

LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN TERAPAN



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

Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun

Ketua/Anggota Tim

INDRAYANI, S.Pi, M.Biotech.Stu.Ph.D (NIDN: 0023127404)  
HASLIANTI, S.Pi, M.Si (NIDN: 0017077906)  
Dr. Ir. WELLEM H. MUSKITA, M.Si (NIDN:0028056207 )

Dibiayai oleh:  
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat  
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan  
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi  
Sesuai dengan Kontrak Penelitian  
Nomor: 058/SP2H/LT/DRPM/2019, Tanggal 11 Maret 2019

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
UNIEVRSITAS HALU OLEO  
NOVEMBER 2019

## HALAMAN PENGESAHAN

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

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : INDRAYANI, S.Pi, M.Biotech, Ph.D  
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 S.Pi, M.Si  
NIDN : 0017077906  
Perguruan Tinggi : Universitas Halu Oleo

**Anggota (2)**  
Nama Lengkap : Dr. Ir WELLEM HENDRIK MUSKITA M.Si  
NIDN : 0028056207  
Perguruan Tinggi : Universitas Halu Oleo

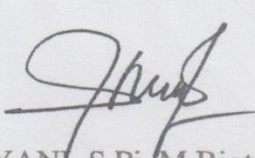
**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 190,341,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 387,391,000

Mengetahui,  
Dekan EPIK UHO



(Prof. Ir. H. LA SARA, M.Si, Ph.D)  
NIP/NIK 196004221987031003

Kendari, 12 - 11 - 2019  
Ketua,



(INDRAYANI, S.Pi, M.Biotech, Ph.D)  
NIP/NIK 197412232001122001

Menyetujui,  
Ketua LPPM UHO



(Ketua LPPM UHO, S.Si, M.Si)  
NIP/NIK 196512311997031011

## RINGKASAN

Meningkatnya kebutuhan dunia akan bahan bakar fosil sementara persediaan yang semakin menipis ditambah lagi dengan masalah lingkungan yang ditimbulkan oleh penggunaan fosil fuel memotivasi para scientists, pemerintah dan industri 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) yang dapat dikonversi menjadi biodiesel serta lebih sustainable karena dapat dikultur pada lahan yang tidak produktif/marginal, dapat memanfaatkan air laut serta tidak akan memicu issue “food vs fuel”. Selain itu, mikroalga memiliki banyak senyawa lain yang dapat menjadi produk sampingan dari biodiesel serta kultur mikroalga juga dapat diintegrasikan dengan pengolahan limbah cair maupun untuk CO<sub>2</sub> bioremediation. Permasalahan terbesar dari produksi biodiesel dari mikroalga 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.

Mikroalga *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 dikultur menggunakan kolam raceway yang terbuat dari rangka besi yang dilapisi tripleks dan terpal yang berukuran 2x0,8x0,4 m (PxLxT) yang dilengkapi dengan kincir yang berfungsi untuk mengaduk kultur. Kedua jenis mikroalga dikultur dengan menggunakan media air laut yang diperkaya dengan nutrisi f/2 dan Walne. Kultur pada awalnya dioperasikan dengan mode batch hingga mencapai stationary phase. Setelah itu kultur dioperasikan dengan mode semi-kontinyu dengan cara memanen sebagian kultur lalu ditambahkan media baru sebanyak volume kultur yang di panen dan diberi nutrisi. Kultur dipelihara selama kurang lebih 3 bulan. Sampling penghitungan sel dilakukan setiap 2 hari sedangkan sampling untuk biomassa (DW dan AFDW) serta lipid dilakukan setiap 4 hari.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua jenis mikroalga ini, memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan baik pada kolam raceway di outdoor. Laju pertumbuhan spesifik (LPS) *Nannochloropsis* sp.UHO3 berkisar 0,105-0,447 d<sup>-1</sup> sedangkan laju pertumbuhan spesifik *Skeletonema* sp.UHO29 berkisar 0,127-0,457 d<sup>-1</sup>. *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki kandungan lipid yang tinggi yakni masing-masing berkisar 15-44% AFDW dan 14-53% AFDW. Produktivitas biomassa *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 masing-masing berkisar antara 10-122 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> dan 13-107 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> sedangkan nilai produktivitas lipid untuk *Nannochloropsis* sp.UHO3 berkisar 4 - 31 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> dan *Skeletonema* sp.UHO29 berkisar 5 - 25 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. Hasil analisis komposisi asam diketahui bahwa asam palmitat (C16:0), asam stearate (C18:0), asam oleic (C18:1) dan asam linoleate (C18:2) merupakan komponen utama asam lemak pada *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua jenis mikroalga ini potensial dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel karena memiliki pertumbuhan yang cepat, kandungan lipid yang tinggi, produktivitas biomassa dan lipid yang tinggi, komposisi asam lemak yang sesuai untuk biodiesel serta dapat tumbuh dengan baik saat dikultur massal pada kolam raceway di outdoor.

Target luaran adalah 1). Akan dihasilkan paten/paten sederhana (luaran wajib). 2). Akan dihasilkan publikasi pada jurnal internasional (luaran tambahan) 3). Hasil penelitian akan dipresentasikan pada seminar Nasional dan International. 4). Rekomendasi species/strain yang paling potensial sebagai biodiesel feedstock. 5). Buku Ajar bioteknologi perairan (luaran tambahan). Adapun TKT penelitian ini pada tahun ketiga sudah masuk ke TKT 5/6.

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR ISI</b> .....	4
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	5
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	6
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	7
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	9
<b>BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b> .....	11
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b> .....	12
<b>Tahapan Penelitian</b> .....	12
<b>Tahun 1. Isolasi dan Identifikasi (2017)</b> .....	12
<b>Tahun 2. Skrining (2018)</b> .....	13
<b>Tahun 3. Kultur massal di outdoor (2019)</b> .....	14
<b>Metode Analysis</b> .....	17
<b>Penghitungan jumlah sel</b> .....	17
<b>Menentukan laju pertumbuhan specific (Specific growth rate)</b> .....	17
<b>Menentukan berat kering biomass (DW) dan berat kering organic (AFDW)</b> .....	17
<b>Lipid Extraction</b> .....	17
<b>Komposisi Asam Lemak</b> .....	17
<b>Analisa Data</b> .....	17
<b>BAB 5. HASIL YANG DICAPAI DAN LUARAN</b> .....	18
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	33

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.	Road Map Penelitian	10
2.	Growth curve of the <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 under different culture medium .....	18
3.	Specific Growth Rates of the <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 under different culture medium .....	19
4.	Biomass yield of the <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 under different culture medium .....	19
5.	Biomass productivity of the <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 under different culture medium.....	20
6.	Growth curve of the <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 under different Silica.....	21
7.	Specific growth rate of the <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 under different Silica.....	21
8.	Biomass yield of the <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 under different Silica.....	22
9.	Biomass productivity of the <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 under different Silica.....	23
10.	Large-scale cultivation of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 dan <i>Skeletonema</i> sp. UHO29 in outdoor raceway ponds.....	23
11.	Growth curve of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 under semicontinuous mode in outdoor raceway ponds.....	24
12.	Growth curve of <i>Skeletonema</i> sp. UHO29 under semicontinuous mode in outdoor raceway ponds.....	25
13.	Specific growth rate ( $d^{-1}$ ) of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 and <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 in outdoor raceway ponds.....	25
14.	Biomass yield ( $g.L^{-1}$ ) of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 and <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 in outdoor raceway ponds.....	26
15.	Biomass productivity of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 and <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 in outdoor raceway ponds in $g.L^{-1}.d^{-1}$ (Top panel) and in $g.m^{-2}.d^{-1}$ (Bottom panel).....	27
16.	Lipid yield ( $g.L^{-1}$ ) of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 and <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 in outdoor raceway ponds .....	27
17.	Lipid content (% Biomass) of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 and <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 in outdoor raceway ponds.....	28
18.	Lipid productivity of <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO3 and <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 in outdoor raceway ponds in $g.L^{-1}.d^{-1}$ (Top panel) and in $g.m^{-2}.d^{-1}$ (Bottom panel).....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

1	Manuscript Growth and lipid production of a newly isolated microalga <i>Nannochloropsis</i> sp.UHO 003 at increasing salinity telah disubmit pada HAYATI Journal of Biosciences (Q2)	36
2	Deskripsi Paten sederhana dengan judul invensi “ <b>HALOPHILIC MIKROALGA <i>Skeletonema</i> sp.UHO29 SEBAGAI BODIESEL FEEDSTOCK</b> “ telah Terdaftar	50
3	Sertifikat Sebagai Presenter pada Seminar Internasional di Hotel Claro Makassar, 21 Juni 2019	61
4	Sertifikat sebagai pemakalah pada seminar Nasional di Hotel Claro Makassar, 22 Juni 2019	62
5	Sertifikat sebagai pemakalah pada seminar Nasional Perikanan dan Kelautan Berkelanjutan III di Hotel Claro Kendari, 14 September 2019	63

## 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 mikroalga 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 mikroalga 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 mikroalga 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 mengasilkan ethanol dan methane (Spolaore et al. 2006). Mikroalga memiliki kemampuan untuk memanfaatkan CO<sub>2</sub> dari hasil buangan industry (flue gasses) sehingga dapat diusahakan secara untuk produksi biomass dan bioremediasi CO<sub>2</sub> serta dapat juga dimanfaatkan untuk pengolahan limbah cair dikarenakan mikroalga 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 mikroalga 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 mikroalga. 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 mikroalga laut. Indonesia memiliki biodiversity mikroalga yang sangat besar yang belum banyak dieksplorasi. Menurut Borowitzka (personal communication), pengembangan mikroalga 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 mikroalga 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 mikroalga 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 ekstensif 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 industri 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<sup>-1</sup>year<sup>-1</sup> dibandingkan dengan soybean (636 L oil ha<sup>-1</sup>year<sup>-1</sup>), jatropha (741 L oil ha<sup>-1</sup>year<sup>-1</sup>), canola (974 L oil ha<sup>-1</sup>year<sup>-1</sup>) dan palm oil (5366 L oil ha<sup>-1</sup>year<sup>-1</sup>) (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).

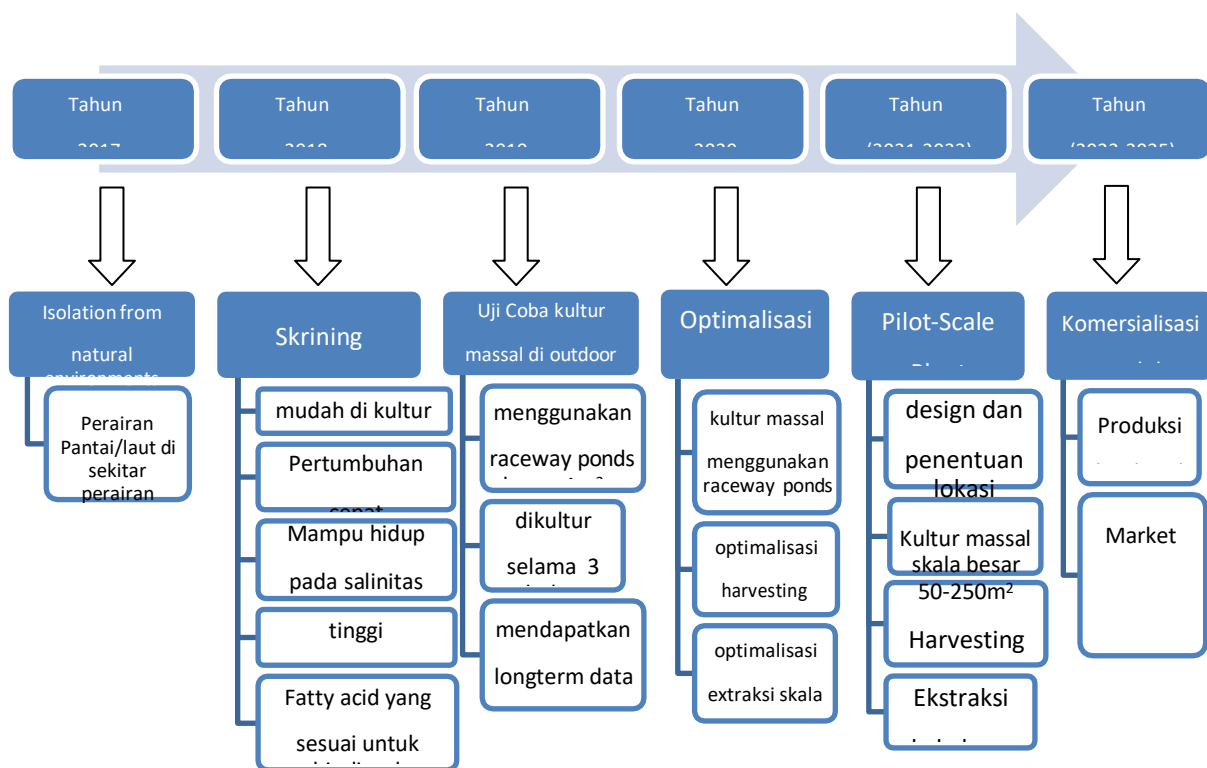
Beberapa faktor penting yang perlu dipertimbangkan dalam pengembangan biodiesel dari mikroalga. Seleksi spesies/strain adalah faktor yang pertama dan terpenting yang menentukan keberhasilan komersialisasi mikroalga dan seleksi spesies yang tepat merupakan faktor terpenting untuk kesuksesan produksi biodiesel 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 CO<sub>2</sub> dari industri (Sheehan et al. 1998; Borowitzka 2013b). Sampai saat ini sangat sulit untuk mendapatkan spesies yang bisa memenuhi semua kriteria tersebut di atas. Namun di yakini bahwa spesies yang memiliki adaptasi spesifik terhadap suatu lingkungan tertentu menjadi kunci keberhasilan produksi mikroalga secara komersial karena memungkinkan mikroalga terekspos pada kondisi lingkungan tertentu dimana tidak banyak organisme yang bisa bertahan setempat 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 komersial 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 mikroalga (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 mikroalga untuk jangka waktu yang lama karena kecil kemungkinan terjadi kontaminasi dan lebih cocok digunakan untuk spesies mikroalga 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 Merz (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.



Gambar 1. Road Map Penelitian

### **BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan 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 biomassa sebagai bahan bakubiodiesel. Untuk mencapai tujuan tersebut maka akan dilakukan beberapa tahapan kegiatan yakni 1). Mengisolasi species lokal mikroalgalaut dari berbagai habitat perairan asin termasuk estuaria dan pantai/ laut (2017), 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) (2018), 3). Melakukan ujicoba kultur massal di outdoor open pond system (raceway ponds) selama kurang lebih 2-3 bulan terhadap species-species yang unggul (2-3 species) (2019).

Target luaran (output) dari penelitian ini adalah 1). Akan diperoleh puluhan 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). Akan dihasilkan patent/patent sederhana. 3). Akan dihasilkan publikasi baik pada jurnal nasional maupun jurnal international. 4). Rekomendasi species/strain yang paling potensial sebagai biodiesel feedstok. 5). Hasil penelitian akan dipresentasikan pada konferensi/seminar Nasional dan International. 6). Akan memperkaya bahan ajar pada kuliah planktonologi, budidaya pakan alami, bioteknologi perairan dan bioprospecting kelautan.

## BAB 4. METODE PENELITIAN

### Tahapan Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 3 tahun dengan tahapan sebagai berikut:

#### Tahun 1. Isolasi dan Identifikasi (2017)

##### 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 sertamenyiapkan 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  $\text{NaNO}_3$ , fosfat  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Silika  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , trace elements dan vitamin. Masing-masing stok solution dibuat terpisah dengan konsentrasi yang berbeda-beda yakni nitrat  $\text{NaNO}_3$  (75g/l), fosfat  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (5.65g/l), Silika  $\text{NaSiO}_3$  (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 ( $\text{NaNO}_3$ ), fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Silika ( $\text{NaSiO}_3$ ) 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  $121^\circ\text{C}$ . 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 (Skrlning).

**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. Skrlning (2018)**

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

##### **1. Skrlning awal species/strains yang dapat dikultur pada hypersaline media**

- Biakan murni dari isolat yang telah dihasilkan akan diskale up ke 300 mL untuk mendapatkan cukup inoculum untuk eksperimen skrlning awal
- Strains yang mudah dikultur dan di skale up selanjutnya di kultur dalam Erlenmeyer 50 mL berisi 30 mL f/2 medium pada salinitas yang berbeda yakni 3,4 dan 5% NaCl (w/v), intensitas  $70 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , siklus 12 jam gelap :12 jam terang pada suhu kamar. Species yang tumbuh baik pada salinitas 5% NaCl selanjutnya akan dipilih untuk eksperimen selanjutnya. Hal ini dilakukan sebagai skrlning awal spesies yang dapat dikultur pada hypersaline media.

##### **2. Eksperiment pengaruh salinitas yang berbeda terhadap pertumbuhan dan kandungan lipid mikroalga**

- Dari hasil skrlning awal, spesies yang terpilih selanjutnya akan dikultur dalam erlemeyer 300 mL berisi 150 mL f/2 medium pada intensitas  $70 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , siklus 12 jam gelap :12 jam terang pada suhu kamar pada salinitas 3, 4, 5 dan 6% 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)
- Karakterisasi komposisi fatty acids (asam lemak) dari isolat yang tumbuh dengan baik pada salinitas hingga 6%
- Species yang paling potensil yang memiliki pertumbuhan yang bagus/cepat pada salinitas tinggi serta kandungan lipid yang tinggi akan dipilih untuk di kultur secara massal di outdoor.

### Tahun 3. Kultur massal di outdoor (2019)

1. Persiapan alat dan bahan

Pembelian dan pemesanan bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan media, ekstraksi dan pembuatan bak kultur, kincir dll

2. Pembuatan stok solution media f/2 dan Walne dan Persiapan inokulum kultur di indoor Untuk keperluan outdoor, terlebih dahulu harus disiapkan inokulum kultur yang akan digunakan sebagai starter kultur di outdoor. Inokulum kultur disiapkan di indoor secara bertahap mulai dari 200 ml-1 L-3 L-10 L-20 L. Inokulum kultur dipersiapkan untuk 2 jenis mikroalga yakni *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29.

3. Eksperimen pengaruh penggunaan media kultur yang berbeda terhadap pertumbuhan dan produktivitas

4. Pembuatan bak-bak kultur/paddle wheels/poros kincir

Pembuatan bak-bak kultur yang terbuat dari rangka besi, tripleks dan terpal dengan ukuran bak 2x0,8x0,4 m (PxLxT) sebanyak 6 buah. Masing-masing bak kultur juga dibuatkan kincir yang terbuat dari besi plat yang dipasang/ ditempelkan pada poros besi. Sambil menunggu penyelesaian pembuatan bak kultur, kincir dll maka dilakukan beberapa eksperimen di lab yang mana hasilnya akan diaplikasi pada kondisi kultur di outdoor

5. Eksperimen pengaruh penggunaan jenis pupuk yang berbeda terhadap pertumbuhan dan produktivitas lipid mikroalga

Eksperimen ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan dan produktivitas biomassa mikroalga dengan menggunakan jenis-jenis pupuk yang berbeda yakni f/2, Walne, NPK, TSP dan Urea. Dari eksperimen ini akan diketahui jenis pupuk yang memberikan pertumbuhan terbaik dan produktivitas biomassa dan lipid yang tertinggi dan jenis pupuk tersebutlah yang akan kita gunakan untuk uji coba kultur massal di outdoor.

