

PENAPISAN MIKROALGA PENGHASIL KAROTENOID SERTA STUDI PENGARUH STRES NITROGEN DAN FOSFOR TERHADAP PRODUKSI β -KAROTEN PADA MIKROALGA *Oocystis* sp.

*Screening of Carotenoid Producing Microalgae and Study of the Effect of Nitrogen and Phosphorus Stress on the Production of β -Carotene in Microalgae *Oocystis* sp.*

Wahida Nia Elfiza¹, Abdi Dharma^{2*} dan Nasril Nasir³

¹ Program Pascasarjana Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

² Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

³ Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

*Korespondensi Penulis: abdipogil@gmail.com

Diterima: 18 Maret 2019; Direvisi: 9 Mei 2019; Disetujui: 22 Juni 2019

ABSTRAK

β -karoten merupakan karotenoid yang bermanfaat sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan menapis mikroalga yang berpotensi mengandung karotenoid tinggi dan mempelajari pengaruh nitrogen dan fosfor terhadap produktivitas biomassa, kandungan pigmen fotosintesis dan β -karoten, pada mikroalga yang diisolasi dari perairan Danau Atas, Sumatera Barat. Penapisan mikroalga penghasil karotenoid dilakukan dengan memberikan paparan UV-A 326 nm terhadap kultur campuran mikroalga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 5 dari 18 spesies mampu bertahan pada proses penapisan. Pengaruh 9 jenis medium pertumbuhan dengan kriteria: tanpa NaNO_3 , 3x NaNO_3 , 5x NaNO_3 , 10x NaNO_3 , *Bold Basalt Medium* (BBM) normal (kontrol), tanpa KH_2PO_4 , 3x KH_2PO_4 , 5x KH_2PO_4 , dan 10x KH_2PO_4 terhadap mikroalga terpilih (*Oocystis* sp.) diamati. Hasil menunjukkan kandungan β -karoten tertinggi ditemukan pada perlakuan 5x KH_2PO_4 yaitu sebesar 0,22 % dari berat kering mikroalga, dengan produktivitas biomassa 0,0015 g/mL/hari, serta kandungan klorofil a, klorofil b dan karotenoid total yaitu 7,15 $\mu\text{g/mL}$, 0,81 $\mu\text{g/mL}$ dan 6,67 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan medium pertumbuhan dengan kandungan 5x KH_2PO_4 merupakan medium yang cocok bagi pertumbuhan *Oocystis* sp. untuk mendapatkan biomassa dengan kandungan β -karoten dan karotenoid tinggi tanpa harus menurunkan produktivitas biomasanya.

KATA KUNCI : mikroalga, β -karoten, *Oocystis* sp., stres nitrogen, stres fosfor

ABSTRACT

β -carotene is a carotenoid that is useful as an antioxidant. Present study aims to screening high microalgae which contain carotenoids from water of Danau Atas lake (West Sumatra Province), and study the effect of nitrogen and phosphorus on biomass productivity, photosynthetic and β -carotene pigment content. Screening of carotenoid-producing microalgae was carried out by exposing UV-A 326 nm to mixed microalgae cultures. The results showed that 5 of the 18 species were able to survive in the screening process. The effect of growth medium, i.e. without NaNO_3 , 3x NaNO_3 , 5x NaNO_3 , 10x NaNO_3 , normal *Bold Basalt Medium* (BBM) (control), without KH_2PO_4 , 3x KH_2PO_4 , 5x KH_2PO_4 , and 10x KH_2PO_4 on of selected microalgae (*Oocystis* sp.) was carried out. The result showed that the highest content of β -carotene of *Oocystis* sp. was obtained with 5x KH_2PO_4 which was 0.22% of the dry weight of biomass. Biomass productivity was 0.0015 g/mL/day and the chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids contents were 7.15 $\mu\text{g/mL}$, 0.81 $\mu\text{g/mL}$ and 6.67 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Based on this research, 5x KH_2PO_4 can be concluded as a suitable medium for *Oocystis* sp. to obtained high β -carotene and carotenoid of *Oocystis* sp. without reducing biomass productivity.

KEYWORDS: microalgae, β -carotene, *Oocystis* sp., nitrogen stress, phosphorus stress

PENDAHULUAN

Karotenoid adalah pigmen alami yang ditemukan pada bakteri, alga, fungi dan tumbuhan tetapi tidak diproduksi oleh hewan. Karotenoid banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri seperti produk makanan kesehatan, kosmetik, suplemen vitamin, dan zat adiktif. Beberapa jenis karotenoid yang dipelajari secara luas adalah β -karoten, likopen, lutein, zeaxantin dan astaxantin (Coates, Trentacoste, & Gerwick, 2013).

β -karoten merupakan provitamin A yang bisa dikonversi menjadi retinol. Vitamin A berfungsi menurunkan resiko gangguan pada mata (*macular degeneration*). Selain itu β -karoten juga berfungsi sebagai inhibitor dalam pertumbuhan sel kanker dengan cara menginduksi terjadinya apoptosis (Coates et al., 2013).

β -karoten sebagai metabolit sekunder pada mikroalga dapat disintesis oleh sel karena adanya stres oksidatif dari lingkungan. Salah satu bentuk stres oksidatif adalah berupa cahaya kuat (Asker & Ohta, 1999; Stafnes et al., 2010). Cahaya kuat yang berasal dari intensitas cahaya matahari di musim panas mengandung sinar ultraviolet (UV) pada panjang gelombang tertentu. Paparan radiasi UV-A (320-400 nm) dan UV-B (280-320 nm) berbahaya bagi sel, radiasi UV-A menghasilkan radikal bebas yang membahayakan DNA sedangkan paparan UV-B menysasar DNA dan protein. Sebagai antioksidan, β -karoten yang merupakan bagian dari karotenoid mampu melindungi sel dari radikal bebas (Stafnes et al., 2010). Paparan sinar UV akan meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ ROS*) oleh sel, yang harus segera dinetralkan oleh sistem antioksidan sel. Spesies yang tidak mempunyai sistem antioksidan yang baik tidak mampu bertahan hidup, sedangkan spesies yang mempunyai sistem antioksidan yang baik akan bertahan.

Stres oksidatif dapat menyebabkan akumulasi β -karoten karena perubahan jalur metabolit sekunder β -karoten pada mikroalga. Biosintesis β -karoten dapat terjadi karena adanya stres abiotik. Salah satu stres abiotik yaitu dengan pembatasan nutrisi. Pembatasan nutrisi mengacu kepada stres kandungan nutrisi pada medium kultivasi mikroalga seperti stres nitrogen dan fosfor (Paliwal et al., 2017). Studi memperlihatkan adanya peningkatan ekspresi gen *likopen b-cyclase* (Lcy-b) dari mikroalga *Dunaliella salina* karena kondisi stres lingkungan berupa paparan stres abiotik salinitas dan cahaya tinggi yang dikombinasi dengan pembatasan nutrisi. Kombinasi dengan faktor pembatasan nutrisi meningkatkan level *steady-state*

mRNA *b-cyclase* (Lcy-b) *D. salina* dibandingkan dengan hanya melibatkan dua faktor stres abiotik salinitas dan cahaya tinggi. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa pembatasan (kekurangan) nutrisi merupakan faktor penting untuk akumulasi β -karoten pada mikroalga (Ramos et al., 2008).

