

ANALISIS PIGMEN KAROTENOID dan UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI serta KARAKTERISASI DAERAH PENANDA ITS dari *Nannochloropsis oculata***Azalia Puspa Herida*, Hermin Pancasakti Kusumaningrum, dan Endang Kusdiyantini***Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas**Diponegoro JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang, Semarang**50275 Indonesia***azaliapuspaherida@gmail.com***ABSTRAK**

Nannochloropsis oculata merupakan mikroalga yang umum digunakan pada pakan tambahan budidaya hewan laut. Mikroalga *N. oculata* mampu menghasilkan pigmen karotenoid salah satunya β -karoten berfungsi sebagai antioksidan serta senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai agen antibakteri. Penamaan mikroalga *N. oculata* dari Gondol Bali hanya dilakukan berdasarkan pengamatan mikrobiologis, karakterisasi biokimia, dan ekofisiologis tetapi belum dianalisis hingga tingkat molekuler. Identifikasi molekuler mikroalga dapat dilakukan pada daerah penanda ITS (*Internal Transcribed Spacer*) hingga di tingkat spesies. Tujuan penelitian yaitu, menganalisis kandungan pigmen karotenoid berupa β -karoten, menguji kemampuan *N. oculata* sebagai agen antibakteri, serta karakterisasi molekuler *N. oculata* menggunakan daerah penanda ITS. Metode penelitian ini meliputi kultivasi mikroalga, analisis pigmen β -karoten, uji antibakteri kultur *N. oculata*, isolasi DNA menggunakan metode Doyle & Doyle, amplifikasi daerah ITS menggunakan primer ITS 4 dan ITS 5, sekuensing DNA hasil amplifikasi, analisis filogenetik melalui program BLAST, Clustal X, NJ Plot, dan MEGA 6. Hasil penelitian diketahui bahwa analisis pigmen β -karoten mengalami peningkatan kadar β -karoten selama masa kultur dan menurun pada fase stasioner. Kadar β -karoten tertinggi sebesar 0,08 $\mu\text{g/mL}$. Kultur *N. oculata* mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji dengan kategori hambat sedang terhadap bakteri Gram negatif *Eschericia coli* dan Gram positif *Staphylococcus aureus*. Amplifikasi daerah penanda ITS menggunakan metode PCR menghasilkan sekuens sebesar 985 bp. Hasil BLAST menunjukkan *N. oculata* memiliki kemiripan sekuens sebesar 99,43% dengan *N. oceanica*. Penelitian ini disimpulkan bahwa *N. oculata* memiliki pigmen β -karoten yang dihasilkan selama masa pertumbuhan mikroalga. Kultur *N. oculata* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji dengan semakin banyak volume yang diberikan daya hambat yang

dihasilkan semakin besar. *N. oculata* berdasarkan pohon filogenetik berkerabat dekat dengan sekuen referensi *N. oceanica* strain IMP-BG-006.

Kata kunci: *Nannochloropsis oculata*, ITS, filogenetik, β -karoten, antibakteri

ABSTRACT

Nannochloropsis oculata is a microalgae that commonly used in additional feed for the cultivation of marine animals. *N. oculata* is able to produce carotenoid pigments like β -carotene that is used to antioxidant and bioactive compound that is used to antibacterial agent. The name of *N. oculata* is from Gondol Bali that is only base on microbiological, biochemical characterization, and ecophysiological but analysis in the molecular level has not been done. Molecular identification of microalgae can be carried out in the ITS (Internal Transcription Spacer) marker region to species level. The purpose of the study was to analyze the content of carotenoid pigments, to test the ability of *N. oculata* as an antibacterial agent, and molecular characterization of *N. oculata* using the ITS region. This research method consist of the following microalgae cultivation, analysis of β -carotene pigment, antibacterial test of *N. oculata* culture, DNA isolation, amplification of ITS region using ITS 4 and ITS 5 primer, phylogenetic analysis using BLAST, Clustal X, NJ Plot, and MEGA 6. The results of this research showed the analysis of β -carotene pigment have increased levels of β -carotene during the culture period and it decreased in the stationary phase. The highest β -carotene level was 0.08 $\mu\text{g} / \text{mL}$. *N. oculata* culture was able to inhibit the growth of test bacteria with medium inhibition categories againts of Gram negative *Escherichia coli* and Gram positive *Staphylococcus aureus*. The amplification of ITS region by a PCR method obtained 985 bp sequences. The BLAST search used NCBI confirmed that *N. oculata* had 99,43% matching sequence with *N. oceanica*. This study was concluded by *N. oculata* contained β -carotene pigments and capable to inhibit the growth of test bacteria. The phylogenetic reconstruction indicated *N. oculata* that was used in this study closely related to the reference sequence *N. oceanica* strain IMP-BG-006.

