

LAPORAN AKHIR PENELITIAN
PENELITIAN PRODUK TERAPAN



ISOLASI DAN SKRINING OLEAGINOUS MIKROALGA LAUT DI PERAIRAN KENDARI
YANG POTENTIAL UNTUK DIKULTUR MASSAL PADA HYPERSALINE MEDIA SEBAGAI
BIODIESEL FEEDSTOCK

Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun

Ketua/Anggota Tim

Indrayani, S.Pi, M.Biotech.Stu, Ph.D (NIDN: 0023127404)

Haslianti, S.Pi, M.Si (NIDN: 0017077906)

UNIVERSITAS HALUOLEO

Oktober 2017

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : ISOLASI DAN SKRINING OLEAGINOUS
MIKROALGA LAUT DI PERAIRAN KENDARI YANG
POTENTIAL UNTUK DIKULTUR MASSAL PADA
HYPERMINE MEDIA SEBAGAI BIODIESEL
FEEDSTOCK

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : INDRAYANI, S.Pi, M.Biotech
Perguruan Tinggi : Universitas Halu Oleo
NIDN : 0023127404
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Manajemen Sumber Daya Perairan
Nomor HP : 082188629424
Alamat surel (e-mail) : indrayani_tajudin@yahoo.com.au

Anggota (1)
Nama Lengkap : HASLIANTI M.Si
NIDN : 0017077906
Perguruan Tinggi : Universitas Halu Oleo

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 56,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 220,000,000

Mengetahui,
Dekan FPIK UHO



(Prof. H. La Sara, M.Si, PhD)
NIP/NIK 196004221897031003

Kota Kendari, 27 - 10 - 2017
Ketua,

(INDRAYANI, S.Pi, M.Biotech)
NIP/NIK 132297346

Menyetujui,
Ketua LPPM



(Dr.H. La Aba, S.Si, M.Si)
NIP/NIK 196912311997031011

RINGKASAN

Kebutuhan dunia akan bahan bakar fosil yang terus meningkat sementara persediaan yang semakin menipis ditambah lagi dengan masalah lingkungan yang ditimbulkan oleh penggunaan fosil fuel yaitu Green House Gases (GHG) telah memotivasi para scientists untuk memikirkan berbagai alternative sumber biofuels terutama biodiesel. Mikroalga sebagai alternative feedstock untuk produksi biodiesel telah menjadi perhatian secara global sejak beberapa tahun terakhir dikarenakan mikroalgae memiliki banyak keunggulan dibandingkan biodiesel feedstock lainnya seperti canola, rapeseed, jatropha, coconut maupun palm oil. Mikroalgae memiliki pertumbuhan yang cepat (dapat di panen setiap hari), kandungan lipid yang tinggi (oleaginous microalgae) hingga 80% dari berat kering biomass yang dapat dikonversi menjadi biodiesel serta lebih sustainable karena dapat dikultur pada lahan yang tidak produktif untuk tanaman pangan, dapat memanfaatkan air laut serta tidak akan memicu issue “food vs fuel feud”. Selain itu, mikroalga memiliki banyak senyawa lain yang dapat menjadi produk sampingan dari biodiesel. Kultur mikroalga juga dapat diintegrasikan dengan pengolahan limbah cair maupun untuk CO₂ bioremediation.

Meskipun memiliki banyak kelebihan namun banyak juga permasalahan yang menghambat komersialisasi mikroalgae sebagai biodiesel feedstock. Permasalahan terbesar adalah tingginya biaya produksi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengurangi tingginya biaya produksi adalah seleksi species/strain yang sangat productive yang dapat dikultur sepanjang tahun pada kondisi iklim yang optimal dengan menggunakan kultur sistem yang biaya kapital dan operasionalnya lebih murah yakni sistem kolam terbuka (open pond sistem). Mikroalga laut yang dapat tumbuh dengan baik pada salinitas yang tinggi (hypersaline) adalah yang paling potensial dan lebih sustainable sebagai biodiesel feedstock karena lebih memungkinkan untuk dikembangkan secara massal dengan sistem kolam terbuka dengan memanfaatkan air laut dan lahan-lahan yang tidak produktif untuk tanaman pertanian. Selain itu, kultur massal pada hypersaline media akan mengurangi resiko kontaminasi oleh non-target spesies yang merupakan permasalahan utama pada kultur massal outdoor dan menjadi penyebab umum kultur kolaps.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi species lokal mikroalgae laut yang memiliki kandungan lipid yang tinggi, pertumbuhan yang cepat serta dapat dikultur secara massal di outdoor menggunakan media dengan salinitas tinggi ($\geq 3\%$ NaCl) untuk produksi biodiesel. Penelitian ini direncanakan dalam 3 tahun. Tahun ke-1 melakukan isolasi species lokal mikroalga laut dari berbagai habitat perairan asin (estuaria dan pantai/ laut) perairan sekitar kota Kendari, Sulawesi Tenggara (pantai Nambo, pantai Toronipa, pulau Bokori, muara sunagn Wanggu dan Lasolo). Tahun ke-2 melakukan skrining/seleksi terhadap isolate mikroalgae yang memiliki karakeiristik unggul yakni pertumbuhan yang cepat, kandungan lemak yang tinggi serta kemampuannya untuk hidup pada salinitas yang tinggi ($>3\%$ NaCl) dan tahun ke-3 melakukan ujicoba kultur massal di outdoor open pond system (raceway ponds) terhadap species-species yang unggul (2-3 species unggul).

Target luaran dari penelitian ini adalah 1). Akan diperoleh puluhan hingga ratusan isolate species lokal mikroalga laut. 2). Rekomendasi species/strain yang paling potensial sebagai biodiesel feedstock. 3). Akan dihasilkan beberapa publikasi baik pada jurnal nasional maupun jurnal international. 4). Hasil penelitian juga akan dipresentasikan pada konferensi Nasional dan International. 5). Dapat memperkaya bahan ajar mata kuliah planktonologi, budidaya pakan alami, bioteknologi perairan dan bioprospecting kelautan.

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN	iii
DAFTAR ISI.....	1
DAFTAR TABEL	2
DAFTAR GAMBAR.....	3
DAFTAR LAMPIRAN.....	4
BAB I. PENDAHULUAN.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	11
Tahapan Penelitian	11
Tahun 1. Isolasi dan Identifikasi	11
Tahun 2. Skrining	13
Tahun 3. Kultur massal di outdoor	14
Metode Analisis	16
Penghitungan jumlah sel	16
Menentukan laju pertumbuhan specific (Specific growth rate)	16
Menentukan berat kering biomass (Dry weight (DW) dan berat kering organik (ash free dry weight (AFDW))	16
Lipid Extraction	16
Analisa Data	16
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	17
5.1. Survey Lokasi Penelitian	17
5.2. Isolasi Mikroalga.....	17
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	27
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	32

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Daftar Species Mikroalgae yang Baru Diisolasi dari Perairan Kendari Sulawesi Tenggara, Indonesia	16
2	Parameter Fisika Perairan di Lokasi Pengambilan Sampel.....	20
3	Parameter Kimia Perairan di Lokasi Pengambilan Sampel.....	20
4	Jenis dan Kelimpahan Phytoplankton di Lokasi Pengambilan Sampel	21

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 Hasil plating ke 1 dari sampel hasil penyaringan dengan plankton net (kiri) Dan dari sampel hasil enrichment (kanan)	14
2 Koloni yang muncul pada media agar. a. Hasil Plating ke 1, b. Hasil Plating ke 2, c. Hasil Plating ke 3.....	15
3 Sampel hasil isolasi dengan mikromanipulasi (isolasi langsung)	16
4 Photomicrograph (pembesaran 100x) mikroalgae yang baru diisolasi yang potesial untuk dikultur massal di outdoor: A-B. <i>Navicula</i> sp, C. <i>Melosira</i> sp, D-G. <i>Diatoma</i> sp, H. <i>Chlamydomonas</i> sp I. <i>Chlorococcum</i> sp, J. <i>Chlorella</i> sp, K. <i>Oscillatoria</i> sp, L. Coccoid red cyanobacteria	19

DAFTAR LAMPIRAN

No		Halaman
1	Survey Lokasi di Muara Sungai Wanggu	28
2	Survey Lokasi di Pantai Tanjung Tiram.....	28
3	Survey Lokasi di Pantai Nambo	28
4	Survey Lokasi di Pantai Toronipa	29
5	Survey Lokasi di Pantai Batu Gong	29
6	Survey Lokasi di Pulau Bokori	29
7	Kegiatan Pembuatan Stok Solution dan f/2 medium	30
8	Pengambilan Sampel Plankton dengan plankton net (kiri) dan pengukuran kualitas air (kanan)	30
9	Kegiatan isolasi dengan metode plating pada media agar. Plating ke 1 (kiri) dan plating ke 2 (kanan)	30
10	Kegiatan isolasi dengan metode pengenceran	31
11	Inkubasi sampel hasil pengenceran pada rak kultur	31
12	Kegiatan plating ke 3 dari hasil plating ke 2	31
13	Isolate species lokal mikroalga yang dihasilkan pada media agar	32
14	Isolates pada 24 dan 96 Microtiter Well-Plates	32
15	Transfer Kultur dari Microtiter Well-Plates ke 5 mL	32
16	Skale-up Kulturdari 5 mL ke 50 mL	33
17	Inkubasi Biakan Murni pada Rak Kultur	33
18	Identifikasi Isolate Mikroalgae	34
19	Draft paper for publication at International Journal (Biodiversitas (Q4, Scopus) or Phycological Research (Q3, Scopus)	35

BAB I. PENDAHULUAN

Mikroalga adalah mikroorganisme prokaryotic maupun eukaryotic yang berfotosynthesis yang dapat ditemukan pada hampir semua ekosistem baik aquatic maupun terrestrial (Richmond 2004; Mata et al. 2010). Mikroalga merupakan salah satu sumber biodiesel yang paling menjanjikan untuk dikembangkan sebagai alternative dari bahan bakar fosil untuk memenuhi kebutuhan global akan bahan bakar (Chisti 2007). Upaya pengembangan microalga sebagai sumber biodiesel sedang dilakukan secara extensive di seluruh dunia (Wijffels and Barba 2010). Beberapa keunggulan yang dimiliki oleh mikroalga sebagai biodiesel feedstock diantaranya kandungan lipid/oil microalga yang sangat tinggi (Schenk et al. 2008). Pertumbuhan yang cepat dan bisa menggandakan biomas dalam hitungan jam (Spolaore et al. 2006; Chisti 2007). Produksi mikroalga tidak mengganggu rantai suplay makanan dibandingkan dengan sumber biodiesel lainnya seperti kelapa sawit, jagung dan kedelai (Chisti 2007). Produksi microalga tidak berkompetisi lahan dengan produksi tanaman pangan dikarenakan produksi mikroalga tidak membutuhkan lahan yang sangat luas serta dapat memanfaatkan lahan tidur yang tidak dapat dimanfaatkan untuk produksi tanaman pangan seperti lahan kering dan lahan yang terpengaruh air laut sehingga lebih sustainable (Borowitzka and Moheimani 2013b). Mikroalga mengandung senyawa/bahan kimia lainnya yang dapat dihasilkan sebagai produk sampingan seperti pigment bernilai tinggi, protein dan carbohydrate serta residue biomass yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan atau fertiliser ataupun untuk menghasilkan ethanol dan methane (Spolaore et al. 2006). Microalga memiliki kemampuan untuk memanfaatkan CO₂ dari hasil buangan industry (flue gasses) sehingga dapat diusahakan secara untuk produksi biomass dan bioremediasi CO₂ serta dapat juga dimanfaatkan untuk pengolahan limbah cair dikarenakan microalga dapat memanfaatkan nutrient yang berlebihan pada limbah cair ataupun mengabsorpsi limbah logam berat sehingga dapat diusahakan secara bersama-sama untuk pengolahan limbah cair dan produksi biomass mikroalga (Chisti 2007).

Pengembangan microalga sebagai biodiesel feedstock di Indonesia sangat jauh tertinggal dibandingkan negara-negara lain seperti Australia, Amerika, Kanada, Jerman dan China. Padahal Indonesia memiliki potensi yang jauh lebih besar untuk memproduksi biodiesel dari microalga. Indonesia adalah negara tropis yang memiliki iklim yang sesuai untuk membudidayakan mikroalga (suhu dan cahaya matahari yang optimal sepanjang tahun) sehingga produktivitas akan tinggi sepanjang tahun. Indonesia memiliki ribuan pulau sehingga memiliki daerah pesisir/pantai yang sangat banyak dan luas yang merupakan lokasi ideal untuk kultur microalga laut. Indonesia memiliki biodiversity microalga yang sangat

besar yang belum banyak dieksplorasi. Menurut Borowitzka (personal communication), pengembangan microalgae untuk biodiesel lebih dimungkinkan di negara-negara dimana iklimnya mendukung pertumbuhan mikroalga sepanjang tahun, lahan dan tenaga kerja tersedia dengan biaya yang lebih murah sehingga biaya produksi akan jauh lebih rendah. Penelitian tentang mikroalga untuk biodiesel sudah banyak dilakukan di Indonesia namun belum ada yang secara specific memfokuskan penelitian pada microalgae yang mampu hidup pada lingkungan yang hypersaline padahal ini merupakan salah satu syarat penting untuk keberhasilan produksi massal mikroalga menggunakan sistem kultur kolam terbuka di outdoor (outdoor open pond systems) terutama untuk produksi biodiesel.

