

Identifikasi Molekuler *Chlorella sorokiniana* menggunakan Marka ITS dan 18S rDNA serta Produksi Karotenoid dengan Perlakuan Cahaya

Muhammad Iskandar Zulkarnain¹, Hermin Pancasakti Kusumaningrum^{1*}, Nurhayati¹,
Agung Suprihadi², Muhammad Zainuri³

¹Program Studi Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

²Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

³Departemen Oseanografi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

Email: herminpk@live.undip.ac.id

Abstrak

Chlorella sorokiniana merupakan salah satu mikroalga penghasil astaxantin. Produksi astaxantin *C. sorokiniana* dapat meningkat pada kondisi kultur yang optimal. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan identitas *C. sorokiniana* secara molekuler menggunakan ITS, dan 18S rDNA, serta untuk mengetahui pertumbuhan dan produksi astaxantin *C. sorokiniana* berdasarkan perlakuan cahaya. Metode yang digunakan pada penelitian ini meliputi kultivasi mikroalga *C. sorokiniana*, isolasi DNA, uji kuantitatif DNA, identifikasi molekuler melalui proses amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan marka molekuler ITS dan 18S rDNA, visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis menggunakan *GelDoc* diikuti sekuensing DNA. Produksi astaxantin mikroalga *C. sorokiniana* dihitung selama 10 hari dibawah perlakuan cahaya matahari dan sinar UV. Identifikasi molekuler *C. sorokiniana* menggunakan ITS memperoleh dengan ukuran fragmen sebesar 500 pb, sedangkan fragmen 18S rDNA sebesar 600 pb. Pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana* kontrol pada hari ke-10 dengan kerapatan 15×10^6 sel/mL, sedangkan pada perlakuan cahaya matahari dan sinar UV pada hari ke-10 dengan kerapatan $38,45 \times 10^6$ sel/mL. Konsentrasi astaxantin yang dihasilkan mikroalga *C. sorokiniana* pada perlakuan kontrol mencapai tertinggi 0,3306 mg/mL dan pada perlakuan cahaya matahari dan sinar UV meningkat mencapai 0,3874 mg/mL.

Kata kunci : Mikroalga, 18S rDNA, ITS, Identifikasi Molekuler, *Chlorella sorokiniana*

Abstract

Molecular Identification of Chlorella sorokiniana using ITS Markers and 18S rDNA and Production of Carotenoids by Light Treatment

Chlorella sorokiniana is one of the astaxanthin-producing microalgae. Astaxanthin production of *C. sorokiniana* can be increased under optimal culture conditions. This study aims to determine the molecular identity of *C. sorokiniana* using ITS and 18S rDNA, as well as to determine the growth and production of astaxanthin *C. sorokiniana* based light treatment. The methods used in this study included *C. sorokiniana* microalgae cultivation, DNA isolation, DNA quantitative testing, molecular identification through the process of DNA amplification with PCR (*Polymerase Chain Reaction*) using ITS and 18S rDNA molecular markers, visualization of PCR results by electrophoresis using *GelDoc* followed by sequencing DNA. The astaxanthin production of *C. sorokiniana* microalgae was calculated for 10 days under sunlight and UV light treatment. Molecular identification of *C. sorokiniana* using ITS obtained a fragment size of 500 bp, while the 18S rDNA fragment was 600 bp. The growth of *C. sorokiniana* microalgae was controlled on day 10 with a density of 15×10^6 cells/mL, whereas in the treatment of sunlight and UV light on day 10 with a density of $38,45 \times 10^6$ cells/mL. The concentration of astaxanthin produced by *C. sorokiniana* microalgae in the control treatment reached 0,3306 mg/mL and in the sunlight and UV light treatments it increased to 0,3874 mg/mL.

Keywords : Microalgae, 18S rDNA, Molecular Identification, *Chlorella sorokiniana*

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan salah satu penghasil karotenoid alami terbesar. Komposisi karotenoid penting yang dikandung oleh mikroalga terdiri dari

β -karoten, astaxantin, lutein, zeaxantin, kriptoxantin dan fukoxantin, dimana memiliki peranan bagi makhluk hidup khususnya manusia (Kusumaningrum dan Zainuri, 2014; Kusumaningrum *et al.*, 2021). Salah satu

*Corresponding author

DOI:10.14710/buloma.v12i2.46705

<http://ejournal.undip.ac.id/index.php/buloma>

Diterima/Received : 09-06-2022

Disetujui/Accepted : 16-03-2023

mikroalga yang dapat menghasilkan karotenoid astaxantin adalah *Chlorella sorokiniana*. Astaxantin merupakan salah satu pigmen karotenoid xantofil utama dari mikroalga *C. sorokiniana*. Mikroalga *C. sorokiniana* tersebut juga mengandung asam lemak tak jenuh (81,34%) yang terdiri dari asam palmitoleat (16:1) sebesar 22,85%, asam linoleat (18:2), 28,27%; asam oleat (C18:1), 14,38%; dan asam eikosapentanoat (20:5), 4,49% (Yadavali *et al.*, 2021). Keunggulan astaxantin adalah berperan penting bagi kesehatan manusia yaitu mencegah peradangan, fotooksidasi sinar UV, penuaan dan makula terkait usia, degenerasi, dan kanker dan dalam peningkatan kekebalan tubuh respon, fungsi hati, kesehatan jantung, dan lain sebagainya (Do *et al.*, 2019; Awaliyah, 2019). Astaxantin memiliki aplikasi luas di industri farmasi, kosmetik, makanan, dan pakan hewan budidaya akuakultur. Menurut marketsandmarkets.com, nilai ekonomi astaxantin global diperkirakan bernilai US\$ 647 juta pada tahun 2021 dan US\$ 965 juta pada tahun 2026. Astaxantin memiliki potensi besar di pasar global karena berdaya nilai jual tinggi yaitu berkisar antara US\$ 2500–7000/kg (Koller *et al.*, 2014; Witono, 2018). Produksi astaxantin mikroalga dipengaruhi oleh aerasi, intensitas cahaya, suhu dan nutrisi (Bocanegra, 2004). Cahaya diperlukan untuk sintesis astaxantin, karotenoid yang bertanggung jawab atas warna merah pada alga *C. sorokiniana*. Pada hasil penelitian Suyono *et al.*, (2016) dan Awaliyah (2019) dikemukakan bahwa cahaya matahari dan sinar UV menjadi faktor yang berperan dalam meningkatkan produksi astaxantin *H. pluvialis* dengan hasil kadar astaxantin 0,745 mg/L.

