

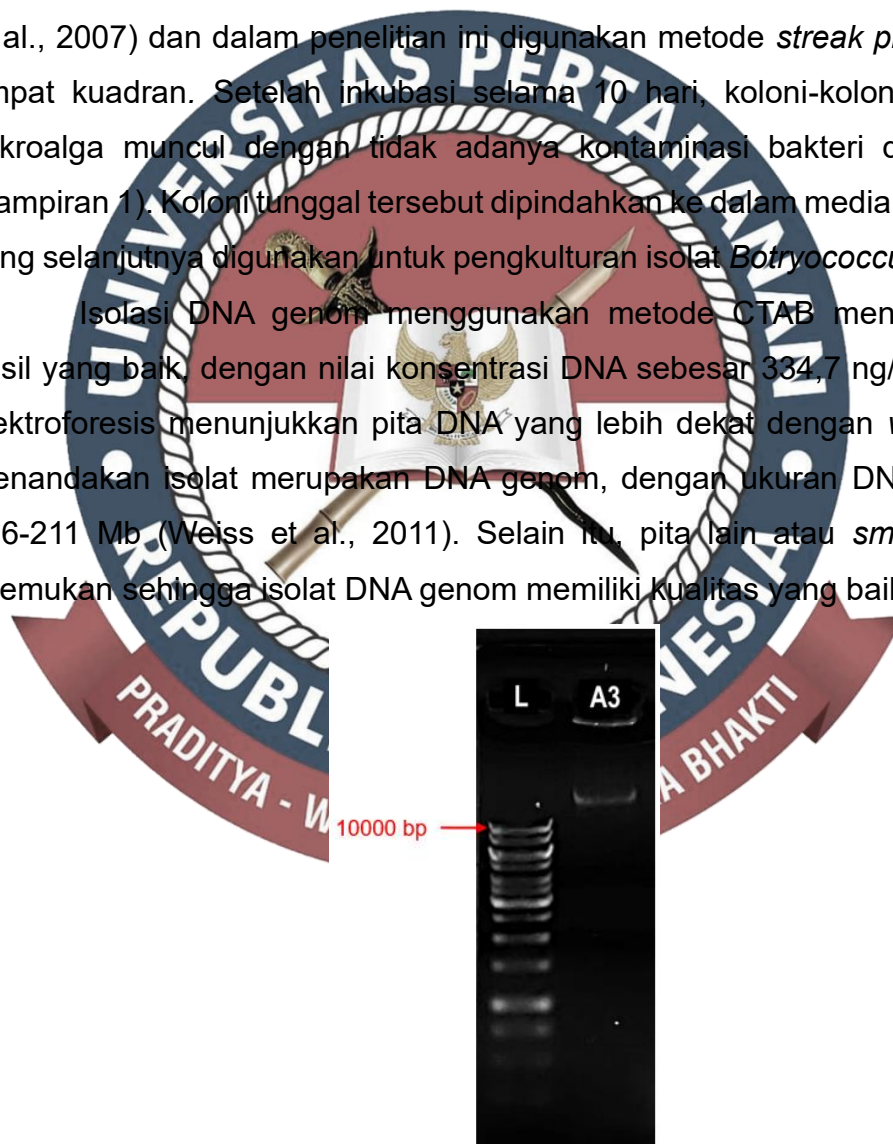
BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Identitas Isolat Mikroalga berdasarkan Analisis Molekuler dan Morfologi

Kultur mikroalga diisolasi untuk memperoleh koloni tunggal *Botryococcus*. Mikroalga dapat diisolasi menggunakan dua metode (Parvin et al., 2007) dan dalam penelitian ini digunakan metode *streak plate* pada empat kuadran. Setelah inkubasi selama 10 hari, koloni-koloni tunggal mikroalga muncul dengan tidak adanya kontaminasi bakteri dan fungi (Lampiran 1). Koloni tunggal tersebut dipindahkan ke dalam media cair steril yang selanjutnya digunakan untuk pengkulturan isolat *Botryococcus braunii*.