Kultur massal microalgae untuk biofuels membutuhkan air yang sangat banyak (Borowitzka and Moheimani 2013b; Fon Sing et al. 2013). Jika menggunakan air tawar maka akan secara langsung berkompetisi dengan tanaman pangan, industry dan rumah tangga untuk penggunaan sumber daya air tawar yang terbatas. Sebaliknya penggunaan air laut/asin lebih sustainable dan ekonomis (Yang et al. 2011; Resurreccion et al. 2012). Namun, mikroalga yang dikultur dengan menggunakan media air laut khususnya pada kolam terbuka akan mengalami fluktuasi salinitas disebabkan oleh evaporasi dan hujan dan salinitas medium akan sangat tergantung apakah air tawar atau air laut yang digunakan untuk menggantikan kehilangan air akibat evaporasi. Jika air tawar yang digunakan untuk menggantikan kehilangan air akibat evaporasi maka akan sangat banyak air tawar yang dibutuhkan sementara jika air laut yang digunakan maka salinitas medium akan terus meningkat. Oleh karena itu untuk keberhasilan dan sustainabilitas dari kultur massal jangka panjang menggunakan air laut, maka mikroalga yang memiliki toleransi yang luas terhadap salinitas menjadi sangat penting (Borowitzka and Moheimani 2013b). Selain itu mikroalga yang dikultur pada hypersaline media tidak akan mudah terkontaminasi oleh organisme lain termasuk protozoa, zooplankton maupun jenis microalgae lainnya sehingga akan lebih memungkinkan untuk di kultur secara massal di outdoor untuk jangka panjang (Borowitzka 2013b). Untuk produksi biodiesel, spesies/strain yang euryhaline pada lingkungan yang hypersaline saja tidak cukup. Strain yang unggul harus juga memiliki karakteristik lainnya yaitu kandungan lipid yang tinggi, pertumbuhan yang cepat sehingga produktifitas biomass dan lipidnya juga akan tinggi. Hal inilah yang menjadi alasan pentingnya untuk terus melakukan skrining untuk mendapat strain yang terbaik untuk meningkatkan produktivitas biomass dan lipid (Barclay and Apt 2013).

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Microalgae merupakan feedstock yang paling potensial untuk produksi biofuels terutama biodiesel (Ndimba et al. 2013). Biodiesel dari microalgae telah direview secara ekstensive oleh beberapa penulis (Chisti 2007; Hu et al. 2008; Mata et al. 2010). Potensi microalgae sebagai biodiesel feedstock adalah karena kemampuannya untuk mengakumulasi lipid dalam jumlah yang banyak yang dapat dikonversi menjadi biodiesel (Parmar et al. 2011). Mikroalgae untuk produksi biodiesel lebih sustainable karena dapat dikultur pada lahan yang tidak produktif untuk tanaman pertanian (non-arable land) dan dapat memanfaatkan air laut sehingga tidak akan berkompetisi dengan tanaman pangan untuk lahan maupun air tawar (Borowitzka and Moheimani 2013b). Mikroalga juga dapat memanfaatkan buangan gas dari industry sebagai sumber karbon (Chisti 2007)

Lipid yield dari mikroalga jauh lebih tinggi dibandingkan tanaman darat. Mikroalga dapat menghasilkan 58.700 – 136.900 L oil ha⁻¹year⁻¹ dibandingkan dengan soybean (636 L oil ha⁻¹year⁻¹), jatropha (741 L oil ha⁻¹year⁻¹), canola (974 L oil ha⁻¹year⁻¹) dan palm oil (5366 L oil ha⁻¹year⁻¹) (Ahmad et al. 2011). Kandungan lipid mikroalga sangat bervariasi tergantung spesies/strain. Kandungan lipid dari ratusan mikroalga yang telah diteliti berkisar antara 1 – 85% dari berat kering biomass (Spolaore et al. 2006; Chisti 2007). *Nannochloropsis* spp dan *Botryococcus braunii* dapat mengakumulasi hingga 80% of lipid (Larkum et al. 2012) sementara *Chlorella pyrenoidosa* dapat mengakumulasi hingga 85% lipid dalam kondisi kekurangan nitrogen (Rodolfi et al. 2009).

Beberapa faktor penting yang perlu dipertimbangkan dalam pengembangan biodiesel dari mikroalga. Seleksi spesies/strain adalah faktor yang pertama dan terpenting yang menentukan keberhasilan komersialisasi mikroalga dan seleksi spesies yang tepat merupakan faktor terpenting untuk kesuksesan produksi biodiesel dari mikroalga (Borowitzka 2013b). Strain yang ideal untuk produksi biofuels harus memiliki karakteristik sebagai berikut: (1) mempunyai produktivitas lipid yang tinggi; (2) memiliki toleransi yang luas terhadap suhu dan salinitas; (3) mikroalga laut (lebih baik yang hypersaline spesies) sehingga memungkinkan untuk dikultur massal di sistem kultur kolam terbuka (open pond sistem); (4) dapat memanfaatkan kelebihan nutrient pada limbah cair sehingga dapat diintegrasikan dengan sistem pengolahan limbah; (5) menghasilkan co-product yang bernilai tinggi; (6) serta dapat memanfaatkan buangan gas CO₂ dari industri (Sheehan et al. 1998; Borowitzka 2013b). Sampai saat ini sangat sulit untuk mendapatkan spesies yang bisa memenuhi semua kriteria tersebut diatas. Namun di yakini bahwa spesies yang memiliki adaptasi spesifik

terhadap suatu lingkungan tertentu menjadi kunci keberhasilan produksi mikroalga secara komersial karena memungkinkan mikroalga terekspose pada kondisi lingkungan tertentu dimana tidak banyak organisme yang bisa bertahansetempat jika dibandingkan dengan menggunakan spesies yang diimport yang belum tentu sesuai dengan iklim/lingkungan setempat (Sheehan et al. 1998). Spesies-spesie microalgae yang telah diproduksi secara komersial memiliki lingkungan yang selektif termasuk diantaranya *Dunaliella salina* yang diproduksi secara komersil untuk produksi β -carotene (production plant terbesar di Australia) yang hidup pada salinitas yang sangat tinggi mencapai 30% NaCl, *Spirulina* yang menyukai lingkungan dengan pH tinggi (9-11) telah di produksi secara komersial oleh Dainippon Ink dan Chemicals di Hainan (China), Earthrise Nutritional farms di California dan Cyanotech di Hawaii (USA), *Chlorella* yang menyukai media dengan kandungan nutrient yang tinggi telah diproduksi secara komersial oleh Taiwan Chlorella Manufacturing and Co (Taiwan) dan juga di Klotze (Germany) dan *Haematococcus pluvialis* sebagai penghasil pigment astaxanthin telah dibudidayakan secara komersial di Hawaii, India dan Israel (Olaizola 2003; Pulz and Gross 2004). Faktor penting lainnya adalah lokasi kultur yang memungkinkan untuk produksi sepanjang tahun (high insulation and acceptable temperature range) (Brennan and Owende 2010; Fon Sing et al. 2013).

Produksi massal microalgae secara komersial dapat dilakukan melalui dua system yakni system terbuka (open system) atau system tertutup (photobioreactors) (Borowitzka 1999). Produksi mikroalga pada kolam terbuka telah digunakan sejak tahun 1950 an. Sistem terbuka dapat dikategorikan ke dalam: perairan alam (danau, laguna dan kolam) dan kolam buatan atau container. Raceway pond adalah system kultur terbuka di outdoor yang paling umum digunakan untuk produksi komersial mikroalga (Borowitzka and Moheimani 2013a). Raceway pond terdiri atas sebuah sirkuit dengan saluran yang parallel yang dilengkapi dengan paddlewheel yang digunakan untuk mensirkulasi kultur mikroalgae (Zittelli et al. 2013). Raceway pond dapat terbuat dari concrete atau galian ditanah yang kemudian dilapisi dengan plastic atau terbuat dari fibreglass. Sistem ini yang digunakan untuk produksi *Spirulina* / *Arthrospira* oleh Earthrise Nutritionals, LLC (California, USA) and Hainan DIC Microalgae (China) dan untuk memproduksi astaxanthin dari *Haematococcus pluvialis* oleh Cyanotech Co. (Hawaii, USA) dan Parry Agro Industries Ltd (India) (Zittelli et al. 2013) dan juga untuk produksi komersil *Dunaliella* (Borowitzka 2013a).

Sistem kultur lainnya adalah photobioreaktor dikembangkan dengan tujuan untuk menutupi kekurangan utama dari system kultur terbuka yakni masalah polusi dan kontaminasi (Tredici 2004). Yang termasuk system tertutup adalah tubular, plate, dan

column photobioreactors. Photobioreaktor memungkinkan kultur tunggal spesies microalgae untuk jangka waktu yang lama karena kecil kemungkinan terjadi kontaminasi dan lebih cocok digunakan untuk spesies microalgae yang sensitive (Tredici and Materassi 1992; Tredici 2004, 2010). Namun, kapital cost dari system tertutup jauh lebih mahal dari pada system kolam terbuka. Dibandingkan dengan photobioreaktor, sistem kolam terbuka merupakan metode produksi massal biomas mikroalga yang paling murah dan lebih banyak digunakan untuk produksi komersil mikroalga (Borowitzka and Moheimani 2013a; Borowitzka and Moheimani 2013b).

Study tentang pengembangan mikroalga sebagai biodiesel feedstock sudah sangat banyak dilakukan namun kebanyakan masih terbatas pada skala kecil di laboratorium dan belum banyak yang sampai pada kultur massal terutama yang menggunakan sistem kolam terbuka serta secara spesifik fokus pada lingkungan yang selektif terutama lingkungan yang bersalinitas tinggi (hypersaline). Beberapa spesies mikroalga yang berhasil dikultur massal di outdoor dalam jangka panjang menggunakan saline-hypersaline media termasuk *Amphora coffeaeformis* MUR158 yang dilakukan oleh Mercz (1994), *Tetraselmis* spp (Fon-Sing and Borowitzka 2016), *Pleurochrysis carterae* (Moheimani and Borowitzka 2006, 2007), *Amphora* sp MUR 258 (Indrayani 2017). Spesies-spesies tersebut diatas merupakan spesies-spesies unggul dan sangat potensial untuk dikembangkan sebagai biodiesel feedstock karena produktivitas lipidnya tinggi serta dapat dikultur massal di outdoor dalam jangka waktu lama sehingga dapat diproduksi sepanjang tahun.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi species lokal microalgae laut yang memiliki kandungan lipid yang tinggi, pertumbuhan yang cepat serta dapat dikultur secara massal di outdoor menggunakan media dengan salinitas tinggi ($\geq 3\%$ NaCl) untuk produksi biodiesel. Untuk mencapai tujuan tersebut maka akan dilakukan beberapa tahapan kegiatan yakni 1). Mengisolasi species lokal mikroalga laut dari berbagai habitat perairan asin termasuk estuaria dan pantai/ laut, 2). Melakukan skrining/seleksi terhadap isolate microalgae yang memiliki pertumbuhan yang cepat, kandungan lemak yang tinggi serta kemampuannya untuk hidup pada salinitas yang tinggi ($>3\%$ NaCl), 3). Melakukan ujicoba kultur massal di outdoor open pond system (raceway ponds) selama kurang lebih 6 bulan terhadap species-species yang unggul (2-3 species).

Target luaran (output) dari penelitian ini adalah 1). Akan diperoleh puluhan hingga ratusan isolate species lokal mikroalga laut yang selanjutnya akan disimpan dan dikembangkan untuk dipersiapkan sebagai cikal bakal pembentukan koleksi kultur mikroalga pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Haluoleo dan juga sebagai bahan/material penelitian dan pengembangan microalgae untuk aplikasi komersial". 2). Rekomendasi species/strain yang paling potensial sebagai biodiesel feedstock (2-3 species). 3). Akan dihasilkan beberapa publikasi baik pada jurnal nasional maupun jurnal international. 4). Hasil penelitian akan dipresentasikan pada konferensi Nasional dan International. 5). Akan memperkaya bahan ajar pada kuliah planktonologi, budidaya pakan alami, bioteknologi perairan dan bioprospecting kelautan.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Tahapan Penelitian

Penelitian ini direncanakan akan berlangsung selama 3 tahun dengan tahapan sebagai berikut:

Tahun 1. Isolasi dan Identifikasi

Survey Lokasi Pengambilan Sampel air/mikroalga

Survey dilakukan di lokasi-lokasi yang dianggap sesuai dengan target capaian yakni isolasi mikroalga laut spesies lokal di perairan Kendari Sulawesi Tenggara termasuk di perairan pantai dan muara sungai. Lokasi-lokasi yang dimaksud adalah Muara Sungai Wanggu, Pantai Tanjung Tiram, Pantai Nambu, Pantai Batu Gong, Pantai Toronipa dan Pulau Bokori.

Persiapan alat dan bahan.

Melakukan pembelian dan pemesanan peralatan dan bahan-bahan dasar yang akan digunakan untuk keperluan isolasi seperti bahan untuk pembuatan media, wadah kultur serta menyiapkan ruang kultur untuk inkubasi/menumbuhkan mikroalga termasuk rak kultur, lampu untuk penerangan/sumber cahaya dilengkapi dengan alat timer (pengatur waktu lampu on dan off).

Pembuatan media kultur

Media kultur yang dipersiapkan adalah f/2 medium (Guillard and Ryther 1962). Agar medium dibuat dengan menambahkan 1% agar ke dalam liquid f/2 medium. Air laut yang digunakan untuk pembuatan media sebelumnya difilter melalui tank filter yang berisi kapas dan arang yang disusun secara berlapis dan berselang-seling. Salinitas media disesuaikan dengan salinitas lokasi pengambilan sampel.

Jenis medium kultur yang digunakan adalah f/2 medium. Medium kultur yang dibuat ada 2 jenis yakni agar f/2 medium dan liquid f/2 medium (medium cair). Prosedur pembuatan medium kultur adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan stok solution f/2 medium.

