



TUGAS AKHIR - SB -184830

Eksplorasi Isolat Organisme Penghasil Astaxanthin dengan Penanda Gen BKT (β - Karoten Ketolase) di Perairan Utara Sowan, Tuban

Thalita Meidina
01311540000018

Dosen Pembimbing:
Dini Ermavitalini, M.Si

Departemen Biologi
Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2019



TUGAS AKHIR - SB - 184830

**Eksplorasi Isolat Organisme Penghasil
Astaxanthin dengan Penanda Gen BKT (β -
Karoten Ketolase) di Perairan Utara Sowan,
Tuban**

**Thalita Meidina
01311540000018**

**Dosen Pembimbing:
Dini Ermavitalini, M.Si**

**Departemen Biologi
Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2019**



FINAL PROJECT - SB - 184830

**Exploration of Astaxanthin Producing
Organism Isolate with BKT (B-Carotene
Ketolase) Genes Marker in North Sea of
Sowan, Tuban**

**Thalita Meidina
01311540000018**

**Advisor Lecturer:
Dini Ermavitalini, M.Si**

**Department of Biology
Faculty of Science
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2019**

LEMBAR PENGESAHAN

EKSPLORASI ISOLAT ORGANISME PENGHASIL ASTAXANTHIN DENGAN PENANDA GEN BKT (β -KAROTEN KETOLASE) DI PERAIRAN UTARA SOWAN, TUBAN

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
Pada
Departemen Biologi
Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

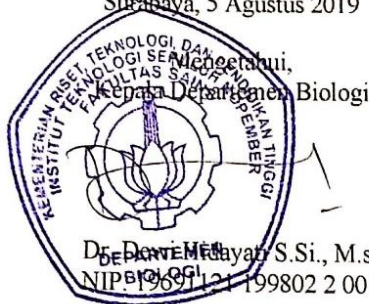
Oleh:

THALITA MEIDINA
NRP. 01311540000018

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Dini Ermavitalini, M.Si..... (Pembimbing 1)

Surabaya, 5 Agustus 2019



EKSPLORASI ISOLAT ORGANISME PENGHASIL ASTAXANTHIN DENGAN PENANDA GEN BKT (β - KAROTEN KETOLASE) DI PERAIRAN UTARA SOWAN, TUBAN

Nama Mahasiswa : Thalita Meidina
NRP : 01311540000018
Departemen : Biologi
Dosen Pembimbing: Dini Ermavitalini, M.Si.

Abstrak.

Mikroalga merupakan mikroorganisme berklorofil, habitat di air tawar atau air laut. Mikroalga mengakumulasi astaxanthin sebagai respon terhadap kondisi stres lingkungan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat mikroalga yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan astaxanthin dengan analisis molekuler gen BKT dan mengetahui kekerabatan gen BKT pada isolat mikroalga yang didapatkan. Sampling dilakukan di perairan utara Sowan. Isolasi menggunakan metode dilusi dan streak plate. Ekstraksi DNA menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) dan dilakukan uji kemurnian serta konsentrasi sampel. Amplifikasi DNA menggunakan primer gen penanda BKT (P1 dan P2) dan dielektroforesis. Gel agarosa yang mengandung DNA dipurifikasi dan dilakukan sekuensing serta analisis filogenetik untuk mengetahui kekerabatan gen BKT antar isolat mikroalga. Hasil analisis PCR menunjukkan gen BKT teramplifikasi, oleh P1 dengan ukuran fragmen 900 bp untuk S1 dan S2, oleh P2 dengan ukuran fragmen 700 bp untuk S1 dan S2. Isolat diduga termasuk dalam kelompok Sianobakteria genus Synechococcus yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan astaxanthin. Kekerabatan gen BKT menunjukkan kedekatan dengan bakteri Halomonas dan Sphingomonas.

Kata Kunci: Astaxanthin, BKT, filogenetik, mikroalga, molekuler.

**EXPLORATION OF ASTAXANTHIN PRODUCING
ORGANISM ISOLATE WITH BKT (β -CAROTENE
KETOLASE) GENES MARKER IN NORTH SEA OF
SOWAN, TUBAN**

Student Name : Thalita Meidina
NRP : 01311540000018
Departement : Biology
Advisor Lecturer : Dini Ermavitalini, M.Si.

Abstract.

Microalgae are microorganisms that have chlorophyll, habitats in freshwater or seawater. Microalgae accumulate astaxanthin in response to environmental stress conditions. The purposes of this study are to look for microalgae isolates which produce antioxidant astaxanthin by molecular analysis of the BKT gene and to find out the BKT gene kinship in the microalgae isolates obtained. The sampling was carried out north of Sowan. Isolation uses a dilution method and streak plate. DNA extraction using Genomic DNA Mini Kit (Plant), purity and concentration are also tested. DNA amplification uses the primary BKT gene marker and electrophoreses on 2% agarose gel with a voltage of 100 volts. Agarose gel containing DNA was purified and sequenced, phylogenetic analysis was carried out to determine BKT gene kinship between microalgae isolates. Results of PCR analysis shown that BKT genes are amplified with P1 with 900 bp fragments length for S1 and S2, also with P2 with 700 bp fragments length for S1 and S2. *Synechococcus* suspected include in Cyanobacteria and has potentio to produce antioxidant Astaxanthin. Isolates *Synechococcus* has kinship with *Halomonas* and *Sphingomonas*.

Keyword: Astaxanthin, BKT, filogenetics, microalgae, molecular

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan berkat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Eksplorasi Isolat Organisme Penghasil Astaxanthin dengan Penanda Gen BKT (β -karoten ketolase) di Perairan Utara Sowan, Tuban”. Tugas akhir ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Biologi pada Fakultas Ilmu Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak yang telah memberikan masukan-masukan kepada penulis. Oleh karena itu, penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyusunan proposal ini.

Terlepas dari semua itu, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dari proposal ini, baik materi maupun teknik penyajiannya, mengingat kurangnya pengetahuan dan pengalaman penulis. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan agar penulis menjadi lebih baik lagi.

Surabaya, 2 Agustus 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	iii
LEMBAR PENGESAHAN	vii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Batasan Masalah	2
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Kondisi Umum Perairan Laut.....	5
2.2 Mikroalga	5
2.3 Faktor-faktor Pertumbuhan Mikroalga	6
2.5 Astaxanthin.....	7
2.6 Potensi Mikroalga Penghasil Astaxanthin sebagai Antioksidan	8
2.7 Biosintesis Astaxanthin pada Mikroalga	9
2.8 Teknik Identifikasi.....	11
2.8.1 Marka Molekuler.....	11
2.8.2 Desain Primer.....	11
2.8.3 PCR	12
2.8.4 Elektroforesis	13
2.8.5 Sekuensing dan Analisis Filogenetik	13

BAB III METODOLOGI	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2 Cara Kerja.....	15
3.2.1 Sampling mikroalga	15
3.2.2 Persiapan Media dan Sterilisasi	16
3.2.3 Isolasi dan Purifikasi Mikroalga	18
3.2.5 Identifikasi Morfologi menggunakan Mikroskop	19
3.2.6 Analisis Gen BKT (β -karoten ketolase) pada Isolat Mikroalga	20
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	24
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	 25
4.1 Gambaran umum lokasi penelitian	25
4.2 Isolasi dan Kultivasi Mikroalga.....	25
4.3. Identifikasi Mikroalga	26
4.4. Analisis Gen BKT (β -karoten ketolase) pada <i>Synechococcus</i>	28
4.4.1. Amplifikasi DNA.....	28
4.4.2 Elektroforesis Produk Amplifikasi.....	29
4.4.3 Hasil Sekuensing.....	31
4.4.4 Kekerabatan Gen BKT.....	31
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	 33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
 DAFTAR PUSTAKA	 35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur kimia astaxanthin.....	8
Gambar 2.2 Jalur biosintesis astaxanthin (Pierce <i>et.al.</i> , 2015)....	10
Gambar 4.1 Kultur <i>Synechococcus</i>	26
Gambar 4.2 Hasil elektroforesis produk PCR.	29
Gambar 4.3 Pohon filogenetik.....	32

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Komposisi media isolasi f/2 guillard.....	17
Tabel 3.2 Komposisi media isolasi BG11	18
Tabel 3.3 Daftar nomor seri sekuens gen BKT	20
Tabel 3.4 Sekuens hasil desain primer forward dan reverse	20
Tabel 3.5 Komponen reagen proses PCR.....	22
Tabel 3.6 Pengaturan suhu dan waktu PCR	23
Tabel 4.1 Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA S1 dan S2.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja.....	43
Lampiran 2 Isolasi, identifikasi dan perbanyakan biomassa	44
Lampiran 3 Ekstraksi DNA, Amplifikasi DNA dan Elektroforesis	45
Lampiran 4. Perhitungan pengenceran primer dan pengenceran DNA	49
Lampiran 5. Primer Forward 1 dan Forward 2.....	51
Lampiran 6. Primer Reverse 1 dan Reverse 2	52
Lampiran 7. Hasil Sekuensing.....	53

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki wilayah perairan yang luas, sehingga dikenal sebagai negara maritim. Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi, termasuk keanekaragaman lautnya. Perairan laut merupakan salah satu sarana ekosistem bagi makhluk hidup seperti mikroalga. Sejak meningkatnya permintaan terhadap sumber daya alam, pengembangan terhadap inovasi bioaktif dan substansi berbasis makhluk hidup dengan aktifitas yang spesifik, seperti antioksidan, menjadi sangat dibutuhkan. Salah satu solusi yang tepat untuk mengatasi permasalahan itu adalah dengan melihat dan mengenali potensi dari mikroalga.

Mikroalga merupakan makhluk hidup berukuran 1 mikrometer hingga ratusan mikrometer yang memiliki klorofil, habitat di air tawar atau air laut, membutuhkan karbon dioksida, nutrisi dan cahaya untuk melakukan fotosintesis. Sebagian besar mikroalga menghasilkan produk-produk tertentu seperti karotenoid, enzim-enzim, polimer, peptida, asam lemak, dan salah satunya adalah antioksidan (Hadiyanto dan Azim, 2012).

Antioksidan adalah senyawa penting yang terdapat pada peptida bioaktif mikroalga yang secara efektif mencegah atau menunda efek merugikan yang disebabkan oleh radikal bebas (Munir *et.al.*, 2013). Senyawa antioksidan diproduksi oleh mikroalga sebagai mekanisme perlindungan internal untuk meminimalkan konsentrasi ROS. Oksigen hasil fotosintesis mudah diaktifkan oleh stres secara umum yang mencakup kekeringan, kelembaban, salinitas, suhu rendah, UV-B, dan lain-lain atau disebut dengan spesies oksigen reaktif (ROS) (Yanuhar, 2016). Salah satu antioksidan kuat yang dapat dihasilkan oleh mikroalga adalah astaxanthin.

Karotenoid adalah kelompok antioksidan dan pigmen alami yang merupakan molekul isoprenoid dengan struktur rantai 40 atom karbon poliena. Astaxanthin terbentuk dari β -karoten dengan penambahan gugus keto pada posisi 4 dan 4' serta gugus hidroksil pada posisi 3 dan 3' dari cincin β -ionone (Zhu *et.al.*, 2008). Gugus hidroksi dan keto memungkinkan astaxanthin memiliki aktifitas antioksidan yang lebih besar daripada karotenoid lain. Maka dari itu, astaxanthin memiliki manfaat dan peran penting sebagai antioksidan alami dalam farmasi.

Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi isolat organisme di wilayah perairan utara Sowan, Tuban dengan isolasi, identifikasi morfologi dan analisis molekuler menggunakan gen BKT yang merupakan gen pengkode β -karoten ketolase dalam pembentukan astaxanthin. Identifikasi dengan analisis gen tersebut dilakukan untuk mengetahui mikroalga yang berpotensi menghasilkan antioksidan astaxanthin.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Isolat-isolat mikroalga apa saja yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan astaxanthin dengan metode analisis gen BKT di perairan utara Sowan, Tuban?
2. Bagaimana kekerabatan gen BKT pada isolat mikroalga yang didapatkan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Mendapatkan isolat-isolat mikroalga yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan astaxanthin dengan analisis molekuler gen BKT di perairan utara Sowan, Tuban.
2. Mengetahui kekerabatan gen BKT pada isolat mikroalga yang didapatkan.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Gen yang digunakan dalam analisis molekuler adalah BKT (β -karoten ketolase)
2. Identifikasi menggunakan pendekatan morfologi
3. Identifikasi dilakukan hingga tingkat genus menggunakan buku *Freshwater algae: Identification and Use as Bioindicator* oleh Bellinger dan Siege tahun 2010
4. Mikroalga yang diteliti hanya mikroalga yang berhasil dikulturmurnikan dan berjumlah 10 isolat

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat yang dapat dikembangkan sebagai bahan baku sumber produksi alami berbagai obat-obatan dalam farmasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kondisi Umum Perairan Laut

Kabupaten Tuban merupakan salah satu kota pesisir Pantai Utara (Pantura) Jawa Timur yang memiliki panjang pantai ± 65 km (Joesidawati, 2016). Perairan laut maupun pesisir memiliki pH relatif lebih stabil dan berada dalam kisaran yang sempit yaitu 7,7-8,4. pH dipengaruhi oleh kapasitas penyangga (*buffer*) yaitu adanya garam-garam karbonat dan bikarbonat yang terkandung. Salinitas di laut bervariasi, rata-rata 35%. Salinitas di perairan bergantung dengan kedalaman. Suhu alami air laut berkisar antara suhu di bawah -5°C hingga lebih dari 33°C (Yulianda dan Zamani, 2014). Wilayah perairan laut memiliki ekosistem padang lamun yang terapat pada daerah mid-intertidal hingga kedalaman 0,5-10 meter (Tangke, 2010).

2.2 Mikroalga

Mikroalga merupakan mikroorganisme akuatik fotosintetik berukuran mikroskopis, yang dapat ditemukan di dalam air tawar dan air laut dan termasuk mikroorganisme fotoautotrof (Harmoko *et.al.*, 2017). Mikroalga berukuran antara 1 mikrometer sampai ratusan mikrometer, memiliki klorofil, membutuhkan karbon dioksida, beberapa nutrisi dan cahaya untuk berfotosintesis (Hadiyanto dan Azim, 2012). Serupa dengan tumbuhan, mikroalga adalah organisme autotrof, memiliki kloroplas dan organel seluler (Kim, 2015). Mikroalga dapat ditemukan hampir pada seluruh lingkungan dan habitat di bumi, dari wilayah kutub hingga ekuator. Mikroalga dapat hidup bebas mengapung (planktonik) atau tumbuh menempel pada substrat. Mikroalga memiliki berbagai macam bentuk dan ukuran, berupa uniseluler atau multiseluler atau berkoloni. Beberapa ada yang non-motil, dan ada yang memiliki flagella halus atau berambut sebagai alat gerak (Levine dan Fleurence, 2018).

Mikroalga eukariotik dilapisi dinding sel selulosa yang tebal. Dinding sel tersusun atas proteoglikan, selulosa dan serat hemiselulosa, protein dan polisakarida ekstraseluler (EPSs). Sedangkan pada prokariot tidak mengandung membran selulosa, namun dilapisi peptidoglikan seperti pada eubacteria gram negatif (Torgal *et.al.*, 2016). Mikroalga merupakan komponen kunci jaring-jaring makanan di perairan dengan peran sebagai produsen primer (Levine dan Fleurence, 2018).

2.3 Faktor-faktor Pertumbuhan Mikroalga

Faktor-faktor yang berpengaruh bagi pertumbuhan mikroalga menurut Hadiyanto dan Azim (2012) adalah intensitas cahaya, suhu, nutrisi, oksigen, karbon dioksida, pH dan salinitas.

Pertumbuhan mikroalga sangat dipengaruhi oleh cahaya karena dibutuhkan dalam proses fotosintesis. Aktivitas fotosintetik naik seiring dengan kenaikan intensitas cahaya. Sebagian besar mikroalga tidak dapat tumbuh dengan baik dalam keadaan pencahayaan yang konstan, karena membutuhkan waktu istirahat untuk menyimpan makanan. Terkadang dilakukan manipulasi durasi pencahayaan *light dark* (L/D) antara lain 18:8, 14:10 atau 12:12 waktu pencahayaan.

Salah satu parameter pertumbuhan mikroalga yang penting adalah suhu, karena didasarkan pada tempat tumbuhnya mikroalga yang beriklim tropis maupun sub tropis. Sebagian besar mikroalga dapat tumbuh pada 15°-40°C, dan beberapa mikroalga dapat tumbuh subur pada kondisi suhu 24°-26°C. Pada suhu dibawah 16°C, mikroalga masih dapat tumbuh dalam keadaan lambat. Namun ketika suhu diatas 35°C, beberapa mikroalga lisis (pecah). Kenaikan suhu pada range tertentu dapat menaikkan *growth rate* mikroalga.

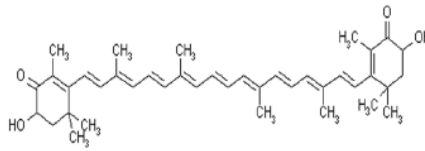
Mikroalga membutuhkan makronutrien dan mikronutrien untuk pertumbuhannya. Makronutrien yang dibutuhkan antara lain karbon (C), nitrogen (N), hidrogen (H), sulfur (S), kalium (K), magnesium (Mg) dan fosfor (P), serta unsur mikronutrien yang meliputi zat besi (Fe), boron (B), mangan (Mn), vanadium

(Va), silikon (Si), selenium (Se), cuprum (Cu), nikel (Ni) dan molybdenum (Mo). Mikronutrien digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan sel dan metabolisme. Keberadaan mikronutrien tidak bisa diganti oleh zat lain. Kebutuhan mikronutrien setiap mikroalga berbeda-beda berdasarkan habitatnya (air laut, payau, tawar).

Oksigen dihasilkan dari proses fotosintesis mikroalga. Level oksigen yang tinggi dalam medium akan membahayakan proses fotosintesis. Karbon dioksida berperan penting dalam proses fotosintesis mikroalga seperti tumbuhan berklorofil lainnya. Transfer massa CO₂ pada medium mempengaruhi laju pertumbuhan mikroalga. Namun apabila kadar CO₂ semakin tinggi dapat mempengaruhi pH medium. Semakin tinggi kadar CO₂ diatas 33% dari komposisi udara normal, laju pertumbuhan mikroalga menjadi lambat. Sebagian besar mikroalga dapat tumbuh pada kondisi pH normal antara 6-8. Namun beberapa jenis sianobakteria hanya dapat tumbuh pada kondisi alkali/basa. Mikroalga air laut umumnya rentan terhadap perubahan salinitas pada medium.

2.5 Astaxanthin

Karotenoid ialah isoprenoid, yang merupakan senyawa rantai panjang poliena yang mengandung 40 atom karbon dengan gugus-gugus siklik. Berdasarkan kandungan unsur kimia, karotenoid terbagi menjadi dua kelompok yaitu karoten dan xantofil. Karoten merupakan senyawa karotenoid yang mengandung unsur hidrogen dan karbon (hidrokarbon) sedangkan xantofil merupakan senyawa karotenoid yang mengandung hidrogen, karbon dan oksigen (Wusqy dan Karwur, 2010). Astaxanthin termasuk dalam kelompok ketokarotenoid (Zhu *et.al.*, 2008).



Gambar 2.1 Struktur kimia astaxanthin

Ketokarotenoid merupakan kelompok karotenoid yang mengandung paling sedikit satu gugus keto pada rantai linear atau pada cincin β -ionone. Astaxanthin atau 3,3'-dihidroksi- β , β -karotene-4,4'-dione merupakan antioksidan kuat dan berperan dalam kesehatan mata dan kulit (Zhu *et.al.*, 2008). Astaxanthin tersusun atas 40 atom karbon terhubung dengan ikatan tunggal dan rangkap membentuk rantai fitoen (Pratiwi & Limantara, 2008). Rantai fitoen pada astaxanthin diawali dan diakhiri cincin ionon. Astaxanthin termasuk dalam golongan xantofil karena memiliki oksigen pada cincin ionone (Wusqy dan Karwur, 2010). Astaxanthin dihasilkan paling baik oleh *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), yang mengakumulasi astaxanthin sebagai respon terhadap kondisi stres lingkungan seperti radiasi, suhu dan salinitas yang tinggi (Fretes *et.al.* 2012).

2.6 Potensi Mikroalga Penghasil Astaxanthin sebagai Antioksidan

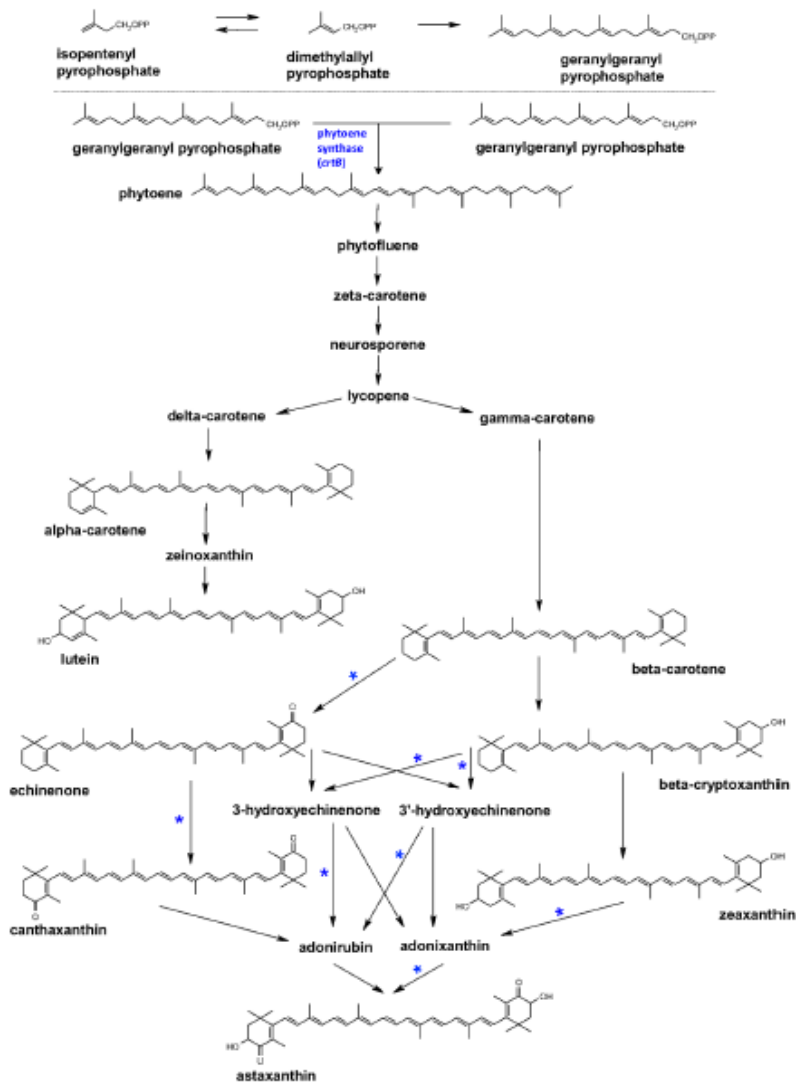
Astaxanthin merupakan antioksidan potensial yang dapat membantu mempertahankan kesehatan tubuh. Astaxanthin melindungi sel dari oksidasi dengan mekanisme meredam singlet oksigen kemudian melepaskan energi dalam bentuk panas dan menetralkan radikal bebas, yang selanjutnya mencegah dan menghentikan reaksi oksidasi (Pratiwi dan Limantara, 2008). Astaxanthin merupakan antioksidan yang ditemukan pada *H. pluvialis*, yang memiliki kekuatan antioksidan lebih tinggi daripada vitamin C dan E (Oktarina, 2017).

Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa astaxanthin dapat mencegah penyakit kardiovaskular dengan mekanisme

antioksidan. Iwamoto *et.al.* (2000) membuktikan bahwa konsumsi mikroorganisme penghasil astaxanthin dapat menghambat oksidasi LDL dan mencegah arteriosklerosis. Hussein *et.al.* (2005) menemukan manfaat astaxanthin dalam perlindungan terhadap hipertensi dan stroke. Selain itu, astaxanthin bermanfaat dalam meningkatkan respon imun antitumor dengan menghambat peroksidasi lipid yang diinduksi oleh stres oksidatif (Wusqy dan Karwur, 2010). Aktivitas antioksidan astaxanthin merupakan mekanisme utama dari aktivitas lainnya seperti perlindungan terhadap fotooksidasi oleh sinar ultraviolet (UV), inflamasi, kanker, infeksi bakteri, penuaan dan penyakit yang terkait dengan usia, serta peningkatan respon sistem imun, fungsi hati dan jantung, kesehatan mata, persendian dan prostat. Selain itu, Astaxanthin memiliki potensi sebagai senyawa antikanker (Pratiwi dan Limantara, 2008).

2.7 Biosintesis Astaxanthin pada Mikroalga

Karotenoid terbentuk melalui jalur biosintesis isoprenoid. Kombinasi dari dua molekul geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) merupakan tahap pertama sintesis karotenoid yang akan membentuk phytoene. Kombinasi tersebut dikatalis oleh phytoene synthase (Psy). Kemudian phytoene dikonversi menjadi β -karoten, yang mengandung dua struktur cincin beta (β -ring). Beta karoten dapat dimodifikasi lebih lanjut untuk membentuk ketokarotenoid. Penambahan gugus keto pada satu atau kedua cincin mengarah pada pembentukan pigmen echinenone dan canthaxanthin. Astaxanthin terbentuk dari dua gugus yang keduanya mengalami ketolasi dan hidroksilasi (Pierce *et.al.*, 2015). Jalur biosintesis astaxanthin ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Jalur biosintesis astaxanthin (Pierce *et.al.*, 2015)

2.8 Teknik Identifikasi

2.8.1 Marka Molekuler

Alat yang digunakan untuk analisis keanekaragaman genetik adalah marka molekuler. Marka molekuler merupakan sekuens DNA yang dapat diidentifikasi dengan suatu metode tertentu yang terdapat pada lokasi tertentu dalam genom dan dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Aplikasi genetika molekuler, dalam hal ini marka/penanda molekuler, untuk mengestimasi keanekaragaman genetik terus berkembang. Analisis keragaman genetik berdasarkan marka molekuler berbasis polimorfisme sekuens DNA. Marka molekuler juga dapat diaplikasikan pada kegiatan konservasi plasma nutfah, program pemuliaan tanaman dan hewan, mengonstruksi peta keterpautan dan mengidentifikasi gen-gen yang bertanggung jawab terhadap sifat/karakter tertentu (Irmawati, 2016).

2.8.2 Desain Primer

Pada proses amplifikasi fragmen gen diperlukan suatu komponen yang disebut primer. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Maitriani *et.al.*, 2015). Primer adalah oligonukleotida yang memiliki peranan penting dalam proses PCR yang komplemen terhadap DNA target berjumlah dua buah atau sepasang (Prayoga dan Wardani, 2015). Desain primer dapat diperoleh dengan menggunakan bantuan software bioinformatik. Software akan secara otomatis menentukan primer yang layak pada suatu sekuens. Dalam melakukan desain primer terdapat beberapa kriteria untuk mendapatkan primer yang optimal diantaranya spesifisitas, panjang primer 18-30 bp, kandungan %GC sekitar 40-60%, suhu leleh (T_m) optimal berkisar 52-58°C, peniadaan basa timin pada 3'-end primer bukan komplemennya sehingga mencegah *self-annealing/dimmers* dan *mispriming*, suhu disosiasi primer pada pasangan PCR kira-kira sama. Desain primer yang spesifik dapat digunakan dalam identifikasi suatu gen (Pahlevi, 2016).

2.8.3 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik *in vitro* yang digunakan untuk melakukan replikasi atau amplifikasi bagian spesifik dari berjuta lipatan DNA dalam waktu beberapa jam. PCR membutuhkan beberapa substansi dalam pengerjaannya sebagai bahan baku, yaitu primer, DNA target atau DNA sampel, enzim polimerase, dNTP, kation divalen seperti magnesium klorida dan *buffer*. Enzim polimerase merupakan enzim yang berperan dalam proses sintesis atau pemanjangan untai DNA baru, umumnya menggunakan enzim Taq Polimerase. dNTP merupakan molekul bahan baku pembentuk untai DNA baru, terdiri atas dATP, dTTP, dGTP dan dCTP. Magnesium klorida menyediakan molekul Mg^{2+} yang berfungsi sebagai kofaktor enzim polimerase. *Buffer* yang digunakan dalam PCR umumnya adalah Tris-HCl (Prayoga dan Wardani, 2015).

Proses PCR secara umum berlangsung dalam tiga tahap, yaitu tahap denaturasi, tahap penempelan (*annealing*), dan tahap pemanjangan (*extension*). Tahap denaturasi dilakukan dengan menaikkan suhu hingga suhu 93 – 94°C dan bertujuan untuk memecah DNA target dari dua untai menjadi untai DNA tunggal yang saling terpisah. Tahap *annealing* dilakukan pada suhu 50 – 60°C setelah tahap denaturasi dan bertujuan agar primer menempel pada DNA target. Tahap *extension* berlangsung pada suhu 72°C setelah tahap *annealing* dan bertujuan agar enzim polimerase dapat melakukan sintesis sehingga berlangsung proses pemanjangan untai DNA baru. Setiap tahap PCR tersebut harus dilakukan secara berurutan dan satu perjalanan dari tahap denaturasi hingga tahap *extension* dinamakan satu siklus (*cycle*). Umumnya satu proses PCR membutuhkan sekitar 30 – 40 siklus untuk mendapatkan untai DNA baru (*amplicon*) dalam jumlah cukup banyak sesuai kebutuhan hasil analisis DNA (Prayoga dan Wardani, 2015).

2.8.4 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini memanfaatkan muatan listrik pada makromolekul. DNA yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, yaitu gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka DNA tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2005).

Gel agarosa merupakan bahan semi padat berupa polisakarida. Gel agarosa dibuat dengan melarutkannya ke dalam suatu *buffer* dibantu dengan pemanasan, sehingga terbentuk cairan yang mudah dituang ke atas plate. Ujung dibuat lubang-lubang dengan lembaran perspex atau sisir. Sisir ditancapkan pada salah satu ujung gel yang masih cair, sehingga akan terbentuk lubang-lubang kecil setelah gel mengalami pendinginan dan pepadatan. Lubang tersebut sebagai tempat untuk memasukkan sampel molekul DNA. Gel yang sudah terbentuk dimasukkan dalam tangki berisi *buffer* yang sama dengan yang digunakan untuk membuat gel. *Buffer* dapat dibuat dengan tris-borat-EDTA (TBE). DNA sampel dimasukkan dan dialiri arus listrik. Molekul DNA bergerak ke arah kutub positif. Setelah beberapa waktu gel agarosa direndam dalam larutan yang mengandung etidium bromida. Etidium bromida akan menginterkalasi (menyisip ke dalam) DNA dan membantu dalam visualisasi. Etidium bromida akan memendarkan sinar UV. Pita-pita yang terbentuk pada gel terlihat setelah disinari UV dari bawah (Yuwono, 2005).

2.8.5 Sekuensing dan Analisis Filogenetik

Penentuan pohon filogenetik memerlukan sekuen data-data hasil sekuensing DNA hasil eksperimen. Sekuensing merupakan pembacaan urutan basa nukleotida. Salah satu metode sekuensing DNA yang digunakan adalah metode Sanger (Sanger dideoxy

sequencing). Metode tersebut menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuen (Tasma, 2015). Basa nukleotida hasil pembacaan sekuen dapat diketahui melalui pembacaan grafik kromatogram yang menampilkan empat warna berbeda. Urutan nukleotida tersebut dibandingkan dengan data base GenBank dan dianalisis melalui BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Alignment sekuen menggunakan Clustal W untuk membandingkan ada tidaknya point mutasi basa nukleotida (Nugroho dan Rahayu, 2017).

Diagram filogenik adalah diagram berbentuk hubungan percabangan yang menunjukkan hubungan evolusi antara berbagai sekuen makhluk hidup berdasarkan kemiripan dan perbedaan karakteristik fisik serta genetik yang diturunkan dari induknya sebagai pendekatan logis untuk menunjukkan hubungan evolusi antara organisme. Program Mega 7 dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemiripan antar sekuen. Tahapan dimulai dari installing program, editing data sekuen dan alignment. Dari hasil analisis akan diketahui diagram filogenik dan dapat disimpulkan hubungan evolusi dari sekuen yang homolog (Yuniarti *et.al.*, 2016).

BAB III METODOLOGI

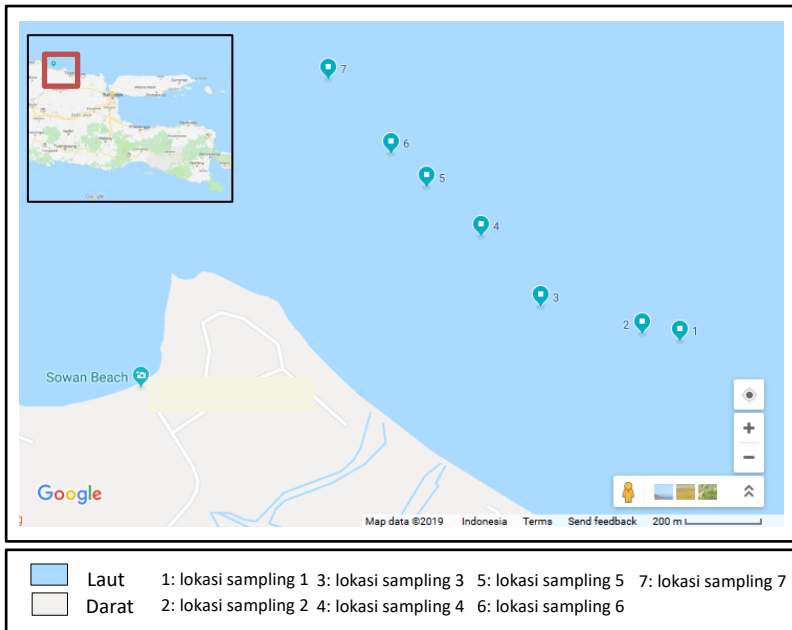
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada Desember-Juli 2019. Pengambilan sampel mikroalga dilakukan di wilayah perairan utara Sowan, Tuban pada 7 stasiun yang telah ditentukan. Jarak antar stasiun yaitu ± 200 meter. Isolasi dan Kultivasi dilakukan di Laboratorium Biosains dan Teknologi Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Isolasi genom mikroalga dan analisis gen BKT dilaksanakan di Laboratorium Hepatitis Institut Tropical Disease (ITD) Surabaya.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Sampling

Pengambilan sampel mikroalga dilakukan pada jarak ± 500 meter dari garis pantai melewati vegetasi lamun dan karang, dengan menggunakan plankton net tipe *small net* dengan *mesh size* 0,08 mm. Sampling dilakukan dengan menyaring secara horizontal pada bagian permukaan hingga badan air laut yang terjangkau oleh cahaya matahari (± 30 cm). Sampling dilakukan dengan menggunakan perahu motor dengan kecepatan 10 km/jam dengan jarak antar stasiun sepanjang 200 meter. Sampel mikroalga pada tiap stasiun ditampung pada satu botol plakton (komposit). Posisi dan karakter perairan meliputi salinitas dan pH dicatat. Koordinat titik sampling pada 7 stasiun diperoleh dengan GPS dan dicatat.



Gambar 3.1 Lokasi pengambilan sampel di perairan utara Sowan, Tuban (Google maps, 2019).

