

Pengaruh Sumber Fosfat Terhadap Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Yang Dikultur Bersama Bakteri Penghasil *Indole-3-Acetic Acid*

Lintang Guritno Cucu Wijaya¹⁾, Sitoresmi Prabaningtyas^{2*)}

^{1,2)}Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang No. 5 Malang, Jawa Timur, Indonesia

*Corresponding author: sitoresmi.prabaningtyas.fmipa@um.ac.id

ABSTRAK

Kebutuhan sumber energi di Indonesia terus mengalami peningkatan, pada tahun 2018 Indonesia merupakan negara dengan konsumsi energi sekitar 114 *Million Tons of Oil Equivalent* (MTOE). Oleh karena itu, diperlukan energi alternatif dari biomassa seperti biodiesel. *Chlorella vulgaris* merupakan mikroba yang cocok untuk energi alternatif karena mengandung lipid hingga 80%. *Chlorella vulgaris* membutuhkan fosfor untuk pertumbuhan sel dari pupuk untuk produksi *Adenosine Triphosphate* (ATP). Selain fosfor, *co-culture* dengan bakteri penghasil *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) dapat meningkatkan pertumbuhan *C. vulgaris*. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh sumber fosfat terhadap pertumbuhan *C. vulgaris* yang dikultur bersama bakteri penghasil IAA. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan kultur bersama *C. vulgaris* dan bakteri penghasil IAA dengan sumber fosfat yang berbeda pada medium Gusrina selama 27 hari. Perlakuan terdiri dari perlakuan A (kontrol), B penambahan *Triple Super Phosphate* (TSP), dan C penambahan *Super Phosphate-36* (SP-36) Pertumbuhan sel dihitung menggunakan metode ruang hitung *Petroff-Hausser* yang dilanjutkan dengan uji ANOVA. Pertumbuhan sel tertinggi diperoleh pada perlakuan B (TSP), diikuti dengan perlakuan C (SP-36), dan terakhir perlakuan A (kontrol). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan sumber fosfat berpengaruh terhadap pertumbuhan *C. vulgaris* dengan jumlah sel tertinggi terdapat pada perlakuan B (TSP) sebesar $2,66 \times 10^6$ sel/mL.

Kata kunci: *Chlorella vulgaris*; *co-culture*; fosfor

Effect of Phosphate Source on Growth of *Chlorella vulgaris* Cultured with Indole-3-Acetic Acid-Producing Bacteria

ABSTRACT

The need for energy sources in Indonesia continues to increase, in 2018 Indonesia is a country with energy consumption of around 114 *Million Tons of Oil Equivalent* (MTOE). Therefore, alternative energy from biomass such as biodiesel is needed. *Chlorella vulgaris* is a microbe suitable for alternative energy because it contains up to 80% lipids. *Chlorella vulgaris* needs phosphorus for cell growth from fertilizer for the production of *Adenosine Triphosphate* (ATP). In addition to phosphorus, *co-cultures* with IAA-producing bacteria can promote the growth of *C. vulgaris*. This study was conducted to evaluate the influence of phosphate sources on the growth of *C. vulgaris* cultured with IAA-producing bacteria. This study was carried out by *co-culture* *C. vulgaris* and IAA-producing bacteria with different phosphate sources on Gusrina medium for 27 days. The treatment consisted of treatment A (control), B *Triple Super Phosphate* (TSP), and C *Super Phosphate-36* (SP-36). Cell growth was calculated using the *Petroff-Hausser* counting chamber method followed by the ANOVA test. The highest cell growth was obtained in treatment B (TSP), followed by treatment C (SP-36), and finally treatment A (control). The results showed that the addition of phosphate sources had an effect on the growth of *C. vulgaris* with the highest number of cells found in treatment B (TSP) of $2,66 \times 10^6$ cells/mL.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; co-culture; phosphorus

(Article History: Received 09-09-2024; Accepted 17-10-2024; Published 17-10-2024)

PENDAHULUAN

Kebutuhan sumber energi di Indonesia terus mengalami peningkatan dan pada tahun 2018 Indonesia merupakan negara dengan konsumsi energi sekitar 114 *million tons of oil equivalent* (MTOE) dengan rincian sektor transportasi 40%, sektor industri 36%, rumah tangga 16%, komersial 6%, dan lain-lain 2% (Tim Sekretaris Jenderal Dewan Energi Nasional, 2019). Banyaknya konsumsi energi mengakibatkan cadangan energi fosil di Indonesia semakin berkurang. Minyak bumi yang ada di Indonesia diprediksi akan habis dalam 10 hingga 15 tahun lagi jika tingkat konsumsi terus meningkat (Hindarti & Ayuningtyas, 2020).

Kebutuhan energi yang terus meningkat dengan waktu produksi minyak bumi yang memerlukan waktu yang lama mengakibatkan krisis yang serius. Energi alternatif yang sangat berpotensi sebagai pengganti bahan bakar fosil berasal dari biomassa mikroorganisme yang diolah menjadi biodiesel. Biodiesel adalah bahan bakar mirip minyak diesel yang diperoleh dari minyak nabati dan hewani (Hindarti & Ayuningtyas, 2020). Selain dapat diperbarui karena berasal dari minyak nabati maupun hewani, biodiesel merupakan sumber energi ramah lingkungan karena tidak beracun, mudah terurai, dan menghasilkan emisi yang lebih rendah dibandingkan dengan minyak bumi pada saat dibakar (Hindarti & Ayuningtyas, 2020).