Identifikasi dan karakterisasi molekuler merupakan data yang akurat untuk digunakan identifikasi suatu spesies, khususnya bagi mikroalga yang akan digunakan dalam industri (Hadi *et al.*, 2016). Karakterisasi molekuler diperlukan bagi pengembangan potensi mikroalga *C. sorokiniana*. Beberapa marka yang telah digunakan dalam karakterisasi molekuler *C. sorokiniana* dari beberapa daerah adalah 18S rDNA, *Internal Transcribed Spacer (ITS)* dan *rbcL* (Chekano *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Zainul, 2016; Alanagreh *et al.*, 2017; Beatrice-Lindner *et al.*, 2018).

Marka *ITS* adalah salah satu penanda DNA yang berasal dari DNA ribosomal yang umum digunakan untuk karakterisasi molekuler pada DNA tanaman. Proses karakterisasi molekuler

menggunakan *ITS* dilakukan dengan fragmen DNA untuk mengidentifikasi spesies tanaman, identifikasi tingkat spesies keanekaragaman hayati, dan asal-usul untuk peninjauan studi ekologi (Cheng, 2016).

Gen penyandi 18S rDNA merupakan salah satu kontrol *internal* yang banyak digunakan karena gen tersebut tereksresi pada semua jaringan sel. Daerah 18S rDNA adalah komponen berasal dari subunit besar ribosom sel eukariotik (Andariyusti *et al.*, 2021).

Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui identitas molekuler *C. sorokiniana* menggunakan marka *ITS*, dan 18S rDNA, serta untuk mengetahui pertumbuhan dan produksi karotenoid *C. sorokiniana* berdasarkan perlakuan cahaya matahari dan sinar UV.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang.

Kultivasi Mikroalga

Kultivasi *C. sorokiniana* dilakukan menggunakan erlenmeyer. Sebanyak 100 mL isolat dikultivasi dalam 900 mL air tawar steril dan 1 mL pupuk Walne. Suplai cahaya dilengkapi dengan aerasi menggunakan pompa dan lampu. Pengamatan pertumbuhan dilakukan pada suhu 23 – 29°C selama 14 hari (Gildantia *et al.*, 2022).

Perlakuan Cahaya

Kombinasi cahaya matahari dan sinar ultraviolet digunakan sebagai perlakuan dan lampu putih digunakan sebagai kontrol. Perlakuan sinar matahari dilakukan selama 12 jam, perlakuan sinar ultraviolet dilakukan selama 3 jam/hari, dan kontrol sinar lampu putih selama 24 jam/hari.

Isolasi DNA

Isolasi DNA mikroalga menggunakan metode *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB)* (Doyle and Doyle, 1987). Sebanyak 400 mL *C. sorokiniana* disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 5 menit. Sampel dipindahkan ke mortar dan dihaluskan dengan pestel. *Buffer CTAB* sebanyak 1 mL ditambahkan, lalu sampel dihaluskan hingga menjadi bubur halus. Sampel

dipindahkan ke *microtube* baru, kemudian diinkubasi pada *waterbath* (65°C) selama 30 menit. *Chloroform Isoamylalcohol* (CIA) 24:1 sebanyak 0,5 mL (500 µL) ditambahkan ke sampel, lalu divortex selama 1 menit, kemudian disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* baru dan ditambahkan 800 µL CIA 24:1 dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 10 menit, ulangi langkah yang telah dilakukan sampai tidak ada lapisan putih di antara supernatan dan CIA 24:1. Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* baru dan ditambahkan isopropanol sesuai dengan volume supernatan yang didapatkan, kemudian divortex selama 1 menit. Sampel disimpan pada suhu -20°C selama semalam. Sampel disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 5 menit. Pelet dilarutkan dengan 100 µL Bufer TE, dan ditambah 500 µL etanol, kemudian dibolak-balik secara perlahan. Sampel disimpan pada suhu -20°C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 5 menit. Fase cair dibuang hingga pelet mengering (pelet melekat di dasar tabung). Setelah pengeringan, DNA dicuci dengan etanol 500 µL, lalu ditumpahkan dengan hati-hati. Sampel DNA dikeringkan dengan meletakkan *microtube* terbalik di atas tisu. Setelah pengeringan, DNA dilarutkan dengan 50 µL Bufer TE. Sampel DNA dapat disimpan pada suhu -20°C.

Uji Kuantitatif DNA Mikroalga *C. sorokiniana* (*NanoDrop*)

Uji kuantitatif DNA berfungsi untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA. Uji

kuantitatif menggunakan *NanoDrop*. *NanoDrop spektrofotometer* dikalibrasi dengan ddH₂O sebanyak 1 µL. Software *NanoDrop* (ND-2000) dibuka dan diklik “*Nucleic Acid*”. DNA sampel dimasukkan sebanyak 1µL, kemudian menu “*Measure*” diklik untuk mendapatkan data konsentrasi DNA pada perangkat komputer.

Amplifikasi Menggunakan Marka Molekuler *ITS* dan *18S rDNA*

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR dengan primer *ITS* dan *18S rDNA*. Primer *ITS* yang digunakan adalah *ITS 4* (5`- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3`) dan *ITS 5* (5`--GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G –3`). Primer PCR *ITS 4* dan *ITS 5* digunakan untuk mengamplifikasi daerah *ITS* (*ITS 1*, *5.8S*, and *ITS 2*) (White *et al.*, 1990). Program amplifikasi dengan primer *ITS* tertera pada Tabel 1.