6. Eksperimen pengaruh penggunaan jenis-jenis silika terhadap pertumbuhan dan produktivitas biomassa mikroalga.

Eksperimen ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan dan produktivitas biomassa diatom *Skeletonema* sp.UHO29 dengan menggunakan jenis-jenis silika yang berbeda yakni Laboratory grade silika (powder silica, Merck), Silika Solution PA (Merck) dan Waterglass silika Teknis.

7. Persiapan lahan/lokasi kultur di Balai Benih Udang Desa Purirano Kendari

Lokasi kultur di BBU Mata Kelurahan Purirano yang berjarak sekitar 40 km dari Kota Kendari. Lokasi ini dipilih karena tempatnya yang dekat dengan laut dan memiliki fasilitas treatment dan penampungan air laut serta memiliki lahan terbuka yang cukup luas yang sesuai dengan kebutuhan penelitian kultur massal di outdoor.

8. Persiapan kultur Outdoor dan inokulasi kultur

Bak-bak kultur/kincir/poros kincir/tripleks/terpal yang akan digunakan dibawa ke lokasi kultur BBU Mata dan selanjutnya dilakukan assembly 6 buah bak/kincir/poros/terpal. Setelah siap bak-bak kultur diisi air laut dan dibiarkan selama 2 hari dalam keadaan teraduk dengan kincir yang digerakkan dengan mesin dengan tujuan untuk mencuci/menghilangkan residu/bahan kimia pada terpal dan cat kincir. Setelah itu baru kemudian terpal dibersihkan dan dikeringkan untuk diisi kembali dengan air laut untuk memulai proses inokulasi.

9. Kultur massal di outdoor

Pada awalnya hanya 2 pond saja yang diinokulasi masing-masing untuk jenis *Nannochloropsis* (pond 4) dan *Skeletonema* (pond 2). Setelah dikultur mencapai stationary phase sebagian kultur dipindah ke bak yang disebelah sehingga masing-masing spesies dikultur menggunakan 3 bak yakni bak 1-3 untuk kultur *Skeletonema*

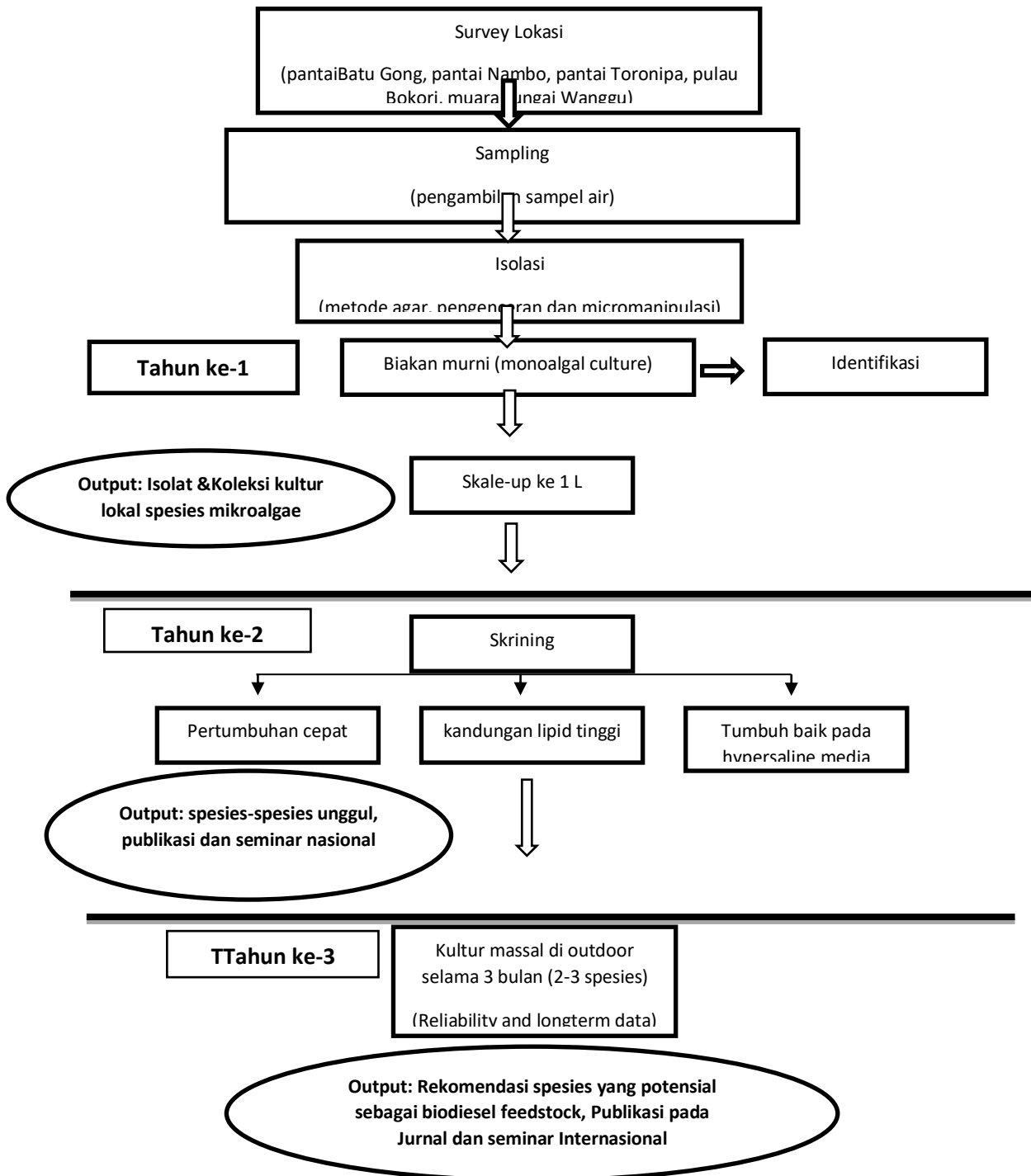
dan bak 4-6 untuk kultur *Nannochloropsis*. Untuk selanjutnya kultur dioperasikan dengan mode semikontinyu yakni panen sebagian (30-50%) setiap 4 hari dan dilakukan penambahan media kultur sebanyak volume yang dipanen dan diberi nutrisi/pupuk.

10. Sampling untuk penghitungan kepadatan sel dilakukan setiap 2 hari sementara penentuan dry weight, ash free dry weight dan lipid dilakukan setiap 4 pada saat panen dilakukan selama periode kultur

11. Analisis komposisi asam lemak akan dilakukan setiap bulannya sehingga akan didapatkan data komposisi asam lemak dari masing-masing species selama 2-3 bulan periode kultur

Dari penelitian ini akan dihasilkan data pertumbuhan, laju pertumbuhan spesifik, dry weight, ash free dry weight, biomass productivity, lipid yield, lipid content, lipid productivity, dan komposisi asam lemak setiap bulan selama periode kultur 2-3 bulan

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 ( $\mu$ )) dihitung menggunakan persamaan berikut:

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

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

### Menentukan berat kering biomass (DW) dan berat kering organic (AFDW)

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

$$\text{Dryweight}(g.L^{-1}) = (\text{weightoffiltersplusalgae}) - (\text{weightoffilters})$$

Filter kemudian dipindahkan ke oven furnace pada suhu 450°C selama 5 jam. Berat kering 17rganic (Ash-free dry weight) dihitung menggunakan formula berikut:

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

### Lipid Extraction

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

### Komposisi Asam Lemak

Penentuan komposisi asam lemak dilakukan dengan menggunakan Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).

### 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 14 package.

## BAB 5. HASIL YANG DICAPAI DAN LUARAN

### 5.1. Hasil

#### 5.1.1. Pengaruh penggunaan Nutrient (Pupuk Komersil) Yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan dan Produktivitas biomassa *Nannochloropsis* sp. UHO3

Salah satu permasalahan utama dari pengembangan mikroalga sebagai bahan baku biodiesel adalah tingginya biaya produksi. Biaya untuk penggunaan pupuk/nutrient dalam kegiatan kultur mikroalga dapat mencapai hingga 30% dari total biaya produksi. Untuk keperluan kultur massal di outdoor sebaiknya digunakan sumber nutrient yang murah dan mudah diperoleh untuk mengurangi biaya produksi biomassa mikroalga. Oleh karena itu diperlukan penelitian mengenai pengaruh penggunaan pupuk/nutrient yang berbeda terhadap pertumbuhan dan produktivitas biomassa *Nannochloropsis* sp.UHO3.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa *Nannochloropsis* sp.UHO3 dapat tumbuh dengan baik pada semua jenis nutrient yang digunakan serta tidak tampak adanya fase lag sesaat setelah inokulasi (Fig.2). Dari kurva pertumbuhan terlihat bahwa kultur tumbuh dengan cepat pada 4 hari pertama (fase eksponensial) dan mulai memasuki fase perlambatan pertumbuhan (fase stationary) pada hari ke-6 hingga hari ke-14 kecuali kultur yang diberi pupuk NPK saja mengalami penurunan jumlah kelimpahan sel (fase kematian) setelah hari ke-6 (Fig.2).

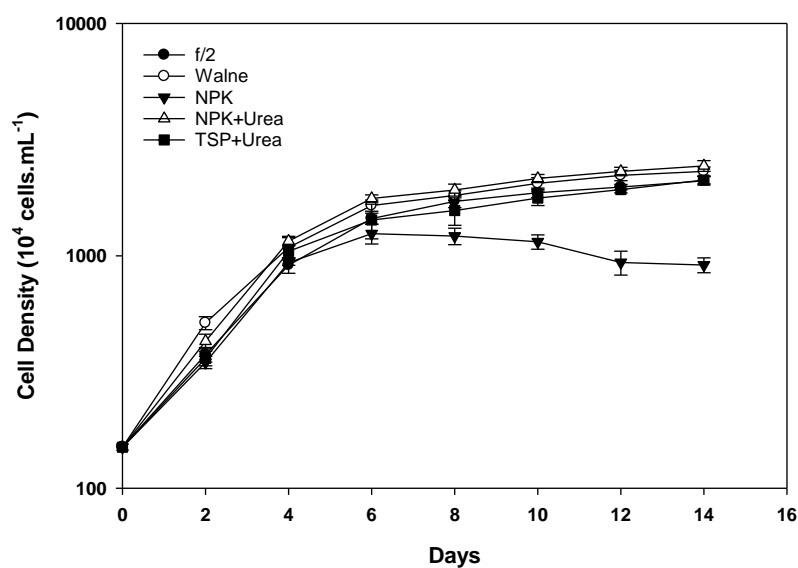


Figure 2. Growth curve of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 under different culture medium

Laju pertumbuhan spesifik (SGR) dari *Nannochloropsis* sp.UHO3 yang dikultur menggunakan nutrient yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan (One Way Anova,  $F(10,4)=7,361$ ,  $P=0,005$ ). SGR tertinggi didapatkan pada kultur yang menggunakan media Walne ( $0,615 \pm 0,0321 \text{ d}^{-1}$ ) dan terendah pada kultur yang menggunakan nutrient f/2 ( $0,458 \pm 0,0356 \text{ d}^{-1}$ ) (One Way Anova,  $P=0,004$ ) (Fig.3). SGR kultur yang menggunakan media Walne tidak berbeda nyata dengan SGR kultur yang menggunakan media NPK+urea (Holm-Sidak method,  $P=0,106$ ) dan TSP+urea (Holm-Sidak method,  $P=124$ ). Sementara SGR kultur menggunakan media f/2 tidak berbeda nyata dengan kultur yang menggunakan media NPK (Holm-Sidak method,  $P=0,602$ ), NPK+urea (Holm-Sidak method,  $P=0,238$ ) dan TSP+urea (Holm-Sidak method,  $P=0,215$ ) (Fig.3).

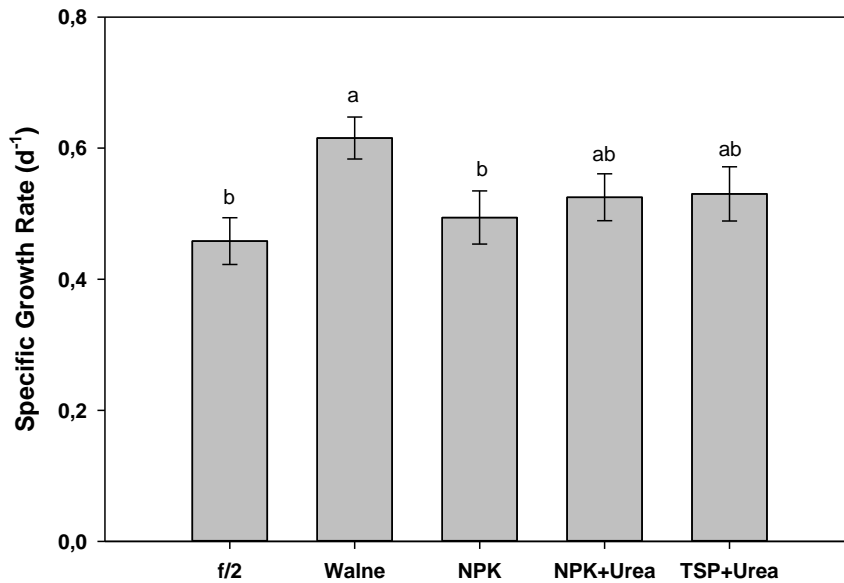


Figure 3. Specific growth rate (SGR) of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 under different culture medium.

Biomass yield *Nannochloropsis* sp.UHO3 saat dikultur pada nutrient yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (One Way Anova,  $F(10,4)=2,150$ ,  $P=0,149$ ). Biomass yield *Nannochloropsis* sp. berkisar  $0,560-0,85$  g.L<sup>-1</sup> (Fig.4).

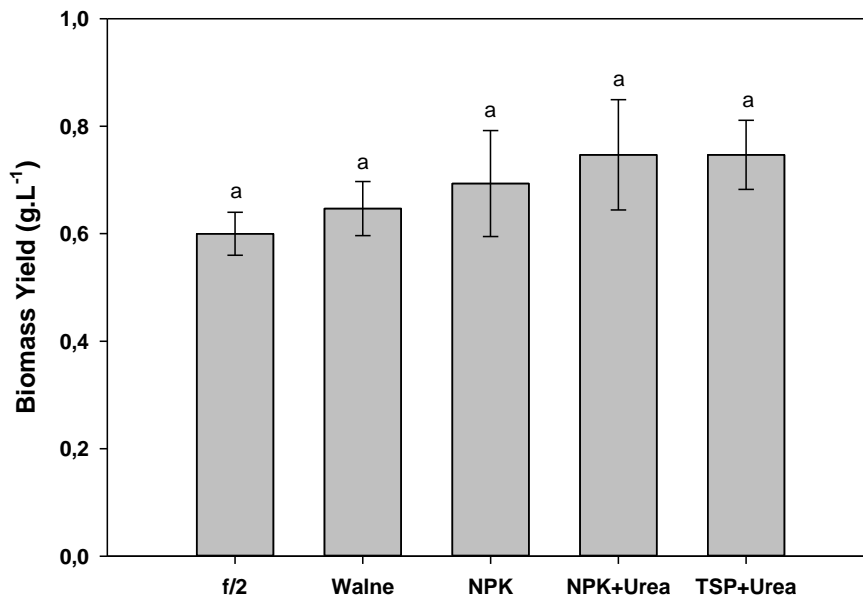


Figure 4. Biomass yield of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 under different culture medium

Produktivitas biomassa *Nannochloropsis* sp. yang dikultur pada media uji yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (One Way Anova,  $F(10,4)=4,329$ ,  $P>0,05$ ). Nilai produktivitas biomassa berkisar  $0,254-0,437$  g.L<sup>-1</sup>.d-1 (Fig.5).

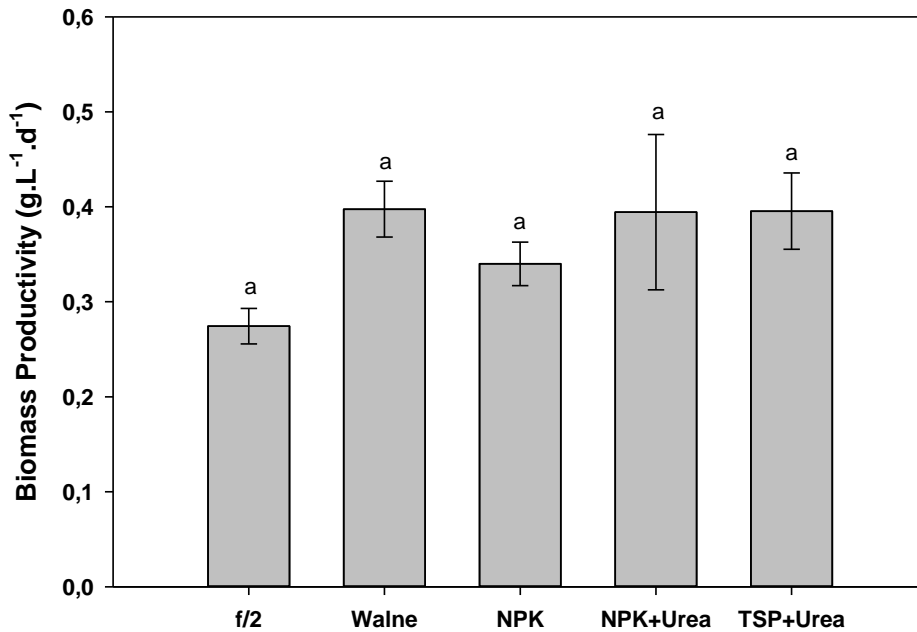


Figure 5. Biomass productivity of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 under different culture medium

### 5.1.2. Pengaruh penggunaan sumber silikat yang berbeda terhadap pertumbuhan dan produktivitas biomassa *Skeletonema* sp. UHO 029

*Skeletonema* sp.UHO29 merupakan salah satu jenis diatom dari kelas bacillariophyceae. Untuk tumbuh dan berkembang biak dengan baik, diatom membutuhkan nutrient silika selain makro dan mikro nutrient sebagaimana yang dibutuhkan oleh mikroalga lainnya. Selama kultur *Skeletonema* sp. dalam kondisi laboratorium digunakan sodium metasilicate powder (Merck) sebagai sumber silika. Permasalahan dengan silika jenis ini adalah harga yang mahal, tidak dijual bebas dan pemesannya harus indent hingga 2 bulan. Oleh karena itu, untuk keperluan kultur massal diperlukan alternative sumber silika yang mudah diperoleh dengan harga yang jauh lebih murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan sumber silika yang berbeda (sodium silikate powder, silikate solution dan waterglass silika) terhadap pertumbuhan dan produktivitas biomassa *Skeletonema* sp.UHO29.