Mikroalga adalah salah satu mikroorganisme penghasil asam lemak dan lipid yang cocok sebagai bahan baku diesel karena jumlah lipidnya dapat mencapai 80% serta sifatnya yang menyerupai minyak nabati (Elystia *et al.*, 2019). Selain itu, mikroalga memiliki pertumbuhan sel yang cepat karena memiliki waktu generasi yang singkat dan tidak memerlukan tempat kultivasi yang luas (Nasution *et al.*, 2021). Mikroalga merupakan mikroba uniseluler dengan struktur sederhana, berukuran mikroskopis yang hidup di air tawar dan air laut (Noerdjito, 2019). Mikroalga dapat berfotosintesis dengan mengolah CO₂, H₂O, dan mineral untuk pertumbuhan sel dalam menghasilkan biomassa.

Chlorella vulgaris masuk dalam kelas *Chlorophyceae* yang memiliki kandungan bahan organik yang tinggi, seperti lemak, protein, vitamin, dan berbagai nutrisi lainnya (Basar *et al.*, 2019). *C. vulgaris* dapat menghasilkan lipid sebesar 5-40% per berat kering biomassa dalam kondisi pertumbuhan optimal dan sebagian besar terdiri dari glikolipid, lilin, hidrokarbon, fosfolipid, dan sejumlah kecil asam lemak bebas (Safi *et al.*, 2014). *C. vulgaris* hanya memiliki kloroplas tunggal yang tersusun dari fosfolipid dan terdiri dari dua membran. Membran pertama permeabel terhadap metabolit dan ion tertentu, sedangkan membran kedua sangat selektif dan berfungsi untuk mengangkut protein (Coronado-Reyes *et al.*, 2022).

Chlorella vulgaris memerlukan zat hara sebagai nutrisi untuk proses pertumbuhan dan perkembangan sel. Zat hara adalah salah satu unsur penting dalam pertumbuhan mikroalga bersama dengan suhu, cahaya, pH, dan salinitas. Fosfor dalam sel mikroalga berperan dalam pembelahan sel dan mempertahankan populasi mikroalga. Kekurangan nitrogen atau fosfor pada proses kultur mikroalga bisa menghambat produksi biomassa. Jika kandungan nitrogen dan fosfor dalam medium habis, populasi mikroalga akan menurun

karena adanya proses penurunan metabolisme (Andriani *et al.*, 2023). Fosfor pada media kultur merupakan nutrisi yang penting setelah nitrogen bagi pertumbuhan mikroalga, oleh karena itu mikroalga harus mampu menyerap fosfor untuk proses metabolisme. Fosfor merupakan unsur penting dalam penyusunan *Adenosine Triphosphate* (ATP) untuk proses seluler yang berkaitan dengan transfer energi dan selanjutnya dimanfaatkan dalam proses fiksasi CO₂ (Maizatul *et al.*, 2021).

Sumber fosfor untuk mikroalga dapat dilakukan dengan menambahkan pupuk. Pupuk merupakan material yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi pada media tanam budidaya dengan kandungan bahan organik untuk pupuk organik dan bahan anorganik untuk pupuk anorganik (Andriani *et al.*, 2023). Pupuk alami bisa dipakai untuk proses kultur *Chlorella*. Pemberian pupuk harus sesuai dengan skala kultur mikroalga, karena pemberian pupuk yang kurang atau berlebih akan memperlambat proses seluler mikroalga. Pemberian nutrisi berlebih dalam media kultur akan bersifat *toxic* dan memperlambat pertumbuhan. Penambahan fosfor yang semakin banyak pada media kultur akan meningkatkan tingkat kekeruhan, sehingga fosfat pada media tidak dapat digunakan (Mutia *et al.*, 2021). Semakin keruh media kultur semakin rendah penyerapan cahaya, sehingga menyebabkan terganggunya proses fotoautotrof dari mikroalga. Jenis pupuk yang dapat meningkatkan pertumbuhan mikroalga yaitu *Triple Super Phosphate* (TSP) dan pupuk *Super Phosphate-36* (SP-36).

Pupuk *Triple Super Phosphate* (TSP) merupakan pupuk anorganik dengan kandungan fosfor sebanyak 45%. Pupuk TSP efektif dalam meningkatkan kandungan P pada tanah yang kekurangan fosfat (Fauzan *et al.*, 2021). TSP merupakan pupuk anorganik dengan kandungan senyawa fosfat yang banyak. Pupuk TSP ini bisa digunakan sebagai makronutrien untuk mendukung pertumbuhan mikroalga (Fathurohman *et al.*, 2022). Pupuk TSP dapat memacu peningkatan pertumbuhan mikroalga karena mengandung fosfor. Populasi *Chlorella vulgaris* paling optimal terjadi pada penggunaan pupuk TSP dengan jumlah sel $2,62 \times 10^7$ sel/mL selanjutnya pada penggunaan pupuk ZA sebesar $1,08 \times 10^7$ sel/mL dan terakhir pupuk *walne* sebesar $4,14 \times 10^6$ sel/ml (Fauzan *et al.*, 2021).

Pupuk SP-36 adalah pupuk anorganik yang memiliki kandungan fosfor sebesar 36% (Oktaviani, 2020). Pupuk ini sering digunakan dalam budidaya tanaman pangan maupun tanaman hortikultura. Penambahan pupuk PS-36 pada kultur mikroalga dapat meningkatkan laju pertumbuhan sel karena kandungan fosfor yang ada didalamnya. SP-36 dapat meningkatkan pertumbuhan spesifik *Spirulina sp.* tertinggi terjadi pada penambahan SP-36 sebanyak 200 mg/L dan urea sebesar 300 mg/L pada media limbah tahu dosis 20% yaitu sebanyak 4,22 sel/mL/hari (Lutama *et al.*, 2014).