Campuran PCR *ITS* terdiri dari 25 µL *MyTaq* PCR kit, 2 µL primer *ITS 5* (*forward*), 2 µL primer *ITS 4* (*reverse*), 3 µL sampel DNA Mikroalga *C. sorokiniana*, dan 18 µL ddH₂O. Primer 18S rDNA yang digunakan adalah 18S rDNA *Forward* (5`- GTA GTC ATA TGC TTG TCT - 3`) dan 18S rDNA *Reverse* (5`- GCT GGC ACC ASA CTT GCC CT - 3`). Program amplifikasi dengan primer 18S rDNA tertera pada Tabel 2.

Campuran PCR *ITS* terdiri dari 25 µL *MyTaq* PCR kit, 2 µL primer 18S forward, 2 µL primer 18S rDNA reverse, 3 µL sampel DNA mikroalga *C. sorokiniana*, dan 18 µL ddH₂O (Rismiarti *et al.*, 2016).

Tabel 1. Program Amplifikasi DNA *C. sorokiniana* Primer *ITS*

<i>Initial Denaturation</i>	95°C 1’ 35 Siklus
<i>Denaturation</i>	95°C 30”
<i>Annealing</i>	55°C 30”
<i>Extension</i>	72°C 15”
<i>Post Extension</i>	72°C 5’

Tabel 2. Program Amplifikasi DNA *C. sorokiniana* Primer 18S rDNA

<i>Initial Denaturation</i>	95°C 1’ 35 Siklus
<i>Denaturation</i>	95°C 30”
<i>Annealing</i>	52°C 30”
<i>Extension</i>	72°C 15”
<i>Post Extension</i>	72°C 5’

Visualisasi Hasil PCR dengan Elektroforesis

Visualisasi hasil PCR menggunakan Elektroforesis gel agarose 1% dan ditambah 4 µL *FloroSafe* DNA stain. Campuran DNA Ladder mix terdiri dari 3 µL *DNA Ladder* dan 1 µL *Loading Dye*, lalu dimasukkan ke sumuran pertama di gel agarosa. Sebanyak 3 µL sampel *C. sorokiniana* hasil amplifikasi dimasukkan ke sumuran kedua pada gel agarose. Elektroforesis dilakukan menggunakan Bio-Rad USA pada voltase 100 Volt selama 30 menit dan dicitrakan dengan gel documentation.

Sekuensing

Sampel DNA disekuensing dengan sampel dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia beserta primer ITS dan 18S rDNA untuk proses sekuensing.

Analisis Sekuensing

Data hasil sekuensing dianalisis untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara *C. sorokiniana* menggunakan ITS dan 18S rDNA. Analisis dilakukan menggunakan *software* BioEdit untuk membuat file dengan format FASTA, lalu diolah menggunakan *software* MEGA X untuk analisis filogenetik.

Analisis Produksi Astaxantin Mikroalga *C. sorokiniana*

Mikroalga *C. sorokiniana* dipindahkan ke tabung falkon 15 mL lalu disentrifugasi pada 2.500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan larutan heksana ke dalam tabung falkon. Sampel direndam dengan air di dalam gelas beaker untuk proses pemecahan dinding sel dengan alat Sonicator. Sampel disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dipindahkan ke wadah baru. Langkah tersebut dilakukan hingga supernatan yang dihasilkan berwarna bening. Supernatan yang sudah terkumpul di wadah baru dievaporasi. Kemudian hasil endapan evaporasi ditambahkan larutan heksana. Analisis spektrofotometri astaxantin dilakukan dengan 2-3 mL larutan dimasukkan ke

kuvet, kemudian diukur dengan panjang gelombang spektrofotometer 470 nm. Setelah itu, absorbansi larutan pigmen diukur. Konsentrasi astaxantin ditentukan menggunakan persamaan Lambert-Beer yang disesuaikan (Britton *et al.*, 1995) :

$$C \text{ (mg/mL)} = \left(\frac{\lambda_{470}}{125.100 \times l} \div 10 \right) \times 596.841$$

Keterangan : λ_{470} = Absorbansi pada Panjang gelombang 470; l = Tebal kuvet; 100 = Koefisien molar absorbansi astaxantin; 596.841 = Massa molar astaxantin (g/mol); C = Konsentrasi astaxantin (mg/mL)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Molekuler

Berdasarkan hasil pengukuran kualitatif dan kuantitatif DNA pada Tabel 3. memperoleh nilai kemurnian dan konsentrasi yang baik. Kemurnian DNA diantara 1,8 – 2,0 menunjukkan hasil isolasi yang murni dengan tingkat kontaminasi yang rendah. Nilai rasio kurang dari 1,8 kemungkinan sampel terkontaminasi protein serta bahan organik dengan nilai rasio lebih dari 2,0 maka kontaminasi disebabkan oleh fenol dan RNA. Sambrook & Russell (1989) menyatakan bahwa DNA dikatakan murni apabila mempunyai angka (A_{260}/A_{280}) dalam kisaran 1,8-2,0.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Liana (2017), didapatkan hasil kemurnian dan konsentrasi dari mikroalga *Chlorella* sp. adalah 2,02 dan 143,57 ng/µL. Penelitian yang dilakukan oleh Fitriyah *et al.* (2021), didapatkan hasil kemurnian dan konsentrasi dari mikroalga *C. sorokiniana* adalah 1,87 dan 453,8 ng/µL. Penelitian yang dilakukan oleh Rismiarti *et al.* (2016), didapatkan hasil kemurnian dan konsentrasi dari mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris*. Pada mikroalga *C. pyrenoidosa* diperoleh kemurnian 1,88 dengan konsentrasi 277,5 ng/µL. Pada mikroalga *C. vulgaris* diperoleh kemurnian 1,803 dengan konsentrasi 589,5 ng/µL.

