

**EKSPRESI GEN ASTAXANTHIN PADA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
DENGAN INDUKSI NaCl DAN INTENSITAS CAHAYA TINGGI**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Novia Purnamasari

11171064



Universitas Bhakti Kencana

Fakultas Farmasi

Program Strata I Farmasi

Bandung

2021

ABSTRAK

EKSPRESI GEN ASTAXANTHIN PADA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* DENGAN INDUKSI NaCl DAN INTENSITAS CAHAYA TINGGI

Oleh :

NOVIA PURNAMASARI

11171064

H. pluvialis merupakan mikroalga uniseluler yang mampu menghasilkan astaxanthin hingga 5% berat kering dalam kondisi stress. Astaxanthin mempunyai aktivitas utama sebagai antioksidan sehingga banyak dimanfaatkan dibidang kesehatan. Maka dari itu, diperlukan upaya untuk meningkatkan kadar astaxanthin pada *H. pluvialis*. Beberapa upaya yang dapat dilakukan yaitu penambahan induksi kimia dan fisika serta kombinasi keduanya. Ketika produktivitas astaxanthin meningkat berpengaruh pada gen-gen yang terlibat dalam biosintesis astaxanthin. Peningkatan kadar tersebut berkaitan dengan tujuan penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh ekspresi gen (*crtR-b*) β -karoten hidroksilase terhadap produksi astaxanthin pada mikroalga *H. pluvialis* yang diinduksi dengan penambahan NaCl dan intensitas cahaya tinggi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR) gel base*. *H. pluvialis* dikultivasi menggunakan media Guillard selama 7 hari. Pada hari ke-8, kultur diberikan perlakuan induksi NaCl 0,8%, dipaparkan cahaya 6800 lux, kombinasi antara keduanya, serta tanpa diberikan perlakuan apapun sebagai kontrol negatif. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi menggunakan DMSO (Dimetil Sulfoksida) yang kemudian dilakukan pengukuran kadar astaxanthin menggunakan spektrofotometer pada λ 490 nm. Hasil pengukuran kadar astaxanthin menunjukkan kadar tertinggi dihasilkan oleh kultur dengan induksi NaCl 0,8% sebanyak 3,111 mg/L. Metode yang digunakan untuk amplifikasi gen yaitu PCR *gel-base* dengan hasil nilai AUC tertinggi 22711,72 dihasilkan oleh kultur dengan induksi NaCl 0,8%.

Kata kunci : Astaxanthin, gen *crtR-b*, *H. pluvialis*, induksi kimia dan fisika, PCR *gel Base*

ABSTRACT

ASTAXANTHIN GEN EXPRESSION IN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS WITH NaCl INDUCTION AND HIGH LIGHT INTENSITY

By :

NOVIA PURNAMASARI

11171064

H. pluvialis is a unicellular microalgae capable of producing astaxanthin up to 5% dry weight under stress conditions. Astaxanthin has the main activity as an antioxidant so that it is widely used in various fields of life, especially health. Therefore, efforts are needed to increase astaxanthin levels in *H. pluvialis*. Some efforts that can be done are the addition of chemical and physical induction and a combination of both. As the productivity of astaxanthin increases, it affects the genes involved in astaxanthin biosynthesis. These levels are related to the purpose of this increase research, namely to determine the effect of gene expression (*crtR-b*) β -carotene hydroxylase on astaxanthin production in *H. pluvialis* microalgae induced by the addition of NaCl and high light intensity using the basic method of gel Polymerase Chain Reaction (PCR). *H. pluvialis* was cultivated using Guillard media for 7 days. On day 8, the culture was given 0.8% NaCl induction treatment, exposed to 6800 lux light, a combination of the two, and without any treatment as a negative control. The extraction method used is maceration using DMSO (Dimethyl Sulfoxide) which is then measured astaxanthin levels using a spectrophotometer at λ 490 nm. The results of the measurement of astaxanthin levels showed the highest levels produced by culture with 0.8% NaCl induction as much as 3,111 mg/L. The method used for gene amplification was gel-base PCR with the highest AUC value of 22711.72 produced by culture with 0.8% NaCl induction.

Keywords : *Asataxnthin*, *crtR-b* gene, *H. pluvialis*, chemical and physical induction, PCR gel base

LEMBAR PENGESAHAN
EKSPRESI GEN ASTAXANTHIN PADA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* DENGAN
INDUKSI NaCl DAN INTENSITAS CAHAYA TINGGI

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

Novia Purnamasari

11171064

Bandung, 21 Juni 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Soni Muhsinin, M.Si)

NIDN. 0402068407

Pembimbing Serta,



(Apt., Lia Marliani, M.Si)

NIDN. 0007128001

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah robbil ‘alamiin, allahumma shalli ‘alaa Sayyidinaa Muhammad. Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karuniaNya kepada penulis. Sholawat dan salam senantiasa tercurah kepada nabi akhir zaman Rasulullah SAW yang telah ngantarkan kita semua dari zaman kegelapan menuju zaman terang benderang ini. Alhamdulillah dengan pertolongan Allah SWT penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir dengan judul “**EKSPRESI GEN ASTAXANTHIN PADA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* DENGAN INDUKSI NaCl DAN INTENSITAS CAHAYA TINGGI**” sebagai salah syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) pada Program Studi Farmasi.

Dalam penyusunan skripsi ini tentunya banyak rintangan serta tantangan yang penulis hadapi, namun berkat dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak baik secara moral maupun spiritual sehingga penulis dapat menghadapi rintangan tersebut. Oleh karena itu, ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Orang tua serta keluarga besar yang selalu memberikan semangat dikala penat, memberikan petunjuk serta saran agar penulis tetap melanjutkan penulisannya, tak lupa juga nasihat terbaik yang sangat berguna bagi penulis dalam menempuh penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes., Apt sebagai Rektor Universitas Bhakti Kencana
3. Bapak Soni Muhsinin, M.Si sebagai pembimbing utama, ibu Apt., Lia Marliani, M.Si sebagai pembimbing serta yang telah memberikan banyak ilmu, arahan, masukan serta saran yang membangun dalam penulisan ini
4. Sahabat-sahabat TKG, terimakasih selalu memberikan pelajaran dalam hdup, memberikan asupan semangat dengan semua agenda agendanya dan membrikan bantuan dikala penulis membutuhkan bantuan.
5. Sahabat-sahabat SNSD, terimakasih telah menemani penulis dalam penyusunan skripsi ini.
6. Terimakasih Thoriq Nurdin, telah menjadi tempat keluh kesah saat penulis mengalami kesulat, mejadi tempat diskusi yang baik sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Semua teman-teman Kurva 2 dan seluruh angkatan 2017
8. Seluruh pihak terkait yang tidak bisa disebutkan satu persatu, jazaakumullah khayran katsiiran.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna dikarenakan terbatasnya pengalaman dan pengetahuan yang dimiliki penulis. Maka dari itu, semoga saudara/i pembaca berkenan memberikan koreksi serta saran guna memperbaiki kekurangan yang terdapat dalam laporan tugas akhir ini. Akhir kata, penulis berharap segala ilmu dari Allah swt yang tertuang dalam laporan tugas akhir ini dapat bermanfaat dan semoga Allah swt memberi perlindungan bagi kita semua.