3.2.2 Persiapan Media dan Sterilisasi

Media isolasi yang digunakan adalah medium f/2 Guillard cair untuk metode dilusi dan media f/2 Guillard padat untuk metode *streak plate*. Pembuatan media cair dilakukan dengan menyaring air laut yang berasal dari tempat pengambilan sampel di perairan Tuban dan digunakan sebagai pelarut media f/2 Guillard. Pada pembuatan media f/2 padat dilakukan penambahan 10g/L (1%) agarosa ke dalam media cair (Thao, *et.al.*, 2017). Media menggunakan f/2 Guillard dikarenakan karakter perairan utara Sowan termasuk dalam perairan yang salin. Komposisi media f/2 Guillard terdapat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi media isolasi f/2 guillard

Komposisi	Ml
F/2 medium	
NaNO ₃ (75.0 g/L dH ₂ O)	1.0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (5.0 g/L dH ₂ O)	1.0
f/2 Trace Metal Solution	1.0
f/2 Vitamin Solution	0.5
Air laut	1000
f/2 Trace Metal Solution	
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ .H ₂ O (9.8 g/L dH ₂ O)	1.0
NaMoO ₂ .2H ₂ O (6.3 g/L dH ₂ O)	1.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (22.0 g/L dH ₂ O)	1.0
CoCl ₂ .6H ₂ O (10.0 g/L dH ₂ O)	1.0
MnC ₂ .4H ₂ O (180.0 g/L dH ₂ O)	1.0
Distilled water	1000
f/2 Vitamin Solution	
Vitamin B12 (1.0 g/L dH ₂ O)	1.0
Biotin (0.1 g/L dH ₂ O)	10.0
Thiamine HCl	200.0 mg
Distilled water	1000

(Perumal *et.al.*, 2012)

Variasi media yang digunakan selanjutnya yaitu BG11 untuk media cair, dengan volume *stock solution* yang dilarutkan dalam 1000 ml air laut. Komposisi media BG11 terdapat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Komposisi media isolasi BG11

Volume <i>Stock Solution</i> (ml)	Bahan	Konsentrasi dalam <i>Stock Solution</i>
60	NaNO ₃	2.50 g / 100 mL
10	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75 g / 100 mL
20	Na ₂ CO ₃	1.10 g / 100 mL
5.3	K ₂ HPO ₄	0.75 g / 100 mL
14	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.25 g / 100 mL
6	Citric Acid	0.10 g / 100 mL
10	Ferric ammonium citrate	0.06 g / 100 mL
10	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.01 g / 100 mL
Micronutrient		
1	H ₃ BO ₃	61 mg / 1 L
	MnSO ₄ .H ₂ O	169 mg / 1 L
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287 mg / 1 L
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5 mg / 1 L
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	12.5 mg / 1 L

(Kuhl dan Lorenzen, 1964; Rippka dan Herdman, 1992; Stanier *et.al.*, 1974)

Peralatan kultur meliputi cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, pipet ukur, ose, sumbat, tabung eppendorf disterilisasi beserta tip. Sterilisasi medium isolasi dan alat menggunakan autoklaf selama 90 menit dengan suhu 121° dan tekanan 1 atm. Pipet mikro dan *pump* disterilkan dengan alkohol 70% ketika akan digunakan. Sterilisasi dilakukan agar data yang dihasilkan valid (Ochthreeani *et.al.*, 2014).

3.2.3 Isolasi dan Purifikasi

Isolasi sampel mikroalga menggunakan metode pengenceran bertingkat dalam medium f/2 Guillard cair steril dan *streak plate* dalam medium f/2 Guillard padat steril. Pengenceran bertingkat dilakukan secara aseptis hingga didapatkan pengenceran 10⁻², 10⁻³

dan 10^{-4} . Pada pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} , 5 tetes tiap sampel diletakkan ke permukaan medium padat steril dan diratakan menggunakan drygalski. Isolat diinkubasi dalam suhu ruang ($23-25^{\circ}\text{C}$) dengan penyinaran 24:0 selama 7-14 hari (Azzahidah dan Ermavitalini, 2015). Koloni isolat yang tumbuh pada medium tersebut dimurnikan pada medium padat steril yang baru dengan metode *streak plate*. Pemilihan isolat didasarkan pada morfologi koloni, warna koloni dan perbedaan morfologi sel. Proses dilakukan terus menerus hingga didapatkan isolat murni, dengan melihat secara visual dan dengan menggunakan mikroskop hingga didapatkan mikroalga monokultur.

Isolat monokultur dipindahkan ke media padat BG11 secara bertahap dilanjutkan dengan media cair. Persiapan kultur starter/bibit dibagi menjadi tiga yaitu 1 ml, 10 ml dan 100 ml. Perbandingan bibit dan media adalah 1:10. Kultur dikocok atau diaerasi setiap hari (Mahmudah *et.al.*, 2015). Kultur diinkubasi dalam suhu ruang ($23-25^{\circ}\text{C}$) dengan penyinaran 24:0 selama 7-14 hari (Azzahidah dan Ermavitalini, 2015).

3.2.5 Identifikasi Morfologi menggunakan Mikroskop

Isolat mikroalga dipisahkan berdasarkan kesamaan morfologi koloni ke medium f/2 steril padat baru. Identifikasi isolat ke tingkat genus didasarkan pada morfologi tiap individu sel melalui pengamatan mikroskop. Isolat diambil menggunakan jarum ose secara aseptis dan diletakkan diatas gelas objek yang telah ditetesi medium cair. Masing-masing isolat yang diidentifikasi dibawah mikroskop ditandai dengan label dan diambil gambarnya dengan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop dengan optilab. Parameter yang diamati adalah bentuk sel, ukuran sel dan warna. Masing-masing isolat mikroalga diidentifikasi hingga tingkat genus menggunakan buku *Freshwater algae: Identification and Use as Bioindicators* oleh Bellinger dan Siege tahun 2010.

3.2.6 Analisis Gen BKT (β -karoten ketolase) pada Isolat Mikroalga

3.2.6.1 Desain Primer

Pada penelitian ini dilakukan desain primer *forward* dan *reverse* untuk mendapatkan gen target BKT (β -karoten ketolase). Primer dirancang dengan mensejajarkan beberapa nukleotida gen BKT dari spesies mikroalga yang mengandung gen BKT yang telah diunduh dari database GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) menggunakan *software online* MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) dan dipilih sekuens yang konservatif sebagai primer *forward* dan *reverse*. Perhitungan *melting temperature* pada setiap sekuens menggunakan *software online* OligoAnalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>).

Tabel 3.3 Daftar nomor seri sekuens gen BKT

No.	Nama Spesies	Nomor Seri GenBank
1.	<i>Haematococcus pluvialis</i>	GU143689.1
2.	<i>Chlorella zofingiensis</i>	AY772714.1
3.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XM_001698647.1
4.	<i>Chlorococcum</i> sp.	JF451851.1
5.	<i>Scotiellopsis oocystiformi</i>	JF451850.1
6.	<i>Protosiphon botryoides</i>	JF451849.1
7.	<i>Neochloris wimmeri</i>	JF451848.1

Tabel 3.4 Sekuens hasil desain primer *forward* dan *reverse*

No	Sekuens primer forward	Melting temperature
1.	5'- CAT CAC CAC GCA TGA TGC -3'	54,5 °C
2.	5'- GCA CTG GGA GCA CCA C -3'	56,6 °C
No	Sekuens primer reverse	Melting temperature
1.	5'- ACC CTC GTG GTG TCC -3'	54,1 °C
2.	5'- GGG ACC ACC CTC GAC GG -3'	60,9 °C

3.2.6.2 Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant)*. Isolat mikroalga murni dimasukkan dalam microtube dan disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm. Setelah didapatkan supernatan dan pelet, dibuang bagian supernatan. Pelet yang mengendap pada bagian bawah merupakan sel yang akan diekstrak. Pada tahap lisis, 400 μ L GP1 *buffer* ditambahkan dan dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya diinkubasi menggunakan thermostat dengan suhu 60°C selama 10 menit. Kemudian 100 μ L GP2 *buffer* ditambahkan ke dalam microtube sampel, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi suhu rendah (-20 °C) selama 3 menit. Filter column disiapkan dan ditempatkan dalam 2 ml collection tube. Campuran ditransfer ke filter column dan dicentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 1000 rpm, kemudian filter column dibuang. Supernatan ditransfer dari 2 ml collection tube ke microtube 1,5 ml steril baru.

Pada tahap DNA *binding*, 750 μ L GP3 *buffer* (yang telah ditambahkan dengan isopropanol) ditambahkan ke dalam campuran, kemudian dihomogenkan selama 5 detik dengan vortex. Selanjutnya disiapkan GD column dan ditempatkan dalam 2 ml collection tube, campuran ditransfer ke GD column. Kemudian disentrifuge pada 15000 rpm selama 2 menit. GD column dipindah ke dalam 2 ml collection tube baru dan disentrifuge kembali pada 15000 rpm selama 2 menit. GD column ditempatkan pada collection tube steril baru.

Pada tahap *wash*, 400 μ L W1 *buffer* ditambahkan ke dalam GD column dan disentrifuge 15000 rpm selama 1 menit. GD column ditempatkan pada collection tube steril baru. Selanjutnya 600 μ L *wash buffer* ditambahkan ke GD column dan disentrifuge kembali dengan kecepatan 15000 rpm selama 1 menit. GD column ditempatkan kembali pada collection tube steril baru. Kemudian disentrifuge kembali dengan 15000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan matriks kolom. GD column yang telah dikeringkan ditempatkan ke microtube 1,5 ml steril. Selanjutnya 50 μ L *elution buffer pre-heated* ditambahkan ke tengah matriks

kolom dan didiamkan selama 5 menit. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 15000 rpm selama 1 menit.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA diukur menggunakan nanodrop. Komputer dihubungkan dengan nanodrop dan dipilih *option: nucleic acid*. Tempat sampel (pedestal) pada nanodrop dibersihkan, ditetaskan blanko (TE *buffer*) 2 μL pada pedestal kemudian klik *measurement* pada software PC. Pedestal dibersihkan dan ditetaskan sampel isolat. Dilakukan pengukuran nilai sampel isolat mikroalga dengan klik *measurement* pada software PC. Kemurnian 1,8-2,0 merupakan nilai layak sampel isolat mikroalga untuk menuju ke tahap PCR dan elektroforesis (Mustafa dkk., 2016). Nilai kemurnian dapat dilihat sesuai dengan nilai rasio absorbansi.

$$R: \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

A260: panjang gelombang sinar UV yang diserap oleh DNA

A280: panjang gelombang sinar UV yang diserap oleh kontaminan

3.2.6.3 Amplifikasi DNA

Genom yang didapatkan pada proses ekstraksi tersebut digunakan sebagai template untuk proses amplifikasi DNA (PCR). Amplifikasi DNA diawali dengan pencampuran reagen primer *forward*, *reverse*, ddH₂O, DNA template dan kit.

Tabel 3.5 Komponen reagen proses PCR

Komponen	Volume
GoTaq Green Master Mix (2x)	25 μL
Primer forward (1 μM)	5 μL
Primer reverse (1 μM)	5 μL
Nuclease free water	11 μL
DNA Template	4 μL

Gen BKT diamplifikasi dengan primer *forward* dan *reverse* yang telah didapatkan dari tahap penentuan primer. Amplifikasi menggunakan PCR dan dilakukan dengan pengaturan suhu dan waktu sesuai protokol GoTaq Green Master Mix (2x) sebagai berikut.

Tabel 3.6 Pengaturan suhu dan waktu PCR

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	94 °C	3 min	1
Denaturasi	94 °C	30 sec	35 – 40
Annealing	50 & 55 °C	30 sec	
Elongasi	72 °C	60 sec	

3.2.6.3 Elektroforesis

Produk PCR diamati menggunakan elektroforesis. Elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dengan *buffer* 1x TBE (Tris-Borat-EDTA). Gel dibuat dengan 2 gr agarose dalam 100 ml TBE, dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam cetakan. Sumur cetakan diletakan ke dalam elektroforesis dengan mengarahkan sumuran ke kutub negatif. Ditambahkan TBE 1X hingga gel terendam. Disuntikkan DNA ladder 5 mikrolit dan DNA sample 7 mikrolit. Tegangan diatur menjadi 100 volt dengan waktu 40 menit. Fragmen DNA diamati dengan UV *transilluminator*.