Tabel 3. Hasil Spektrofotometer *NanoDrop* DNA mikroalga *C. sorokiniana*

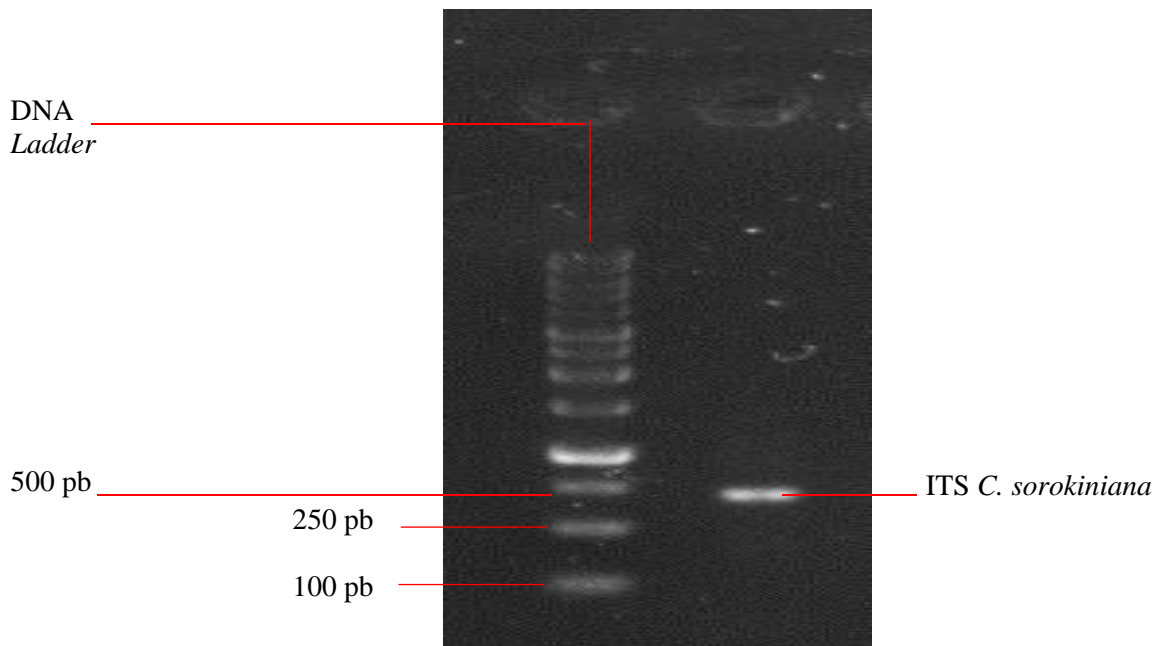
Nama Sampel	λ_{260}	λ_{280}	Konsentrasi (ng/µL)	Kemurnian (A_{260} / A_{280})
<i>C. sorokiniana</i>	1,60	0,85	79,90	1,88

Sekuens *C. sorokiniana* dengan Primer ITS yang diperoleh telah disubmit ke GenBank dan memperoleh nomor aksesinya yaitu ON668126. Hasil visualisasi DNA mikroalga *C. sorokiniana* menggunakan Primer ITS tertera pada Gambar 1 menunjukkan pita DNA hasil isolasi terlihat jelas dengan satu pita DNA. Pita DNA yang terlihat memiliki ukuran genom 500 pb.

Sekuens *C. sorokiniana* dengan Primer 18S rDNA yang diperoleh telah disubmit ke GenBank dan memperoleh nomor aksesinya yaitu ON631959. Hasil visualisasi DNA mikroalga *C. sorokiniana* menggunakan Primer 18S rDNA tertera pada Gambar 2 menunjukkan pita DNA hasil isolasi terlihat jelas dengan satu pita DNA. Pita DNA yang terlihat memiliki ukuran genom 500 pb.

