

Pertumbuhan dan Kandungan Lutein *Dunaliella salina* pada Salinitas yang Berbeda

Faith Dibri Kimberly, Endang Supriyantini*, Sri Sedjati

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Sudarto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50275
Email : supri_yantini@yahoo.com

Abstrak

Dunaliella salina adalah salah satu mikroalga yang mengandung pigmen lutein. Lutein memiliki manfaat sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas pada mata. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh berbagai macam faktor lingkungan, salah satunya adalah salinitas. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan salinitas terbaik guna mengoptimalkan pertumbuhan dan produksi pigmen lutein pada *D. salina*. Metode yang digunakan adalah eksperimen laboratoris. Mikroalga *D. salina* dikultivasi dengan lima perlakuan salinitas yang berbeda yaitu 20, 25, 30, 35, dan 40 ppt. Pertumbuhan sel *D. salina* diamati selama 9 x 24 jam kemudian dipanen untuk perhitungan biomasanya. Biomassa basah hasil kultivasi diekstraksi menggunakan pelarut aseton. Ekstrak aseton *D. salina* kemudian dianalisis kandungan pigmen luteinnya secara spektrofotometrik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan salinitas berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan sel dan kandungan pigmen lutein *D. salina*. Pertumbuhan sel *D. salina* optimum pada perlakuan salinitas 30 ppt, yaitu sebesar $125,86 \times 10^4$ sel/mL, sedangkan untuk kandungan pigmen lutein *D. salina* diproduksi optimum pada salinitas 25 ppt, yaitu sebesar $0,0077 \mu\text{g/g}$.

Kata Kunci : *Dunaliella salina*, Salinitas, Pertumbuhan, Lutein

Abstract

Growth and Lutein Content of Dunaliella salina with Different Salinity

Dunaliella salina is a microalga containing lutein pigment. Lutein has the role of being an antioxidant to fight free radicals in the eye. Microalgae growth is influenced by a variety of environmental factors, such as salinity. The purpose of this research is to determine the best salinity to optimize the growth and production of lutein pigments in *D. salina*. The method used in this research was a laboratory experiment. Microalgae *D. salina* was cultivated with five different salinity treatments, which 20, 25, 30, 35, and 40 ppt. Growth of *D. salina* cells was observed for 9 x 24 hours and then harvested for the biomass determination. The wet biomass from the cultivation results was extracted using acetone solvent. *D. salina* acetone extract was then analyzed for its lutein pigment content spectrophotometrically. The results showed that salinity treatment had a significant effect on cell growth and pigment content of lutein *D. salina*. The optimum growth of *D. salina* cell is optimally achieved in 30 ppt salinity treatment at the amount of $125,86 \times 10^4$ cell/mL, while for the lutein pigment content of *D. salina* is optimally achieved in 25 ppt salinity at the amount of $0,0077 \mu\text{g/g}$.

Keywords: *Dunaliella salina*, Salinity, Cell Growth, Lutein

PENDAHULUAN

Manusia rentan terhadap berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang tidak stabil dengan atom pada orbit terluarnya berupa elektron - elektron yang tidak berpasangan. Elektron tersebut cenderung menarik elektron dari molekul lain. Hal ini akan berakibat destruktif terhadap molekul yang diambil elektronnya. Radikal bebas sering menarik elektron yang berasal dari molekul protein, karbohidrat, lemak, dan DNA dalam

tubuh sehingga radikal bebas dianggap sebagai penyebab timbulnya penyakit (Khaira, 2010). Salah satu penyakit yang berhubungan dengan adanya radikal bebas adalah gejala *Age-Related Macular Degeneration* (AMD / ARMD). *Age-Related Macular Degeneration* (AMD / ARMD) merupakan penurunan ketajaman penglihatan dan dapat mengakibatkan hilangnya fungsi penglihatan sentral akibat kemunduran kinerja makula (pusat retina) (Roberts *et al.*, 2009). Penyakit AMD lebih dikenal dengan penyakit katarak.

