



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA III

"Teori dan Aplikasi Sains dalam Isu Globalisasi Lingkungan, Profesionalisasi Pembelajaran dan Kewirausahaan"

Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS

Surakarta, 7 Mei 2011



MAKALAH PENDAMPING

POSTER
(Kode : H-05)

ISBN : 978-979-1533-85-0

VARIASI PENAMBAHAN KH_2PO_4 SEBAGAI SUMBER FOSFAT TERHADAP PEMBENTUKAN KAROTEIOMID DAN β -KAROTEN *Dunaliella salina*

Ni Wayan Sri Agustini^{1*} dan Kusmiati²

^{1,2} Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI

*e-mail : wayan_sa2002@yahoo.com

Abstrak

Dunaliella salina sebagai penghasil pigmen karotenoid dan beta karoten yang tinggi, dalam pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan nutrisi. Salah satu sumber nutrisi yang dapat mempengaruhi kandungan karotenoid dan beta karoten adalah fosfor. Fosfat sebagai sumber fosfor yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalium dihidrogen fosfat dengan konsentrasi 0,010 g/L; 0,035 g/L; 0,070 g/L; 0,105 g/L. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui konsentrasi fosfat yang optimum untuk peningkatan karotenoid dan beta karoten dengan menambahkan kalium dihidrogen fosfat dalam berbagai konsentrasi. Analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap karotenoid dan beta karoten dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan karotenoid tertinggi sebesar 12,407 ppm dihasilkan dari penambahan kalium dihidrogen fosfat dengan konsentrasi 0,035 g/L pada fase stasioner dan beta karoten sebesar 2,308 ppm pada fase logaritmik.

Kata kunci : Kalium dihidrogen fosfat, *Dunaliella salina*, karotenoid, beta karoten

PENDAHULUAN

Besarnya jumlah penduduk di Indonesia menuntut pasokan pangan yang luar biasa jumlahnya. Sumber pasokan pangan hanya bertumpu dari sumber lahan daratan yang jumlahnya semakin terbatas, karena terdesak oleh kebutuhan perumahan dan pemukiman dan perluasan kawasan industri. Untuk itu, diperlukan penggalian sumber daya alam potensial. Salah satu sumber daya potensial dan mempunyai nilai ekonomi tinggi adalah mikroalga. Mikroalga mengandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, protein, vitamin, mineral dan juga senyawa bioaktif. Potensi mikroalga sangat besar sebagai sumber berbagai produk, diantaranya sebagai sumber protein, produksi pigmen, sebagai sumber warna, sebagai pakan larva ikan dan non ikan, serta produksi antimikroba [1,2,3]

Berdasarkan hal tersebut maka mikroalga telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti sebagai suplementasi pangan, bidang kesehatan, kedokteran, kosmetika dan farmasi.

Salah satu spesies mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan adalah *Dunaliella*. *Dunaliella* merupakan mikroalga uniseluler, biflagel, termasuk kelompok alga hijau (Chlorophyceae) yang memiliki komposisi biokimia yang berpotensi sebagai sumber makanan dalam akuakultura dan merupakan mikroalga paling kaya sumber β -karoten dan gliserol [1,2,3]

Pigmen yang terkandung dalam mikroalga Chlorophyceae antara lain klorofil a, yang berperan memberi warna hijau. Disamping itu mempunyai pigmen klorofil b dan karotenoid yang juga berperan dalam proses fotosintesis. Pigmen merupakan zat warna alami yang telah

dimanfaatkan untuk zat warna makanan, minuman, kosmetik dan obat-obatan [1]

Karotenoid merupakan kelompok pigmen yang berwarna kuning, oranye, merah oranye. Karoten yang terdiri dari beberapa unit isoprena (suatu diena) dikenal sebagai hidrokarbon tak jenuh turunan likopena. Sedangkan turunan yang mengandung oksigen disebut xantofil. Pigmen yang termasuk karoten yaitu α -karoten, β -karoten, γ -karoten, ϵ -karoten. Sedangkan yang termasuk xantofil antara lain lutein, rubixantin, zeaxantin, violaxantin. [4,5]

Kultur mikroalga dalam skala laboratorium memerlukan kondisi lingkungan yang terkendali. Pertumbuhan mikroalga sangat erat kaitannya dengan ketersediaan hara makro dan mikro serta dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga antara lain cahaya, suhu, pH, dan salinitas.