Penambahan bakteri pada kultur mikroalga disebut juga *co-culture* dengan dilakukan penambahan bakteri yang memiliki potensi untuk meningkatkan pertumbuhan mikroalga (Sitoresmi *et al.*, 2019). *Co-culture* mikroalga dan bakteri diharapkan dapat meningkatkan produk biomassa yang dihasilkan mikroalga dengan adanya metabolit yang dihasilkan bakteri berupa hormon pertumbuhan salah satunya adalah auksin. Penambahan hormon pertumbuhan (auksin) dapat merangsang proses pembentukan sel dengan adanya beberapa proses metabolisme seperti peningkatan produksi protein dan enzim, sintesis protein dan asam nukleat, dan pengaturan pembelahan sel melalui metabolit sekunder. *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) adalah salah hormon organik yang tidak tergolong unsur hara dan hormon

tersebut dalam jumlah sedikit dapat meningkatkan, memperlambat, atau mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Mogea *et al.*, 2022). Fungsi IAA bagi mikroalga adalah untuk merangsang pembelahan sel dan meningkatkan produksi biomassa (Fathy *et al.*, 2023). IAA dapat meningkatkan efisiensi penyerapan nutrisi pada mikroalga, khususnya penyerapan nitrogen dan fosfor (Fathy *et al.*, 2023). Bakteri penghasil IAA merupakan *Plant Growth-Promoting Bacteria* yang dapat memproduksi fitohormon berupa auksin. Auksin dihasilkan melalui metabolit sekunder *Plant Growth-Promoting Bacteria* (PGPB) berupa Indole-3-Acetic Acid (IAA) untuk mendukung pertumbuhan tanaman secara alami (Rini *et al.*, 2020).

Penambahan sumber fosfor yang berbeda pada kultur bersama *C. vulgaris* dan bakteri penghasil IAA diharapkan dapat meningkatkan pertumbuhan *C. vulgaris*. Bakteri penghasil IAA akan menghasilkan fitohormon berupa *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) yang berperan dalam pembelahan sel *C. vulgaris*. Sumber fosfat dalam media kultur akan digunakan oleh *C. vulgaris* untuk penyusunan ATP. ATP bersama hormon IAA yang dihasilkan digunakan untuk proses seluler yang berhubungan dengan transfer energi dan mempercepat pembelahan sel. Oleh karena itu, penelitian dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh variasi sumber fosfat terhadap pertumbuhan *C. vulgaris* yang dikultur bersama dengan bakteri penghasil IAA.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Mei 2024. Pembuatan stok bakteri, medium, pengenceran bertingkat, pengamatan koloni bakteri, dan perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang. Kegiatan *co-culture* mikroalga-bakteri dan monokultur mikroalga dilakukan di ruang Kultur Alga Green house Biologi Universitas Negeri Malang.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur mikroalga spesies *Chlorella vulgaris* dari Laboratorium Kultur Alga *Green house* Biologi Universitas Negeri Malang. Bakteri yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang yang dikultur pada media Gusrina dengan pupuk sebagai sumber fosfor yang berbeda. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Non-Faktorial dengan faktor P (sumber fosfat), yang terdiri dari tiga taraf perlakuan yakni:

- A: Medium Gusrina (Kontrol),
- B: Medium Gusrina+penambahan pupuk TSP,
- C: Medium Gusrina+penambahan pupuk SP-36.

Medium perlakuan A terdiri dari 600 mL akuades steril, 75 mL kultur mikroalga, 75 mL biakan bakteri, dan 750 μ L medium Gusrina. Medium perlakuan B terdiri dari 600 mL akuades steril, 75 mL kultur mikroalga, 75 mL biakan bakteri, 750 μ L medium Gusrina dan 750 μ L larutan pupuk TSP. Medium perlakuan C terdiri dari 600 mL akuades steril, 75 mL kultur mikroalga, 75 mL biakan bakteri, 750 μ L medium Gusrina dan 750 μ L larutan pupuk SP-36 dengan satuan percobaan berupa botol kaca ukuran 1000 mL.

Prosedur penelitian yang dilakukan mencakup pembuatan media pertumbuhan mikroalga yaitu menggunakan medium Gusrina. Pembuatan medium pertumbuhan bakteri

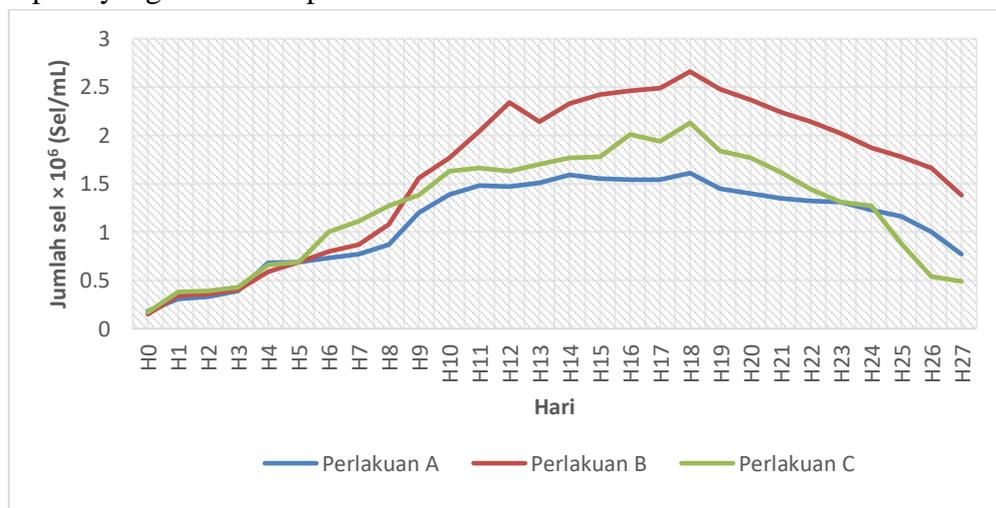
yaitu Nutrient Agar (NA) dengan melarutkan, *Nutrient Broth* (NB) (Mogea *et al.*, 2022), dan *Plate Count Agar* (PCA) (Sitoresmi *et al.*, 2019) serta pembuatan larutan pupuk TSP dan SP-36 sebagai variabel perlakuan pada penelitian. Lalu dilakukan pembuatan stok mikroalga sebagai starter dan stok bakteri penghasil IAA. Kemudian dilakukan pembuatan sampel uji masing-masing perlakuan yaitu perlakuan A (kontrol), perlakuan B (penambahan pupuk TSP), dan perlakuan C (penambahan pupuk SP-36). Selanjutnya sampel uji dilkultur selama 27 hari dan dilakukan pengumpulan data setiap harinya.