Menurut Saputra *et al.* (2018), sekitar 16-20% penduduk Indonesia yang mengalami penyakit katarak berasal dari golongan usia 40-54 tahun. Hal ini diduga adanya pengaruh kondisi lingkungan dan pola hidup yang tidak sehat yang mendukung berkembangnya radikal bebas. Menurut Fretes *et al.* (2012), radikal bebas pada mata dapat dicegah dengan mengonsumsi asupan makanan yang kaya akan lutein. Lutein berperan sebagai senyawa antioksidan untuk melawan oksigen reaktif pada mata (Kusmiati *et al.*, 2010).

Salah satu sumber potensial pigmen lutein adalah mikroalga *Dunaliella salina*. Hal ini dikarenakan mikroalga *Dunaliella salina* memiliki berbagai macam komponen bioaktif seperti karotenoid (Abu-Rezqet *et al.*, 2010). Lutein merupakan karotenoid dari golongan xanthofil dengan bentuk kristal padat berwarna kuning (Kusmiati *et al.*, 2010). Senyawa lutein didapatkan dengan cara melakukan kultivasi mikroalga *D. salina*. Salah satu faktor pembatas yang mempengaruhi produksi lutein dalam mikroalga adalah salinitas (Guedes *et al.*, 2011). Salinitas dianggap mempengaruhi karena mengakibatkan adanya tekanan osmosis melalui pertukaran ion (Djunaedi *et al.*, 2017). Tekanan osmosis ini juga memicu perubahan protein menjadi asam piruvat yang digunakan sebagai bahan dasar pembentukan lutein (Imron *et al.*, 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh salinitas terhadap pertumbuhan sel dan kandungan lutein *Dunaliella salina*, serta untuk menentukan salinitas terbaik untuk pertumbuhan sel dan produksi pigmen lutein. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi mengenai salinitas terbaik untuk pertumbuhan sel dan kandungan pigmen lutein pada *D. salina* dan menjadi penunjang referensi dalam produksi pigmen lutein industri farmakologi.

MATERI DAN METODE

Peralatan untuk kultur mikroalga *D. salina* disterilkan dengan melakukan pencucian yang selanjutnya disterilkan dengan penyemprotan alkohol 70%. Selanjutnya disinari dengan menggunakan lampu UV 20 Watt selama 2 jam. Sterilisasi media kultur dilakukan dengan pemberian 3 gram kaporit atau $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ke dalam 50 L air laut dan diaerasi selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan 1,5 gram Natrium Tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dan didiamkan selama 6 jam. Lalu air laut disaring menggunakan saringan yang sudah diberi kapas dan direbus sampai mendidih.

Setelah itu air laut didinginkan kemudian disinari dengan sinar UV selama 2 jam (Andersen, 2005).

Stok air laut steril dengan salinitas 40 ppt diencerkan menjadi lima salinitas perlakuan yang berbeda, yaitu 20, 25, 30, 35, dan 40 ppt. Pengukuran salinitas menggunakan rumus menurut Rahma *et al.* (2014). Kultivasi dilakukan menurut Zainuddin *et al.* (2017), dimana digunakannya stoples dengan volume 3 L. Kultivasi dilakukan dengan perbandingan 1:2 (*D. salina* : air laut steril). Pupuk Walne diberikan sebanyak 1,5 mL ke dalam kultivasi *D. Salina* (dosis 1 mL/L).

Pengamatan kepadatan sel *D. salina* dilakukan setiap 24 jam. Perhitungan kepadatan sel dilakukan dengan cara mengambil sampel mikroalga sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam botol vial yang kemudian ditambahkan 0,05 ml formalin 5%. Selanjutnya dilakukan perhitungan dengan menggunakan *haemocytrometer* di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Jumlah sel/mL *D. salina* dihitung dengan menggunakan rumus menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995).