Fosfor merupakan salah satu unsur makro yang penting bagi pembentukan protein dan metabolisme sel mikroalga. Di perairan hanya fosfor terlarut yang dapat dimanfaatkan dalam pembentukan biomassa fitoplankton. Pada pertumbuhan fitoplankton fosfor dibutuhkan dalam jumlah sedikit dan merupakan unsur pembatas bagi pertumbuhan dan perkembangan sel fitoplankton ([2]

Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk melihat pengaruh fosfat sebagai sumber fosfor terhadap kandungan karotenoid dan beta karoten pada mikroalga *Dunaliella salina*. Karotenoid merupakan pigmen yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat memberi serapan pada spektrum cahaya tampak, sehingga dalam penelitian ini akan digunakan metode spektrofotometri UV-Vis sebagai analisis pigmen karotenoid. Selain itu beta karoten yang terdapat pada karotenoid berada dalam jumlah yang kecil, maka analisis

kuantitatif beta karoten perlu menggunakan metode yang sensitif. Pada penelitian ini akan digunakan metode KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi).

METODOLOGI

A. Bahan

1. Mikroalga *Dunaliella salina*
2. Medium Becker : natrium klorida, kalium nitrat, kalium dihidrogen fosfat, natrium bikarbonat, kalium klorida, larutan Fe-EDTA (besi (III) klorida + Etilen diamin tetra asetat), magnesium sulfat heptahidrat, magnesium klorida heksahidrat, kalsium klorida dihidrat, *Trace Element*
3. Pereaksi : etanol, kalium hidroksida 60%, natrium klorida 0,9%, dietil eter, natrium sulfat anhidrat, asetonitril, methanol

B. Cara Kerja

1, Penyiapan stok kultur

Dunaliella salina ditanam dalam medium Becker pada botol 1 liter dengan intensitas cahaya 2500 lux. Aerasi dilakukan secara terus menerus dengan pH awal 7,5. Pertumbuhan mikroalga ini diamati setiap hari untuk mengetahui fase pertumbuhannya. Komposisi medium Becker dalam tiap 1 liter [2]:

a. Elemen makro

Magnesium sulfat 0,5 g, magnesium klorida 1,5 g, kalsium klorida 0,2 g, kalium nitrat 1,0 g, kalium dihidrogen fosfat 0,035 g, natrium hidrogen karbonat 0,043 g, kalium klorida 0,2 g, natrium klorida 27 g.

b. Elemen mikro (*Trace element*)

Elemen mikro dibutuhkan sebanyak 1 mL, yang dibuat dari : mangan klorida 1,81 g, asam borat 2,86 g, dan tembaga (II) sulfat pentahidrat 0,079 g, ammonium molibdat

0,018 g, zink sulfat dihidrat 0,22 g dan dilarutkan dalam 1 L aquades.

c. Larutan besi (III) klorida - EDTA

Larutan besi (III) klorida dibuat dari : 0,085 g besi (III) klorida dan 2,67 g EDTA (Etilen diamin tetra asetat) yang dilarutkan dalam 100 mL aquades. Dalam 1 L media larutan besi (III) klorida yang dibutuhkan sebanyak 1 mL.

2. Kultivasi Mikroalga *Dunaliella salina*

Dunaliella salina dikultivasi pada media Becker dengan pH awal media 7,5. Kultur diberi cahaya menggunakan lampu neon 40 watt dengan intensitas cahaya 2500 lux pada suhu 25°C, dan diberi aerasi secara terus menerus. Setelah stok kultur mencapai fase logaritmik kemudian dilakukan uji pengaruh fosfor yang bervariasi sebagai sumber nutrisi.

Stok kultur pada fase logaritmik dipindahkan ke dalam 4 botol ukuran 2 liter yang telah berisi medium Becker dengan jumlah kalium dihidrogen fosfat yang berbeda (Tabel1).

3. Penetapan Pola Pertumbuhan *Dunaliella salina*

Kepadatan biomassa diukur dengan metode turbidimetri. Kultur *Dunaliella salina* diamati pertumbuhannya setiap hari hingga diperoleh pola pertumbuhannya selnya dari peningkatan dan penurunan jumlah populasi sel yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm. Serapan yang diperoleh dibuat kurva dengan cara memplotkan waktu kultur dengan kepadatan jumlah populasi sel mikroalga.

