

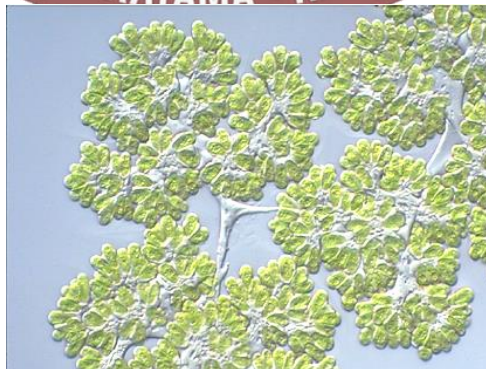
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Mikroalga *Botryococcus braunii*

Botryococcus braunii merupakan mikroalga hijau berbentuk bulat hingga buah pir dengan ukuran sel (panjang×lebar) dalam rentang (8–9×5) μm x (13×7–9) μm (Tasić et al., 2016) (Gambar 2.1). *Botryococcus braunii* berhabitat di perairan air tawar dan payau di daerah beriklim sedang dan tropis di seluruh dunia. Kondisi optimal untuk pertumbuhan dan produksi metabolit berada pada pH 6 – 8,5 (Dayananda et al., 2006) dan 4% CO_2 (Nugroho et al., 2020). Mikroalga ini ditemukan dalam kumpulan besar yang mengambang (Levine & Fleurence, 2018). Menurut GBIF (2023), *Botryococcus braunii* merupakan salah satu spesies dari genus *Botryococcus* dan familia Botryococcaceae. Botryococcaceae bersifat kosmopolitan dan tersebar luas di berbagai jenis habitat perairan. Koloninya muncul sebagai kumpulan warna hijau dan coklat yang tersuspensi. Ukuran sel dan koloni sangat bergantung pada kondisi lingkungan (Kim, 2013). Tujuh belas spesies dari genus *Botryococcus* telah ditemukan hingga saat ini (Guiry & Guiry, 2017). Namun, karakteristik diagnostik seperti bentuk koloni, warna, dan ukuran sel berpotensi berubah pada strain klonal ketika ditempatkan dalam kondisi kultur berbeda (Kawachi et al., 2012).



Gambar 2.1 Morfologi Koloni *Botryococcus braunii*

Sumber: Krishna et al., 2012

Botryococcus braunii merupakan salah satu jenis mikroalga yang dapat mengakumulasi hidrokarbon rantai panjang dan lipid eter pada matriks ekstraselulernya, sehingga dapat menjadi alternatif pengganti minyak mentah. *Botryococcus braunii* diklasifikasikan menjadi tiga kelompok besar berdasarkan struktur kimia hidrokarbon yang dihasilkannya, yaitu ras A, B, dan L. Ras A menghasilkan n-alkadiena dan/atau n-triena serta turunannya dengan nomor karbon ganjil. Ras B menyintesis triterpena spesifik bernama botryococcenes dan squalene termetilasi. Sedangkan, ras L menghasilkan hidrokarbon tetraterpenoid tunggal bernama likopadiena (Kawachi et al., 2012). Secara umum, *Botryococcus braunii* mengakumulasi triasilgliserol dan asam lemak jenuh pada awal pertumbuhan dalam kondisi kultur yang tercekam untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Kemudian, pada fase eksponensial, hidrokarbon menjadi komponen utama, yang dikeluarkan ke ruang ekstraseluler, sehingga mendukung kelangsungan hidup sel. Tahap terakhir merupakan fase stasioner yaitu sel mendukung sintesis triasilgliserol dan asam lemak jenuh yang penting untuk produksi biodiesel (Tasić et al., 2016).

2.1.2 Gen Ortolog *LEC1* dan *MYB1*

Homologi menunjukkan hubungan keturunan yang sama antara entitas, tanpa spesifikasi lebih lanjut mengenai skenario evolusi. Oleh karena itu, entitas yang dihubungkan oleh homologi, khususnya gen, disebut homolog. Dua istilah lainnya mendefinisikan subkategori homolog, yaitu ortolog dan paralog. Ortolog adalah gen yang berhubungan melalui spesiasi (keturunan vertikal), sedangkan paralog adalah gen yang berhubungan melalui duplikasi. Kombinasi peristiwa spesiasi dan duplikasi, bersama dengan transfer gen horizontal, hilangnya gen, dan penataan ulang gen, melibatkan ortolog dan paralog ke dalam jaringan hubungan yang kompleks (Koonin, 2005).