Pemanenan biomassa *D. salina* dilakukan pada masa puncak kepadatan sel yang disebut dengan fase eksponensial (H0), fase stasioner 1, yaitu 1 hari setelah fase eksponensial (H1), dan fase stasioner 2, yaitu 2 hari setelah fase eksponensial (H2). Pemanenan dilakukan dengan cara mengambil 5 mL sampel dengan pipet tetes dan dimasukkan ke dalam botol vial yang dibungkus dengan aluminium foil. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit (Imron *et al.*, 2016). Lalu supernatan dibuang dan endapan yang terbentuk ditimbang menggunakan timbangan analitik dan didapatkan berat biomassa basah.

Ekstraksi pigmen lutein dilakukan dengan melakukan maserasi biomassa basah *D. salina* dengan pelarut aseton PA selama 24 jam dengan perbandingan 1:1 (gram biomassa basah : mililiter pelarut aseton) (Imron *et al.*, 2016). Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 42 dan sisa filtrat disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya filtrat diencerkan sebanyak 24 kali dengan menambahkan kembali pelarut aseton PA. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 446 nm. Perhitungan kadungan lutein dihitung dengan menggunakan rumus menurut Hajare *et al.* (2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan sel tertinggi *D. salina* pada semua perlakuan dicapai pada hari ke-4. Kepadatan sel tertinggi perlakuan A (20 ppt) sebesar $123,09 \times 10^4$ sel/mL, perlakuan B (25 ppt) sebesar $99,44 \times 10^4$ sel/mL, perlakuan C (30 ppt) sebesar $125,86 \times 10^4$ sel/mL, perlakuan D (35 ppt) sebesar $83,24 \times 10^4$ sel/mL, dan untuk perlakuan E (40 ppt) sebesar $89,20 \times 10^4$ sel/mL.

Pada hari ke-0 atau saat dimulainya kultivasi hingga hari ke-1 terjadi fase penyesuaian yang ditandai dengan bertambahnya kepadatan sel *D. salina* yang relatif kecil. Selanjutnya terlihat adanya peningkatan kepadatan sel pada pengamatan hari ke-1 hingga hari ke-4, dimana kepadatan sel mencapai puncak tertinggi, yang kemudian disebut sebagai fase eksponensial. Selanjutnya fase stasioner terjadi pada hari ke-5 dan ke-6 dikarenakan adanya penurunan kepadatan sel pada hari ke-5 dan diikuti dengan kepadatan sel yang tidak jauh berbeda pada hari ke-6. Pengamatan pada hari ke-7 dan ke-8 menunjukkan adanya penurunan drastis dari kepadatan sel, yang dapat disimpulkan sebagai fase kematian (Gambar 1).

Perlakuan C (30 ppt) menghasilkan kepadatan sel paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan salinitas lain ($p < 0,05$), sehingga salinitas 30 ppt merupakan media tumbuh yang optimum untuk *D. salina*. Pernyataan ini juga didukung oleh Zainuddin *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa kepadatan sel tertinggi dicapai oleh *D. salina* pada salinitas 30 ppt. Hal ini diduga karena tidak adanya tekanan osmosis yang menyebabkan konversi glukosa menjadi gliserol sehingga glukosa dapat dipakai secara optimum untuk pertumbuhan sel. Pendapat ini sejalan dengan de Jaeger *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa gliserol diproduksi melalui proses glikolisis atau pemecahan gula.