Untuk pembuatan stok solution f/2 medium digunakan air aquadest untuk melarutkan nutrient. Stok solution yang dibuat adalah nitrat NaNO_3 , phosphat NaH_2PO_4 , Silika Na_2SiO_3 , trace elements dan vitamin. Masing-masing stok solution dibuat terpisah

dengan konsentrasi yang berbeda-beda yakni nitrat NaNO_3 (75g/l), fosfat NaH_2PO_4 (5.65g/l), Silika NaSiO_3 (30g/l) dan trace elements.

2. Pembuatan f/2 medium.

Air laut yang diperoleh dari masing-masing lokasi digunakan untuk pembuatan bahan dasar f/2 medium. Air laut terlebih dulu disaring dengan kapas dan filter untuk mendapatkan air laut yang bersih dari kotoran-kotoran dan sebagian besar kontaminan baik zooplankton maupun mikroalga. Air laut yang telah difilter kemudian ditambahkan dengan nutrient dari stok solution f/2 medium termasuk nitrat (NaNO_3), fosfat (NaH_2PO_4), Silika (NaSiO_3) dan trace elements dengan dengan dosis untuk f/2 medium yakni masing 1 mL/1 Liter medium kultur. Untuk pembuatan medium agar, liquid medium ditambahkan dengan 1% agar (Merck). f/2 medium baik yang liquid maupun yang agar selanjutnya di autoclave pada suhu 121°C . Setelah di autoclave, liquid medium didinginkan semalaman sebelum digunakan sementara untuk agar medium didiamkan sekitar 10 menit baru kemudian di tuang ke cawan petri dalam kondisi steril. Setelah medium agar dingin baru kemudian disimpan di lemari pendingin untuk digunakan sewaktu-waktu.

Pengambilan Sampel air untuk keperluan isolasi

Pengambilan sampel dilakukan di 5 lokasi yakni pantai Tanjung Tiram, pantai Nambo, pantai Batu Gong, pantai Toronipa dan pulau Bokori. Hal-hal yang dilakukan saat sampling pada masing-masing lokasi adalah :

1. Pengambilan sampel air dengan menggunakan plankton net. Tujuan dari pengambilan sampel plankton adalah untuk mendapatkan data tentang jenis-jenis dan kelimpahan phytoplankton yang merupakan mikroalga planktonik (yang melayang-layang di dalam perairan).

2. Pengambilan sampel air tanpa menggunakan plankton net yang dimasukkan ke dalam botol sampel volume 1500 mL (sebanyak 3 botol untuk masing-masing lokasi).
Sampel air ini digunakan untuk keperluan isolasi dengan metode enrichment/ pengkayaan dengan nutrient dan juga sebagai bahan pembuatan media kultur (f/2 medium).
3. Pengukuran parameter kualitas air termasuk suhu, salinitas, pH, kecerahan, kedalaman (in situ) serta pengambilan sampel air untuk keperluan analisa nitrat, phosphat dan ammonia (ek situ).

Isolasi dan inkubasi isolat

Isolasi dilakukan menggunakan metode isolasi langsung, pengenceran dan penggoresan pada media agar plate dengan mengacu pada Andersen and Kawachi (2005). Sample diinkubasi pada intensitas cahaya rendah ($20-30 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) dengan siklus gelap dan terang (12 jam: 12 jam) pada suhu kamar $27-30^{\circ}\text{C}$.

Biakan murni dan skale-up

Isolat yang didapat selanjutnya akan ditransfer ke 24-microtiter well plate yang berisi 2 mL medium dan selanjutnya diinkubasi pada intensitas $50-70 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, siklus 12 jam gelap:12 jam terang pada suhu kamar. Liquid kultur selanjutnya di scale-up dari 2 mL – 10 mL -50 mL – 100 mL – 500 mL dan 1 L sehingga didapatkan cukup inoculum untuk tahapan selanjutnya (Skrining).

Identifikasi. Identifikasi dilakukan terhadap spesies-spesies mikroalga yang berhasil dikultur monospesies (unialgal culture) dan di skale-up dengan mikroskop berdasarkan jenis pigmen, ciri-ciri morfologi termasuk bentuk sel (filament, bulat atau rod-like), ada atau tidaknya flagel, phyrenoid dan feature lainnya dengan mengacu pada buku identifikasi phytoplankton/mikroalga.

Tahun 2. Skrining

Eksperiment pengaruh salinitas.

Spesies yang mudah dikultur dan di skale up selanjutnya di kultur dalam Erlenmeyer 250 mL berisi 150 mL f/2 medium pada salinitas 5% (w/v), intensitas $70 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, siklus 12 jam gelap :12 jam terang pada 25°C . Hal ini dilakukan sebagai skrining awal spesies yang dapat dikultur pada hypersaline media. Dari hasil skrining awal, spesies yang

terpilih selanjutnya dikultur dalam erlenmeyer 250 mL berisi 150 mL f/2 medium pada intensitas $70 \mu\text{mol photon.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$, siklus 12 jam gelap :12 jam terang pada suhu kamar pada salinitas 3, 5, 7, 9% NaCl (in triplicates). Species yang paling potensial yang memiliki pertumbuhan yang bagus/cepat, kandungan lipid yang tinggi serta memiliki toleransi yang luas pada kisaran salinitas yang tinggi selanjutnya akan dipilih untuk di kultur secara massal di outdoor.

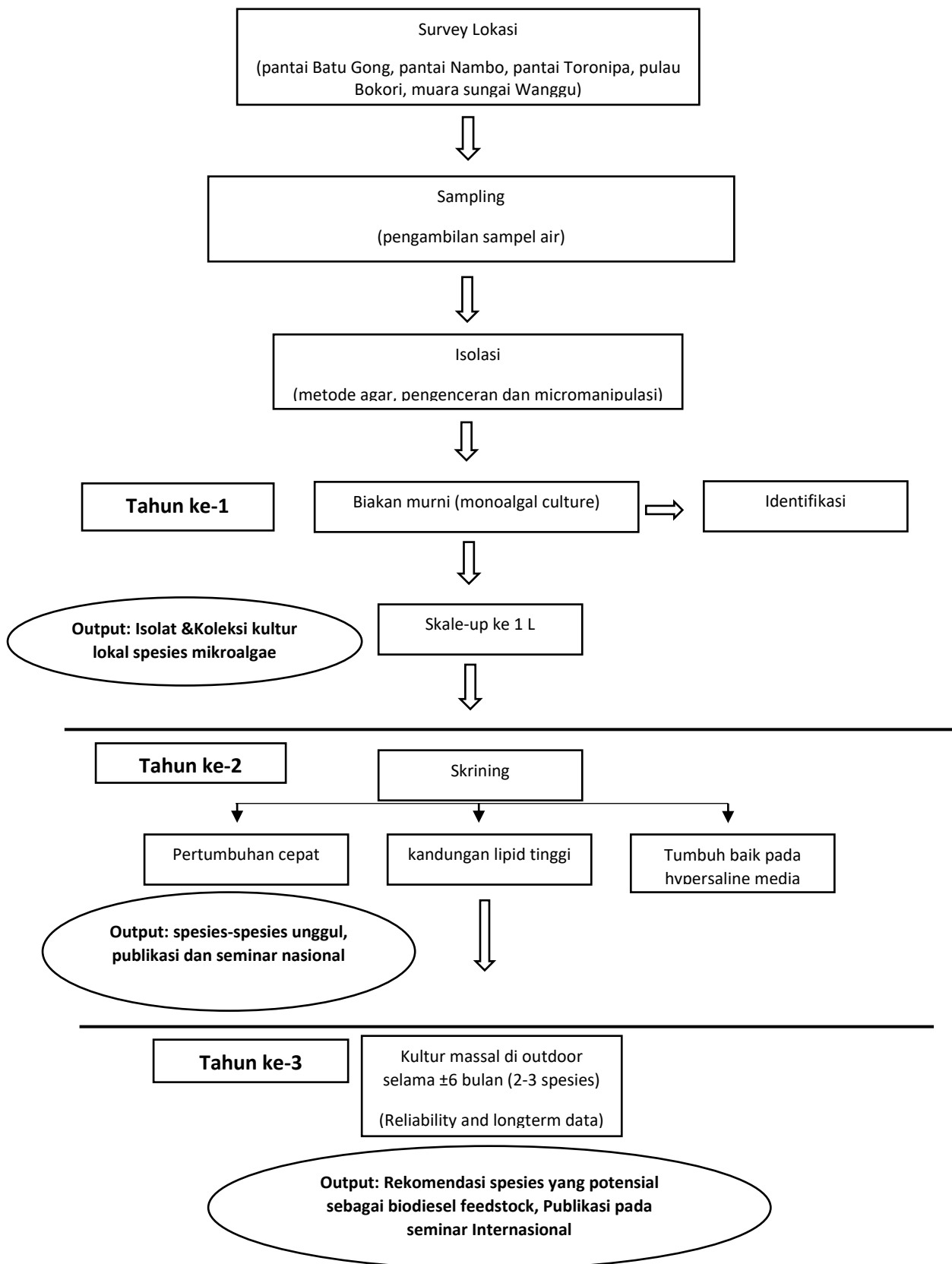
Sampling untuk mengukur pertumbuhan dan kandungan lipid

Sampling untuk mengukur pertumbuhan (penghitungan jumlah sel dan berat kering biomass) dilakukan setiap 2 hari sedangkan untuk analisa kandungan lipid dilakukan pada hari ke 4 (ekponensial phase) dan hari ke 12-15 (early stationary phase) dan hari ke 25-28 (late stationary phase).

Tahun 3. Kultur massal di outdoor

.Kultur outdoor menggunakan raceway pond (fibreglass) berukuran 1 m^2 ($2 \times 0.5 \times 0.4 \text{ m}$, $L \times W \times D$) dan dilengkapi dengan paddlewheels. Species unggul selanjutnya dikultur menggunakan air laut yang telah difilter dan sudah diperkaya dengan nutrient f/2 medium sedangkan salinitasnya diatur sesuai dengan salinitas optimum species yang dikultur. Inokulum untuk kultur massal dipersiapkan di indoor menggunakan beberapa buah carboys volume 20 L.

Adapun bagan alir penelitian adalah :



Metode Analysis

Penghitungan jumlah sel

Pertumbuhan kultur dimonitor dengan menghitung jumlah sel menggunakan Neubauer haemocytometer (Moheimani et al. 2013).

Menentukan laju pertumbuhan specific (Specific growth rate)

Laju pertumbuhan specific (specific growth rate (μ)) dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_2/N_1)}{t_2 - t_1}$$

dimana N_1 and N_2 adalah kepadatan sel pada waktu ke 1 (t_1) and 2 (t_2).

Menentukan berat kering biomass (Dry weight (DW) dan berat kering organic (ash free dry weight (AFDW))

Penentuan DW dan AFDW mengacu pada standar metode untuk mengukur pertumbuhan microalgae (Moheimani et al. 2013):

$$\text{Dry weight (g.L}^{-1}\text{)} = (\text{weight of filters plus algae}) - (\text{weight of filters})$$

Filter kemudian dipindahkan ke oven furnace pada suhu 450°C selama 5 jam. Berat kering 16rganic (Ash-free dry weight) dihitung menggunakan formula berikut:

$$\text{Ash - freedryweight(g.L}^{-1}\text{)} = \text{Dryweight} - \text{weightafterashing}$$

Lipid Extraction

Ekstraksi lipid menggunakan metode Bligh and Dyer (1959) yang dimodifikasi oleh Kates and Volcani (1966) dan diadaptasi oleh Merz (1994).