Bandung, 13 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Rumusan masalah.....	2
I.3. Batasan masalah	2
I.4. Tujuan dan manfaat penelitian	2
I.5. Hipotesis penelitian	3
I.6. Tempat dan waktu penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	4
II.1.1. Taksonomi.....	4
II.1.2. Morfologi dan siklus hidup	4
II.2. Astaxanthin.....	5
II.2.1. Biosintesis astaxanthin.....	6
II.2.2. Organisme penghasil astaxanthin	8
II.2.3. Manfaat astaxanthin	9
II.3. Kultur mikroalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	11
II.3.1. Sistem kultur	11
II.3.2. Faktor yang mempengaruhi akumulasi astaxanthin.....	11

II.4.	Ekspresi gen	12
II.5.	Polymerase chain reaction (PCR)	12
II.6.	Elektroforesis	15
II.7.	Image-J	15
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN		17
III.1.	Lokasi dan waktu penelitian	17
III.2.	Subjek penelitian	17
III.3.	Metode penelitian	17
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN		19
IV.1.	Alat	19
IV.2.	Bahan	19
IV.3.	Prosedur penelitian	19
IV.3.1.	Kultivasi mikroalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	19
IV.3.2.	Induksi stres	20
IV.3.3.	Analisis spektrofotometri pendekatan kadar astaxanthin	20
IV.3.4.	Evaluasi Primer	20
IV.3.5.	Isolasi RNA	21
IV.3.6.	Amplifikasi gen <i>crtR-B</i>	21
IV.3.7.	Karakteristik DNA menggunakan elektroforesis	23
IV.3.8.	Analisis semi kuantitatif DNA menggunakan Image-J	24
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN		25
V.1.	Kultivasi Mikroalga <i>H. pluvialis</i>	25
V.2.	Induksi NaCl dan intensitas cahaya tinggi	26
V.3.	Kurva pertumbuhan <i>Haematococcus pluvialis</i>	27
V.4.	Ekstraksi	28
V.5.	Analisis Spektrofotometri Pendekatan Kadar Astaxanthin	29
V.6.	Amplifikasi gen <i>crtR-B</i> pada <i>H. pluvialis</i> menggunakan PCR <i>gel base</i>	32

V.6.1 Evaluasi primer crtR-B	32
V.6.2 Isolasi RNA	32
V.6.3 Amplifikasi PCR.....	34
V.7. Karakterisasi amplicon menggunakan elektroforesis gel.....	35
V.8. Analisis semi kuantitatif DNA menggunakan Image-J	36
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	38
VI.1. Kesimpulan	38
VI.2. Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel II. 1 Kandungan biokimia yang terdapat dalam <i>H. pluvialis</i>	5
Tabel II. 2 Organisme penghasil astaxanthin	8
Tabel IV. 1 Perlakuan setiap tabung	20
Tabel IV. 2 Komponen I <i>Reverse Transcription</i>	22
Tabel IV. 3 Komponen II <i>Reverse Transcription</i>	22
Tabel IV. 4 Komponen PCR	23
Tabel V. 1 Panjang bp setiap pita	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar II. 1 Sel mikroskopis <i>H. pluvialis</i> dalam siklus hidupnya	5
Gambar II. 2 Struktur Astaxanthin.....	6
Gambar II. 3 Jalur biosintesis astaxanthin pada <i>H. pluvialis</i>	7
Gambar II. 4 Proses PCR	12
Gambar II. 5 Skema ilustrasi dari temperatur profile PCR.....	12
Gambar II. 6 Tahap denaturasi.....	13
Gambar II. 7 Tahap annealing	13
Gambar II. 8 Tahap extension.....	14
Gambar IV. 1 Siklus PCR.....	23
Gambar V. 1 Visualisasi kultur mikroalga <i>H. pluvialis</i>	26
Gambar V. 2 Visualisasi kultur setelah induksi.....	27
Gambar V. 3 Visualisasi sel <i>H. pluvialis</i> dibawah mikroskop cahaya	27
Gambar V. 4 Grafik kurva pertumbuhan	28
Gambar V. 5 Proses ekstraksi klorofil	29
Gambar V. 6 Kadar astaxanthin pada hari ke 10, 11, dan 12	30
Gambar V. 7 Hasil primer BLAST primer <i>forward</i>	32
Gambar V. 8 Hasil primer BLAST primer <i>reverse</i>	32
Gambar V. 9 Hasil isolasi mikroalga <i>H. pluvialis</i>	34
Gambar V. 10 Hasil elektroforesis cDNA	34
Gambar V. 11 Visualisasi hasil amplifikasi.....	35
Gambar V. 12 Elektroforegram ampikon gen crtR-b	36
Gambar V. 13 Nilai AUC hasil elektroforegram	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Ilustrasi perhitungan jumlah sel menggunakan <i>haemocytometer</i>	42
Lampiran 2 Data kurva pertumbuhan	43
Lampiran 3 Data kadar estimasi astaxanthin menggunakan spektrofotometri	44
Lampiran 4 Hasil data uji statistik kadar astaxanthin	46
Lampiran 5 Data nilai AUC hasil elektroforesis menggunakan imageJ	47
Lampiran 6 Hasil data uji statistik nilai AUC.....	48
Lampiran 7 Dokumentasi selama penelitian.....	48
Lampiran 8 Kwitansi pembelian mikroalga <i>H. pluvialis</i>	51