Gen penyandi faktor transkripsi dianggap berkontribusi terhadap keanekaragaman dan evolusi. Identifikasi faktor transkripsi dan situs

pengikatan faktor transkripsionalnya sangat penting dalam memanipulasi jaringan regulasi untuk sifat-sifat yang diinginkan dari molekul target. Selain itu, kontrol laju inisiasi transkripsi oleh faktor transkripsi merupakan cara penting untuk memodulasi ekspresi gen, dan kemudian mengatur pertumbuhan dan perkembangan organisme, termasuk respon terhadap lingkungan (Corrêa et al., 2008).

LEC1 adalah gen yang mengontrol perkembangan biji pada tumbuhan. *LEC1* diekspresikan terutama dalam jaringan embrio dan memainkan fungsi biologis penting dalam mengendalikan perkembangan embrio akhir dan pembentukan kotiledon pada tumbuhan tingkat tinggi. Namun, penerapan ekspresi berlebih pada gen ini juga dapat mempengaruhi gen lain seperti *ABI3* dan *FUS3* yang selanjutnya memengaruhi gen yang mengontrol sintesis asam lemak (Wang & Perry, 2013). Hilangnya fungsi mutasi *LEC1* menyebabkan embrio abnormal secara fenotip, cacat pada penyimpanan protein dan akumulasi lipid (Santos-Mendoza et al., 2008), serta fenotip terkait etiolasi pada bibit awal di *Arabidopsis* (Huang et al., 2015). Ekspresi *BnaLEC1* yang berlebihan di bawah promotor khusus benih (Napin A) dari *Brassica napus* menyebabkan tumbuhan transgenik *Arabidopsis* menjadi abnormal setelah perkecambahan dengan kematian total atau kemandulan. Namun, ketika aktivitas promotor hanya 18% dari aktivitas aslinya, pertumbuhan dan perbanyakan tumbuhan normal terjadi peningkatan kandungan lipid yang luar biasa (Tan et al., 2011). Para peneliti dalam penelitian Liu et al. (2021) mengekspresi *AtLEC1* secara berlebihan di *Chlorella ellipsoidea* dan membudidayakan strain transgenik dalam kondisi mixotrofik dan autotrofik. Berdasarkan hasil qRT-PCR, profil ekspresi gen kunci dalam jalur sintesis lipid, seperti *ACCase*, *GPDH*, *PDAT1*, dan *DGAT1*, berubah secara signifikan. Dengan membandingkan gen yang diekspresikan secara berbeda yang diatur oleh *AtLEC1* pada *Chlorella ellipsoidea* dan *Arabidopsis*, teramati bahwa sekitar 59% (95/160) gen yang terkait dengan metabolisme lipid diregulasi dalam transgenik *AtLEC1 Chlorella*. Penelitian

tersebut menyediakan cara untuk meningkatkan kandungan lipid dengan mengintroduksi faktor transkripsi eksogen dan menyajikan kemungkinan mekanisme regulasi akumulasi lipid *AtLEC1* pada *Chlorella ellipsoidea*.

Keluarga protein MYB pada tumbuhan dicirikan oleh adanya domain pengikatan DNA MYB yang dilestarikan yang biasanya berisi satu hingga empat pengulangan tidak sempurna (Li et al., 2015). Protein MYB mengatur berbagai proses seluler dengan membentuk kompleks dengan protein lain pada tumbuhan (Xu et al., 2015). Protein MYB berfungsi dalam beragam proses biologis termasuk pengaturan metabolisme primer dan sekunder, perkembangan benih dan bunga, nasib dan identitas sel, pertahanan, dan respons terhadap stres pada tanaman. Keluarga MYB adalah salah satu keluarga faktor transkripsi terbesar pada tumbuhan, mewakili sekitar 9% dari total faktor transkripsi di *Arabidopsis* (Riechmann et al., 2000). Keluarga MYB diklasifikasikan menjadi empat subfamili berdasarkan jumlah dan posisi pengulangannya, yaitu 4R-MYB, R1R2R3-MYB, R2R3-MYB dan 1R-MYB (Dubos et al., 2008). *MYB1* diperlukan untuk ekspresi gen yang terlibat dalam dua jalur metabolisme lipid yang penting yaitu ekspor asam lemak dari kloroplas ke retikulum endoplasma dan dalam biosintesis triasilgliserol di retikulum endoplasma (Choi et al., 2022). *MYB1* adalah regulator positif penting dari akumulasi lipid di bawah cekaman, tetapi fungsi *MYB1* pada metabolisme lipid mikroalga dalam kondisi pertumbuhan standar masih belum jelas. Faktor transkripsi tipe MYB LRL1 pada *Chlamydomonas* berinteraksi dengan CrTTG1 dan CrbHLH2 untuk mengatur respons kelaparan fosfor. Karena *MYB1* termasuk dalam kelompok filogeni protein MYB yang sama dengan LRL1, ada kemungkinan bahwa *MYB1* juga membentuk kompleks protein untuk regulasi transkripsional gen metabolisme lipid di bawah keterbatasan nitrogen (Hidayati et al., 2019). Keluarga faktor transkripsi MYB tipe R2R3 baru (*MYB1*) di *Chlamydomonas* merupakan regulator positif penting dari akumulasi lipid di bawah kondisi kultur rendah nitrogen (Choi et al., 2022).