Analisa Data

Eksperimen pengaruh salinitas dilakukan dalam triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) digunakan untuk melihat perbedaan dari masing-masing perlakuan. Jika uji normalitas dan equal variance test gagal maka akan digunakan the Holm-Sidak pairwise comparison method based on ranks. Semua analisa statistik akan menggunakan Sigma-Plot 13 package.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

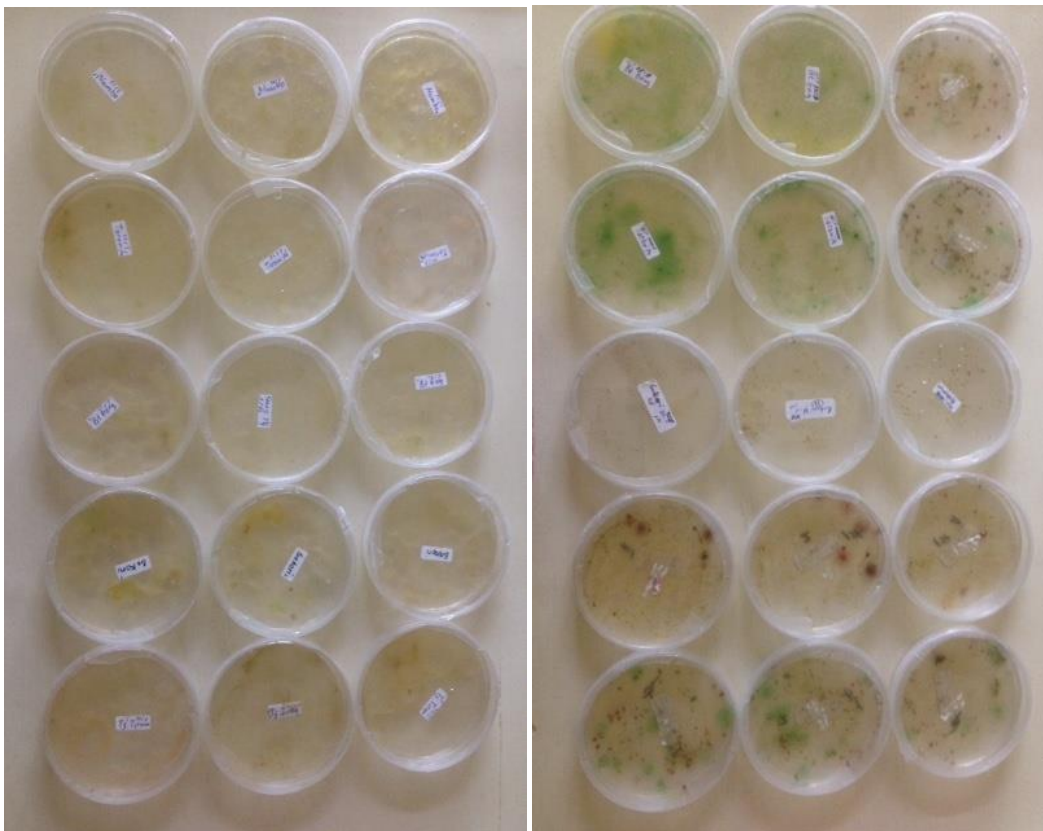
5.1. Survey Lokasi Penelitian

Lokasi yang di survey termasuk pantai Tanjung Tiram, pantai Nambo, muara sungai Wanggu, pantai Batu Gong, pantai Toronipa dan pantai Bokori. Survey lokasi penelitian dilakukan untuk mengetahui kondisi ril lokasi penelitian sehingga akan memudahkan dalam merencanakan kegiatan sampling termasuk menentukan lokasi pengambilan sampel (air dan plankton), banyaknya jumlah sampel yang dibutuhkan serta kesesuaian lokasi penelitian dengan target output. Berdasarkan hasil survey diputuskan untuk melakukan sampling di hampir semua lokasi yang di survey kecuali di muara sungai Wanggu dikarenakan salinitas perairan yang sangat rendah yakni sekitar 5 ppt sementara target penelitian ini adalah untuk mengisolasi species mikroalga laut yang dapat hidup pada salinitas yang tinggi diatas salinitas air laut yakni lebih dari 30 ppt. Selain itu perairan muara juga sangat keruh sehingga kecil kemungkinan untuk mendapatkan spesies target.

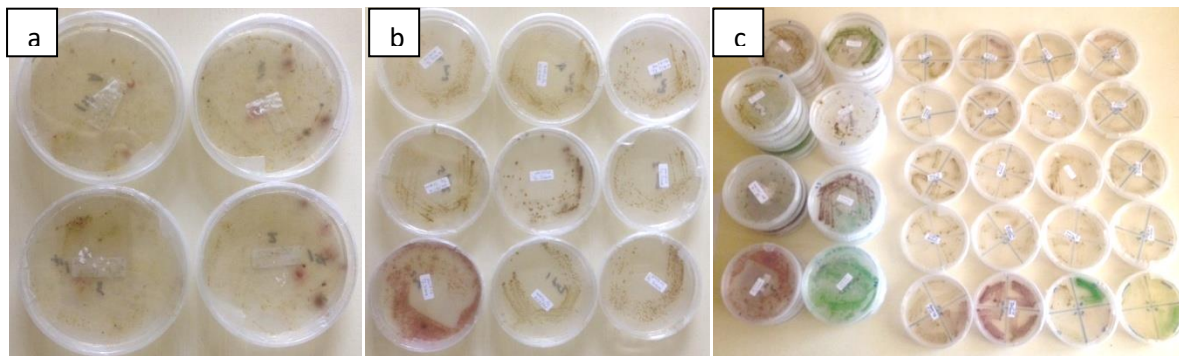
5.2. Isolasi Mikroalga

Metode isolasi yang digunakan adalah agar plating teknik (penggoresan pada media agar), pengenceran/tuang, mikromanipulasi (isolasi langsung) dan enrichment. Untuk metode agar, sampel yang berasal dari plankton net (sebanyak 0,1 mL) di plate pada media agar. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu kamar, pada rak kultur yang dilengkapi dengan lampu neon LED 20 watt dengan siklus gelap dan terang 12 jam terang dan 12 jam gelap. Setelah 3 minggu, beberapa koloni mulai nampak pada media agar namun kondisi agar umumnya berlubang yang semakin lama semakin melebar serta sebagian media mencair. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada sampel yang disaring menggunakan plankton net juga tersaring banyak zooplankton termasuk protozoa (ciliate dan amoeba) yang memakan bakteri dan mikroalga pada permukaan media agar.

Metode lain yang kami coba lakukan adalah metode enrichment (pengkayaan). Sampel air laut yang tidak difilter dengan plankton net dimasukkan ke dalam botol kecil dengan volume 100 mL dan kemudian di tambahkan nutrient dari masing-masing stock solution f/2 medium (nitrat, fosfat, silika dan trace elements) dengan takaran 0,1 ml stok solution/100 ml media kultur dan diinkubasi pada kondisi tersebut diatas. Setelah beberapa minggu warna sampel berubah menjadi kecoklatan dan kehijauan. Sampel tersebut di plate di medium agar yang baru dengan cara yang sama seperti sebelumnya dan diinkubasi pada kondisi kultur yang sama. Setelah 3 minggu, sangat banyak koloni yang tumbuh baik yang berwarna coklat, merah dan hijau. Koloni-koloni tersebut kemudian di transfer ke media agar yang baru untuk di plating ke 2 kalinya. Koloni yang tumbuh pada plating ke 2 nantinya akan di plating lagi untuk ke 3 kalinya sehingga di harapkan di dapatkan isolat yang murni untuk kemudian di transfer ke liquid media dan di selanjutnya di skale up.



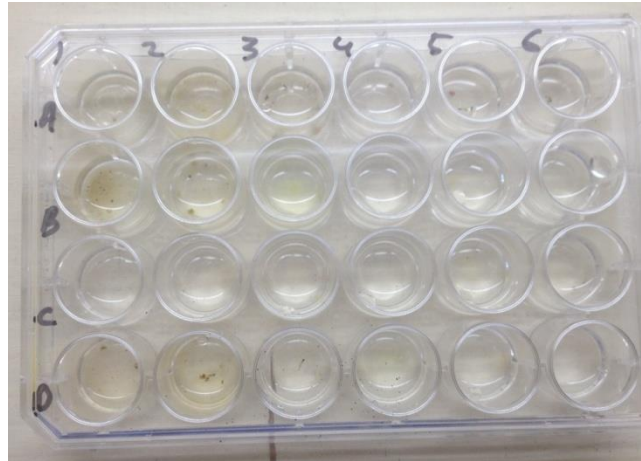
Gambar 1. Hasil plating ke 1 dari sampel hasil penyaringan dengan plankton net (kiri) dan dari sampel hasil enrichment (kanan)



Gambar 2. Koloni yang muncul pada media agar. a. Hasil Plating ke 1, b. Hasil plating ke 2 dan c. Hasil plating ke 3

Isolasi dengan metode mikromanipulasi sulit dilakukan karena tidak tersedianya inverted mikroskop. Namun demikian tetap kami coba untuk melakukan isolasi langsung menggunakan mikroskop biasa. Setelah beberapa minggu, beberapa sampel yang diinkubasi menggunakan 24-mikrotiter well plate (volume 1 mL) menunjukkan perubahan warna menandakan pertumbuhan sel mikroalga. Dari hasil pengamatan di mikroskop belum dihasilkan monokultur/single spesies karena masih terdapat 2-3 spesies sehingga kami coba untuk isolasi kembali dengan mikroamanipulasi untuk mendapatkan unialga kultur.

Isolasi dengan metode pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 ml sampel dari hasil enrichment dan di masukkan ke dalam botol yang bersisi 9 ml medium kultur (pengenceran pertama), sampel dari pengenceran pertama kemudian diambil 1 ml untuk dimasukkan ke botol lain yang berisi 9 ml medium kultur (pengenceran kedua) dan seterusnya hingga pengenceran kelima. Sampel diinkubasi pada kondisi yang sama dengan kultur lainnya.



Gambar 3. Sampel hasil isolasi dengan mikromanipulasi (isolasi langsung)

Dari beberapa metode isolasi yang digunakan, metode enrichment yang dilanjutkan dengan dengan metode agar plating teknik yang memberikan hasil yang lebih baik. Hal ini disebabkan oleh karena sampel yang digunakan tanpa di saring dengan plankton net sehingga jumlah dan kepadatan sel mikroalga jauh lebih sedikit termasuk keberadaan zooplankton yang merupakan pemangsa mikroalga juga jauh lebih sedikit. Dengan penambahan nutrient, maka mikroalga yang ada dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Kondisi kultur yang stagnan menyebabkan mikroalga yang tumbuh membentuk agregat atau menempel pada dasar dan dinding wadah kultur sehingga menyulitkan zooplankton untuk memangsa yang pada akhirnya zooplankton akan mati. Hal ini terlihat pada saat sampel di plating di media agar tidak ditemukan media agar yang berlubang seperti pada saat sampel dari plankton net yang di plating pada media agar. Selain itu koloni yang tumbuh juga lebih cepat sehingga proses pemurnian akan lebih cepat.

Tabel 1. Daftar species mikroalga yang baru diisolasi dari perairan Kendari Sulawesi Tenggara, Indonesia

Kode Isolate	Scientific Name	Lokasi Pengambilan Sampel Mikroalga
IND-UHO 001	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 002	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 003	<i>Chlorella sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 004	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island

IND-UHO 005	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND –UHO 006	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 007	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 008	<i>Diatoma sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 009	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 010	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 011	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 012	<i>Syura sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 013	<i>Syura sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 014	<i>Syura sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 015	<i>Navicula sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 016	<i>Surire sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 017	<i>Chlorella sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 019	<i>Aphanocapsa sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 020	<i>Tabellaria</i>	Bokori Island
IND-UHO 021	<i>Aphanocapsa sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 025	<i>Surire sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 028	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 029	<i>Melosira sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 030	<i>Melosira sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 031	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 033	<i>Chlorella sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 034	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 035	<i>Oscillatoria sp</i>	Bato Gong Beach
IND-UHO 036	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 037	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 038	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 039	<i>Dinobryon sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 040	<i>Melosira sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 041	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 042	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 043	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 044	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 045	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 046	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 051	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 052	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 053	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 054	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa beach

IND-UHO 055	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 056	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 057	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 058	<i>Navicula sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 059	<i>Anabaena sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 060	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 061	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 062	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 063	<i>Navicula sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 064	<i>Melosira sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 065	<i>Oscillatoria sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 066	<i>Oscillatoria sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 067	<i>Diatoma sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 068	<i>Navicula sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 069	<i>Coscinodiscus sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 070	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 072	<i>Chlorella sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 073	<i>Diatoma sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 075	<i>Chlorella sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 076	<i>Chlamydomonas sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 077	<i>Chlorella sp</i>	Nambo Beach

Dari 77 isolate yang berhasil ditumbuhkan pada media cair dan diskale-up ke 50 mL, terdapat 34 isolates yang menunjukkan pertumbuhan yang cepat dan tidak menempel pada wadah kultur sehingga mudah untuk dikultur. Isolate inilah yang selanjutnya akan diskruining untuk kemampuan tumbuh pada salinitas tinggi diatas salinitas air laut (salinitas >4% NaCl). Beberapa isolates yang potensial untuk dikultur massal dapat dilihat pada Gambar 4.

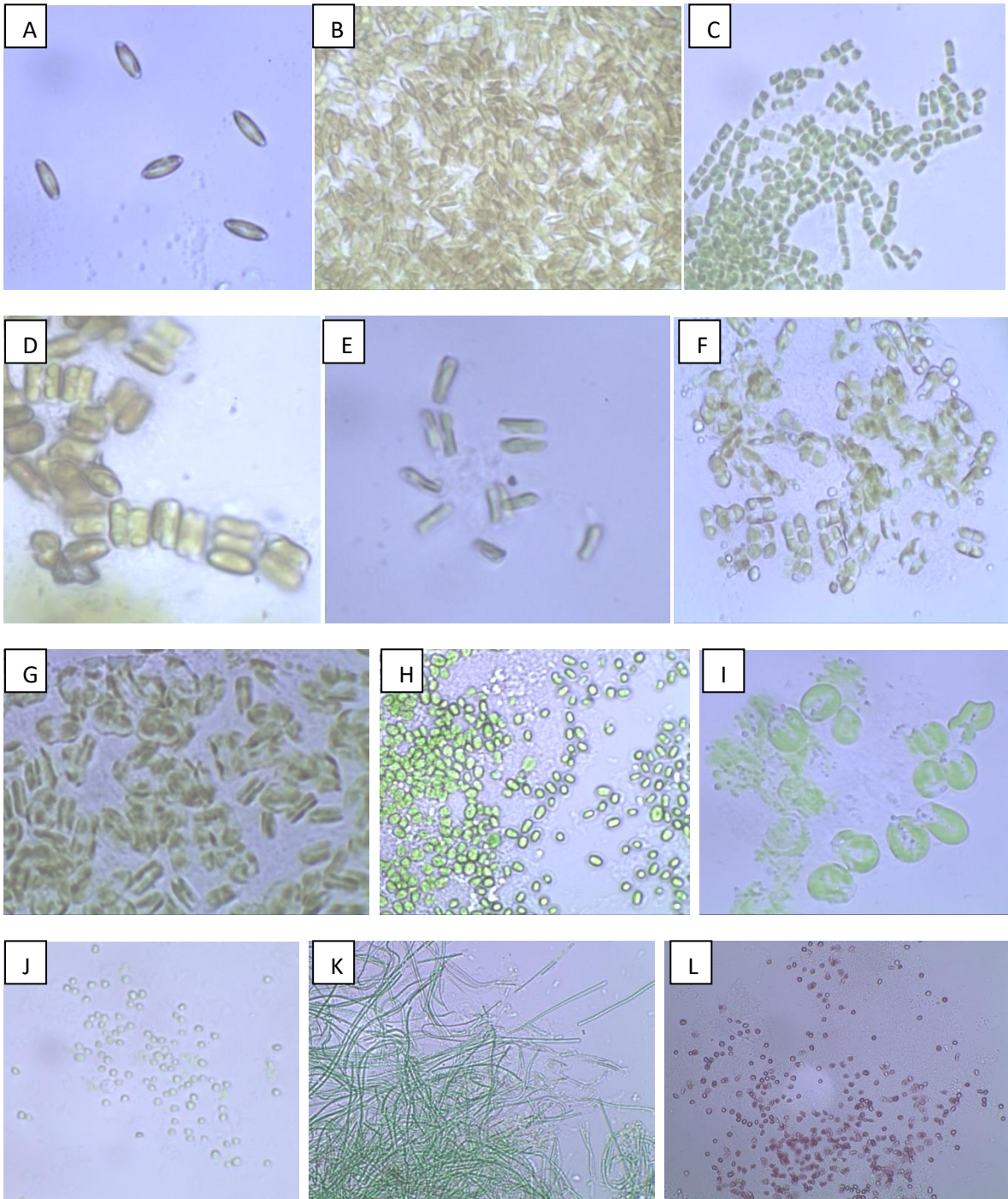


Figure 4. Photomicrograph (at 100x magnification) of Newly isolated microalgae potential for mass cultivation in outdoors: A-B. *Navicula* sp, C. *Melosira* sp, D-G. *Diatoma* sp, H. *Chlamydomonas* sp I. *Chlorococcum* sp, J. *Chlorella* sp, K. *Oscillatoria* sp, L. Coccoid red cyanobacteria