4. Analisis pigmen karotenoid

Sebanyak 25,0 ml kultur disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit kemudian supernatan dibuang sedangkan endapan (biomassa) diambil. Endapan alga diekstraksi

dengan 7,5 ml etanol, 15 tetes kalium hidroksida 60%, didiamkan selama 24 jam. Kemudian ditambahkan 7,5 ml larutan natrium klorida 0,9%. Dipecahkan selnya dengan alat sonikator dengan kekuatan 40 Hz selama 4 menit kemudian dipanaskan pada suhu 45-50°C selama 15 menit, disentrifus kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan ditambah 7,5 ml dietil eter, kemudian dikocok, diperoleh dua lapisan yaitu lapisan bawah berwarna hijau dan lapisan atas berwarna kuning. Supernatan yang berwarna kuning ditetapkan panjang gelombang maksimumnya kemudian diukur serapan pada panjang gelombang maksimum, terhadap blanko pereaksi. Hasil pengukuran dimasukkan pada persamaan Karotenoid (mg/l)=3,92 x A₄₅₂

Keterangan 3,92 =Ketetapan Mackiney (1941)

A =Hasil absorbansi

5. Analisis pigmen klorofil

Sebanyak 25,0 ml kultur disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit kemudian supernatan dibuang sedangkan endapan (biomassa) diambil. Endapan alga diekstraksi dengan 10 ml aceton 90 %. Kemudian dipecahkan selnya dengan alat sonikator dengan kekuatan 40 Hz selama 4 menit dan didiamkan 30 menit, disentrifus kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang berwarna hijau diukur serapan pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm, terhadap blanko aceton. Hasil pengukuran dimasukkan pada persamaan : Klorofil (mg/L)= (8,02 x A₆₆₃) + (20,2 x A₆₄₅)

6. Analisis Kuantitatif Beta Karoten Secara KCKT

a. Penetapan kadar beta karoten secara KCKT

Fase gerak : metanol - asetonitril (1 : 9)

Fase diam : C18

Detektor : λ = 450 nm

Laju Alir : 1,0 ml / menit

Volume Sampel : 20 µl

b. Pembuatan kurva kalibrasi

Dari hasil kromatogram diperoleh luas area, kemudian dibuat kurva hubungan antara luas area dan konsentrasi larutan baku beta karoten, didapat persamaan garis regresi sebagai berikut : $Y = a + bx$, dimana : Y = luas area beta karoten sedangkan x = kadar beta karoten (mg/l). Kadar beta karoten dalam larutan uji dihitung menggunakan persamaan garis regresi.

Rancangan Penelitian

Analisis data menggunakan ANOVA satu arah

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kurva Pertumbuhan mikroalga *Dunaliella salina*

Kepadatan awal biomassa mikroalga pada masing-masing perlakuan memiliki serapan 0,501. Pada penelitian ini, mikroalga *Dunaliella salina* tidak mengalami fase lag (adaptasi), hal ini dikarenakan stok kultur telah memasuki fase logaritmik, sehingga saat diinokulasi ke dalam media yang baru tidak mengalami fase adaptasi (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan pendapat Becker [2], inokulan yang berasal dari fase lag akhir, fase logaritmik, atau fase stasioner awal akan mengalami fase lag yang lebih singkat dibandingkan inokulan dari fase pertumbuhan yang lain. Bahkan fase lag sering kali tidak dijumpai bila inokulan diambil pada fase logaritmik.

Penambahan kalium dihidrogen fosfat sebesar 0,010 g/L mengalami fase logaritmik hingga hari ke-24, kemudian mengalami fase stasioner hingga hari ke-34. Sedangkan fase logaritmik pada penambahan kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L mencapai hari ke-29, fase stasioner dengan kepadatan konstan hingga hari ke-34 menunjukkan serapan sebesar 4,071. Penambahan kalium dihidrogen fosfat 0,070 g/L

mengalami fase logaritmik hingga hari ke-24, kemudian memasuki fase stasioner hingga hari ke-34. Konsentrasi kalium dihidrogen fosfat 0,105 g/L mengalami fase logaritmik sampai hari ke-23 dan menalami fase stasioner hingga hari ke-35.

Kepadatan biomassa dengan jumlah kalium dihidrogen fosfat 0,010 g/L, pada fase logaritmik memiliki kepadatan tertinggi, dengan menunjukkan serapan sebesar 2,408 pada hari ke-13 dibanding perlakuan lainnya. Hal ini diduga sel menyerap nutrisi lebih cepat untuk memenuhi kebutuhan metabolisme sel, karena ketersediaan fosfat untuk transfer energi kecil. Sehingga sebelum kultur mengalami kekurangan fosfat, maka sel membelah diri lebih cepat dan pertumbuhan sel menjadi lebih tinggi.