yang mudah digunakan sebagai bahan baku produksi bioetanol dalam kondisi pertumbuhan yang optimal karena tidak adanya atau rendahnya kandungan lignin darinya. Ketika ditempatkan dalam kondisi stres, banyak spesies mikroalga menghasilkan sejumlah besar lipid netral yang biasanya dalam bentuk triasilgliserol sebagai produk penyimpanan karbon dan energi, sehingga muncul istilah mikroalga oleaginous. Peristiwa ini biasanya terjadi pada sel yang aktif secara fotosintesis, akumulasi triasilgliserol dalam mikroalga secara konseptual lebih mirip dengan akumulasi triasilgliserol yang diinduksi stres pada jaringan vegetatif tumbuhan dibandingkan dengan proses terkait dalam perkembangan biji tumbuhan. Oleh karena itu, pemahaman tentang akumulasi triasilgliserol pada mikroalga juga dapat memberikan wawasan penting untuk rekayasa akumulasi triasilgliserol pada jaringan vegetatif tumbuhan (Zhi-Yan & Christoph, 2016).

Cekaman dapat bersifat kimia atau non-kimia, dan pemicu utama akumulasi triasilgliserol berbasis bahan kimia adalah berbagai keterbatasan nutrisi, sedangkan pemicu stres non-kimia utama adalah suhu dan intensitas cahaya. Fase pertumbuhan suatu kultur dan penuaan kultur mikroalga juga mempengaruhi kandungan triasilgliserol dan komposisi asam lemak karena nutrisi menjadi terbatas dan senyawa yang bersifat toksik terakumulasi saat kultur memasuki fase stasioner.

Mikroalga *Nannochloropsis* sp. dapat mengakumulasi triasilgliserol sebagai senyawa penyimpanan karbon dan energi utama dalam kondisi teratur atau stres (Meng et al., 2015). *Nannochloropsis* sudah menyintesis triasilgliserol dalam jumlah besar (~10% berat kering) dalam kondisi kaya nutrisi (Taleb et al., 2015). Meskipun *Nannochloropsis* menghasilkan hingga 20% berat kering karbohidrat seperti mono dan polisakarida dalam kondisi kekurangan nutrisi, triasilgliserol adalah senyawa cadangan utama pada kondisi tersebut. Misalnya, *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 dapat mengakumulasi triasilgliserol dalam jumlah besar dalam tetesan lipid setelah kekurangan nitrogen, dan memetabolisme ulang triasilgliserol untuk

pertumbuhan selama pasokan nitrogen tercukupi (Zhi-Yan & Christoph, 2016).

2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan pengaruh berbagai macam cekaman terhadap respon mikroalga oleaginous baik terhadap pertumbuhannya, metabolisme, dan yang lainnya (Tabel 2.1). Hal ini turut memengaruhi tahapan yang akan diambil selanjutnya untuk optimalisasi pertumbuhan mikroalga untuk mendapatkan hasil yang diinginkan (Gambar 2.3).