5.3. Kondisi Kualitas Air Lokasi Pengambilan Sampel

Hasil pengamatan parameter fisika pada masing-masing lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Tabel 1. Suhu perairan untuk semua lokasi penelitian berkisar antara 30-33°C, salinitas berkisar 30-33 ppt, kecerahan berkisar 85-100% serta kedalaman berkisar 65-95 cm. Kisaran parameter fisika perairan yang diperoleh pada masing-masing lokasi berada pada kisaran umum kondisi perairan pantai di Indonesia.

Tabel 2. Parameter Fisika Perairan di Lokasi Pengambilan Sampel

Lokasi	Suhu (oC)	Salinitas (ppt)	Kecerahan (%)	Kedalaman (cm)
Pantai Tanjung Tiram	32	31	100	90
Pantai Nambo	33	33	100	81
Pantai Batu Gong	30	30	85	65
Pantai Toronipa	33	33	100	70
Pulau Bokori	33	33	100	95

Untuk parameter kimia, kandungan nitrat pada lokasi penelitian berkisar antara 0,0141-0,0179 ppm, phosphate berkisar antara 0,024-0,0046 pp, ammonia berkisar 0,017-0,031 pp serta pH yang seragam di semua lokasi yakni 7 (Tabel 2). Kisaran parameter kimia pada lokasi penelitian berada pada kisaran yang umum ditemukan pada perairan pantai. Kandungan nitrat, ammonia dan fosfat tergolong rendah untuk mendukung pertumbuhan mikroalga oleh karena itu untuk menumbuhkan mikroalga maka sampel air laut yang dikumpulkan pada masing-masing lokasi penelitian diperkaya dengan nutrient nitrat dan fosfat untuk merangsang pertumbuhan mikroalga yang berada pada air sampel.

Tabel 3. Parameter Kimia Perairan di Lokasi Pengambilan Sampel

Lokasi	Nitrat (NO ₃)	Phosphat (PO ₄)	Ammonia (NH ₃)	pH
Pantai Tanjung Tiram	0,0141	0,0042	0,031	7
Pantai Nambo	0,0179	0,0026	0,017	7
Pantai Batu Gong	0,0166	0,0024	0,027	7
Pantai Toronipa	0,0158	0,0046	0,024	7
Pulau Bokori	0,0156	0,0044	0,020	7

Tabel 4. Komposisi Jenis, Kelimpahan, Keanekaragaman dan Keseragaman Phytoplankton di Lokasi Pengambilan Sampel

Komposisi Jenis	Lokasi									
	Pantai Tanjung Tiram		Pantai Nambo		Pantai Batu Gong		Pantai Toronipa		Pulau Bokori	
	Sta I	Sta II	StaI	StaII	StaI	StaII	StaI	StaII	StaI	StaII
<i>Amphora sp</i>	12	5	2	3	3	2	4	6	1	6
<i>Amphipleura</i>			1		1		1	2		
<i>Asterionella</i>				2				6		
<i>Ceratium</i>		3			1					
<i>Chaetoceros sp</i>		1	4				8		72	34
<i>Cyclotella</i>	2	6		2	2		7	8	5	-
<i>Cocconeis</i>	2	2	3	4		2		6	5	1
<i>Coscinodiscus sp</i>	7	7		4	13	2	4		1	5
<i>Diatoma</i>		2	1	7	6	1	5	12	2	1
<i>Dinobryon sp</i>		2							2	-
<i>Eutonia</i>					1					
<i>Fragillaria</i>										2
<i>Gomphonema</i>	1						3	2	1	3
<i>Gymnodinium</i>									1	-
<i>Gyrosigma</i>	7	8	4	6	3		1	5	1	6
<i>Imnodinium</i>									1	-
<i>Mellosira sp</i>		2			1			2	2	-
<i>Navicula</i>		1	1	1	1			1		1
<i>Nitzchia sp</i>	2	7			1		5	7	22	22
<i>Oscillatoria</i>										3
<i>Pinullaria</i>	6	12		3	1		3	2		2
<i>Peridium</i>	1		1			3				
<i>Propecentrum sp</i>		1								
<i>Surirella</i>		2	1					3		
<i>Scyanobacteria</i>	16	11	23	19	21	21	10	15	14	17
<i>Stephanodiscus</i>	22	26	3		1	8			2	-
<i>Synedra sp</i>	44	43	19	27	25	16	15	36	24	62
<i>Tabellaria sp</i>	1			3			2	1	7	-
<i>Thalassionema</i>									1	-
<i>Urosolenia sp</i>								2		
Total Individu	123	141	63	81	81	55	68	116	164	165
Kelimpahan (ind/L)	683	783	350	450	450	306	378	644	911	917

Dari hasil pengamatan plankton ditemukan bahwa komposisi jenis dan kelimpahan plankton pada masing-masing lokasi penelitian bervariasi. Secara umum phytoplankton didominasi oleh diatom (Bacillariophyceae) dan filamentous Cyanobacteria (Cyanophyceae).

Kedua kelas phytoplankton ini yang memang diketahui dominan ditemukan pada perairan pantai. Dominansi diatom pada perairan pantai/laut merupakan hal yang umum dimana diatom dikenal sebagai species mikroalga yang paling melimpah dengan keanekaragaman yang tinggi yang ditemukan pada hampir semua lingkungan perairan. Diatom adalah mikroalgae bersel tunggal yang merupakan bagian dari Bacillariophyceae dalam divisi Heterokontophyte (Falciatore and Bowler 2002) dan merupakan kelompok phytoplankton yang paling penting dan bertanggung jawab terhadap hampir 40% dari produktivitas primer laut (Falkowski et al 1998). Menurut Scala and Bowler (2001), terdapat lebih dari 250 genus diatom yang terdiri dari lebih dari 100.000 species. Diatom dapat dengan mudah dibedakan dengan kelompok mikroalga lainnya berdasarkan karakter morfologi yakni kemampuan diatom untuk menciptakan dinding sel yang sangat unik dan ornamental yang memiliki bentuk dinding sel (frustules) yang tersusun atas 2 valve yang menyerupai cawan petri (Falciatore and Bowler 2002). Grup mikroalga lainnya yang juga mendominasi perairan pantai yang diamati adalah Cyanobacteria. Cyanobacteria ini juga dikenal sebagai alga hijau-biru dan merupakan grup prokaryotik mikroorganisme yang berfotosintesis yang dapat tumbuh dengan cepat karena strukturnya dan persyaratan tumbuhnya yang simpel dan juga sangat efisien dalam menggunakan cahaya, CO₂ dan nutrisi inorganik (Parmar et al 2011).

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan berikutnya (tahun ke-2) adalah skrining dan karakterisasi strains yang potential untuk dikultur massal sebagai biodiesel feedstok pada lingkungan hypersaline.

Adapun tahapan-tahapan kegiatan pada tahun ke-2 adalah sebagai berikut :

1. Skrining awal species/strains yang dapat dikultur pada hypersaline media
 - Biakan murni dari isolat yang telah dihasilkan akan diskale up ke 1L untuk mendapatkan cukup inokulum untuk eksperimen skrining awal
 - Strains yang mudah dikultur dan di skale up selanjutnya di kultur dalam Erlenmeyer 250 mL berisi 150 mL f/2 medium pada salinitas 5% NaCl (w/v), intensitas $70 \mu\text{mol photon.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$, siklus 12 jam gelap :12 jam terang pada suhu kamar. Species yang dapat tumbuh pada salinitas 5% NaCl selanjutnya akan dipilih untuk eksperimen selanjutnya. Hal ini dilakukan sebagai skrining awal spesies yang dapat dikultur pada hypersaline media.
2. Eksperiment pengaruh salinitas yang berbeda terhadap pertumbuhan dan kandungan lipid mikroalga
 - Dari hasil skrining awal, spesies yang terpilih selanjutnya akan dikultur dalam erlemeyer 250 mL berisi 150 mL f/2 medium pada intensitas $70 \mu\text{mol photon.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$, siklus 12 jam gelap :12 jam terang pada suhu kamar pada salinitas 3, 5, 7, 9% NaCl (in triplicates).
 - Sampling untuk mengukur pertumbuhan (penghitungan jumlah sel dan berat kering biomass) dilakukan setiap 2 hari sedangkan untuk analisa kandungan lipid dilakukan pada hari ke 2-4 (ekponensial phase) dan hari ke 12-15 (stationary phase)

- Species yang paling potensial yang memiliki pertumbuhan yang bagus/cepat serta kandungan lipid yang tinggi akan dipilih untuk di kultur secara massal di outdoor.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal diantaranya :

1. Isolasi dengan metode enrichment dan dilanjutkan dengan teknik plating pada media agar memberikan hasil yang terbaik
2. Ratusan isolates pada media agar berhasil diperoleh dan sekitar 77 isolates yang berhasil ditumbuhkan dan diskale-up pada media cair
3. Isolates yang dihasilkan didominasi oleh diatom (Bacillariophyceae), filamentous cyanobacteria and chlrophyceae
4. Kultur murni yang mudah dikultur dengan pertumbuhan yang baik dan memiliki potensi untuk dikultur massal adalah dari species *Diatoma* sp, *Navicula* sp, *Melosira* sp, *Chlorella* sp, *Oscillatoria* sp

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC, Lim JK (2011) Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew Sust Energy Rev* 15:584-593
- Andersen RA, Kawachi M (2005) Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, London, pp 83-100
- Barclay W, Apt K (2013) Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Wiley-Blackwell, UK, pp 69-79
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70:313-321
- Borowitzka MA (2013a) *Dunaliella*: biology, production, and markets. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Wiley-Blackwell, UK, pp 359-368
- Borowitzka MA (2013b) Species and strain selection. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 77-89
- Borowitzka MA, Moheimani NR (2013a) Open pond culture systems. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 133-152
- Borowitzka MA, Moheimani NR (2013b) Sustainable biofuels from algae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18 (1):13-25
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2):557-577. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25 (3):294-306
- Falciatore A, Bowler C (2002) Revealing Themolecular Secrets of Marine Diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol* 53:109–30.
- Falkowski Pg, Barber Rt, Smetacek V (1998) Biogeochemical Controls And Feedbacks on ocean primary production. *Science* 281:200–6
- Fon-Sing S, Borowitzka MA (2016) Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *J Appl Phycol* 28:1-14
- Fon Sing S, Idepsky A, Borowitzka MA, Moheimani NR (2013) Production of biofuels from microalgae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18:47-72
- Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:229-238
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54:621-639
- Indrayani (2017) Isolation and characterization of microalgae with commercial potential. Ph.D Thesis. Murdoch University, Perth, Australia.
- John J (2012) A beginner's guide to diatoms. A.R.G. Gantner, Ruggel, Liechtenstein,
- Kates M, Volcani BE (1966) Lipid components of diatoms. *Biochim Biophys Acta* 116:264-278
- Kumar HD (1990) *Introductory Phycology*. Affiliated East-West Press Pvt Ltd, New Delhi
- Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, Hankamer B (2012) Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol* 30 (4):198-205
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energy Rev* 14 (1):217-232
- Mercz TI (1994) A study of high lipid yielding microalgae with potential for large-scale production of lipids and polyunsaturated fatty acids. Murdoch University, Perth, Australia
- Moheimani NR, Borowitzka MA (2006) The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 18 (6):703-712

