

## IDENTIFIKASI MIKROALGA LAUT DARI TAMBRAUW, PAPUA BARAT

### IDENTIFICATION OF MARINE MICROALGAE FROM TAMBRAUW, WEST PAPUA

Debora Christin Purbani<sup>1\*</sup>, Wiwik Ambarwati<sup>2</sup>, Aradea Bujana Kusuma<sup>2</sup>  
dan Nurlaila Ervina Herliany<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, 16911

<sup>2</sup>Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu, Bengkulu, 38371

\*E-mail: [deborachristin22@gmail.com](mailto:deborachristin22@gmail.com)

#### ABSTRACT

*Tambrau* as one of the regencies in West Papua, is well known as a megabiodiversity area, including marine microalgae that have an important role in the food chain system in the water. On the other hand the diversity of marine microalgae in this area has not been studied much. This study was conducted to identify marine microalgae from Tambrau based on morphology and molecular approach. Marine microalgae were isolated from natural sources in Tambrau, purified and cultivated under standard conditions. Fourteen cultures of marine microalgae were selected based on growth, diversity of morphology and homogeneity. The morphological characteristics were observed using light microscopy and the phylogenetic relationships of each strain were defined according to the 18S rRNA sequence analysis in the eukaryotic group and 16S rRNA in the prokaryotic microalgae group. The resultant sequences were compared with those available on the NCBI website database through the BLAST bioinformatic tool. The results showed high similarity with known nucleotide sequence identified as *Monoraphidium neglectum* (99%), *Chlorella sorokiniana* (99%), *Oocystis heteromucosa* (99%), *Ettlia texensis* (99%), *Dilabifilum arthopyreniae* (98%), *Auxenochlorella protothecoides* (99%), *Trichosarcina polymorpha* (98%), *Scenedesmus vacuolatus* (99%), *Chlorella kessleri* (99%), *Coelastrella oocystiformis* (99%), dan *Foliisarcina bertiogensis* (99%). This study is the basic information in revealing the diversity patterns of microalgae, which are very important to obtain new genetic resources for industrial purposes as well as for taxonomic studies.

**Keywords:** algae, InaCC, microscopy, phylogeny, sequence analysis

#### ABSTRAK

Tambrau merupakan salah satu Kabupaten di Papua Barat, dikenal sebagai daerah mega-biodiversitas, termasuk mikroalga laut yang memiliki peran penting dalam sistem rantai makanan di perairan. Namun di sisi lain keanekaragaman mikroalga laut di daerah ini masih belum banyak diteliti. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroalga laut dari Tambrau berdasarkan pendekatan morfologi dan molekular. Mikroalga laut diisolasi dari sumber alami di Tambrau, dimurnikan dan dikultur di bawah kondisi standar. Empat belas kultur mikroalga laut dipilih berdasarkan pertumbuhan, keragaman morfologi dan homogenitas. Karakteristik morfologi diamati dalam kondisi kultur menggunakan mikroskop cahaya dan hubungan filogenetik dari masing-masing strain didefinisikan sesuai dengan analisis sekuen 18S rRNA pada kelompok mikroalga eukariot dan 16S rRNA pada kelompok mikroalga prokariot. Sekuen yang dihasilkan dibandingkan dengan database yang tersedia di situs web NCBI melalui alat bioinformatika BLAST. Hasil penelitian menunjukkan similaritas yang tinggi dengan identitas urutan nukleotida yang dikenal, sebagai *Monoraphidium neglectum* (99%), *Chlorella sorokiniana* (99%), *Oocystis heteromucosa* (99%), *Ettlia texensis* (99%), *Dilabifilum arthopyreniae* (98%), *Auxenochlorella protothecoides* (99%), *Trichosarcina polymorpha* (98%), *Scenedesmus vacuolatus* (99%), *Chlorella kessleri* (99%), *Coelastrella oocystiformis* (99%), dan *Foliisarcina bertiogensis* (99%). Studi ini menjadi informasi dasar dalam mengungkap pola keanekaragaman mikroalga, yang sangat penting untuk mendapatkan sumber daya baru genetik untuk kepentingan industri serta studi taksonomi.

**Kata kunci:** alga, analisis sekuen, filogeni, InaCC, mikroskopik

## I. PENDAHULUAN

Tambrauw merupakan Kabupaten pemekaran di Papua Barat sejak tahun 2008 dengan luas 11.373,96 km<sup>2</sup>. Pemerintah daerah memiliki komitmen untuk membangun Tambrauw berdasarkan prinsip-prinsip konservasi. Kabupaten konservasi secara sederhana dapat dimaknai sebagai wilayah administratif pemerintah yang melaksanakan kegiatan pembangunan berdasarkan pada kriteria tertentu yakni pemanfaatan sumberdaya berkelanjutan, perlindungan sistem penyangga kehidupan, dan pengawetan keanekaragaman hayati dan ekosistemnya secara berkelanjutan (Fatem, 2015). Kegiatan yang dapat dilakukan dalam mewujudkannya antara lain adalah dengan melakukan eksplorasi, inventarisasi, dan monitoring keanekaragaman hayati yang ada, diantaranya mikroalga laut di Tambrauw.

Mikroalga laut merupakan mikro-organisme uniselular atau multiselular sederhana yang mampu memenuhi kebutuhan energi secara mandiri dengan melakukan fotosintesis. Secara ekologis, organisme ini menjadi dasar dari jaring makanan di laut dan berkontribusi setidaknya 30% dalam fiksasi CO<sub>2</sub> di seluruh dunia, yang sangat berdampak pada siklus biogeokimia global (Platt *et al.*, 2003). Secara ekonomi, beragam mikro-alga laut digunakan atau memiliki potensi untuk digunakan sebagai nutrasetikal, produksi obat-obatan (Borowitzka, 1995), kosmetik (Kim *et al.*, 2008), bioremediasi (Cardinale, 2011; El-Sheekh *et al.*, 2012), dan *biofuel* (Waltz, 2009).

Kelompok organisme ini sangat heterogen dengan karakteristik yang berbeda-beda, diantaranya perbedaan pada tipe jaringan sel, ukuran sel, morfologi sel (umumnya uniseluler), dan warna sel (Mercer and Armenta, 2011). Karakter morfologi ini biasa digunakan oleh peneliti untuk menentukan nama jenis spesies mikroalga. Namun, karakterisasi secara konvensional ini memiliki kemungkinan

bahwa mikroalga yang memiliki fenotif sama teridentifikasi menjadi spesies yang sama, padahal keduanya belum tentu secara genetik memiliki kesamaan. Oleh sebab itu, diperlukan karakterisasi dan identifikasi lebih lanjut menggunakan analisis molekuler.