Tujuan dari penelitian ini adalah menapis mikroalga yang mengandung karotenoid tinggi dan mempelajari pengaruh stres nitrogen dan fosfor terhadap produktivitas biomassa, pigmen fotosintesis dan β -karoten pada mikroalga hasil penapisan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel mikroalga diisolasi dari perairan Danau Atas (Kabupaten Solok, Provinsi Sumatera Barat) dengan titik koordinat 1°03'54.1"S 100°44'51.5"E. Sampel diambil dengan *plankton net* ukuran pori 30 micron pada kedalaman ± 1 meter, ± 3 meter dan ± 5 meter. Sampel dimasukkan ke dalam botol kaca steril dan diberi label. Sebagian sampel diberi formalin 4% untuk pengamatan bentuk morfologi mikroalga dengan mikroskop jenis binokuler dan bagian kedua, dikultivasi dengan medium pertumbuhan *Medium Bold Basalt* (BBM).

Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan medium BBM, *dan Growmore* (GM). Di samping itu juga dibutuhkan standar β -karoten (Sigma Aldrich) untuk pengujian.

Metode

Penapisan dan isolasi

Sebanyak 1 mL kultur sampel dalam medium BBM diteteskan ke dalam *petridish* steril, lalu ditambahkan 10 mL medium BBM steril. Sampel tersebut disinari dengan lampu UV-A (326 nm) selama 3 jam dan diinkubasi pada suhu ruang hingga sampel menghitam pudar (20 hari). Setelah itu, diamati dengan binokuler (*Olympus BX51*). Mikroalga yang teramat hidup merupakan mikroalga yang mampu bertahan pada proses penapisan. Mikroalga yang bertahan selanjutnya diisolasi.

Isolasi dilakukan dengan cara meneteskan cuplikan sampel menggunakan mikropipet di atas kaca preparat dan ditutup dengan kaca objek, kemudian diamati dengan mikroskop. Jika yang diamati terbawa satu sel, maka kaca preparat dan kaca objek dicuci menggunakan medium BBM steril, cuciannya ditampung ke dalam botol vial (botol kultur

yang telah berisi medium BBM steril), lalu dibiarkan selama sebulan hingga menghitam homogen. Mikroalga yang telah terisolasi dijaga kemurniannya sampai menghitam pudar, setelah itu dipindahkan ke dalam botol kaca 500 mL untuk memperbanyak biomasanya.

Pembuatan medium pertumbuhan mikroalga

Medium kultivasi yang digunakan adalah GM dan BBM. Medium GM memiliki persentase komposisi nitrogen (N), fosfor (P) dan kalium (K) bervariasi yaitu GM 6-30-30, 10-55-10, 20-20-20 dan 32-10-10, sedangkan komposisi zat lainnya memiliki persentase yang sama yaitu kalsium (Ca) 0,05 %, Magnesium (Mg) 0,10 %, Sulfur (S) 0,20 %, Boron (B) 0,02 %, Tembaga (Cu) 0,05 %, Iron (Fe) 0,10 %, Mangan (Mn) 0,05 %, Molibdenum (Mo) 0,0005 % dan Zink (Zn) 0,05 %. Medium kultivasi GM dibuat dengan cara melarutkan 0,2 g serbuk GM ke dalam 1 L aquades. Medium GM dipilih sebagai medium seleksi karena lebih praktis dan hemat dibandingkan medium BBM. Medium BBM terdiri dari makronutrien NaNO_3 25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,5 g/L, NaCl 2,5 g/L, K_2HPO_4 7,5 g/L, KH_2PO_4 17,5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/L, dan mikronutrien yaitu *trace element* ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,82 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,44 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,57 g/L, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,49 g/L), *EDTA-KOH solution* (EDTA 50, dan KOH 31 g), *ferric solution* ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,98 g/L, dan H_2SO_4 conc. 10 tetes), dan H_3BO_3 11,42 g/L. Medium BBM dibuat dengan cara melarutkan 10 mL masing-masing makronutrien dan 1 mL mikronutrien dalam 1 L aquades, lalu disterilisasikan dengan *autoclave* dan didinginkan sebelum digunakan (Singh, Gupta, Guldhe, Rawat, & Bux, 2015)

Seleksi medium

Isolat mikroalga dikultur dengan 5 jenis medium, yaitu BBM, GM6-30-30, GM10-55-10, GM 20-20-20 dan GM32-10-10, dan pertumbuhannya dipantau berdasarkan nilai *optical density* OD-400nm dari kultur dengan spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesys*). Medium dengan pertumbuhan mikroalga terbaik digunakan sebagai medium pertumbuhan untuk penelitian selanjutnya. Mikroalga dipanen pada fasa stationer dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 1914 g. Biomassa mikroalga yang didapat dikeringkan pada kondisi gelap selama 3 hari, kemudian disimpan pada suhu 4 °C sampai waktu analisis (Kee et al., 2017).

Tahap induksi dengan stres nitrogen dan fosfor

Penerapan stres nutrisi yang berupa kekurangan atau kelebihan kadar N dan P pada medium BBM dilakukan setelah kultur mikroalga di dalam medium BBM mencapai akhir fasa eksponensial (hari ke 18).

Kultur berumur 18 hari disentrifugasi pada kecepatan 1914 g, kemudian biomassa mikroalga yang diperoleh dimasukkan ke dalam medium BBM termodifikasi berikut: BBM kekurangan N dan P mengandung 0 M NaNO_3 , 0 M KH_2PO_4 ; BBM kelebihan N mengandung 1 M NaNO_3 (3 kali lipat), 1,5 M NaNO_3 (5 kali lipat) dan 3 M NaNO_3 (10 kali lipat); BBM kelebihan P mengandung 0,4 M KH_2PO_4 (3 kali lipat), 0,6 M KH_2PO_4 (5 kali lipat), 1,3 M KH_2PO_4 (10 kali lipat). Medium kontrol adalah BBM dalam kondisi normal dengan 0,3 M NaNO_3 dan 0,1 M KH_2PO_4 , lalu dikultur selama 3 hari (Moussa, Chtourou, Karray, Sayadi, & Dhouib, 2017).

