

Fusi Protoplas Interspesies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Dunaliella salina*

¹Yudi Yunanto, ¹Hermin Pancasakti Kusumaningrum, and ²Sri Pujiyanto

¹Laboratorium Genetika

²Laboratorium Mikrobiologi

Jurusan Biologi, Fakultas Sains & Matematika, Universitas Diponegoro

Tembalang, Semarang – 50275

Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Email : kamiyayuu07@gmail.com

ABSTRACT

Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Dunaliella salina* have been used as natural aquaculture food supplement because the previous contains 60,5% proteins and 180,8 mg/100g β -carotene and the other were accumulated β -carotene by 95% from their total carotenoid. Carotenoid production can be improved by protoplast fusion technique. The aim of the research was conducted protoplast fusion of from *C. pyrenoidosa* and *D. salina* in order to gaining boarder salinity spectrum for natural aquaculture food supplement. The research methodology consist of protoplast isolation followed by protoplast fusion process induced by PEG6000 and regeneration of fusant. Protoplast fusion was done in three different PEG incubation time that are 15, 30 and 45 minutes. The fusants were grown in 2 different medium, sea water media and fresh water media. Research result shows that optimal fusion incubation time with PEG6000 is at 30 minutes. Fusant can grown in both medium and revealed higher β -carotene contents 2,008 μ g/ml comparing with their parents.

Keywords: Protoplast fusion, Chlorella pyrenoidosa, Dunaliella salina, β -carotene.

PENDAHULUAN

Ketersediaan pakan merupakan suatu hal yang menentukan dalam proses budidaya perairan. Mikroalga adalah organisme sumber pakan alami hewan budidaya yang bermanfaat bagi manusia, contohnya adalah *Chlorella* dan *Dunaliella* (Krismono, 1992; Beveridge *et al.*, 1994; Adi, 2011). *Chlorella* merupakan bioindikator kualitas air, kultivasinya mudah dan ekonomis (Riffiani, 2010). Sementara itu *D. salina* mampu mengakumulasi β -karoten sebesar 95% dari total karotenoid yang dihasilkannya (Jiménez dan Pick, 1994 dalam Mendoza *et al.*, 2008) sehingga dimanfaatkan dalam bidang kesehatan untuk manusia dan industri untuk provitamin A, antioksidan dan pewarna aditif dalam budidaya hewan akuakultur (Kusumaningrum *dkk.*, 2003; Pital and Lele, 2005).

Karotenoid dibutuhkan oleh larva udang untuk perlindungan intrasel melalui stabilitas membran, survival dan pertumbuhan dengan membuang radikal oksigen bebas, akan tetapi hewan akuakultur tersebut tidak dapat mensintesisnya sendiri (Darachai *et al.*, 1998). Karotenoid pada

mikroalga fotosintetik merupakan pigmen warna yang diperlukan untuk melindungi sel dari cahaya matahari berlebihan dan bekerja pada panjang gelombang 450 – 570 nm (Krinksky, 1979; Khachik *et al.*, 1986; Olson, 1994; Van den Berg *et al.*, 2000) Pencarian karotenoid pada tumbuhan membutuhkan proses yang lama dan hanya bagian tertentu dari tumbuhan yang dapat memberi karotenoid dalam jumlah maksimal contohnya pada buah atau daun saja serta produksi yang amat bergantung pada keadaan iklim (Kamffer *et al.*, 2010; Maldonade *et al.*, 2007).

CARA KERJA

Kultur Sel Induk

Kultur mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *D. salina* didapatkan dari BBPBAP Jepara (Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau). Sel dikultur dengan menggunakan aerasi dan iluminasi. Pengukuran jumlah sel dilakukan dengan menghitung jumlah sel dengan menggunakan hemositometer pada kotak dengan lebar 1mm selama 24 jam sekali. Kepadatan yang

didapat adalah $N \times 10^4$ sel/ml (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