Hillis & Davis (1988) menyatakan bahwa

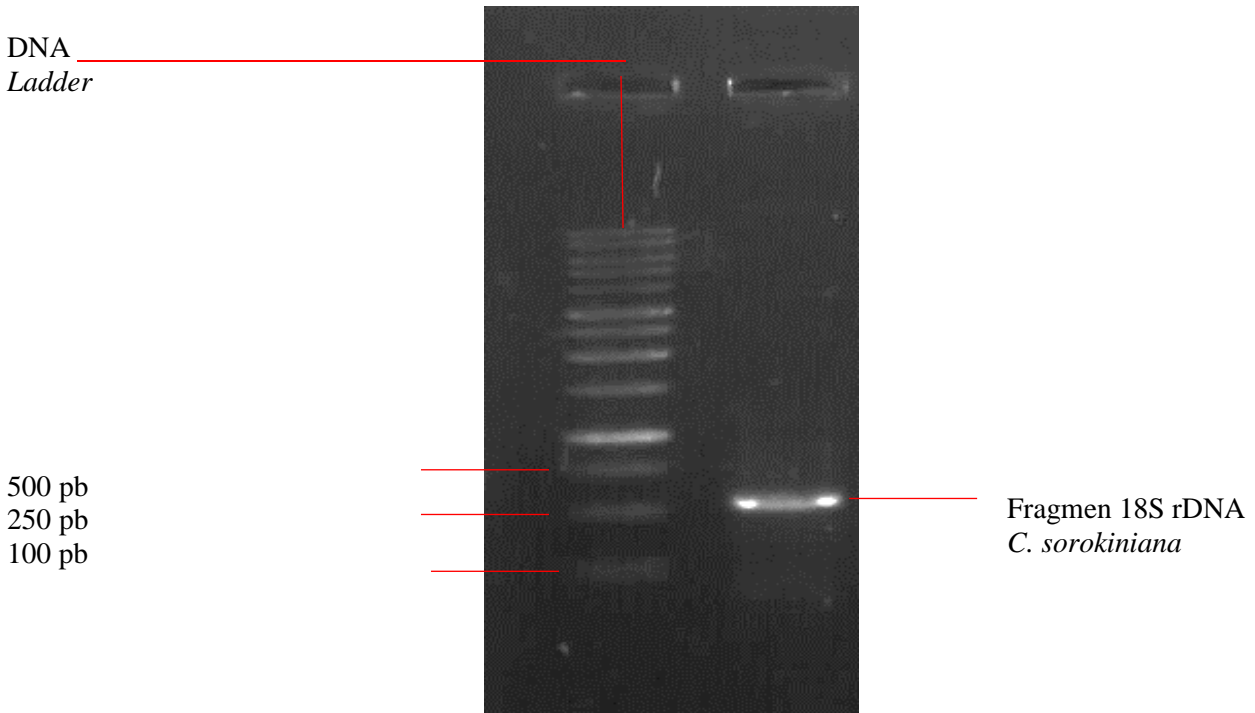
ukuran pendek dari ribosomal DNA sudah dapat digunakan untuk analisis homologi dan filogenetik. Pembacaan sekuensing oleh mesin yang baik berkisar antara 500 pb. Pada penelitian yang dilakukan oleh Fitriyah *et al.* (2021), hasil amplifikasi DNA *C. sorokiniana* diperoleh dengan ukuran pita ± 615 pb. Pada penelitian yang dilakukan oleh Rismiarti *et al.* (2016), hasil amplifikasi DNA *C. pyrenoidosa* diperoleh dengan ukuran pita ± 1.600 pb dan hasil amplifikasi DNA *C. vulgaris* diperoleh dengan ukuran pita ± 1.250 pb. Hasil BLAST *C. sorokiniana* primer ITS sesuai dengan Tabel 4 menunjukkan *C. sorokiniana* komersial Primer ITS memiliki homologi dengan *C. sorokiniana* strain UTEX1665 dengan kemiripan mencapai 99,61%.



Gambar 1. Visualisasi fragmen ITS *C. sorokiniana*

Tabel 4. Hasil BLAST NCBI DNA mikroalga frgamen ITS *C. sorokiniana*

Spesies	Kemiripan	Nomor Aksesinya
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain UTEX1665	99,61%	KJ676113.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain KLL-G018 clone a	99,48%	KP726221.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain KLL-G018 clone c	99,35%	KP726220.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain UTEX1230	99,61%	KJ676112.1



Gambar 2. Visualisasi fragmen 18S rDNA *C.sorokiniana*



Gambar 3. Hasil Analisis Filogenetik daerah ITS *C. sorokiniana*

Konstruksi pohon filogenetik *C. sorokiniana* dengan primer ITS sesuai Gambar 3 menunjukkan bahwa sampel *C. sorokiniana* komersial Primer ITS berada dalam satu kelompok dengan *Chlorella* lainnya. Sampel *C. sorokiniana*

komersial Primer ITS berada dalam kelompok monofiletik dengan *Chlorella* lainnya. Panjang cabang sampel *C. sorokiniana* komersial Primer ITS memiliki panjang cabang yang lebih panjang (0,002) dibandingkan dengan panjang cabang

lainnya. Menurut Hall (2001) semakin besar nilai panjang cabang maka terdapat lebih banyak perubahan sekuens yang terjadi. Hasil BLAST *C. sorokiniana* dengan Primer 18S rDNA sesuai dengan Tabel 5 menunjukkan *C. sorokiniana* komersial Primer 18S rDNA memiliki homologi dengan *C. sorokiniana* strain KU-1019 dengan kemiripan mencapai 99,63%.

Konstruksi pohon filogenetik *C. sorokiniana* dengan primer 18S rDNA sesuai Gambar 4 menunjukkan bahwa sampel *C. sorokiniana* komersial Primer 18S rDNA berada dalam satu kelompok dengan *Chlorella* lainnya. Sampel *C. sorokiniana* komersial Primer 18S rDNA berada dalam kelompok monofiletik dengan *Chlorella* lainnya. Panjang cabang sampel *C. sorokiniana* komersial Primer 18S rDNA dengan *C. sorokiniana* strain KU-1019 adalah 0,000, menunjukkan *C. sorokiniana* komersial Primer 18S rDNA identik dengan *C. sorokiniana* strain KU-1019. Panjang cabang 0,000 menunjukkan bahwa tidak ada perubahan sekuens yang terjadi sesuai dengan pernyataan Hall (2001).

Laju Pertumbuhan Mikroalga *C. Sorokiniana*

Berdasarkan Gambar 5, pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana* kontrol tertinggi pada hari ke-6 dengan kerapatan 19×10^6 sel/mL. Pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana* perlakuan cahaya matahari dan sinar UV tertinggi pada hari ke-10 dengan kerapatan $38,45 \times 10^6$ sel/mL.

Laju pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana* pada perlakuan cahaya matahari dan sinar UV lebih tinggi jika dibandingkan dengan laju pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana* kontrol. Laju pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh intensitas cahaya. Menurut Benavente-Valdés *et al.* (2016), kondisi cahaya merupakan faktor penting bagi pertumbuhan mikroalga yang dapat memberikan pengaruh secara fisiologis dan keberlangsungan fotosintesis. Hasil penelitian Fakhri *et al.* (2017) terhadap mikroalga *Nannochloropsis* sp. menunjukkan bahwa peningkatan intensitas cahaya memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan, biomassa, klorofil-a, dan karotenoid.