Penentuan pertumbuhan dan produktivitas biomassa

Pertumbuhan mikroalga diamati setiap hari dengan pengukuran $\text{OD}_{400\text{nm}}$ dan biomassa sel kering (DCW) mg/L. Produktivitas biomassa (BP) ditentukan nilainya dengan mengacu kepada persamaan BP (mg/L/hari) (Moussa et al., 2017)

Penentuan pigmen fotosintesis

Kandungan pigmen klorofil a, klorofil b dan karotenoid total ditentukan berdasarkan metoda Lichtenthaler (1987). Kultur mikroalga (2 mL) disentrifugasi pada kecepatan 1914 g selama 5 menit, pelet diambil lalu ditambahkan metanol lalu diinkubasi pada suhu 60 °C selama 30 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang dan disentrifugasi ulang pada kecepatan 1914 g selama 5 menit. Pigmen terlarut diukur pada panjang gelombang 470, 650 dan 665 nm.

Kandungan pigmen ditentukan dengan formulasi sebagai berikut :

$$\text{Klorofil a} (\mu\text{g/mL}) = (16,72 \times A_{665}) - (9,16 \times A_{652})$$

$$\text{Klorofil b} (\mu\text{g/mL}) = (34,09 \times A_{652}) - (15,28 \times A_{665})$$

$$\text{Karotenoid} (\mu\text{g/mL}) = (1000 \times A_{470}) - (1,63 \times \text{klorofil a}) - (104,96 \times \text{klorofil b}) / 221$$

Analisis b-karoten dengan HPLC

Standar β -karoten (*Sigma Aldrich*) ditimbang sebanyak 5 mg, lalu dilarutkan dalam 10 mL pelarut (fasa gerak) diklorometan : asetonitril : metanol dengan perbandingan 20:70:10 (v/v/v), untuk mendapatkan larutan stok β -karoten 500 ppm. Larutan standar β -karoten 37,5 ppm, 75 ppm, 150 ppm, dan 300 ppm dibuat dengan cara mengencerkan larutan stok β -karoten.

Sebelum pengukuran dengan HPLC, pigmen diekstrak dengan cara maserasi sebanyak 0,1 g

biomassa kering mikroalga dengan 5 mL aseton selama 24 jam sebanyak 3 kali, hingga ekstrak tidak berwarna. Selanjutnya ekstrak disentrifugasi pada kecepatan 4000 g selama 3 menit untuk memisahkan sisa-sisa biomasanya, lalu dikeringkan dalam kondisi gelap selama 1 malam. Ekstrak kering dilarutkan dalam 2 mL pelarut (fasa gerak) diklorometan : asetonitril : metanol dengan perbandingan 20:70:10. Selanjutnya β -karoten standar dan sampel diinjeksikan ke instrumen HPLC (Shimadzu SPD 20 A / SPD-20AV) yang dilengkapi dengan kolom C18 (Shim-pack VP-ODS LUNA). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan kecepatan alir bahan 0,9 mL/menit, pada temperatur 25 °C (Sekatresna, Dharma, Zein, & Chaidir, 2016). Kadar β -karoten pada mikroalga terpilih dihitung dengan menggunakan persamaan regresi yang dihasilkan dari analisis HPLC β -karoten standar. Persentase β -karoten dihitung dengan persamaan berikut :

$$\beta\text{-karoten (\%)} = \frac{\text{Berat } \beta\text{-karoten dalam sampel (mg)}}{\text{Berat biomassa kering mikroalga (mg)}} \times 100\%$$

Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan dengan perangkat lunak SPSS dengan metoda *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA). Perlakuan dilakukan triplo. Signifikan hasil uji dipertimbangkan ketika $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Spesies Mikroalga

Sampel diambil dari air Danau Atas yang terletak pada ketinggian di atas 1400 mdpl dengan suhu relatif rendah yaitu berkisar 18,5 °C. Mikroorganisme yang berasal dari lingkungan ekstrim mampu memproduksi karotenoid dengan jumlah tinggi salah satunya lingkungan dengan suhu rendah (Strand, Shivaji, & Liaaen-Jensen, 1997), sehingga dari lokasi sampel diharapkan mikroalga yang terisolasi berpotensi sebagai sumber karotenoid seperti β -karoten.

Dari sampel air Danau Atas, dapat dikenali sebanyak 18 spesies mikroalga berdasarkan morfologinya. Jenis-jenis tersebut diamati dengan mikroskop binokuler dan diidentifikasi berdasarkan sumber www.algabase.org. Morfologi mikroalga yang teridentifikasi dari Danau Atas disajikan pada Gambar 1.

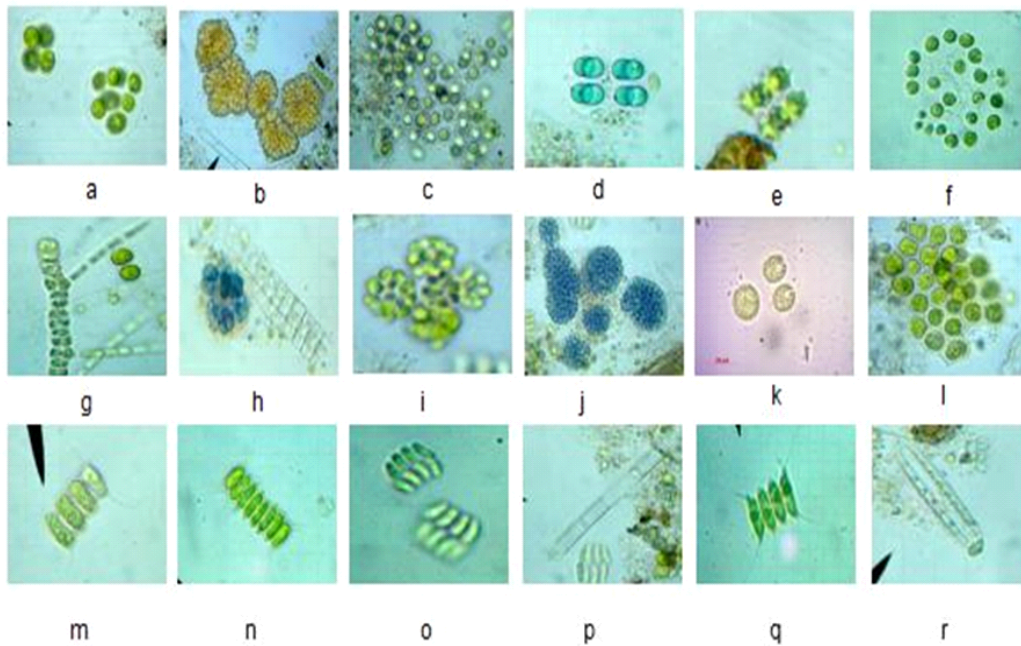
Penapisan dengan cara penyinaran UV-A 326 nm pada kultur campuran 18 spesies mikroalga menyisakan 5 jenis mikroalga yaitu *Oocystis* sp. *Denticula tenuis*, *Gleocystis schroeteri*, *Scenedesmus longispina* dan *Fragillaria construens*. Mikroalga yang masih bertahan merupakan mikroalga yang berpotensi mengandung karotenoid tinggi. Namun, hanya *Oocystis* sp. yang dipelajari lebih lanjut pada penelitian ini.