Pengumpulan data dilakukan dengan mengambil sampel *co-culture Chlorella vulgaris* bersama bakteri penghasil IAA dengan variasi sumber fosfat setiap 1×24 jam selama 21-28 hari. Sampel diambil menggunakan mikropipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam *microtube*. *Microtube* yang sudah berisi sampel diberi label sesuai perlakuan dan ulangan kemudian pertumbuhan sel *Chlorella vulgaris* dihitung dengan metode ruang hitung *Petroff-Hausser* atau hemositometer. Kepadatan jumlah sel kultur dapat dihitung secara langsung menggunakan ruang hitung *Petroff-Hausser* (Hausser ilmiah, AS). Sampel di dalam mikrotube diambil sebanyak 1 tetes menggunakan pipet tetes kemudian ditetaskan di ruang hitung bagian tengah *Petroff-Hausser* lalu ditambahkan alkohol 70% dan ditutup dengan kaca penutup. Preparat diamati di bawah mikroskop dan dihitung jumlah selnya pada 5 blok *Petroff-Hausser* sebanyak 2 kali. Data hasil pengamatan dihitung menggunakan rumus yang diadaptasi dari (Wahyuni *et al.*, 2019) sebagai berikut:

$$\text{Pertumbuhan sel (sel/mL)} = \frac{\text{Jumlah el}}{\text{Jumlah blok (5)}} \times 25 \times 10^4$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian selama 27 hari dengan sumber fosfat yang berbeda (tanpa penambahan sumber fosfat, TSP, dan SP-36) menunjukkan fase pertumbuhan *Chlorella vulgaris* seperti yang tercantum pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Kepadatan Sel *Chlorella vulgaris* (sel/mL) Perlakuan A= tanpa penambahan sumber fosfat, B= pupuk TSP, dan C= pupuk SP-36

Secara keseluruhan pertumbuhan pada tiga macam perlakuan terjadi secara runtut dari fase adaptasi, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian. Fase adaptasi mulai hari ke-0 sampai hari ke-3 pada saat mikroalga beradaptasi dengan lingkungan baru. Laju

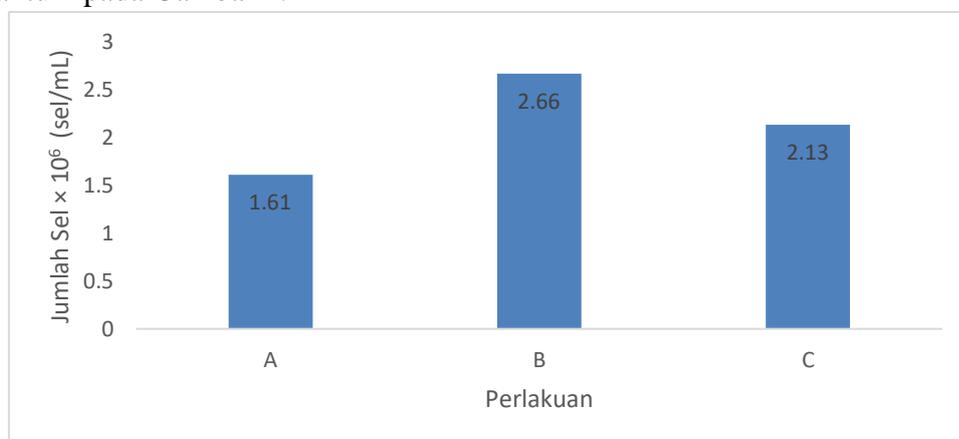
pembelahan sel pada tahap ini masih rendah sehingga jumlah sel belum mengalami penambahan secara signifikan (Elystia *et al.*, 2021). *C.vulgaris* belum bisa melakukan penyerapan nutrisi secara optimal sehingga proses pertumbuhan sel belum optimal.

Fase logaritmik pertumbuhan mikroalga terjadi mulai hari ke-4 sampai hari ke-12 saat mikroalga mengawali tahap pertumbuhan dan pembelahan sel. Fase ini dicirikan oleh pertumbuhan sel yang cepat, pembelahan sel yang berlangsung konstan, dan kondisi seimbang antara suplai nutrisi dan peningkatan jumlah sel (Elystia *et al.*, 2019). *C. vulgaris* yang mampu beradaptasi dengan baik pada lingkungan baru akan mulai melakukan optimasi pemanfaatan nutrisi dan melakukan pembelahan sel (Fathurohman *et al.*, 2022). Selama fase logaritmik, proses fotosintesis berlangsung optimal untuk sintesis protein serta komponen plasma seluler yang dibutuhkan untuk pertumbuhan (Halima *et al.*, 2020).

Fase stasioner dimulai pada hari ke-13 sampai hari ke-18, jumlah sel mikroalga tetap stabil, sedangkan jumlah nutrisi dalam medium berkurang (Elystia *et al.*, 2019). Pada fase ini, pertumbuhan mikroalga berhenti karena jumlah sel yang baru terbentuk sama dengan jumlah sel yang mati. Penurunan populasi disebabkan oleh terbatasnya jumlah nutrisi yang tersedia di lingkungan, sehingga mikroalga tidak dapat lagi mempertahankan kepadatannya. Nutrisi yang didapatkan oleh *C. vulgaris* hanya ditambahkan pada proses awal kultur sehingga nutrisi mulai berkurang.

