

Bab 3

Teknik Budidaya Porphyridium

3.1. Media Kultur

Air dan media yang digunakan dalam kultur *Porphyridium* berbeda sesuai habitat asal dari jenis yang ada. Jenis yang berasal dari perairan tawar dapat digunakan media air tawar, sebaliknya untuk jenis yang berasal dari perairan laut memerlukan air dengan kadar garam, berupa air laut alami maupun air laut buatan. *Porphyridium cruentum* dapat dikembangkan pada media F/2 Guillard dan Hemerick; sedangkan *Porphyridium aerugineum* merupakan jenis yang berasal dari lingkungan perairan tawar dapat dikembangkan pada media F/2 dan Bristol (ARAS MULYADI, 1995). Komposisi media kultur Hemerick dan Bristol yang dapat digunakan untuk *Porphyridium cruentum* dan *Porphyridium aerugineum* dapat dilihat Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Media kultur yang sering digunakan untuk kultur *Porphyridium*

Media Hemerick - <i>Porphyridium cruentum</i>		Media Bristol - <i>Porphyridium aerugineum</i>	
NaCl	29 g/l	NaCl	0,025 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,3 g/l	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075 g/l
NaNO ₃	1,70 g/l	NaNO ₃	0,75 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,47 g/l	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025 g/l
KCl	0,75 g/l	KH ₂ PO ₄	0,175 g/l
K ₂ HPO ₄	0,175 g/l	K ₂ HPO ₄	0,075 g/l
FeEDTA	0,05 g/l	FeEDTA	0,02 g/l
H ₃ BO ₃	2,86 mg/l	H ₃ BO ₃	2,86 mg/l
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,8 mg/l	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,8 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 mg/l	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 mg/l	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 mg/l
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,09 mg/l	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,09 mg/l
O ₂ S ₂ V ₅ H ₂ O	0,043 mg/l	MoO ₃	0,036 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,02 mg/l	Vitamin B12	0,1 mg/l

3.2. Jenis Kultur Mikroalga

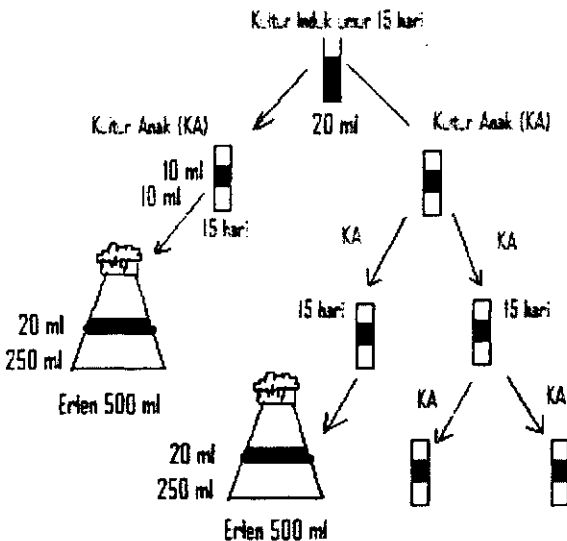
Secara garis besar kultur mikroalga dapat dikelompokkan kepada kultur skala laboratorium (*in-door culture*) dan kultur di alam terbuka (*out-door culture*). Kultur laboratorium sering diterapkan pada pemeliharaan dalam skala kecil hingga sedang dengan tujuan untuk mendapatkan kultur aksenik. Lazimnya pemeliharaan di laboratorium dilakukan dalam kondisi steril dan menggunakan wadah dari bahan kaca, bak plastik dan bak semen yang tidak dan/atau dilengkapi dengan sistem aerasi. Sedangkan kultur di alam terbuka sering diterapkan pada pemeliharaan skala industri. Pemeliharaan dengan teknik ini biasanya menggunakan bak-bak besar dari bahan semen dengan bantuan sirkulasi media untuk membantu pengudaraan.