Pada fase stasioner, penambahan jumlah kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L menunjukkan kepadatan sel tertinggi dengan serapan sebesar 4,071 pada hari ke-31. Kandungan fosfat yang tepat dapat memberikan pertumbuhan mikroalga yang optimum.

Kepadatan biomassa pada fase stasioner lebih tinggi dibandingkan fase logaritmik. Saat fase stasioner, kepadatan sel menjadi konstan dan maksimum. Hal ini disebabkan karena berkurangnya nutrisi dan intensitas cahaya akibat bayangan dari populasi selnya sendiri, sehingga laju pertumbuhan setara dengan laju kematian.

Intensitas cahaya yang kurang, dapat mengakibatkan pertumbuhan biomassa mikroalga yang dikultur menjadi lebih rendah. Disamping itu, gelembung gas yang ditimbulkan oleh aerasi tidak cukup kuat untuk memberikan pengadukan biomassa dengan merata sehingga kesempatan untuk memperoleh intensitas cahaya menjadi tidak sama. Saat pengambilan sampel perlu diperhatikan, karena jika ada mikroalga yang berbentuk filamen ikut terukur, maka serapan akan semakin besar dan hasil pengukuran ini bukan yang sebenarnya.

B. Pigmen Klorofil

Pada penelitian ini, fase logaritmik memiliki kandungan klorofil lebih tinggi. Keadaan ini disebabkan sel membutuhkan energi dan makanan untuk kelangsungan hidupnya, yang didapat dari hasil fotosintesis, sehingga sel memproduksi klorofil lebih banyak. Menurut Becker [2], pada fase stasioner peran klorofil dalam penyerapan cahaya mulai digantikan oleh pigmen lain seperti karotenoid, tetapi proses fotosintesis tetap dijalankan oleh klorofil.

Total kandungan klorofil pada penambahan kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L memiliki kadar tertinggi sebesar 23,9637 ppm dibanding penambahan lainnya (Gambar 2)

Berdasarkan hasil analisis statistik nilai F-hitung 39,59 sedangkan nilai F-tabel $\alpha=0,05$: 3,00 sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kalium dihidrogen fosfat berpengaruh secara nyata terhadap kandungan klorofil. Kandungan klorofil dipengaruhi oleh ketersediaan fosfat untuk transfer energi dalam proses fotosintesis.

2. Karotenoid

Karotenoid diekstraksi dengan etanol yang berfungsi untuk menarik klorofil dan karotenoid. Penambahan kalium hidroksida 60 % dan pendiaman selama \pm 24 jam bertujuan melepaskan ikatan ester dari karotenoid. Pemecahan dinding sel *Dunaliella salina* dilakukan secara mekanik dengan proses sonikasi. Pemanasan pada suhu 45-50°C membantu proses penyabunan untuk melepaskan ikatan ester. Selanjutnya filtrat disentrifus untuk memisahkan biomassa, kemudian lapisan karotenoid ditarik dengan dietil eter.

Identifikasi karotenoid dilakukan dengan membandingkan panjang gelombang serapan maksimum dari zat yang diperiksa dengan data yang tertera di pustaka. Panjang gelombang serapan maksimum dapat ditentukan dengan

membuat spektrum serapan dari larutan yang diperiksa.

Menurut Harborne [4], panjang gelombang maksimum β -karoten dengan pereaksi eter ialah 451 nm. Hasil penelitian menunjukkan sampel karotenoid *Dunaliella salina* memiliki panjang gelombang maksimum 452 nm, mendekati yang tertera pada literatur. Sehingga dapat disimpulkan bahwa karotenoid *Dunaliella salina* mengandung β -karoten. Analisis kuantitatif karotenoid dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang maksimum 452 nm (Gambar 3).

Dari hasil penelitian, kandungan karotenoid tertinggi terdapat pada fase stasioner. Hal ini diduga berkaitan dengan usahanya untuk meningkatkan kemampuan penambatan cahaya pada fase stasioner, juga sebagai respon terhadap kenaikan salinitas medium pada fase stasioner. Selain itu, fiksasi CO₂ dengan pengambilan NO₃⁻ pada proses fotosintesis berkontribusi terhadap peningkatan pH. Perubahan pH berpengaruh terhadap penurunan biomassa dan destruksi klorofil. Sehingga meningkatkan produksi karotenoid yang berperan membantu fotosintesis.