Medium Pertumbuhan Mikroalga

Kecocokan terhadap medium pertumbuhan dapat dilihat melalui kurva waktu terhadap nilai OD_{400nm} (Gambar 2). Terlihat pertumbuhan *Oocystis* sp. terbaik adalah pada medium BBM, diikuti oleh medium GM 32-10-10. Masing-masing spesies mikroalga mempunyai kesesuaian komposisi medium yang berbeda. Pertumbuhan *Scenedesmus rubescens* di dalam medium GM 32-10-10 terlihat lebih baik dibandingkan di dalam medium BBM, sementara *Galdieria sulphuraria* tumbuh dengan pola dan tingkat pertumbuhan yang sama di dalam medium BBM maupun di dalam GM 32-10-10 (Hernandi, Dharma, & Armaini, 2018). Kedua mikroalga terakhir berasal dari sumber air yang sama dengan *Oocystis* sp.

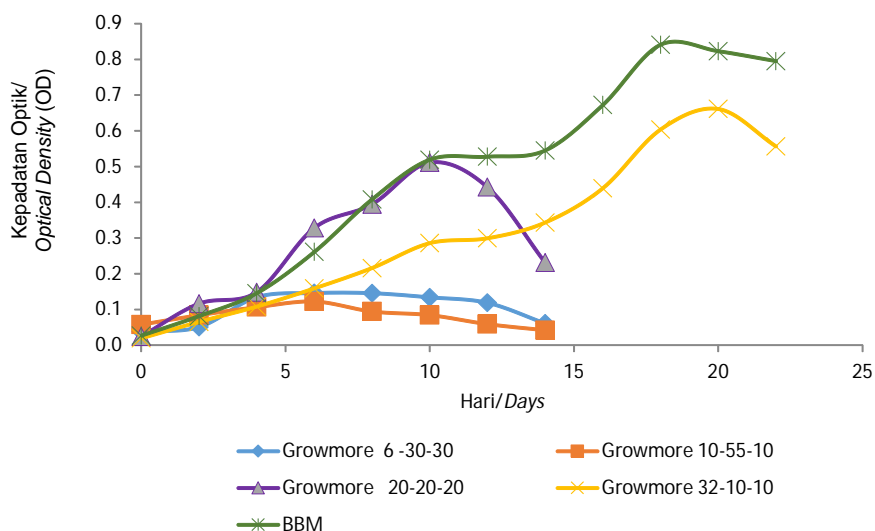
Pertumbuhan *Oocystis* sp. sama sekali tidak didukung oleh medium GM 6-30-30, dan GM 10-55-10, sedangkan GM 32-10-10 dapat mendukung pertumbuhan *Oocystis* sp, namun masih lebih rendah dibandingkan dengan medium BBM. Diduga kandungan N pada medium GM 6-30-30 dan GM 10-55-10 sangat kecil sehingga tidak bisa mendukung pertumbuhan mikroalga *Oocystis* sp. (Gambar 2). Berdasarkan hal tersebut, persentase optimum N untuk mendukung pertumbuhan *Oocystis* sp. adalah 34% seperti yang terkandung di dalam medium BBM.

Nutrien adalah faktor penting dalam produksi biomassa mikroalga, terlebih pada unsur makronutrien seperti N, P dan K. Medium GM 32-10-10 yang memiliki kandungan N lebih tinggi dari P dan K-nya, terdeteksi memiliki umur/masa kultur *Oocystis* sp. yang lebih panjang serta biomassa lebih tinggi dibandingkan dengan medium GM lainnya. Namun pertumbuhan *Oocystis* sp. lebih baik pada medium BBM daripada medium GM 32-10-10. Dalam medium BBM terkandung N sebesar 25 g/L dari NaNO₃, P sebesar 17,5 g/L dari KH₂PO₄ dan K sebesar 7,5 g/L dari K₂HPO₄. Pada komposisi demikian, didapatkan rata-rata produktifitas bioamassa mikroalga *Oocystis* sp. sekitar 0,7 g/L. Dari lima medium yang telah diujicobakan medium BBM memberikan hasil pada



Gambar 1. Mikroalga yang teridentifikasi dari perairan Danau Atas, Alahan Panjang, Kabupaten Solok dengan perbesaran 400x (a) *Asterococcus limneticus*, (b) *Botryococcus braunii*, (c) *Chroococcus dispersus*, (d) *C. limnticus*, (e) *Coeleastrum morus*, (f) *Dyctiosphaerium pulchellum*, (g) *Fischerella mucicola*, (h) *Fragillaria construens*, (i) *Gleocystis schroeteri*, (j) *Microcystis aeruginosa*, (k) *Oocystis sp.*, (l) *Pediatrum integrum*, (m) *Scenedesmus quadricauda*, (n) *S. obliquus*, (o) *S. arcuatus*, (p) *Aulacoseira italica*, (q) *S. longispina*, (r) *Denticula tenuis*

Figure 1. *Microalgae identified from the waters of Danau Atas, Alahan Panjang, Kabupaten Solok with a magnification of 400x(a) Asterococcus limneticus, (b) Botryococcus braunii, (c) Chroococcus dispersus, (d) C. limnticus, (e) Coeleastrum morus, (f) Dyctiosphaerium pulchellum, (g) Fischerella mucicola, (h) Fragillaria construens, (i) Gleocystis schroeteri, (j) Microcystis aeruginosa, (k) Oocystis sp., (l) Pediatrum integrum, (m) Scenedesmus quadricauda, (n) S. obliquus, (o) S. arcuatus, (p) Aulacoseira italica, (q) S. longispina, (r) Denticula tenuis*



Gambar 2. Pertumbuhan mikroalga *Oocystis sp.* pada media BBM dan Growmore
 Figure 2. *Oocystis sp.* growth on BBM and Growmore media