Fase kematian dimulai pada hari ke-19 hingga 27 dimana terjadi penurunan jumlah sel mikroalga. Jumlah nutrisi yang semakin berkurang hingga akhirnya habis pada medium mengakibatkan kematian pada mikroalga yang disebut dengan fase kematian (Inuhan *et al.*, 2016). Fase kematian jumlah sel yang ada dalam media kultur berkurang dan pembelahan sel hampir tidak terjadi karena mikroalga tidak dapat melakukan fotosintesis.

Selain itu ada pula data puncak populasi untuk mengetahui bagaimana pengaruh setiap perlakuan (tanpa pupuk, TSP, dan SP-36) terhadap pertumbuhan sel *C. vulgaris*. Berdasarkan hasil pengamatan pada penelitian puncak populasi setiap perlakuan (tanpa pupuk, TSP, dan SP-36) terjadi pada hari ke 18. Grafik puncak populasi *Chlorella vulgaris* yang tercantum pada Gambar 2.



Gambar 2. Puncak Populasi Pertumbuhan Sel *Chlorella vulgaris* (Sel/mL)
Perlakuan A= tanpa penambahan sumber fosfat, B= pupuk TSP, dan C= pupuk SP-36

Uji statistik menunjukkan bahwa penambahan pupuk berpengaruh secara nyata (signifikan) terhadap pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. Pertumbuhan sel paling tinggi terdapat pada perlakuan B (penambahan TSP) dengan jumlah sel sebesar $2,66 \times 10^6$ sel/mL.

Jumlah sel tinggi kedua terdapat pada perlakuan C (penambahan SP-36) dengan jumlah $2,13 \times 10^6$ sel/mL. Pertumbuhan sel paling rendah terdapat pada perlakuan A (kontrol) dengan jumlah sel sebesar $1,61 \times 10^6$ sel/mL.

Perlakuan penambahan TSP dan SP-36 diharapkan dapat meningkatkan produktivitas sel *C. vulgaris* dengan adanya kandungan fosfor. Fosfor memiliki peran penting dalam pertumbuhan alga, produksi lipid, hasil asam lemak dan proses metabolisme seperti transfer energi, transduksi sinyal dan fotosintesis (Yang *et al.*, 2018). Fosfor dalam sel mikroalga berperan untuk proses pembelahan sel dan menjaga populasi mikroalga. Pada proses metabolisme mikroalga, fosfor dibutuhkan dalam bentuk fosfat anorganik untuk sintesis molekul seperti DNA, RNA, membran sel, dan komponen lainnya (Maizatul *et al.*, 2021).

Gambar 2 menunjukkan bahwa penambahan pupuk TSP pada perlakuan B berpengaruh secara nyata terhadap pertumbuhan *Chlorella vulgaris* secara optimal. Hal ini bisa dilihat dari jumlah selnya yang paling tinggi yaitu sebesar $2,66 \times 10^6$ sel/mL. Penambahan pupuk TSP memiliki jumlah sel yang paling tinggi dikarenakan selain mendapat nutrisi dari medium Gusrina, *C. vulgaris* juga mendapatkan tambahan nutrisi pada pupuk TSP. Penambahan TSP pada kultur menunjang pertumbuhan sel melalui proses fotosintesis. Pertumbuhan populasi *Chlorella vulgaris* paling optimal terjadi pada penggunaan pupuk TSP dengan jumlah sel $2,62 \times 10^7$ sel/mL selanjutnya pada penggunaan pupuk ZA sebesar $1,08 \times 10^7$ sel/mL dan terakhir pupuk walne sebesar $4,14 \times 10^6$ sel/ml (Fauzan *et al.*, 2021).

Jumlah sel paling sedikit diamati pada perlakuan A (tanpa penambahan sumber fosfat) dengan jumlah $1,61 \times 10^6$ sel/mL. Sel *Chlorella vulgaris* hanya mendapat nutrisi dari medium Gusrina. Nutrisi yang ada pada medium Gusrina kurang optimal dalam menunjang pertumbuhan *C. vulgaris*. Hal ini mengakibatkan proses fotosintesis dan pembelahan sel kurang optimal. *Chlorella vulgaris* memerlukan nutrisi berupa nitrogen, fosfor, karbon, sulfur, magnesium, natrium, dan kalsium (Ahmad & Gozali, 2020).

Pada perlakuan C (penambahan SP-36) memiliki jumlah sel tertinggi kedua setelah perlakuan B (penambahan TSP) yaitu sebesar $2,13 \times 10^6$ sel/mL. Pada perlakuan ini *Chlorella vulgaris* mendapatkan nutrisi dari medium Gusrina dan pupuk SP-36. Pupuk SP-36 merupakan pupuk anorganik yang mengandung 36% fosfor (Oktaviani, 2020). Penambahan SP-36 belum optimal dalam meningkatkan jumlah sel *C. vulgaris* karena kelarutannya yang agak sulit dalam air dan reaksi kimianya yang lambat, sehingga sering dipakai sebagai pupuk dasar. Pupuk ini bersifat netral, tidak higroskopis, dan tidak menyebabkan iritasi kulit (Normahani, 2022).

Jumlah sel *C. vulgaris* pada hari ke 18 masing-masing perlakuan (tanpa penambahan sumber fosfat, TSP, dan SP-36) memiliki perbedaan yang signifikan menurut uji lanjut taraf 0,05%. Berdasarkan tabel di atas masing-masing perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan. Perlakuan A (tanpa penambahan sumber fosfat) berbeda secara nyata (signifikan) dengan perlakuan B (penambahan TSP). Perlakuan A (tanpa penambahan sumber fosfat) berbeda secara nyata (signifikan) dengan perlakuan C (penambahan pupuk SP-36). Perlakuan B (penambahan TSP) berbeda secara nyata (signifikan) dengan perlakuan C (penambahan SP-36).