Para ahli mengelompokkan atas beberapa tipe kultur volume kecil yang sering direalisasikan dalam skala laboratorium:

- 1) *Maintenance culture*, maksudnya tipe kultur mikroalga yang diintroduksi pada sampel fitoplankton berasal dari alam yang dipelihara pada kondisi favorable. Kultur tipe ini ditujukan untuk memberi peluang terjadinya suksesi jenis sesuai kondisi lingkungan. Spesies yang cocok dan mampu mengadaptasi kondisi lingkungan yang ada akan tumbuh secara lebih dominan, sebaliknya spesies yang tidak cocok dan tak mampu beradaptasi akan tereliminasi secara alami.
- 2) *Enrichment culture*, maksudnya tipe kultur mikroalga yang ditujukan untuk pemeliharaan sampel fitoplankton dari alam pada media tertentu untuk meningkatkan jumlah spesies tertentu.
- 3) *Unialgal culture*, maksudnya tipe kultur mikroalga yang dalam populasinya didominasi oleh satu jenis mikroalga tertentu. Namun terkadang di dalamnya masih dijumpai jenis mikroorganisma lain dalam jumlah sangat terbatas.
- d) *Axenic culture*, maksudnya tipe kultur mikroalga yang dalam populasinya hanya disusun oleh satu jenis alga tanpa adanya campuran mikroorganisma lain.
- e) *Clone culture*, maksudnya tipe kultur mikroalga yang berasal dari hasil turunan pembiakan satu individu, baik kultur aksenik ataupun kultur tidak aksenik.

3.3. Kultur Induk

Kultur induk sangat penting artinya dalam aktivitas budidaya mikroalga. Kultur induk bertujuan untuk menjaga keberlanjutan dan ketersediaan bibit mikroalga yang akan digunakan untuk produksi. Kehilangan akibat kontaminasi, perlakuan yang tidak benar dan musibah akibat kesalahan teknis atau akibat kondisi lingkungan dapat terjadi sewaktu-waktu. Kultur induk dapat dikembangkan melalui dua seri: 1) kultur induk sebagai sumber bibit pada kultur dengan volume lebih besar, dan 2) kultur induk sebagai cadangan bibit jika terjadi kegagalan dalam kultur dengan volume yang lebih besar. Secara skematik pemeliharaan kultur induk dapat dilakukan seperti dikembangkan AUDINEAU dan BLANCHETON (1986). Lazimnya kultur induk diimplementasikan dalam tabung essai menggunakan media padat (media agar) atau media cair. Kultur dalam tabung essai dapat diperbanyak secara reguler minimal setiap 15 hari. Sebagian dari bibit itu dikembangkan untuk tingkatan kultur lebih besar dan sebagian lagi digunakan untuk mempertahankan keberlanjutan bibit di masa datang (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Skema pemeliharaan kultur induk mikroalga (Sumber: ARAS MULYADI, 1995)

3.4. Dekontaminasi Kultur Mikroalga

Dekontaminasi kultur mikroalga adalah suatu rangkaian kegiatan yang bertujuan untuk menjaga pemurnian kultur mikroalga dari organisme kontaminan. Perlu menjadi catatan bahwa sangat sulit untuk memperahankan kemurnian kultur dalam waktu lama. Kultur mikroalga sangat rawan akan kontaminasi mikroorganisma lain seperti jamur, bakteri, mikroalga lain, dan zooplankton. Oleh sebab itu dianjurkan untuk senantiasa mengontrol bahwa kultur senantiasa dalam kondisi aksenik (bebas kontaminan). Upaya untuk menghindari kontaminasi kultur mikroalga dari mikroorganisma lain dapat dilakukan dengan cara menjaga sterilisasi media dan peralatan serta ruang kultur. Untuk penanggulangan kontaminan mikroorganisma dalam kultur mikroalga dapat dilakukan melalui beberapa cara, antara lain:

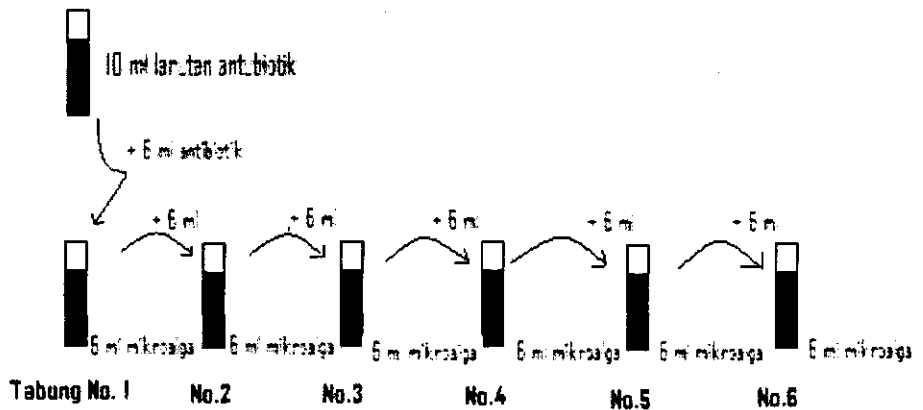
- 1) Dengan cara pencucian bakteri melalui migrasi dalam media yang mengandung antibiotik. Antibiotik diintroduksi pada sisi tabung gelap dan sisi tabung lain tidak diberi antibiotik tetapi diberi penyinaran. Cara ini memanfaatkan sifat berbeda dari dua jenis organisma terhadap cahaya. Mikroalga dengan sifatnya fototaksis positif akan bergerak serta berkumpul pada sisi cahaya, sebaliknya bakteri dengan sifatnya yang fototaksis negatif akan tetap berkumpul pada sisi gelap. Pada gilirannya, antibiotik yang ada akan dapat membunuh bakteri secara langsung.
- 2) Dengan cara filtrasi. Cara ini dilakukan dengan cara penyaringan terhadap kultur alga yang telah terkontaminasi organisma kontaminan. Ukuran mata saring yang digunakan mesti berukuran lebih kecil dari diameter mikroalga. Dengan cara ini mikroalga akan tertahan disaringan sedangkan bakteri akan lolos dari saringan.
- 3) Dengan cara sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan untuk tujuan memisahkan antara mikroalga dengan bakteri kontaminan. Dengan cara ini karena sifat bakteri yang lebih ringan dari pada mikroalga maka sel-sel mikroalga akan mengendap ke dasar sedangkan sel-sel bakteri tetap mengambang pada air permukaan.



4) Dengan cara dekontaminasi kultur menggunakan antibiotik (Gambar 3.2). Bahan campuran antibiotik yang digunakan: penicilin G (0,8 gr), streptomycin sulfat (0,2 gr) chloromphenicol (2 mg). Adapun langkah-langkah umum yang dapat dilalui dalam dekontaminasi cara ini antara lain:

1. Campuran antibiotik sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml media kultur.
2. Dalam waktu bersamaan disiapkan 6 ml kultur mikroalga pada 6 – 7 tabung essai.
3. Dalam tabung essai No.1 ditambahkan sebanyak 6 ml larutan antibiotik, dan diaduk secara merata.
4. Setelah diaduk secara merata, kemudian diambil dari tabung essai No. 1 ini sebanyak 6 ml untuk ditambahkan ke dalam tabung No. 2, dan diaduk secara merata.
5. Setelah diaduk secara merata, kemudian diambil dari tabung essai No. 2 ini sebanyak 6 ml untuk ditambahkan ke dalam tabung No. 3, dan diaduk secara merata.
6. Perlakuan yang sama dilanjutkan hingga tabung terakhir.
7. Kemudian pada masing-masing tabung essai ditambahkan sebanyak 1 tetes media organik (misalnya E6), untuk selanjutnya semua tabung essai diinkubasi pada ruang kultur dengan pencahayaan selama 24 jam.
8. Setelah diinkubasi, masing-masing kultur dalam tabung essai diambil sebanyak 1-2 tetes untuk disemai kedalam media kultur cair steril dalam wadah erlenmeyer volume 100 ml.
9. Proses dekontaminasi antibiotik ini sebaiknya diulang beberapa kali sehingga dipastikan bahwa kultur mikroalga benar-benar sudah steril dari mikroorganisme kontaminan.