- Moheimani NR, Borowitzka MA (2007) Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (1):27-36
- Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Fon Sing S (2013) Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 265-284
- Ndimba BK, Ndimba RJ, Johnson TS, Waditee-Sirisatthae R, Baba M, Sirisatthah S, Shiraiwaf Y, Agrawali GK, Rakwali R (2013) Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. *J Proteomics* 93:234-244
- Olaizola M (2003) Commercial development of microalgal biotechnology : from test tube to the marketplace. *Biomol Eng* 20:459-466
- Parmar A, Singh NK, Pandey A, Gnansounou E, Madamwar D (2011) Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol* 102:10163–10172
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635-648
- Resurreccion EP, Colosi LM, White MA, Clarens AF (2012) Comparison of algae cultivation methods for bioenergy production using a combined life cycle assessment and life cycle costing approach. *Bioresour Technol* 126:298-306
- Richmond A (2004) Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512 (1-3):33-37
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotech Bioeng* 102 (1):100-112
- Scala S, Bowler C. (2001) Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell. Mol. Life Sci* 58:1666–73
- Schenk P, Thomas-Hall S, Stephens E, Marx U, Mussgnug J, Posten C (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research* 1:20-43
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P (1998) A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program biodiesel from algae. Golden: National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-580-24190
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial application of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87-96
- Tredici MR (2004) Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal cultures, biotechnology and applied phycology*. Blackwell, Oxford, pp 178-214
- Tredici MR (2010) Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels* 1:143-162
- Tredici MR, Materassi R (1992) From open ponds to vertical alveolar panels-The Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of photoautotrophic microorganisms. *J Appl Phycol* 4:221-231
- Wijffels RH, Barba E (2010) An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329:796-799
- Yang J, Xu M, Zhang X, Hu Q, Sommerfeld M, Chen Y (2011) Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresour Technol* 102:159-165
- Zittelli GC, Biondi N, Rodolfi L, Tredici MR (2013) Photobioreactors for mass production of microalgae. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture, applied phycology and biotechnology*. Wiley Blackwell, UK, pp 225-266

LAMPIRAN

1. Survey Lokasi di Muara Sungai Wanggu



2. Survey Lokasi di Pantai Tanjung Tiram



3. Survey Lokasi di Pantai Nambo



4. Survey Lokasi di Pantai Toronipa



5. Survey Lokasi di Pantai Batu Gong



6. Survey Lokasi di Pulau Bokori



7. Kegiatan Pembuatan Stok Solution dan f/2 medium



8. Pengambilan Sampel Plankton dengan plankton net (kiri) dan pengukuran kualitas air (kanan)



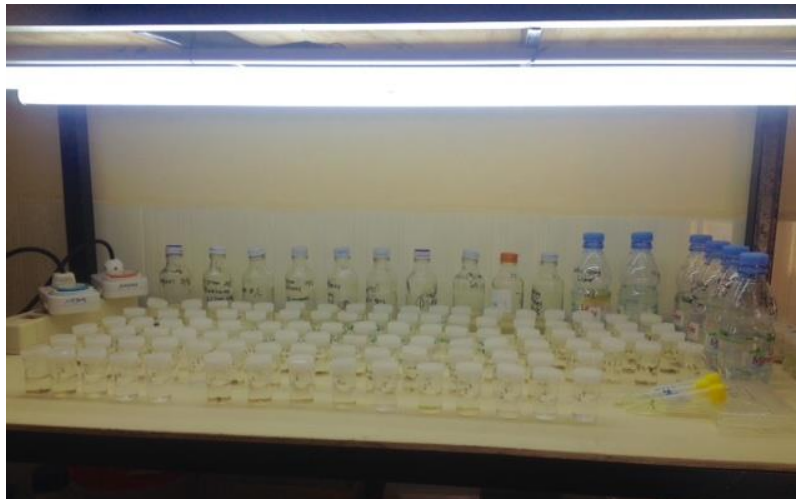
9. Kegiatan isolasi dengan metode plating pada media agar. Plating ke 1 (kiri) dan plating ke 2 (kanan)



10. Kegiatan isolasi dengan metode pengenceran



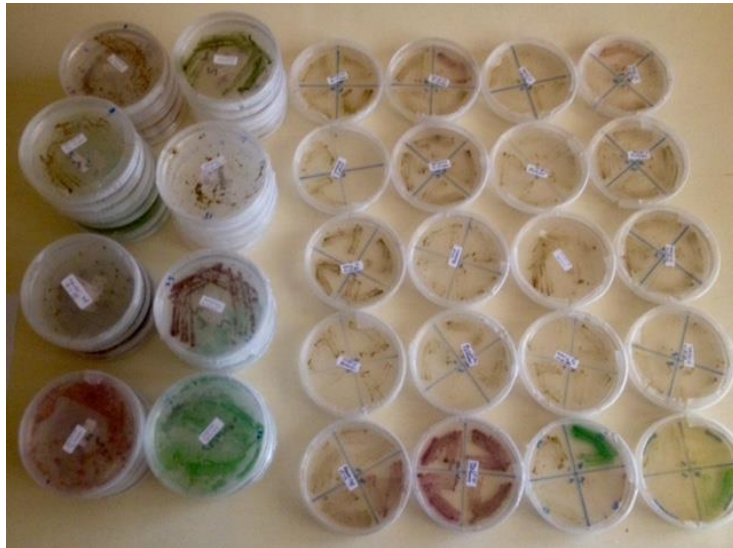
11. Inkubasi sampel hasil pengenceran pada rak kultur



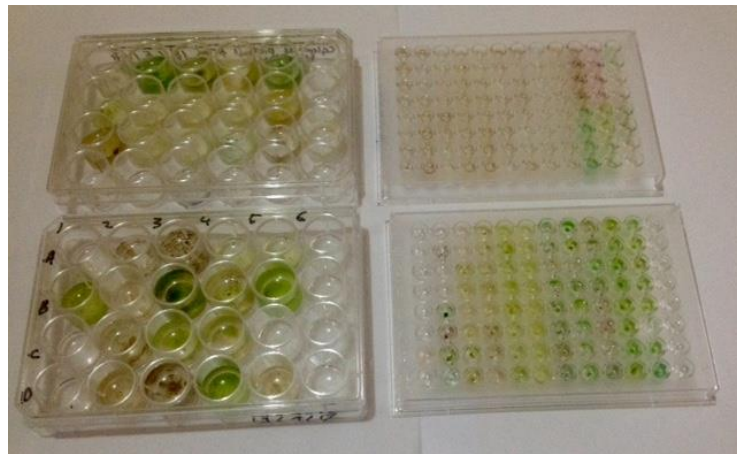
12. Kegiatan Plating ke 3 dari hasil plating ke 2



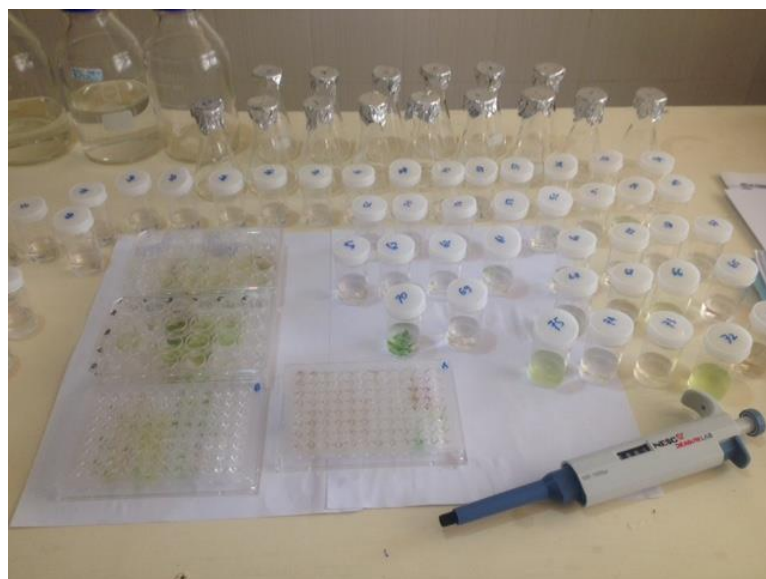
13. Isolates species lokal mikroalga yang dihasilkan (pada media agar)



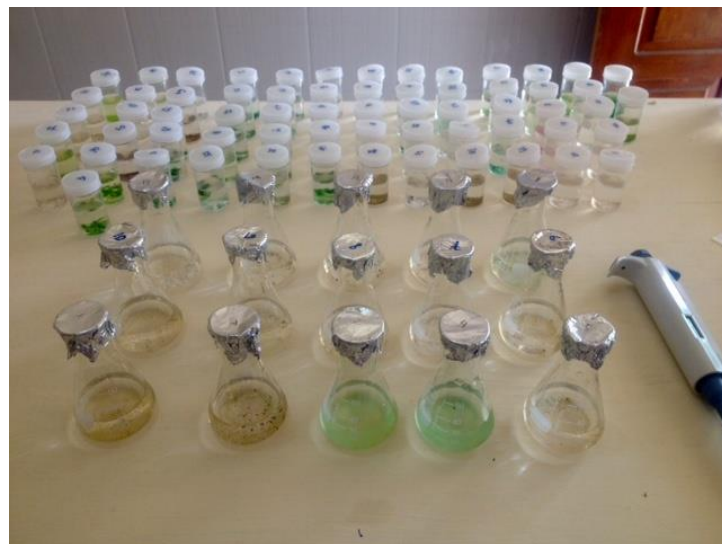
14. Isolates pada 24 dan 96 microtiter well plates



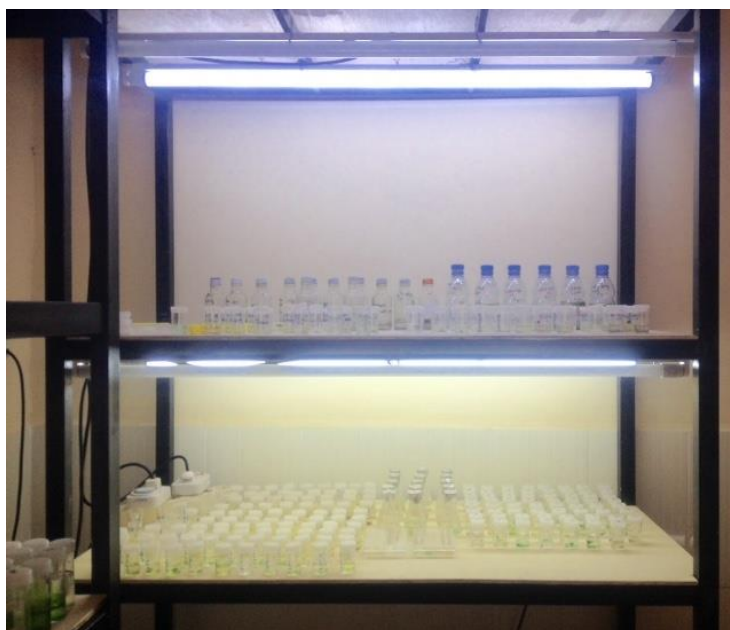
15. Transfer kultur dari microtiter well plates (0,2 mL dan 1 mL) ke 5 mL media kultur



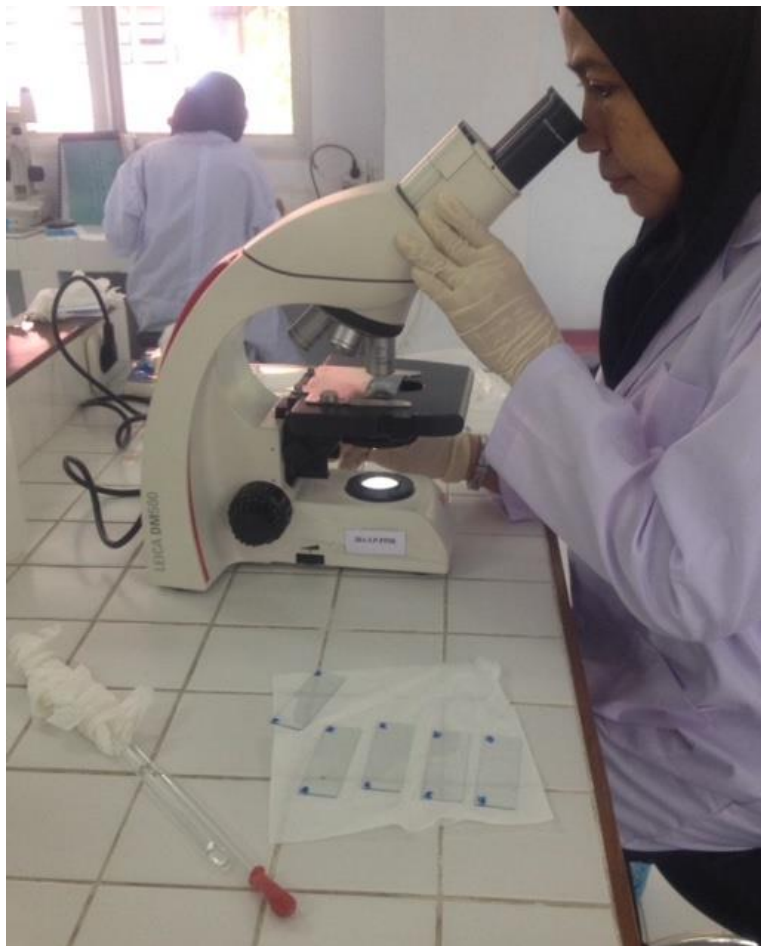
16. Skale up kultur dari 5 mL ke 50 mL



17. Inkubasi Biakan murni pada rak kultur



18. Identifikasi Isolates Mikroalgae



Lampiran 19. Draft paper for publication at an International Journal
(Biodiversitas/Phycological Research)

Isolation and Screening of Local Species Microalgae in Southeast Sulawesi Indonesia Suitable for Mass Cultivation in Outdoor Open Pond Systems

Indrayani^{1*} and Haslianti¹

¹Faculty of Fisheries and Marine Science, Halu Oleo University, Jl. HEA. Mokodompit,
Kampus Baru Anduonohu, Kendari, Southeast Sulawesi, Indonesia, 93232

*Corresponding Author: indrayani_tajudin@yahoo.com.au

Abstract

Isolating and selecting of local species microalgae for any commercial application has a competitive advantage especially for microalgae species intending to be mass produced in outdoors as they are well adapted to the local climatic environment. The aim of this study was to isolate local species microalgae in Kendari Waters Southeast Sulawesi Indonesia suitable for mass cultivation in outdoor open pond systems for the development of the native species microalgae for commercial applications and for educational purposes. The study was conducted in several coastal areas in Kendari including Tanjung Tiram Beach, Nambo Beach, Batu Gong Beach, Toronipa Beach and Bokori Island. The isolation of microalgae was done using agar plating technique (1% agar in f/2 medium). The water samples were collected using a plankton net and manually collected in bottle samples. The water samples were plated on agar medium and incubated under dim light, 12:12 hours light and dark cycle and at ambient room temperature. Water quality parameters including temperature, salinity, water transparency, nitrate, phosphate, ammonia and phytoplankton were also determined at each location. There are hundreds of isolates generated. Pure colonies were established after repeated streaking on agar medium. The isolates are dominated by diatom (Bacillariophyceae), filamentous cyanobacteria and chlorophyceae. Isolates potential for mass cultivation in outdoors include *Diatoma* sp, *Melosira* sp, *Navicula* sp and *Chlorella* sp, *Chlamydomonas* sp and *Oscillatoria* sp. All isolates generated will be maintained and further studied for their potential commercial application and for educational purposes.