Data pertumbuhan jumlah sel dari *C. vulgaris* didukung dengan adanya beberapa faktor pertumbuhan mikroalga. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel pada tiap

perlakuan yang dilakukan yaitu aerasi, suhu, dan intensitas cahaya. Aerasi dilakukan menggunakan aerator dengan lama waktu 12 jam nyala dan 12 jam mati. Aerasi berfungsi untuk pengadukan (sirkulasi) antara media dan mikroalga pada fotobioreaktor. Proses pengadukan dilakukan untuk mencegah terjadinya pengendapan sel dan meningkatkan adanya pertukaran gas dalam media pada proses fotosintesis (Rusdiani *et al.*, 2016). Pengadukan juga dilakukan agar seluruh sel mikroalga secara merata mendapatkan cahaya dan nutrisi (Gunawan & Wianto, 2017).

Suhu yang digunakan pada tiap perlakuan yaitu pada kisaran 28-30°C atau kisaran suhu ruang. Suhu adalah salah satu faktor kritis yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Kenaikan suhu diatas batas optimal dalam kultur dapat menyebabkan kerusakan pada sistem enzim mikroalga (Praharyawan, 2021). Kerusakan sistem enzim ini akan mengakibatkan fotosintesis tidak berlangsung dengan lancar karena adanya stres panas. Stres panas mengakibatkan rusaknya sistem enzim RuBisCO dan menurunnya kelarutan CO₂ pada kultur. Setiap mikroalga memiliki suhu optimum tertentu untuk bertahan hidup dalam media kultur (Praharyawan, 2021). *Chlorella vulgaris* dapat hidup pada lingkungan dengan suhu maksimal 25-30°C (S. Ahmad *et al.*, 2020).

Intensitas cahaya yang digunakan pada tiap perlakuan menggunakan lampu dengan besaran 2800 lux dan lama penyinaran 18 jam menyala dan 6 jam mati. Cahaya merupakan faktor penting dalam proses fotosintesis mikroalga dengan perannya sebagai penyedia ATP dan NADP dalam proses fiksasi CO₂ (Praharyawan, 2021). Intensitas cahaya sendiri yaitu ukuran dari amplitudo gelombang cahaya yang mengenai kultur mikroalga. Berkurangnya jarak tembus cahaya ke dalam air dapat menghambat fotosintesis di dalam air, mengurangi oksigen terlarut dalam air, dan mengurangi keanekaragaman spesies alga hijau yang hidup di dalamnya (Abizar & Rahmah, 2020).

Pada percobaan dilakukan kultur bersama antara mikroalga dan bakteri potensial penghasil IAA yang disebut dengan *Co-culture*. Bakteri yang dipakai pada penelitian yaitu isolat *Delftia sp.* dari Laboratorium mikrobiologi Universitas Negeri Malang. Bakteri penghasil IAA merupakan *Plant Growth-Promoting Bacteria* yang dapat memproduksi fitohormon berupa auksin. Auksin dihasilkan melalui metabolit sekunder *Plant Growth-Promoting Bacteria* (PGPB) untuk mendukung pertumbuhan tanaman secara alami (Rini *et al.*, 2020). Pada percobaan bakteri IAA diketahui dapat hidup berdampingan dengan *C. vulgaris* diketahui melalui adanya koloni pada uji Angka Lempeng Total (ALT). Uji ALT dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri IAA yang ada pada kultur dengan melihat adanya koloni pada media Plate Count Agar (PCA).

Fungsi IAA dalam mikroalga adalah untuk merangsang pembelahan sel dan meningkatkan produksi biomassa (Fathy *et al.*, 2023). IAA dapat meningkatkan efisiensi penyerapan nutrisi pada mikroalga, khususnya penyerapan nitrogen dan fosfor (Fathy *et al.*, 2023). Bakteri penghasil IAA berpengaruh penting terhadap pertumbuhan mikroalga dengan menyediakan IAA eksogen untuk metabolisme dan ekspresi gen (Cheng *et al.*, 2023). IAA yang dihasilkan secara eksogen oleh bakteri mempengaruhi ukuran mikroalga dengan merubah morfologi dan memperbesar sel secara signifikan (Fu *et al.*, 2015).

Co-culture mikroalga-bakteri dilakukan untuk memperoleh pola siklus nutrisi yang kompleks. Selain itu untuk memenuhi kebutuhan setiap mikroorganisme melalui simbiosis atau sinergis sehingga menghasilkan biomassa yang optimal (Naseema Rasheed *et al.*,

2023). Simbiosis yang terjadi pada *Co-culture* mikroalga-bakteri diantaranya bakteri menghasilkan zat pemicu pertumbuhan, vitamin, dan kofaktor untuk merangsang pertumbuhan mikroalga. Mikroalga menghasilkan O₂ melalui fotosintesis untuk pertumbuhan bakteri, kemudian bakteri menghasilkan CO₂ yang dapat dimanfaatkan oleh mikroalga pada proses fotosintesis (Naseema Rasheed *et al.*, 2023). Interaksi antara O₂ dan CO₂ pada *Co-culture* mikroalga-bakteri sangat menguntungkan untuk siklus hidup keduanya.

Media yang digunakan untuk *Co-culture Chlorella vulgaris* dan bakteri penghasil IAA yaitu medium Gusrina (Nur, 2014). Komposisi medium Gusrina sendiri terdiri dari urea untuk sumber nitrogen, pupuk TSP untuk sumber fosfor, FeCl₃ untuk sumber zat besi, dan vitamin B12 untuk sumber mikronutrien. Nitrogen merupakan makronutrien penting dalam proses pertumbuhan mikroalga dan memiliki peran penting dalam proses sintesis protein, lipid, dan karbohidrat (Maizatul *et al.*, 2021). Fosfor dalam sel mikroalga berperan untuk proses pembelahan sel dan menjaga populasi mikroalga.

