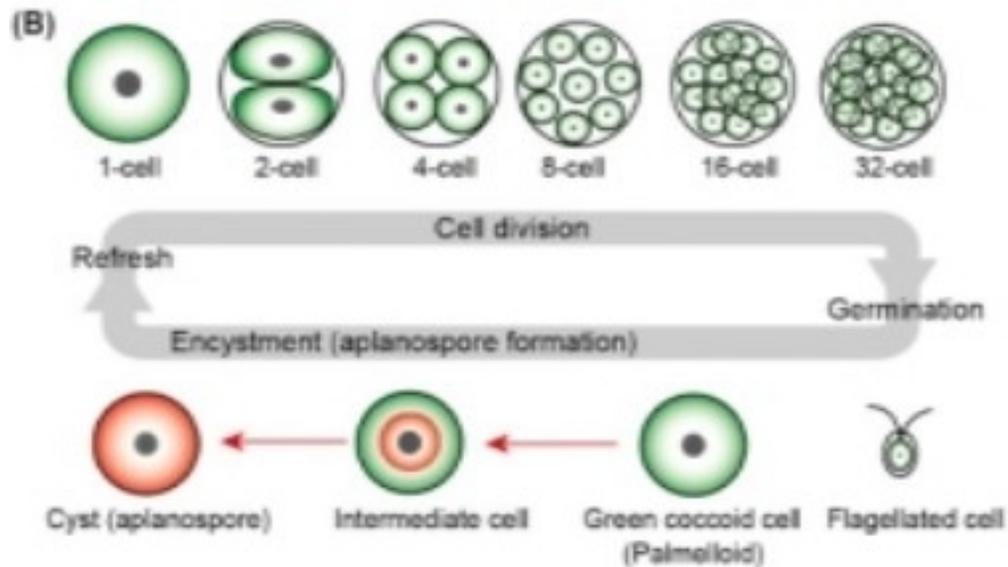


Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Mikroalga (Sumber: Marufatin A., 2016)

Menurut Muzaki dkk. (2008), secara umum mikroalga *H. pluvialis* memiliki 5 fase yaitu (1) fase pertama merupakan sel dengan biflagela dengan pertumbuhan cepat dan aktif bergerak; (2) Fase kedua ditandai flagela lepas dan tumbuh; (3) Fase ketiga ditandai sel induk mengalami pembelahan vegetatif

dengan menghasilkan sel baru yang di lengkapi flagela dan sel tumbuh secara kontinu, terbentuk dinding multilayer pada sel induk; (4) Bila sel hidup dalam kondisi menguntungkan maka akan lanjut ke fase keempat sel baru dilepas dari sel induk dan berlanjut ke siklusnya, namun bila sel hidup dalam kondisi *stress*; (5) Fase kelima sel akan berhenti membelah dan membentuk *cyste (aplanospore)* dengan di tandai penebalan dinding sel yang membesar dan berubah warna menjadi merah karena terbentuknya astaxanthin (Muzaki dkk., 2008). Tiga fase akumulasi Astaxanthin berlangsung selama 10 hari (4 hari fase hijau motil *macrozoid* dan 6 hari dari fase *palmelloid* hingga fase *cyste/aplanospore* (Butler dkk., 2017).