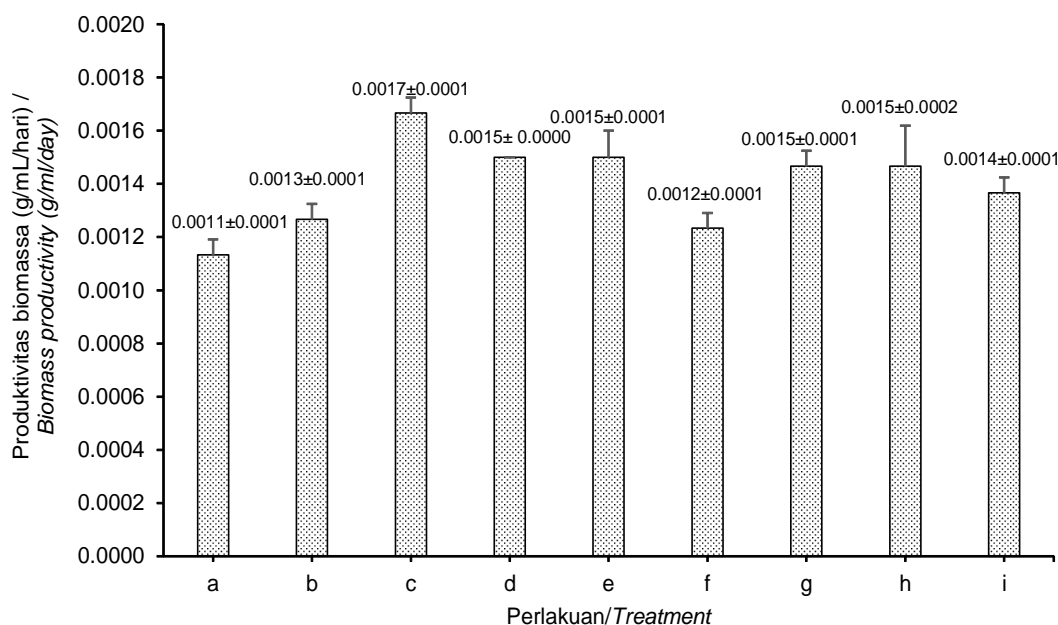
kultur *Oocystis* sp. terbaik, sehingga digunakan pada kultur selanjutnya.

Efek induksi terhadap produktivitas biomassa *Oocystis* sp.

Produktivitas biomassa mikroalga *Oocystis* sp. tertinggi diperoleh pada perlakuan induksi dalam kondisi konsentrasi 5x NaNO₃ yaitu sekitar 0,0017 g/mL/hari (Gambar 3). Hal ini menunjukkan keadaan medium induksi *Oocystis* sp. pada konsentrasi optimal, sedangkan induksi dengan kelebihan NaNO₃ lainnya dan medium BBM normal (kontrol) memiliki produktivitas yang lebih rendah (Gambar 3). Stres nitrogen (N) berpengaruh terhadap produktivitas biomassa *Oocystis* sp. (p<0,05). Perlakuan konsentrasi N yang kurang dan berlebih dari kondisi normal dapat memberikan efek berbeda terhadap produktivitas biomassa *Oocystis* sp. Nitrogen adalah faktor penting pada medium pertumbuhan dengan konsentrasi tertentu. Kelebihan atau kekurangan akan mengganggu pertumbuhan sel. Hal ini tergantung dari kondisi kultur dan jenis spesies (Li, Horsman, Wang, Wu, & Lan, 2008).

Keberadaan N dalam medium pertumbuhan sangat berpengaruh terhadap produktivitas biomassa. Produktivitas biomassa *Oocystis* sp. dalam kondisi medium tanpa N (0 M NaNO₃) terdeteksi paling rendah yaitu sekitar 0,0011 g/mL/hari. Barsanti dan Gualtieri (2006) dalam Wehr (2018) menyatakan bahwa, N merupakan komponen utama untuk pertumbuhan alga karena fungsinya dalam komposisi struktural sel dan fungsi protein seperti enzim dalam sel alga. Namun hasil penelitian menunjukkan mikroalga masih dapat bertahan hidup walaupun tanpa N. Hal ini karena mikroalga mampu memanfaatkan cadangan N seperti klorofil yang dikonversi ke protein, asam nukleat dan isi sel lainnya. Li et al. (2008) menyatakan hal tersebut dilakukan untuk menopang pertumbuhan mikroalga sehingga mikroalga masih bisa bertahan.

Selain N, unsur P juga berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produktivitas biomassa *Oocystis* sp. Kultur mikroalga *Oocystis* sp. pada medium 0 M KH₂PO₄ (defisiensi fosfor) memiliki produktivitas biomassa yang rendah. Hal tersebut senada dengan hasil penelitian yang didapatkan oleh Kozłowska-Szerenos et al. (2000) terhadap *C. vulgaris*. Pada



Keterangan/Notes :

- a = BBM tanpa NaNO₃/BBM without NaNO₃
- b = BBM dengan 3x NaNO₃/BBM with 3x NaNO₃
- c = BBM dengan 5x NaNO₃/BBM with 5x NaNO₃
- d = BBM dengan 10x NaNO₃/BBM with 10x NaNO₃
- e = BBM Normal/Normal BBM

- f = BBM tanpa KH₂PO₄/BBM without KH₂PO₄
- g = BBM dengan 3x KH₂PO₄/BBM with 3x KH₂PO₄
- h = BBM dengan 5x KH₂PO₄/BBM with 5x KH₂PO₄
- i = BBM dengan 10x KH₂PO₄/BBM with 10x KH₂PO₄

Gambar 3. Produktivitas biomassa mikroalga *Oocystis* sp (g/mL/hari) selama proses kultivasi 21 hari
 Figure 3. *Microalgae Oocystis* sp (g/mL/day) biomass productivity during 21 days cultivation process.

penelitian mereka terjadi penurunan pertumbuhan *Chorella vulgaris* dari 30% hingga 40% akibat pembatasan jumlah fosfor pada kultur dibandingkan dengan mikroalga yang dikultur dalam medium kontrol. Walaupun demikian, beberapa mikroalga masih dapat tumbuh jika terjadi defisiensi sumber fosfor karena proses asimilasi fosfat (Li et al., 2008).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan pengaruh keberadaan P dalam jumlah berlebih dalam medium pertumbuhan. Konsentrasi P sebesar 3 kali, 5 kali dan 10 kali KH_2PO_4 menunjukkan produktivitas biomassa *Oocystis* sp. yang cenderung konstan namun lebih baik daripada perlakuan tanpa KH_2PO_4 . Hasil yang sama juga didapatkan oleh Moussa et al. (2017) pada mikroalga *Tetraselmis marina* yang tetap bertahan di bawah kondisi defisiensi P walaupun dari segi produktivitas biomassa menurun dari pada perlakuan kelebihan P. Produktivitas biomassa akibat perlakuan induksi dengan kelebihan KH_2PO_4 terdeteksi dengan baik, hal ini kemungkinan disebabkan peranan K dalam makronutrien tersebut. Unsur K merupakan kofaktor pada banyak reaksi enzim yang mempengaruhi laju pertumbuhan dan perkembangan (Talling, 2010).