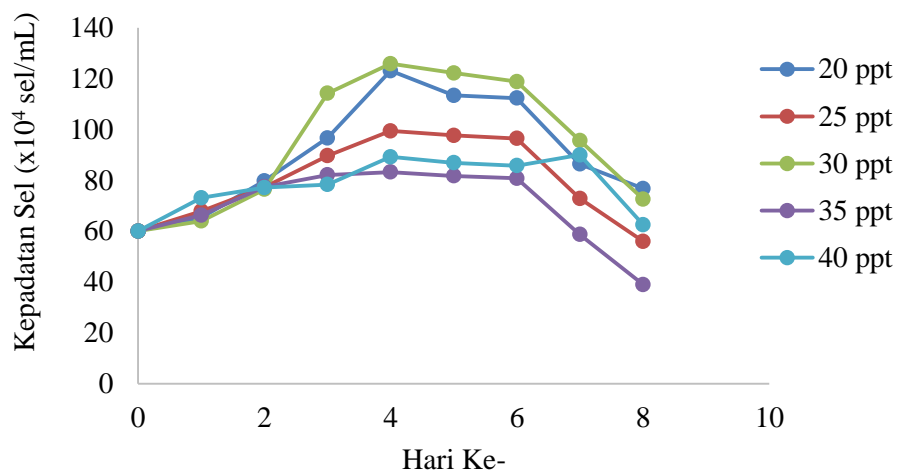
Kepadatan sel paling rendah terjadi pada perlakuan D (35 ppt) dan E (40 ppt). Ini menunjukkan bahwa adanya penurunan pertumbuhan yang berada pada salinitas tinggi. Hal ini diduga karena adanya penurunan kinerja fotosintesis. Pernyataan ini sejalan dengan Singh dan Kashtriya (2002) yang menyatakan bahwa pada salinitas tinggi mikroalga mengalami penurunan kinerja proses fotosintesis. Kinerja fotosintesis yang menurun pada salinitas tinggi disebabkan oleh klorofil yang terdisintegrasi akibat ion Na^+ yang berlebih (Ashraf dan Harris, 2013). Keadaan salinitas tinggi membuat lingkungan sekitar sel akan menjadi lebih pekat dari keadaan normalnya sehingga sel akan

cenderung menarik ion dan sel akan kekurangan air untuk menyeimbangkan keadaan cairan di dalam sel. Kebeish *et al.* (2014) menyatakan bahwa salinitas yang tinggi mengakibatkan sel memiliki ion berlebih yang bersifat toksik. Kekurangan air dalam sel juga menyebabkan kandungan klorofil dalam mikroalga berkurang.

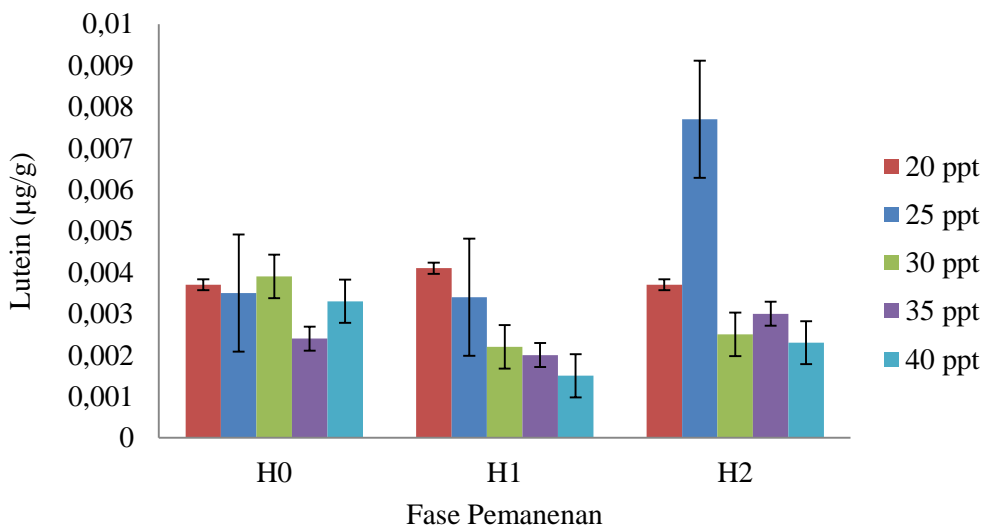
Kandungan lutein tertinggi yang dipanen pada masa puncak terjadi pada perlakuan salinitas 30 ppt dengan nilai sebesar $0,0039 \mu\text{g/g}$. Hasil perhitungan pada pemanenan masa satu hari setelah masa puncak menunjukkan bahwa lutein tertinggi terdapat pada perlakuan salinitas 20 ppt sebesar $0,0041 \mu\text{g/g}$. Lutein yang dipanen dua hari setelah masa puncak memiliki kandungan lutein tertinggi ($p < 0,05$) pada salinitas 25 ppt sebesar $0,0077 \mu\text{g/g}$. Kandungan lutein paling tinggi didapatkan pada fase stasioner perlakuan B (25 ppt) (Gambar 2).