3.2.6.4 Purifikasi Gel

Gel agarose 2% yang mengandung sekuens DNA dipotong dan digunakan untuk proses sekuensing. Gel dimasukkan dalam microtube dan ditambahkan dengan 400 µl DNA binding *buffer*, kemudian divortex hingga homogen. Ditambahkan 20 µl etanol absolut pada sampel, dihomogenkan, dan dipindahkan pada *cleanup spin column* di dalam microtube baru. Disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Dibuang supernatan yang terdapat pada microtube dan *cleanup spin column* ditempatkan kembali pada microtube yang sama, ditambahkan 700 µl *DNA wash buffer* dan disentrifuge dengan kecepatan 5000

rpm selama 5 menit. Bagian supernatan dibuang dan tempatkan kembali *cleanup spin column* pada microtube yang sama, proses pemberian *DNA wash buffer* diulang sebanyak 1 hingga 2 kali. Pindahkan *cleanup spin column* pada microtube steril dan tambahkan 25 µl *elution buffer*. Didiamkan selama 1 menit pada suhu ruang, lalu disentrifuge kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. DNA hasil purifikasi gel terlarut bersamaan dengan cairan yang terkumpul dalam microtube.

3.2.6.5 Sekuensing, Sekuens Alignment dan Analisis Filogenetik

Sekuensing dilakukan dengan menggunakan metode sanger. Proses sekuensing menggunakan jasa PT. Genetika Science Indonesia. Data DNA hasil sekuens gen BKT isolat mikroalga divisualisasikan menggunakan BioEdit untuk mengetahui kualitas sekuens dan dianalisis menggunakan MEGA 7.

Sekuens tersebut dibandingkan dengan sekuens serupa dalam database GenBank menggunakan Blast. Penyelarasan beberapa sekuens dilakukan dengan program CLUSTAL W, yang memungkinkan perhitungan matriks jarak yang dianalisis menggunakan algoritma neighbourjoining (NJ) dari CLUSTAL W. Setelah analisis sekuens lengkap, sekuens sejajar digunakan untuk menghasilkan pohon filogenetik menggunakan metode neighbor-joining (NJ). Software MEGA 7 dapat digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik.

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Hasil penelitian terkait isolat-isolat yang ditemukan, data sekuens DNA BKT, serta hubungan kekerabatan gen tersebut dengan isolat yang ditemukan masing-masing dianalisis secara deskriptif kualitatif.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Gambaran umum lokasi penelitian

Parameter yang diamati pada saat pengambilan sampel yaitu waktu, tempat, salinitas dan pH. Waktu pengambilan sampel dilakukan pada siang hari pukul 10.00 WIB dengan pertimbangan kelimpahan mikroalga yang tinggi. Pada saat itu mikroalga akan terakumulasi di permukaan badan perairan. Hal tersebut disebabkan karena adanya tingkat intensitas cahaya yang optimal yang akan dimanfaatkan mikroalga untuk fotosintesis (Siregar *et.al.*, 2014). Salinitas di perairan Sowan sebesar 32‰ dengan nilai pH 8. Menurut Jati *et.al.* (2012) fitoplankton dapat tumbuh dengan baik pada kisaran pH optimum 8,0 – 8,5 dan fitoplankton air laut hidup normal pada salinitas optimum 25-35‰.

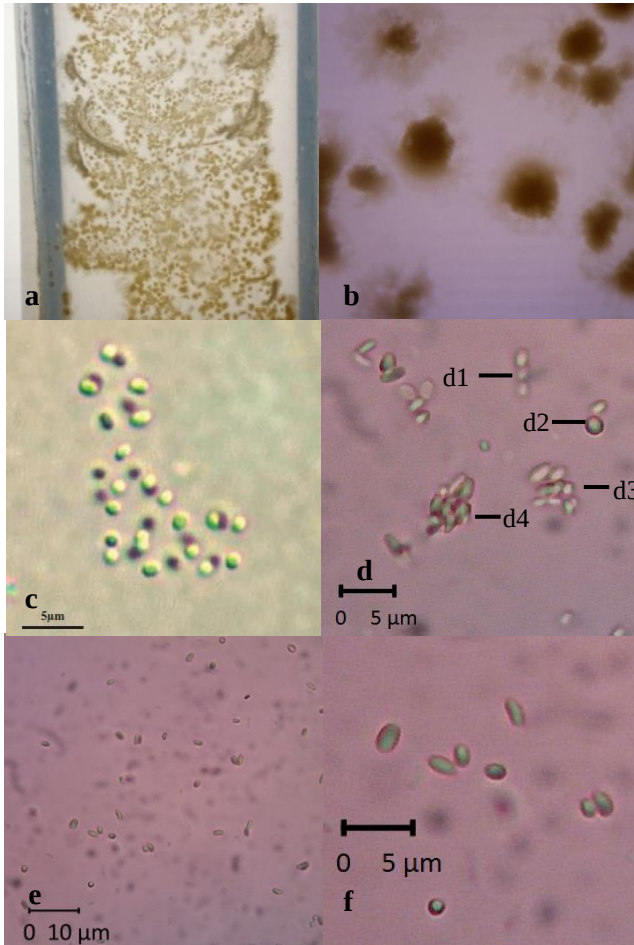
4.2 Isolasi dan Kultivasi Isolat

Pada penelitian pendahuluan, telah dilakukan isolasi mikroalga menggunakan media f/2 Guillard. Namun, hasil pengamatan tidak menunjukkan pertumbuhan dari mikroalga, sehingga diperlukan variasi media kultur. Pada penelitian ini selanjutnya digunakan variasi media BG11. Setelah dilakukan inkubasi selama 14 hari pada media padat, didapatkan jenis mikroalga yang dapat tumbuh dengan baik. Pemindahan isolat untuk mendapatkan mikroalga monokultur dilakukan sebanyak empat kali. Selanjutnya isolat yang telah dipurifikasi dipindahkan ke media cair BG11.

Kultivasi dilakukan pada kondisi pH 8, salinitas 32‰ dengan kisaran suhu 25-30°C dan penyinaran 24:0. Menurut Kurniawan dkk. (2017) lama waktu adaptasi bergantung pada kemampuan individu sel mikroalga. Pada fase tersebut pertumbuhan sel akan melambat, dikarenakan alokasi energi dipusatkan untuk penyesuaian terhadap media kultur dan untuk pemeliharaan sehingga hanya sebagian kecil bahkan tidak ada energi yang digunakan untuk pertumbuhan.

4.3. Identifikasi Isolat

Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi secara morfologi, isolat mikroalga diduga masuk dalam genus *Synechococcus*. Berikut adalah gambar kultur dalam media BG11 padat dan sel *Synechococcus*.



Gambar 4.1 Kultur *Synechococcus*; (a) Isolat monokultur *Synechococcus* yang tumbuh setelah 14 hari; (b) Koloni

Synechococcus yang tumbuh setelah 14 hari pada pengamatan mikroskop stereo dengan perbesaran 4.5x; (c) Sel *Synechococcus* sp. (Bellinger dan Siege, 2010); (d) bentuk sel *Synechococcus* yang berkoloni; (d1) rantai pendek; (d2) dua sel; (d3 dan d4) empat hingga delapan sel; (e) sel dengan perbesaran 400X; (f) sel dengan perbesaran 1000X.

Hasil pengamatan makroskopis isolat *Synechococcus* menunjukkan pertumbuhan yang sangat jelas. Pengamatan dilakukan pada koloni isolat yang tumbuh pada media BG-11 padat. Koloni isolat tumbuh berwarna putih transparan setelah hari ke-3, dengan bentuk membulat/lingkaran seperti titik. Setelah hari ke-5, terjadi perubahan warna koloni menjadi kuning kecoklatan seperti pada gambar 4.1a.

Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa sel *Synechococcus* uniseluler, berbentuk bulat telur hingga oval silindris. Sel berukuran sangat kecil ($\pm 0,9-1,9 \mu\text{m}$) dan tidak didapati adanya flagela dan lendir/*mucilage*. Pada penampang mikroskop, teramati sel-sel yang soliter maupun yang membentuk koloni seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.1d. Koloni tersebut dapat tersusun atas dua (gambar 4.1.d2), empat, hingga delapan sel (gambar 4.1.d3 dan d4), dan terkadang membentuk rantai pendek (gambar 4.1.d1). Karakter tersebut sesuai dengan karakteristik *Synechococcus* menurut Bellinger dan Siege (2010), bahwa sel mikroalga hidup soliter atau terkadang membentuk dua hingga empat koloni-koloni kecil. Koloni tersebut tidak selalu diselubungi oleh lendir/*mucilage* serta ukuran diameter sel berkisar antara 1-12 μm . Berdasarkan kandungan pigmen, *Synechococcus* terbagi menjadi dua, yaitu pigmen dominan fikoeiritrin berwarna kecoklatan dan pigmen dominan fikosianin berwarna hijau kebiruan (Wilczewska *et.al.*, 2018). Pada penampang mikroskop, protoplas sel yang teramati secara mikroskopis memiliki warna hijau kebiruan, diduga isolat tersebut mengandung pigmen fikosianin.

Sehingga dari karakteristik yang telah dijelaskan diatas, isolat mikroalga tersebut diduga termasuk dalam genus

Synechococcus. Genus ini merupakan mikroorganisme yang termasuk ke dalam kelas Cyanophyceae atau alga hijau-biru. *Synechococcus* terdistribusi luas diseluruh perairan laut maupun tawar yang memiliki temperatur, cahaya dan nutrisi yang berbeda-beda. Hal itu disebabkan karena *Synechococcus* memiliki mekanisme beradaptasi yang efisien terhadap perubahan kondisi lingkungan (Kim *et.al.*, 2018).

4.4. Analisis Gen BKT (β -karoten ketolase) pada *Synechococcus*

Pada penelitian ini, dilakukan analisis gen beta karoten ketolase pada isolat *Synechococcus* yang didapatkan, yang selanjutnya disebut S1 untuk *Synechococcus* pengulangan 1 dan S2 untuk *Synechococcus* pengulangan 2.

4.4.1. Amplifikasi DNA

Salah satu faktor keberhasilan dalam proses amplifikasi DNA pada PCR adalah nilai konsentrasi dan kemurnian DNA. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan *nanodrop spectrophotometer* ND-1000 dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Tabel 4.1 Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA S1 dan S2

Sampel	ng/μL	A260	A280	260/280
S1	31,38	0,628	0,301	2,08
S2	21,18	0,424	0,206	2,06

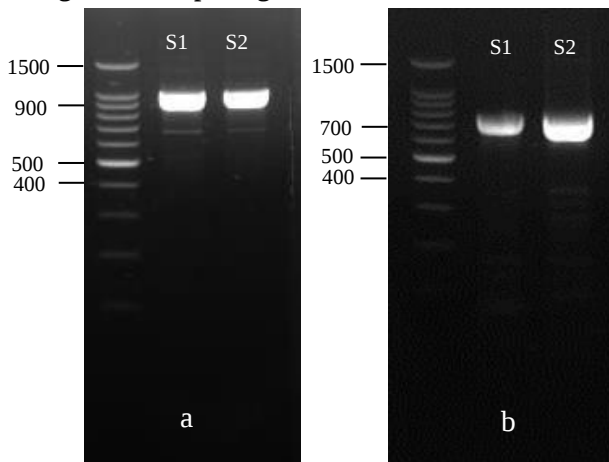
Tabel 4.1 menunjukkan masing-masing sampel menghasilkan DNA dengan konsentrasi yang baik. Konsentrasi DNA pada S1 dan S2 memenuhi untuk digunakan sebagai template PCR, konsentrasi yang dibutuhkan yaitu 20 ng/ μ L. Sedangkan untuk nilai kemurnian dari kedua sampel adalah sangat murni yang dapat diketahui dari nilai rasio yang masih berada pada rentang ukuran 1,8-2,0 (Mustafa dkk., 2016). Dilihat

dari nilai konsentrasi dan kemurnian DNA, S1 dan S2 layak digunakan sebagai template pada tahap PCR.

Hasil ekstraksi DNA yang telah diketahui konsentrasi dan kemurniannya, diamplifikasi menggunakan PCR BIO-RAD T100 *Thermal cycler*. Pada tahap tersebut, digunakan dua pasangan primer yang telah ditentukan. Primer tersebut dirancang berdasarkan daerah konservatif dari sekuens nukleotida pengkode BKT beberapa spesies mikroalga seperti tertera dalam tabel 3.3 pada bab metodologi. Runtutan masing-masing daerah konservatif dapat dilihat pada Lampiran 5 dan 6. Proses amplifikasi dilakukan dengan suhu *annealing* 50°C untuk pasangan primer 1 (P1) dan 55°C untuk pasangan primer 2 (P2) dengan 35x-40x siklus.