Identifikasi berbasis molekular dengan analisis sekuensing dianggap memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Penggunaan sekuen DNA dapat mengatasi kelemahan dari data morfologi yang diketahui memiliki ke-terbatasan karakter dan cenderung dipengaruhi lingkungan. Karakter dari penanda molekular berupa sekuen DNA dapat di ambil dari inti sel, kloroplas dan mitokondria (Suparman, 2012). Penanda genetik yang banyak digunakan untuk studi filogeni dan taksonomi mikroalga prokariot adalah 16s rRNA (Janda and Abbott, 2007; Galhano *et al.*, 2011). Sementara 18s rRNA menjadi penanda molekular paling penting dalam analisis filogenetik molekular dan studi *skrining* biodiversitas mikroalga khususnya kelompok eukariot (Meyer *et al.*, 2010). Hal ini karena keduanya memiliki beberapa urutan nukleotida (basa) yang *conserved* (tidak berubah dari satu organisme ke organisme yang lain) dan beberapa urutan yang bervariasi pada organisme eukariotik dan prokariotik, serta menunjukkan divergensi sekuen kurang dari 1% diantara *symbiont clades* (Erwin and Thacker, 2008; Rivas *et al.*, 2004).

Suharno dan Lantang (2012) telah mengamati secara morfologi bahwa mikroalga yang ditemukan di Perairan Laut Manokwari dan Sorong, Papua Barat didominasi jenis *Diatoma* sp., *Euglena* sp., *Lyngbya* sp., *Navicula* sp., *Proboschia* sp., *Spirogyra* sp., *Nitzschia* sp., *Bakteriastrum* sp., *Peridinium* sp., dan *Rhisosolenia* sp.. Mikroalga dari kelompok Bacillariophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, dan Chrysophyceae juga ditemukan di perairan luar Teluk Wondama, Papua Barat (Alianto *et al.*, 2019). Sujarta *et al.* (2011) juga telah mengidentifikasi 21 marga mikroalga secara morfologi di Teluk Tanah Merah, Jayapura.

Namun, eksplorasi dan identifikasi mikroalga laut di Tambrauw sampai saat ini belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikro-alga laut dari Tambrauw berdasarkan pendekatan morfologi dan molekular. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi dasar dalam mengungkap pola keanekaragaman serta potensi mikroalga yang ada di Tambrauw, Papua Barat.

## II. METODE PENELITIAN

### 2.1. Pengambilan dan Pengayaan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di wilayah laut Tambrauw yaitu Distrik Sausapor (*S*: 00°30'18,42" *E*: 132°04'51,25"), secara *simple random sampling*. Metode yang digunakan adalah pengapusan, koleksi biomassa, koleksi batuan kecil atau pasir, koleksi sedimen, membilas hewan air dan koleksi air sampel secara langsung. Sampel kemudian diperkaya dalam *corning tubes* dengan medium IMK untuk air laut dengan komposisi 200mg NaNO<sub>3</sub>, 1.4mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68mg NH<sub>4</sub>Cl, 5.2mg Fe-EDTA, 0.332mg Mn-EDTA, 37.2mg Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.023mg ZnSO<sub>4</sub>• 7H<sub>2</sub>O, 0.014mg CoSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.0073mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.0025mg CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, 0.0017mg H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.180mg MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O, 0.2mg Thiamin•HCl, 0.0015mg Biotin, 0.0015mg Vitamin B12 dan satu liter air laut (Anderson, 2005).

### 2.2. Isolasi Mikroalga

Isolasi dilakukan dengan metode *capillary micro-pipetting* di bawah mikroskop cahaya (Olympus CKX41). *Silicon slant* dihubungkan dengan ujung *pasteur pipette*. Media dituangkan ke dalam *flat bottom 24 wellplates* masing-masing sebanyak 1ml. Sampel diteteskan pada *object glass*, keberadaan dan ke-ragaman mikroalga diamati di bawah mikroskop cahaya. Mikroalga target (sel tunggal) kemudian ditentukan dan disedot menggunakan ujung runcing *pasteur pipette*, lalu ditiupkan dalam

sumuran 24 *wellplates* yang telah berisi media. Pengenceran berseri dilakukan sampai mendapatkan isolat tunggal (Purbani, 2019). Unit karakter yang digunakan adalah morfologi yang meliputi bentuk sel, ukuran sel, bentuk kloroplas, tipe reproduksi, dan struktur khusus (bintik mata) (Abdullah dan Sembiring, 2009).

### 2.3. Identifikasi Morfologi

Isolat mikroalga yang tumbuh dari proses isolasi selanjutnya diseleksi dan diidentifikasi secara morfologi. Mikroalga diteteskan pada *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop cahaya Olympus BX5 yang telah dihubungkan dengan kamera Olympus DP26 dan *personal computer* dengan aplikasi *CellSens Standart* dimulai dari perbesaran kecil hingga perbesaran 100 kali. Bentuk atau arsitektur sel diamati dengan mengamati karakter morfologi yaitu bulat, memanjang, tidak beraturan, berkoloni atau tunggal, dan berlendir atau tidak. Karakter morfologi masing-masing isolat mikroalga kemudian dianalisis secara deskriptif menggunakan buku identifikasi mikroalga (Barsanti and Gualtieri, 2014; Tomas, 1997). Isolat kemudian dikelompokkan berdasarkan keragaman morfologi. Isolat terpilih selanjutnya dikultivasi dalam *culture flasks* berisi 25ml medium IMK selama 2-4 minggu di bawah cahaya (12h:12h) pada suhu 25°C.

### 2.4. Identifikasi Molekular

DNA genom diekstraksi menggunakan *Genomic DNA mini kit (Plant)* Geneaid dari Genetika Science dengan nomor GP100. Hasil produk ekstraksi DNA kemudian diamplifikasi dengan menggunakan primer 18S rRNA yaitu 18SF (5' CCA ACC TGG TTG ATC CTG CCA GTA 3') dan 18SR (5' CCT TGT TAC GAC TTC ACC TTC CTC T 3') untuk mikroalga eukariot (Tale et al., 2014). Primer universal 16S rRNA yaitu 27F Algae (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') dan 1510R