Fusi Protoplas

Fusi protoplas dilakukan menggunakan Glisin 2%, NaCl 2%, KCl 0,6 M, $CaCl_2$ 0,1 M, PEG 6000 35% dan enzim Lisosim 20 $\mu\text{g/ml}$. Sel kedua induk dalam jumlah yang sama dicampur kemudian disentrifugasi untuk didapatkan peletnya. Pelet yang diperoleh kemudian ditempatkan dalam larutan penstabil osmotik. Pelet hasil preparasi dihilangkan dinding selnya menggunakan enzim Lisosim 20 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 60 μl ; 3% NaCl sebanyak 3 ml dan $CaCl_2$ sebanyak 100 μl . Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 20 menit untuk inkubasi agar lisosim bekerja secara maksimal. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Proses fusi protoplas mikroalga menggunakan metode modifikasi Tjahjono *et al.* (1994) dan Uppalati & Fujita (2002). Pelet hasil litik ditambahkan dengan larutan penginduksi fusi sebanyak 1800 μl , $CaCl_2$ sebanyak 300 μl dan Glisin 2% sebanyak 150 μl . Sampel kemudian dibagi menjadi 3 untuk perlakuan 15, 30 dan 45 menit waktu inkubasi dalam suhu ruang. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Pelet dicuci dengan penstabil osmotik kemudian ditambah $CaCl_2$ sebanyak 60 μl dan glisin 2% sebanyak 30 μl . Sampel diinkubasi pada suhu ruang untuk optimasi fusi selama 15 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit dan dicuci dengan larutan penstabil osmotik. Sel rekombinan ditumbuhkan dalam air laut dan air tawar dan kemudian ditambahkan pupuk dengan takaran 4 : 1 (medium pertumbuhan : pupuk). Kultur diinkubasi selama 5-7 hari sambil diamati pertumbuhannya.

Analisis β -karoten

Analisis β -karoten menggunakan metode modifikasi dari Hejazi *et al.* (2002). Sampel sebanyak 2 ml disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Pelet yang didapatkan kemudian diberi ditambahkan isopropanol sebanyak 5 ml. Sampel kemudian divortex dengan rentang waktu 1-2 menit dengan tujuan untuk mengekstraksi karotenoid. Proses vortex harus dilakukan sampai sel mikroalga bercampur hal ini diindikasikan dengan larutan yang berubah keruh. Apabila sel mengendap dan tidak

tercampur maka dilakukan penggojogan manual dengan mikropipet dan kembali divortex. Setelah divortex sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Fasa atas diambil untuk pengukuran pigmen β -karoten dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan blanko isopropanol. Nilai absorbansi dan penghitungan kadar β -karoten didapatkan dengan rumus menurut Deutsch (1995) :

$$\text{Abs} = 2 - \log T$$

Keterangan :

Abs = nilai absorbansi

T = Transmittent yang didapat

Kadar β -karoten didapat dengan menggunakan rumus :

$$\beta\text{-karoten } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs } (\lambda) : (196 \times l \times (\text{vol. awal} : \text{vol. akhir}))$$

Keterangan

Abs = nilai absorbansi

λ = panjang gelombang yang digunakan (436 nm)

196 = koefisien ekstingsi β -karoten

l = ukuran cuvet yang digunakan

HASIL PENGAMATAN DAN PEMBAHASAN

a. Hasil fusi Protoplas

Fusi protoplas dilakukan dengan tiga tahapan utama, yaitu preparasi sampel, proses lisis dinding sel, dan proses fusi. Sel hasil proses litik memiliki penampakan bulat *spherical*. Menurut Kaladharan (1998) penampakan seperti ini adalah penampakan *spheroplast*. Apabila sel tersebut diuji dengan uji warna menggunakan safranin sebagaimana dikemukakan oleh Lu *et al.*, (2011), maka didapatkan hasil bahwa sel yang litik bagian dalamnya akan berwarna lebih gelap karena tidak ada dinding sel yang menghalangi masuknya safranin ke dalam sel. Penampakan pada proses fusi lebih terlihat seperti sel yang bergumpal. Hal ini dikarenakan protoplas menjadi saling tarik menarik dengan adanya efek PEG. Proses regenerasi dinding sel

memperlihatkan nukleus dua protoplasma yang berbeda bisa berfusi atau tidak berfusi sama sekali meskipun setelah mengalami fusi sitoplasma. Sel heterokaryon atau heterocyte adalah sel yang binukleat, sel yang nukleusnya terfusi disebut hybrid atau synkaryocyte dan ketika hanya sitoplasma yang berfusi dan informasi genetik dari salah satu atau kedua nuklei hilang dinamakan cybrid (Doods dan Roberts, 1985). Hasil fusi mendapatkan bahwa sel yang diamati kebanyakan memiliki bentuk hampir serupa dengan *C. pyrenoidosa* namun berbeda jauh dengan *D. salina* baik fusan yang dikulturkan dalam medium air laut maupun dalam medium air tawar. Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa fusi protoplas telah terjadi karena salah satu ciri yang menandai bahwa fusi protoplas berhasil menghasilkan rekombinan baru adalah penampakkannya yang secara morfologis berbeda dengan induk yang digunakan sebagai bahan dasar fusi. Selain itu ciri lainnya adalah dapat hidup dalam medium yang berbeda (Fungaro *et al.*, 1992). Fusan memerlukan waktu untuk dapat mengoptimalkan pembentukan dinding selnya. Pada *Bryopsis plumosa* yang masih termasuk alga hijau, dalam waktu 20 menit rekombinan sudah dapat membentuk dinding sel setelah pemberian *lysozyme* (Kim *et al.*, 2009). Hasil penelitian Honjoh *et al.* (2003) menyatakan bahwa protoplas fusan *Chlorella vulgaris* dapat tumbuh dan beregenerasi dengan efisien pada medium agar terutama Bacto-agar baik secara agitasi maupun tidak.