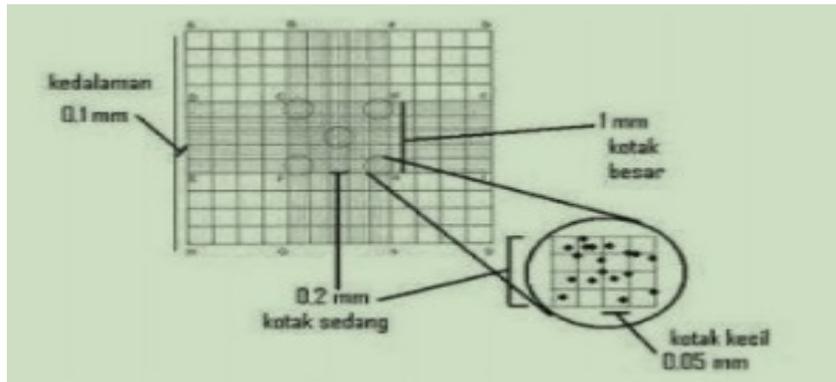
Fase *macrozoid* dan *palmella* merupakan fase vegetatif hijau (Muzaki dkk., 2008, Shah dkk., 2016). Fase *macrozoid* merupakan fase hijau yang masuk ke dalam fase lag hingga fase stasioner, bila stress kultur akan masuk ke fase merah yaitu fase *palmelloid*, pada sel mengalami stress intensitas cahaya dan kekurangan nutrisi pada fase stasioner (Han dan Hu, 2013). Dalam kondisi stres *macrozooids* memperluas ukuran selnya dan kehilangan flagel. Dengan tekanan lingkungan yang terus berlanjut (kekurangan nutrisi, radiasi cahaya dan salinitas yang tinggi) pembelahan sel terhenti dan *palmella* berubah menjadi *palmelloid* hingga *aplanospore* (Shah dkk., 2016). Fase *aplanospores* adalah fase sel dengan dinding sel alginan tebal, sel menjadi sangat merah, akumulasi lipid yang mengandung astaxanthin mengisi seluruh sitoplasma sel (Levine dan Fleurence, 2018) (Gambar 3).



Gambar 3. Siklus Hidup *Haematococcus pluvialis* (Sumber: Levine dan Fleurence, 2018).

Aplanospora dewasa mengakumulasi karotenoid sekunder dalam jumlah yang besar, terutama astaxanthin (Shah *et al.*, 2016). Begitu kondisi lingkungan kembali optimal suhu 25°C pH 7 – 8,2 ( Huber dan Blaha, 2016; Iwaliyah dkk., 2016), aplanospora berkecambah membentuk zoospore yang berflagel untuk memulai pertumbuhan vegetatif baru (Gambar 3) (Shah *et al.*, 2016).

Menurut Satyantini dkk. (2012), analisis jumlah sel dapat menggunakan *Haemocytometer* dengan metode *Small Box*. Metode ini dilakukan dengan menghitung sel dilakukan dengan dihitung 5 kotak pada kotak tengah dan masing-masing kotak kecil dihitung sel yang terdapat dalam setiap kotak, dari sisi kiri sampai sisi kanan seperti Pada Gambar 4 ( Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).



Gambar 4. Pembacaan Pada Haemacitometer (Sumber: Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Perhitungan jumlah sel mikroalga dapat dihitung menggunakan rumus Kerapatan (K) (Satyantini dkk., 2012).

$$K = \frac{\text{Jumlah kelima Kotak (A, B, C, D dan E)}}{(5 \times 4 \times 10^{-6})}$$

Diketahui:

K = Kerapatan sel (sel/ml)

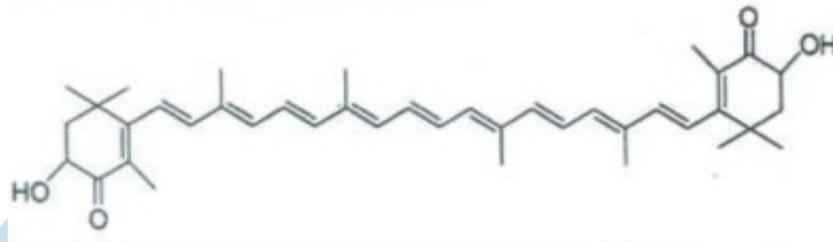
5 = Jumlah Kotak

$4 \times 10^{-6}$  = Luas kotak kecil

### C. Astaxanthin, Manfaat dan Faktor Pemicu

Menurut Nurdianti dkk. (2017), astaxanthin merupakan karotenoid alami yang tergolong antioksidan kuat, termasuk kelompok *Xantofil*. Menurut Witono dkk. (2018), astaxanthin memiliki warna merah terang dari keluarga yang sama dengan likopen, lutein, dan  $\beta$ -karoten. Astaxanthin juga bersifat larut lemak yang disintesis oleh tanaman dan sebagian jenis alga (Nurdianti dkk., 2017). Astaxanthin memiliki struktur (Gambar 5) kimia  $C_{40}H_{52}O_4$ , 3, 3-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4, 4-dione (Molino dkk., 2018). Astaxanthin juga terdapat pada