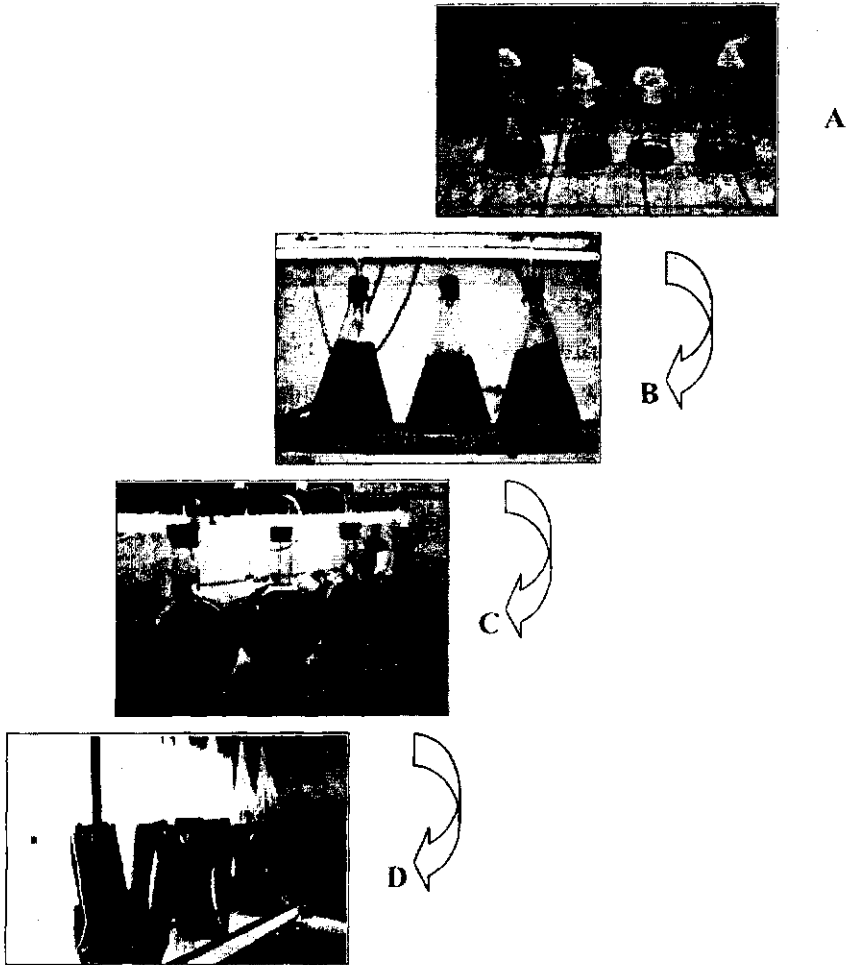




Gambar 3.2. Langkah dekontaminasi kultur mikroalga menggunakan antibiotik

3.5. Teknik Kultur

Ada dua tipe kultur yang umum diterapkan dalam produksi massa mikroalga *Porphyridium*: a). "*type batch culture*", maksudnya kultur mikroalga dengan cara tanpa penggantian media kultur, b). "*type continuous culture*", maksudnya pemeliharaan mikroalga yang pada waktu-waktu tertentu diberikan penambahan elemen nutritif. Produksi mikroalga ini dimulai dari kultur volume kecil (tabung esai, erlenmeyer 250 ml, 500 ml). Kultur volume kecil ini bisa disebut metoda ekstensif, karena kultur tidak dilengkapi dengan sistem aerasi/pengudaraan. Secara bertahap, volume kultur dapat dikembangkan secara bertingkat ke volume yang lebih besar (2 liter, 5 liter dan 20 liter), selanjutnya ke kultur massa dengan volume 100 liter atau lebih (Gambar 3.3). Kultur dalam volume besar ini digolongkan kultur intensif karena sudah dilengkapi dengan sistem pengudaraan. Pengudaraan antara lain bertujuan untuk menghindari pengendapan populasi mikroalga di dasar media, disamping juga guna membantu penyebaran elemen nutritif secara merata di badan media kultur.



Gambar 3.3. Teknik kultur massa mikroalga: (A) kultur dalam erlenmeyer 250 ml, (B) kultur volume 5 liter, (C) kultur volume 20 liter, (D) kultur massal

Kultur massa dimaksudkan untuk memproduksi mikroalga dalam jumlah besar untuk keperluan tertentu, misalnya sebagai sumber pakan dalam usaha pembenihan, akuakultur, produksi biomassa, dan lain-lain. Kultur massa

ini dapat dilaksanakan dalam ruangan tertutup menggunakan sumber cahaya berasal dari energi listrik, yang lebih populer dengan sebutan "*in-door system*". Dan dapat juga dilaksanakan di alam terbuka menggunakan sumber energi cahaya berasal dari sinar matahari, sering disebut "*out-door system*". Sumber elemen nutritif pada kultur massa ini lebih praktis menggunakan pupuk daripada diramu dari komposisi media kultur tertentu. Pupuk yang digunakan bisa berupa pupuk buatan maupun berupa pupuk alami atau pupuk kandang. Untuk mendapatkan produksi biomassa yang maksimal, sebaiknya panen dilakukan disaat pertumbuhan populasi mikroalga dalam posisi optimal; tepatnya di akhir fase pertumbuhan logaritmik. Karena pada fase ini diperkirakan jumlah populasi mikroalga berada pada kondisi puncak.