Tabel 5. Hasil BLAST NCBI daerah 18S rDNA mikroalga *C. sorokiniana*

Spesies	Kemiripan	Nomor Akses
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain KU-1019	99,63%	KF444207.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain CMBB-146	99,63%	MH443351.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> 18S ribosomal RNA gene	99,63%	KT388090.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain NON001	99,63%	MF101221.1



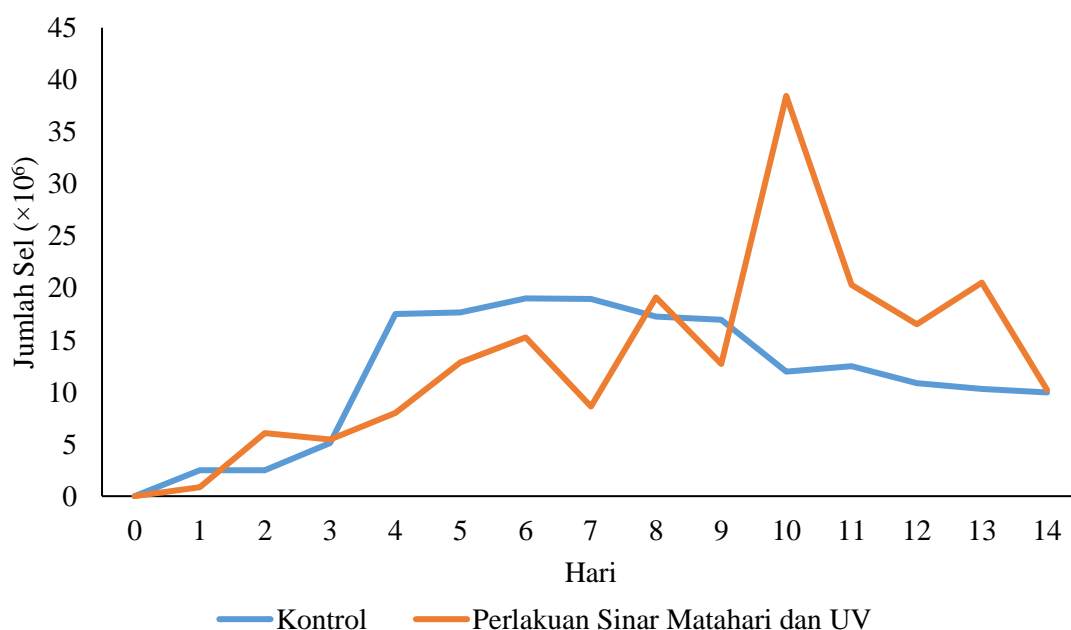
Gambar 4. Hasil Analisis Filogenetik daerah 18S rDNA *C. sorokiniana*

Ketersediaan nutrisi mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana*. Suminto (2009) menggunakan media Walne terhadap *Spirulina platensis*. Hasil penelitian Suminto (2009) menunjukkan bahwa perlakuan W memiliki kelimpahan sel tertinggi, diduga karena konsentrasi N dalam NaNO_3 yang tinggi pada media Walne membuat aktivitas metabolisme tetap berlangsung dalam jangka waktu yang optimum sehingga pembelahan sel masih terus berlangsung hingga masa puncak eksponensial. Raof *et al.* (2005) menyatakan sumber N pada KNO_3 dan NaNO_3 merupakan unsur yang penting (*essential*) bagi pertumbuhan sel *S. platensis* dan merupakan level kritis yang penting bagi keberadaan nitrogen pada skala massal produksi *S. platensis*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Raman & Mohamad (2012), pertumbuhan mikroalga *C. sorokiniana* tertinggi pada hari ke-14 dengan penambahan 0,14 g/L nitrat diperoleh kerapatan 0,6 pada absorbansi 620 nm. Novianti *et al.* (2017) melakukan penelitian pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* dengan perlakuan sumber cahaya yang berbeda. Pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* dengan perlakuan cahaya LED merah tertinggi pada hari ke-4 dengan kerapatan 115×10^6 sel/mL, perlakuan cahaya LED hijau tertinggi pada hari ke-4 dengan kerapatan $101,25 \times 10^6$ sel/mL, dan perlakuan cahaya LED biru tertinggi pada hari ke-

4 dengan kerapatan 100×10^6 sel/mL. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kristiyaningrum *et al.* (2013) diperoleh pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* tertinggi pada hari ke-5 dengan kerapatan $0,34 \times 10^6$ sel/mL dan mikroalga *C. vulgaris* fusan tertinggi pada hari ke-3 dengan kerapatan $0,42 \times 10^6$ sel/mL.

Media yang digunakan pada kontrol dan perlakuan cahaya matahari dan sinar UV menggunakan air tawar yang menggunakan media Walne. Pada kontrol pertumbuhan signifikan mulai terjadi pada hari ke-4 dan pada perlakuan cahaya matahari dan sinar UV pertumbuhan signifikan mulai terjadi pada hari ke-2 yang berarti proses pembelahan sel yang terjadi mulai optimal. Menurut Kristiyaningrum *et al.* (2013) setelah proses pembelahan sel mencapai puncak, maka tidak terjadi proses pembelahan sel lagi, yang artinya laju pertumbuhan seimbang dengan laju kematian. Tahap stasioner mulai terjadi pada hari ke-6 dikarenakan jumlah pertumbuhan sel fitoplankton dalam media kultur semakin banyak, namun jumlah kandungan nutrisi dalam media semakin menurun. Pada tahap stasioner foton cahaya yang dihasilkan tidak mampu diserap atau dimanfaatkan secara maksimal oleh mikroalga. *C. sorokiniana* mengalami tahap kematian, yaitu penurunan jumlah sel dikarenakan laju kematian sel lebih tinggi daripada laju pertumbuhan sel sehingga kepadatan populasi semakin menurun.