ikan salmon, ikan *trout*, ikan *breem* laut merah, udang, lobster, dan telur ikan (Witono dkk., 2018).



Gambar 5. Struktur Astaxanthin ( Sumber: Ciapara dkk., 2006).

Menurut Guerin dkk., (2003), proses astaxanthin dicerna dalam tubuh dimulai dari penyerapan dan transportasi karotenoid dalam plasma darah. Dalam transport plasma darah, karotenoid non-polar seperti betakaroten, a-karoteneorlycopene, ditransportasikan oleh lipoprotein densitas sangat rendah (VLDL), lipoprotein densitas rendah (LDL) ataupun berikatan dengan karotenoid polar, sementara karotenoid polar, seperti zeaxantin atau lutein, ditransportasi oleh lipoprotein densitas rendah (LDL) dan lipoprotein densitas tinggi (HDL) (Guerin dkk., 2003).

Astaxanthin memiliki beberapa manfaat bagi kesehatan seperti untuk kesehatan kulit, fotoprotektan, kesehatan mata, kesehatan jantung, detoksifikasi dan fungsi liver, respon imun dan antikanker (Guerin dkk., 2003). Astaxanthin juga sebagai antioksidan, dapat menyerap energi tereksitasi dari rantai oksidasi oksigen karotenoid, menyebabkan degradasi molekul karotenoid tetapi mencegah kerusakan pada molekul atau jaringan lain,

mencegah produksi reaksi berantai radikal bebas yang disebabkan oleh degradasi asam lemak tak jenuh ganda dan mempercepat degradasi membran lipid (Guerin dkk., 2003). Astaxanthin sangat baik melindungi *membrane fosfolipid* dan lipid lain terhadap peroksidasi lipid (Guerin dkk., 2003). Sebagai fotoprotektan astaxanthin melindungi paparan sinar UV terhadap senyawa lipid dan jaringan sel dapat menyebabkan produksi oksigen singlet dan radikal bebas serta kerusakan foto-oksidatif lipid dan jaringan (Guerin dkk., 2003). Senyawa karotenoid memiliki peran penting dalam melindungi jaringan terhadap foto-oksidasi yang disebabkan oleh sinar UV. Astaxanthin memiliki kemampuan lebih efektif daripada betakaroten dan lutein dalam mencegah fotooksidasi cahaya-UV dari lipid (Guerin dkk., 2003).

Mikroalga *H. pluvialis* dapat mensintesis dan mengakumulasi senyawa metabolit sekunder berupa antioksidan kuat yaitu astaxanthin (Butler dkk., 2017). Senyawa ini diproduksi oleh *H. pluvialis* yang hidup dalam kondisi *stress* (Butler dkk., 2017). Radiasi UV dapat mempengaruhi induksi produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada beberapa mikroalga pada panjang gelombang UV 320-400 nm (UV-A) dan panjang gelombang 280-315 nm (UV-B), namun mikroalga memiliki dua jenis antioksidan yang diproduksi untuk mengurangi dampak reaksi *stress* oksidatif ROS akibat paparan UV (Iwalyah dkk., 2019). Antioksidan yang berperan yaitu antioksidasi enzimatis seperti *catalase* (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx), superoksida dismutase (SOD) dan antioksidan non-enzimatis seperti flavonoid dan karotenoid

(Iwalyah dkk., 2019). Faktor lain yang memengaruhi produksi astaxanthin adalah nutrisi dalam medium pertumbuhan mikroalga *H. pluvialis* (Prihantini dkk., 2007), komposisi nutrisi yang lengkap dan konsentrasi nutrisi yang tepat menentukan produksi biomassa dan kandungan gizi mikroalga.