Berdasarkan hasil analisis statistik nilai F-hitung 272,37 sedangkan nilai F-tabel $\alpha=0,05$: 3,00. hal ini berarti konsentrasi kalium dihidrogen fosfat berpengaruh secara nyata terhadap kadar karotenoid *Dunaliella salina* pada tiap fase. Konsentrasi 0,035 g/L memiliki kandungan karotenoid tertinggi sebesar 12,407 ppm pada fase stasioner. Dengan kata lain, konsentrasi kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L merupakan konsentrasi optimum untuk menghasilkan kandungan karotenoid tertinggi (Gambar 4)

C. Kurva Kalibrasi Beta Karoten

Kurva kalibrasi dibuat dari satu seri larutan pembanding beta karoten dengan konsentrasi 0,5

ppm, 1,0 ppm, 1,5 ppm. Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara luas puncak dengan konsentrasi baku pembanding. Uji linearitas menggambarkan kemampuan suatu alat untuk memperoleh hasil pengujian yang sebanding dengan kadar analitik dalam sampel pada rentang kadar tertentu. Berikut adalah data baku pembanding beta karoten untuk menentukan linieritas (Tabel 2).

Dari hasil analisis diperoleh nilai r untuk larutan baku beta karoten sebesar 0,9999. Nilai tersebut menunjukkan nilai yang ideal karena mendekati 1, sehingga koefisien korelasi antara larutan dengan luas puncak yang terdeteksi oleh KCKT adalah baik untuk digunakan penelitian.

Berdasarkan data baku pembanding dapat diperoleh persamaan regresi yaitu $Y = 904,3333 + 467 X$. Penetapan kadar beta karoten dihitung menggunakan persamaan regresi tersebut, dengan Y sebagai luas area beta karoten dan X sebagai konsentrasi beta karoten yang dicari.

D. Analisis Kuantitatif Beta Karoten

Beta karoten berada dalam jumlah yang kecil, sehingga dibutuhkan metode yang sensitif untuk mengetahui kadar beta karoten. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi. Kadar beta karoten dihitung terhadap persamaan regresi yang telah didapat dari uji linieritas. Data kadar beta karoten *Dunaliella salina* dapat dilihat pada Tabel 3

Berdasarkan grafik (Gambar 5), fase pertumbuhan logaritmik memperlihatkan kandungan beta karoten lebih tinggi dibandingkan saat fase stasioner yaitu dengan kadar rata-rata 1,848 ppm. Peningkatan karotenoid ternyata tidak diiringi dengan peningkatan kandungan beta karoten. Berdasarkan hasil analisis terhadap kadar karotenoid, menunjukkan bahwa karotenoid saat fase stasioner lebih tinggi dibanding fase

logaritmik, karena adanya proses penuaan yang meningkatkan produksi karotenoid. Namun, dalam analisis beta karoten terjadi sebaliknya, fase logaritmik menghasilkan beta karoten lebih tinggi daripada fase stasioner.

Berdasarkan hasil analisis statistik, penambahan kalium dihidrogen fosfat tidak mempengaruhi kandungan beta karoten, karena nilai F -hitung : 1,78 lebih kecil dibandingkan dengan nilai F -tabel $\alpha=0,05$: 5,99. Kandungan beta karoten tertinggi dihasilkan pada konsentrasi kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L dengan kadar β -karoten sebesar 2,308 ppm pada fase logaritmik dan 1,496 ppm pada fase stasioner. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kalium dihidrogen fosfat 0.035 g/L merupakan konsentrasi optimum untuk menghasilkan beta karoten (Tabel 3)

KESIMPULAN

1. Kandungan karotenoid *Dunaliella salina* tertinggi dihasilkan pada fase stasioner sebesar 12,407 ppm pada penambahan kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L.
2. Kandungan beta karoten *Dunaliella salina* tertinggi sebesar 2,308 ppm dihasilkan saat fase logaritmik pada penambahan kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L.
3. Jumlah penambahan kalium dihidrogen fosfat yang optimum ialah pada konsentrasi 0,035 g/L untuk menghasilkan karotenoid dan beta karoten yang paling tinggi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Sdr. Desi yang telah membantu dalam pengerjaan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. *Whole book*. Borowitzka MA, Borowitzka LJ. 1988. Mikroalgae biotechnology.