KESIMPULAN

Penelitian menunjukkan penambahan pupuk berpengaruh secara nyata terhadap pertumbuhan sel *Chlorella vulgaris*. Jumlah sel tertinggi terdapat pada perlakuan B (penambahan TSP) yaitu sebesar $2,66 \times 10^6$ sel/mL menunjukkan bahwa TSP merupakan sumber fosfat paling efektif untuk meningkatkan pertumbuhan sel *C. vulgaris*. Perlakuan C (penambahan SP-36) juga mendukung pertumbuhan dengan jumlah sel sebesar $2,13 \times 10^6$ sel/mL. Pertumbuhan sel terendah terdapat pada perlakuan A (tanpa penambahan sumber fosfat) dengan jumlah sel sebesar $1,61 \times 10^6$ sel/mL. Oleh karena itu penambahan pupuk fosfat terutama TSP dapat direkomendasikan untuk meningkatkan pertumbuhan sel *C.vulgaris* ada lingkungan dan kondisi yang sama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Payung Penelitian Danau *Research Group* yang telah mengadakan program penelitian terkait optimalisasi hasil biomassa *Chlorella vulgaris*. Terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Negeri Malang yang telah memberikan dana hibah penelitian skripsi sebesar Rp. 5.000.000,- tahun anggaran 2024 dengan Nomor: 4.4194/UN32.14.1/LT/2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Abizar & Rahmah, S. W. (2020). Alga hijau (*chlorophyceae*) yang ditemukan di sungai sumatera barat green alga (*chlorophyceae*) found in the west sumatera river. *Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi Bioconcetta*, 6(1), 21–26. DOI : [10.22202/bc.2020.v6i2.4062](https://doi.org/10.22202/bc.2020.v6i2.4062)
- Ahmad, I. & Gozali, A.L. (2020). Kajian Pustaka Analisis Proksimat dari Mikroalga *Chlorella vulgaris* [Laporan Tugas Akhir]. Program Strata I Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Bandung.

- Ahmad, S., Kothari, R., Shankarayan, R., & Tyagi, V.V. (2020). Temperature dependent morphological changes on algal growth and cell surface with dairy industry wastewater: an experimental investigation. *Biotech*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2008-x>.
- Andriani, Y., Shiyam, D.F., Hasan, Z., & Pratiwy, F.M. (2023). Penggunaan berbagai pupuk alami dalam budidaya *Chlorella* sp.. *Agroqua*, 21(1), 33–45. <https://doi.org/10.32663/ja.v21i1.3238>.
- Basar, S., Simanjuntak, I., & Wibowo, E.S. (2019). Pengaruh Pakan Suplementasi Spirulina platensis dan *Chlorella vulgaris* Terhadap Pertumbuhan dan Komposisi Tubuh Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera: A Scientific Journal*, 36(2), 51–56. DOI:10.20884/1.mib.2019.36.2.724.
- Cheng, X., Li, X., Tong, M., Wu, J., Chan, L. L., Cai, Z., & Zhou, J. (2023). Indole-3-acetic acid as a cross-talking molecule in algal-bacterial interactions and a potential driving force in algal bloom formation. *Frontiers in Microbiology*, 14(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236925>.
- Coronado-Reyes, J.A., Salazar-Torres, J.A., Juárez-Campos, B., & González-Hernández, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology (Brazil)*, 42, 1–11. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>.
- Elystia, S., Darsy, M.S., & Mulia, S.R. (2021). Analisis Penambahan Bakteri Azospirillum Sp. Terhadap Kepadatan Sel Dan Kandungan Lipid Mikroalga *Chlorella* Sp. Serta Penyisihan N Total Di Limbah Cair Tahu. *Jurnal Sains & Teknologi Lingkungan*, 13(2), 120–134. <https://doi.org/10.20885/jstl.vol13.iss2.art4>.
- Elystia, S., Muria, S. R., & Pertiwi, S.I.P. (2019). Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella* Sp Untuk Produksi Lipid Dalam Media Limbah Cair Hotel Dengan Variasi Rasio C:N Dan Panjang Gelombang Cahaya. *Jurnal Sains & Teknologi Lingkungan*, 11(1), 25–43. <https://doi.org/10.20885/jstl.vol11.iss1.art3>.
- Fathurohman, M., Oktaviani, S. U., Gustaman, F., Tri, A., & Pratita, K. (2022). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Dunaliella salina* dengan Metode ASE (Accelerated Solvent Extraction). *Prosiding Seminar Nasional Diseminasi*, 2(1), 185–194.
- Fathy, W.A., Abdelgawad, H., Hashem, A.H., Essawy, E., Tawfik, E., Al-Askar, A.A., Abdelhameed, M.S., Hammouda, O., & Elsayed, K.N.M. (2023). Exploring Exogenous Indole-3-acetic Acid's Effect on the Growth and Biochemical Profiles of *Synechocystis* sp. PAK13 and *Chlorella variabilis*. *Molecules*, 28(14). <https://doi.org/10.3390/molecules28145501>.
- Fauzan, M., Siregar, S.H., & Nasution, S. (2021). Effect Of Different Types Of Fertilizer On The Growth Of Marine Phytoplankton Population *Chlorella Vulgaris*. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 4(1), 65–72. <https://doi.org/10.31258/ajoa.4.1.65-72>.
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling and Behavior*, 10(8). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>.
- Gunawan, & Wianto, T. (2017). Respon Pertumbuhan Mikroalga Indigenous *Synechococcus* Sp. Dan Penurunan Konsentrasi Logam Berat Fe Pada Media Kultur. *Prosiding Seminar Nasional Lahan Basah Tahun 2016*, 244–249.