Pertumbuhan mikroalga *Skeletonema* sp.UHO29. menggunakan silika berbeda dapat dilihat pada Fig.5. Dari kurva pertumbuhan terlihat bahwa *Skeletonema* sp. dapat tumbuh dengan baik pada semua sumber silika yang diujikan. Semua kultur mengalami fase lag pada 2 hari pertama setelah itu kultur memasuki fase eksponensial hingga hari ke 4 untuk selanjutnya ke fase stationari pada hari ke 6 hingga hari ke 12 (Fig.6).

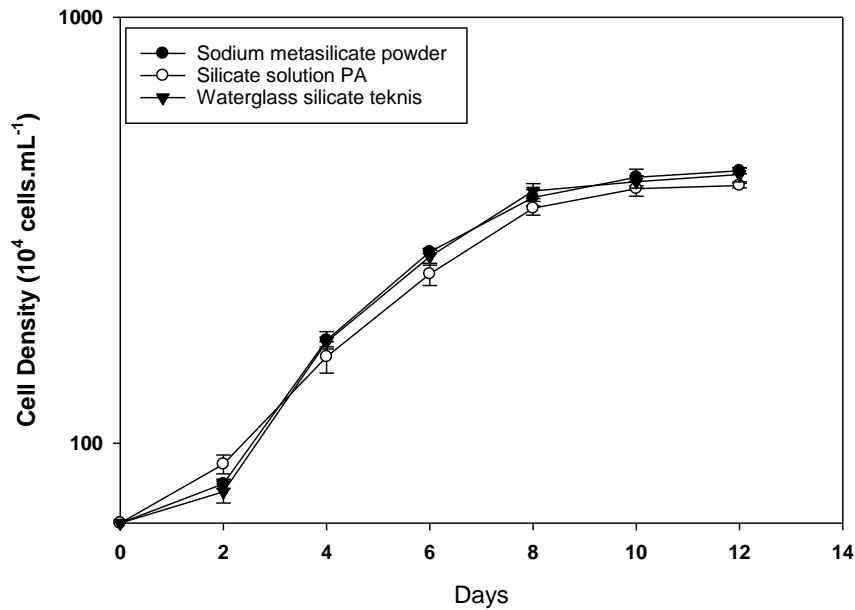


Figure 6. Growth curve of the *Skeletonema* sp.UHO29 under different silica source

Laju pertumbuhan spesifik *Skeletonema* sp. pada silika yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (One Way Anova,  $F(6,2)=10,113$ ,  $P=0,012$ ). LPS tertinggi ( $0,403\pm 0,043$  d<sup>-1</sup>) diperoleh pada waterglass silika dan terendah pada silikat solution ( $0,290\pm 0,037$  d<sup>-1</sup>). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara LPS kultur yang menggunakan waterglass silika dengan sodium metasilika powder (Holm-Sidak,  $P=0,560$ ). Namun terdapat perbedaan yang signifikan antara LPS waterglass silikat dengan LPS silika solution (Holm-Sidak,  $P=0,018$ ) dan antara LPS sodium metasilikat powder dengan LPS silika solution (Holm-Sidak,  $P=0,024$ ) (Fig. 7).

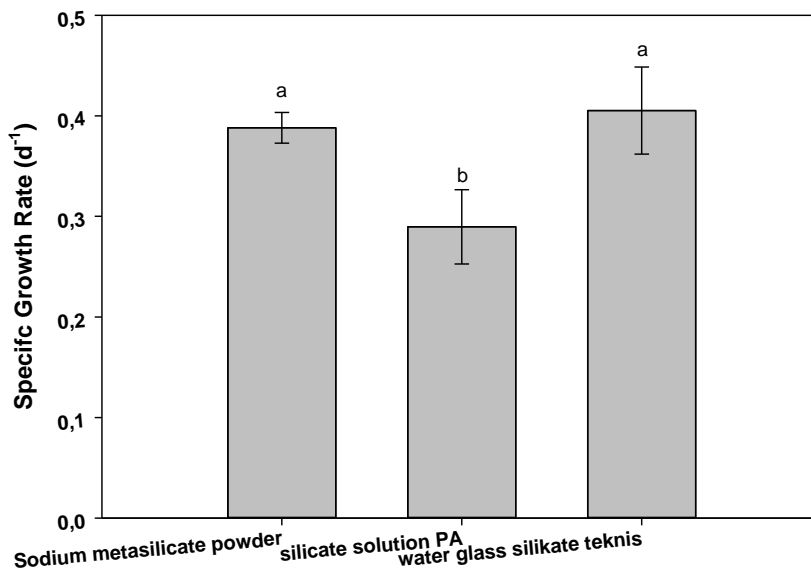


Figure 7. Specific growth rate (SGR) of the *Skeletonema* sp.UHO29 under different silica

Biomass yield *Skeletonema* sp.UHO29 pada silika yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (One Way Anova,  $F(6,2)=0,273$ ,  $P=0,770$ ). Biomass yield berkisar antara 0,548-0,655  $\text{g.L}^{-1}$  (Fig.8).

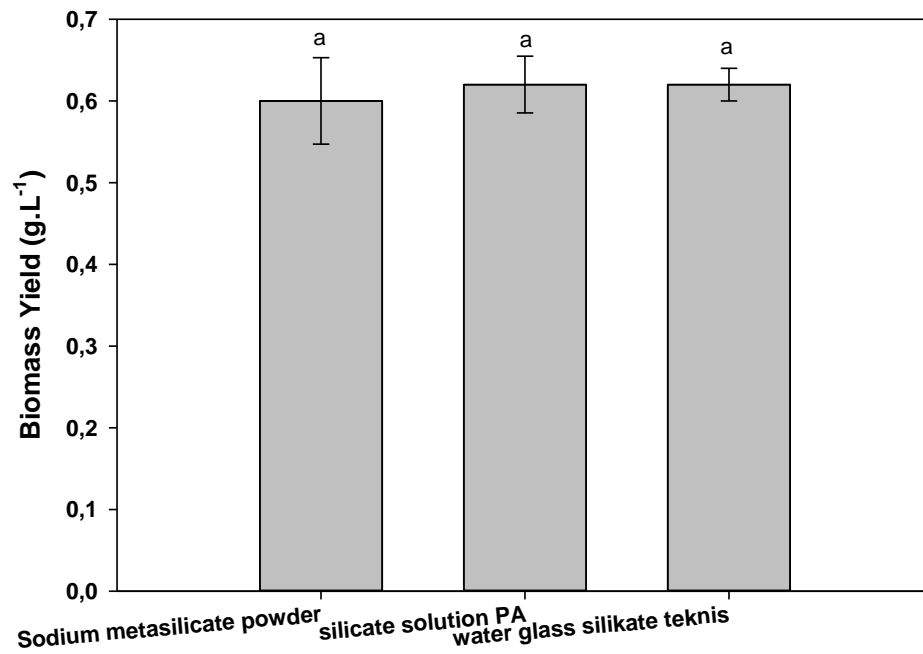


Figure 8. Biomass yield of the *Skeletonema* sp.UHO29 under different silica

*Skeletonema* sp.UHO29 yang dikultur pada silika yang berbeda memberikan hasil produktivitas biomassa yang berbeda nyata (One Way Anova,  $F(6,2)=7,619$ ,  $P=0,023$ ). Produktivitas biomassa tertinggi diperoleh pada waterglass silika ( $0,252\pm 0,033 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) dan terendah pada silikat solution ( $0,179\pm 0,019 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Biomass productivity yang dikultur menggunakan silika waterglasss berbeda nyata dengan silikat solution (Holm-Sidak,  $P=0,028$ ), namun tidak terdapat perbedaan yang nyata antara produktivitas biomassa antara sodium metasilikat powder dengan silikat solution (Holm-Sidak,  $P=0,064$ ) dan antara waterglass silika dan sodium metasilika powder (Hom-Sidak,  $P=0,358$ ) (Fig.9).

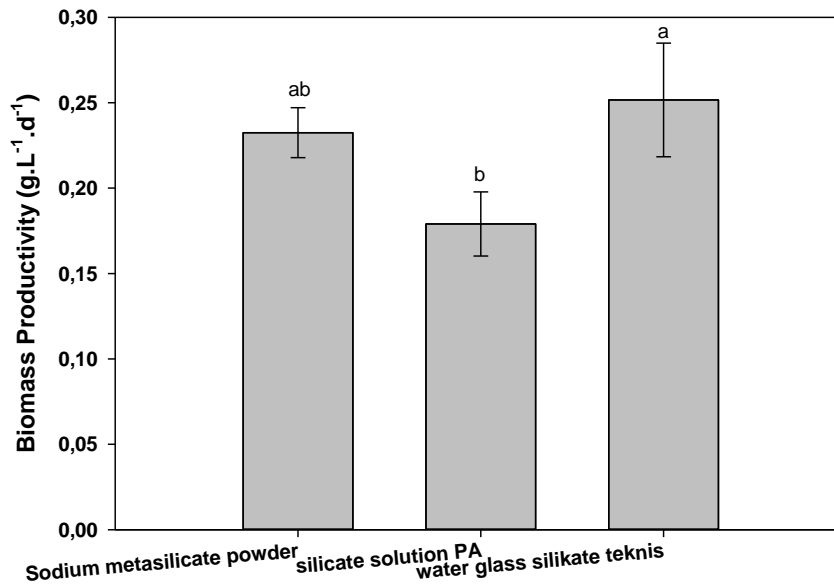


Figure 9. Biomass productivity of the *Skeletonema* sp.UHO29 under different Silica

### 5.1.3. Kultur Massal *Nannochloropsis* sp. IND-UHO3 dan *Skeletonema* sp. IND-UHO 029 di outdoor menggunakan raceway ponds

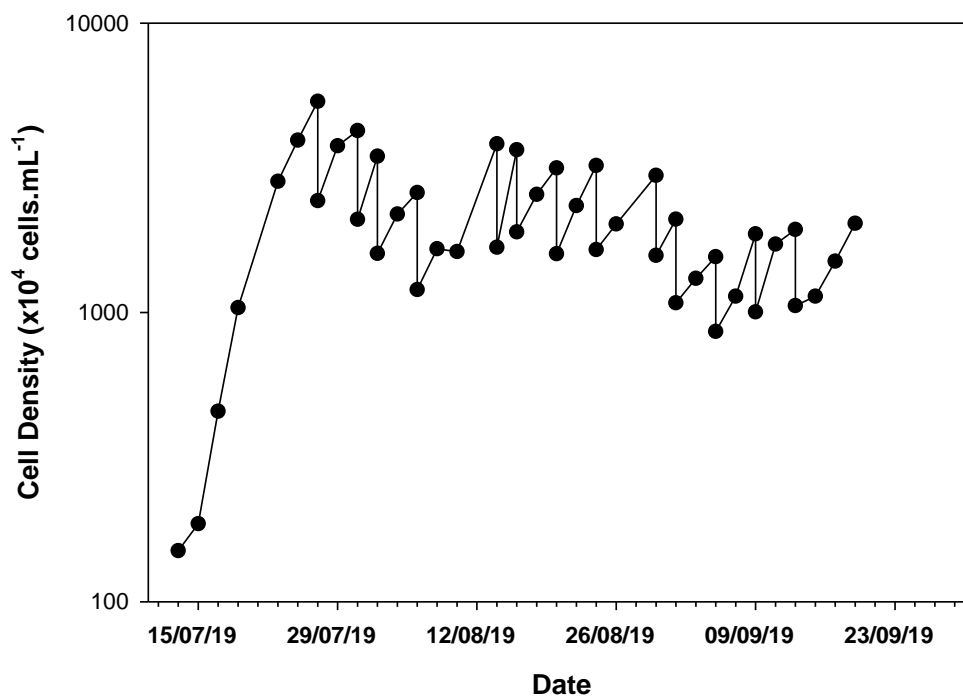
Dari hasil penelitian di laboratorium diketahui bahwa kedua species mikroalga yakni *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel karena pertumbuhan yang cepat, tolerance terhadap kisaran salinitas yang luas dan tinggi (2-7% NaCl), biomass dan lipid yield yang tinggi, produktivitas biomass dan lipid yang tinggi serta komposisi asam lemak yang sesuai untuk biodiesel. Namun belum diketahui apakah kedua jenis mikroalga ini dapat tumbuh dengan baik pada kondisi outdoor yang kondisi lingkungannya sangat berbeda dengan kondisi indoor/laboratorium yang terkontrol dan stabil. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan dan produktivitas biomassa dan lipid mikroalga *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 yang dikultur massal di outdoor menggunakan kolam raceway di outdoor.



Figure 10. Large-scale cultivation of *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp. UHO29 in outdoor raceway ponds

Kurva pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 selama periode kultur 13 Juli 2019 hingga 19 September 2019 pada kolam raceway di outdoor secara semi-kontinyu dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.

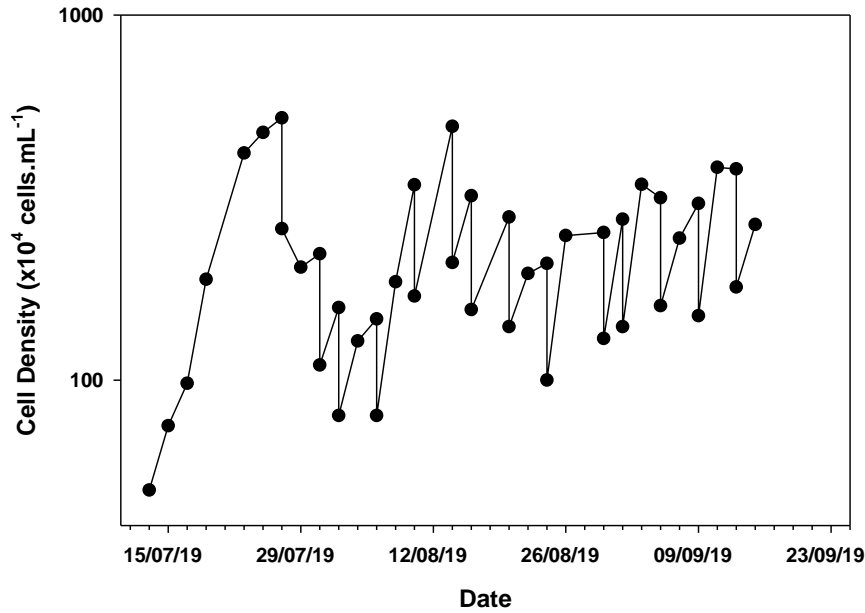
Dari Gambar 11 terlihat bahwa *Nannochloropsis* sp.UHO3 dapat tumbuh dengan baik pada kondisi outdoor meskipun beberapa hari diawal setelah inokulasi pertumbuhan agak lambat karena masih proses adaptasi pada lingkungan outdoor yang kondisi lingkungannya berbeda dengan kondisi outdoor terutama variasi suhu dan intensitas cahaya. Pada awalnya kultur dijalankan secara batch mode hingga mencapai fase stationari. Kepadatan awal sel kultur *Nannochloropsis* sp.UHO3 saat inokulasi adalah  $150 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> dan kepadatan tertinggi pada hari ke-14 adalah  $5367 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>. Dari Gambar 11 juga terlihat bahwa setelah mengalami fase lag pada 2 hari pertama, kultur *Nannochloropsis* mengalami pertumbuhan yang cepat (fase eksponensial) hingga hari ke 8 dan memasuki fase stationari awal pada hari ke 10. Pada hari ke-14, kultur mulai dijalankan secara semi-kontinyu dengan cara memanen sebagian kultur (30-50%) dan menambahkan media kultur yang baru sebanyak volume kultur yang dipanen lalu diberi nutrisi sesuai dosis 1 mL nutrient untuk 1 L air media. Kultur selanjutnya dibiarkan tumbuh hingga mencapai kepadatan sel maksimal (sekitar 4 hari) untuk selanjutnya di panen lagi dan seterusnya seperti itu selama periode kultur.



**Figure 11. Growth Curve of *Nannochloropsis* sp. IND-UHO 003 under semi-continuous regime in outdoor raceway ponds**

Kurva pertumbuhan kultur *Skeletonema* sp.UHO29 pada kolam raceway di outdoor selama periode 13 Juli 2019 -15 September 2019 dapat dilihat pada Gambar 12. Dari Gambar terlihat bahwa mikroalga *Skeletonema* sp.UHO29 dapat tumbuh dengan baik pada kondisi outdoor menggunakan kolam raceway selama periode kultur. Pada awalnya kultur dijalankan secara batch mode dengan kepadatan awal sel setelah inokulasi berkisar  $50 \times 10^4$  cell.mL<sup>-1</sup> dan mencapai  $523 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> pada hari ke 14 (fase stationari). Setelah hari ke 14, kultur dioperasikan secara semi-kontinyu dengan cara memanen sebagian kultur dan menambahkan media baru sebanyak volume kultur yang dipanen.



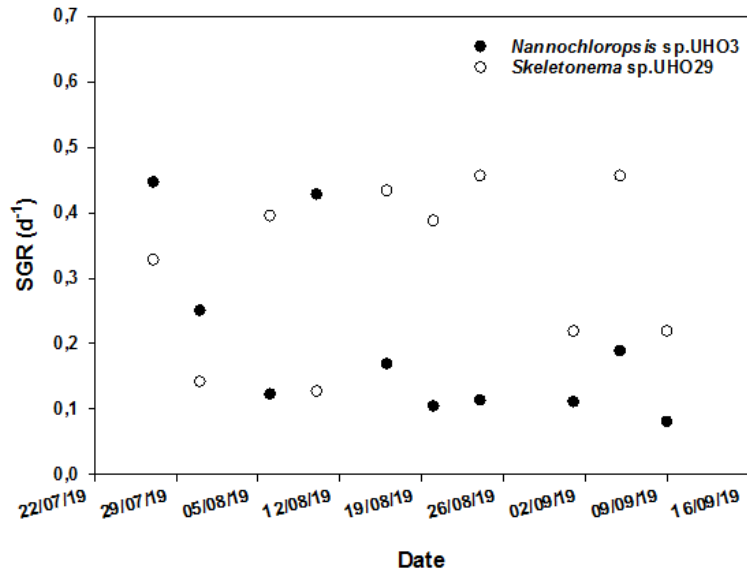


**Figure 12. Growth Curve of *Skeletonema* sp. IND-UHO 029 under semi-continuous regime in outdoor raceway ponds**

Sistem kultur mikroalga skala massal ada dua yakni sistem terbuka (open system) dan sistem tertutup (closed system) (Borowitzka and Moheimani 2013; Zittelli et al. 2013). Penggunaan sistem terbuka (open ponds) untuk kultur massal lebih ekonomis dan lebih mudah dioperasikan dibandingkan dengan sistem tertutup (photobioreactor) sehingga kultur sistem terbuka seperti kolam raceway merupakan sistem kultur yang paling banyak digunakan untuk produksi massal mikroalga (Borowitzka and Moheimani 2013).