b. Karakter Fusan *C. pyrenoidosa* dan *D. salina*

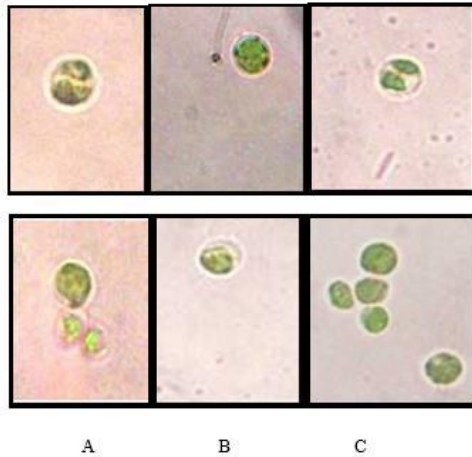
Hasil fusi protoplas mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *D. salina* telah memperoleh beberapa fusan yang berbeda karakternya. Fusan yang dihasilkan dapat memiliki kombinasi karakter dari kedua induk ataupun memperlihatkan sifat dominan dari salah satu induk. Sel fusan ada yang memiliki bentuk seperti *C. pyrenoidosa* namun mampu tumbuh pada medium air tawar dan air laut (Gambar 1). Fusan ini berbeda dengan induk *C. pyrenoidosa* yang tidak mampu hidup pada kadar salinitas tinggi. Fusan yang lain memiliki morfologi seperti *C. pyrenoidosa* namun motil seperti *D. salina*. Selain itu juga diperoleh fusan yang

memiliki morfologi seperti *D. salina* namun tidak motil. Fusan berikutnya memiliki morfologi seperti *C. pyrenoidosa* namun dapat hidup di air laut atau sebaliknya fusan memiliki morfologi seperti *D. salina* namun dapat hidup pada air tawar. Beberapa jenis fusan yang diperoleh sesuai dengan media pertumbuhan dan waktu inkubasi diperlihatkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Salah satu morfologi sel fusan yang tumbuh pada medium air laut perbesaran 1000x (Ds, dinding sel; Klo, kloroplas)

Perolehan beberapa jenis fusan memperlihatkan bahwa pemilihan PEG sebagai agen penginduksi fusi protoplas telah sesuai untuk diterapkan pada fusi *C. pyrenoidosa* dan *D. salina*. Proses penginduksian fusi dengan bahan kimia atau *chemofusion* telah menjadikan metode fusi yang paling banyak diminati. Hal ini dikarenakan proses ini dapat menghasilkan produk fusan secara masal, dapat digunakan pada hampir semua makhluk hidup (non-spesifik) serta tidak membutuhkan biaya yang banyak (Verma, 2008). PEG dengan nilai *Mr* antara 1500 - 6000 dapat digunakan untuk proses fusi antar spesies yang sama maupun antar spesies yang berbeda. Senyawa PEG akan membuat sel saling menempel dengan lekat sehingga dapat membantu membran antar induk untuk dapat berfusi (Gotz *et al.*, 1981).



Gambar 2. Bentuk Sel Fusan Pada Kultur Air laut (atas) dan Air Tawar (bawah) Perbesaran 1000x : A. 15 menit waktu inkubasi, B. 30 menit waktu inkubasi, C. 45 menit waktu inkubasi

Keberhasilan fusi secara umum selain ditentukan oleh jenis enzim yang digunakan untuk lisis dinding sel, waktu inkubasi dan konsentrasi PEG juga dipengaruhi oleh kestabilan *spheroplast*. Hal ini menyebabkan fusi protoplas memerlukan larutan penstabil osmotik. Fusi antara dua spesies dan dua genus yang berbeda merupakan penyatuan dua karakter yang kemiripannya sangat jauh. Hal ini sangat berpengaruh terhadap keberhasilan dan perolehan fusan. Persentase regenerasi fusi dengan demikian menjadi lebih rendah sebagaimana diperlihatkan pada Tabel 1.