Mikroalga *H. pluvialis* dapat mengakumulasi hasil sintesis astaxanthin sebesar >30 gram per kg berat kering (Butler dkk., 2017). Faktor yang memengaruhi produksi astaxanthin adalah kurangnya nutrisi, irradiasi foton, penurunan salinitas dan kondisi suhu ekstrim. Produksi astaxanthin pada *H. pluvialis* secara alami diproduksi pada fase *aplanospores* dengan induksi pada keadaan tertentu seperti lingkungan terbatas nutrisi dan intensitas cahaya yang tinggi. Pada penyinaran UV B 90 menit dengan penambahan BHT dapat mengakumulasi astaxanthin 0,745 mg/L - 0,916 mg/L (Muzaki dkk., 2008; Iwalyah dkk., 2019). Penelitian Muzaki dkk. (2008), memperlihatkan intensitas penyinaran 5.000 lux dapat menginduksi pembentukan astaxanthin selama 20 hari.

Pada penelitian Evens dkk. (2008), efek suhu ekstrim dan irradiasi cahaya dapat memengaruhi pertumbuhan dan proses produksi astaxanthin pada suhu 14 - 28°C dengan iradiasi 30 - 200  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Menurut Borowitzka dkk. (1991), konsentrasi nitrat dan fosfat paling optimal dalam pertumbuhan *H. pluvialis* yaitu dengan konsentrasi nitrat 0,5-1,0  $\text{g l}^{-1} \text{KNO}_3$  dan konsentrasi fosfat 0,1  $\text{g l}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$ , bila kondisi pertumbuhan *H.*

*pluvialis* rendah akan kadar nitrat atau tinggi kadar fosfat maka akan menginduksi pembentukan sel *palmelloid* dan fase *aplanospores* (fase merah). Penurunan suhu atau penambahan NaCl (salinitas) juga dapat menginduksi pembentukan sel *palmella* dan *aplanospores*. Mikroalga *H pluvialis*, juga tidak dapat tumbuh pada suhu di atas suhu 28 °C dengan salinitas di atas 1% w/v NaCl (Borowitzka dkk., 1991).

#### **D. Medium Pertumbuhan**

Media kultur adalah faktor penting untuk dalam industri kultivasi mikroalga. Menurut Prihantini dkk. (2007), media kultur mikroalga mengandung nutrisi pertumbuhan seperti makronutrien dan mikronutrien. Komposisi nutrisi yang lengkap dengan konsentrasi nutrisi yang optimal dapat memengaruhi jumlah biomassa dan kualitas kandungan gizi pada mikroalga. Menurut Prihantini dkk. (2007), media kultivasi mikroalga yang dibagi menjadi dua yaitu media sintetik dan media alami. Medium sintetik umumnya terdiri dari senyawa-senyawa kimia yang komposisi dan jumlahnya telah ditentukan, contoh medium sintetik adalah medium *Basal bold* (MBB) dan medium *Walne* (Prihantini dkk., 2007). Medium *basal bold* adalah media yang umum digunakan dalam kultivasi mikroalga jenis Chlorophyta, sedangkan Media *Walne* merupakan media yang digunakan dalam kultivasi mikroalga secara umum (Putra dkk., 2015). Media *Walne*

mengandung unsur Nitrogen dari ( $\text{NaNO}_3$ ) sebanyak 100,009 g/l dan Unsur Phospor dari ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) sebanyak 20 g/L (Trikuti dkk., 2016).

Media alami adalah media tumbuh mikroalga yang dibuat dari bahan-bahan alami, media alami terdapat juga pada limbah yang dihasilkan dari pembuatan suatu produk, seperti limbah kacang kedelai, limbah minuman teh, limbah cair tahu dan pembuatan tepung tapioka. Salah satu medium alami yang dapat digunakan dalam kultivasi mikroalga adalah medium ekstrak taube (Prihantini dkk., 2007).