Isolasi DNA genom menggunakan metode CTAB menunjukkan hasil yang baik, dengan nilai konsentrasi DNA sebesar 334,7 ng/ μ L. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA yang lebih dekat dengan *well* yang menandakan isolat merupakan DNA genom, dengan ukuran DNA sekitar 166-211 Mb (Weiss et al., 2011). Selain itu, pita lain atau *smear* tidak ditemukan sehingga isolat DNA genom memiliki kualitas yang baik.

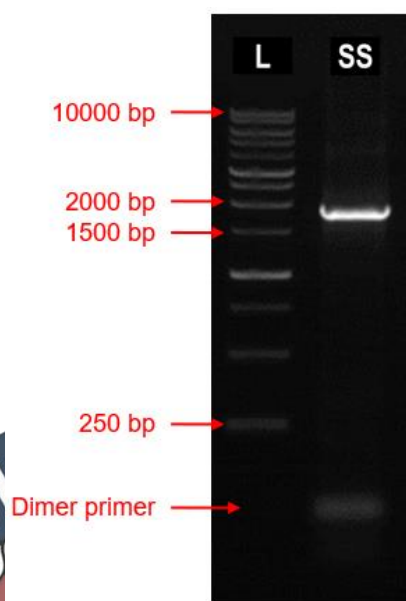


Gambar 4.1 Elektroforegram DNA Genom Mikroalga. DNA *ladder marker* 1 kb (L); DNA genom mikroalga (A3)

Sumber: diolah oleh peneliti

Hasil spektrofotometri menunjukkan kualitas DNA yang baik. DNA memiliki absorbansi maksimal pada panjang gelombang 260 nm dengan nilai *extinction coefficient* sebesar 50 (Ahn et al., 1996). Rasio A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230} umum digunakan untuk mengevaluasi kemurnian DNA dari kontaminan. Nilai kemurnian isolat DNA pada rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,96 yang mana masih termasuk dalam rasio ideal A_{260}/A_{280} DNA yaitu sebesar 1,8–2. Hasil ini menunjukkan minimnya kontaminasi protein atau senyawa organik lain pada DNA dan tingkat kemurniannya baik. Namun, nilai kemurnian relatif isolat DNA pada rasio A_{260}/A_{230} sebesar 1,17 yang mana lebih rendah dari rasio ideal A_{260}/A_{230} DNA yaitu sebesar 2–2,2. Hal ini menunjukkan isolat DNA terkontaminasi senyawa seperti *buffer salt*, EDTA, deterjen non-ionik, polisakarida, atau fenol (Koetsier & Cantor, 2019; Lucena-Aguilar et al., 2019) yang tertinggal saat proses isolasi DNA. Kontaminasi ini dapat berpotensi menghambat reaksi enzimatik dalam proses PCR (Boesenberg-Smith et al., 2012).

Tahap selanjutnya yaitu gen *18S rRNA* diamplifikasi melalui PCR dengan pasangan primer ss5_F/ss3_R. Keberhasilan amplifikasi diuji kualitasnya melalui elektroforesis dengan gel agarosa 0,8%. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA yang tebal dan jelas dengan ukuran antara 1.500-2.000 bp (Gambar 4.2), sesuai dengan hasil Primer-BLAST terhadap genus *Botryococcus* yang memiliki sekuens gen *18S rRNA* berukuran ± 1.791 bp. Namun, elektroforegram juga menunjukkan dimer primer yang teramplifikasi pada ukuran kurang dari 250 bp. Dimer dapat terbentuk antar primer yang sejenis atau dengan primer pasangannya. Ikatan dimer yang terlalu kuat dapat menghambat proses perpanjangan DNA dan menghasilkan konsentrasi DNA yang rendah (Kwon et al., 1991; Saraswati et al., 2019).