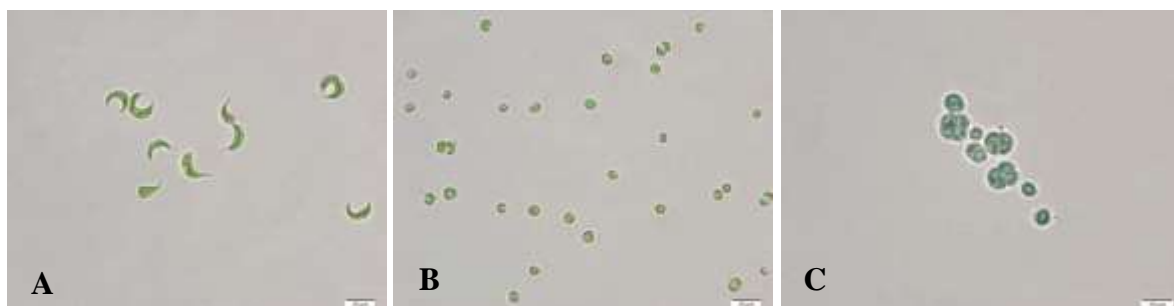
Algae (5' GGG TAC CTT GTT ACG ACT T 3') digunakan untuk mikroalga prokariot (Wilson *et al.*, 1990; Marsh and Nakatsu, 2014). PCR dilakukan dengan mereaksikan 12,5 µl *GoTag® Green Master Mix*, 10 µl *Nuclease Free Water* (NFW), 0,5 µl masing-masing primer, 0,5 µl DMSO, dan 1 µl DNA template. Tahapan PCR untuk mikroalga eukariot meliputi predenaturasi 94°C selama lima menit, diikuti 35 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 63°C selama 1 menit, *extention* pada suhu 72°C satu menit, kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit diikuti tahap pendinginan pada suhu 4°C (Tale *et al.*, 2014). Tahapan PCR untuk mikroalga prokariot meliputi predenaturasi 94°C selama lima menit, diikuti denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 55°C selama satu menit, *extention* pada suhu 72°C satu menit 30 detik, tahap denaturasi, *annealing*, dan *extention* dilakukan sebanyak 31 siklus, kemudian dilanjutkan dengan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit diikuti tahap pendinginan pada suhu 4°C (Ma *et al.*, 2008).

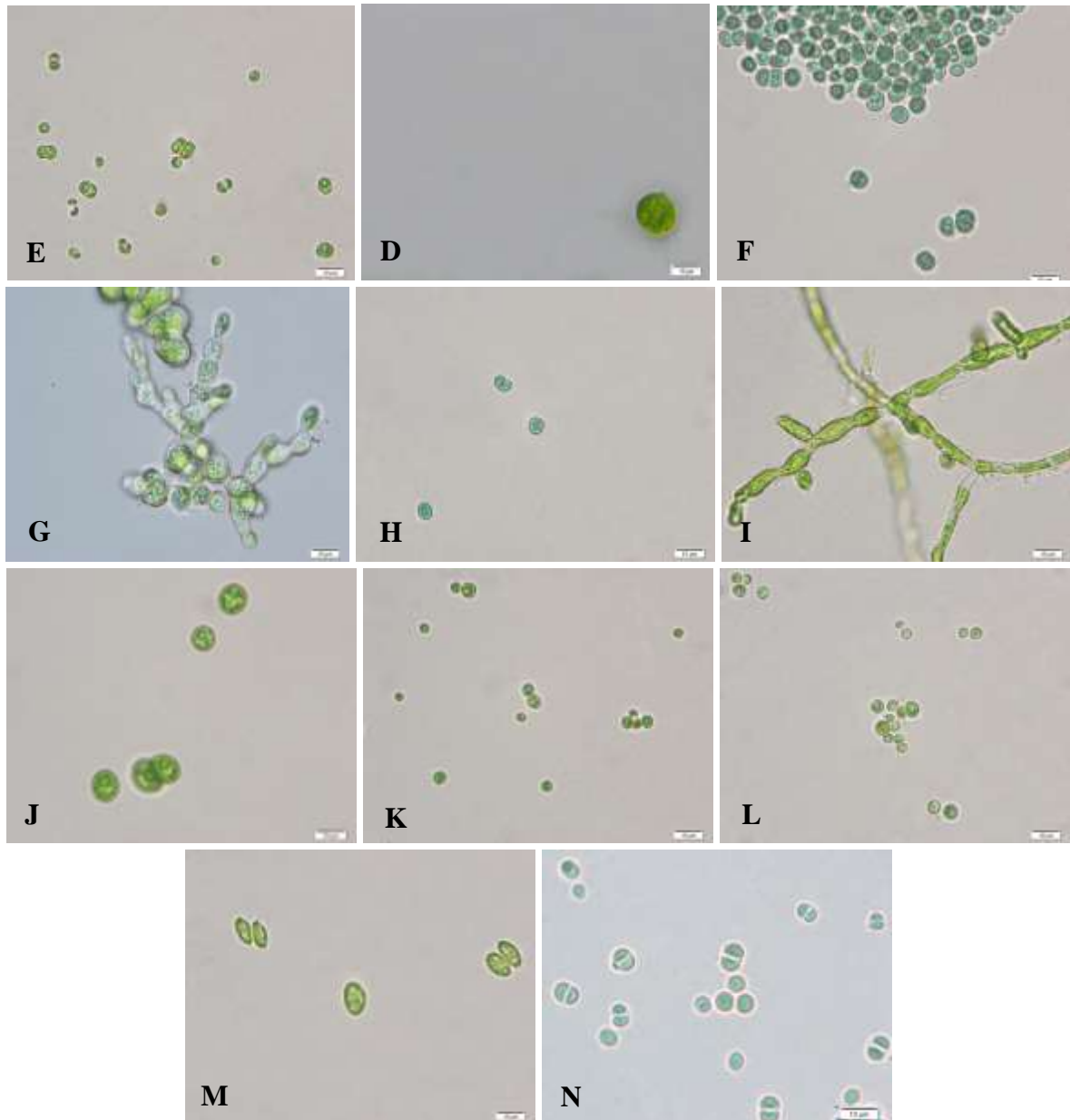
Tahap selanjutnya adalah elektroforesis untuk mengetahui kualitas amplifikasi DNA dari produk PCR menggunakan alat *elektroforeser* yaitu Mupid Elektroforesi. Sekuensing dilakukan di Macrogen.inc Korea Selatan untuk menentukan urutan basa rantai DNA masing-masing isolat. Data sekuen yang

diperoleh dianalisis (edit) secara *offline* dengan menggunakan ChromasPro. Identifikasi jenis dilakukan berdasarkan nukleotida hasil sekuensing dengan analisis bioinformatika BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) secara *online*, mengacu pada data Bank Gen pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) pada laman <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Konstruksi filogenetik dilakukan menggunakan metode pengkelasan *Neighbour-Joining* (NJ), 1000 *bootstrap* dengan aplikasi *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (Tamura *et al.*, 2011).

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroalga yang berhasil diisolasi dari perairan laut Tambrauw sebanyak 14 isolat, dipilih berdasarkan pertumbuhan, keanekaragaman morfologi dan warna, serta homogenitas. Secara morfologi isolat tersebut diduga merupakan kelompok *Chlorophyta* atau *green algae* (InaCC M107, InaCC M108, InaCC M113, InaCC M132, InaCC M133, InaCC M110, InaCC M116, InaCC M115, InaCC M118, InaCC M119, InaCC M120, InaCC M131, InaCC M135) yang termasuk dalam kingdom eukariot, dan kelompok *Cyanobacteria* (InaCC M134) yang termasuk dalam kingdom prokariot (Gambar 1).