DAFTAR SINGKATAN

SINGKATAN	NAMA
AUC	<i>Area under curve</i>
<i>bkt</i>	<i>β-karoten ketolase</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>base pair</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
<i>crtR-b</i>	<i>β-karoten hidroksilase</i>
DMAPP	<i>Dimethylallyl diphosphate</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DOXP	1-deoxy-D-xylulose 5-fosfat
DW	<i>Dry weight</i>
GGPS	<i>Geranylgeranyl pyrophosphate</i>
GGPS	<i>Geranylgeranyl pyrophosphate synthase</i>
<i>H. pluvialis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
HDR	<i>Hydroxy-3-methylbut 2 etnyl diphosphate reductase</i>
IL-1	Interleukin -1
IL-6	Interleukin -6
IPI	<i>Isopentenyl pyrophosphate isomerase</i>
LCY-b	likopen siklase
MEP	2-C-methyl-D-erythritol 4-fosfat
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MVA	<i>Mevalonate</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PSY	<i>Phytoene synthase</i>
PDS	<i>Phytoene desaturase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive chain reaction</i>
Spektrofotometri UV-Vis	<i>Spektrofotometri ultraviolet visible</i>
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
TBE	<i>Tris-Borat EDTA</i>
TAG	<i>Triasilgliserol</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
ZDS	<i>ζ-carotene desaturase</i>

BAB I. PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan daerah perairan yang cukup luas. Luas daratan Indonesia 1,91 juta km² sedangkan luas wilayah perairan 6,32 juta km². (PUSDATIN-KKP, 2018). Organisme seperti mikroalga atau tanaman laut lainnya diprediksi tumbuh subur di perairan Indonesia. Alga dan mikroalga banyak tumbuh diperairan Indonesia seperti di perairan Bali, Nusa Tenggara Barat, Riau, Bangka-Belitung, Selat Sunda, Nusa Tenggara Timur, Seribu, Karimunjawa, Pantai Jawa bagian selatan, pulau-pulau di Sulawesi, dan Maluku. Hal tersebut mendorong pemanfaatan hasil bahari yang begitu melimpah (Firmansyah et al., 2019)

Haematococcus pluvialis merupakan salah satu contoh mikroalga yang dapat menghasilkan karotenoid berupa astaxanthin. *H. pluvialis* tergolong ke dalam kelas Chlorophyceae, ordo Volvocales, famili Haematococcaceae, dengan memiliki bentuk uniseluler (Witono et al., 2018). Pada saat kondisi stres atau kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan, maka *H. pluvialis* dapat menghasilkan astaxanthin hingga 5% (Awaliyah et al., 2019; Masojídek et al., 2013). Salah satu upaya meningkatkan produktivitas astaxanthin pada *H. pluvialis* dapat dilakukan dengan perlakuan rendah nutrisi, paparan cahaya yang tinggi, dan tinggi kadar garam (J. C. Park et al., 2014). Selain astaxanthin karotenoid yang sering kita kenal contohnya β karoten, lutein, lycopene, dan zeaxanthin (S. Y. Park et al., 2018). (Astaxanthin memiliki aktivitas sebagai antioksidan, anti tumor, anti inflamasi, peningkatan sistem kekebalan tubuh, penyakit kardiovaskular, penyakit neurologis, dan diabetes (Shah et al., 2016). Antioksidan yang terkandung dalam astaxanthin memiliki aktivitas 100 kali dari α tokoferol, 65 kali lebih kuat dari vitamin C, 54 kali dari β karoten, 10 kali lebih kuat dari cathaxanthin, zeaxanthin, dan lutein (Shah et al., 2016).

Identifikasi astaxanthin pada *H. pluvialis* dapat dilihat dari gen yang mempengaruhi biosintesis astaxanthin. Proses biosintesis astaxanthin melibatkan beberapa gen karotenogenik diantaranya IPI (*Isopentenyl pyrophosphate isomerase*), GGPS (*Geranylgeranyl pyrophosphate synthase*), PSY (*Phytoene synthase*), PDS (*phytoene desaturase*), ZDS (*ζ -carotene desaturase*), CRT-R-B (*β carotene hidroksilase*), dan BKT (*β carotene ketolase*) (Shah et al., 2016). crtR-B memiliki peran dalam mengkatalisis konversi β karoten menjadi cryptoxanthin, dan cryptoxanthin akan

menjadi zeaxanthin. Selanjutnya zeaxanthin akan dikonversi menjadi adonixanthin oleh β karoten ketolase dan adonixanthin akan dikonversi menjadi astaxanthin oleh β karoten ketolase (Shah et al., 2016). Berdasarkan latar belakang tersebut akan dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menganalisis ekspresi gen crtR-b yang mempengaruhi proses biosintesis astaxanthin menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *gel base* pada kultur *H. pluvialis* dengan induksi NaCl dan intensitas cahaya tinggi.

I.2. Rumusan masalah

1. Bagaimana pengaruh induksi NaCl dan intensitas cahaya terhadap peningkatan produksi astaxanthin pada *H. pluvialis*
2. Bagaimanakah peningkatan ekspresi gen crtR-B pada *H. pluvialis* setelah dilakukan induksi

I.3. Batasan masalah

Penelitian ini memiliki ruang lingkup yang luas, maka diperlukan batasan-batasan masalah seperti berikut :

1. Induksi NaCl 0,8% dan intensitas cahaya tinggi 6.800 lux
2. Analisis gen crtR-B menggunakan metode PCR semi kuantitatif

I.4. Tujuan dan manfaat penelitian

A. Tujuan

1. Mengetahui pengaruh induksi NaCl dan intensitas cahaya terhadap peningkatan produksi astaxanthin pada *H. pluvialis*.
2. Mengetahui ekspresi gen β -karoten hidrosilase terhadap produksi astaxanthin pada mikroalga *H. pluvialis* yang diinduksi dengan penambahan NaCl dan intensitas cahaya tinggi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *gel base*.

B. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat berguna sebagai informasi dan rujukan dalam meningkatkan produktivitas astaxanthin pada mikroalga *H. pluvialis* dengan ekspresi gen serta induksi NaCl dan intensitas cahaya tinggi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *gel base*.