Kecambah kacang hijau atau taube kacang hijau merupakan jenis sayuran yang mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik, taube kacang hijau mengandung makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino, serta gula yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga (Prihantini dkk., 2007). Susunan morfologi kecambah kacang hijau atau taube kacang hijau terdiri dari akar, batang, daun, bunga dan biji, semakin banyak nodula akar semakin tinggi unsur N yang terdapat pada taube sehingga dapat menyuburkan tanah (Rukmana, 1997). Berikut pada Tabel 1 merupakan kandungan gizi dari 100 gram berat kering taube (Persagi, 2009).

Tabel 1. Kandungan gizi tauge (Kecambah kacang hijau) per 100 gram berat kering.

No.	Zat Gizi	Jumlah
1.	Kalori	345 gram
2.	Karbohidrat	44,79 gram
3.	Protein	38,54 gram
4.	Lemak	12,5 gram
5.	Serat	11,46 miligram
6.	Kalsium	1729,17 miligram
7.	Fosfor	770,83 miligram
8.	Nirogen	3,84 gram
9.	Besi	8,33 miligram
10.	Karoten	208,33 mikrogram
11.	Thiamin	0,94 miligram
12.	Riboflavin	1,56 miligram
13.	Niasin	11,46 miligram
14.	Vitamin C.	52,08 miligram

#### E. Ekstraksi dan Pelarut

Pengekstraksian astaxanthin digunakan metode maserasi dengan pelarut Dimetil sulfoksida *sucking progress methods* (Iwaliyah, dkk., 2019). Dimetil sulfoksida (DMSO) adalah jenis pelarut aprotik yang dapat mengikat hidrogen, dapat melarutkan senyawa nonpolar dan polar, tidak memiliki warna, bau dan hidroskopik (Handayani dan Kautsar, 2018; Iwaliyah dkk., 2019). DMSO dapat meningkatkan permeabilitas sel *H. pluvialis* dan berpenetrasi dengan baik tanpa merusak dinding sel (Wang dkk., 2018). Spektrofotometri merupakan metode analisis yang didasari pada serapan sinar monokromatis yang disalurkan pada larutan berwarna dengan panjang gelombang spesifik (Bernadeta dkk., 2012). Metode analisis astaxanthin yang

digunakan adalah spektrofotometri dengan panjang gelombang 490 nm (Liu, 2018). Berikut rumus perhitungan astaxanthin:

$$C_{\text{astaxanthin}} (\text{mg/L}) = 4.5 \times A_{490} \times V_a/V_b$$

Keterangan:

A<sub>490</sub> = Panjang gelombang 490 nm

V<sub>a</sub> = Volume ekstraksi.

V<sub>b</sub> = Volume sampel.

Kalium hidroksida KOH merupakan basa yang lebih kuat dibanding natrium hidroksida (Azhar dkk., 2010). Metanol merupakan pelarut universal yang digunakan untuk melarutkan senyawa ekstrak polar atau non polar (Astarina dkk., 2013). Variasi KOH dan metanol dapat digunakan untuk melarutkan *chlorophyl* pada saat ekstraksi astaxanthin (Liu, 2018). *Aquadest* digunakan untuk membilas senyawa alkali yang tersisa setelah proses ekstraksi astaxanthin berlangsung (Liu, 2018).

## F. Hipotesis Penelitian

1. Medium ekstrak taube (MET) dapat meningkatkan pertumbuhan mikroalga *Haematococcus pluvialis* dengan konsentrasi optimal sebesar 4 % dan meningkatkan pertumbuhan *Haematococcus pluvialis* dengan jumlah 4.000.000 sel/ml.
2. Waktu optimal radiasi UV dalam memproduksi pigmen astaxanthin tertinggi adalah 3 jam.