Gambar 1. Penampakan mikroskopis mikroalga laut dari Tambrauw. A) InaCC M107, B) InaCC M108, C) InaCC M110, D) InaCC M113, E) InaCC M115, F) InaCC M116, G) InaCC M118, H) InaCC M119, I) InaCC M120, J) InaCC M131, K) InaCC M132, L) InaCC M133, M) InaCC M135, N) InaCC M134. A-M: mikroalga hijau kelompok *Chlorophyta* dengan berbagai bentuk (bulan sabit, *coccoid*, *elips*, dan filament); N: mikroalga biru-hijau kelompok *Cyanobacteria* berbentuk bulat, setengah bola ketika berpasangan, dan tidak beraturan ketika membentuk baeocyte.

Identifikasi molekuler dilakukan untuk mendukung identifikasi morfologi dan untuk mengetahui mana jenis isolat hingga tingkat spesies. Amplifikasi gen 18S rRNA

dilakukan pada kelompok mikroalga eukariot dan gen 16S rRNA pada kelompok prokariot. Menurut Duong (2016), mikroalga prokariot sebagian besar merupakan kelompok dari

alga hijau biru atau *Cyanobacteria/ Cyanophyta* dan mikroalga eukariot terdiri dari filum *Glaucophyta*, *Chlorophyta*, *Chlorarachnio phyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Hapto phyta*, *Cryptophyta*, *Heterokontophyta*, dan *Dinophyta*. Sehingga amplifikasi gen 18S rRNA dilakukan pada isolat kelompok *Chlorophyta* dan gen 16S rRNA pada isolat kelompok *Cyanobacteria*. Hasil BLAST dari produk PCR yang ditelusuri pada DNA database *GenBank* melalui situs *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* menunjukkan bahwa 14 isolat mikroalga laut dari TAMBRAUW teridentifikasi sebagai *Monoraphidium neglectum* (InaCC M107), *Chlorella sorokiniana* (InaCC M108), *Oocystis heteromucosa* (InaCC M110), *Chlorella sorokiniana* (InaCC M113), *Ettlia texensis* (InaCC M115), *Oocystis heteromucosa* (InaCC M116), *Dilabifilum arthopyreniae* (InaCC M118),

*Auxenochlorella protothecoides* (InaCC M119), *Trichosarcina polymorpha* (InaCC M120), *Scenedesmus vacuolatus* (InaCC M131), *Chlorella kessleri* (InaCC M132), *Chlorella kessleri* (InaCC M133), *Coelastrella oocystiformis* (InaCC M135), dan *Foliisarcina bertioensis* (InaCC M134). Isolat tersebut secara umum memiliki persentase homologi sebesar 98-99% terhadap *type strain* terdekatnya (Tabel 1). Menurut Henry *et al.*, (2000), nilai similaritas 95–100% dapat dinyatakan sebagai satu spesies yang sama. Konstruksi pohon filogeni, yang dibuat dengan metode pengkelasan *Neighbor-Joining* dengan 1000 replikasi *bootstrap* pada model *Kimura 2 Parameter* dan jarak evolusionernya dihitung menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood* dengan aplikasi *MEGA5* (Tamura *et al.*, 2011), diperoleh hasil seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 dan 3.

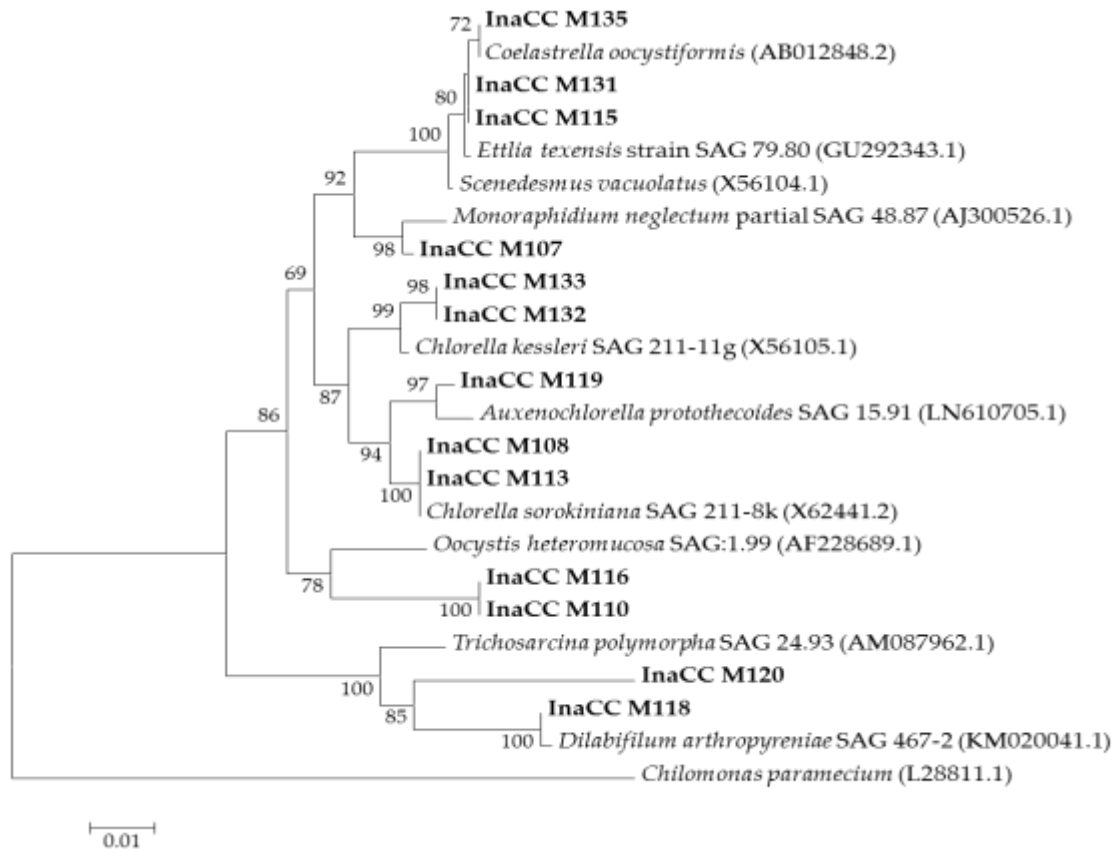
Tabel 1. Identifikasi mikroalga laut dari TAMBRAUW berdasarkan kesamaan urutan gen 18S rRNA.