I.5. Hipotesis penelitian

Dari penelitian yang akan dilakukan, diduga adanya peningkatan produksi astaxanthin dengan induksi stres yang dilakukan serta metode PCR *Gel Base* dapat digunakan untuk mengidentifikasi gen crtR-b pada mikroalga *H. pluvialis*.

I.6. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juli tahun 2021 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Bhakti Kencana Bandung

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. *Haematococcus pluvialis*

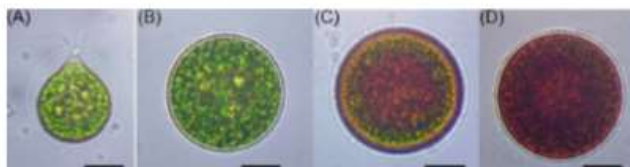
II.1.1. Taksonomi

Mikroalga hijau *Haematococcus pluvialis* merupakan mikroalga air tawar uniseluler berflagela kelas Chlorophyceae ordo Volvocales keluarga Haematococcaceae Genus Haematococcus. Mikroalga ini biasanya dapat ditemukan di daerah beriklim sedang di seluruh dunia. (Shah et al., 2016)

II.1.2. Morfologi dan siklus hidup

Siklus hidup dari *H. pluvialis* terdiri dari empat jenis sel terdiri dari macrozooids (zoospora), microzooids, palmella, dan hematokista (aplanospora). Tahapan makrozoid (zoospora), mikrozooid dan palmella biasanya disebut “fase vegetatif hijau” (Gambar 1A,B). Hematokista (aplanospora) disebut sebagai “fase akumulasi astaxanthin nonmotil merah” dari siklus *H. pluvialis* (Gambar 1C, D). Makrozoida (zoospora) berbentuk bola, ellipsoidal, atau sel berbentuk buah pir dengan dua flagela dengan panjang yang sama. Flagela dapat tumbuh dengan cepat saat sel vegetatif dalam kondisi kultur yang menguntungkan pada tahap pertumbuhan vegetatif awal (Shah et al., 2016).

Disaat lingkungan tidak menguntungkan atau dianggap dapat membahayakan *H. pluvialis*, makrozoid mulai kehilangan flagela dan memperbesar ukuran selnya. *H. pluvialis* akan membentuk amorf berlapis-lapis pada bagian matriks ekstraseluler atau dinding sel primer saat sel berkembang menjadi non motil dan menjadi sel vegetatif. Dengan kondisi lingkungan yang dianggap tidak menguntungkan sel misalnya kekurangan nutrisi, radiasi cahaya tinggi, salinitas tinggi maka akan berhentinya pembelahan sel “palmella” berubah menjadi sel aseksual “aplanospora”. Aplanospora dewasa, mengakumulasi sejumlah besar metabolit sekunder berupa karotenoid terutama astaxanthin, dimana astaxanthin tersebut diendapkan di dalam sitoplasma yang menghasilkan warna merah cerah yang khas. *H. pluvialis* menjadi sel oranye kehijauan (hasil akumulasi astaxanthin) dikarenakan mengandung astaxanthin terletak di sekitar nukleus (Shah et al., 2016)



Gambar II. 1 Sel mikroskopis *H. pluvialis* dalam siklus hidupnya

(A) Sel motil vegetatif hijau; (B) Sel *palmella* vegetatif hijau; (C) Sel *palmella* mulai mengakumulasi astaxanthin dalam transisi ke *aplanospore*; (D) Sel *aplanospore* mengakumulasi astaxanthin (Shah et al., 2016).

Kandungan biokimia yang terdapat dalam *H. pluvialis* : (Shah et al., 2016)

Tabel II. 1 Kandungan biokimia yang terdapat dalam *H. pluvialis*

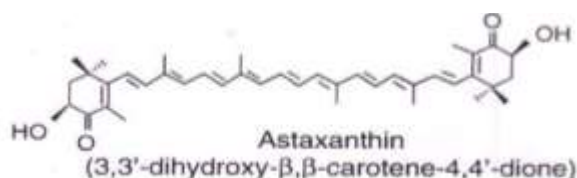
Kandungan (% Berat Kering)	Fase Hijau	Fase Merah
Protein	29-45	17-25
Lipid (% total)	20-25	32-37
Neutral Lipid	59	51,9-53,5
Phosphilipid	23,7	20,6-21,1
Glikolipid	11,5	25,7-26,5
Karbohidrat	15-17	36-40
Karotenoid (% total)	0,5	2-5
Neoxanthin	8,3	-
Violaxanthin	12,5	-
β karoten	16,7	1,0
Lutein	56,3	0,5
Zeaxanthin	6,3	-
Astaxanthin (termasuk ester)	-	81,2
Adonixanthin	-	0,4
Canthaxanthin	-	5,1
Echinenone	-	0,2
Klorofil	1,5-2	0

Keterangan : (-) : tidak ada data yang dilaporkan

II.2. Astaxanthin

Astaxanthin tergolong kedalam karotenoid dengan nama lain (3, 3'-dihidroksi- β , β' -Carotene-4, 4'-Dione) (Chou et al., 2019; Higuera et al., 2006). Astaxanthin tergolong ke dalam keto karotenoid kemerahan yang diklasifikasikan sebagai xantofil (S. Y. Park

et al., 2018). Berdasarkan struktur molekulnya astaxanthin memiliki sifat kimia yang unik. Astaxanthin memiliki dua gugus hidroksil, dua gugus karbonil dan sebelas ikatan rangkap etilenat terkonjugasi. Astaxanthin dapat diesterifikasi karena mempunyai gugus hidroksil dan keto pada setiap cincin ionon sehingga astaxanthin memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari karotenoid lainnya. Astaxanthin mampu menyumbangkan elektron dan mengubahnya menjadi lebih stabil saat berinteraksi dengan radikal bebas sehingga astaxanthin mampu menghentikan reaksi berantai akibat radikal bebas (Dhankhar et al., 2012)