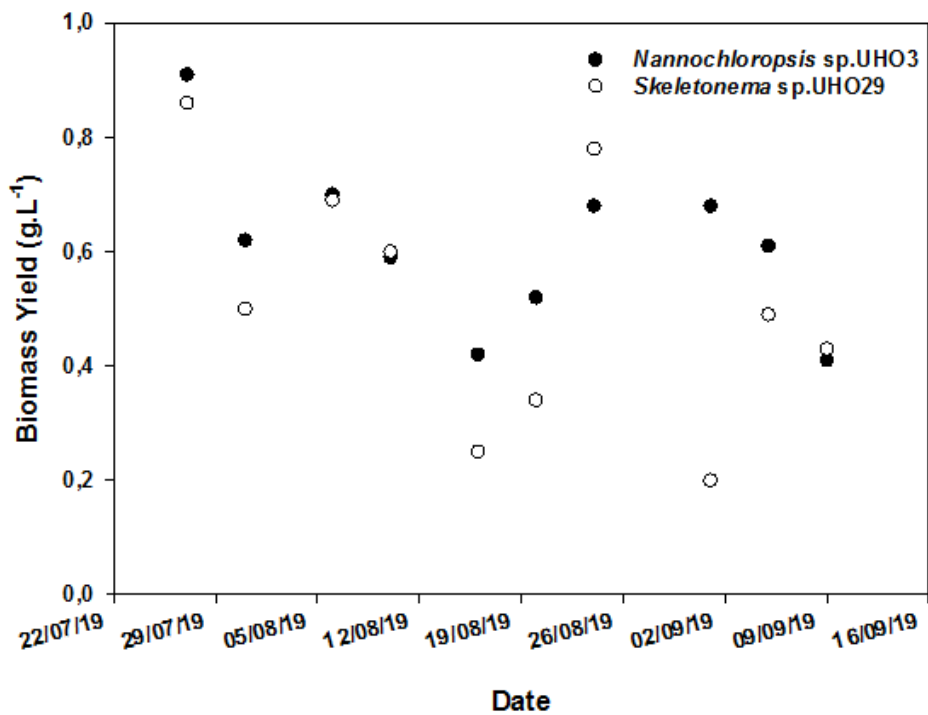
Keberhasilan produksi komersial mikroalga skala massal di outdoor sangat tergantung oleh banyak faktor diantaranya adalah kemampuan mikroalga untuk mentolerir perubahan lingkungan yang terjadi pada kondisi outdoor seperti perubahan suhu, intensitas cahaya dan salinitas.

Laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 yang dikultur massal di kolam raceway dioutdoor dapat dilihat pada Gambar 13. Laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp.UHO3 berkisar 0,105-0,447 d<sup>-1</sup> (0,202±0,133 d<sup>-1</sup>) sedangkan laju pertumbuhan spesifik *Skeletonema* sp.UHO29 berkisar 0,127-0,457 d<sup>-1</sup> (0,317±0,129 d<sup>-1</sup>).



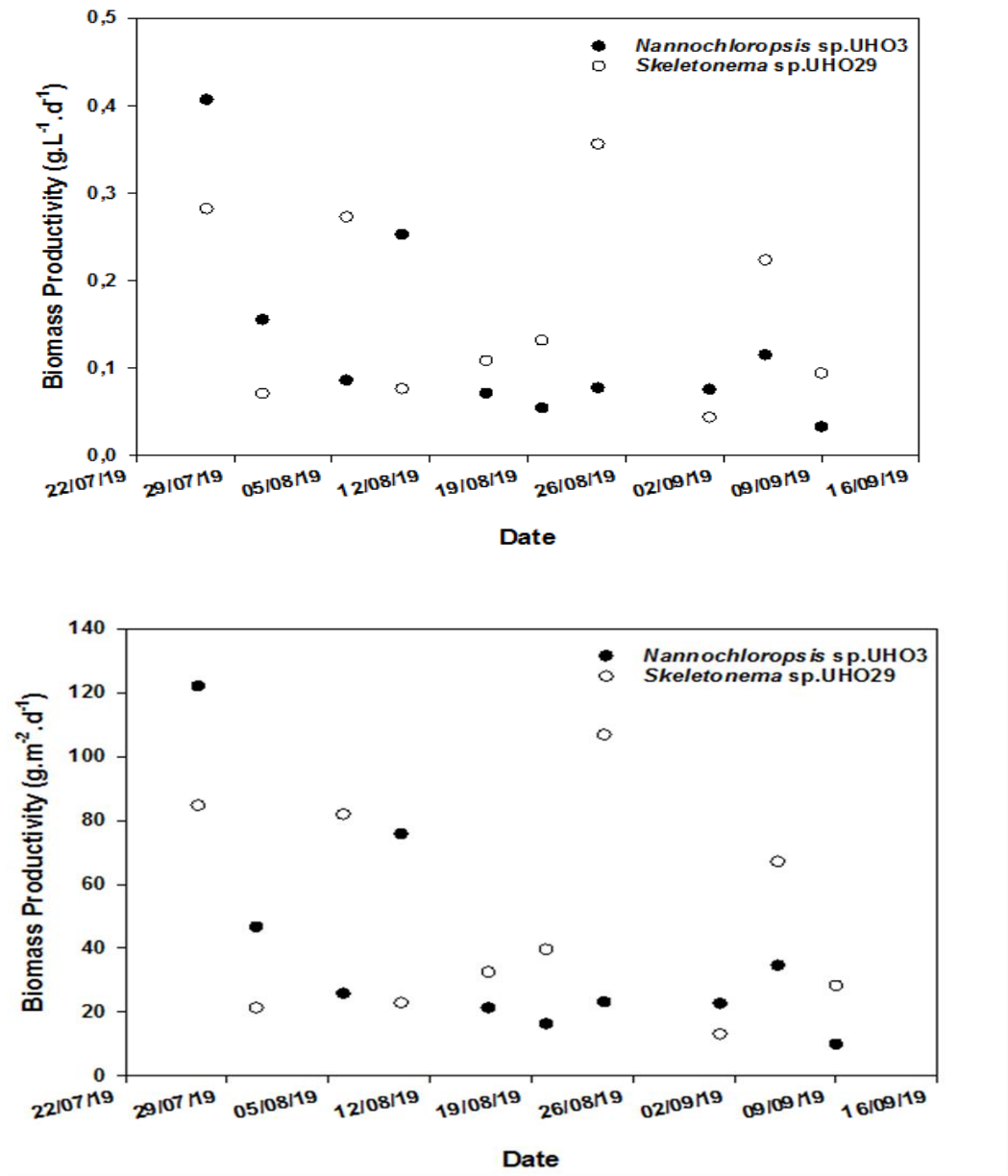
**Figure 13. Specific growth rate (d<sup>-1</sup>) of *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds**

Biomass yield *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 yang dikultur massal pada kolam raceway di outdoor selama 3 bulan dapat dilihat pada Gambar 14. Dari gambar terlihat bahwa biomass yield *Nannochloropsis* sp.UHO3 (0,614±0,146 g.L<sup>-1</sup>) lebih tinggi dari *Skeletonema* sp.UHO29 (0,515±0,219 g.L<sup>-1</sup>).



**Figure 14. Biomass yield (g.L<sup>-1</sup>) of *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds**

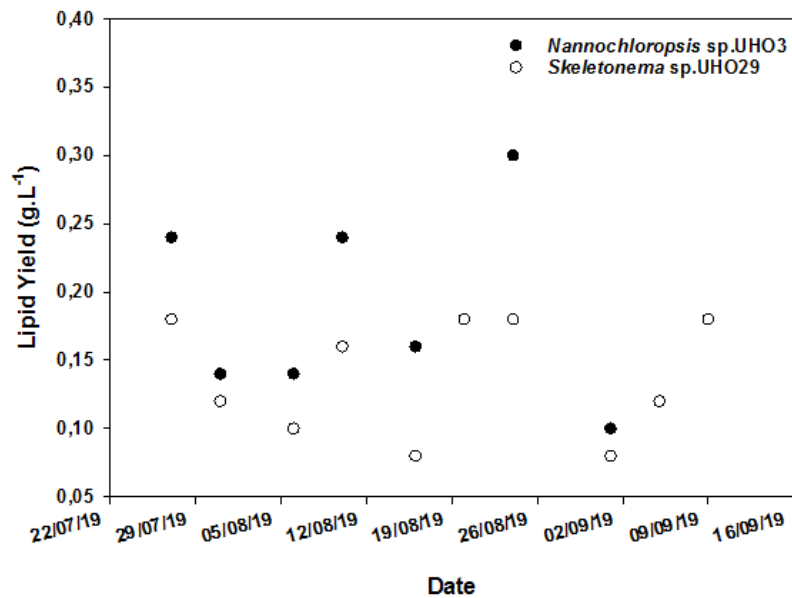
Produktivitas biomassa kedua spesies mikroalga yang dikultur massal pada kolam raceway di outdoor dapat dilihat pada Gambar 15. Rata-rata produktivitas biomassa *Nannochloropsis* sp.UHO3 per volume adalah  $0,133 \pm 0,115 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  dan per luasan area adalah  $39,89 \pm 34,46 \text{ g.m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ . Sedangkan *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki rata-rata produktivitas biomassa per volume adalah  $0,166 \pm 0,109 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  dan per luasan area adalah  $49,85 \pm 32,57 \text{ g.m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ .



**Figure 15. Biomass productivity of *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds in g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Top panel) and in g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> (Bottom panel)**

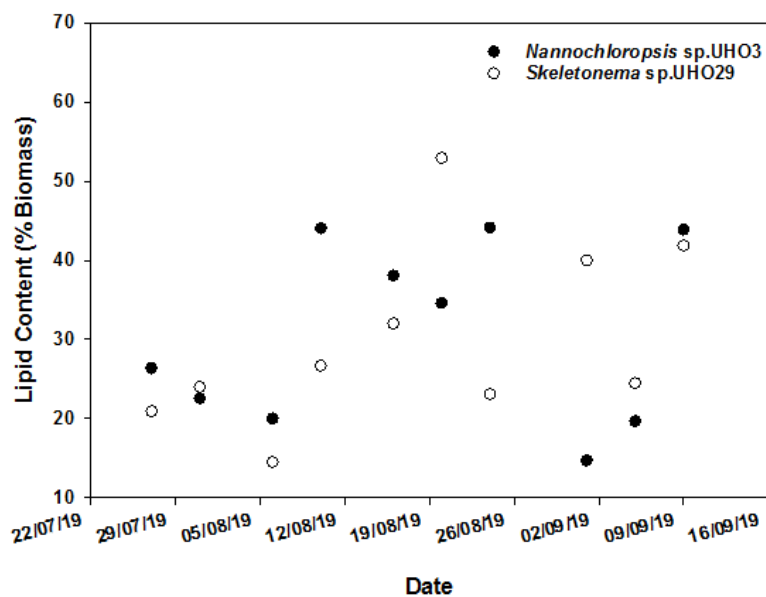
Lipid yield *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 selama kultur massal di kolam raceway di outdoor dapat dilihat pada Gambar 15. Kultur *Nannochloropsis* sp.UHO3

memiliki lipid yield  $0,18 \pm 0,063 \text{ g.L}^{-1}$  sedangkan lipid yield *Skeletonema* sp.UHO29 adalah  $0,138 \pm 0,043 \text{ g.L}^{-1}$  (Gambar 16).



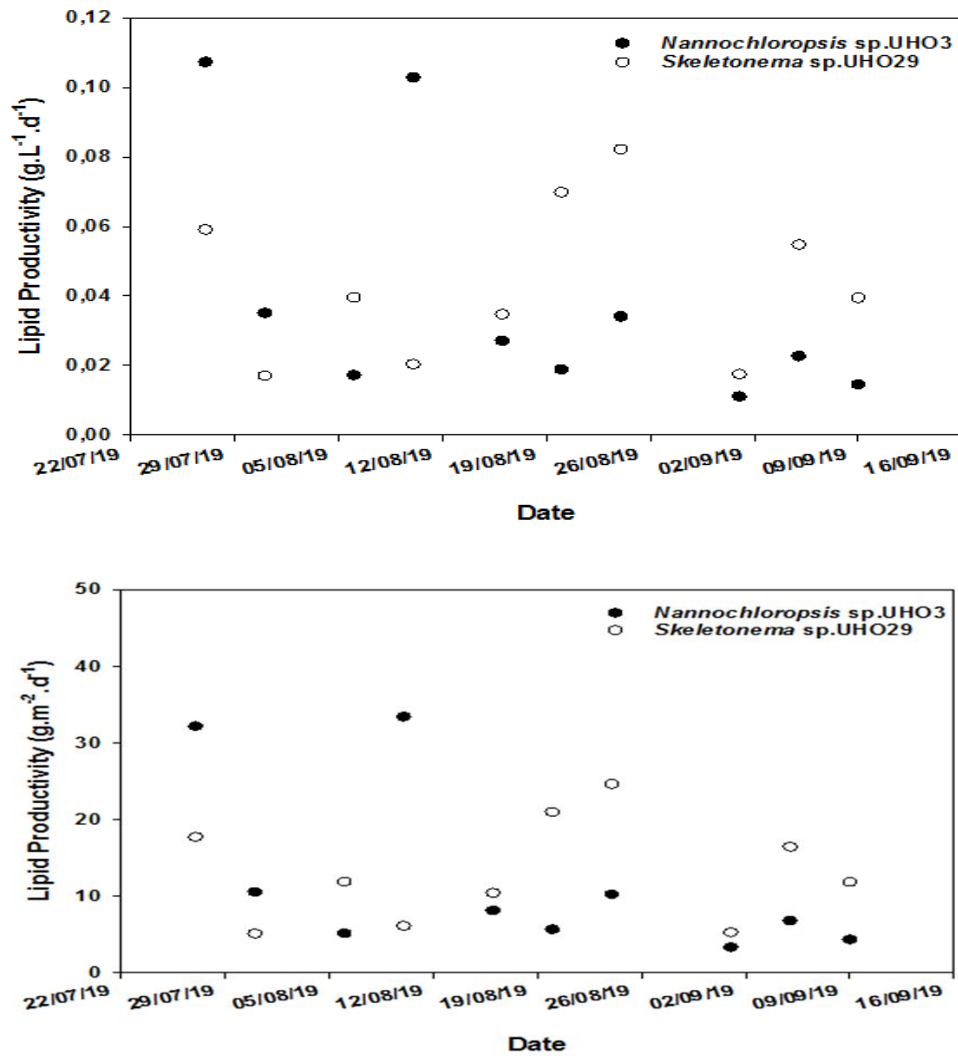
**Figure 16. Lipid yield (g.L<sup>-1</sup>) of *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds**

Kandungan lipid *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 selama 3 bulan kultur massal di outdoor raceway ponds dapat dilihat pada Gambar 17. Rata-rata kandungan lipid *Nannochloropsis* adalah  $30,47 \pm 11,06\%$  Berat Biomass sedangkan *Skeletonema* memiliki kandungan lipid  $30,05 \pm 11,64\%$  Berat Biomass.



**Figure 17. Lipid content (% Biomass) of *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds**

Produktivitas lipid *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 yang dikultur massal pada kolam raceway di outdoor selama 3 bulan dapat dilihat pada Gambar 18. Rata-rata produktivitas lipid *Nannochloropsis* sp.UHO3 per volume adalah  $0,039 \pm 0,036 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  dan per luasan area adalah  $11,733 \pm 10,699 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ . Sedangkan *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki rata-rata produktivitas lipid per volume adalah  $0,044 \pm 0,023 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  dan per luasan area adalah  $13,043 \pm 6,767 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ .



**Figure 18. Lipid productivity of *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds in  $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (Top panel) and in  $\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Bottom panel)**

Komposisi asam lemak mikroalga *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 didominasi oleh saturated fatty acids C16:0 dan C18:0 dan monounsaturated fatty acids C16:1 dan C18:1.

## Pembahasan

Produksi massal microalgae secara komersial dapat dilakukan melalui dua system yakni system terbuka (open system) atau system tertutup (photobioreactors) dimana aceway pond adalah system kultur terbuka di outdoor yang paling umum digunakan untuk produksi komersial mikroalga (Borowitzka and Moheimani 2013). Raceway pond terdiri atas sebuah sirkuit dengan saluran yang parallel yang dilengkapi dengan paddlewheel yang digunakan untuk mensirkulasi kultur mikroalga (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 2013). Penelitian ini menggunakan sistem kultur terbuka yakni kolam raceway karena merupakan sistem kultur yang banyak diterapkan oleh industri untuk produksi massal mikroalga karena capital costnya lebih murah serta lebih mudah dioperasikan. Selain itu penggunaan kolam raceway untuk kultur massal mikroalga laut khususnya di Indonesia merupakan pilihan yang tepat karena dapat langsung diposisikan didaerah pesisir/dekat pantai sehingga memudahkan akses terhadap sumber air laut. Berbeda dengan raceway pond yang lainnya, kolam raceway yang digunakan pada penelitian ini terbuat dari rangka besi, berdinding tripleks dan dilapisi terpal putih dengan pertimbangan biaya dan mobilisasi/assembly peralatan kultur mengingat lokasi kultur bukan lahan pribadi/institusi sehingga tidak bisa dibuat permanen.

Keberhasilan produksi komersial mikroalga skala massal di outdoor sangat tergantung oleh banyak faktor diantaranya adalah kemampuan mikroalga untuk mentolerir perubahan lingkungan yang terjadi pada kondisi outdoor seperti perubahan suhu, intensitas cahaya dan salinitas (Borowitzka 2005; Indrayani 2017; Indrayani et al. 2019). Dari penelitian ini diketahui bahwa kedua jenis mikroalga *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 dapat tumbuh dengan baik pada kolam raceway di outdoor selama periode kultur 13 Juli - 19 september 2019. Hal ini menunjukkan bahwa kedua mikroalga memiliki kemampuan untuk mentolerir fluktuasi parameter lingkungan di outdoor termasuk suhu, salinitas dan intensitas cahaya.

Laju pertumbuhan spesifik (LPS) *Nannochloropsis* sp.UHO3 berkisar berkisar 0,105-0,447 d<sup>-1</sup> sedangkan laju pertumbuhan spesifik *Skeletonema* sp.UHO29 berkisar 0,127-0,457 d<sup>-1</sup>. Nilai laju pertumbuhan spesifik yang diperoleh di outdoor sedikit lebih rendah dibanding laju pertumbuhan spesifik pada kondisi laboratorium/indoor. Hal ini dikarenakan kondisi indoor yang terkontrol dan stabil sehingga kultur dapat tumbuh lebih optimal.

*Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 yang dikultur massal di outdoor memiliki kandungan lipid yang tinggi yakni masing-masing berkisar 15-44% AFDW dan 14-53% AFDW. Dibandingkan dengan nilai kandungan lipid saat dikultur di laboratorium/indoor maka kandungan lipid di outdoor raceway pond lebih tinggi. Kandungan lipid mikroalga pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Crow et al. (2012) yang mendapatkan kandungan lipid *Nannochloropsis salina* yang dikultur pada kolam raceway di Tucson, USA berkisar antara 15-25% AFDW. Penelitian yang dilakukan Benavides et al. (2013) melaporkan kandungan lipid diatom *Phaeodactylum tricornutum* yang dikultur di open ponds berkisar 25 - 27,5% Dry weight (Benavides et al. 2013).

Penelitian tentang kultur massal mikroalga pada kolam raceway di outdoor belum banyak dilakukan apalagi di Indonesia. Pada penelitian ini diperoleh nilai produktivitas biomassa *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 masing-masing berkisar antara 10-122 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup> dan 13-107 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. Nilai produktivitas biomassa kedua mikroalga ini lebih tinggi

dibandingkan beberapa jenis mikroalga lainnya yang juga dikultur pada kolam raceway di outdoor seperti produktivitas biomass *Nannochloropsis salina* yang dikultur di Israel pada raceway pond dengan kedalaman kultur 12 cm memiliki produktivitas biomassa  $24,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Boussiba et al. 1987) dan *Nannochloropsis gaditana* yang dikultur pada kolam raceway di Spain memiliki produktivitas biomassa  $22,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (San Pedro et al. 2015). *Cyclotella* sp. adalah  $12 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Huasemann et al. 2009), *Scenedesmus obliquus* dengan rata-rata produktivitas tahunan  $15 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Payer et al. 1978), *Pleurochrysis carterae* dengan produktivitas  $33,68 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Moheimani and Borowitzka, 2006), *Phaeodactylum tricornutum* dengan produktivitas  $11,7 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Benavides et al. 2013), *Tetraselmis* dengan  $5-40 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Matsumoto et al. 1995), *Amphora* sp.MUR258 dengan produktivitas biomassa tertinggi  $24 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Indrayani, 2017; Indrayani et al. 2019). Tingginya nilai produktivitas biomassa yang diperoleh pada penelitian ini dapat disebabkan oleh berbagai hal diantaranya kedua jenis mikroalga ini memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dan biomass yield yang tinggi pada kondisi outdoor. Selain itu perbedaan kedalaman kultur juga sangat mempengaruhi produktivitas biomassa yang dihasilkan. Pada penelitian ini kultur dioperasikan pada kedalaman 30 cm sementara penelitian yang lainnya mengoperasikan pada kedalaman 15-25 cm. Sehingga nilai produktivitas biomassa per luasan areal akan lebih tinggi pada kedalaman yang lebih tinggi meskipun pertumbuhan dan yieldnya sama atau sedikit lebih rendah.

Demikian pula dengan nilai produktivitas lipid, pada penelitian ini didapatkan nilai produktivitas lipid untuk *Nannochloropsis* sp.UHO3 berkisar  $4 - 31 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  sedangkan *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki produktivitas lipid berkisar  $5 - 25 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ . Dibandingkan dengan nilai produktivitas lipid dari penelitian lainnya, kedua mikroalga pada penelitian ini memiliki nilai produktivitas lipid yang lebih tinggi. Study yang dilakukan oleh Indrayani et al. (2019) mendapatkan nilai maksimum produktivitas lipid dari diatom *Amphora* sp.MUR258 yang dikultur pada kolam raceway di outdoor di Perth adalah  $6,8 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ . *Graeciella* sp.WBG-1 yang dikultur pada kolam raceway memiliki produktivitas lipid berkisar  $2-2,9 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  (Wen et al.2016). Nilai produktivitas lipid yang tinggi erat kaitannya dengan laju pertumbuhan spesifik serta lipid yield yang tinggi.

Berdasarkan hasil analisis komposisi asam diketahui bahwa asam palmitat (C16:0), asam stearate (C18:0), asam oleic (C18:1) dan asam linoleate (C18:2) merupakan komponen utama asam lemak pada *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29. Komposisi asam lemak *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 yang didominasi oleh C16 dan C18 menunjukkan bahwa kedua jenis mikroalga ini potensial sebagai bahan baku biodiesel sebagaimana yang dikemukakan oleh Knothe (2013) bahwa C16 dan C18 merupakan asam lemak yang dominan pada biodiesel.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua jenis mikroalga yakni *Nannochloropsis* sp.UHO3 dan *Skeletonema* sp.UHO29 sangat potensial untuk dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel karena memiliki pertumbuhan yang tinggi, kandungan lipid yang tinggi, produktivitas biomassa dan lipid yang tinggi, komposisi asam lemak yang sesuai untuk biodiesel serta dapat dikultur massal pada kolam raceway di outdoor.

## 5.2 Luaran

Dari hasil penelitian yang telah dicapai sejauh ini telah dihasilkan beberapa luaran sebagai berikut :

1. Paten sederhana dengan judul invensi “**HALOPHILIC MIKROALGA *Skeletonema* sp.UHO29 SEBAGAI BIODIESEL FEEDSTOCK** “ telah Terdaftar (Deskripsi patent dan Surat Terdaftar terlampir)
2. Artikel berjudul “Growth and lipid production of a newly isolated microalga *Nannochloropsis* sp.UHO 003 at increasing salinity telah disubmit pada HAYATI Journal of Biosciences (Scopus, Elsevier, Q2) (Manuscript dan bukti submission terlampir)
3. Artikel berjudul ““Growth, Biomass and Lipid Productivities of a newly isolated marine diatom *Skeletonema* sp. Under different N:P ratio” telah dipresentasikan pada “2nd International Symposium on Marine Science and Fisheries” yang diselenggarakan oleh Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas, Makassar, 22 June 2019 (sertifikat terlampir)
4. Artikel berjudul “Pengaruh intensitas cahaya yang berbeda terhadap pertumbuhan, biomassa dan produktivitas lipid mikroalga laut *Skeletonema* sp. telah dipresentasikan pada “Seminar Nasional VI Kelautan dan Perikanan” yang diselenggarakan oleh Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas, Makassar, 21 Juni 2019. (sertifikat terlampir)
5. Artikel berjudul “Pertumbuhan dan Produktivitas Biomassa Mikroalga Laut *Nannochloropsis* sp.UHO3 Menggunakan Media Kultur Yang Berbeda” telah dipresentasikan pada seminar Nasional Perikanan dan Kelautan Berkelanjutan III yang diselenggarakan oleh FPIK-UHO pada tanggal 14 September 2019 di Hotel Claro, Kendari.
6. Artikel berjudul “Pertumbuhan dan Produktivitas Biomassa Mikroalga Laut *Skeletonema* sp.UHO29 (Bacillariophyceae) Menggunakan Silika Yang Berbeda” telah dipresentasikan pada seminar Nasional Perikanan dan Kelautan Berkelanjutan III yang diselenggarakan oleh FPIK-UHO pada tanggal 14 September 2019 di Hotel Claro, Kendari.
7. Artikel berjudul “Growth, biomass and lipid productivities of a newly isolated tropical marine diatom, *Skeletonema* sp.UHO29, under different light intensity” akan disubmit pada Jurnal “International Microbiology” (Scopus, Springer, Q3)
8. Artikel berjudul “Mass cultivation of Tropical Marine Microalgae *Nannochloropsis* sp.UHO3 and *Skeletonema* sp.UHO29 in outdoor raceway ponds” akan disubmit pada Jurnal Aquaculture/Algal Research (Scopus, Elsevier, Q1)
9. Draft Patent Sederhana berjudul “Oleaginous Mikroalga Laut *Nannochloropsis* sp.UHO3 Sebagai Biodiesel Feedstok”
10. Buku Ajar Bioteknologi Perairan (Proses editing)



## 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 Energ Rev* 15:584-593
- Aizdaicher N, Markina ZV (2010) The effect of decrease in salinity on the dynamic of abundance and the cell size of *Corethron hystrix* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Ocean Sci J* 45:1-5
- Al-Hasan RH, Ali AM, Hana H, Radwan SS (1990) Effect of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp.: potential in mariculture. *J Appl Phycol* 2:215-222
- Al-Hasan RH, Ghannoum MA, Sallal AK, Abuelteen KH, Radwan SS (1987) Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. *J General Microbiol* 133:2607-2616
- Andersen R.A., Kawachi M., 2005 [Traditional microalgae isolation techniques]. In: [Algal culturing techniques]. Andersen R.A. (ed), pp. 83-100. Elsevier Academic Press, London.
- Barclay W., Apt K., 2013 [Strategies for bioprospecting microalgae for potential commercial applications]. In: [Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology]. Richmond. A, Hu.Q., (eds), pp.69-79. Wiley-Blackwell, UK.
- Benavides AM, Torzillo G, Kopecky J, Masojedek J. 2013. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass Bioenergy* 54:115–122
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Borowitzka MA (2012) Phycology. eLS. doi:10.1002/9780470015902.a0000334.pub3
- Borowitzka MA (2013) High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25 (3):743-756
- Borowitzka M.A., 2013a [*Dunaliella*: biology, production, and markets]. In: [Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology]. Richmond. A, Hu.Q., (eds), pp.359-368. Wiley-Blackwell, UK.
- Borowitzka M.A., 2013b [Species and strain selection]. In: [Algae for biofuels and energy]. Borowitzka M.A., Moheimani N.R, (eds), pp. 77-89. Springer, Dordrecht.
- Borowitzka M.A., Moheimani N.R., 2013a [Open pond culture systems]. In: [Algae for biofuels and energy]. Borowitzka M.A., Moheimani N.R, (eds), pp. 133-152. Springer, Dordrecht.
- Borowitzka M.A., Moheimani N.R., 2013b Sustainable biofuels from algae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18 (1):13-25.
- Borowitzka MA. 2005. Culturing microalgae in outdoor ponds. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*. Elsevier, London, pp 205–218
- Borowitzka M.A., 2013. *Dunaliella*: biology, production, and markets In: *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Richmond. A, Hu.Q., (eds), pp.359-368. Wiley-Blackwell, UK.
- Borowitzka MA. 2018. Commercial-scale production of microalgae for bioproducts. In: La Barre S, Bates SS (eds) *Blue biotechnology: production and use of marine molecules*, vol 1. Wiley-VCH, Weinheim, pp 33–65
- Borowitzka MA, Moheimani NR. 2013. Open pond culture systems. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp 133–152
- 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
- Boussiba, S., et al. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12: 37-47.
- 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.
- Fon-Sing S., Borowitzka M.A., 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 M.A., Moheimani N.R., 2013. Production of biofuels from microalgae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18:47-72.
- Guillard R., R., L., Ryther J., H., 1962 Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:229-238.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN (2002) Lipid biochemistry. An introduction. 5th edn. Blackwell, Oxford
- Indrayani., 2017 Isolation and characterization of microalgae with commercial potential. (Dissertation). Murdoch University, Perth, Australia.
- Indrayani, I., Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A. 2019. Long-term reliable culture of a halophilic diatom, *Amphora* sp.MUR258, in outdoor raceway ponds. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-019-01803-y
- Kates M, Volcani BE (1966) Lipid components of diatoms. *Biochim Biophys Acta* 116:264-278
- Knothe G (2013) Production and properties of biodiesel from algal oils. In: Borowitzka MA, Moheimani NR (Eds.) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht, pp. 207-221
- Kates M, Volcani BE (1966) Lipid components of diatoms. *Biochim. Biophys. Acta* 116: 264-278.
- Kumar H.D., 1990 [Introductory Phycology]. Affiliated East-West Press Pvt Ltd, New Delhi
- Larkum A., W., D., Ross I.,L., Kruse O., Hankamer B., 2012 Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol* 30 (4):198-205
- Mata T., M, Martins A., A., Caetano N., S., 2010 Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energy Rev* 14 (1):217-232
- Matsumoto H, Shiroji N, Hamasaki A, Ikuta Y, Fukuda Y, Sato M, Endo N, Tsukamoto. (1995) Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharge from a boiler. *Appl Biochem Biotechnol* 51 (52):681-692
- Moheimani N., R., Borowitzka M., A., 2006 The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 18 (6):703-712.
- Moheimani N., R, Borowitzka M., A., 2007 Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (1):27-36.
- Moheimani N., R., Borowitzka M., A., 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
- Newell G.,E., R.C. Newell R., C., 1977 *Marine Plankton. A Practical Guide* 5 th. Edition Hutchinson of London. 244 p.
- Olaizola M., 2003 Commercial development of microalgal biotechnology : from test tube to the marketplace. *Biomol Eng* 20:459-466.
- Parmar A., Singh N., K., Pandey A., Gnansounou E., Madamwar D., 2011 Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol* 102:10163–10172.
- Payer H.D., Chiemvichak Y., Hosakul K., Kongpanichkul C., Kraidej L., Nguitragul M., Reungmanipytoon S., Buri P., 1980 [Temperature as an important climatic factor during mass production of microscopic algae]. In: [Algae biomass. Production and use]. Shelef G., Soeder C., J., (eds), pp. 389-399. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Payer HD, Pithakpol B, Nguitragool M, Prabharaksa C, Thananunkul D, Chavana S (1978) Major results of the Thai-German microalgae project at Bangkok. *Arch Hydrobiol Beih* 11:41-55

- Ranga Rao A, Dayananda C, Sarada R, Shamala TR, Ravishankar GA (2007a) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour Technol* 98 (3):560-564
- Resurreccion E., P., Colosi L., M., White M., A., Clarens A., F., 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 G., C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M., R., 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.
- San Pedro, A., et al., 2015. Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in raceway ponds. *Algal Research* 8: 205-213.
- Scala S., Bowler C., 2001 Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell. Mol. Life Sci*58:1666–73.
- Sharma KK, Schumann H, Schenk PM (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5:1532-1553
- Takagi M, Karseno., Yoshida T (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101 (3):223-226
- Wen X, Dul K, Wang Z, Peng X, Luo L, Tao H, Xu Y, Zhang D, Geng Y, Li Y. 2016. Effective cultivation of microalgae for biofuel production: a pilot-scale evaluation of a novel oleaginous microalga *Graesiella* sp. *Biotechnol Biofuels* 9:123. DOI 10.1186/s13068-016-0541-y
- Yamaji I., 1976 Illustration of the marine plankton of Japan. Hoikusha Publishing Co. Ltd., Osaka, Japan, 369 pp.
- 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.
- Zhila N, Kalacheva G, Volova T (2005) Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252. *Russian J Plant Physiol* 52:311-319
- Zittelli G., C., Biondi N., Rodolfi L., Tredici M., R., 2013 [Photobioreactors for mass production of microalgae]. In: [Handbook of microalgal culture, applied phycology and biotechnology]. Richmond A., Hu Q., (eds), pp. 225-266. Wiley Blackwell,

## LAMPIRAN

1. Manuscript “Growth and lipid production of a newly isolated microalga *Nannochloropsis* sp.UHO 003 at increasing salinity” telah disubmit pada HAYATI Journal of Biosciences (Q2)

### **Growth and lipid production of a newly isolated microalga *Nannochloropsis* sp.UHO3 at increasing salinity**

**Indrayani Indrayani<sup>1\*</sup>, Haslianti Haslianti<sup>2</sup>, Asmariansi Asmariansi<sup>3</sup>,  
Wellem H. Muskita<sup>4</sup>, Herlan Hidayat<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Department of Aquatic Resources Management, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, University of Halu Oleo, Jl. HEA. Mokodompit, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232, Southeast Sulawesi, Indonesia

<sup>2</sup>Departement of Fisheries Products Technology, Faculty of Fisheries and Marine Sciences,Universitu of Halu Oleo, Jl. HEA. Mokodompit, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232, Southeast Sulawesi, Indonesia

<sup>3</sup>Fisheris Laboratory, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, University of Halu Oleo, Jl. HEA. Mokodompit, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232, Southeast Sulawesi, Indonesia

<sup>4</sup>Departement of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, University of Halu Oleo, Jl. HEA. Mokodompit, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232, Southeast Sulawesi, Indonesia

<sup>5</sup>Department of Environmental Science, Faculty of Environmental Science and Forestry, University of Halu Oleo, Jl. HEA. Mokodompit, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232, Southeast Sulawesi, Indonesia

Corresponding Author: indrayani\_tajudin@yahoo.com.au

## ABSTRACT

Salinity affects growth and biochemical composition of microalgae and the ability of microalgae to tolerate wide range of salinity is one of the important criteria for successful mass cultivation in outdoor open pond systems. The aim of this study was to determine growth and lipid production of the newly isolated marine microalga *Nannochloropsis* sp. UHO3 at increasing salinity. The strain was isolated from a coastal area in Kendari, Southeast Sulawesi, Indonesia in June 2017. The strain was cultured in 500 mL Schott bottles containing 300 mL f/2 medium at increasing salinities from 2 to 7% NaCl, light intensity of about  $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 12:12 hours light and dark cycles at ambient room temperatures. The highest specific growth rate ( $0.779 \pm 0.02 \text{d}^{-1}$ ) achieved at 3% salinity and the lowest ( $0.455 \pm 0.02 \text{d}^{-1}$ ) obtained at 7% salinity. The cultures grown at 3% salinity had the highest lipid content and lipid productivity ( $22.06 \pm 2.92\%$  AFDW) and  $0.161 \pm 0.009 \text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , respectively). This study suggests that the alga has a wide salinity tolerance (2-7% NaCl) and produce high lipid at wider salinity range from 3-4% salinity. Hence, the species is potential for outdoor mass cultivation in saline-hypersaline media for lipid production.

Keywords : growth, lipid, *Nannochloropsis* sp. UHO3, salinity

## 1. Introduction

Microalgae are photosynthetic microorganisms including the prokaryotic cyanobacteria and eukaryotic microalgae that use light energy and carbon dioxide for biomass production (Benneman, 1997; Richmond, 2004; Mata et al., 2010). They are an extremely heterogeneous group of microorganisms which have a wide range of potential applications including for feed, food, cosmetics, pharmaceutical and biofuels (Olaizola, 2003; Spalore et al., 2006; Borowitzka, 2013a).

Microalgae have been suggested as biodiesel feedstock due to their ability to produce lipids that can be converted to biodiesel (Chisti, 2007; Mata et al., 2010; Parmar et al., 2011). Yields of microalgal lipids are higher than terrestrial crops. Depending on the lipid content, microalgae can produce about 58,700 – 136,900 L oil ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> compared to that of soybean (636 L oil ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>), jatropha (741 L oil ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>), canola (974 L oil ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>) and palm oil (5366 L oil ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>) (Ahmad et al., 2011). Furthermore, microalgae are more sustainable to grow for lipid production due to their ability to grow on non-arable land and to utilise sea water so that they will not compete with food crops for habitats and for limited source of fresh water (Borowitzka and Moheimani, 2013). They also can use carbon dioxide from industrial plants for biodiesel production (Sawayama, 1996; Yun et al., 1997; Chisti, 2007). Given the higher growth rate and short generation time as well as high lipid content (up to 80% of dry weight) and lipid productivity, it is clear that microalgae are potential for large scale oils production (Converti et al., 2009).