Kode Isolat	Jumlah Nukleotida	Hasil Sekuensing	Query Cover	Persentase Homologi
InaCC M107	604	<i>Monoraphidium neglectum</i> SAG 48.87 (AJ300526.1)	100%	99
InaCC M108	606	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k (X62441.2)	100%	99
InaCC M110	601	<i>Oocystis heteromucosa</i> SAG 1.99 (AF228689.1)	99%	98
InaCC M113	602	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k (X62441.2)	100%	99
InaCC M115	607	<i>Ettlia texensis</i> SAG 79.80 (GU292343.1)	100%	99
InaCC M116	604	<i>Oocystis heteromucosa</i> SAG 1.99 (AF228689.1)	100%	98
InaCC M118	601	<i>Dilabifilum arthopyreniae</i> SAG 467-2 (KM020041.1)	100%	99
InaCC M119	599	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> SAG 15.91 (LN610705.1)	99%	99
InaCC M120	601	<i>Trichosarcina polymorpha</i> SAG 24.93 (AM087962.1)	99%	98
InaCC M131	608	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 79.80 (X56104.1)	100%	99
InaCC M132	610	<i>Chlorella kessleri</i> SAG 211-11g (X56105.1)	100%	99

Kode Isolat	Jumlah Nukleotida	Hasil Sekuensing	Query Cover	Persentase Homologi
InaCC M133	609	<i>Chlorella kessleri</i> SAG 211-11g (X56105.1)	100%	99
InaCC M135	601	<i>Coelastrrella oocystiformis</i> (AB012848.2)	99%	99

Tabel 2. Identifikasi mikroalga laut dari Tambrauw berdasarkan kesamaan urutan gen 16S rRNA.

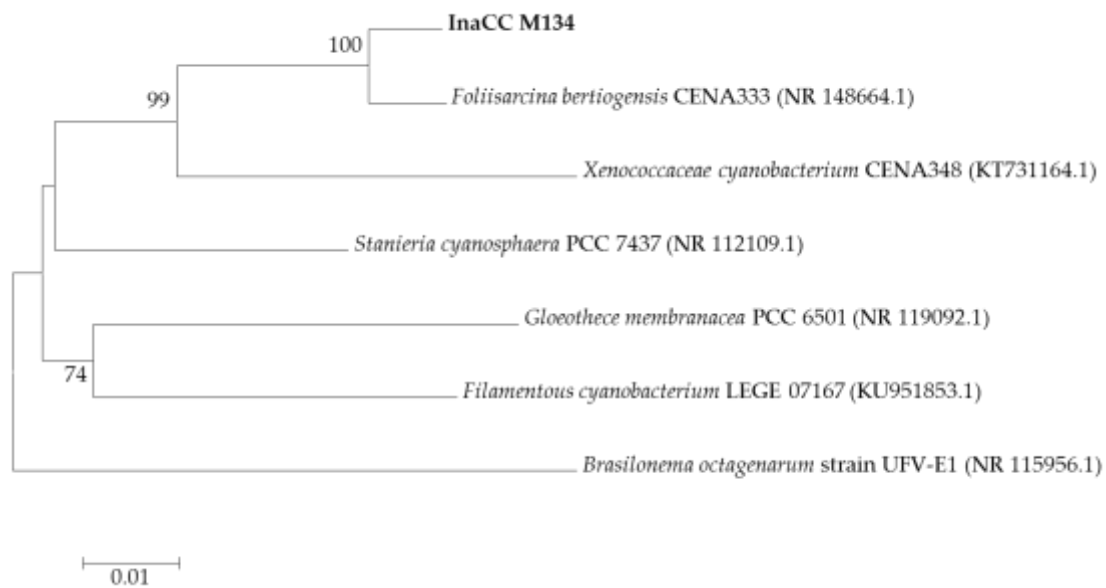
Kode Isolat	Jumlah Nukleotida	Hasil Sekuensing	Query Cover	Presentase Homologi
InaCC M134	1348	<i>Foliisarcina bertiogensis</i> CENA333 (NR148664.1)	100%	99



Gambar 2. Pohon filogenetik isolat mikroalga eukariot dari Tambrauw berdasarkan sekuen gen 18S rRNA.

Hasil dari analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat yang telah teridentifikasi termasuk ke dalam delapan kelompok yang berbeda. Mikroalga dari famili Selenastraceae, Chlorellaceae, Oocystaceae, Chlorococcaceae, Kornmanniaceae, Ulvales, Scenedesma-ceae

dan Xenococcaceae ini ditemukan dalam perairan laut Tambrauw pada suhu 29°C. Spesies-spesies tersebut memang dapat ditemukan pada suhu tersebut, hal ini sesuai dengan pernyataan Munir *et al.* (2015) bahwa kisaran suhu optimal bagi pertumbuhan mikroalga adalah 20°C-30°C.



Gambar 3. Pohon filogenetik isolat mikroalga prokariot dari Tambraw berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

Berdasarkan hasil BLAST dan analisis filogenetik 18S rRNA diketahui bahwa isolat InaCC M107 merupakan mikroalga *Monoraphidium neglectum* yang termasuk dalam famili Selenastraceae, dengan persentase homologi sebesar 99%. Mikroalga ini memiliki bentuk lebih panjang (7-100 $\mu$ m) dari lebar (1-5 $\mu$ m), melengkung, secara bertahap meruncing ke arah puncak, menyerupai bulan sabit. Isolat ini diambil dari substrat sedimen dengan pH 6,5. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bogen *et al.*, (2013) bahwa *Monoraphidium* merupakan mikroalga yang hidup pada pH 5-10. Genus *Monoraphidium* merupakan alga hijau uniseluler yang berdinding sel tipis, berklorofil, namun tidak terdapat *pyrenoid* (struktur pada kloroplas yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan). Genus *Monoraphidium* dapat memproduksi 4-8 autospora setelah dinding induk memecah menjadi dua bagian (Ramos *et al.*, 2013). Mikroalga jenis ini dapat digunakan sebagai indikator perairan yang tercemar, karena memiliki *protective cyste* yang merupakan fase dari organisme uniseluler yang dilindungi oleh lapisan tebal sehingga dapat bertahan hidup lebih lama

pada kondisi yang tidak menguntungkan tanpa mengambil makanan (Maresi *et al.*, 2016).

Isolat InaCC M108 dan InaCC M113 secara molekular teridentifikasi sebagai *Chlorella sorokiniana*, sedangkan isolat InaCC M132 dan InaCC M133 teridentifikasi sebagai *Chlorella kessleri* yang termasuk dalam famili Chlorellaceae, dengan persentase homologi masing-masing sebesar 99%. *Chlorella* pada umumnya hidup di perairan tawar, laut dan tempat yang basah dengan pH 6,7 (Cuaresma *et al.*, 2009). Secara morfologi mikroalga hijau ini memiliki bentuk bulat dengan diameter 5-10  $\mu$ m, setiap selnya mampu membelah diri dan menghasilkan empat sel baru yang tidak mempunyai flagel, kloroplas berbentuk mangkuk dan memiliki pirenoid. Selain sebagai sumber pakan alami *Chlorella* juga diketahui memiliki potensi sebagai agen bio-remediasi (Dewi dan Nuravivah, 2018), antimicrobial (Acurio *et al.*, 2018), antioksidan (Sawant and Kelkar Mane, 2018), serta sebagai bahan baku biodiesel (Liu *et al.*, 2010), dan *bioethanol* (Kumar *et al.*, 2016).