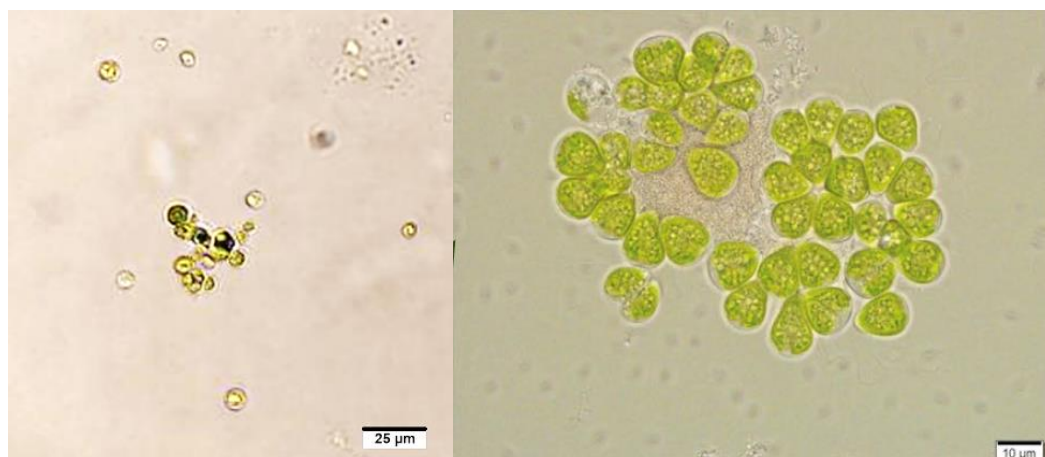


Gambar 4.2 Elektroforegram Produk PCR Fragmen Gen *18S rRNA* dari Isolat DNA Mikroalga. DNA *ladder marker* 1 kb (L); DNA genom mikroalga dengan primer ss5/ss3 (SS)

Sumber: Diolah oleh peneliti

Hasil sekuensing fragmen gen *18S rRNA* dengan primer ss5_F (Lampiran 3, atas) menunjukkan *noisy data* dengan sinyal lemah. Di sisi lain, hasil sekuensing fragmen gen *18S rRNA* dengan primer ss3_R (Lampiran 3, bawah) menunjukkan *noisy data* dengan *peak* yang tumpang tindih. Hal-hal tersebut dapat disebabkan karena kontaminasi senyawa kimia dari proses isolasi DNA, cetakan DNA terdegradasi, kelebihan primer dalam cetakan DNA, dan adanya lebih dari satu cetakan DNA. Hasil tersebut sesuai dengan hasil kemurnian relatif isolat DNA pada rasio A_{260}/A_{230} yang lebih rendah dari rasio ideal dan ditemukannya dimer primer pada hasil elektroforesis produk PCR fragmen gen *18S rRNA* (Gambar 4.2). Keberadaan fragmen lain yang teramplifikasi diduga menjadi penyebab utama yang memengaruhi hasil sekuensing karena metode Sanger mensyaratkan fragmen tunggal dari setiap sampel. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan melakukan pemurnian cetakan DNA, serta pemurnian produk PCR dengan kit atau menggunakan *DNA-binding spin columns*.

Analisis molekuler isolat mikroalga tidak dapat dilakukan sehingga dalam penelitian ini digunakan analisis morfologi. Banyak sel tidak terlihat berkoloni karena metode kultur yang dilakukan aerasi secara terus-menerus. Sel *Botryococcus braunii* diamati dalam kondisi sehat sehingga memiliki warna hijau dengan bentuk menyerupai telur dan belum terbentuk jaringan yang menyambungkan antar koloni mikroalga (Gupte, 2012).