- Halima, A., Nursyirwani, N., Effendi, I., & Ambarsar, H. (2020). Potential Microalga *Chlorella Vulgaris* For Bioremediation of Heavy Metal Pb. *Asian Journal Of Aquatic Sciences*, 2(3), 224–234. <https://doi.org/10.31258/ajoa.2.3.224-234>.
- Hindarti, F., & Ayuningtyas, E. (2020). The Development of *Spirulina* Sp . Cultivation Technique as A Renewable Energy Biomass Source in The Airlift Fotobioreactor. *Jurnal Energi Dan Lingkungan*, 16, 17–24.
- Inuhan, B., Arreneuz, S., & Agus Wibowo, M. (2016). Optimasi Produksi Protein Sel Tunggal (Pst) Dari Bakteri Yang Terdapat Pada Gastrointestinal (Gi) Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Dan Ikan Kembung (*Scomber canagorta*). *Jkk*, 5(1), 24–28.
- Lutama, D., Winarso, S., & Setiawati, T. C. (2014). Uji Efektifitas Pertumbuhan *Spirulina* sp. Pada Limbah Cair Tahu. *x(Sp 36)*, 1–5.
- Maizatul, A.Y., Radin, M.S.R., Mohamed, A.A., Ambati, R.A., & Ranga, R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells*, 10(393), 10–20.
- Mogea, R. A., La Halim Putri, W. I. C., & Abubakar, H. (2022). Isolasi Bakteri Penghasil Indole Acetic Acid pada Tanaman Hortikultura di Perkebunan Prafi SP 1, Manokwari. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 27(1), 1–6. <https://doi.org/10.18343/jipi.27.1.1>
- Mutia, S., Nedi, S., & Elizal, E. (2021). Effect Of Nitrate And Phospate Concentration On *Spirulina* Platensis With Indoor Scale. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 4(1), 29–35. <https://doi.org/10.31258/ajoa.4.1.29-35>
- Naseema Rasheed, R., Pourbakhtiar, A., Mehdizadeh Allaf, M., Baharlooeian, M., Rafiei, N., Alishah Aratboni, H., Morones-Ramirez, J. R., & Winck, F. V. (2023). Microalgal co-cultivation -recent methods, trends in omic-studies, applications, and future challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11(September), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1193424>.
- Nasution, M.N., Feliatra, F., & Effendi, I. (2021). Analisis Pertumbuhan Protein Sel Tunggal (Pst) Bakteri *Bacillus Cereus* Dengan Media Yang Berbeda. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*, 26(1), 47. <https://doi.org/10.31258/jpk.26.1.47-53>.
- Noerdjito, D.R. (2019). Interaksi Mikroalga-Bakteri Dan Peranannya Dalam Produksi Senyawa Dalam Kultur Mikroalga. *OSEANA*, 44(2), 25–34.
- Normahani. (2022). Mengenal Pupuk Fosfat dan Fungsinya bagi Tanaman. Balai Penelitian Pertanian Lahan Rawa, 3. <http://balittra.litbang.pertanian.go.id/index.php/berita/info-aktual/1573-mengenal-pupuk-fosfat-dan-fungsinya-bagi-tanaman>.
- Nur, M.M.A. (2014). Efek Bikarbonat, Besi, dan Garam terhadap Produktivitas Lipid *Chlorella* sp. yang Diekstrak dengan Metode Osmotic Shock. *Eksergi*, 11(02), 20–24.
- Oktaviani, A. (2020). Pengaruh Pupuk Sp-36 Dan Pupuk Bio-Urin Sapi Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil Tanaman Terong Hijau (*Solanum Melongena* L.) Varietas Arya Hijau. *Agrifor*, 19(2), 201. <https://doi.org/10.31293/Af.V19i2.4631>.
- Praharyawan, S. (2021). Bioteknologi & biosains indonesia peningkatan produksi biomassa sebagai strategi jitu dalam mempercepat produksi biodiesel berbasis mikroalga di Indonesia. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 8(2), 294–320. <http://ejurnal.bppt.go.id/index.php/JBBI>.
- Rini, I. A., Oktaviani, I., Asril, M., Agustin, R., & Frima, F. K. (2020). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Iaa (Indole Acetic Acid) Dari Rhizosfer Tanaman Akasia (*Acacia Mangium*). *Agro Bali: Agricultural Journal*, 3(2), 210–219. <https://doi.org/10.37637/ab.v3i2.619>.

- Rusdiani, R. R., Boedisantoso, R., & Hanif, M. (2016). Optimalisasi Teknologi Fotobioreaktor Mikroalga sebagai Dasar Perencanaan Strategi Mitigasi Gas CO₂. *Jurnal Teknik ITS*, 5(2), 188–192. <https://doi.org/10.12962/j23373539.v5i2.16942>.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35(July), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- Sitoresmi, P, A, Witjoro, D, Aridowi, D, Aribah, dan Y.K, B. (2019). Co – culture mikroalga *Chlorella* sp . dan bakteri (penghasil IAA dan pelarut fosfat), prospek industri mikroalga masa depan. *MSOpen*, 5, 132–140.
- Tim Sekretaris Jenderal Dewan Energi Nasional. (2019). Indonesia Energy Out Look 2019. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Wahyuni, N., Rahardja, B.S., & Azhar, M.H. (2019). Pengaruh pemberian kombinasi konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan pupuk walne dalam media kultur terhadap laju pertumbuhan dan kandungan karotenoid *dunaliella salina*. *Journal of Aquaculture Science*, 4(1), 37–49.
- Yang, F., Xiang, W., Li, T., & Long, L. (2018). Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34650-x>.