The lipid content in microalgae is species specific and it is influenced by environmental factors. Salinity is one of the important factor influencing the growth and biochemical composition of marine microalgae (Al-Hasan et al., 1987, 1990; Aizdaicher et al., 2010; Takagi et al., 2006; Ranga Rao et al., 2007; Zhila et al., 2011; Fon Sing et al., 2016, Indrayani et al., 2018). Salinity fluctuation is inevitable under outdoor conditions and when the microalgae species are cultured in outdoor open ponds, evaporation of the cultures in hot sunny days increases salt concentration in the medium. To make up for evaporation losses, freshwater is added to the culture to maintain constant salinity. Alternatively, saline water is used leading to increase in salinity over time (Borowitzka, 2013b). Therefore, if the latter option is used, microalgae species with high salinity tolerance is preferred to obtain reliable cultures for long period. In addition, microalgae species capable to grow well at high salinity will potentially less prone to contamination in large-scale culture for long period, emphasizing the importance of evaluating high salinity tolerance of marine microalgae species intending to be mass cultured in outdoors.

*Nannochloropsis* sp. is one of the most studied microalgal species for lipid and biodiesel production (Chisti, 2007; Mata et al., 2010; Cheng-Wu et al., 2001; Champos et al., 2014; Meridith et al., 2015). In addition, members of the *Nannochloropsis* genus exhibit high growth rate, lipid productivity and tolerance to a wide range of environmental conditions (Richmond and Cheng-Wu, 2001; Gu et al., 2012a, 2012b; Fakhri et al., 2015; Meridith et al., 2015). The present study investigates the effect of increasing salinity on the growth and lipid production of the newly isolated microalgal strain *Nannochloropsis* sp. UHO3. This study could provide information about the salinity tolerance and the optimum salinity for growth and lipid production of the microalga *Nannochloropsis* sp. UHO3.

## 1. Materials and Methods

### 2.1 Source of Algal Strain

The algal strain used in this study is *Nannochloropsis* sp. UHO3 isolated from Kendari Waters, Southeast Sulawesi, Indonesia in June 2017. The strain was isolated using agar plating technique (Andersen and Kawachi, 2005) in f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962). The strain is non-axenic and maintained in Microalgae Culture Collection at Faculty of Fisheries and Marine Science, Halu Oleo University, Kendari, Southeast Sulawesi, Indonesia.

### 2.2 Culture Condition

The *Nannochloropsis* cultures were grown in 500 mL conical flasks containing 300 mL f/2 medium at increasing salinity (2, 3, 4, 5, 6 and 7% NaCl (w/v)). The cultures were initially grown at 2% salinity at initial cell density of about  $150 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> for 10 days in a batch mode and gradually increased the salinity to 7% salinity with 1% increment after 10 days of culturing. To increase the salinity from 2% to 3% salinity, certain amount of culture at 2% salinity was added to the f/2 medium at 3% salinity to give the final cell concentration of about  $150 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>. The amount of 2% salinity culture added to the 3% salinity culture was calculated based on the dilution formula ( $C_1V_1=C_2V_2$ ). Similar procedures were applied to increase the salinity from 3 to 4% NaCl, from 4 to 5%, from 5 to 6% NaCl and from 6 to 7% salinity. The cultures were incubated at ambient room temperature (26-32°C), light: dark cycle 12 h:12 h, light intensity of about 100  $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (in triplicates). The cultures were bubbled with air to facilitate mixing the cultures. Cell counting was carried out every two days, whereas dry weight (DW), ash free dry weight (AFDW) and lipid were measured prior to dilution.

### 2.3 Analytical methods

The growth of the cultures was monitored by counting the numbers of microalgae cells every two days using a Neubauer haemocytometer (Moheimani et al., 2013).

The specific growth rate ( $\mu$ ) was calculated using the following equation:

$$\mu = (\ln \left( \frac{N_2}{N_1} \right)) / (t_2 - t_1)$$

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

For Dry weight (DW) determination, five mL of culture was filtered through pre-weighed and pre-combusted Whatman GF/C, 25 mm filter paper using a Millipore filter apparatus. The filters were removed from the Millipore filter apparatus, folded and patted dry with a paper towel. The filters were dried in an oven at 75°C for 5 hours and then weighted (Moheimani et al., 2013). Dry weight (DW) was determined by the following equation:

$$\text{DryWeight(gram per liter)} = \text{weight of filter plus algae} - \text{weight of filter}$$

The filters were then transferred to a furnace at 450°C and ashed for 5 hours and weighted after cool. Organic dry weight (Ash-free dry weight) was calculated by the following equation:

$$\text{Ash-Free Dry Weight(gram per liter)} = \text{DW} - \text{weight of ash}$$

Biomass productivity was calculated by the equation:

$$\text{Biomass productivity(gram per liter per day)} = \mu \times \text{Yield (gram AFDW per Liter)}$$

Total lipid determination was conducted by the method of Bligh and Dyer (1959) as modified by Kates and Volcani (1966). Lipid productivity was calculated using the following equation:

$$\text{Lipid Productivity(gram per liter per day)} = \mu \times \text{lipid yield}$$

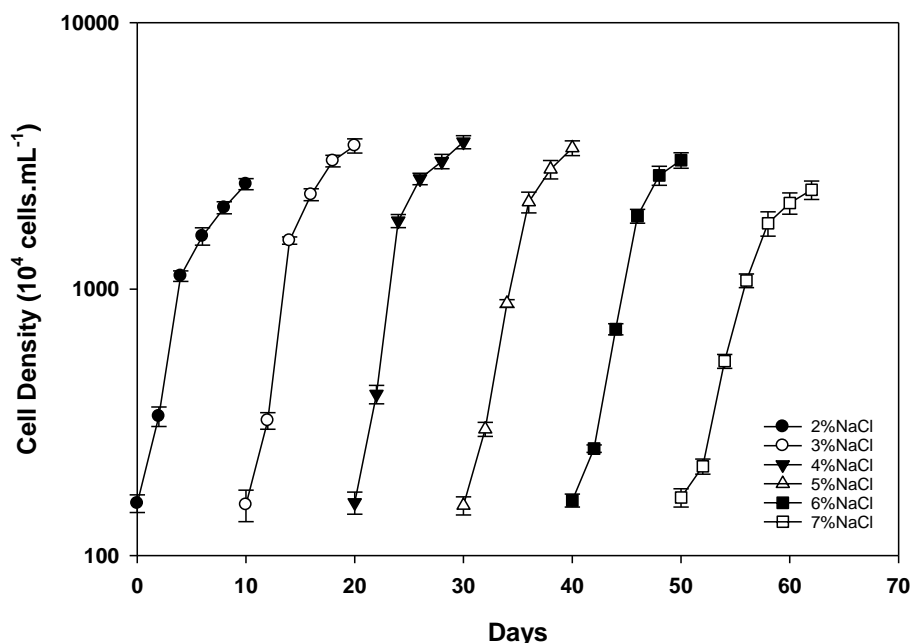
## 2.4 Statistical Analysis

Significant differences between treatments were analysed with a one-way analysis of variance (ANOVA). Pairwise multiple comparison procedure (Holm-Sidak Method) was used to precisely test differences between conditions. All statistical analysis was performed using Sigma-Plot 14 Systat Software Inc., USA.

## 2. Results

### 3.1 Growth of the *Nannochloropsis*sp.UHO3

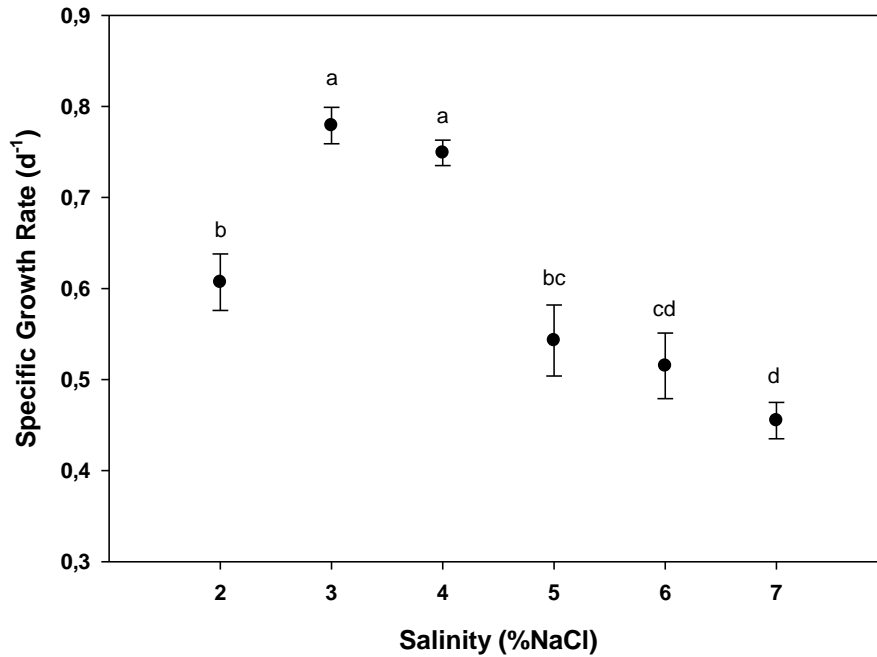
The growth of the *Nannochloropsis* for about 60 days of culturing at increasing salinity from 2 to 7% NaCl is shown in Fig.1. The alga showed good growth over the wide range of salinity tested. The alga was initially grown at 2% salinity at initial cell density of about  $150 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and cultured until reaching the stationary phase (10 days) at the cell density of about  $2478 \pm 118 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The salinity of the cultures was increased by 1% NaCl at 10 days interval until the salinity of the cultures reached 7% NaCl. The cell density of all cultures increased up to two folds in the first two days of culturing indicating that the cells could adapt well with increasing salinity. From day 2 to day 4, all the cultures showed exponential growth before entering early stationary phase. The highest maximum cell density of about  $3565 \pm 201 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$  achieved at 4% salinity and the lowest maximum cell density ( $2356 \pm 187 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) obtained at the highest salinity (7% NaCl).



**Figure 1. Growth of the *Nannochloropsis*sp.UHO3 at increasing salinity. Values represent mean  $\pm$  standard deviation (n=3)**

The specific growth rate (SGR) of the alga was significantly affected by the salinity tested (One Way ANOVA,  $P < 0.001$ ). The specific growth rates of the *Nannochloropsis* decreased at increasing salinity in which the highest specific growth rate ( $0.779 \pm 0.02 \text{d}^{-1}$ ) achieved when rising the salinity from 2 to 3% salinity and the lowest ( $0.455 \pm 0.02 \text{d}^{-1}$ ) obtained when rising the salinity from 6 to 7% salinity (Fig. 2). There was a significant difference in the specific growth rate between 2 and 7%, 3 and 7%, 4 and 7%, 5 and 7%, 2 and 6%, 3 and 6%, 4 and 6%, 3 and 5%, 4 and 5%, 3 and 2%, 4 and 2% (Holm-Sidak Method,  $P < 0.05$ ) but no significant difference in the SGR between 2 and 5%, 3 and 4%, 5 and 6%, 6 and 7% was observed (Holm-Sidak Method,  $P > 0.05$ ).

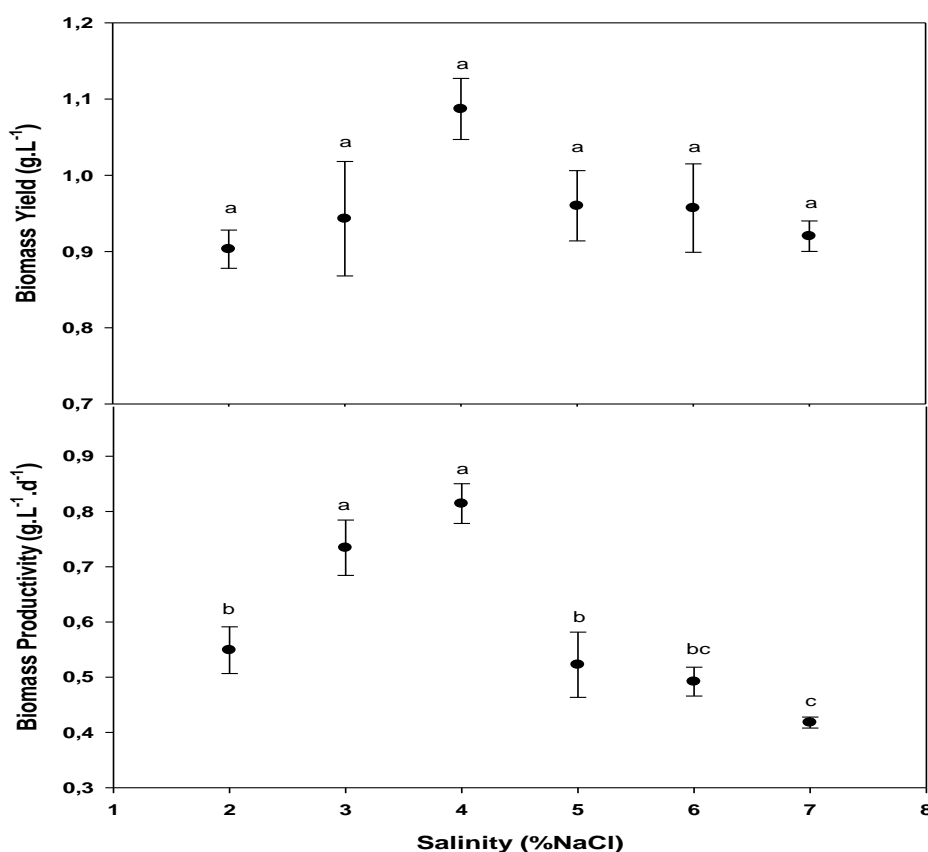




**Figure 2.** Specific growth rate (d<sup>-1</sup>) of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 at increasing salinity. Values represent mean ± standard deviation (n=3)

### 3.2 Biomass yield and productivity of the *Nannochloropsis* sp.UHO3

Biomass yield of the *Nannochloropsis* sp. was not affected by the salinity tested (One Way ANOVA,  $P=0.101$ ). However, there was a significant difference in the biomass productivity between salinity (One Way ANOVA,  $F_{(5,12)}=19.5, p<0.001$ ). The highest biomass productivity achieved at 4% salinity ( $0.814\pm 0.036\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) and the lowest at 7% salinity ( $0.418\pm 0.01\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Significant difference in the biomass productivity was observed between salinity 4 and 7%, 4 and 6%, 3 and 7%, 4 and 5%, 4 and 2%, 3 and 6%, 3 and 5%, 3 and 2%, 2 and 7%, 5 and 7% (Holm-Sidak Method,  $P<0.05$ ) but no significant difference in the biomass productivity was observed between salinity 4 and 3%, 6 and 7%, 2 and 6%, 5 and 6%, 2 and 5% (Holm-Sidak,  $P>0.05$ ) (Fig. 3).



**Figure 3. Biomass yield (g.L<sup>-1</sup>) and Biomass productivity (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) of *Nannochloropsis* sp.UHO3 at increasing salinity. Values represent mean  $\pm$  standard deviation (n=3)**

### 3.3 Lipid of *Nannochloropsis* sp.UHO3

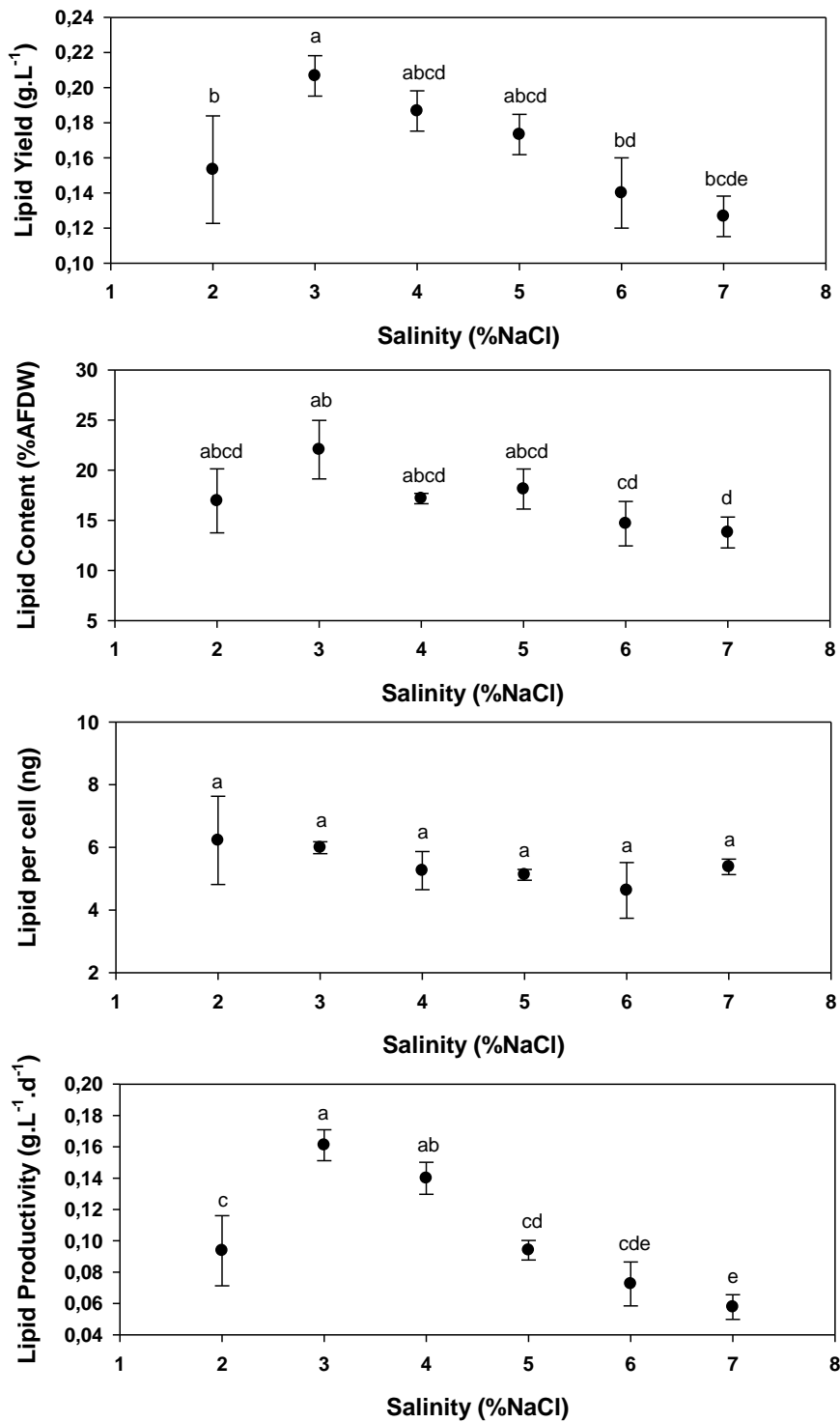
The lipid yield of the alga (g L<sup>-1</sup>) was significantly affected by the salinity tested (One Way ANOVA,  $P=0.001$ ). The highest lipid yield was  $0.207\pm 0.012$  g L<sup>-1</sup> achieved at 3% salinity and the lowest was  $0.127\pm 0.012$  g L<sup>-1</sup> obtained at 7% salinity (Fig. 4). The lipid content of the alga was significantly difference between salinity 3 and 7%, 3 and 6%, 4 and 7%, 3 and 2% (Holm-Sidak Method,  $P<0.05$ ) but no significant difference was observed between salinity 5 and 7%, 4 and 6%, 4 and 2%, 3 and 5%, 5 and 6%, 2 and 7%, 5 and 2%, 3 and 4%, 4 and 5%, 6 and 7%, 2 and 6% (Holm-Sidak,  $P>0.05$ ).