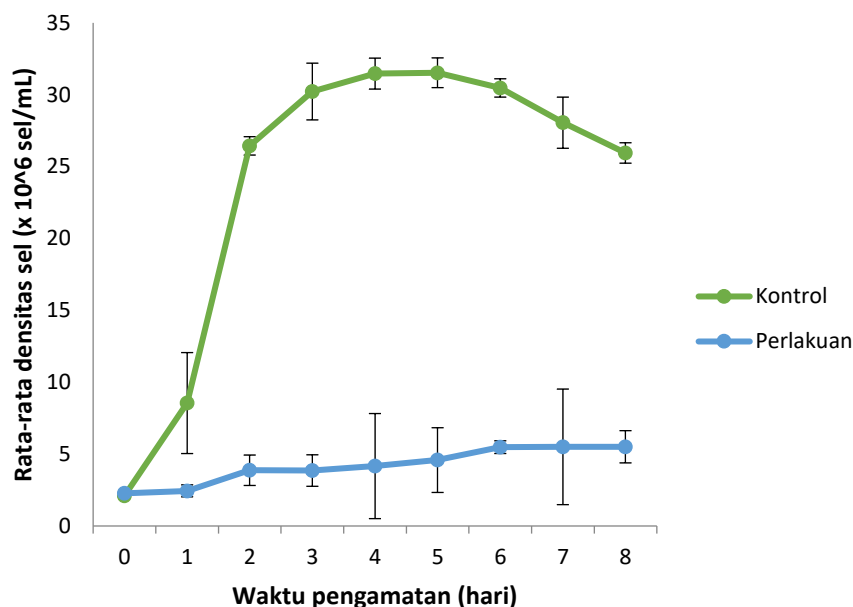


Gambar 4.3 Perbandingan Morfologi Sel *Botryococcus braunii* dalam Penelitian ini pada Mikroskop Perbesaran 400x (kiri) dengan Sel *Botryococcus braunii* SAG 807-1 (kanan) (Cheng et al., 2018)

Sumber: diolah oleh peneliti

4.2 Kurva Tumbuh Mikroalga pada Perlakuan Salinitas

Perhitungan densitas sel mikroalga yang dilakukan selama delapan hari menghasilkan kurva pertumbuhan sigmoid, terutama pada kultur kontrol. Kurva pertumbuhan mikroalga autotrofik terdiri dari enam fase pertumbuhan yaitu, fase lag, fase eksponensial (*log*), fase pertumbuhan linier, fase pertumbuhan menurun (*declining growth*), fase stasioner, dan fase kematian (Aziz et al., 2020; Lee et al., 2015). Berdasarkan hasil penelitian, pertumbuhan mikroalga *Botryococcus braunii* teramati dalam fase lag, fase eksponensial, fase pertumbuhan menurun, dan fase stasioner (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan *Botryococcus braunii* selama 8 Hari Pengamatan. Bar menunjukkan *standard error* (n=3)

Sumber: diolah oleh peneliti

Rata-rata densitas awal kultur *Botryococcus braunii* adalah $2,0 \times 10^6$ sel/mL. Fase lag terjadi pada hari ke-0 sampai hari ke-1 dalam kultur kontrol dan pada hari ke-0 sampai hari ke-2 dalam kultur perlakuan salinitas. Fase ini ditandai dengan pertumbuhan sel yang lambat karena mikroalga masih beradaptasi dengan lingkungan yang baru (Lee et al., 2015). Fase lag yang teramati termasuk cepat karena kultur awal yang diinokulasikan diambil dari kultur mikroalga pada fase eksponensial sehingga dapat mengurangi waktu untuk *upscaling* (Lavens & Sorgeloos, 1996).

Fase eksponensial terjadi pada hari ke-1 sampai hari ke-4 dalam kultur kontrol dan pada hari ke-2 sampai hari ke-5 dalam kultur perlakuan salinitas. Fase ini ditandai dengan densitas sel yang meningkat secara signifikan karena enzim dan senyawa metabolit primer yang dihasilkan dari fase lag sudah tersedia sehingga penyerapan nutrisi dari media dapat dilakukan secara optimal untuk pembelahan sel (Prayitno, 2016). Rata-rata

densitas sel tertinggi yang teramati sebesar $3,2 \times 10^7$ sel/mL untuk kultur kontrol dan $5,0 \times 10^6$ sel/mL untuk kultur perlakuan salinitas.

Pertumbuhan sel secara masif mengakibatkan ketersediaan nutrisi mulai menipis, kandungan karbon dioksida terlarut mulai menurun, dan penyerapan cahaya semakin sulit (Prayitno, 2016) sehingga sel memasuki fase pertumbuhan menurun. Fase pertumbuhan menurun terjadi pada hari ke-4 sampai hari ke-5 dalam kultur kontrol dan pada hari ke-5 sampai hari ke-6 dalam kultur perlakuan salinitas. Fase ini ditandai dengan laju pembelahan sel mulai menurun (Lee et al., 2015).