Isolat InaCC M110 dan InaCC M116 memiliki penampakan morfologi sel yang berwarna hijau, tidak beraturan dan memiliki berbagai bentuk, seperti bulat dan lonjong dengan panjang 7-50  $\mu\text{m}$  dan lebar 6-12  $\mu\text{m}$ , membentuk dua atau empat koloni yang bersebelahan dan dibatasi membran, dengan dinding sel pada ujung tebal. Secara molekular isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Oocystis heteromucosa* yang termasuk ke famili Oocystaceae, dengan persentase homologi masing-masing sebesar 98%. Isolat tersebut diambil dari substrat batuan. Menurut Bock *et al.*, (2011) *Oocystis* pada umumnya hidup di sungai, danau, laut dan ada juga yang hidup epifit dengan batuan.

Isolat InaCC M115 merupakan sel tunggal, berwarna hijau, bentuk bulat dengan diameter 8-15  $\mu\text{m}$ , sel uninukleat tidak ber dinding, terdapat cincin sel, dan memiliki pirenoid dengan selubung yang mengelilingi matrik. Mikroalga tersebut secara molekular teridentifikasi sebagai *Ettlia texensis* yang termasuk dalam famili Chlorococcaceae, dengan persentase homologi sebesar 99%. Menurut Yildirim *et al.* (2014) *Ettlia* adalah kandidat yang menarik untuk bahan baku produksi biodiesel karena memiliki nilai akumulasi lipid yang tinggi. *Canthaxanthin* yang dimilikinya merupakan karotenoid bernilai komersial yang banyak digunakan untuk pewarna makanan.

Isolat InaCC M118 memiliki penampakan morfologi sel berwarna hijau, unipolar atau perkecambahan bipolar, bentuk filamen tidak beraturan, dengan percabangan silinder yang melekat pada permukaan, dapat membelah ke arah yang berbeda, dan memiliki satu kloroplas pariental dengan pirenoid. Secara molekular isolat ini teridentifikasi sebagai *Dilabifilum arthopyreniae* yang termasuk dalam kelompok Ulvales, dengan persentase homologi sebesar 99%. Isolat ini diambil pada substrat batuan di Pantai Sausapor pada temperatur 29°C. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Kim *et al.*, 2018), bahwa

mikroalga jenis ini umumnya menempel pada substrat yang padat seperti batuan, kayu, makroalga dan lamun. Sampai saat ini belum banyak kajian mengenai potensi dari mikroalga *Dilabifilum*, oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi dari mikroalga jenis ini.

Isolat InaCC M119 secara morfologi memiliki bentuk seperti *Chlorella* pada umumnya. Namun secara molekular isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Auxenochlorella protothecoides* yang termasuk dalam famili yang sama dengan *Chlorella* yaitu Chlorellaceae, dengan persentase homologi sebesar 99%. Mikroalga jenis ini sebelumnya dikenal sebagai *Chlorella protothecoides*, yang merupakan alga hijau heterotrofik fakultatif di kelas *Trebouxiophyta* (Gao *et al.*, 2010). Seiring dengan adanya perubahan lingkungan dan karena kebutuhannya akan tiamin untuk pertumbuhannya sehingga spesies *Chlorella* mengalami perkembangan dan menghasilkan spesies baru (Liana, 2017). *A. protothecoides* memiliki potensi dalam produksi biofuel, karena dapat menghasilkan kandungan lipid yang tinggi dalam kondisi heterotrofik sebesar 55,2% berat kering (Gill *et al.*, 2013). *A. protothecoides* juga mampu mengeluarkan 59% dari total nitrogen, 81% dari total fosfor, dan 96% dari total karbon organik dari limbah dengan tetap mempertahankan tingkat produktivitas lipid yang tinggi (Zhou *et al.*, 2012).

Isolat InaCC M120 berdasarkan hasil BLAST dan analisis filogenetik memiliki persentase homologi sebesar 99% dengan *Trichosarcina polymorpha* yang termasuk dalam kelompok yang sama dengan *Dilabifilum* yaitu Ulvales. Secara morfologi isolat ini merupakan multi-seluler sederhana yang berwarna kuning-hijau, memiliki bentuk filamen yang dapat menjadi serangkaian sel sarcinoid, serta mengandung kloroplas pariental dan pirenoid tunggal. Diperlukan studi lebih lanjut mengenai karakteristik dari *Trichosarcina*, karena

kajian mengenai potensi dari mikroalga jenis ini masih belum banyak dilakukan.

Isolat InaCC M131 dan InaCC M135 secara fenotipik memiliki kemiripan yaitu sel berwarna hijau, dengan bentuk *elips* dan *spindle*, serta memiliki kloroplas yang berisi pirenoid. Namun hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat InaCC M131 memiliki persamaan homologi sebesar 99% dengan *Scenedesmus vacuolatus*, sedangkan isolat InaCC M135 teridentifikasi sebagai *Coelastrella oocystiformis* dengan persentase homologi sebesar 99%. Kedua jenis mikroalga tersebut termasuk dalam kelompok yang sama yaitu Scenedesma-ceae. *Scenedesmus* merupakan mikroalga yang bersifat kosmopolit dan sebagian besar hidup di lingkungan akuatik. Mikroalga jenis ini diketahui dapat dimanfaatkan sebagai makanan tambahan dalam bentuk protein sel tunggal, pakan alami dan pakan ternak karena memiliki kandungan gizi yang tinggi (Peixoto *et al.*, 2015). Sedangkan *Coelastrella* merupakan salah satu mikroalga yang memiliki prospek dalam bioteknologi mikroalga. Hal ini karena *Coelastrella* dapat menghasilkan karotenoid seperti  $\beta$ -*carotene*, *lutein*, *free astaxanthin*, *canthaxanthin* dan *phytofluene* yang sangat berpotensi sebagai antioksidan dan anti-kanker (Iyer *et al.*, 2015), serta dapat memproduksi asam lemak yang dapat dijadikan sebagai bahan farmasi, dan kosmetik (Dimitrova *et al.*, 2016).