Gambar II. 2 Struktur Astaxanthin

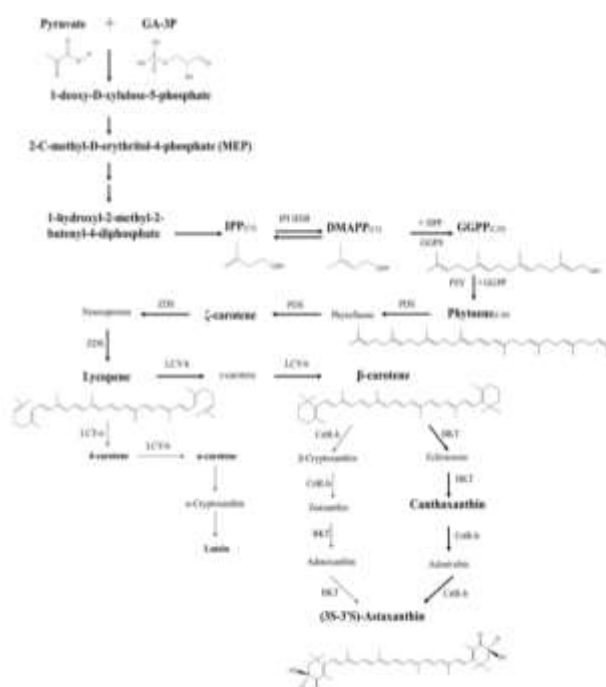
(Shah et al., 2016)

II.2.1. Biosintesis astaxanthin

Haematococcus pluvialis dapat mengakumulasi astaxanthin hingga 5% DW dan dianggap sebagai sumber alami terbaik dari pigmen karotenoid yang bernilai tinggi (Shah et al., 2016; Wayama et al., 2013). Proses pembentukan astaxanthin terjadi saat kondisi stres dan bertepatan dengan akumulasi triasilgliserol (TAG). Kedua senyawa tersebut akan tersimpan di dalam lipid sitosol selama tahap “merah” saat budidaya *H. pluvialis*. Astaxanthin disintesis dari unit isopentenyl pyrophosphate (IPP). IPP bisa berasal dari dua jalur, jalur mevalonate (MVA) terletak di sitosol dan non mevalonate (MEP) berada di kloroplas. Nama alternatif dari MEP adalah DOXP. Diperlukan enzim untuk konversi produk turunan fotosintesis yaitu, piruvat dan gliseraldehida-3-fosfat yang akan membentuk isopentenyl pirofosfat melalui jalur DOXP di dalam kloroplas. IPP selanjutnya menjadi DMAPP (Dimethylallyl diphosphate) melalui proses isomerisasi dengan bantuan katalis IPI (Isopentenyl pyrophosphate isomerase) (Sun *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 1999; Shah *et al.*, 2016). Namun dalam konversi IPP menjadi DMAPP ditemukan ezim baru yang memiliki aktivitas hampir sama yaitu HDR (Hydroxy-3-methylbut 2-enyl diphosphate reductase (Shah *et al.*, 2016;Gwak *et al.*, 2014;Rohdich *et al.*, 2002; Hoeffler *et al.*, 2002). DMAPP yang telah terbentuk kemudian akan membentuk GGPP (Geranylgeranyl pyrophosphate) dengan 3 molekul IPP yang

dikatalisis oleh enzim geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS) (Shah *et al.*, 2016; Cunningham dan Gantt, 1998; Britton, 1993). Selanjutnya phytoene synthase (PSY) mengkatalisis GGPP untuk menghasilkan senyawa C40-phytoene sebagai prekursor untuk astaxanthin dan karotenoid lainnya (Shah *et al.*, 2016; Cunningham dan Gantt, 1998). Ekspresi gen likopen sintase (PSY) meningkat dalam sel *Haematococcus* di bawah tekanan cahaya yang kuat dan mengalami transisi dari "hijau" ke "merah" (Shah *et al.*, 2016)

Melalui empat tahap desaturasi yang dikatalisis oleh dua phytoene desaturase (PDS) dan ζ -carotene desaturase (ZDS), senyawa likopen akhirnya terbentuk. Reaksi desaturasi meningkatkan jumlah ikatan rangkap karbon-karbon terkonjugasi yang membentuk kromofor dalam karotenoid, dan molekul karoten tidak berwarna menjadi likopen merah muda. Kemudian likopen akan mengalami siklisasi yang dikatalisis oleh likopen siklase (LCY-b). Siklisasi adalah titik cabang biosintesis karotenoid di sebagian besar organisme, menghasilkan α -karoten (prekursor lutein) dan β -karoten (prekursor karotenoid lainnya, termasuk astaxanthin). Tahap terakhir adalah proses reaksi oksidasi yang dikatalisis oleh β -karoten ketolase (BKT) dan β -karoten hidroksilase (CrtR-b). (Shah *et al.*, 2016)



Gambar II. 3 Jalur biosintesis astaxanthin pada *H. pluvialis*

(Shah *et al.*, 2016)

II.2.2. Organisme penghasil astaxanthin

Beberapa sumber penghasil astaxanthin diantaranya alga, salmon, trout, krill, ragi, udang, karang, dll. (Tabel 2) . Sebagian besar astaxanthin dihasilkan dari ragi *Phaffa*, *Haematococcus*, dan melalui sintesis kimia. *Haematococcus* adalah salah satu sumber terbaik penghasil astaxanthin (Ambati et al., 2014).

Tabel II. 2 Organisme penghasil astaxanthin
(Ambati et al., 2014)

Sumber	Astaxanthin (%) dalam satuan berat kering
Chlorophyceae	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K.0084)	3.8
<i>Haematococcus pluvialis</i> (Local isolation)	3.6
<i>Haematococcus pluvialis</i> (AQSE002)	3.4
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	2.7
<i>Chlorococcum</i>	0.2
<i>Chlorella zofinglensis</i>	0.001
<i>Neochloris wimmeri</i>	0.6
Ulvophyceae	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0.02
<i>Ulva lactuca</i>	0.01
Florideophyceae	
<i>Catenella repens</i>	0.02
Alphaproteobacteria	
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0.01
<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (NITE SD 00017)	2.2
Tremellomycetes	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (JH)	0.5
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (VKPM Y2476)	0.5

Labyrinthulomycetes

Thraustochytrium sp. CHN-3 (FERM P-18556) 0.2

Malacostraca

Pandalus borealis 0.12

Pandalus clarkia 0.015

II.2.3. Manfaat astaxanthin

Astaxanthin memiliki sifat kimia yang unik karena memiliki dua gugus karbonil, dua gugus hidroksil, dan sebelas ikatan rangkap etilenik terkonjugasi. Adanya gugus hidroksil dan keto pada setiap cincin ionon sehingga astaxanthin memiliki kemampuan untuk diesterifikasi dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi serta sifat yang lebih polar dari pada karotenoid lainnya. Selain itu dilaporkan juga astaxanthin memiliki aktivitas terhadap peradangan, aktivitas neuroprotektif, serta anti diabetes (Dhankhar et al., 2012).