Fase terakhir yang teramati adalah fase stasioner yang mulai terjadi pada hari ke-6 baik dalam kultur kontrol maupun kultur perlakuan salinitas. Fase ini ditandai dengan densitas sel yang relatif konstan. Laju pertumbuhan dan kematian sel mulai seimbang karena nutrisi dalam media yang sangat menipis. Di sisi lain, metabolit sekunder seperti lipid mulai diakumulasi pada fase ini (Lavens & Sorgeloos, 1996). Fase kematian tidak diamati dalam penelitian ini karena kultur mikroalga sudah dipanen pada fase stasioner untuk analisis ekspresi gen. Namun, fase kematian dapat diamati melalui densitas sel yang menurun secara signifikan karena laju kematian sel yang lebih tinggi daripada laju pertumbuhannya (Krishnan et al., 2015). Kultur akan mulai rusak akibat nutrisi dan karbon dioksida yang habis, panas berlebih, gangguan pH, atau kontaminasi (Lavens & Sorgeloos, 1996; Lee et al., 2015).

Rata-rata densitas sel *Botryococcus braunii* pada penelitian ini mengalami penurunan secara signifikan dalam perlakuan salinitas yakni sebesar 82,55%. Menurut Tasić et al. (2016), *Botryococcus braunii* dapat hidup hingga perairan payau. Namun, penelitian ini menunjukkan bahwa isolat *Botryococcus braunii* yang dipakai mempunyai toleransi terhadap salinitas yang rendah. Hal ini sesuai dengan pendapat Yoshimura et al. (2013) yang menyatakan strain *Botryococcus braunii* memiliki toleransi terhadap salinitas yang berbeda-beda.

4.3 Pengaruh Perlakuan Salinitas terhadap Persentase Ekstrak Lipid Mikroalga

Perlakuan salinitas berpengaruh dalam penurunan bobot biomassa *Botryococcus braunii* (Tabel 4.1). Bobot biomassa *Botryococcus braunii* dalam kultur perlakuan salinitas menurun sebesar 36,68% dibanding kultur kontrol, yang sejalan dengan penurunan rata-rata densitas sel dalam perlakuan salinitas. Hal ini sesuai dengan pendapat Ganapathi et al. (2016) yang menyatakan bahwa konsentrasi garam yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan sel mikroalga. Cekaman salinitas dapat memengaruhi pertumbuhan mikroalga dengan menurunkan laju fotosintesis, akumulasi ion berlebih dalam sel, dan membuat sel kesulitan mengekstrak air dari lingkungan sekitarnya (Hart et al., 1991; Rao et al., 2007). Oleh karena itu, mekanisme mikroalga dalam mengatasi cekaman salinitas dilakukan melalui akumulasi zat osmoprotektif dan protein stres, produksi enzim antioksidan, pengaturan proses pertukaran ion melalui membran sel, serta peralihan aktivitas pembelahan sel ke penyimpanan energi melalui produksi lipid (El-Sheekh et al., 2024; Ganapathi et al., 2016).

Bobot ekstrak lipid yang dihasilkan turut mengalami penurunan yaitu lebih kecil 23,26% dari kultur kontrol (Tabel 4.1), yang secara tidak langsung dipengaruhi oleh penurunan rata-rata densitas sel dalam perlakuan salinitas. Hal ini sesuai dengan pendapat Aziz et al. (2020) yang menyatakan bahwa kondisi stres dapat berdampak negatif bagi budidaya mikroalga oleaginous karena dapat menghambat pertumbuhan mikroalga dan menurunkan produktivitas lipid secara keseluruhan. Di sisi lain, mikroalga sendiri terbagi menjadi dua kelompok yang berlawanan yaitu kelompok mikroalga yang mengakumulasi lipid rendah dengan produksi biomassa tinggi dan kelompok mikroalga akumulasi lipidnya yang tinggi dengan produksi biomassa yang rendah. Mikroalga *Botryococcus braunii* termasuk ke dalam kelompok kedua yaitu menghasilkan kandungan lipid lebih tinggi dengan tingkat pertumbuhan yang rendah. Hal ini sejalan dengan persentase kandungan lipid yang dihasilkan pada penelitian ini.