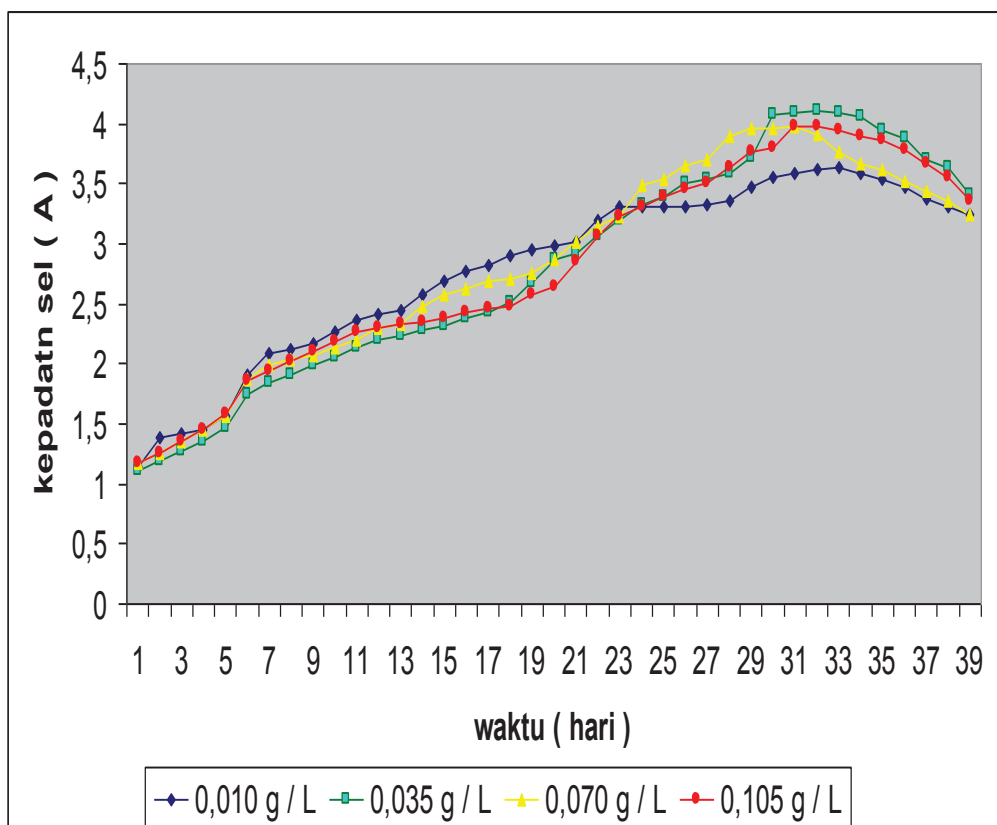
New York: Cambridge University Press. p. 27-51

2. *Whole book.* Becker EW. 1994. *Biotechnology and Microbiology*, 1st edition. New York: Cambridge University Press. p. 9-40, 51-58
3. *Chapter in a book.* Cohen Zvi, Taylor, Francis. 1999. *Chemicals from Microalgae*. Israel: Ben Gurion of the Negev. p. 196-202
4. *Whole book.* Harborne JB. *Metode fitokimia: Penuntun dari modern menganalisis tumbuhan*. 1987. Diterjemahkan oleh Padmawinata K dan Sudiro. Bandung: ITB Bandung. h. 17-24, 158-165
5. *Whole book.* Winarno FG. 2002. *Kimia pangan dan gizi*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama. h. 188-98
6. *Whole book.* Campbell Neil A. *Biologi*. 2002. Diterjemahkan oleh Rahayu Lestari. Jakarta; Erlangga. h. 184-190
7. *Dunaliella salina*. Diambil dari : http://en.wikipedia.org/wiki/Dunaliella_salina. Diakses 18 Desember 2009.
8. *Dunaliella salina* : The Algae with powerful anti-cancer properties. Diambil dari: <http://thehealthlife.co.uk>. Diakses 20 Desember 2009
9. *Chapter in a book.* Dewick M Paul. *Medical natural product. A biosynthetic approach*. Department of Pharmaceutical Science. p 207-13
10. *Whole book.* Gritter JR, Bobbit JM, Schwarting AE. 1991. *Pengantar kromatografi*. Diterjemahkan oleh : Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB Bandung; . h.1-12, 186-231