4.4.2 Elektroforesis Produk Amplifikasi

Berdasarkan hasil siklus PCR yang telah dilakukan, hasil pembacaan amplifikasi gen BKT pada elektroforesis menggunakan P1 dan P2 memiliki kualitas pita produk yang terlihat terang dan tebal pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil elektroforesis produk PCR; (a) hasil dari pasangan primer 1 (P1) pada fragmen 900 bp; (b) hasil dari pasangan primer 2 (P2) pada fragmen 700 bp.

Hasil amplifikasi yang baik ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan tampak sedikit atau tidak ada sama sekali *smear* pada gel jika divisualisasikan pada sinar ultraviolet (Safitri dkk., 2018). Hasil elektroforesis pada gambar 4.2 menunjukkan bahwa sampel S1 dan S2 dapat diamplifikasi dengan dua pasangan primer yang ditentukan (P1 dan P2). Amplifikasi pada kedua sampel menghasilkan satu fragmen oleh masing-masing pasangan primer. Ukuran hasil amplifikasi oleh P1 berada pada ukuran fragmen 900 bp untuk S1 dan S2, dan hasil amplifikasi oleh P2 berada pada ukuran fragmen 700 bp pada kedua sampel. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa primer dapat bekerja pada sampel S1 dan S2 serta diduga primer yang digunakan adalah primer yang spesifik. Sehingga fragmen DNA tersebut berpeluang menjadi salah satu penanda (marker) bagi gen BKT *Synechococcus*.

Pada tahap desain primer PCR, perkiraan panjang amplicon yang dihasilkan dalam proses amplifikasi adalah 514 bp untuk P1 dan 416 bp untuk P2, namun didapatkan ketidaksamaan panjang amplicon hasil amplifikasi (ukuran fragmen) dengan perkiraan. Hal tersebut diduga pada dasar dari desain primer yang digunakan yaitu urutan nukleotida pengkode gen BKT dari spesies *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorococcum* sp., *Scotiellopsis oocystiformis*, *Protosiphon botryoides* dan *Neochloris wimmeri*. Ukuran fragmen 514 bp untuk P1 dan 416 bp untuk P2 akan didapatkan dengan menggunakan pasangan primer P1 dan P2 pada hasil amplifikasi apabila yang digunakan sebagai cetakan DNA adalah DNA milik ketujuh spesies tersebut. Hal ini diduga urutan basa nukleotida gen BKT antar mikroorganisme berbeda-beda, dan sekuen nukleotida S1 dan S2 yang terletak diantara primer tidak sama dengan ketujuh spesies dasar tersebut, melainkan terdapat tambahan basa nukleotida sehingga menyebabkan panjang amplicon tidak berukuran 514 bp dan 416 bp.

Sekuens gen beta karoten ketolase yang telah diketahui berukuran antara 700-1900 bp pada mikroorganisme yang terdapat pada data GenBank dan ukuran fragmen 700-1000 bp terdapat pada bakteri dengan nomor aksesori AY166610.2 (*Brevundimonas aurantiaca*), EF031049.1 (*Brevundimonas bacteroides*), DQ400932.1 (*Sphingomonas melonis*) dan EF031051.1 (*Erythrobacter gaetbuli*). *Synechococcus* merupakan mikroorganisme yang termasuk ke dalam Cyanobacteria atau mikroalga hijau biru, dimana genus tersebut termasuk dalam domain bakteri (Herrero *et.al.*, 2001). Berdasarkan hal tersebut diduga S1 dan S2 yang memiliki pita tunggal DNA dengan ukuran fragmen 900 bp oleh P1 dan 700 bp oleh P2 memiliki sekuens gen BKT. Oleh karena itu, perlu dilakukan tahap sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida yang teramplifikasi.

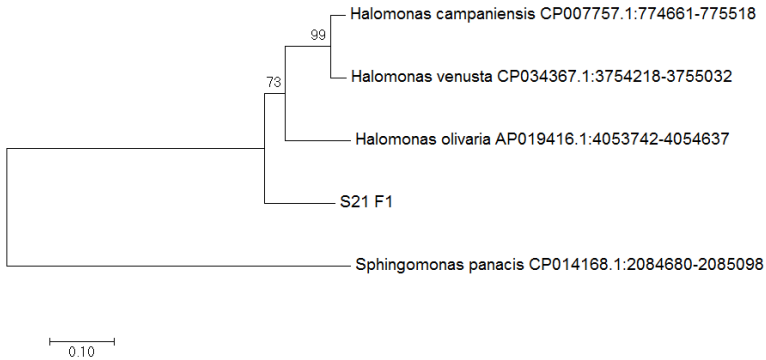
4.4.3 Hasil Sekuensing

Hasil amplifikasi DNA kemudian disekuensing dengan menggunakan jasa Genetika Sains Indonesia, Jakarta. Hasil yang didapatkan dari proses sekuensing untuk masing masing pasangan primer (*forward dan reverse*) tertera pada Lampiran 7 dengan jumlah basa nukleotida berkisar antara 968-992 bp untuk pasangan primer 1 (P1).

4.4.4 Kekerabatan Gen BKT

Data sekuensing selanjutnya dilakukan BLAST untuk mendapatkan spesies-spesies yang memiliki kesamaan urutan basa nukleotida yang ada pada GenBank dengan sekuens *Synechococcus*. Hasil sekuens dibuat dalam format FASTA untuk konstruksi pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak MEGA 7. Sekuens *Sphingomonas panacis* CP014168.1 digunakan sebagai outgroup, dan sekuens *Halomonas campaniensis* CP007757.1, *H. Venusta* CP034367 dan *H. Olivaria* AP019416 digunakan untuk memperjelas hubungan dengan isolat *Synechococcus* karena memiliki similaritas gen

yang cukup tinggi. Berikut adalah hasil visualisasi pohon filogenetik gen BKT.



Gambar 4.3 Pohon filogenetik analisis Neighbour Joining antara *Synechococcus* (S2 F1), *H. campaniensis* CP007757.1, *H. venusta* CP034367.1, *H. olivaria* AP019416 dan *Sphingomonas panacis* CP014168.1.

Pada gambar 4.4 ditunjukkan posisi *Synechococcus* dengan kerabatnya. Posisi *Synechococcus* dengan *Halomonas* terletak dalam satu kluster sehingga menunjukkan bahwa keempatnya berkerabat dekat. Akan tetapi posisi *Synechococcus* dengan *S. panacis* berada pada kluster yang berbeda sehingga diduga memiliki kekerabatan yang jauh. Pohon filogenetik pada gambar 4.4 mengindikasikan adanya kedekatan antara Isolat *Synechococcus* dengan genus *Halomonas*. Berdasarkan pohon filogeni diatas, isolat *Synechococcus* memiliki kesamaan gen dengan *Halomonas* dan *Sphingomonas*, dimana menurut database NCBI keduanya termasuk dalam domain bakteri. Bakteri *Halomonas* menurut Saiz *et.al.*, 2007, dapat memproduksi beta karoten melalui konstruksi gen, dan *Sphingomonas* sp. menurut Tao *et.al.* pada tahun 2006, memiliki sekuens nukleotida beta karotene ketolase (*crtW*).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Isolat yang didapatkan pada penelitian ini diduga termasuk dalam kelompok Sianobakteria genus *Synechococcus*. Isolat *Synechococcus* berpotensi sebagai penghasil antioksidan astaxanthin berdasarkan amplifikasi gen BKT. Kekerabatan gen BKT pada isolat *Synechococcus* yang didapatkan menunjukkan kedekatan dengan bakteri *Halomonas* dan *Sphingomonas*.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, disarankan

1. Pada tahap isolasi mikroalga, sebaiknya digunakan variasi media kultur dengan tujuan mendapatkan isolat-isolat mikroalga yang beragam.
2. Strain spesies yang mengandung gen BKT pada tahap penentuan dan perancangan primer lebih diperkaya.
3. Pasangan primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA lebih diperbanyak.
4. Pada penelitian selanjutnya, diperlukan perlakuan induksi ekspresi astaxanthin pada isolat yang didapatkan untuk mengetahui kandungan astaxanthin.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, E.V., Andreakis, N., Leston, A.L., Pearson, G.A. dan Serrao, E.A. 2006. Genomic DNA Isolation from Green and Brown Algae (Caulerpales and Fucales) for Microsatellite Library Construction. **J. Phycol.** Vol. 42. (741-745).
- Couso, I., Vila, M., Vigara, J., Cordero, B.F., Vargas, M.A., Rodriguez, H. dan Leon, R. 2012. Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway ini response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **European Journal of Phycology**. Vol. 47. No. 3. (223-232).
- Duong, V.T., Thomas, H.S.R., dan Schenk, P.M. 2015. Growth and Lipid Accumulation of Microalgae from Fluctuating Brackish and Sea Water Locations in South East Queenslad-Australia. **Front Plant Sci.** Vol. 6(359):8-15.
- Fretes, H.D., Susanto, A.B., Prasetyo, B. Dan Limantara, L. 2012. Karotenoid dari Makroalgae dan Mikroalgae: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. **J. Teknol. dan Industri Pangan**. Vol. 23. No. 2. (221-228).
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. dan Malcata, F.X. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Journal Marine Drugs**. Vol. 9. (625-644).
- Hadiyanto dan Azim, M. 2012. **Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan**. Semarang: UPT Undip Press.
- Harmoko, Lokaria, E. dan Misra, S. Eksplorasi Mikroalga di Air Terjun Watervang Kota Lubuklinggau. 2017. **Jurnal Bioedukasi**. Vol. 8. No. 1. (75-82).

Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E. 2001. Minireview: Nitrogen Control in Cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**. Vol. 183. No. 2. (411-425).

Hussein, G., Nakamura, M., Zhao, Q., Iguchi, T., Goto, H., Sankawa, U. dan Watanabe, H. 2005. Antihypertensive and Neuroprotective Effects of Astaxanthin in Experimental Animals. **Biol Pharm Bull**. Vol. 28. No. 1. (47-52).

Irmawati. 2016. **Genetika Populasi Ikan**. Yogyakarta: Penerbit ANDI

Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H., Matsumoto, A., Miki, W., Kamiyama, M., Itakura, H., Yamamoto, S. dan Kondo, K. 2000. Inhibition of Low-density Lipoprotein Oxidation by Astaxanthin. **Journal Atheroscler Thromb**. Vol. 7. No. 4. (216-222).

Iqbal, M., Buwono, I.D., Kurniawati, N. 2016. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). **Jurnal perikanan Kelautan**. Vol. VII. No. 1. (54-65)

Jati, F., Hutabarat, J. dan Herawati, V.E. 2012. Pengaruh Penggunaan Dua Jenis Media Kultur Teknis yang Berbeda terhadap Pola Pertumbuhan, Kandungan Protein dan Asam Lemak Omega 3 EPA. **Journal of Aquaculture Management and Technology**. Vol. 1. No. 1. (221-235).

Joesidawati, M.I. 2016. Klasifikasi Pantai di Pesisir Tuban Jawa Timur. **Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan VI**. Universitas Brawijaya

Kim, S.K. 2015. **Handbook of Marine Microalgae**. USA: Elsevier.

Kim, Y., Jeon, J., Kwak, M.S., Kim, G.H., Koh, I., Rho, M. 2018. Photosynthetic functions of *Synechococcus* in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. **Journal PloS ONE**. Vol. 13. No. 1. (1-14).

Kurniawan, M.H., Sriati, Agung, M.U.K., Mulyani, Y. 2017. Pemanfaatan *Skeletonema* sp. dalam Mereduksi Limbah Minyak Solar di Perairan. **Jurnal Perikanan dan Kelautan** Vol. VIII. No. 2. (68-75)

Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S., dan Nam, P. K. 2014. Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. **Journal of natural science, biology, and medicine**. Vol. 5(2):333-9.

Levine, I.A. dan Fleurence, J. 2018. **Microalgae in Health and Disease Prevention**. United States: Elsevier.

Ley, B.M. 2001. **Bilberry and Lutein: The Vision Enhancers**. USA: BL Publications.