Fase ini menunjukkan bahwa *D. salina* melakukan proses pembentukan karotenoid yang berperan sebagai pertahanan diri terhadap senyawa-senyawa reaktif yang dapat mengganggu fungsi sel. Mikroalga *D. salina* mengalami tekanan osmotik akibat perbedaan salinitas pada media kultivasi. Kadar garam pada media kultivasi akan berpengaruh terhadap pembentukan karotenoid. Hal ini disebabkan karena ion Na^+ dan Cl^- mengganggu keseimbangan osmotik antar bagian dalam sel dengan lingkungan luar sel (Imron *et al.*, 2016). Ketidakseimbangan ini akan mendorong sel untuk beradaptasi yang salah satunya dengan cara mengeluarkan metabolit sekunder untuk mendukung penyesuaian hidup sel terhadap peningkatan salinitas.

Menurut Imron *et al.* (2016), tekanan salinitas akan menimbulkan tekanan osmolaritas media yang berakibat pada perubahan tatanan lipid membran plasma. Perubahan tatanan lipid ini berakibat pada aktivasi dari protein kinase yang kemudian akan dipecah menjadi asam piruvat dan digunakan sebagai dasar dari pembentukan senyawa-senyawa karotenoid. Asam piruvat pada mikroalga hijau akan digunakan bersamaan dengan Gliseraldehida-3-Fosfat untuk pembentukan Isopentenylpyrophosphate (IPP). Kemudian molekul IPP bergabung dengan dimetilalil pirofosfat (DMAPP) untuk menghasilkan geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). Senyawa GGPP inilah yang merupakan prekursor dari semua karotenoid (Ramos *et al.*, 2011). Pigmen lutein yang merupakan turunan likopen adalah hasil dari metabolit sekunder yang akan meningkat jumlahnya apabila mengalami suatu tekanan karena sel akan semakin rentan



Gambar 1. Pertumbuhan sel *D. salina* pada perlakuan salinitas yang berbeda selama 8 hari pengamatan



Gambar 2. Kandungan Lutein *D. salina* pada perlakuan salinitas yang berbeda

terhadap senyawa reaktif oksigen yang semakin banyak bermunculan. Hal ini didukung oleh Pisal dan Lele (2005) yang menyatakan bahwa suatu tekanan akan mengakibatkan kondisi keseimbangan sel terganggu dan mengakibatkan terciptanya radikal bebas yang berlebih. Pigmen lutein ini diproduksi sebagai bentuk pertahanan diri dari kondisi keseimbangan yang terganggu.

KESIMPULAN

Mikroalga *Dunaliella salina* dapat tumbuh di semua perlakuan salinitas yang diberikan. Salinitas mempengaruhi pertumbuhan sel *D. salina*. Pertumbuhan sel yang paling baik untuk *D. salina* terdapat pada media dengan kadar salinitas 30 ppt. Salinitas juga mempengaruhi kandungan pigmen lutein *D. salina*. Kandungan pigmen lutein tertinggi didapatkan pada

media dengan kadar salinitas 25 ppt pada fase stasioner 2.