Unsur N dan P merupakan makronutrien untuk pertumbuhan dan metabolisme dari sel alga. N adalah unsur fundamental untuk membentuk protein dan asam nukleat. N terintegrasi pada molekul esensial seperti ATP. P juga merupakan komponen yang sangat penting. P merupakan *backbone* dari DNA dan RNA yang merupakan makromolekul esensial untuk kehidupan semua sel. Selain itu, P merupakan komponen kunci dari fosfolipid (Juneja, Ceballos, & Murthy, 2013).

Efek Induksi terhadap Pigmen Fotosintesis *Oocystis* sp.

Perlakuan induksi terhadap mikroalga *Oocystis* sp., berpengaruh terhadap kandungan pigmen fotosintesisnya (Gambar 4). Analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan stres N dan P memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kandungan pigmen klorofil a, klorofil b serta karotenoid pada mikroalga *Oocystis* sp. ($p < 0,05$). Kandungan karotenoid total dengan medium induksi tanpa NaNO_3 terdeteksi lebih tinggi dibandingkan medium induksi yang memiliki kelebihan kandungan NaNO_3 seperti 3x NaNO_3 , 5x NaNO_3 , dan 10x NaNO_3 . Hal tersebut menunjukkan faktor kekurangan N menstimulus respon fisiologis dengan cepat yang selanjutnya diarahkan kedalam jalur biosintesis metabolit sekunder termasuk karotenoid. Secara umum defisiensi N mempunyai efek yang lebih baik daripada kelebihan N terhadap kandungan karotenoid. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh

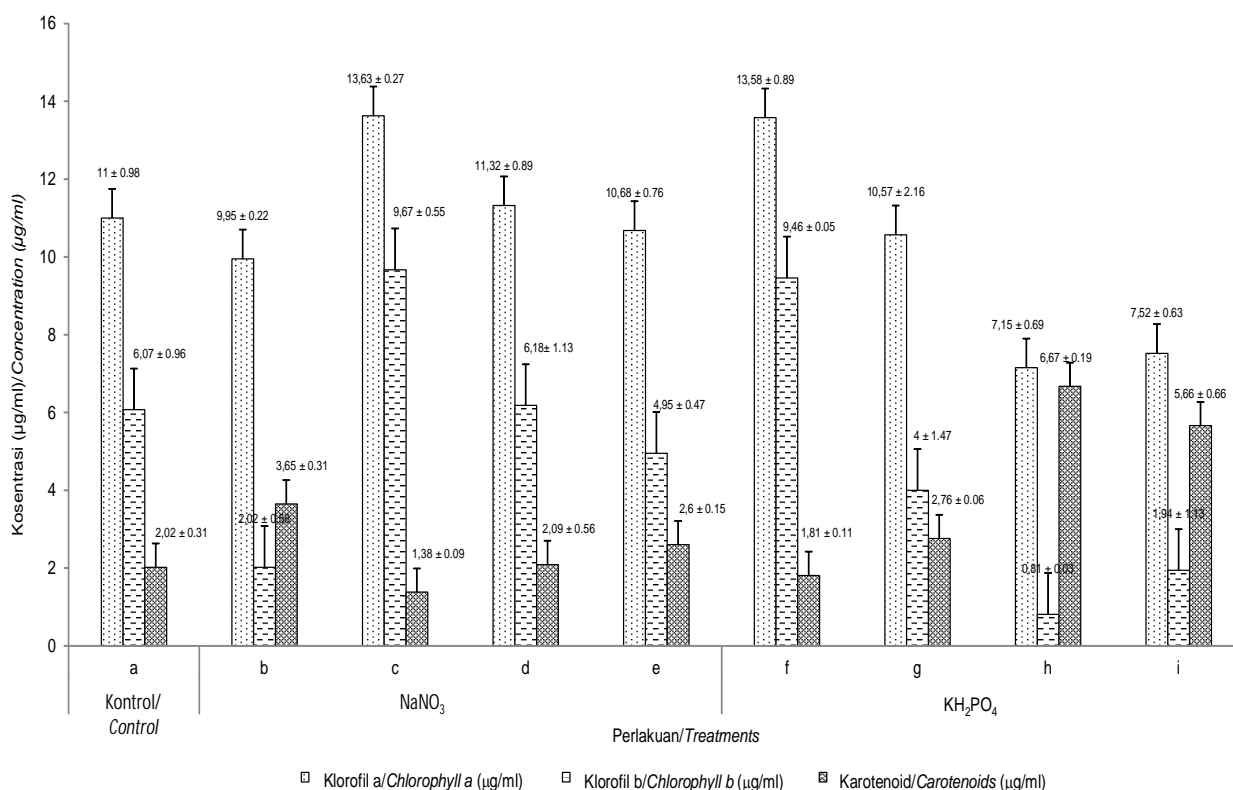
Borowitzka et al. (1991) terjadi peningkatan karotenoid jenis astaxantin pada mikroalga *Haematococcus pluvialis* karena kondisi defisiensi N. Pada kondisi kultur mikroalga dengan kandungan N yang rendah, mikroalga akan menjadikan karbon (C) yang terdapat pada sel dan medium untuk sintesis karotenoid, sedangkan kultur yang kaya dengan nitrogen menjadikan karbon sebagai bahan untuk asimilasi nitrogen.

Nilai klorofil a dan b terdeteksi lebih rendah di dalam medium pertumbuhan tanpa N dibandingkan dengan medium yang kelebihan N, nilai-nilai tersebut berbanding terbalik dengan kandungan karotenoidnya. Klorofil akan mudah terdeteksi pada medium yang kaya N, karena N tersebut digunakan sebagai N intraseluler untuk mendukung lebih lanjut pertumbuhan sel dan produksi biomassa sampai N di media tersebut berkurang (Li et al., 2008). Sebagai contoh *Chlamydomonas reinhardtii* dan *Scenedesmus subpicatus* hanya memasuki fasa stationer saat level N dalam medium di bawah 0,05 mg/L (Dean, Sigee, Estrada, & Pittman, 2010).

Studi lain melaporkan, ketika N ditambahkan ke dalam medium inokulum *Chorella minutissima* yang telah kekurangan N, ternyata terjadi peningkatan kandungan klorofil a dan b. Hal ini mengindikasikan keberadaan N dalam medium menyebabkan akumulasi pada klorofil a dan b. Pada perlakuan N yang lebih tinggi akan terjadi perbaikan dari klorofil, selanjutnya akan menunjukkan laju pertumbuhan lebih cepat. Akan tetapi pada medium yang kekurangan N, maka klorofil akan didegradasi menjadi N dan digunakan kembali untuk pertumbuhan dengan kandungan klorofil a dan b yang lebih rendah. Hasil yang sama juga terjadi penurunan klorofil dengan cepat pada mikroalga *Neochloris oleoabundus* yang telah dikultur selama 2 hari (Li et al., 2008).