Berikut beberapa fungsi dari penggunaan astaxanthin :

1. Anti oksidan

Anti oksidan merupakan molekul yang dapat menghambat oksidasi (Ambati et al., 2014). Reaksi oksidatif ditandai dengan produksi ROS (*reactive oxygen species*) yang berperan terhadap perkembangan tumor serta ciri khas dari beberapa kanker. ROS berperan dalam inisiasi kanker, perkembangan dan pembawa pesan sekunder dalam pensinyalan spesifik dan aktivasi. Anti oksidan seperti astaxanthin berperan untuk menghambat molekul oksidatif (Zhang & Wang, 2015). Karotenoid mengandung rantai poliena, ikatan rangkap panjang terkonjugasi, yang memiliki aktivitas antioksidan dengan menghentikan oksigen singlet dan mengakhiri reaksi berantai. Astaxanthin memiliki sifat antioksidan yang lebih baik dari pada karotenoid lain seperti lutein, lycopene, α karoten, β karoten (Ambati et al., 2014). Astaxanthin dapat bertindak sebagai antioksidan kuat dengan mendonasikan elektron dan bereaksi dengan radikal bebas untuk mengubahnya menjadi produk yang stabil dan menghentikan reaksi berantai radikal bebas dalam berbagai bentuk organisme hidup (Dhankhar et al., 2012).

2. Anti inflamasi

Astaxanthin dapat menekan produksi sitokin seperti IL-6, IL-1B, TNF α . Dimana tubuh akan merespon peradangan dengan menghasilkan respon biologis saat adanya rangsangan berbahaya melalui peningkatan sel plasma serta diproduksi sitokin dan proinflamasi seperti IL-1 (interleukin -1), IL-6 (interleukin -6), TNF α (tumor necrosis factor α) (Zhang & Wang, 2015). Astaxanthin dapat meningkatkan mikrobisida neutrofil, fagositosis, mengurangi produksi superion anion dan hidrogen peroksida, yang dimediasi oleh pelepasan kalsium dari intraseluler dan produksi nitrat oksida (Dhankhar et al., 2012). Astaxanthin dapat meningkatkan respon imun tubuh, menurunkan biomarker, peradangan, kerusakan oksidatif DNA. Beberapa percobaan juga menyatakan astaxanthin, ginkgolide B atau kombinasinya dapat menekan aktivitas sel T dari penyakit asma (Dhankhar et al., 2012).

3. Anti diabetes

Pada pasien diabetes memiliki tingkat stres oksidatif yang tinggi. Hal tersebut di akibatkan karena adanya disfungsi β pankreas dan kerusakan jaringan pada pasien sehingga menyebabkan hiperglikemia. Astaxanthin dapat melindungi sel β pankreas dari toksisitas glukosa. Pada tikus diabetes yang diobati oleh astaxanthin menunjukkan tingkat urinari albumin lebih rendah. Astaxanthin mampu mencegah nefropati diabetik, mengurangi stres oksidasi, dan kerusakan sel ginjal menurut beberapa penelitian (Ambati et al., 2014).

Astaxanthin dapat menghambat glikasi nonenzimatik dan sitotoksitas oleh protein atau zat besi pada sel endotel. Ditemukan juga astaxanthin mampu menurunkan kadar glukosa darah, diesterifikasi asam lemak dan trigliserida, secara signifikan meningkatkan kadar lipoprotein kolesterol dan adiponektin. Astaxanthin dapat meningkatkan mekanisme insulin dengan meningkatkan penyerapan glukosa sehingga dapat memperbaiki sensitivitas insulin (Dhankhar et al., 2012).

4. Anti kanker

Antioksidan dapat digunakan sebagai deteksi dini berbagai gangguan generatif. Spesies oksigen seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil dihasilkan dalam metabolisme aerobik normal. Melalui peristiwa fotokimia dapat menghasilkan oksigen singlet sedangkan radikal peroksil dihasilkan oleh peroksidasi lipid. Oksidan tersebut

dapat menyebabkan penuaan, penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, kanker melalui oksidasi DNA, protein, lipid. Dengan adanya senyawa antioksidan dapat menurunkan mutagenesis dan careinogenesis dengan jalan menghambat oksidasi yang terjadi pada sel. Sel dapat berkomunikasi melalui gap junctional berkurang pada tumor manusia dan pemulihannya cenderung menurunkan proliferasi sel tumor. Gap junctional communication terjadi karena peningkatan protein connexin-43 melalui upregulasi gen connexin-43. Karotenoid alami dan retinoid dapat meningkatkan komunikasi antar sel tersebut.

Astaxanthin memiliki aktivitas anti tumor yang lebih baik dibandingkan dengan karotenoid lain seperti canthaxanthin dan β caroten. Dengan astaxanthin mampu meningkatkan komunikasi antar sel gap junctional dalam sel fibroblas. Astaxanthin pun mampu menghambat kematian sel, proliferasi sel, dan tumor (Ambati et al., 2014).

II.3. Kultur mikroalga *Haematococcus pluvialis*

II.3.1. Sistem kultur

Kultur dapat dilakukan di photobioreactor tertutup atau di kolom raceway terbuka. Fase pertama yaitu (green stage), fase ini menunjukkan pertumbuhan *H. pluvialis* secara maximal karena mendapat asupan nitrogen serta berada dalam kondisi rendah cahaya. Sehingga mikroalga tersebut tumbuh dengan baik (Boussiba, 2000; A fl alo *et al.*, 2007; Del Rio *et al.* , 2007; Shah et al., 2016)

Fase kedua yaitu red stage, astaxanthin dapat diproduksi pada fase ini karena sel –sel mikroalga tersebut mengalami stres akibat intensitas cahaya yang tinggi, ph, stres garam, pengurangan nitrogen, penambahan asetat berlebih, defisiensi fosfat, atau penambahan inhibitor pembelahan sel spesifik (Fábregas *et al.*, 2001; Torzillo *et al.*, 2003; Orosa *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011;Shah et al., 2016).