Keywords: Isolation, Local Species Microalgae, Southeast Sulawesi

Introduction

Microalgae are prokaryotic or eukaryotic photosynthetic microorganisms that can be found in all ecosystems both aquatic and terrestrial (Richmond 2004; Mata et al. 2010) and they are an extremely heterogeneous group of microorganisms which are potentially rich source of important chemicals with potential application in the feed, food, nutritional,

cosmetics, pharmaceuticals and even in fuel industries (Olaizola 2003). Although, there are over thousands or even millions of microalgae species exist in nature. Only a few of them have been successfully produced commercially for the production of high value products (i.e. *Dunaliella salina* for β -carotene, *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and *Cryptocodinium cohnii* for EPA production). Hence, bioprospecting of microalgae species with commercial potential is thus an important and challenging task.

Species or strain selection is the first and critical step in bioprospecting of microalgae for any commercial application (Borowitzka 2013). Screening of microalgae species involves a series of steps including sample collection, isolation, purification, identification, maintenance and characterization of potential products (Gong and Jiang 2011). There are two possible sources of selecting/screening microalgae; from microalgae culture collections and from natural environments. Species selection through microalgae culture collections can be accessed easily although the number of microalgae species kept in the culture collection is only a small fraction of microalgae species that exist in nature (Borowitzka 2013). On the other hand, untapped resources of microalgae species can be isolated from natural environments. Isolating and selecting of local microalgae species/strains has a competitive advantage especially for microalgae species intending to be mass produced in outdoor as they are well adapted to the local climatic environment (Larkum et al. 2012). Therefore, the aim of this study was to isolate local species microalgae in Kendari Waters Southeast Sulawesi Indonesia and to screen them for potential mass cultivation in outdoor open pond systems. The purpose of this study was to provide isolates and unialgal cultures of local species microalgae for research and development of local species microalgae for commercial application and for educational purposes.

Materials and Methods

Sampling Sites

This study was conducted at several coastal areas in Kendari, Southeast Sulawesi, Indonesia including Tanjung Tiram Beach (4°2'24"BT-122°40'1"LS), Nambo Beach (4°0'5"BT-122°36'58"LS), Batu Gong Beach (3°52'43"BT-122°30'45"LS), Toronipa Beach (3°54'0"BT-122°39'36"LS) and Bokori Island (3°55'34"BT-122°40'0"LS).

Sample collection

Water samples were collected manually using plastic water bottles volume 1.5 L and also using a plankton net mesh size 25 µm. For the plankton net, about 50 litres of seawater at each location were filtered through the plankton net and collected in a 50 mL tube. In the lab, the water samples from each location were transferred into small glass bottles (100 mL) and enriched with nutrients (nitrat, phosphate, silicate and trace elements) based on f/2 medium stock solution (Guillard and Ryther 1962) and then incubated in a culture shelve with illumination of a 20 watt of white fluorescent tubes under 12:12 hour light and dark cycles and at ambient room temperature whereas the sample from plankton net was prepared for isolation straight away.

Isolation of Microalgae

Isolation of the microalgae was carried out using agar plating technique (Andersen and Kawachi 2005). The medium used was f/2 medium (Guillard and Ryther 1962). Agar medium was prepared by adding 1% of agar into the liquid medium prior to autoclaving.

Sample from plankton net (0.1 mL) was spotted on the middle of the agar plates and spread evenly on the surface using a glass spreader. The plates were then sealed with parafilm to avoid drying out and incubated in the culture shelve under dim light (1x20 watt of white fluorescent tube light) with 12 h light and 12 h dark cycle and at room temperature. The same protocols were applied for the enrichment samples.

Colonies emerged on the agar plates were picked up and re-streaked onto fresh agar medium using standard microbiology agar streaking technique. Pure unialgal colonies were obtained after repeated streaking on fresh agar media and confirmed by microscopic observation. The pure colonies were then transferred into liquid medium by inoculating a single colony into each well of the 24 and 96-wells microtiter plate containing 1 mL and 200 μ L of f/2 medium, respectively.

Screening of Microalgae suitable for mass cultivation in outdoors

For screening, new isolates were grown in microtiter well plates and then gradually scale-up from 0.2 mL – 2 mL – 10 mL, 50 mL and 100 mL at ambient room temperature (25-30°C), 12 h:12h light and dark cycles and under light intensity of 2x20 watt of white florescent tube light (about 70-80 μ mol.photon.m⁻².s⁻²). The cultures were then observed for their ability to grow well in liquid medium. The cultures that grew well in liquid medium were then selected for further screening test. About 30 mL aliquots of the cultures were then transferred to flasks containing 70 mL of f/2 medium and exposed them gradually to increasing salinity at 4 and 5% NaCl (w/v) for one week at each salinity.

The growth of the cultures was monitored by cell counting using a Neubauer haemocytometer (Moheimani et al. 2013a). The specific growth rate (μ) was then calculated using the following equation:

$$\mu = \ln(N_2 / N_1) / (t_2 - t_1)$$

Where N_1 and N_2 are the cell density at time 1 (t_1) and 2 (t_2) within the exponential phase

Identification of Phytoplankton

Identification of the microalgae isolates was based on the morphological characteristics using a microscope and phytoplankton identification books (Yamaji 1976; Newell and Newell 1977; Thomas 1997; John 2012). The isolates were identified up to genus level.

Results

Isolation and Identification of Microalgae

Hundreds of isolates grown on agar plates from coastal areas in Southeast Sulawesi Indonesia including Bokori Island, Toronipa Beach, Batu Gong Beach, Tanjung Tiram Beach and Nambo Beach have been successfully established (Figure 1).

Isolation of microalgae using agar plating techniques is one of the most employed method of isolation due to its easy application and reliability in obtaining pure isolates albeith it is time consuming and the use of lots of petri plates. The water samples containing microalgae were spreaded on agar medium and incubated under light for several weeks for coloni to grow. Colonies emerged from 1st plating were then picked up and streaked onto the fresh agar medium. After 3-4 weeks of incubation, lots of colonies appeared on the 2nd plating. Again, colonies from 2nd plating were transferred onto fresh agar medium to obtain pure isolates/colonies (Figure 1c).

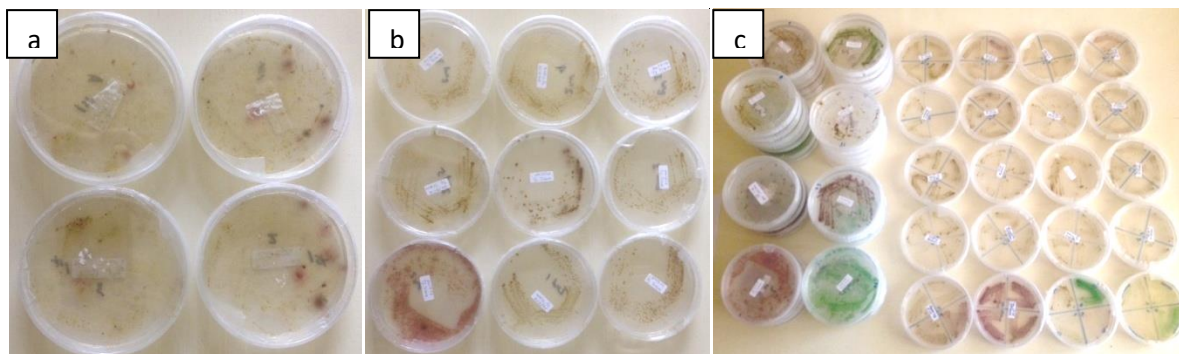


Figure 1. Colonies emerged from agar plates. a.1st plating, b. 2nd plating and c. 3rd plating

After obtaining pure colonies, each colony was then transferred into 24 and 96-microtiter well plate containing 1 and 0.2 mL of f/2 medium, respectively. Out of hundreds of isolates on agar, about 77 isolates successfully grown in liquid medium (Figure 2b).

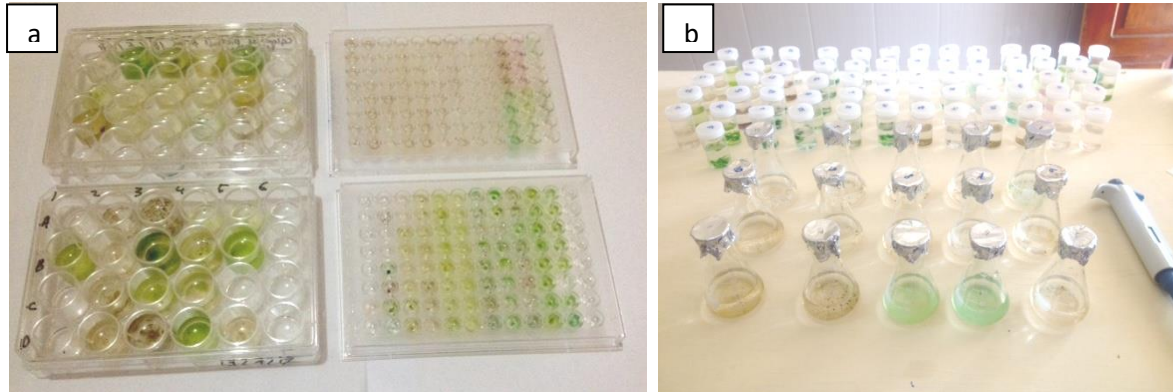


Figure 2. Newly isolated microalgae grown in liquid f/2 medium. A. in 24 and 96 microtiter well plates and B. in 10 mL containers and 50 mL flasks

Identification of the microalgal species was only performed on the species that can grow on liquid medium. The isolates grown on liquid medium are dominated by diatoms/Bacillariophyceae (*Diatoma sp*, *Navicula sp*, *Melosira sp*, *Syura sp*, *Surire sp*), filamentous cyanobacteria (*Oscillatoria sp*) and green algae/Chlorophyte (*Chlorella sp*, *Chlamydomonas sp.*) (Table 1). Most of the diatom species isolated are from Bokori Island and Tanjung Tiram Beach whereas the filamentous cyanobacteria and the green algae are from Batu Gong, Toronia Beach and Nambo Beach.

Table 1. List of newly isolated local species microalgae in Coastal areas in Kendari Southeast Sulawesi Indonesia

Isolate Code	Scientific Name	Place of Collection
IND-UHO 001	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 002	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 003	<i>Chlorella sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 004	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 005	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND –UHO 006	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach

IND-UHO 007	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 008	<i>Diatoma sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 009	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 010	<i>Navicula sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 011	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 012	<i>Syura sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 013	<i>Syura sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 014	<i>Syura sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 015	<i>Navicula sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 016	<i>Surire sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 017	<i>Chlorella sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 019	<i>Aphanocapsa sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 020	<i>Tabellaria</i>	Bokori Island
IND-UHO 021	<i>Aphanocapsa sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 025	<i>Surire sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 028	<i>Diatoma sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 029	<i>Melosira sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 030	<i>Melosira sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 031	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 033	<i>Chlorella sp</i>	Bokori Island
IND-UHO 034	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 035	<i>Oscillatoria sp</i>	Bato Gong Beach
IND-UHO 036	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 037	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 038	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 039	<i>Dinobryon sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 040	<i>Melosira sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 041	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 042	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 043	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 044	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 045	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 046	<i>Oscillatoria sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 051	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 052	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 053	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 054	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa beach
IND-UHO 055	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 056	<i>Oscillatoria sp</i>	Toronipa Beach

IND-UHO 057	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 058	<i>Navicula sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 059	<i>Anabaena sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 060	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 061	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 062	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 063	<i>Navicula sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 064	<i>Melosira sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 065	<i>Oscillatoria sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 066	<i>Oscillatoria sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 067	<i>Diatoma sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 068	<i>Navicula sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 069	<i>Coscinodiscus sp</i>	Toronipa Beach
IND-UHO 070	<i>Oscillatoria sp</i>	Batu Gong Beach
IND-UHO 072	<i>Chlorella sp</i>	Tanjung Tiram Beach
IND-UHO 073	<i>Diatoma sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 075	<i>Chlorella sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 076	<i>Chlamydomonas sp</i>	Nambo Beach
IND-UHO 077	<i>Chlorella sp</i>	Nambo Beach

Screening of Newly Isolated Microalgae Suitable for Mass Cultivation in Outdoors

Out of 77 isolates grown in liquid medium, there were about 34 isolates that showed fast growth and did not stick to the culture vessels so that they remain in suspension to get expose to light and nutrients for optimum growth. These isolates were then screened for their ability to grow at high salinity. There were 12 isolates showed good growth after cultivating the isolates at 5% salinity, (Figure 3).