Persentase kandungan lipid dalam kultur perlakuan salinitas meningkat sebesar 31% dibanding kultur kontrol (Tabel 4.1). Hal ini sesuai dengan pendapat Ganapathi et al. (2016) yang menyatakan bahwa salinitas memengaruhi mekanisme biologis dan biokimia mikroalga yang mengakibatkan peningkatan kandungan lipid karena perubahan metabolisme asam lemak. Distribusi karbon dari pati pada mikroalga akan dialihkan untuk produksi lipid (Shi et al., 2020). Lipid akan bertindak sebagai bahan energi cadangan sampai kondisi lingkungan yang menguntungkan kembali muncul.

Tabel 4.1 Pengaruh Perlakuan Salinitas terhadap Bobot Biomassa dan Persentase Kandungan Lipid *Botryococcus braunii*

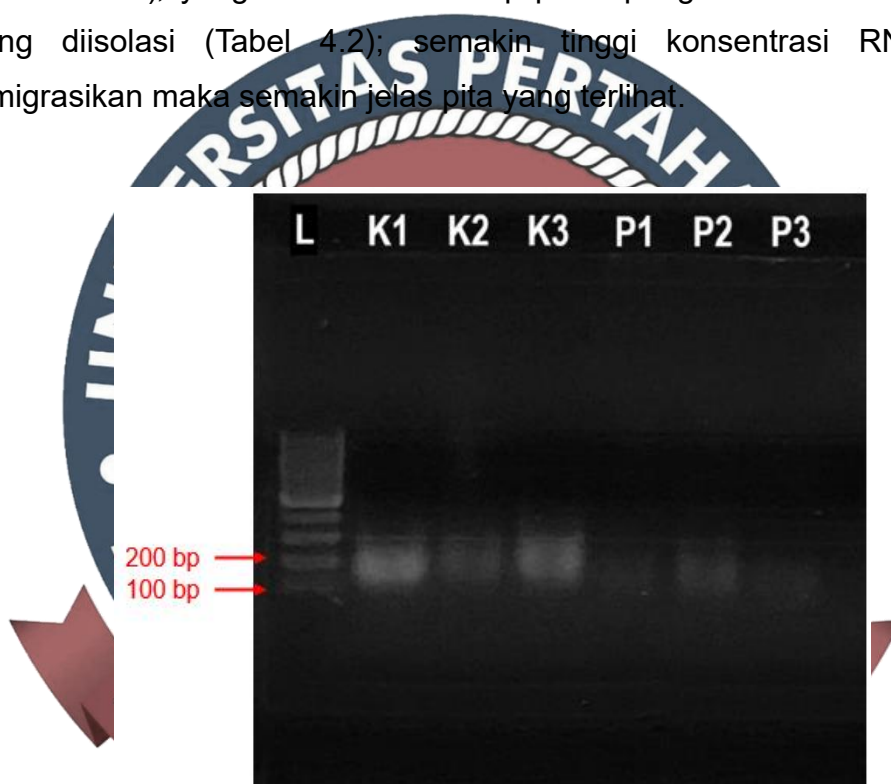
Kelompok	Bobot Biomassa (mg)	Bobot Ekstrak Lipid (mg)	Persentase Kandungan Lipid
Kontrol	22,9	8,6	37,1%
Perlakuan	14,5	8,6	48,6%