Gambar 5. Pertumbuhan *C. sorokiniana*

Tabel 6. Konsentrasi astaxantin mikroalga *C. sorokiniana*

Perlakuan	A_{470}	Konsentrasi Astaxantin (mg/mL)	Rata-rata (mg/mL)
Kontrol	0,477	0,2276	0,2767
	0,690	0,3306	
	0,570	0,2719	
Cahaya Matahari dan Sinar UV	0,558	0,2662	0,2661
	0,812	0,3874	
	0,303	0,1446	

Hasil Karotenoid (Astaxantin)

Konsentrasi astaxantin yang dihasilkan pada *C. sorokiniana* sesuai Tabel 6 menunjukkan bahwa astaxantin *C. sorokiniana* perlakuan kontrol tertinggi adalah 0.3306 mg/mL. Konsentrasi astaxantin yang dihasilkan pada *C. sorokiniana* perlakuan cahaya matahari dan sinar UV tertinggi adalah 0.3874 mg/mL. Konsentrasi astaxantin kontrol dengan perlakuan cahaya matahari dan sinar UV tidak berbeda nyata ($\text{Sig} > 0.05$). Intensitas cahaya menjadi faktor utama yang mempengaruhi produksi astaxantin pada *C. sorokiniana*. Yadavalli *et al.* (2021) menyebutkan bahwa astaxantin dapat terakumulasi di bawah tekanan lingkungan atau keadaan lingkungan yang tidak menguntungkan dalam *Cytosolic Lipid Bodies* (LBs), seperti intensitas cahaya yang berlebihan, salinitas tinggi, dan defisiensi nutrisi. Menurut Fauziah *et al.* (2019) pigmen karotenoid akan terbentuk secara optimum pada intensitas cahaya rendah. Pelah *et al.* (2004) menyatakan bahwa karotenoid jenis astaxantin dapat diproduksi secara optimum pada stress intensitas cahaya yang rendah. Intensitas cahaya yang tinggi dapat menghambat produksi astaxantin. Fakhri *et al.* (2017) menyatakan bahwa produksi karotenoid dapat terhambat oleh pengaruh radiasi ultraviolet, yaitu hambatan oleh cahaya (*photoinhibition*), kerusakan oleh cahaya (*photodamage*), dan oksidasi oleh cahaya (*photooxidation*) yang disebabkan oleh intensitas cahaya yang terlalu tinggi. Pada hasil penelitian Suyono *et al.* (2016) dan Awaliyah (2019) dikemukakan bahwa cahaya matahari dan sinar UV menjadi faktor yang berperan dalam meningkatkan produksi astaxantin *H. pluvialis* dengan hasil kadar astaxantin 0,745 mg/L. Pada penelitian yang dilakukan oleh Raman & Mohamad (2012), produksi astaxantin oleh mikroalga *C. sorokiniana* pada hari ke-14 dengan penambahan 0.14 g/L nitrat diperoleh 0.0011 g/L.

Secara keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa mikroalga yang digunakan adalah benar-benar *C. sorokiniana* berdasarkan identifikasi molekuler. Kedua marka yang digunakan sama-sama memperlihatkan kemiripan tertinggi dengan *C. sorokiniana*. Selain itu hasil penelitian juga memperlihatkan bahwa *C. sorokiniana* merupakan penghasil astaxantin. Hasil penelitian yang penting lainnya adalah perlakuan cahaya mampu meningkatkan produksi astaxantin sebesar sekitar 16% walaupun nilai rata-rata sedikit lebih rendah. Hal ini menjadi peluang bagi penelitian lebih lanjut untuk mencari perlakuan lain yang mampu mengoptimalkan produksi astaxantin pada *C. sorokiniana*.

KESIMPULAN

Mikroalga *C. sorokiniana* berhasil diidentifikasi menggunakan ITS dan 18S rDNA dengan panjang fragmen DNA 500 pb. Perlakuan cahaya matahari dan sinar UV meningkatkan pertumbuhan *C. sorokiniana*, namun tidak mempengaruhi produksi astaxantin yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alanagreh, L., Pegg, C., Harikumar, A. & Buchheim, M. 2017. Assessing intragenomic variation of the internal transcribed spacer two: Adapting the Illumina metagenomics protocol. *Plos One*, 12(7): e0181491. doi: 10.1371/journal.pone.0181491.
- Andariyusti, F. & Roslim, D.I. 2021. Analisis Sekuens DNA Penyandi 18S rRNA pada Tumbuhan Cocor Bebek (*Kalanchoe x laetivirens*). *Jurnal Bios Logos*, 11(2): 109-113.
- Awaliyah, R.B. 2019. Overproduksi Astaxantin pada *Haematococcus pluvialis* dengan