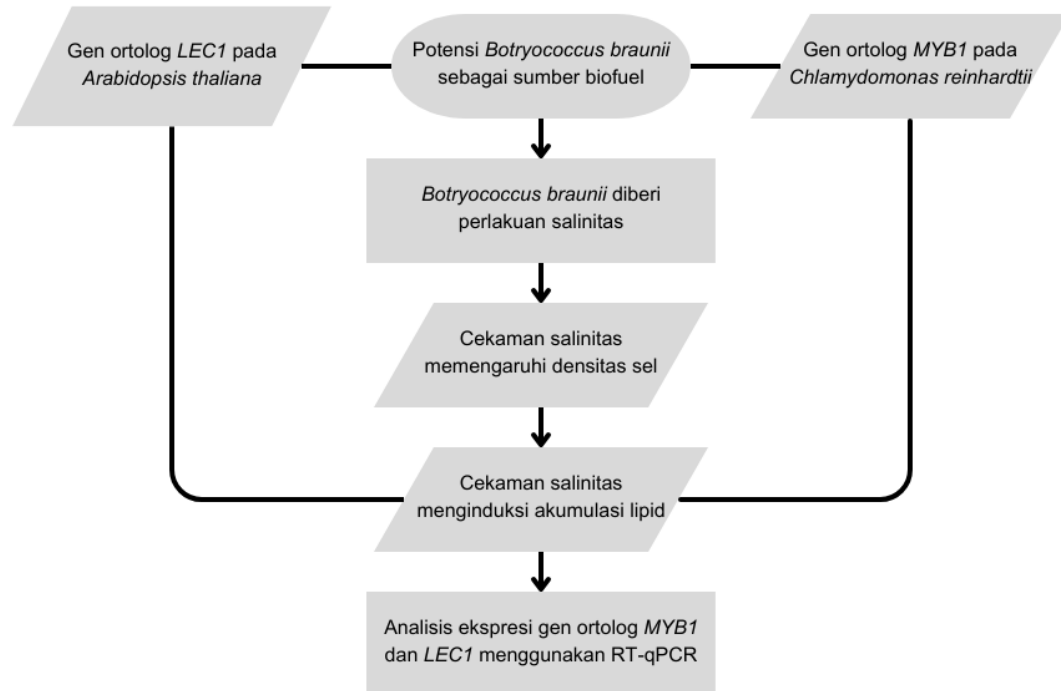
Tabel 2.1 Penelitian Terdahulu

No.	Nama Peneliti, Tahun, Judul Penelitian	Hasil Penelitian	Relevansi
1	Rao et al. (2007). <i>Effect of salinity on growth of green alga Botryococcus braunii and its constituents</i>	Keberadaan natrium klorida 0,3 dan 0,7 M dalam media kultur <i>Botryococcus braunii</i> IPPAS H-252 menghambat pertumbuhan sel mikroalga pada awal pertumbuhan, penurunan total nitrogen, peningkatan sintesis triasilgliserol, perubahan profil asam lemak, serta penurunan kandungan asam polienoat dan asam jenuh rantai panjang.	Perlakuan salinitas juga dilakukan pada penelitian ini, tetapi dengan konsentrasi yang lebih rendah.
2	Liu et al. (2021). <i>Overexpression of the</i>	Perbandingan gen yang diekspresikan secara berbeda yang diatur oleh	Gen <i>LEC1</i> dari <i>Arabidopsis</i> pada penelitian

	<i>transcription factor AtLEC1 significantly improved the lipid content of Chlorella ellipsoidea</i>	<i>AtLEC1</i> pada <i>Chlorella ellipsoidea</i> dan <i>Arabidopsis</i> menunjukkan sekitar 59% (95/160) gen yang terkait dengan metabolisme lipid diregulasi dalam transgenik <i>AtLEC1 Chlorella</i>. Penelitian ini menyediakan cara untuk meningkatkan kandungan lipid dengan memperkenalkan faktor transkripsi eksogen dan menyajikan kemungkinan mekanisme regulasi akumulasi lipid <i>AtLEC1</i> pada <i>C. ellipsoidea</i>.	tersebut menjadi referensi gen ortolog yang dibandingkan pada penelitian ini.
3	Zhao et al. (2023) <i>Overexpression of a MYB1 transcription factor enhances triacylglycerol and starch accumulation and biomass production in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii</i>	Ekspresi berlebih <i>MYB1</i> di <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> meningkatkan kandungan lipid, pati, dan protein serta produksi biomassa dalam kondisi pertumbuhan standar.	Gen <i>MYB1</i> dari <i>Chlamydomonas</i> pada penelitian tersebut menjadi referensi gen ortolog yang dibandingkan pada penelitian ini.

2.3 Kerangka Berpikir

Kerangka berpikir penelitian disajikan dalam bentuk diagram alir sebagai berikut (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Diagram Kerangka Berpikir