Berdasarkan kurva pertumbuhan mikroalga (Gambar 4.4), kondisi media yang kurang menguntungkan dimulai pada fase stasioner yang mana ditandai dengan densitas sel yang cenderung stagnan. Pada fase tersebut, energi yang ditangkap untuk proses fotosintesis tidak digunakan secara efisien untuk produksi metabolit primer, sebaliknya regulasi metabolisme akan diubah untuk meningkatkan produksi hidrokarbon (Sakamoto et al., 2012). Pada penelitian ini, pemanenan kultur untuk ekstraksi lipid dilakukan pada hari ke-17. Hal ini sejalan dengan pendapat Hu et al. (2015) yang menyatakan bahwa perpanjangan masa budidaya mikroalga dapat meningkatkan akumulasi lipid dan derajat kejenuhan asam lemak rata-rata. Produksi mikroalga dengan kandungan lipid tinggi membutuhkan waktu yang lebih lama, tetapi stres yang berkepanjangan mengakibatkan penurunan lipid secara keseluruhan. Oleh karena itu, pemanenan kultur

untuk ekstraksi dilakukan pada fase kematian yang mana akumulasi lipid telah dicapai secara optimal.

4.4 Ekspresi Relatif Gen Ortolog *LEC1* dan *MYB1*

Isolasi RNA total menggunakan metode TRIzol menunjukkan hasil yang baik. Hasil elektroforesis menunjukkan pita-pita RNA pada setiap *well* (Gambar 4.5), yang mana tebal setiap pita dipengaruhi konsentrasi RNA yang diisolasi (Tabel 4.2); semakin tinggi konsentrasi RNA yang dimigrasikan maka semakin jelas pita yang terlihat.



Gambar 4.5 Elektroforegram RNA Total Mikroalga. DNA *ladder marker* 100 bp (L); RNA total mikroalga kelompok kontrol (K1-K3); RNA total mikroalga kelompok perlakuan (P1-P3)

Sumber: diolah oleh peneliti

Hasil spektrofotometri menunjukkan kualitas RNA yang cukup baik (Tabel 4.2). Seperti DNA, RNA memiliki absorbansi maksimal pada panjang gelombang 260 nm. Rasio A_{260}/A_{280} digunakan untuk mengevaluasi kemurnian RNA. Nilai kemurnian RNA total pada rasio A_{260}/A_{280} berada

sedikit di bawah rasio ideal A_{260}/A_{280} RNA sebesar $\sim 2,1$. Hasil ini menunjukkan isolat RNA terkontaminasi protein atau senyawa organik lain.

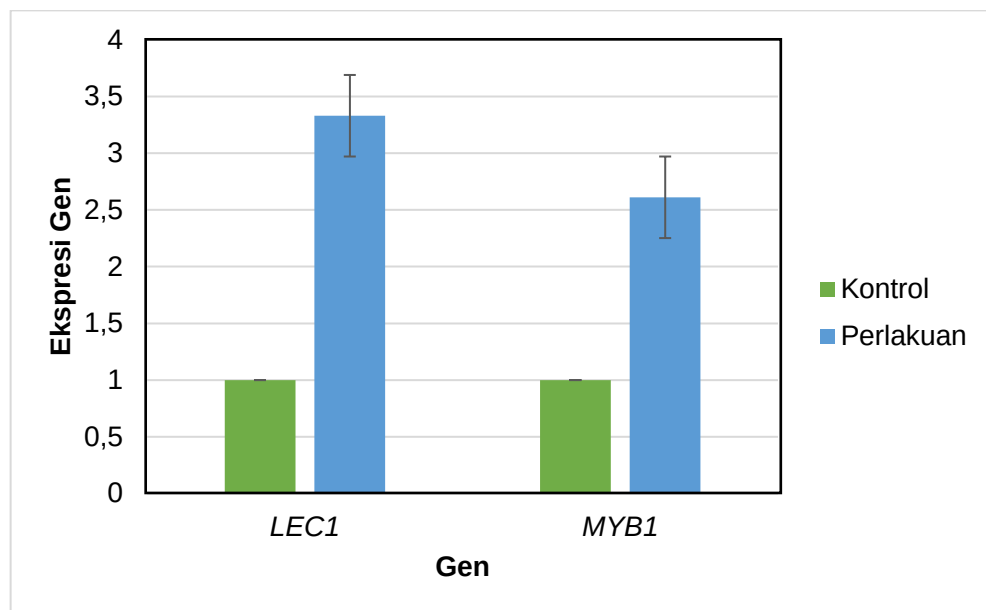
Tabel 4.2 Konsentrasi dan Kemurnian RNA *Botryococcus braunii*