Hasil analisis sekuen gen 16S rRNA pada isolat InaCC M134 menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki homologi sebesar 99% dengan *Foliisarcina bertiogensis* yang termasuk dalam famili Xenococcaceae. Secara morfologi isolat tersebut merupakan sel berwarna biru-hijau dan berbentuk bulat, setengah bola ketika berpasangan, serta seperti persegi ketika berkoloni atau tidak teratur ketika membentuk *baeocyte*. *Foliisarcina* memiliki membran pembungkus koloni tipis, rapat, *hyaline* (transparan). Menurut Alvarenga *et al.* (2016) *Foliisarcina* termasuk dalam kelompok Cyanobacteria yang memiliki sifat-sifat khas yaitu tahan

kering, tahan panas dalam air, dan beberapa jenis dapat mengikat molekul N<sub>2</sub> dari udara jika dalam tanah tidak ada nitrat. Mikroalga jenis ini juga dapat tumbuh di lingkungan toksik dan di perairan dengan salinitas yang tinggi.

#### IV. KESIMPULAN

Sebanyak 14 isolat mikroalga dari famili Selenastraceae, Chlorellaceae, Oocystaceae, Chlorococcaceae, Kornmanniaceae, Ulvales, Scenedesmaceae dan Xenococcaceae telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi melalui pendekatan morfologi dan molekular dari perairan laut Tandrauw. Teknik molekular perlu dilakukan dalam identifikasi suatu spesies, karena pendekatan klasik yang mengandalkan karakter morfologis tidak cukup menggambarkan jenis spesies dengan sensitivitas tinggi. Data molekular memberikan hasil yang lebih andal dan wawasan baru tentang filogeni alga. Penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik dari masing-masing isolat yang teridentifikasi diperlukan untuk mengetahui potensinya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dan diidentifikasi sebagai bagian dari proyek penelitian di Pusat Penelitian Biologi-LIPI, ber-kolaborasi dengan Ekspedisi NKRI Koridor Papua Barat. Penulis mengucapkan terimakasih kepada I Nyoman Sumerta, M.Sc. yang telah membantu dalam proses pengambilan sampel.

#### DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, M.M., dan L. Sembiring. 2009. Deteksi, karakterisasi, dan identifikasi mikroalga kontaminan pada polimer emulsi berbasis polivinil asetat (PVA). *Dalam* Prosiding Seminar

- Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta, 16 Mei 2009. Hlm.:130-136.
- Acurio, L.P., D.M. Salazar, A.F. Valencia, D.R. Robalino, A.C. Barona, F.C. Alvarez, and C.A. Rodriguez. 2018. Antimicrobial potential of *Chlorella* algae isolated from stacked waters of the Andean Region of Ecuador. *In* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Paris, France, 7-9 February 2018. 151: 1-7 pp. <http://doi.org/10.1088/1755-1315/151/1/012040>
- Alianto, H., dan Suhaemi. 2019. Kelimpahan dan kelompok fitoplankton di perairan luar Teluk Wondama, Provinsi Papua Barat. *J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 10(3): 683-697. <http://doi.org/10.29244/jitkt.v10i3.19561>
- Alvarenga, D.O., J. Rigonato, L.H.Z. Branco, I.S. Melo, and M.F. Fiore. 2016. *Phyllonema aviceniicola* gen. Nov., sp. nov. and *Foliisarcina bertiogensis* gen. nov., sp. nov., epiphyllic Cyanobacteria associated with *Avicennia schaueriana* leaves. *International J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2): 689-700. <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.000774>
- Anderson, R.A. 2005. Algal culturing techniques, 1<sup>st</sup> ed. Elsevier Academic Press Phycological Society of America, 53: 596p. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Barsanti, L., and P. Gualtieri. 2014. Algal culturing. *In* Algae. CRC Press. Italy. 221-266 pp. <http://doi.org/10.1201/b16544-7>
- Bock, C., T. Pröschold, and L. Krienitz. 2011. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data. *J. Phycology*, 47(3): 638-652. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00989.x>
- Bogen, C., A. Al-Dilaimi, A. Albersmeier, J. Wichmann, M. Grundmann, O. Rupp, K.J. Lauersen, O. Blifernez-Klassen, J. Kalinowski, A. Goesmann, J.H. Mussgnug, and O. Kruse. 2013. Reconstruction of the lipid metabolism for the microalga *Monoraphidium neglectum* from its genome sequence reveals characteristics suitable for biofuel production. *BMC Genomics*, 14(926): 1-18. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-926>
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Applied Phycology*, 7(1): 3-15. <http://doi.org/10.1007/BF00003544>
- Cardinale, B.J. 2011. Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature*, 472(7341): 86-91. <http://doi.org/10.1038/nature09904>
- Cuaresma, M., M. Janssen, C. Vílchez, and R.H. Wijffels. 2009. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2): 352-359. <http://doi.org/10.1002/bit.22394>
- Dewi, R.S, and R. Nuravivah. 2018. Potential Of microalgae *Chlorella vulgaris* as bioremediation agents of heavy metal Pb (Lead) on culture media. *E3S Web of Conferences*, 31: 5010-5014. <http://doi.org/10.1051/e3sconf/20183105010>
- Dimitrova, P., G. Marinova, and P. Pilarski. 2016. Preliminary studies on the growth and biochemical composition of a promising carotenoid producing strain *Coelastrella* sp. *Natural and Mathematical Science*, 6(3): 139-149.

- Duong, V.T. 2016. Isolation and evaluation of microalgae strains from The Northern Territory and Queensland - Australia that have adapted to accumulate triacylglycerides and protein as storage. Thesis. Queensland, Australia: The University of Queensland.
- El-Sheekh, M.M., M. Ghareib, and G.A. EL-Souod. 2012. Biodegradation of phenolic and polycyclic aromatic compounds by some algae and Cyanobacteria. *J. Bioremediation and Biodegradation*, 3(1): 133-137. <http://doi.org/10.4172/2155-6199.1000133>
- Fatem, S.M. 2015. Kabupaten konservasi sebagai political action pemerintah daerah dalam mendukung konservasi sumberdaya alam hayati: Studi kasus Kabupaten Tambrau, Papua Barat. *In* Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia, 1(6): 1403-1410. <http://doi.org/10.13057/psnmbi/m010624>
- Galhano, V., D. Figueiredo, A. Alves, A. Correia, M. Pereira, J. Gomes-Laranjo, F. Peixoto. 2011. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia*, 663(1): 187-203. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0572-5>
- Gao, C., Y. Zhai, Y. Ding, and Q. Wu. 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Applied Energy*, 87(3): 756-761. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.09.006>
- Gill, S.S., M.A. Mehmood, U. Rashid, M. Ibrahim, A. Saqib and M.R. Tabassum, M. R. 2013. Waste-water treatment coupled with biodiesel production using microalgae: A bio-refinery approach. *Pakistan J. Life and Social Sciences*, 11(3): 179-189.
- Henry, T., P.C. Iwen, and S.H. Hinrichs. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clinical Microbiology*, 38(4): 1510-1515.
- Iyer, G., V. Nagle, Y.V. Gupte, S. Desai, and M. Iyer. 2015. Characterization of high carotenoid producing *Coelastrella oocystiformis* and its anti-cancer potential. *International J. of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(10): 527-536.
- Janda, M., and S. Abbott. 2007. 16s rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clinical Microbiology*, 45(9): 2761-2764.
- Kim, C., Y.S. Kim, and K.W. Nam. 2018. New records of two unknown micro-filamentous endophytic green algae in Korea: *Phaeophila dendroides* and *Dilabifilum arthropryreniae*. *J. Fishries and Marine Sciences Education*, 29(1): 234-241. <http://doi.org/10.13000/jfmse.2017.29.1.234>
- Kim, S.K., Y.D. Ravichandran, S.B. Khan, and Y.T. Kim. 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5): 511-523. <http://doi.org/10.1007/s12257-008-0113-5>
- Kumar, V.B., I.N. Pulidindi, Y. Kinel-Tahan, Y. Yehoshua, and A. Gedanken. 2016. Evaluation of the potential of *Chlorella vulgaris* for bioethanol production. *Energy and Fuels*, 30(4): 3161-3166. <http://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b00253>
- Liana, H.A. 2017. Isolasi *Chlorella* sp. dengan metode CATB dan