DAFTAR PUSTAKA

Abu-Rezq, T.S., Al-Hooti, S., Jacob, D., Al-Shamli, M., Ahmed, A., & Ahmed, N. 2010. Induction and Extraction of α -Carotene From The Locally Isolated *Dunaliella salina*. *Journal Algal Biomass Utilization* 1(4):58-83

Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press., UK.

Ashraf, M. dan P.J.C Harris. 2013. Photosynthesis Under Stressful Enviroments: An Overvie. *Photosyntetica*, 51(2):163-190.

de Jaeger, L., Carreres, B.M., Springer, J., Schaap, P.J., Eggink, G., Dos Santos, V.A.M., Wijffels, R.H. & Martens, D.E. 2018. *Neochloris oleoabundans* is worth its

- salt: Transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PLoS one*, 13(4):0194834.
- Djunaedi, A., Chrisna, A.S. & Sardjito. 2017. Kandungan Pigmen Polar dan Biomassa pada Mikroalga *Dunaliella salina* dengan Salinitas yang Berbeda. *Jurnal Kelautan Tropis*. 20(1):1-6.
- Frete, H., A.B. Susanto., Budhy P., & Leenawanty, L. 2012. Karotenoid dari Makroalga dan Mikroalga: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. *Jurnal. Teknologi dan Industri Pangan*, 23(2):221-228.
- Guedes, A.C., Helena M.A., & Fransisco, X.M. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Journal Marine Drugs*, 9:625-644.
- Hajare, R., Ray, A., Shreya, T.C., Avadhani, M.N. & Selvaraj, I.C., 2013. Extraction and quantification of antioxidant lutein from various plant sources. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(1):152-157.
- Imron, M.A., Sudarno & Mastihah, E.D. 2016. Pengaruh Salinitas Terhadap Kandungan Lutein pada Mikroalga *Botryococcus braunii*. *Journal Marine and Coastal Science* 5(1): 36-48.
- Isnansetyo, A & Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton; Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Kebeish, R., El-Ayouty, Y. & Hussein, A. 2014. Effect of Salinity on Biochemical Traits and Photosynthesis-Related Gene Transcription in *Chlorella vulgaris*. *Egypt Journal Botany* 54(2):281-294.
- Khaira, K. 2010. Menangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan. *Journal Saintek*, 2(2): 183-187.
- Kusmiati, Ni Wayan S.A., Swasono R., & Melia, I. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink. *Jurnal Kimia Indonesia*, 5(1): 30-34.
- Pisal, D.S. & Lele, S.S. 2005. Carotenoid Production from Microalgae *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 476-483.
- Rahma, H.N., Prayitno, S.B. & Haditomo, A.H.C., 2014. Infeksi white spot syndrome virus (WSSV) pada udang windu (*Penaeus monodon* Fabr.) yang dipelihara pada salinitas media yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(3):26-34.
- Ramos, A.A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J.C., Jin, E.S. & Varela, J.C., 2011. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1):3-20.
- Roberts, R. L., Justin G., & Brandon L. 2009. Lutein and Zeaxanthin in Eye and Skin Health. *Journal Clinics in Dermatology*, (27):195-201.
- Saputra, N., M.C. Handini & Sinaga, T.R. 2018. Faktor Risiko yang Mempengaruhi Kejadian Katarak (Studi Kasus Kontrol di Poli Klinik Mata RSUD Dr. Pringadi Medan Tahun 2017). *Jurnal Ilmiah Simantek*, 2(1):104-113.
- Singh, D.P. & Kashtriya, K. 2002. NaCl-induced Oxidative Damage in The Cyanobacterium *Anobena doliolum*. *Journal Microbiology*, 44:411-417.
- Zainuddin, M., N. Hamid, L. Mudiarti, N. Kursistyanto, & Aryono, B. 2017. Pengaruh Media Hiposalin dan Hipersalin Terhadap Respon Pertumbuhan dan Biopigmen *Dunaliella salina*. *Jurnal Enggano*, 2(1):46-57.