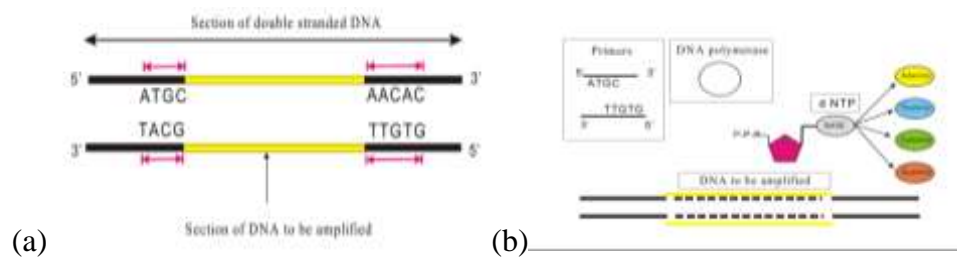
II.3.2. Faktor yang mempengaruhi akumulasi astaxanthin

Beberapa induksi yang dapat meningkatkan produksi astaxanthin diantaranya disebabkan oleh defisiensi nutrisi (Chekanov *et al.*, 2014; Awaliyah et al., 2019), akibat stres cahaya (Imamoglu *et al.*, 2009; Awaliyah et al., 2019), akibat stres salinitas (Sarada *et al.*, 2002; Awaliyah et al., 2019), dan dengan diberikannya zat kimia seperti BHT (Butylated Hydroxytoluene) (Zhao *et al.*, 2018; Awaliyah et al., 2019).

II.4. Ekspresi gen

Ekspresi gen adalah proses penentuan sifat organisme melalui gen. Ekspresi gen merupakan database yang memberikan informasi tentang gen dan ekspresi protein yang berbeda spesies dan konteks, seperti jaringan, tahap perkembangan, penyakit atau jenis sel. Ciri organisme merupakan hasil dari proses metabolisme yang terjadi di dalam sel. Karena adanya enzim yang berperan sebagai katalisator proses biokimia, proses metabolisme dapat terjadi. Enzim dan protein lain diterjemahkan dari urutan nukleotida yang ada dalam molekul mRNA, dan ekspresi gen berlangsung dalam dua tahap: transkripsi dan translasi. Proses transkripsi berlangsung di dalam nukleus, sedangkan translasi terjadi di dalam sitoplasma. (Syahbanuari et al., 2020)

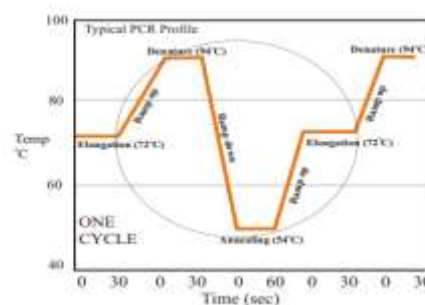
II.5. Polymerase chain reaction (PCR)



Gambar II. 4 Proses PCR

(a) Bagian dari molekul DNA beruntai ganda secara skematis dengan beberapa basa pada kedua sisi wilayah 5' ke 3'. (b). Komponen yang dibutuhkan untuk proses PCR antara lain primer, enzim polimerase dan campuran basa. (Diagnostic & Handbook, 2005)

Prinsip-prinsip PCR :

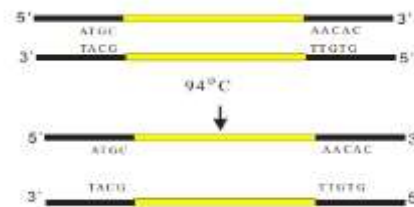


Gambar II. 5 Skema ilustrasi dari temperatur profile PCR

(Diagnostic & Handbook, 2005)

1. Denaturasi

Ketika molekul DNA untai ganda (dsDNA) dipanaskan hingga 94°C , untai berpasangan akan terpisah (denaturasi). Hal ini memungkinkan akses primer ke DNA untai tunggal (ssDNA) template.

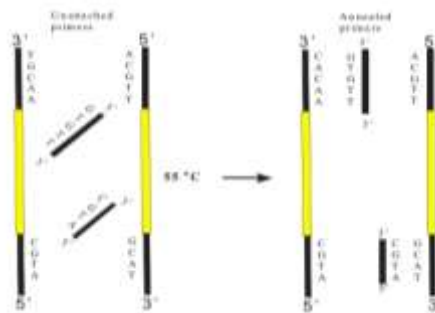


Gambar II. 6 Tahap denaturasi

Pengaruh pemanasan dsDNA pada 94°C . Ikatan hidrogen diputus dan untai komplementer dsDNA terpisah. (Diagnostic & Handbook, 2005)

2. Annealing

Campuran reaksi didinginkan (sekitar 50°C) untuk memungkinkan primer memilih dan mengikat (hibridisasi) posisi komplementernya pada molekul cetakan ssDNA.



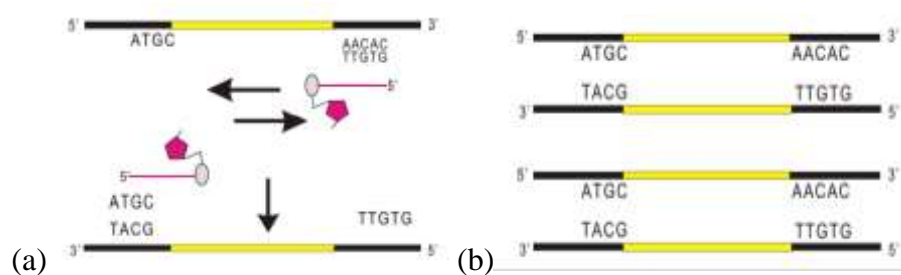
Gambar II. 7 Tahap annealing

Primer khusus dengan basis pelengkap untuk template ssDNA ditambahkan, pada suhu 55°C primer anil dengan basa ssDNA komplementer. (Diagnostic & Handbook, 2005)

3. Extension

Larutan ssDNA / primer dipanaskan hingga 72°C . Dengan adanya polimerase stabil panas, Buffer PCR, molekul dNTP dan magnesium (Mg^{2+}), prosedur replikasi dimulai. Dengan setiap pengulangan siklus ini, target menjadi dua kali lipat dan segera,

setelah sekitar 30 siklus, reaksi akan menghasilkan lebih dari 1 juta salinan dari fragmen DNA target.