The lipid content of the alga (%AFDW) was significantly affected by the salinity tested (One Way ANOVA,  $P=0.001$ ). The alga achieved its highest lipid content when grown at 3% salinity ( $22.06\pm 2.92\%$  AFDW) and the lowest lipid content achieved when the alga was grown at 7% salinity ( $13.79\pm 1.54\%$  AFDW) There was a significant difference in the lipid content between 3 and 7%, 3 and 6% (Holm-Sidak,  $P<0.05$ ). However, no significant difference was observed between salinity 3 and 2%, 3 and 4%, 5 and 7%, 3 and 5%, 5 and 6%, 4 and 7%, 2 and 7%, 4 and 6%, 2 and 6%, 5 and 2%, 5 and 4%, 6 and 7%, 4 and 2% (Holm-Sidak,  $P>0.05$ ) (Fig.4).

The lipid content per cell (ng) of the alga was not affected by the salinity tested One Way ANOVA,  $P=0.170$ ). The lipid per cell decreased as salinity increase ranging from  $3.94$  ng cell<sup>-1</sup> to  $7.26$  ng cell<sup>-1</sup> (Fig. 4).

The lipid productivity of the alga was significantly affected by the salinity (One Way ANOVA,  $P<0.001$ ). The highest lipid productivity obtained at 3% salinity ( $0.161\pm 0.009$  gL<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) and the lowest lipid productivity obtained at 7% NaCl ( $0.058\pm 0.008$  gL<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) The lipid productivity was significantly difference between salinity 3 and 7%, 3 and 6%, 4 and 7%, 4 and 6%, 3 and 2%, 3 and 5%, 4 and 2%, 4 and 5%, 5 and 7%, 2 and 7% (Holm-Sidak,  $P<0.05$ ) but no significant

difference was observed between 5 and 6%, 2 and 6%, 3 and 4%, 6 and 7%, 5 and 2% (Holm-Sidak,  $P>0.05$ ). (Fig. 4).



**Figure 4.** Lipid yield (g.L<sup>-1</sup>), lipid content (% AFDW), lipid content per cell (ng) and Lipid productivity (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) of *Nannochloropsis* sp. IND-UHO3 at increasing salinity. Values represent mean  $\pm$  standard deviation (n=3)

### 3. Discussion

The ability of a marine microalgal species to tolerate wide range of high salinity is one of the important criteria for successful microalgal cultivation in outdoor open pond system. Therefore, it is important to determine the salinity tolerance of any microalgal species intending to be mass produced in outdoor open pond system for any commercial application. In this study, we tested to grow the newly isolated marine *Nannochloropsis* sp.UHO3 at a wide range of salinity and found that the alga can grow very well over a wide range of high salinity tested from 2 to 7% NaCl which is up to more than two fold of the seawater salinity. This is possibly the highest salinity tolerance reported in the literature for the genus *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae, Monodopsidaceae). Most of the similar studies on the effect of salinity on the growth of *Nannochloropsis* examined small range of salinity from brackish to seawater salinity (<3.5% NaCl) ignoring the higher salinity values above seawater salinity. For example, a study done by Gu et al. (2012a) reported the optimum salinity for the growth of *N. oculata* under nutrient-replete conditions was 25‰ (2.5%), and it grew better at 35‰ (3.5%) under nutrient-deplete conditions. Renaud and Parry (1994) and Wilkerson (1998) reported the optimum salinity for the growth of the *N. oculata* was 22 to 25g.L<sup>-1</sup> (2.2 to 2.5% NaCl). Bartley et al. (2015) observed the salinity range for *N. salina* growth was 14.5-45.5 PSU The optimum salinity for the growth of *Nannochloropsis* was 10‰ or 1% NaCl (Fakhri et al., 2015). The variation of the salinity tolerance of *Nannochloropsis* sp. is species specific (Richmond, 1986) and it is also related to origin (Banerjee et al., 2011).

The highest specific growth rate (SGR) of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 ( $0.779 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ ) was achieved when rising the salinity from 2 to 3% NaCl and the lowest ( $0.455 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ ) was obtained when increasing the salinity from 6 to 7% salinity. A decrease in the algal growth at increasing salinity would be due to energy use for maintaining the turgor pressure resulted in a decrease in productivity or reduction in growth (Kirst, 1989) and also due to lower photosynthetic rate (Hart et al., 1991). The SGR reported in this study was comparable with other studies. For example, the maximum growth rate of the *Nannochloropsis salina* under optimum growing condition in the laboratory was  $0.030 \text{ h}^{-1}$  or  $0.72 \text{ d}^{-1}$  corresponding to a doubling time of 23 h (Boussiba et al., 1987). The highest specific growth rate of *Nannochloropsis oculata* was about  $0.282 \pm 0.017 \text{ d}^{-1}$  obtained at salinity  $35 \text{ g L}^{-1}$  or 3.5% NaCl (Gu et al., 2012b). A study done by Cho et al. (2007) reported the highest SGR of the *N. oculata* was  $0.46 \text{ d}^{-1}$  obtained at salinity 10‰ or 1% NaCl. Pal et al. (2011) reported the highest SGR of the *Nannochloropsis* sp ( $0.81 \text{ d}^{-1}$ ) was achieved at salinity  $27 \text{ g L}^{-1}$  (2.7 % NaCl) and the lowest SGR ( $0.55 \text{ d}^{-1}$ ) was obtained at salinity  $40 \text{ g L}^{-1}$  (4.0% NaCl). According to Garcia et al. (2007), variation in growth rates of microalgae are more strain specific than species specific and differ between geographical location (de Boer et al. 2005). The optimum salinity for the growth of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 (3% NaCl) is very close to the initial salinity condition from which the strain was collected (3.2% NaCl).

This study tested the growth of the *Nannochloropsis* sp at wide range of high salinity up to two times of the seawater salinity (2-7% NaCl). The main reason is that the alga is going to be mass produced in outdoors for any potential applications using seawater based medium. If the seawater is used then the salinity of the culture media will increase overtime (Borowitzka, 2013b) and therefore with capability of the alga to tolerate wide range of high salinity, the reliable culture could possibly be maintained for long periods. In addition, microalgae growing in hypersaline media are less prone to contamination by other microorganisms including other microalgal species, protozoas and bacteria as not many organisms can tolerate high salt concentration (Mutanda et al., 2011; Indrayani et al., 2018).

Salinity is not only affect the growth of microalgae but also affect biochemical composition of microalgae including lipid. This study is particularly focused on the effect of the salinity on the growth and lipid productivity of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 due to the fact that genus *Nannochloropsis* is one of the most studied microalgae genera owing to its ability to synthesize not only neutral lipids for biodiesel production but also EPA for functional food (Hoffmann et al., 2010; Ma et al., 2014; Ma et al., 2016; Hulatt et al., 2017). Neutral lipids are the dominant storage compounds in *Nannochloropsis* under nitrogen-deprivation condition whereas under nutrient-

sufficient conditions, the biosynthesis of polar lipids is preferred (Ma et al., 2016). Hu et al. (2008) pointed out that lipids both polar membrane lipids and neutral lipids are important structural and functional parts of microalgae in which under favourable growth condition, microalgae synthesize membrane lipids of about 5-20% of the cell dry weight; under unfavourable conditions, more neutral lipids in the form of TAGs are synthesized of about 20-50% of dry weight. In this study, we found that the highest lipid content (25.29% AFDW) and lipid productivity ( $0.172 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) of the *Nannochloropsis* sp.UHO3 obtained at 3% salinity although no significantly difference at 4% salinity. The highest lipid yield of the alga coincides well with the highest growth rate achieved at salinity 3% NaCl resulted in the highest lipid productivity. It is interesting to note that the intracellular lipid accumulation of the alga was relatively higher at the lowest salinity (2% NaCl) although statistically no significant difference between other salinities. Higher intracellular lipid content of the alga at lower salinity could be due to the increase accumulation of neutral lipids as energy-rich storage products produced under unfavourable salinity condition for the growth of the alga. Therefore, the optimum salinity for higher growth rate and lipid productivity of the *Nannochloropsis* sp.UHO 003 is at salinity 3-4% NaCl.

The lipid content of the *Nannochloropsis* found in this study is comparable with other studies. For example, *N. gaditana* strains can accumulate 20% of lipid (wild type) and 40-45% (mutant type) under nutrient-replete conditions (Ajjawi et al., 2017). San Pedro et al. (2014) studied outdoor pilot scale production of *Nannochloropsis gaditana* in tubular photobioreactors and found that the species produced maximum lipid productivity of about  $0.110 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Dianursanti et al. (2018) reported the highest lipid content of *N. oculata* (20.3% dry weight) was obtained after the addition 25 ppm  $\text{HCO}_3^-$ . The lipid content of *N. salina* ranged from 22-26% AFDW (Boussiba et al., 1987).

The results of this study suggests that the newly isolated *Nannochloropsis* sp.UHO3 is a potential microalgae species for biodiesel feedstock due to its high growth rate, high lipid content and lipid productivity. This is in line with a study done by Doan et al. (2011) who conducted a comprehensive high-throughput screening study. Out of the 96 strains screened, they recommended *Nannochloropsis* strains as the best feedstock for biodiesel due to its high lipid content ranging from 39.4% to 44.9% of dry weight biomass. Ma et al. (2014) also suggest the *N. oceanica* IMET1 as an excellent strain for lipid production due to its high lipid productivity of  $158 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . The ideal microalgae as an alternative biodiesel source must have high growth rate, lipid content and lipid productivity (Griffiths and Harrison, 2009; Gong and Jiang, 2011). In addition, microalgal species with a wide salinity tolerance is preferred for outdoors cultivation to obtain reliable cultures for long period (Indrayani, 2017, Indrayani et al., 2019). Microalgae with these characteristics will greatly reduce the production cost of biodiesel (Ruangsomboon et al., 2013).

In conclusion, the microalga strain *Nannochloropsis* sp.UHO3 has a wide range of salinity tolerance from 2% to 7% NaCl concentration. The algal strain can yield high lipid production at wider salinity range from 3-4% NaCl. On the basis of its growth characteristics, lipid content and lipid productivity, this strain seems to be suitable for biodiesel feedstock. Research on this strain is continuing to determine other limits to growth factors to further enhance biomass, lipid productivities and fatty acids compositions for biodiesel and high value product production (i.e DHA and EPA contents) and also to determine its reliability for mass cultivation in outdoor raceway ponds.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Ministry of Research and Higher Education of Republic of Indonesia by providing financial support through the Applied Research Grant 2019 (Contract no.519e/UN29.20/PPM/2019) for the project entitled Isolation and Screening of Oleaginous Marine Microalgae in Kendari Waters Potential for Mass Cultivation in Hypersaline Media for Biodiesel Feedstock.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Statement of Informed Consent, Human/Animal Rights

Not applicable

## References

- Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C., Lim, J.K. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15,584-593.
- Aizdaicher, N., Markina, Z.V. 2010. The effect of decrease in salinity on the dynamic of abundance and the cell size of *Corethron hystrix* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Ocean. Sci. J.* 45,1-5.
- Ajjawi, I., Verruto, J., Aqui, M., Soriaga, L.B., Coppersmith, J., Kwok, K., Peach, L., Orchard, E., Kalb, R., Xu, W., Carlson, T.J., Francis, K., Koningsfeld, K., Bartalis, J., Schultz, A., Lambert, W., Schwatt, A.S., Brown, R., Moellering, E.R. 2017. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nature Biotechnology.* 35,647-652.
- Al-Hasan, R.H., Ali, A.M., Hana, H., Radwan, S.S. 1990. Effect of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp.: potential in mariculture. *J. Appl. Phycol.* 2,215-222.
- Al-Hasan, R.H., Ghannoum, M.A., Sallal, A.K., Abuelteen, K.H., Radwan, S.S. 1987. Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. *J. General. Microbiol.* 133,2607-2616.
- Andersen, R.A., Kawachi, M. 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen, R.A. (ed), *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press., London, pp. 83-100
- Banerjee, S., Hew, W.E., Khatoon, H., Shariff, M. and Yusoff, F.M. 2011. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology.* 10(8),1375-1383.
- Bartley, M.L., Boeing, W.J., Daniel, D., Dungan, B.N., Schaub, T. 2015. Optimization of environmental parameters for *Nannochloropsis salina* growth and lipid content using the response surface. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-015-0567-8.
- Benemann, J.R. 1997. CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. *Energy. Convers. Manage.* 38, 475-479.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37,911-917.
- Borowitzka, M.A. 2013a. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25(3),743-756.
- Borowitzka, M.A. 2013b. Species and strain selection. In: Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. (eds), *Algae for biofuels and energy*. Springer., Dordrecht, pp. 77-89
- Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. 2013. Sustainable biofuels from algae. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change.* 18 (1),13-25.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., Richmond, A. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass.* 12,37-47.
- Campos, H., Boeing, W.J., Dungan, B.N. 2014. Cultivating the marine microalgae *Nannochloropsis salina* under various nitrogen sources: effect on biovolume yields, lipid content and composition, and invasive organisms. *Biomass Bioenergy.* 66,301-307
- Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R., Richmond, A. 2001. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Aquaculture.* 195,35-49.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25(3),294-306.

- Cho, S.H., Ji, S.C., Hur, S.B., Bae, J., Park, I.S., Song, Y.C. 2007. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fisheries Science*. 73,1050-1056.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process*. 48(6),1146-1151.
- de Boer, M.K., Koolmees, E.M., Vrieling, E.G., Breeman, A.M., van Rijssel, M. 2005. Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* strains (Raphidophyceae) from different climate regions. *J. Plankton Res.* 27,47-60.
- Dianursanti, Agustin, Z.L., Putri, D.N. 2018. Increased lipids production of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel synthesis through the optimization of growth medium composition arrangement by using bicarbonate addition. *MATEC Web of Conferences* 154, 01009. doi.org/10.1051/mateconf/201815401009.
- Doan, T.T.Y., Sivaloganathan, B., Obbard, J.P. 2011. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass Bioenergy*. 35,2534–2544. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.021.
- Fakhri, M., Arifin, N.B., Budiyanto, B., Yuniarti, A., Hariati, A.M. 2015. Effect of Salinity and Photoperiod on Growth of Microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. *Nature Environment and Pollution Technology*. 14,563-566.
- Fon-Sing, S., Borowitzka, M.A. 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.
- Garcia, F., Freile-Pelegrin, Y., Robledo, D. 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*. 98,1359-65.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21(5),493-507.
- Gong, Y., Jiang, M. 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol. Lett.* 33,1269-1284.
- Gu, N., Qiang Lin, Q., Li, G., Qin, G., Lin, J., Huang, L. 2012a. Effect of Salinity Change on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of The World Aquaculture Society*. 40(1), 97-106.
- Gu, N., Lin, Q., Li, G., Tan, Y.-H., Huang, L.-M., Lin, J.-D. 2012b. Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Eng. Life Sci.* 12,631–637. doi: 10.1002/elsc.201100204.
- Guillard, R/R.L., Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8,229-238.
- Hart, B.T., Bailey, P., Edwards, R. Hortlek, K. James, K., Mc Mahon, A., Meredith, C. and Swadling, S. 1991. A review of the salt sensitivity of the Australian fresh water biota. *Hydrobiologia*. 210(1),105-144.
- Hoffmann, M., Marxen, K., Schulz, R., Vanselow, K.H. 2010. TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments. *Mar. Drugs*. 8,2526–2545. doi: 10.3390/md8092526.
- 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. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.
- Hulatt, C.J., Wijffels, R.H., Bolla, S., Kiron, V. 2017. Production of Fatty Acids and Protein by *Nannochloropsis* in Flat-Plate Photobioreactors. *PloS One*. 12(1),e0170440. doi: 10.1371/journal.pone.0170440.
- Indrayani, I. 2017. Isolation and characterization of microalgae with commercial potential. PhD thesis. Murdoch University, Perth, Australia, 214 pp.
- Indrayani, Haslianti., Asriyana. 2018. Isolation and screening of marine microalgae from Kendari waters, Southeast Sulawesi, Indonesia suitable for outdoor mass cultivation in hypersaline media. *AAAC Bioflux*. 11(5),1445-1455.

- Indrayani, I., Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A. 2019. Long-term reliable culture of a halophilic diatom, *Amphora* sp.MUR258, in outdoor raceway ponds. J. Appl. Phycol. DOI 10.1007/s10811-019-01803-y
- Kates, M., Volcani, B.E.1966. Lipid components of diatoms. Biochim. Biophys. Acta. 116,264-278.
- Kirst, G.O. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 40,21-53.
- Ma, Y.-B., Wang, Z.-Y., Yu, C.-J., Yin, Y.-H., Zhou, G.-K.2014. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. Bioresour. Technol. 167,503–509. doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.047.
- Ma, X.N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., Chen, F. 2016. Lipid production from *Nannochloropsis*. Mar. Drugs. 14(4), 61. doi: 10.3390/md14040061.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renew. Sust. Energy. Rev. 14 (1),217-232.
- Meridith, L.B., Wiebke, J.B., David, D., Barry, N.D., Tanner, S.2015. Optimization of environmental parameters for *Nannochloropsis salina* growth and lipid content using the response surface method and invading organisms. J.Appl.Phycol. DOI 10.1007/s10811-015-0567-8
- Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A., 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.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F. 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresour. Technol. 102,57-70.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology : from test tube to the marketplace. Biomol. Eng. 20,459-466.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I.,Cohen, Z., Boussiba, S. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 4,1429-41. doi: 10.1007/s00253-011-3170-1.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D.2011. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. Bioresour. Technol. 102,10163–10172.
- Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A.2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. Bioresour. Technol. 98(3),560-564.
- Renaud, S.M., Parry, D.L. 1994. Microalgae for use in tropicalaquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marinemicroalgae. J. Appl. Phycol. 6(3),347-356.
- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. In: Richmond, A. (ed), Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press., Boca Raton, USA, pp. 69-106.
- Richmond, A. 2004. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. Hydrobiologia. 512(1-3),33-37.
- Ruangsomboon, S., Ganmanee, M.2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalgae, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. J. Appl. Phycol. 25,867-874.
- Sawayama, S. 1996. CO<sub>2</sub> fixation and oil production through microalga, Fuel. Energ. Abstr. 37,217.
- San Pedro, A., González-López, C.V., Acién, F.G., Molina-Grima, E. 2014. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. Bioresour. Technol. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.052.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. 101,87–96.