3.6. Pengukuran Pertumbuhan Mikroalga

Penghitungan Sel

Penghitungan sel mikroalga dilakukan dengan menggunakan kaca objek tipe Thoma. Kaca objek tipe ini memiliki satu kuadran berskala berukuran: 1 mm x 1 mm x 0,1 mm (atau setara dengan volume 10^{-4} ml) yang digunakan sebagai tempat larutan contoh yang akan dihitung mikrolaganya. Penghitungan sel dilakukan dengan bantuan mikroskop. Larutan contoh kultur mikroalga diteteskan ke dalam kuadran berskala, kemudian ditutup dengan *cover glass*, untuk selanjutnya dilakukan penghitungan di bawah mikroskop. Dalam penghitungan jika ditemukan 1 (satu) sel mikroalga dalam kuadran jumlahnya setara dengan 10.000 sel. Keuntungan menggunakan metoda ini antara lain adalah mudahnya membedakan sel mikroalga yang mati atau sampah dengan sel mikroalga yang hidup.

Pengukuran Berat Kering

Pengukuran berat kering mikroalga dapat direalisasikan dengan cara mensentrifugasi sebanyak 50 ml contoh kultur mikroalga pada gravitasi 3500



gram selama 20 menit. Untuk menghilangkan kadar garam yang bersumber dari media kultur, dilakukan pencucian menggunakan air distilasi terhadap endapan mikroalga yang telah disentrifugasi. Pada contoh mikroalga hasil cucian ini tambahkan lagi sebanyak 50 ml air distilasi untuk disentrifugasi kembali pada 3500 gram selama 20 menit. Setelah disentrifugasi ulang, minimal sebanyak dua kali, kemudian endapan mikroalga diletakkan di atas kertas aluminium yang telah diketahui beratnya. Selanjutnya diinkubasi dalam oven pada temperatur 100 °C selama 24 jam, untuk selanjutnya ditimbang menggunakan timbangan analitik. Pengukuran berat kering seperti ini memiliki kelemahan antara lain tidak mampu memisahkan antara sel-sel mikroalga yang mati ataupun sampah dengan sel-sel mikroalga yang masih hidup sehingga menghitung secara total sel mikroalga yang ada.

Penghitungan Kecepatan Pertumbuhan

Pertumbuhan mikroalga dapat dihitung dari variasi positif dari populasi efektif (n) sesuai waktu pemeliharaan. Selama fase eksponensial, sel mikroalga membelah secara cepat mengikuti perioda waktu pertumbuhan. Perkembangan populasi pada satu putaran perioda waktu mengikuti rumus berikut:

$$N_t = N_{t_0} \cdot e^{kn(t-t_0)}$$

Dimana: N_t = Waktu t
 N_0 = Waktu t_0
 Kn = koefisien pertumbuhan

Dengan menggunakan rumus di atas, maka koefisien pertumbuhan (k) dan waktu pembelahan sel (t_d) dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$k = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$$

$$t_d = \ln 2 / k = 0,693 / k$$



Pengukuran Klorofil-a

Pengukuran klorofil-a mikroalga dilakukan dengan cara menyaring sebanyak 10 ml contoh yang diambil dan sesuai waktu dari kultur mikroalga. Contoh mikroalga disaring menggunakan kertas saringan Whatman GF/F dengan porositas 0,7 μm . Mikroalga hasil saringan dapat diukur segera kandungan klorofilnya. Namun jika pengukuran tidak langsung segera direalisasi maka mikroalga hasil saringan dapat disimpan terlebih dahulu dalam kondisi beku.

Klorofil dapat diekstrak menggunakan aseton. Kertas saring dihancurkan dalam larutan 5 ml aseton 90 %, kemudian diinkubasi dalam lemari dingin (refrigerator) selama 24 jam guna memberikan kesempatan reaksi ekstraksi bagi klorofil dalam larutan aseton. Setelah diinkubasi, larutan kemudian disentrifugasi pada gravitasi 1500 gram selama 10 menit. Selanjutnya fluoresens klorofil-a diukur menggunakan spektrofotometer LS 50B Perkin-Elmer.

Panen Mikroalga

Panen mikroalga ditujukan untuk mendapatkan biomassa yang akan dapat digunakan untuk berbagai keperluan. Panen biasanya dilakukan diakhir fase eksponensial dari pertumbuhan mikroalga. Proses panen untuk *Porphyridium* dapat dilakukan dengan cara mengendapkan sel-sel mikroalga melalui penghentian pengudaraan selama 24 jam. Endapan biomassa mikroalga dikumpulkan untuk selanjutnya dapat dimanfaatkan langsung atau dapat disimpan dalam kondisi beku sebelum digunakan.