Mahmudah, N.H., Margono, Pranolo, S.H., Dyartanti, E.R., Handayani, F. 2015. Profil Fermentasi pada Produksi Minyak Mikroalga Menggunakan *Nannochloropsis oculata* dalam Medium BG-11. **Jurnal Ekuilibrium**. Vol. 14. No. 2. (63-67).

Maitriani, L.K.B., Wirajana, I.N. dan Yowani, S.C. 2015. Desain Primer untuk Amplifikasi Fragmen Gen *inhA* Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction. **Indonesian E-Journal of Applied Chemistry**. Vol. 3. No. 2. (89-96).

Munir, N., Sharif, N., Na, S., dan Manzoor, F. 2013. Algae: A Potent Antioxidant Source. **Sky Journal of Microbiology Research**. Vol. 1(3):22-31.

Mustafa, H., Rachmawati, I. dan Udin, Y. 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk. **Jurnal Vektor Penyakit**. Vol. 10. No. 1. (7-10).

Nugroho, E.D. dan Rahayu, D.A. 2017. **Pengantar Bioteknologi (Teori dan Aplikasi)**. Dee Publisher: Yogyakarta

Oktarina, E. 2017. Alga: Potensinya pada Kosmetik dan Biomekanismenya. **Majalah Teknologi Agro Industri**. Vol. 9. No. 10. (1-10).

Pahlevi, M.R. 2016. Desain Primer untuk Identifikasi Gen *GmDREB2* pada Kedelai. **Jurnal Agrinis**. Vol. 1. No. 1. (1-8).

Perumal, P., Prasath, B.B., Santhanam, P., Ananth, S., Devi, A.S., dan Kumar, S.D. 2012. **Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture, Chapter: Isolation and Culture of Microalgae**. (166-181)

Pierce, E.C., LaFayette, P.R., Ortega, M.A., Joyce, B.L., Kopsell, D.A., dan Parrot, W.A. 2015. Ketocarotenoid Production in Soybean Seeds through Metabolic Engineering. **Journal Plos One**. Vol. 10(9): 1-15.

Popa, V and Volf, I. 2018. **Biomass as renewable raw material to obtain bioproducts of high-tech value**. Elsevier: United Kingdom.

Prayoga, W. dan Wardani, A.K. 2015. *Polymerase Chain Reaction* untuk Deteksi Salmonella sp. : Kajian Pustaka. **Jurnal Pangan dan Agroindustri**. Vol. 3. No. 2. (483-488).

Rau, C.H., Yudistira, A., Simbala, H.E.I. 2018. Isolasi, Identifikasi secara Molekuler menggunakan Gen 16S rRNA, dan Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Simbion Endofit yang Diisolasi dari Alga *Halimeda opuntia*. **Jurnal Pharmacon**. Vol. 7. No.2. (53-61).

Reny, P. Dan Limantara, L. 2008. Potensi Astaxantin sebagai Senyawa Antikanker. **Indonesian Journal of Cancer**. Vol. 4. (149-154).

Safitri, R., Muchlisin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S., Ethica, S.N. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Anzim Protease *Bacillus thuringiensis* IRODI pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam. **Seminar Nasional Edusaintek**. (62-69).

Saputro, T.B. 2012. Multiplikasi Tunas pada Mikropropagasi Tanaman Transgenik Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.). Blume Pembawa 35S: KNATI pada Media Tanpa Fitohormon. **Tesis**. Yogyakarta: Program Studi Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada.

Sarwa, P. Dan Verma, S.K. 2017. Identification and Characterization of Green Microalgae, *Scenedesmus* sp. MCC26 and *Acutodesmus obliquus* MCC33 Isolated from Industrial Polluted Site Using Morphological and Molecular Markers. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**. Vol. 5. No. 4. (415-422).

Saiz, M.R., Porro, C.S., Fuente, J.L.D.L., Mellado, E., Barredo, J.L. 2007. Engineering the Halophilic bacterium *Halomonas elongata* to produce β -carotene. **Appl Microbiol Biotechnol**. Vol.77. (637-643).

Siregar, L.L., Hutabarat, S., Muskananfolo, M.R. 2014. Distribusi Fitoplankton Berdasarkan Waktu dan Kedalaman yang Berbeda di Perairan Pulau Menjangan Kecil Karimunjawa. **Diponegoro Journal of Maquares Management of Aquatic Resources**. Vol. 3. No. 4. (9-14).

Sun, Z., Li, T., Zhou, Z., dan Jiang, Y. 2016. Microalgae as a source of lutein: chemistry, biosynthesis, and carotenogenesis. **Journal Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. Vol. 153:37-58.

Tangke, U. 2010. Ekosistem Padang Lamun. **Jurnal Ilmiah Agribisnis dan Perikanan**. Vol. 3. No. 1. (9-29).

Tasma, I.M. 2015. Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom untuk mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. **J. Litbang Pertanian**. Vol. 34. No. 4. (159-168).

Tao, L., Wilczek, J., Odom, M., Cheng, Q. 2006. Engineering a beta karotene ketolase for astaxanthin production. **Metabolic Engineering**. Vol. 8 (523-531).

Thao, T.Y., Linh, D.T., Si, V.C., Carter, T.W., dan Hill, R.T. 2017. Isolation and Selection of Microalgal Strains from Natural Water Sources in Viet Nam with Potential for Edible Oil Production. **Journal Marine Drugs**. Vol. 15(194):1-14.

Torgal, F.P., Rasmussen, E., Granqvist, C.G., Ivanov, V., Kaklauskas, A. dan Makonin, S. 2016. **Start-up Creation: The Smart Eco-Efficient Built Environment**. Woodhead Publishing: United Kingdom

Varela, J.C., Pereira, H., Vila, M. dan Leon, R. 2015. Production of Carotenoids by Microalgae: Achievements and Challenges. **Journal Photosynthesis Research**. Vol. 125. No.3. (423-436)

Vijai, K., Gupta, Treichel, H., Shapaval, V., Oliveira, L.A., dan Tuohy, M. 2018. **Microbial Functional Foods and Nutraceuticals**. United Kingdom: John Wiley & Sons.

Wilczewska, S.S., Cieszyńska, A., Maculewicz, J., Latala, A. 2018. Ecophysiological characteristics of red, green and brown strains of the Baltic picocyanobacterium *Synechococcus* sp. **Biogeosciences**. Vol. 15. (6257-6276).

Wusqy, N.K. dan Karwur, F.F. 2010. Astaksantin dari Bakteri Laut: Biosintesis, Manfaat, Dan Potensi Produksi Massal. **Squalen**. Vol. 5. No. 1. (33-38).

Yanuhar, U. 2016. **Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata***. Malang: UB Media

Yulianda, F. dan Zamani, N.V. 2014. **Biologi Kelautan**. Penerbit Universitas Terbuka: Tangerang.

Yuliani, Y., Yuniaty, A., Susanto, A.H. 2017. Variasi Sekuens DNA yang Diamplifikasi Menggunakan Primer ATPB-RBCL pada Beberapa Kultivar Kacang Tanah. **Scripta Biologica**. Vol. 4. No. 1. (11-14).

Yuniarti, H., Cholis, B. Dan Rinanti, A. 2016. Diagram Filogenik Hasil Sekuens Basa DNA menggunakan Program Mega-7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). **Jurnal Penelitian dan Karya Ilmiah**. Vol. 1. No. 2. (109-117).

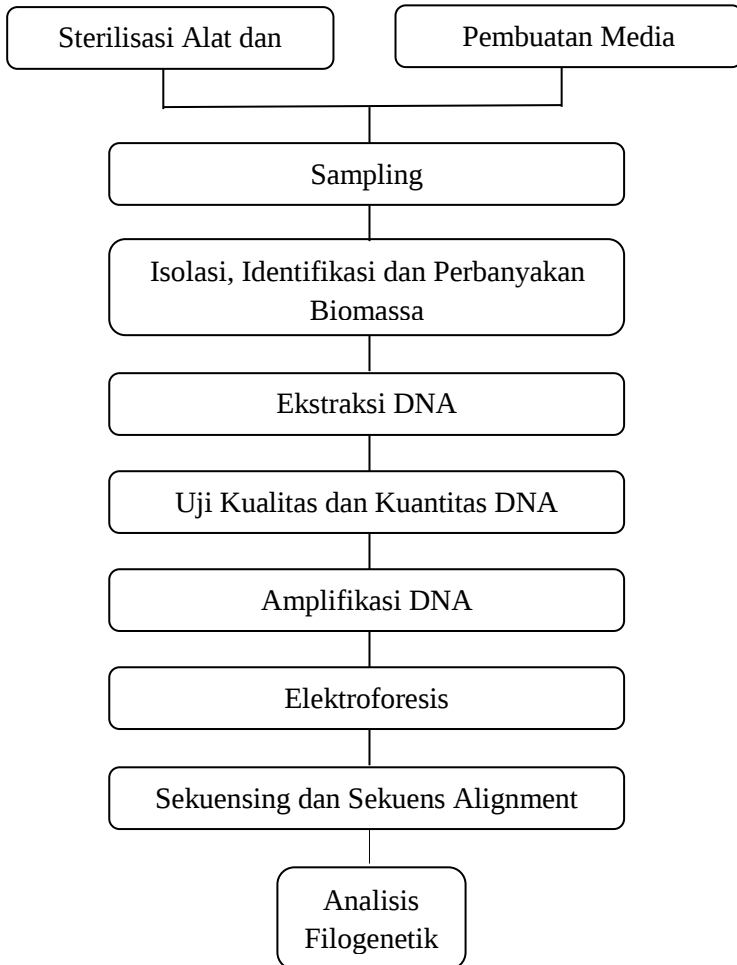
Yuwono, T. 2005. **Biologi Molekular**. Penerbit Erlangga: Jakarta

Zhu, C., Naqvi, S., Capell, T., dan Christou, P. 2008. Review: Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. **Journal Archives of Biochemmistry and Biophysics**. (182-190).

Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandman, G., Christou, P. Dan Capell, T. 2008. Combinational genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. **PNAS**. Vol. 105. No. 47. (18232-18237).

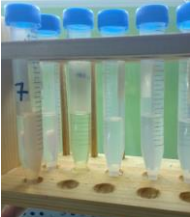
LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja



Lampiran 2 Isolasi, identifikasi dan perbanyakan biomassa

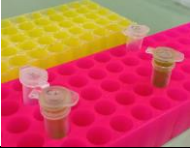
No.	Foto	Keterangan
1		Dilakukan serial dilusi/pengenceran sampel hingga 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4}
2		Dilakukan metode <i>pour plate</i> dengan meneteskan hasil serial dilusi masing-masing ke media padat
3		Diinkubasi 2-4 minggu
4		Dilakukan purifikasi hingga monokultur dengan metode <i>streak plate</i>
5		Diinkubasi 2-4 minggu

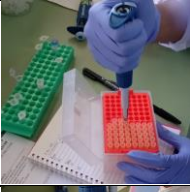
6		Dikultivasi dalam media cair
7		Diamati dibawah mikroskop untuk identifikasi

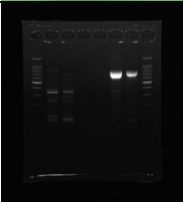
Lampiran 3 Ekstraksi DNA, Amplifikasi DNA dan Elektroforesis

No.	Foto	Keterangan
1		Sampel disiapkan dan disentrifuge dalam microtube 1.5 ml
2		Ditambahkan 400 μ L GP1 <i>buffer</i>
3		Dihomogenkan dengan vortex

4		Diinkubasi dengan thermostat 60°C selama 10 menit
5		Ditambahkan 100 μ L GP2 <i>buffer</i> dan dihomogenkan dengan vortex
6		Diinkubasi -20°C selama 3 menit
7		Campuran ditransfer ke filter column + collection tube dan disentrifuge 1 menit 1000 rpm
8		Supernatan ditransfer ke microtube steril baru
9		Ditambahkan 750 μ L GP3 <i>buffer</i>

10		Campuran ditransfer ke GD column + collection tube dan disentrifuge 15000 rpm 2 menit
11		Dimasukkan GD column ke collection tube baru dan disentrifuge kembali
12		Ditambahkan 400 μ L W1 <i>buffer</i> dan disentrifuge 15000 rpm 1 menit
13		Ditambahkan 600 μ L wash <i>buffer</i> dan disentrifuge 15000 rpm 1 menit
14		Disentrifuge kembali dengan collection tube baru
15		Ditambahkan elution <i>buffer</i> 50 μ L dan didiamkan 5 menit