- Takagi, M., Karseno., Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101(3),223-226.
- Wilkerson, J. 1998. Clownfishes. Microcosm Limited. ISBN: 1890087041.
- Yun, Y.S., Lee, S.B., Park, J.M., Lee, C.I., Yang, J.W. 1997. Carbon dioxide fixation by algalcultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69,451–455.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Volova, T.G. 2011. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J. Appl. Phycol.* 23,47–52. DOI 10.1007/s10811-010-9532-8.

2. Paten sederhana dengan judul invensi “**HALOPHILIC MIKROALGA *Skeletonema* sp.UHO29 SEBAGAI BIODIESEL FEEDSTOCK** “ telah Terdaftar

### Deskripsi

#### **HALOPHILIC MIKROALGA *Skeletonema* sp.UHO29 SEBAGAI BIODIESEL FEEDSTOCK**

##### **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berkaitan dengan pemanfaatan halophilic mikroalga laut jenis *Skeletonema* sp.UHO29 yang mampu hidup pada salinitas tinggi diatas salinitas air laut sebagai bahan baku biodiesel.

##### **Latar Belakang Invensi**

Mikroalga adalah mikroorganisme prokaryotic maupun eukaryotic yang berphotosynthesis 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 microalgae 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 microalgae 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 microalgae 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 2013). 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). Microalgae memiliki kemampuan untuk memanfaatkan CO<sub>2</sub> dari hasil buangan industry (flue gasses) sehingga dapat diusahakan secara untuk produksi biomass dan bioremediasi CO<sub>2</sub> serta dapat juga dimanfaatkan untuk pengolahan limbah cair dikarenakan microalgae 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 microalgae 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 microalgae. 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 microalgae laut selain itu Indonesia memiliki biodiversity microalgae yang sangat besar yang belum banyak dieksplorasi sehingga pengembangan microalgae untuk biodiesel sangat memungkinkan karena 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 potensi pemanfaatan 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 2013; 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 2013). 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 2013).

Untuk produksi lipid/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).

Dari hasil penelusuran paten ditemukan beberapa paten terkait dengan produksi biomass mikroalga yang potensial sebagai biodiesel feedstock diantaranya Paten No. **IDS000001962** tentang produksi

biodiesel dari mikroalga *Chlorella* sp., paten No. **IDP000042556** tentang produksi biomassa dari mikroalga *Botryococcus* yang potensial untuk produksi hydrocarbon, patent No. **US 7,981,648 B2** tentang mikroalga yang baru diisolasi dari jenis *Pseudochoricystis ellpsoidea* yang memiliki kemampuan untuk memproduksi hydrocarbon sehingga potensil sebagai biodiesel, patent No. **US 2014/0302569A1** tentang penggunaan strain mikroalga dari genus *Desmodesmus* untuk produksi biodiesel.

Invensi-Invensi yang disebut diatas memiliki kelemahan yakni menggunakan mikroalga air tawar sehingga tidak sustainable untuk digunakan sebagai biodiesel feedstok. Berbeda dengan invensi sebelumnya, invensi ini memanfaatkan species lokal mikroalga laut yang baru diisolasi dari perairan sekitar Kendari, Sulawesi Tenggara sebagai bahan baku biodiesel yakni jenis *Skeletonema* sp.UH029 Selain merupakan isolat baru, *Skeletonema* sp.UH029 juga memiliki kemampuan untuk tumbuh dengan baik pada kisaran salinitas yang luas dan sainitas tinggi hingga dua kali salinitas air laut (2-7 o/o atau 20-70 o/oo NaCl) sehingga memungkinkan untuk dikultur massal menggunakan air laut dengan kultur sistem terbuka seperti kolam raceway yang capital costnya jauh lebih murah dibandingkan dengan kultur sistem tertutup menggunakan bioreaktor sehingga lebih sustainable dan ekonomis. Selain itu *Skeletonema* sp.UH029 memiliki pertumbuhan spesifik yang cepat hingga  $0,54\text{ d}^{-1}$ , kandungan lipid yang tinggi hingga 35% berat biomassa kering serta memiliki komposisi asam lemak yang didominasi oleh palmitic acid, stearic acid dan oleic acid yang merupakan asam lemak utama pada biodiesel sehingga sangat potensil untuk dikembangkan sebagai bahan baku biodiesel.

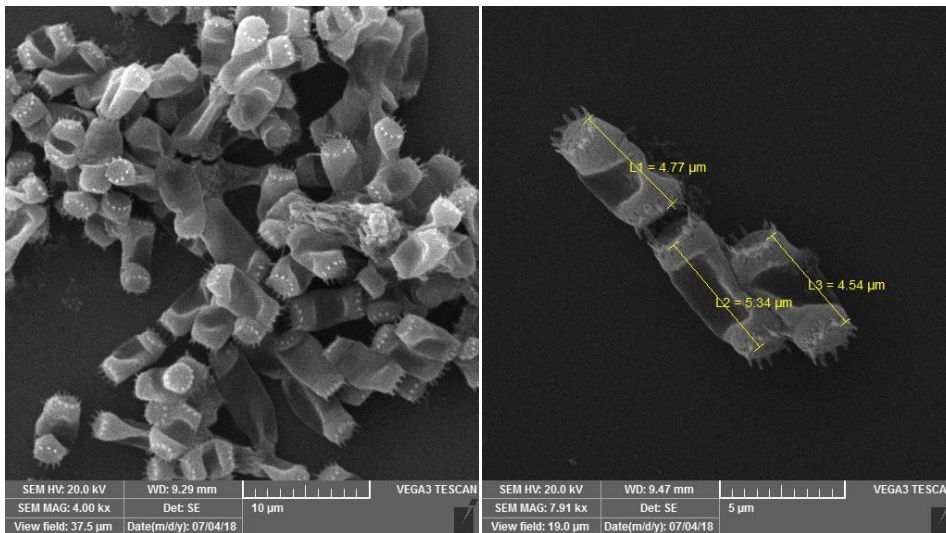
### **Uraian Singkat Invensi**

Invensi ini bertujuan untuk menyiapkan sumber bahan baku biodiesel dari species mikroalga laut yang memiliki pertumbuhan yang cepat, kandungan lipid yang tinggi, komposisi asam lemak yang sesuai untuk biodiesel serta mampu hidup pada kisaran salinitas yang luas dan tinggi diatas salinitas air laut sehingga memungkinkan untuk dikultur massal pada media hypersaline di outdoor. Invensi ini

berhubungan dengan halophilic microalgae *Skeletonema* sp.UH029 sebagai biodiesel feedstock, dimana suatu Halophilic microalga *Skeletonema* sp. UH029 sebagai biodiesel feedstock sesuai dengan invensi ini terdiridari *Skeletonema* sp.UH029 yang merupakan isolat yang baru diisolasi dari perairan pantai sekitar Kendari, Sulawesi Tenggara, Indonesia. *Skeletonema* sp.UH029 memiliki kemampuan hidup pada kisaran salinitas yang luas dan tinggi hingga dua kali salinitas air laut yakni 2-7‰ NaCl atau 20-70‰ (salinitas air laut berkisar 3-3,5‰ atau 30-35‰ NaCl). *Skeletonema* sp.UH029 memiliki laju pertumbuhan spesifik yang tinggi mencapai 0,54 d<sup>-1</sup>. *Skeletonema* sp.UH029 memiliki kandungan lipid yang tinggi hingga 35% berat kering biomas serta komposisi asam lemak yang didominasi oleh palmitic, stearic dan oleic acids yang merupakan komponen utama biodiesel.

#### **Uraian Singkat Gambar**

Mikroalga yang digunakan adalah mikroalga laut yang baru diisolasi dari perairan laut sekitar Kendari, Sulawesi Tenggara yakni *Skeletonema* sp.UH029. Mikroalga ini merupakan jenis diatom dari kelas Bacillariophyceae, genus *Skeletonema*. *Skeletonema* Sp.UH029 adalah centric diatom dengan bentuk seperti tabung/silinder yang memiliki jari-jari memanjang pada kedua valve-nya yg akan berikatan dengan valve sel-sel lainnya sehingga membentuk koloni/rantai, berukuran 4-6 µm, berwarna kecoklatan serta bersifat planktonik artinya tersuspensi/melayang dalam kolom air dan tidak melekat pada substrat sehingga memungkinkan untuk dikultur dalam kolam raceway menggunakan paddlewheel/kincir.



Gambar 1: Mikroalga *Skeletonema* sp.UHO29 Menggunakan Scanning Electron Microscopy pada pembesaran 4000x (kiri) dan 8000x (kanan)

### **Uraian Lengkap Invensi**

Invensi ini dimulai dari proses isolasi mikroalga dari perairan laut sekitar Kendari, Sulawesi Tenggara selanjutnya dilakukan skrining berdasarkan pertumbuhan dan kandungan lipid dan dilanjutkan dengan karakterisasi kandungan asam lemak untuk melihat kesesuaiannya untuk biodiesel.

1. Proses isolasi dimulai dari pengambilan sampel air laut dari berbagai perairan pantai di sekitar Kendari dengan menggunakan botol aqua plastik. Sampel air selanjutnya di enrich dengan nutrisi f/2 medium dan di bagi ke dalam botol-botol kaca kecil volume 200 ml yang diisi dengan 100 mL sampel dan diinkubasi pada suhu kamar di bawah pencahayaan rendah menggunakan lampu neon 20 watt dengan siklus gelap terang masing-masing 12 jam. Sampel yang menunjukkan perubahan warna kecoklatan atau kehijauan selanjutnya di plate secara langsung pada cawan petri berisi media agar f/2 medium (1% agar pada Guillard f/2 medium) dengan cara mengambil 0,1 mL sampel dan disebar dengan merata pada permukaan agar menggunakan glass rod. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada rak kultur dibawah cahaya lampu dengan intensitas cahaya rendah. Selama proses inkubasi dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan koloni pada media agar pada cawan petri. Setelah kurang lebih 2 minggu mulai terlihat banyak koloni yang berwarna coklat maupun

hijau tumbuh pada permukaan media agar. Koloni yang tumbuh selanjutnya di streak/gores ulang pada media agar yang baru dan ulang hingga 3 kali penggoresan sehingga didapatkan isolat yang murni. Isolat-isolat pada media agar selanjutnya ditransfer ke media cair secara bertahap mulai dari volume 1 mL menggunakan 24-microtiter well plate kemudian ke volume 10 mL, 50 mL, 100 mL dan 1 L.

2. Isolat yang menunjukkan pertumbuhan yang baik pada media cair selanjutnya diseleksi pertumbuhannya pada salinitas yang berbeda mulai salinitas 2% hingga 7%. Dari hasil skrining awal di peroleh 8 isolat yang tumbuh baik pada media cair. Ke 8 isolat inilah yang selanjutnya di skrining untuk mendapatkan isolat/strain yang mampu hidup pada salinitas tinggi diatas air laut, memiliki pertumbuhan yang cepat serta memiliki kandungan lipid yang tinggi. Dari hasil skrining diperoleh isolat UHO29 yang kemudian diidentifikasi sebagai *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki laju pertumbuhan spesifik (LPS) yang tinggi berkisar  $0,32-0,54 \text{ hari}^{-1}$  dimana LPS tertinggi diperoleh pada salinitas 4% dan terendah pada salinitas 7%.

3. Isolat ini selanjutnya dianalisis kandungan lipidnya pada salinitas yang berbeda-beda yakni 2,3,4,5,6 dan 7% NaCl. Dari hasil analisis diperoleh bahwa isolat 029 memiliki kandungan lipid tertinggi 35% dengan produktivitas lipid tertinggi mencapai  $162 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  pada salinitas 4% dan terendah pada salinitas 7%.

4. Untuk pemanfaatan sebagai biodiesel, maka perlu diketahui komposisi asam lemak dari lipid mikroalga target. Berdasarkan hasil analisa asam lemak dari *Skeletonema* sp.UHO29 diperoleh bahwa asam lemak isolat 29 didominasi oleh palmitic acid (C16:0) 53-58%, Stearic acid (C18:0) 13-24% dan Oleic acid (C18:1)12-33%. Komposisi asam lemak mikroalga *Skeletonema* sp.UHO29 sangat sesuai untuk biodiesel.

5. Selain itu *Skeletonema* sp.UHO29 memiliki keunggulan lainnya yakni sifatnya yang tersuspensi dan tidak menempel pada substrat atau dinding wadah kultur sehingga memiliki pertumbuhan yang cepat pada kondisi teraduk/mixing. *Skeletonema* sp. juga mudah mengendap



di dasar wadah kultur saat mixing dihentikan dikarenakan dinding selnya yang berat karena mengandung silika sehingga akan lebih mudah untuk di konsentrasikan saat dewatering dan harvesting/panen sehingga lebih ekonomis karena tidak banyak mikroalga yang memiliki karakteristik yang mudah untuk dikonsentrasikan/dipanen.

## **Klaim**

1. Suatu halophilic microalgae *Skeletonema* sp.UHO29 sebagai biodiesel feedstock merupakan mikroalga yang baru saja diisolasi dari perairan Kendari yang mampu hidup pada media hypersaline yang terdiri dari spesies/strain mikroalga yang digunakan serta kondisi kultur mikroalga untuk mendapatkan produktivitas lipid yang tinggi
2. Suatu halophilic microalgae *Skeletonema* sp.UHO29 sebagai biodiesel feedstock sesuai dengan klaim 1, dimana species/strain mikroalga yang digunakan adalah *Skeletonema* sp.UHO29 yang merupakan mikroalga laut yang baru diisolasi dari perairan Kendari
3. Suatu halophilic microalgae *Skeletonema* sp.UHO29 sebagai biodiesel feedstock sesuai dengan klaim 1, dimana untuk mendapatkan laju pertumbuhan spesifik tertinggi ( $0,54 \text{ hari}^{-1}$ ), kandungan lipid tertinggi (35% berat kering biomass) serta produktivitas lipid tertinggi ( $162 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) maka mikroalga dikultur pada media f/2 medium, pada suhu ambient ( $26-32^{\circ}\text{C}$ ), salinitas 4% NaCl, intensitas cahaya  $100 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , siklus terang dan gelap masing-masing 12 jam dan dibubling dengan udara menggunakan aerator.
4. Suatu halophilic microalgae *Skeletonema* sp.UHO29 sebagai biodiesel feedstock sesuai dengan klaim 1, dimana untuk mengetahui kesesuaian sebagai biodiesel feedstock maka dilakukan analisa komposisi asam lemak mikroalga *Skeletonema* sp.UHO29 menggunakan GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) dan diperoleh bahwa asam lemak *Skeletonema* sp.UHO29 didominasi oleh palmitic acid (C16:0) 53-58%, Stearic acid (C18:0) 13-24% dan Oleic acid (C18:1).
5. Suatu halophilic microalgae *Skeletonema* sp.UHO29 sebagai biodiesel feedstock sesuai dengan klaim 1, dimana berdasarkan hasil analisa laju pertumbuhan spesifik, kandungan lipid dan produktivitas lipid serta komposisi asam lemak maka *Skeletonema* sp.UHO29 merupakan halophilic mikroalga yang potensial untuk dikembangkan sebagai biodiesel feedstock.



# Abstrak

## HALOPHILIC MIKROALGA *Skeletonema* sp.UHO29 SEBAGAI BIODIESEL FEEDSTOCK

Invensi ini berhubungan dengan mikroalga laut halophilic jenis *Skeletonema* sp. UHO29 yang memiliki kemampuan hidup pada salinitas yang tinggi hingga dua kali salinitas air laut yang memiliki pertumbuhan yang cepat, produktivitas lipid yang tinggi serta komposisi asam lemak yang sesuai untuk biodiesel sehingga potensial untuk dikembangkan sebagai biodiesel feedstock. Invensi ini diawali dengan proses isolasi spesies lokal mikroalga laut di perairan Kendari, Sulawesi Tenggara, dilanjutkan dengan proses skrining isolat yang memiliki pertumbuhan yang cepat, mampu hidup pada salinitas tinggi dan memiliki kandungan lipid yang tinggi serta dilanjutkan dengan karakterisasi komposisi asam lemak untuk melihat kesesuaian lipid mikroalga untuk biodiesel. Dari proses isolasi dan skrining didapatkan isolat 29 yang diidentifikasi sebagai *Skeletonema* sp.UHO29 yang memiliki pertumbuhan cepat dengan laju pertumbuhan spesifik berkisar  $0,32 - 0,54 \text{ d}^{-1}$ , tumbuh dengan baik pada kisaran salinitas yang luas dan salinitas tinggi 2-7% NaCl dengan kandungan lipid berkisar 21-35% berat kering biomas. Hasil analisa asam lemak menunjukkan kandungan asam lemak yang didominasi oleh palmitic acid (53-58%), stearic acid (13-24%) dan oleic acid (12-33%) dimana komposisi asam lemak tersebut sangat sesuai untuk biodiesel. Invensi ini menunjukkan potensi mikroalga *Skeletonema* sp.UHO29 untuk dikultur massal pada hypersaline media sebagai biodiesel feedstock.

- Sertifikat Sebagai Presenter pada “2nd International Symposium on Marine Science and Fisheries” yang diselenggarakan oleh Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas, Makassar, 22 June 2019



- Sertifikat sebagai pemakalah pada “Simposium Nasional VI Kelautan dan Perikanan” yang diselenggarakan oleh Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas, Makassar, 21 Juni 2019.



5. Sertifikat sebagai pemakalah pada Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan Berkelanjutan III yang diselenggarakan oleh FPIK-UHO



# Sertifikat Apresiasi

*Diberikan kepada* \_\_\_\_\_

**Haslianti**

**Indrayani dan Asmariani**

Atas partisipasinya sebagai **PEMAKALAH** dengan judul:

"Pertumbuhan dan Produktivitas Biomassa Mikroalga Laut  
*Nannochloropsis* sp. UHO3 Menggunakan Pupuk yang Berbeda"

## SEMINAR NASIONAL *kekeluargaan* PERIKANAN DAN KELAUTAN BERKELANJUTAN III

Danu Hotel - Kendari, 14 September 2019

Pengorganisasi:  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Halmu Oloeo

Ditanggung Juali



Ketua Panitia Seminar Nasional  
Perikanan dan Kelautan Berkelanjutan III  
Prof. Dr. H. La Sara, M.Si., Ph.D.



Ketua Panitia Seminar Nasional  
Perikanan dan Kelautan Berkelanjutan III  
Alimul Mustafid, S.Pl., M.P.