Pada perlakuan induksi dengan 5x KH_2PO_4 dan 10x KH_2PO_4 kandungan karotenoid terdeteksi lebih tinggi namun kandungan klorofil a dan b terdeteksi lebih rendah, sedangkan untuk perlakuan 3x KH_2PO_4 dan tanpa KH_2PO_4 memiliki kandungan karotenoid yang rendah namun dengan kandungan klorofil a dan b yang lebih tinggi. Kekurangan P dalam medium mampu menurunkan produktivitas biomassa serta kandungan karotenoid namun tidak memberikan efek penurunan terhadap pigmen klorofil pada mikroalga (Kozłowska-Szerenos et al., 2000).

Unsur P mempunyai peranan dalam proses metabolisme energi. Kelebihan atau peningkatan kandungan P dalam medium pertumbuhan mikroalga *Tetraselmis marina* memberikan korelasi positif terhadap kandungan karotenoidnya (Moussa et al., 2017), selain itu peningkatan P dan N dalam medium pertumbuhan terdeteksi mampu meningkatkan pigmen



Keterangan/Notes :

- a = BBM normal 0,3 M NaNO₃ dan 0,1 M KH₂PO₄/Normal BBM 0.3 M NaNO₃ 0.1 M and KH₂PO₄
- b = BBM tanpa NaNO₃/without NaNO₃
- c = BBM dengan 3x NaNO₃/BBM with 3x NaNO₃
- d = BBM dengan 5x NaNO₃/BBM with 5x NaNO₃
- e = BBM dengan 10x NaNO₃/BBM with 10x NaNO₃
- f = BBM tanpa KH₂PO₄/BBM without KH₂PO₄
- g = BBM dengan 3x KH₂PO₄/BBM with 3x KH₂PO₄
- h = BBM dengan 5x KH₂PO₄/BBM with 5x KH₂PO₄
- i = BBM dengan 10x KH₂PO₄/BBM with 10x KH₂PO₄

Gambar 4. Efek konsentrasi NaNO₃ dan KH₂PO₄ terhadap kandungan pigmen fotosintesis
 Figure 4. The effects concentrations of NaNO₃ and KH₂PO₄ on the pigment content of photosynthesis

fotosintesis pada mikroalga *Hypnea musciformis* (Martins, Junior, Colepicolo, & Yokoya, 2011).

Mikroalga diketahui memproduksi pigmen dan senyawa bioaktif yang terfokus pada tiga jenis antara lain klorofil, phicobillin dan karotenoid (Abalde, Fabregas, & Herrero, 1991). Pigmen fotosintesis seperti klorofil a dan b memiliki peranan penting dalam proses fotosintesis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi nutrisi dapat mempengaruhi kandungan pigmen pada mikroalga *Oocystis* sp.

Analisis β-karoten

Analisis standar β-karoten dengan HPLC menghasilkan persamaan regresi $y = 12.790.618,26x - 50.841,04$ dengan nilai $R^2 = 0,94$. Kandungan β-karoten tertinggi pada mikroalga *Oocystis* sp. terdeteksi pada perlakuan induksi dengan kandungan medium BBM dengan 5x KH₂PO₄ yaitu sekitar 0,22% dari berat kering biomassa mikroalga (Gambar 5).

Persentase demikian mengindikasikan bahwa kandungan β-karoten mikroalga *Oocystis* sp. terbilang cukup baik. Menurut Milledge, konsentrasi rata-rata karotenoid (β-karoten) pada mikroalga secara umum adalah 0,1-2 % (Milledge, 2011).

Pengaruh induksi medium BBM dengan kandungan 5x KH₂PO₄ terhadap β-karoten pada mikroalga *Oocystis* sp. dapat dinyatakan lebih tinggi 1,6 kali lipat dibandingkan dengan mikroalga yang tidak diberi perlakuan induksi sama sekali. Selain itu produktivitas biomasanya pun hampir sama dengan mikroalga yang diinduksi dengan medium BBM normal yaitu 0,001 g/mL/hari. Dengan demikian, perlakuan induksi dengan medium yang kaya fosfor memberikan efek yang positif terhadap sintesis β-karoten pada mikroalga *Oocystis* sp.

Kandungan β-karoten (Gambar 5) pada perlakuan induksi tanpa KH₂PO₄ tidak terdeteksi sama sekali. Hasil yang sama juga ditemukan pada mikroalga

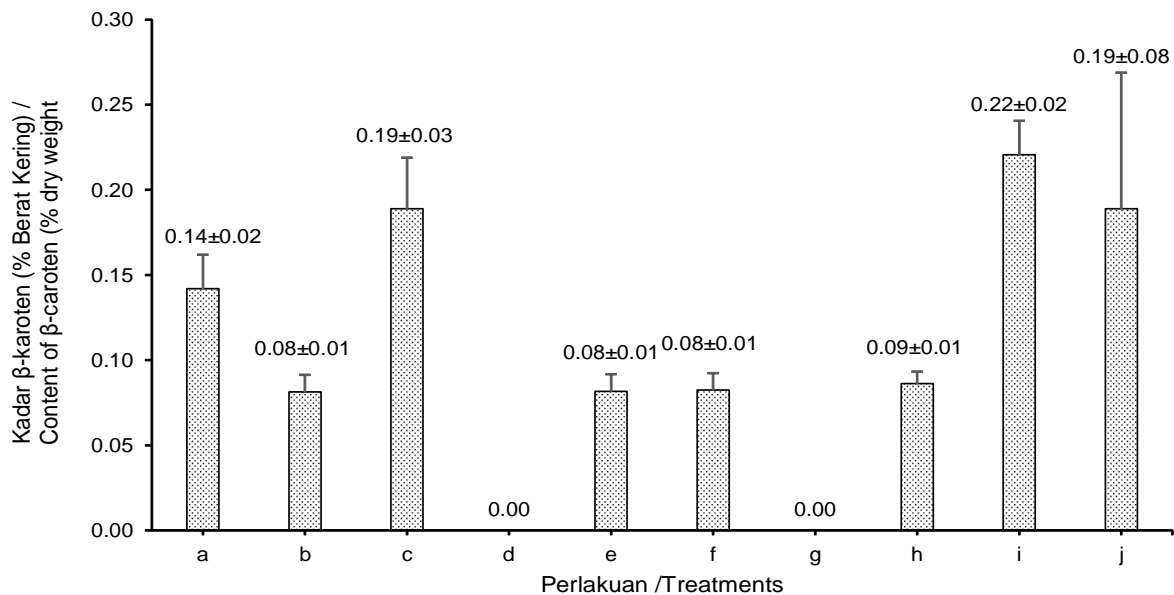
Nannochloropsis, bahwa tidak terjadi peningkatan kandungan karotenoid jenis β -karoten pada mikroalga yang ditumbuhkan dalam medium dengan kandungan P yang kurang, namun terjadi peningkatan pada zeaxantin. Selain β -karoten, karotenoid lain yang tidak mengalami peningkatan adalah violaxantin dan cantaxantin (Forján, Garbayo, Casal, & Vílchez, 2007).