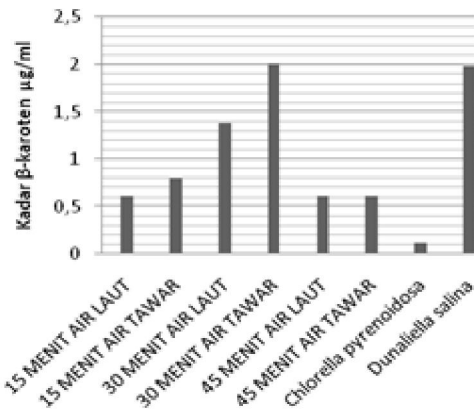
Tabel 1. Frekuensi Regenerasi Fusi

Waktu Inkubasi	Frekuensi Regenerasi Fusi	
	Medium Air Tawar	Medium Air Laut
15 menit	25,15 %	23,80 %
30 menit	27,03 %	29,52 %
45 menit	23,94 %	18,52 %

c. Kandungan β -karoten fusan

Hasil analisis β -karoten menunjukkan bahwa β -karoten yang dihasilkan fusan umumnya memiliki produksi yang tinggi seperti *D. salina* bahkan beberapa memiliki kadar lebih tinggi dari induk. Hasil analisis β -karoten fusan disajikan pada Gambar 3. Kandungan β -karoten yang lebih tinggi tersebut diperkirakan disebabkan oleh adanya gabungan karakter antara *C.*

pyrenoidosa dan *D. salina*. Pigmen β -karoten pada *C. pyrenoidosa* merupakan metabolit primer yang terbentuk bersamaan dengan pertumbuhan. β -karoten pada *C. pyrenoidosa* akan meningkat pada fase log namun akan semakin sedikit pada masa fase stasioner (Gouvica *et al.*, 2006).



Gambar 3. Kadar β -karoten fusan pada medium air laut dan air tawar

Sedangkan mikroalga *D. salina* memiliki 2 macam β -karoten yaitu *all trans* β -karoten dan 9-*cis*-isomer β -karoten. *All trans* β -karoten disintesis bersamaan dengan pembentukan klorofil dan memiliki kurva produksi yang sama dengan β -karoten *C. pyrenoidosa*. Jenis β -karoten kedua pada *D. salina* yaitu 9-*cis*-isomer- β -karoten akan disintesis pada fase logaritmik namun akan disimpan dalam lapisan lipid pada kloroplas dan digunakan untuk menghadapi cekaman lingkungan yang berlebihan. Hal ini menyebabkan *D.salina* lebih tahan terhadap salinitas dan intensitas cahaya yang tinggi.

KESIMPULAN

Fusi interspesies *Dunaliella salina* dan *Chlorella pyrenoidosa* menghasilkan sel rekombinan yang mampu tumbuh pada kedua medium pertumbuhan baik air laut maupun air tawar serta memproduksi β -karoten yang cenderung memiliki jumlah lebih banyak dibandingkan sel induk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memperkenankan peneliti untuk membantu dalam penelitian Hibah Bersaing tahun 2013