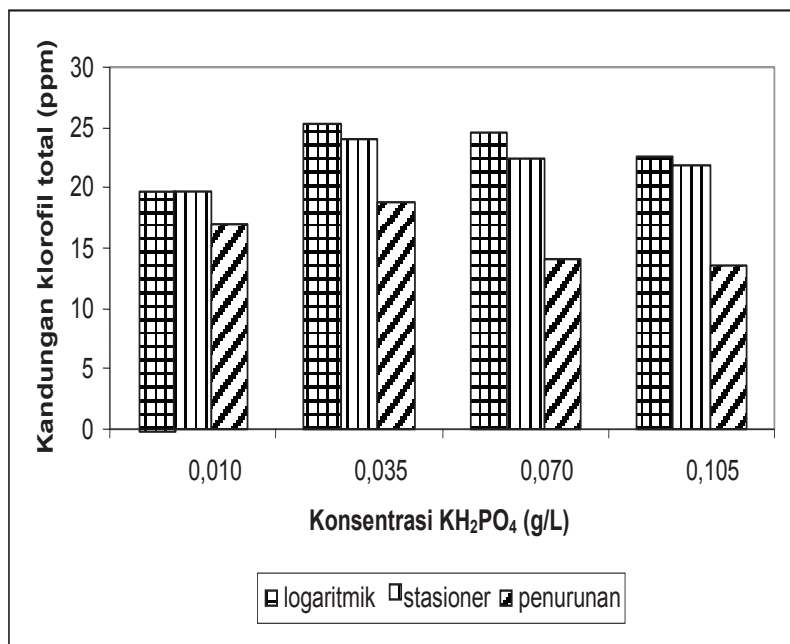
LAMPIRAN

Tabel 1. Komposisi medium untuk *Dunaliella salina* dengan variasi jumlah kalium dihidrogen fosfat untuk tiap 1 liter

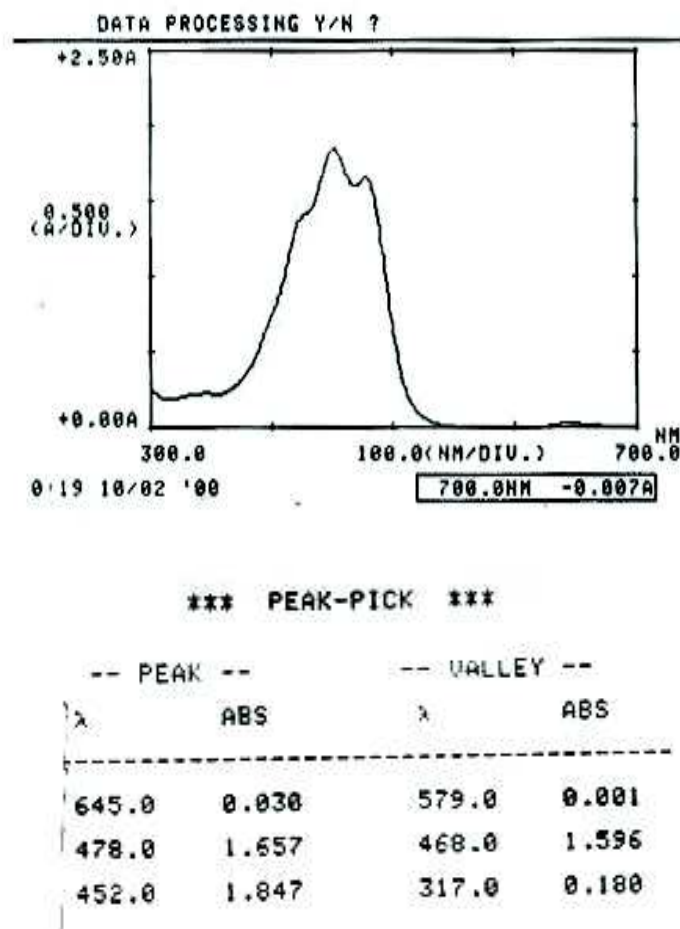
Komposisi	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
KCl	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
NaHCO ₃	0,043 g	0,043 g	0,043 g	0,043 g
KH ₂ PO ₄	0,010 g	0,035 g	0,070 g	0,105 g
NaCl	27 g	27 g	27 g	27 g
KNO ₃	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g
Trace element	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Lar. Fe EDTA	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml



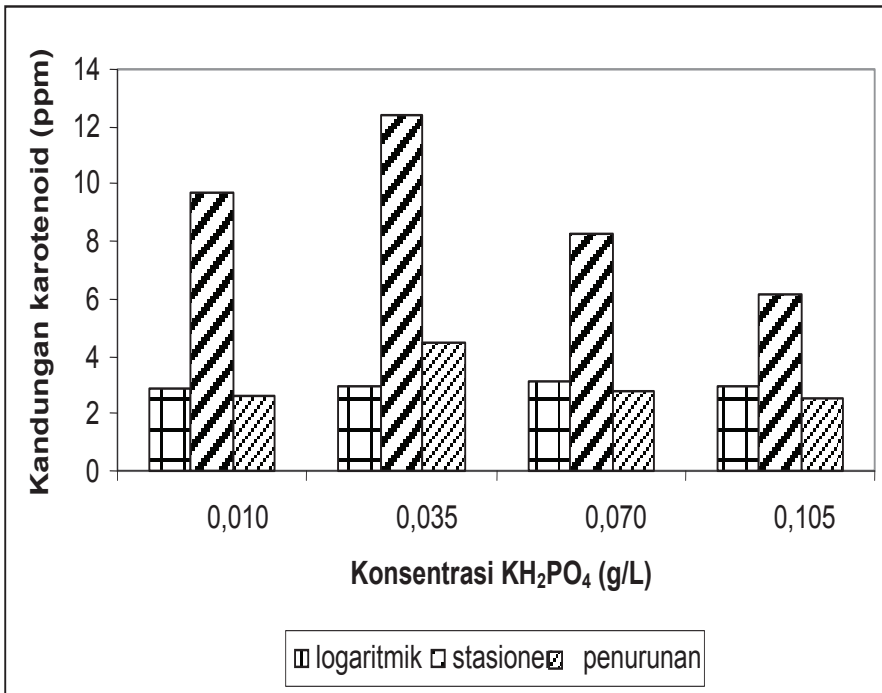
Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Dunaliella salina*



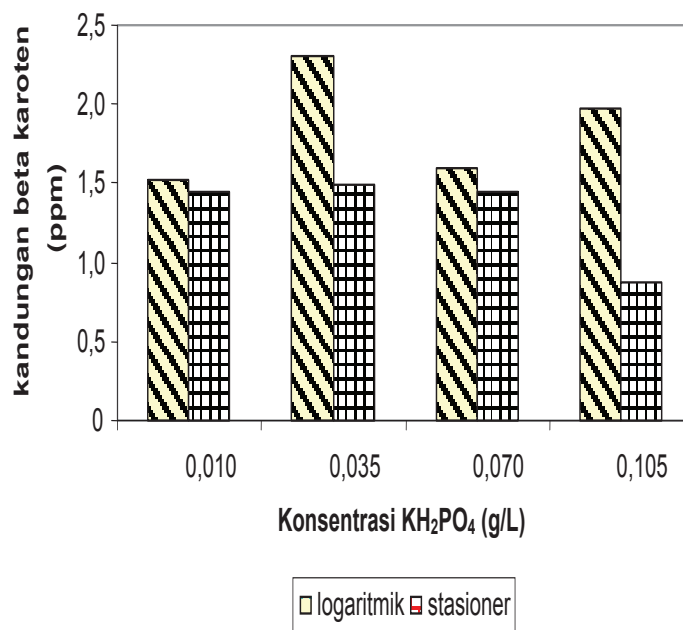
Gambar. 2. Kandungan klorofil total *Dunaliella salina*



Gambar 3. Spektrum Karotenoid *Dunaliella salina*



Gambar 4. Kandungan karotenoid dari *Dunaliella salina* pada berbagai variasi penambahan KH_2PO_4 sebagai sumber fosfat



Gambar 5. Kandungan beta karoten *Dunaliella salina*

Tabel 2. Data baku pembanding beta karoten

No.	Konsentrasi (ppm)	Waktu Retensi (menit)	Luas Puncak
1.	0,5	0,673	1139
2.	1,0	0,640	1369
3.	1,5	0,650	1606

Tabel 3. Hasil analisis kuantitatif beta karoten

Fase Pertum- buhan	Sam- pel g/L	Waktu Reten- si	Luas Area	Kadar (ppm)	Kadar rata-rata \pm SD
Logarit- mik	0,01	0,957	1612	1,515	1,848 \pm 0,366
	0,035	0,932	1982	2,308	
	0,070	0,613	1649	1,595	
	0,105	0,855	1826	1,974	
Stasio- ner	0,01	0,642	1577	1,440	1,315 \pm 0,297
	0,035	0,627	1603	1,496	
	0,070	0,612	1582	1,451	
	0,105	0,633	1311	0,871	