- identifikasi sekuen 18S rDNA. Skripsi. Malang, Indonesia: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Liu, J., J. Huang, K.W. Fan, Y. Jiang, Y. Zhong, Z. Sun, and F. Chen. 2010. Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresource Technology*, 101(22): 8658–8663. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.082>
- Ma, R., X. Wu, R. Wang, C. Wang, and J. Zhu, 2008. Identification and phylogenetic analysis of a bacterium isolated from the cloaca of Chinese alligator, 7(13): 2128–2133. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Maresi, S.R.P., P. Priyanti, dan E.Yunita. 2016. Fitoplankton sebagai bioindikator saprobitas perairan di Situ Bulakan Kota Tangerang. *AL-Kauniah: J. Biologi*, 8(2): 113–122. <http://doi.org/10.15408/kauniah.v8i2.2697>
- Marsh, T.L., and C.H. Nakatsu. 2014. Analysis of microbial communities with denaturing gradient gel electrophoresis and terminal restriction fragment length polymorphism. *In* Methods for General and Molecular Microbiology, 3<sup>rd</sup> Ed. ACM Press. Washington D.C. 909–923 pp. <http://doi.org/10.1128/9781555817497.ch41>
- Mercer, P., and R.E. Armenta. 2011. Developments in oil extraction from microalgae. *European J. Lipid Science and Technology*, 113(5): 539–547. <http://doi.org/10.1002/ejlt.201000455>
- Meyer, A., C. Todt, N. Mikkelsen, B. Lieb. 2010. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evol Biol*, 10(70): 1–12.
- Munir, N., A. Imtiaz, N. Sharif, and S. Naz. 2015. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid contents. *J. Animal and Plant Sciences*, 25(2): 546–553.
- Peixoto, G., C. De Matos, and C. Do Nascimento. 2015. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, 42(3): 549–566.
- Platt, T., C. Fuentes-Yaco, and K.T. Frank. 2003. Marine ecology: Spring algal bloom and larval fish survival. *Nature*, 423(6938): 398–399. <http://doi.org/10.1038/423398b>
- Purbani, D.C. 2019. Cyanobacteria from *Sorghum bicolor*-grown fields of Ecopark at Cibinong Science Center-Botanic Gardens, Indonesia. *In*: Sayyed R., M. Reddy, S. Antonius. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for sustainable agriculture. Springer. Singapore. 109–116 pp. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6790-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6790-8_7).
- Ramos, G.J.P., C.E. de M. Bicudo, A. Góes Neto, and C.W. do N. Moura. 2013. *Monoraphidium* and *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. *Hoehnea*, 39(3): 421–434. <http://doi.org/10.1590/s2236-89062012000300006>
- Rivas, R., E. Velázquez, E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Mateos, P. F., & Molina, E. M. (2004). Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and

- eukaryotes. *J. Microbiological Methods*, 56(3): 413–426.  
<http://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.007>
- Sawant, S.S., and V. Kelkar Mane. 2018. Nutritional profil, antioxidant, antimicrobial potential, and bioactives profile of *Chlorella emersonii* KJ725233. *Asian J. Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(3): 220–225.  
<http://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i3.21990>
- Suharno, dan D. Lantang. 2012. Status Kesuburan Perairan Laut ditinjau dari Keragaman Plankton di Kawasan Kepala Burung , Papua Barat. *J. Biologi Papua*, 4(2): 75–82.
- Sujarta, P., H. Ohee, dan E. Rahareng. 2011. Kajian keragaman plankton dan ikan di perairan teluk tanah merah Distrik Depapre, Kabupaten Jayapura, Papua. *J. Biologi Papua*, 3(2): 67–73.  
<http://ejournal.unicen.ac.id/index.php/JBP/article/view/47>
- Suparman. 2012. Markah Molekuler dalam Identifikasi dan Analisis Kekerabatan Tumbuhan serta Implikasinya bagi Matakuliah Genetika. *J. Bioedukasi*, 1(1): 59–68.
- Tale, M., S. Ghosh, B. Kapadnis, and S. Kale. 2014. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technology*, 169: 328–335.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.017>
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.  
<http://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tomas, C. 1997. Identifying marine phytoplankton. *In Dinoflagellates*. Academic Press. California, USA. 858 pp.  
<http://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1537>
- Waltz, E. 2009. Biotech's green gold?. *Nature Biotechnology*, 27(1): 15–18.  
<http://doi.org/10.1038/nbt0109-15>
- Wilson, K.H., R.B. Blitchington, and R.C. Greene. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clinical Microbiology*, 28(9): 1942–1946.
- Yildirim, A., Z. Demirel, M. İşleten-Hoşoğlu, I.H. Akgün, S. Hatipoğlu-Uslu, and M. Conk-Dalay. 2014. Carotenoid and fatty acid compositions of an indigenous *Ettlia texensis* isolate (Chlorophyceae) under phototrophic and mixotrophic conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3): 1307–1319.  
<http://doi.org/10.1007/s12010-013-0599-y>
- Zhou, W., Y. Li, M. Min, B. Hu, H. Zhang, X. Ma, L. Li, Y. Cheng, P. Chen, and R. Ruan. 2012. Growing wastewater-born microalga *Auxenochlorella protothecoides* UMN280 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production. *Applied Energy*, 98: 433–440.  
<http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.04.005>

Received : 03 May 2019

Reviewed : 24 May 2019

Accepted : 02 September 2019