Kelompok	Konsentrasi RNA (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}
Kontrol 1	2.581	1,958
Kontrol 2	1.278	1,826
Kontrol 3	2.552	2,070
Perlakuan 1	1.646	2,071
Perlakuan 2	1.423	1,778
Perlakuan 3	902	1,815

Pada penelitian ini, pemanenan kultur untuk isolasi RNA dilakukan pada hari ke-6 yaitu pada fase eksponensial yang sedang menuju fase stasioner sesuai kurva pertumbuhan mikroalga (Gambar 4.4). Isolat RNA total disintesis menjadi cDNA untuk analisis ekspresi gen ortolog *LEC1* dan *MYB1* menggunakan qRT-PCR dengan satu pasang primer spesifik gen aktin *Botryococcus braunii* serta dua pasang primer spesifik gen target *LEC1* dan *MYB1* (Tabel 3.3). Nilai ekspresi relatif gen target dibandingkan antara kultur kontrol dengan kultur perlakuan salinitas. Sebelum dilakukan qRT-PCR, produk cDNA telah dicek menggunakan mesin PCR dengan ketiga pasang primer spesifik untuk qRT-PCR dan hasil elektroforesis menunjukkan terbentuknya pita yang terlihat samar (Lampiran 4).

Berdasarkan analisis hasil qRT-PCR (Lampiran 6), nilai ekspresi relatif gen ortolog *LEC1* dan *MYB1* berbeda signifikan antara kultur kontrol dengan kultur perlakuan salinitas. Kedua gen mengalami peningkatan ekspresi pada kultur perlakuan salinitas masing-masing sebesar 3,3 dan 2,6 kali lipat dari kultur kontrol (Gambar 4.6). Hal ini sejalan dengan peningkatan persentase kandungan lipid dalam kultur perlakuan salinitas (Tabel 4.1). Berdasarkan hasil tersebut, ekspresi gen ortolog *LEC1* dan

MYB1 pada *Botryococcus braunii* dapat dipengaruhi oleh adanya cekaman dari lingkungan yang mana juga berhubungan dalam proses biosintesis lipid (Liu et al., 2021; Zhao et al., 2023).



Gambar 4.6 Grafik Perbandingan Nilai Ekspresi Relatif Gen Ortolog *LEC1* dan *MYB1* pada *Botryococcus braunii* antara Kultur Kontrol dengan Kultur Perlakuan Salinitas. Bar menunjukkan *standard error* (n=2)

Sumber: diolah oleh peneliti

Penelitian mengenai mekanisme biosintesis lipid ini diharapkan dapat memaksimalkan produksi lipid untuk *biofuel* dari mikroalga *Botryococcus braunii* dalam upaya mendukung ketahanan energi. Mekanisme biosintesis lipid ini difokuskan pada gen ortolog *LEC1* dan *MYB1* dari mikroalga *Botryococcus braunii*, tetapi mekanisme kedua gen tersebut dalam mengatur biosintesis lipid tetap perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Di sisi lain, peningkatan akumulasi lipid dari mikroalga pada penelitian ini dipicu dengan adanya cekaman salinitas karena mikroalga cenderung mengakumulasi lipid ketika mengalami stres (Cakmak et al., 2012). Strategi cekaman seperti ini banyak digunakan karena keefektifan dan keekonomisannya, tetapi mekanisme berbagai kondisi cekaman perlu

diteliti lebih lanjut untuk menentukan target produksi yang diinginkan (Shi et al., 2020). Oleh karena itu, perbandingan tingkat ekspresi gen ortolog *LEC1* dan *MYB1* dengan persentase kandungan lipid yang dihasilkan mikroalga *Botryococcus braunii* diharapkan dapat menjadi dasar dalam pengoptimalan produksi lipid melalui rekayasa genetika yang selanjutnya dapat diteruskan untuk penerapan bioteknologi dalam upaya mendukung ketahanan energi.