- Induksi Radiasi UV dan Penambahan BHT. *Journal of Pharmacopolium*, 2(3):179-187.
- Beatrice-Lindner, P., Garrido-Cardenas, J.A., Sepulveda, C., & Acien-Fernandez, F.G. 2018. A new approach for detection and quantification of microalgae in industrial-scale microalgal cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 8429-8436. doi: 10.1007/s00253-018-9268-y
- Benavente-Valdés, J.R., Aguilera, C., Contreras-Esquivela, J.C., Méndez Zavalab, A. & Montañezb, J. 2016. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae specie. *Biotechnology Reports*, 10:117–125. doi: 10.1016/j.btre.2016.04.001
- Belkoura, M., Benider, A., & Dauta, A. 1997. Effects of temperature, light intensity and growth phase on the biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 33: 3–11.
- Bocanegra, A.R.D. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxantin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92:209–214.
- Bohutskyi, P., Kligerman, D.C., Byers, N., Nasr, L.K., Cua, C., Chow, S., Su, C., Tang, Y., Betenbaugh, M.J. & Bouwer, E.J., 2016. Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their polyculture in primary and secondary wastewater. *Algal research*, 19:278-290.
- Britton, G., Liaaen-Jensen S., & Pfander, H. 1995. Carotenoids. Volume 1A: isolation and analysis (Vol. 1). Birkhäuser. doi: 10.1007/978-3-0348-7836-4.
- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., & Solovchenko, A. 2014. Accumulation of Astaxantin by a New *Haematococcus pluvialis* Strain BM1 from the White Sea Coastal Rocks (Russia). *Marine Drugs*, 12: 4504-4520; doi: 10.3390/md12084504
- Cheng, T. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for *ITS* regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16: 138–149.
- Do, T., Ong, B., Tran, M., Nguyen, D., Melkonian, M., & Tran, H. 2019. Biomass and Astaxantin Productivities of *Haematococcus pluvialis* in an Angled Twin-Layer Porous Substrate Photobioreactor: Effect of Inoculum Density and Storage Time. *Biology*, 8(68):1-14. doi: 10.3390/biology8030068
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Fakhri, M., Arifin, N.B., Hariati, A.M. & Yuniarti, A., 2017. Growth, biomass, and chlorophyll-a and carotenoid content of *Nannochloropsis* sp. strain BJ17 under different light intensities. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1):15-21. doi:10.19027/jai.16.1.15-21.
- Fauziah, A., Bengen, D.G., Kawaroe, M., Effendi, H. & Krisanti, M., 2019. Hubungan antara Ketersediaan Cahaya Matahari dan Konsentrasi Pigmen Fotosintetik di Perairan Selat Bali. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 11(1):37-48.
- Fitriyah, F. Faramitha, Y. Sari, D.A. Kresnawaty, I. Panji, T. & Santoso, D. 2021. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Chlorella* isolates from Indonesia using rbcL gene. *Menara Perkebunan*, 89(1):17-25.
- Gildantia, E., Ferniah, R.S., Budiharjo, A., Suprihadi, A., Zainuri, M., & Kusumaningrum, H.P. 2022. Identifikasi Spesies Mikroalga dari BBPBAP Jepara secara Morfologi dan Molekuler menggunakan 18S rDNA. *Buletin Oseanografi Marina*, 11(2):167-176.
- Hadi, S.I.I.A., Santana, H., Brunale, P.P.M., Gomes, T.G., Oliveira, M.D., Matthiensen, A., Oleivera, M. E.C., Silva, F.C.P., Bruno, S. & Brasil A.F. 2016. DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. *Plos One*, 11(2): p.e0149284. doi: 10.1371/journal.pone.0149284
- Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How - To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hillis, D.M. & Davis, S.K.. 1988. Ribosomal DNA: Intraspecific Polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction. *Systematic Zoology*, 37: 63-66.
- Kim, J.H., Affan, M.A., Jang, J., Kang, M.H., Ko, A., Jeon, S., Oh, C., Jeo, S., Le, Y., Ju, S. & Kang, D. 2014. Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Astaxantin-Producing Green Microalga

- Haematococcus* sp KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) Isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(2): 238-246. doi: 10.4014/jmb.1410.10032.
- Kristiyaningrum, D. Kusumaningrum, H.P. & Kusdiyantini, E. 2013. Analisis Kandungan B-Karoten Fusan Intraspecies *Chlorella vulgaris* san Aplikasinya sebagai Pakan Tambahan pada *Post Larva* Stadia 10 Udang Windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Biologi* 2(3):1-7.
- Kusumaningrum H.P., & Zainuri, M. 2014. Optimization and Stability of Total Pigments Production of Fusan from Protoplast Fusion of Microalgae *Dunaliella* and *Chlorella* in vivo : Attempts an Production of Sustainable Aquaculture Natural Food. *International Journal of Marine and Aquatic Resource Conservation and Co-existence*, 1(1):1-5
- Kusumaningrum H.P, Zainuri, M., Marhaendrajaya, I., Subagio, A., Widianingsih, Endrawati, H., Fadillah, A., Zulkarnain, M.I., Muliastuti, Y. & Misbach, I. 2021. Effect of Silver Nano Particle Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Dunaliella salina* on Growth and Survival of *Penaeus monodon* Larvae. *Buletin Oseanografi Marina*, 10(2):105–111.
- Liana, H.A. 2017. Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan Metode CTAB dan Identifikasi Sikuen 18S rDNA. Malang : Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Novianti, T. Zainuri, M. & Widowati, I. 2017. Studi tentang Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella vulgaris* yang Dikultivasi Berdasarkan Sumber Cahaya yang Berbeda. *Jurnal Magnifera Edu*, 1(2):1-8.
- Pelah, D., Sintov, A. & Cohen, E. 2004. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:483–486. doi: 10.1023/B:WIBI.0000040398.93103.21.
- Raman, R. & Mohamad, S.E. 2012. Astaxantin Production by Freshwater Microalgae *Chlorella sorokiniana* and Marine Microalgae *Tetraselmis* sp. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(24):1182-1186.
- Raof, B., Kaushik, B.D. & Prasanna, R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina. *Biomass and bioenergy*, 30(6): 537-542.
- Rismiarti, A., Kusumaningrum, H.P. Zainuri, M., & Pujiyanto, S. 2016. Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Fusan Hasil Fusi Protoplas Interspecies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Chlorella vulgaris* menggunakan 18S rDNA. *Bioma*, 18(1):30-40.
- Sambrook, J., & Russell, D.W. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition. New York: Laboratory Pr.
- Suminto, S., 2009. Penggunaan jenis media kultur teknis terhadap produksi dan kandungan nutrisi sel *Spirulina platensis*. *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 4(2): 53-61
- Suyono, E.A., Aminin, Pradania, L., Mu'avatuna, U., Habibaa, R.N., Ramdaniyaha, & Rohma, E.F. 2016. Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of Microalga *Haematococcus pluvialis*. *Procedia Environmental Sciences*, 28:399–405
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J.1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA, pp. 315–322.
- Yadavalli, R., Ratnapuram, H., Peasari, J.R., Reddy, C.N., Ashokkumar, V. & Kuppam, C., 2021. Simultaneous production of astaxanthin and lipids from *Chlorella sorokiniana* in the presence of reactive oxygen species: a biorefinery approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12: 881–889. doi: 10.1007/s13399-021-01276-5.
- Zainul, R. 2016. Isolation and molecular identification of freshwater microalgae in Maninjau Lake West Sumatra. *Der Pharmacia Lettre*, 8(20):177-187.