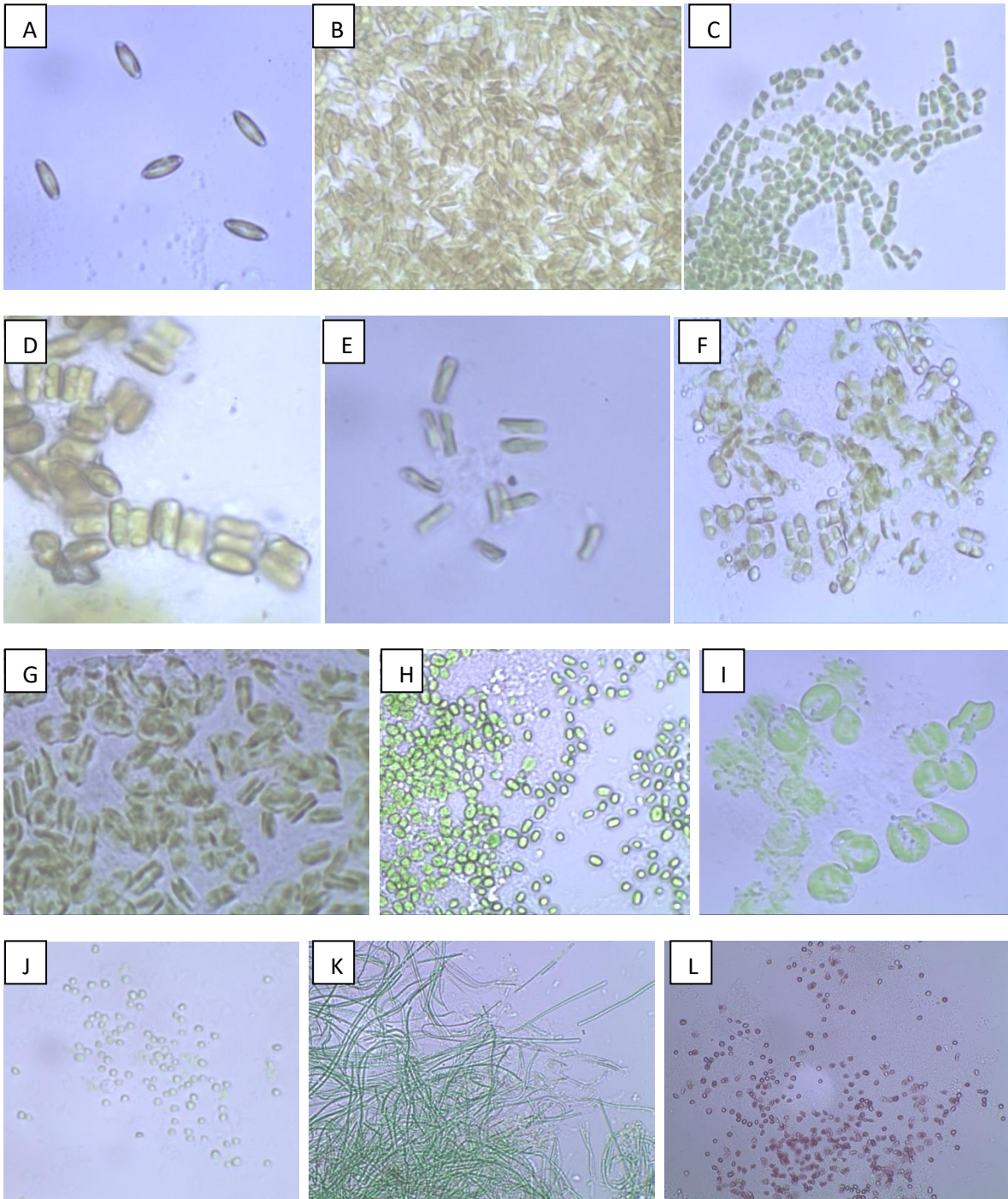


Figure 3. Photomicrograph (at 100x magnification) of Newly isolated microalgae potential for mass cultivation in outdoors: A-B. *Navicula* sp, C. *Melosira* sp, D-G. *Diatoma* sp, H. *Chlamydomonas* sp I. *Chlorococcum* sp, J. *Chlorella* sp, K. *Oscillatoria* sp, L. Coccoid red cyanobacteria

Discussion

Isolation of microalgae/phytoplankton is a time consuming and a labour intensive task but it is important for research and development of microalgae for any applications. This study is the first in attempting to isolate local species microalgae from several coastal areas in Kendari Southeast Sulawesi, Indonesia. This study has been successfully generated hundreds of local species microalgae isolates which will be maintained and further studied for their potential commercial application

This study showed that isolation of microalgae straight away from plankton net samples using agar plating technique was not successful as not many colonies emerged on agar plates after 3-4 weeks of incubations. Also, the condition of the agar medium was not good as many holes formed on the agar and some of them were not in solid form (quite watery). The possible explanation was due to the presence of zooplankton in the plankton net samples. The use of plankton net is not only for collecting phytoplankton but also zooplankton including protozoan that feed on bacteria and phytoplankton. Therefore, when they were plated on agar, the zooplankton did grazing on bacteria/phytoplankton that grow on the surface of the agar forming holes and destroy the agar. However, when the enrichment samples were plated on the agar, lots of colonies emerged and the condition of agar was still good (no holes and still in solid form). The reason for this was because the samples collected manually were initially contained less organisms including microalgae and zooplankton. After enrichment with nutrients and under static condition, the microalgae started to grow and form colonies/aggregates. If the zooplanktons still exist in the samples, they will die as they are unable to feed on microalgae colonies/aggregates.

Newly isolated local species microalgae from coastal areas in Southeast Sulawesi are dominated by diatoms species and filamentous cyanobacteria. The dominance of diatoms in isolates is not surprising as they are well known as the most abundance and diverse

microalgae species found in almost all aquatic environments. Diatoms are unicellular microalgae that belong to Bacillariophyceae within the division of Heterokontophyte (Falciatore and Bowler 2002) and considered to be the most important group of phytoplankton responsible for almost 40% of marine primary productivity (Falkowski et al 1998). According to Scala and Bowler (2001), there are over 250 genera of diatoms with perhaps as many as 100,000 species which are more than three orders of magnitude in size of land plants and exhibit a remarkable variety of shapes. The diatoms can be easily distinguished based on their morphological characteristics especially their ability to generate highly ornamented silicious cell walls (frustules) constructed of two almost equal valves like a petri dish (Falciatore and Bowler 2002). Besides diatoms, another group of microalgae dominated the isolates is cyanobacteria. Cyanobacteria which is also known as blue-green algae are a diverse group of prokaryotic photosynthetic microorganisms that can grow rapidly due to their simple structures and growth requirements as well as efficient use of light, CO₂ and other inorganic nutrients (Parmar et al 2011).

There are several key criteria of microalgae suitable for large scale cultivation in outdoors including wide temperature and salinity, out compete contaminants and ease of harvesting (Indrayani 2017). The ability of microalgae to tolerate wide range of salinity and temperature are the most important criteria for the successful of microalgal culture under outdoor conditions because outdoor cultures will be exposed to varying environmental conditions (Khatoon et al 2010). The salinity of the culture could decrease due dilution of heavy rains or it could increase due to extensive evaporation of hot sunny days. If the culture is started at about 5% salinity, heavy rains could potentially decrease the salinity of the culture up to 3% NaCl. In contrast, the salinity of the culture could increase up to 7% NaCl in hot days . Therefore, the microalgal species capable of growing well at 5-7% NaCl will not be affected by variation of the outdoor conditions and could sustain high productivity

throughout the year. In addition, microalgal species capable of growing at hypersaline environment will be less prone to contamination as not many organisms could withstand high salt concentration and therefore monoalgal cultures could possibly be maintained for long periods (Borowitzka 2013). Similarly, cultures will be exposed to daily and seasonal variation of temperatures. For a tropical country like Indonesia, temperature is relatively constant with little fluctuation. The daily air temperatures range between 22-34°C and that is the reason why we tested to grow the isolates at ambient room temperature (25-30°C) and then selected the species that can withstand ambient temperature.

Conclusion and Future Direction

Hundreds of newly isolated local species microalgae from coastal areas of Kendari Southeast Sulawesi Indonesia have been successfully established. Isolated species are dominated by diatoms and filamentous cyanobacteria including *Diatoma* sp, *Navicula* sp, *Melosira* sp and *Oscillatoria* sp. Several species including *Diatoma* sp, *Navicula* sp, *Melosira* sp, *Chlamydomonas* sp and *Chlorella* sp show potential to be mass cultivated in outdoors due to their ability to grow well in liquid medium, ability to grow at ambient temperature, ability to grow at high salinity and ability to remain in suspension (do not stick). The next step of studies will be to determine their optimum growth conditions, to characterize their biochemical compositions (i.e lipid, protein, carbohydrate and carotenoid pigments) and to grow them under real condition in outdoor open pond systems. In the long run, the isolated species will be developed for commercial applications (i.e biodiesel and high value products).

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support provided by the Ministry of Research and Higher Education of Republic of Indonesia through the Project of Applied Product Research 2017 (Contract no. 581/UN29.20/PPM/2017) entitled Isolation and Screening of Local Species Marine Microalgae Potential for Mass Cultivation in Hypersaline Medium for Biodiesel Feedstock.

References

- Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC, Lim JK (2011) Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew Sust Energ Rev* 15:584-593
- Andersen RA, Kawachi M (2005) Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, London, pp 83-100
- Barclay W, Apt K (2013) Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Wiley-Blackwell, UK, pp 69-79

- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol* 70:313-321
- Borowitzka MA (2013a) *Dunaliella*: biology, production, and markets. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Wiley-Blackwell, UK, pp 359-368
- Borowitzka MA (2013b) Species and strain selection. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 77-89
- Borowitzka MA, Moheimani NR (2013a) Open pond culture systems. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 133-152
- Borowitzka MA, Moheimani NR (2013b) Sustainable biofuels from algae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18 (1):13-25
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2):557-577. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25 (3):294-306
- Falciatore A, Bowler C (2002) Revealing Themolecular Secrets of Marine Diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol* 53:109–30.
- Falkowski Pg, Barber Rt, Smetacek V (1998) Biogeochemical Controls And Feedbacks on ocean primary production. *Science* 281:200–6
- Fon-Sing S, Borowitzka MA (2016) Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *J Appl Phycol* 28:1-14
- Fon Sing S, Idepsky A, Borowitzka MA, Moheimani NR (2013) Production of biofuels from microalgae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18:47-72
- Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:229-238
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54:621-639
- Indrayani (2017) Isolation and characterization of microalgae with commercial potential. Ph.D Thesis. Murdoch University, Perth, Australia.
- John J (2012) A beginner's guide to diatoms. A.R.G. Gantner, Ruggel, Liechtenstein,
- Kates M, Volcani BE (1966) Lipid components of diatoms. *Biochim Biophys Acta* 116:264-278
- Kumar HD (1990) *Introductory Phycology*. Affiliated East-West Press Pvt Ltd, New Delhi

- Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, Hankamer B (2012) Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol* 30 (4):198-205
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energy Rev* 14 (1):217-232
- Mercz TI (1994) A study of high lipid yielding microalgae with potential for large-scale production of lipids and polyunsaturated fatty acids. Murdoch University, Perth, Australia
- Moheimani NR, Borowitzka MA (2006) The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 18 (6):703-712
- Moheimani NR, Borowitzka MA (2007) Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (1):27-36
- Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Fon Sing S (2013) Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 265-284
- Ndimba BK, Ndimba RJ, Johnson TS, Waditee-Sirisatthae R, Baba M, Sirisatthah S, Shiraiwaf Y, Agrawali GK, Rakwali R (2013) Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. *J Proteomics* 93:234-244
- Olaizola M (2003) Commercial development of microalgal biotechnology : from test tube to the marketplace. *Biomol Eng* 20:459-466
- Parmar A, Singh NK, Pandey A, Gnansounou E, Madamwar D (2011) Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol* 102:10163–10172
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635-648
- Resurreccion EP, Colosi LM, White MA, Clarens AF (2012) Comparison of algae cultivation methods for bioenergy production using a combined life cycle assessment and life cycle costing approach. *Bioresour Technol* 126:298-306
- Richmond A (2004) Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512 (1-3):33-37
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotech Bioeng* 102 (1):100-112
- Scala S, Bowler C. (2001) Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell. Mol. Life Sci* 58:1666–73
- Schenk P, Thomas-Hall S, Stephens E, Marx U, Mussgnug J, Posten C (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research* 1:20-43

- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P (1998) A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program biodiesel from algae. Golden: National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-580-24190
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial application of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87-96
- Tredici MR (2004) Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal cultures, biotechnology and applied phycology*. Blackwell, Oxford, pp 178-214
- Tredici MR (2010) Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels* 1:143-162
- Tredici MR, Materassi R (1992) From open ponds to vertical alveolar panels-The Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of photoautotrophic microorganisms. *J Appl Phycol* 4:221-231
- Wijffels RH, Barba E (2010) An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329:796-799
- Yang J, Xu M, Zhang X, Hu Q, Sommerfeld M, Chen Y (2011) Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresour Technol* 102:159-165
- Zittelli GC, Biondi N, Rodolfi L, Tredici MR (2013) Photobioreactors for mass production of microalgae. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture, applied phycology and biotechnology*. Wiley Blackwell, UK, pp 225-266