16		Disentifuge 15000 rpm 1 menit
17		Diukur konsentrasi dan kemurnian DNA
18		Primer forward dan reverse diencerkan menjadi 10 μ M dan 1 μ M dari 100 μ M
19		DNA stock diencerkan menjadi 20 ng dari hasil pengukuran konsentrasi DNA
20		Dicampurkan komponen reagen PCR dengan total volume 25 μ L
21		<i>Running</i> PCR

22		Disiapkan gel dan dimasukkan di ruang elektroforesis hingga terendam dengan TBE
23		Dimasukkan sampel dan DNA ladder ke dalam sumuran
24		<i>Running</i> Elektroforesis
25		Gel diletakkan dalam UV-transilluminator

Lampiran 4. Perhitungan pengenceran primer dan pengenceran DNA

Pengenceran primer dari 100 μM menjadi 10 μM

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$100.V1 = 10.100$$

$$V1 = 10 \mu\text{L}$$

$$*TEb = 90 \mu\text{L}$$

V1: volume primer yang diambil dari konsentrasi 100 μM

TEb: TE buffer sebagai pelarut

Pengenceran primer dari 10 μM menjadi 1 μM untuk volume 25 μL Reaksi PCR

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$10.V1 = 1.25$$

$$V1 = 2,5 \mu\text{L}$$

$$*TEb = 22,5 \mu\text{L}$$

V1: volume primer yang diambil dari konsentrasi 10 μM
TEb: TE buffer sebagai pelarut

Pengenceran DNA stok menjadi 20 ng/ μL dari sampel

S1: 31,38 ng/ μL

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$31,38.V1 = 20.50$$

$$V1 = 31,86 \mu\text{L}$$

$$*dH_2O = 18,14 \mu\text{L}$$

S2: 21,18 ng μL

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$21,18.V1 = 20.50$$

$$V1 = 47,21 \mu\text{L}$$

$$*dH_2O = 2,79 \mu\text{L}$$

V1: volume DNA stok yang diambil dari masing-masing konsentrasi awal S1 dan S2

dH₂O: dH₂O sebagai pelarut

Lampiran 6. Primer Reverse 1 dan Reverse 2

[illegible]

Lampiran 7. Hasil Sekuensing

>S21_F1 (968 bp)

TNCGGTGGGCCACTCCAGGAATATGGAGGAGTTAGCCGAGCATGTTTCGCCAAGGCTGGCC
GATGCCCTGGGGCTTTTTGGTCGCGGGGCCACGGTATTTACGCCGTGGGCGACAGCATTGCC
AGCTGCCGCGGCCACCTGGAAGCAATCGAATTCTTACTTGCCTGTGTACTGGAAGAGAGCC
GGTGGTCCCAATGAGTAACCCAACCGTTCGCGCCATCGTGACCGATATCGAAGGTACAC
CACCGATATCCACTTCGTTACAAAAGTGCTGTTCCCTTATGCCTACGCCAAGCTGCCTGACT
TTCTGCGTGAGAATGCAGAAGCACCGGCGGTGGCCGAGCAGATTGACGCCGTGCGCCATG
AGATGCAGGACGCCGACGCCCACTGGAAGCGGTGATTGCCACCCTGCTGCACTGGATCG
ACACCGACCAGAAAGTGACGCCACTCAAAGCCCTGCAGGGCATGGTGTGGGCCGACGGCT
ACCAGCGCGCGGACTTCACCGGCCATTTATACGCGGATGTTGCTCCGGTGTACGCCAGTG
GCAGGCCGAGGGCTGGCGCTGTATGTGTACTCGTCAGGCTCGGTGCAGGCGCAGAAGCT
GCTGTTTGGCTACAGCGACGAGGGTGATTTGACCCGCTGTTCAGCGGCTACTTCGACACG
CACATTGGCCATAAGCGCGAGGCCATGGCCTATCAGCGCATTATCGAGGCGCTCGATCTAC
CTGCAGAGTCGATACTGTTCCCTGTCTAGATGTGGTCGAAGAGCTGGATGCGGCCAAGCAGG
CGGGTATGCAAACCTGCAGCTCGTGCGGAAGGTACCCAGGCGGGCACTGTACACGCCCT
GTGTGCAAAGCTTTGCTGACATTGCCCTTTAACGGCTATGTTACCCCTTACCTCTTAGGAG
CGTCTTTATGTCCCAACTGAAAGTCTTTGCCGATCAACATCCTAATGATGCGCTGCTGA

>S11_F1 (992 bp)

GGGCATNCGGTGGGCCACTCCAGGATATGGAGGAGTTAGCCGAGCATGTTTCGCCAAGGCT
GGCCGATGCCCTGGGGCTTTTTGGTCGCGGGGCCACGGTATTTACGCCGTGGGCGACAGCAT
TGCCAGCTGCCGCGGCCACCTGGAAGCAATCGAATTCTTACTTGCCTGTGTACTGGAAGAG
AGCCGGTGGTCCCAATGAGTAACCCAACCGTTCGCGCCATCGTGACCGATATCGAAGGTA
CCACCACCGATATCCACTTCGTTACAAAAGTGCTGTTCCCTTATGCCTACGCCAAGCTGCCT
GACTTTCTGCGTGAGAAATGTCAGAAGCACCGGCGGTGGCCGAGCAGATTGACGCCGTGCGC
CATGAGATGCAGGACGCCGACGCCCACTGGAAGCGGTGATTGCCACCCTGCTGCACTGG
ATCGACACCGACCAGAAAGTGACGCCACTCAAAGCCCTGCAGGGCATGGTGTGGGCCGAC
GGCTACCCAGCGCGGCGACTTCACCGGCCATTTATACGCGGATGTTGCTCCGGTGTACGCC
AGTGGCAGGCCGAGGCGTGCGCTGTATGTGTACTCGTCAGGCTCGGTGCAGGCGCAGA
AGCTGCTGTTTGGCTACAGCGACGAGGGTGATTTGACCCCGCTGTTACGCGGCTACTTCGA
CACGCACATTGGCCATAAGCGCGAGGCCATGGCCTATCAGCGCATTATCGAGGCGCTCGA
TCTACCTGCAGAGTCGATACTGTTCCCTGTCTAGATGTGGTCGAAGAGCTGGATGCGGCCAAG
CAGGCGGGTATGCAAACCTGCAGCTCGTGCGGAAGGTACCCAGGCGGGCACTGTACAC
GCCTGTGTGCAAAGCTTTGCTGACATTGCCCTTTAACGGCTATGTTACCCCTTACCTCTTA
GGAGCGTCTTTATGTCCCAACTGAAAGTCTTTGCCGATCAACATCCTAATGATGCGCTGCT
GGACCACNAACAAGGTAAANN

>S21_R1 (986 bp)

ATNTGATCGGCAAGACTTTCAGTTGGGGACATAAAGACGCTCCTAAGAGGTAAGGGGTGA
ACATAGCCGTTAAAGGCAATGTCAGCAAAGCTTTGCACACAGGCGTGTACAGTGCCCCG
CTGGGTACCTTCGCGCACGAGCTGCAGGGTTTGCATACCCGCTGCTTGGCCGATCCAGC
TCTTCGACCACATCTGACAGGAACAGTATCGACTCTGCAGGTAGATCGAGCGCCTCGATAA
TGCGCTGATAGCCATGGCCTCGCGCTTATGGCCAAATGTGCGTGTGGAAGTAGCCGCTGAA
CAGCGGGGTCAAATACCCCTCGTCGCTGTAGCCAAACAGCAGCTTCTGCGCTGCACCGA

GCCTGACGAGTACACATACAGCGCCACGCCTGCGGCCTGCCACTGGCGTAGCACCGGAGC
AACATCCGCGTATAAATGGCCGGTGAAGTCGCCGCGCTGGTAGCCGTCGGCCACACCAT
GCCCTGCAGGGCTTTGAGTGGCGTCACCTTCTGGTCGGTGTGATCCAGTGACAGAGGGTG
GCAATCACCGCTTCCAGTGTGGCGTCGGCGTCCTGCATCTCATGGCGCACGGCGTCAATCT
GCTCGGCCACCGCCGGTGCTTCTGCATTCTCACGCAGAAAGTCAGGCAGCTTGGCGTAGGC
ATAAGGGAACAGCACTTTGTGAACGAAGTGGATATCGGTGGTGGTACCTTCGATATCGGT
CACGATGGCGCAACGGTTGGGTTACTCATTGGGACCACCGGCTCTCTTCCAGTACACAGG
CAAGTAAGAATTGATTGCTTCCAGGTGGCGCGGCGCAGCTGGCAATGCTGTGCGCCACGG
CGTAAATACCGTGGCCCGCGACCAAAAAGCCCCAGGGCATCGGCCAGCCTTGGCGAACAT
GCTCGGCTAACTCCTCCATATCCTGGGAGTTGGGCACCACCGGCAAAAGAATCGTCGCATCG
CGTGGGTGNNNGGGAAG

>S11_R1 (985 bp)

NNAGTGACGGCAAGACTTTCAGTTGGGACATAAAGACGCTCCTAAGAGGTAAGGGGTGAA
CATAGCCGTTAAAGGGCAATGTGCAGCAAAGCTTTCGACACAGGCGTGTACAGTGCCCGCC
TGGGTACCTTCGCGCACGAGCTGCAGGGTTTGCATACCCGCTGCTTGGCCGCATCCAGCT
CTTCGACCACATCTGACAGGAACAGTATCGACTCTGCAGGTAGATCGAGCGCTCGATAAT
GCGCTGATAGGCCATGGCCTCGCGCTTATGGCCAATGTGCGTGTGGAAGTAGCCGCTGAAC
AGCGGGGTCAAATCACCCCTCGTCGCTGTAGCCAAACAGCAGCTTCTGCGCCTGCACCGAG
CCTGACGAGTACACATACAGCGCCACGCCTGCGGCCTGCCACTGGCGTAGCACCGGAGCA
ACATCCGCGTATAAATGGCCGGTGAAGTCGCCGCGCTGGTAGCCGTGGGCCACACCATG
CCCTGCAGGGCTTTGAGTGGCGTCACCTTCTGGTCGGTGTGATCCAGTGACAGAGGGTGG
CAATCACCGCTTCCAGTGTGGCGTCGGCGTCCTGCATCTCATGGCGCACGGCGTCAATCTG
CTCGGCCACCGCCGGTGCTTCTGCATTCTCACGCAGAAAGTCAGGCAGCTTGGCGTAGGCA
TAAGGGAACAGCACTTTGTGAACGAAGTGGATATCGGTGGTGGTACCTTCGATATCGGTC
ACGATGGCGCGAACGGTTGGGTTACTCATTGGGACCACCGGCTCTCTTCCAGTACACAGGC
AAGTAAGAATTCGATTGCTTCCAGGTGGCGGCGGCAGCTGGCAATGCTGTGCGCCACGGC
GTAATACCGTGGCCCGCGACCAAAAAGCCCCAGGGCATCGGCCAGCCTTGGCGAACATG
CTCGGCTAACTCCTCCATATCCTGGGAGTTGGGCACCACCGGCAAAAGAATCGTCGCACGC
GNGGGTGNNNGGGAAG

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Banyuwangi pada tanggal 3 Mei 1997 sebagai anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Kasiyanto dan Ibu Linda. Penulis menyelesaikan pendidikan dasar pada tahun 2009 di SD Katolik Santa Maria Banyuwangi. Kemudian melanjutkan pendidikan menengah di SMP Negeri 1 Banyuwangi dan lulus tahun 2012. Penulis menamatkan pendidikan menengah atas di SMA Katolik Santo Albertus Malang pada tahun 2015. Penulis masuk ke Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Departemen Biologi, Fakultas Sains melalui jalur SNMPTN pada tahun 2015. Selama masa perkuliahan, penulis aktif menjadi staff departemen Minat Bakat Himpunan Mahasiswa Biologi ITS pada kepengurusan tahun 2016/2017 dan tahun 2017/2018 di Kesejahteraan Mahasiswa sebagai staff ahli.