Gambar II. 8 Tahap extension

(a). Dua untai ssDNA dengan primer anil, penambahan enzim polimerase dan campuran dNTP memungkinkan produksi untai baru melalui penambahan basa pelengkap ke untai yang tumbuh tersebut. (b) Segmen DNA target digandakan mengikuti urutan kejadian yang dimulai dengan pengikatan pasangan primer ke daerah mengikat. (Diagnostic & Handbook, 2005)

Komponen-komponen yang diperlukan untuk melakukan proses PCR (Diagnostic & Handbook, 2005) diantaranya :

1. Template DNA

Dalam proses PCR template DNA memiliki fungsi sebagai cetakan dalam proses pembentukan molekul DNA baru yang sama, Templat ini dapat berupa DNA plasmid, DNA kromosom ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju.

2. Primer

Primer PCR adalah untai pendek spesifik DNA untai tunggal (ssDNA), yang dikenal sebagai oligodeoxyribonucleotides atau oligomer. Primer ini mengikat untai yang berlawanan di kedua ujung DNA target. Desain primer ini sangat penting dan komposisi, urutan yang sesuai dengan template dan konsentrasi primer yang memainkan peran penting dalam hasil pengujian PCR.

3. Buffer dan Magnesium

Buffer diperlukan untuk memberikan kekuatan ionik dan kapasitas buffering selama reaksi dan aspek lingkungan ionik PCR.

Konsentrasi Mg mempengaruhi reaksi secara berbeda pada konsentrasi rendah atau tinggi dan berpengaruh dalam hal spesifisitas dan hasil reaksi amplifikasi. Mg membentuk kompleks terlarut dengan blok penyusun dNTP agar tersedia dan dikenali sebagai substrat untuk enzim

4. dNTP

dNTP dalam proses PCR berfungsi sebagai blok pembangun DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP di ujung 3 akan diikat ke gugus -OH primer untuk membentuk untai baru yang melengkapi untai DNA cetakan.

5. Enzim Polimerase DNA

DNA polimerase dalam proses PCR bertindak sebagai katalisator untuk reaksi polimerisasi DNA. Dalam proses PCR, enzim ini diperlukan untuk tahap perluasan DNA. DNA polimerase diisolasi dari bakteri termofilik atau termofilik, sehingga enzim bersifat termostabil.

II.6. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode untuk memisahkan asam nukleat (DNA atau RNA) dalam gel yang terbuat dari agarosa dalam buffer yang sesuai di bawah pengaruh medan listrik. Amplicon dengan panjang yang berbeda dapat dipisahkan dengan migrasi mereka melalui gel agarosa saat terkena medan listrik. Molekul DNA yang bermuatan negatif bergerak dengan kecepatan yang berbanding terbalik dengan ukurannya. DNA dapat divisualisasikan dengan pewarnaan dengan pewarna fluoresen dan melihat di bawah sinar UV. Ukuran amplicon diprediksi oleh penempatan primer pada DNA target dan produk atau 'pita' sebagai hasil positif. Konfirmasi dapat diberikan dengan menggunakan probe khusus untuk memeriksa identitas band. (Diagnostic & Handbook, 2005)

II.7. Image-J

Image-J dibuat oleh Wayne Rashband dari Research Services Branch National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.. Aplikasi ini adalah software gratis (*free software*) untuk pengolahan gambar digital berbasis Java. Penggunaan Image-J dalam analisis gambar digital telah digunakan secara luas dalam bidang kesehatan dan biologi. Namun bukan hanya dibidang kedokteran, sekarang aplikasi ImageJ juga dapat

digunakan untuk berbagai keperluan tertentu seperti pertanian untuk mengukur luas daun, tinggi pohon, jumlah kacang hijau, dan sebagainya. (Kurniawan et al., 2011)

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

III.1. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juli tahun 2021 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Bhakti Kencana Bandung

III.2. Subjek penelitian

Pada penelitian ini menggunakan mikroalga *Haematococcus pluvialis* yang berasal dari Daerah Istimewa Yogyakarta

III.3. Metode penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi gen *β -karoten hidroksilase* dari kultur mikroalga *H. pluvialis* dalam upaya peningkatan kadar astaxanthin menggunakan metode PCR *Gel Base*. Induksi yang diberikan yaitu penambahan NaCl 0,8 % dan paparan intensitas cahaya tinggi 6800 lux dengan menggunakan media Guillard. Kemudian dilakukan analisis semi kuantitatif dan kualitatif setelah pemberian induksi stres. Penelitian ini dilakukan dengan proses pengumpulan alat dan bahan, penyiapan mikroalga *H. pluvialis*, kultivasi, induksi menggunakan NaCl 0,8% dan paparan intensitas cahaya tinggi 6800 lux, isolasi RNA, amplifikasi gen menggunakan PCR *Gel Base*, kemudian pengujian menggunakan elektroforesis yang selanjutnya dilakukan analisis semi kuantitatif dengan mengukur nilai luas area di bawah kurva menggunakan software ImageJ.

Tahap pertama yaitu aklimatisasi yang dilakukan selama 3 hari. Selanjutnya dilakukan kultur *H. pluvialis* menggunakan media Guillard. Lalu dilakukan analisis kerapatan sel (*Optical Density*) untuk dibuat kurva pertumbuhan menggunakan *Hemocytometer*.

Tahap kedua dilakukan induksi stres pada kultur saat fase pertumbuhan (akhir fase logaritmik). Induksi yang diberikan yaitu NaCl 0,8% dan paparan intensitas cahaya tinggi 6800 lux, namun pada kultur kontrol negatif tidak diberikan perlakuan induksi apapun.

Tahap ketiga dilakukan isolasi RNA, dilanjutkan dengan amplifikasi gen menggunakan PCR *Gel Base*. Selanjutnya pengukuran menggunakan elektroforesis gel. Hasil dari elektroforesis gel kemudian dilihat ketebalan pita dan nilai luas area dibawah kurva dari masing-masing pita yang dihasilkan. Pengukuran luas area dibawah kurva (area under

curve) menggunakan ImageJ. Hasil setiap luas area dibawah kurva yang didapat diinterpretasikan menjadi nilai ekspresi dari gen yang di uji.