yang berjudul Aplikasi Pakan Alami Kaya Krotenuoid Dari Mikroalga Hasil Fusi Protoplas *Dunaliella* dan *Chlorella* untuk Meningkatkan Ketahanan Penyakit Pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.) dengan surat perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Multi Tahun TA.2013 No: 154a-12/UN7.5/PG/2013 tanggal 15 Pebruari 2013 dengan Tim Peneliti Dr. Hermin Pancasakti Kusumaningrum, SSi., MSi. dan Prof. Dr. Muhammad Zainuri, DEA.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Adi, V. Ap. S. 2011. Analisa Usaha Budidaya Perikanan. Pusat Penyuluhan Kelautan dan Perikanan. Jepara
- [2] Deutsch. 1995. Vitamins and Other Nutrients. AOAC Official Methods. Chemical Methods. Carotenes and Xanthophylls. 45 : 5-6
- [3] Beveridge, C.M., Ross, L.G. and Kelly, L.A., 1994. Aquaculture and Bio-Diversity. *Ambio.*, 23: 497-502.
- [4] Darachai J, S. Piyatiratitivorakul, P. Kittakoo, C. Nitithamyong, and P. Menasveta. 1998. Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- [5] Doods dan Roberts. 1985. Experiments In Plant Tissue Culture 2nd edition. Cambridge University Press. New York
- [6] Fungaro, H. P. Maria, J. L. de Azevedo, and A. A. Pizzirani-Kleiner. 1992. Genetic Recombination After Protoplast Fusion in *Candida* sp. . *Brazil Journal Genetics*. 15(3):499-507.
- [7] Gotz, F, S Ahrné and M Lindberg. 1981. Plasmid Transfer and Recombination by Protoplast Fusion in Staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 145(1):74-81
- [8] Gouviea, L., V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais, and J. Empis. 1996. Evolution of Pigment Composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 57 : 157 – 163.
- [9] Hejazi. M. A., C. de Lamariere, J.M.S Rocha, M. Vermue and J. Tramper. 2001. Selective Extraction of Carotenoids from Microalga *Dunaliella salina* with Retention of Viability. *Biotechnology and Engineering*. 79(1):29-36.
- [10] Honjoh, K., T. Machida, T. Hagsako, K. Suga, I. Maruyama, T. Miyamoto, S. Iatano and M. Iio. 2003. Preparation of Protoplasts from *Chlorella vulgaris* K-73122 and Cell Wall Regeneration of Protoplasts from *C. vulgaris* K-73122 and C-27. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 47(2):257-266
- [11] Kaladharan, P. 1998. Protoplast – A Powerful Tool In Genetic Manipulation of Commercial Seaweeds. *Proc. First Natl. Semi. Mar. Biotech*.
- [12] Kamfer, Z., K.A. Bindon, and A. Oberholster. 2010. Optimization of a Method for the Extraction and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls during Ripening in Grape Berries (*Vitis vinifera* cv. Merlot). *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 58:6578–6586
- [13] Khachik, F., G. R. Beecher and N. F. Whitaker. 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem*. 34:603-616.
- [14] Kim G.H., T.A. Klotchkova dan Y.M. Kang. 2001. Life Without a Cell Membrane: Regeneration of Protoplasts from Disintegrated Cells of The Marine Green Alga *Bryopsis plumosa*. *J. Cell Sci*. 114 : 2009-2014
- [15] Krinsky, N. 1979. Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem*. 51: 649–660
- [16] Krismono. 1992. Penelitian Potensi Sumberdaya Perairan Waduk Wadaslintang, Mrica, Karangates dan Waduk Selorejo untuk Budidaya Ikan dalam Keramba Jaring Apung. Buletin Penelitian Perikanan Darat. 11(2):20
- [17] Lu, Y., R. Kong, and L. Hu. 2011. Preparation Protoplasts from *Chlorella protothecoides*. *World J. Microbio. Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-011-0963-4
- [18] Maldonade , I. R., R. Adilma, P. Scamparini., and D. B. Rodriguez-Amaya. 2007. Selection And Characterization of

- Carotenoid-Producing Yeasts from Campinas Region, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 38 : 1
- [19] Mendoza, H., A. de la Jara, K. Freijanes, L. Carmona, A.A. Ramos, V.de Sousa Duarte dan J. C.S.Varela. 2008. Characterization of *Dunaliella salina* Strains by Flow Cytometry : A New Approach to Select Carotenoid Hyperproducing Strains. *Electronic Journal of Biotechnology* (2008) 11: 1-13.
- [20] Olson, J.A. 1994. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Journal Pure & Applied Chemistry*, 66 (5):1011-1016
- [21] Pisal, D.S. and S. S Lele. 2005. Carotenoid Production from Microalgae *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*. 4: 476-483
- [22] Riffiani, R. 2010. Penggunaan Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Chick Amobil Untuk Meningkatkan Kualitas Air dalam Akuakultur. *Jurnal Hidrosfir Indonesia*. 5:25 – 33.
- [23] Tjahjono, A.E., T. Kakizono, Y. Hayama, N. Nishio and S. Nagai. 1994. Isolation of Resistent Mutants against Carotenoid Biosynthesis Inhibitors for a Green Alga *Haematococcus pluvialis*, and their Hybrid Formation by Protoplast Fusion for Breeding of Higher Astaxanthin Producer. *J. of Fermentation and Bioengineering*. 77(4):352 – 357
- [24] Uppalapati S.R. and Y. Fujita. 2002. A simple method for mass isolation of protoplasts from species of *Monostroma*, *Enteromorpha* and *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales). Springer. *J. of Appl. Phycology*, 14(3):165-168
- [25] Van den Berg, H., R.Faulks, H. F. Granado, J. Hirschberg, B. Olmedilla, G. Sandmann, S. Southon, and W. Stahl. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal Science Food Agriculture*. 80(7):880–912
- [26] Verma, N., M.C. Bansal., and V. Kumar. 2008. Protoplast fusion Technology and Its Biotechnological applications. *Chemical Engineering Transactions*. 14:113-120