Perlakuan induksi terhadap mikroalga *Oocystis* sp. dengan medium BBM tanpa NaNO_3 terdeteksi memiliki kandungan β -karoten sekitar 0,19 % berat kering mikroalga (Gambar 5). Data tersebut menunjukkan peningkatan kandungan β -karoten akibat proses induksi sekitar 1,34 kali lipat dibandingkan dengan mikroalga yang tidak diberikan perlakuan induksi. Secara umum defisiensi N mempunyai efek yang lebih baik dalam produksi β -karoten daripada kondisi kelebihan N, seperti pada mikroalga *Dunaliella salina* yang memberikan efek peningkatan kandungan β -karoten diatas 2,7 % berat kering mikroalga (Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016). Namun berbeda dengan hasil penelitian yang didapatkan oleh Couso

et al. (2012) pada mikroalga *Chlamydomonas reinhardtii*, bahwa defisiensi nitrogen pada medium pertumbuhan tidak memberikan hasil yang lebih baik terhadap karotenoid jenis β -karoten namun menunjukkan hasil yang lebih baik pada jenis karotenoid lainnya seperti zeaxantin. Hal tersebut disebabkan oleh aktivasi siklus *xantofil*.

KESIMPULAN

Pada proses penapisan mikroalga penghasil karotenoid dari perairan Danau Atas diperoleh *Oocystis* sp. sebagai spesies yang mampu bertahan terhadap stres oksidatif sinar UV-A 326 nm. Karotenoid jenis β -karoten pada *Oocystis* sp. dapat dioptimalkan dengan cara pemberian stres nutrien N dan P. Hasil menunjukkan induksi *Oocystis* sp. dengan medium BBM yang mengandung $5x \text{KH}_2\text{PO}_4$ memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan induksi lainnya. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat melakukan analisis terhadap kandungan karotenoid jenis lainnya seperti astaxantin, zeaxantin, lutein dan masih banyak lagi.



Keterangan/Notes :

a = Tidak diinduksi/No induction

b = BBM normal/Normal BBM

c = BBM tanpa NaNO_3 /BBM without 0NaNO_3

d = BBM dengan $3x \text{NaNO}_3$ /BBM with $3x \text{NaNO}_3$

e = BBM dengan $5x \text{NaNO}_3$ /BBM with $5x \text{NaNO}_3$

f = BBM dengan $10x \text{NaNO}_3$ /BBM with $10x \text{NaNO}_3$

g = BBM tanpa KH_2PO_4 /BBM without $0 \text{KH}_2\text{PO}_4$

h = BBM dengan $3x \text{KH}_2\text{PO}_4$ /BBM with $3x \text{KH}_2\text{PO}_4$

i = BBM dengan $5x \text{KH}_2\text{PO}_4$ /BBM with $5x \text{KH}_2\text{PO}_4$

j = BBM dengan $10x \text{KH}_2\text{PO}_4$ /BBM with $10x \text{KH}_2\text{PO}_4$

Gambar 5. Kadar β -karoten pada mikroalga *Oocystis* sp dalam beberapa perlakuan

Figure 5. The levels of β -carotene in *Oocystis* sp microalgae in several treatments

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian dan penyusunan artikel ilmiah ini. Terucap kepada analis Laboratorium Biokimia, Genetika, FMIPA Universitas Andalas, dan Analis Laboratorium Dasar Sentral Universitas Andalas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abalde, J., Fabregas, J., & Herrero, C. (1991). β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 38(2–3), 121–125. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90142-7](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90142-7)
- Asker, D., & Ohta, Y. (1999). Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 617–621. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87089-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87089-9)
- Borowitzka, M. A., Huisman, J. M., & Osborn, A. (1991). Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*, 3(4), 295–304. <https://doi.org/10.1007/BF02392882>
- Coates, C. R., Trentacoste, E., & Gerwick, W. H. (2013). Bioactive and novel chemicals from microalgae. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture* (pp. 504–531). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch26>
- Couso, I., Vila, M., Vígara, J., Cordero, B. F., Vargas, M. Á., Rodríguez, H., & León, R. (2012). Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology*, 47(3), 223–232. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.692816>
- Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., & Pittman, J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12), 4499–4507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>
- Forján, E., Garbayo, I., Casal, C., & Vilchez, C. (2007). Enhancement of carotenoid production in. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp. 356–364). Formatex.
- Hernandi, R.; Dharma, A. A. (2018). Screening, Isolation, and Characterization of the Potential Microalgae as Biodiesel Production from Lake Kerinci, Jambi, 9(6), 5.
- Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*, 6(9), 4607–4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>
- Kozłowska-Szerenos, B., Zieliński, P., Stanisław, & Maleszewski. (2000). Involvement of glycolate metabolism in acclimation of *Chlorella vulgaris* cultures to low phosphate supply. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(9), 727–734. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01175-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01175-X)
- Lam, M. K., Yusoff, M. I., Uemura, Y., Lim, J. W., Khoo, C. G., Lee, K. T., & Ong, H. C. (2017). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, 103, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.032>
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Martins, A. P., Junior, O. N., Colepicolo, P., & Yokoya, N. S. (2011). Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(2), 340–348. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000078>
- Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Moussa, I. D.-B., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S., & Dhoub, A. (2017). Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology*, 238, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.008>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216–1226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Ramos, A., Coesel, S., Marques, A., Rodrigues, M., Baumgartner, A., Noronha, J., ... Varela, J. (2008). Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* Lcy-beta gene encoding a functional lycopene beta-cyclase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 819. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1492-4>
- Sekatresna, W., Dharma, A., Zein, R., & Chaidir, Z. (2016). Identification of blue-green algae uncultured oscillatoria sp IPOME-4 isolated from local industry

- effluent with the potential as β -carotene feedstock. *Der Pharma Chemica*, 8(12), 110–117.
- Singh, P., Gupta, S. K., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Microalgae isolation and basic culturing techniques. In S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of marine microalgae* (pp. 43–54). Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00004-2>
- Stafsnes, M. H., Josefsen, K. D., Kildahl-Andersen, G., Valla, S., Ellingsen, T. E., & Bruheim, P. (2010). Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. *Journal of Microbiology*, 48(1), 16–23. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0118-6>
- Talling, J. F. (2010). Potassium- A non-limiting nutrient in fresh waters?. *Freshwater Reviews*, 3(2), 97–104. Retrieved from <https://doi.org/10.1608/FRJ-3.2.1>
- Wehr, J. D. (2018). *Algae/ : Anatomy , Biochemistry , and Biotechnology* by Barsanti , L . & Gualtieri ,. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00335.x>