Keywords: *Nannochloropsis oculata*, ITS, phylogenetic, β -carotene, antibacterial

1. Pendahuluan

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik berukuran renik berdiameter antara 3-30 μm , memiliki sel tunggal maupun koloni yang mampu hidup di seluruh wilayah perairan laut maupun tawar (Abdurrachman dkk, 2013). *Nannochloropsis oculata* memiliki sel yang berukuran 2-4 μm , dengan kloroplas berbentuk cangkir. Mikroalga jenis *N. oculata* banyak ditemui di sepanjang pantai dan estuari di atas zona fotik (Hu & Gao, 2003). *N. oculata* banyak dimanfaatkan sebagai sumber pakan dalam kultur rotifer, kerang, serta larva udang (Baharuddin, 2011). Pemanfaatan mikroalga sebagai sumber bahan pakan bagi budidaya hewan laut terus berkembang pesat. Analisis mengenai kandungan senyawa pada mikroalga yang diperlukan bagi penunjang kehidupan hewan laut budidaya.

Karotenoid mampu dihasilkan oleh mikroalga merupakan senyawa yang berfungsi sebagai agen antioksidan. Karotenoid yang dihasilkan pada mikroalga mampu dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pakan untuk meningkatkan kelulushidupan hewan laut budidaya. Mikroalga dalam genus *Nannochloropsis* mampu menghasilkan total karotenoid lebih besar dibandingkan dengan total karotenoid pada *D. Salina* (Darsi dan Sasanti, 2012). Kandungan karotenoid pada mikroalga *Nannochloropsis* mampu mencapai 65% dari bobot biomassa keringnya (Hossain *et al.*, 2008). Biosintesis karotenoid pada mikroalga disintesis melalui jalur non-mevalonat yang diproduksi di dalam plastid. Pembentukan karotenoid dikendalikan dari aktivitas enzim fitoen sintase (PSY) dan karotenoid hidroksilase (CH) (Hasidah dan Rousdy, 2017). Beta-karoten merupakan salah satu jenis karotenoid, selain sebagai provitamin-A, β -karoten juga berperan sebagai antioksidan (Yulianawati, 2012). Sintesis karotenoid pada mikroalga mampu mengalami peningkatan dengan perubahan kondisi kultur, seperti pemberian paparan radiasi, penambahan intensitas cahaya, serta perubahan komposisi nutrisi pada media kultivasi (Lubian *et al.*, 2000; Forjan *et al.*, 2007; Fakhri dkk, 2017).

Mikroalga mampu berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif yang dimanfaatkan sebagai antimikroba, antivirus, antikanker, serta antifungal. *Nannochloropsis oculata* merupakan mikroalga yang berpotensi sebagai agen antimikroba yang mampu menghasilkan senyawa metabolit berupa asam lemak dan fenol sebagai senyawa antimikrobia (Srivastava *et al.*, 2017). Asam lemak dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak struktur membran sel sehingga menyebabkan sel bakteri kehilangan zat internal sel yang mengakibatkan kematian (Amaro *et al.*, 2011). Senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antimikroba terakumulasi didalam sel dan mampu dieksresikan ke medium kultivasi yang disebut eksometabolit. EPS (*Extracellular Sulfated Polysaccharide*) salah satu senyawa

metabolit ekstraseluler yang dapat berfungsi sebagai antibakteri (Greque *et al.*, 2015).

Penamaan mikroalga *N. oculata* dari Gondol Bali hanya dilakukan berdasarkan pengamatan mikrobiologis, karakterisasi biokimia dan ekofisiologi. Identifikasi secara molekuler pada mikroalga *N. oculata* Gondol Bali belum pernah dilakukan sehingga perlu adanya karakterisasi molekuler yang mampu mendukung posisi *N. oculata* dalam filogenetik mengenai hubungan kekerabatannya dengan spesies *Nannochloropsis* yang berkerabat dekat melalui karakterisasi dari fragmen DNA daerah ITS. Identifikasi pada daerah penanda ITS mampu membedakan urutan sekuens DNA hingga ke tingkat spesies. Referensi yang banyak terdapat pada database NCBI mengenai analisis molekuler pada daerah penanda ITS mampu mempermudah dalam melakukan analisis data (Samson *et al.*, 2010; Beeck *et al.*, 2014).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini penting dilakukan untuk menganalisis karotenoid berupa beta karoten, analisis aktivitas antibakteria, serta karakterisasi daerah penanda ITS dari mikroalga *Nannochloropsis oculata*.

2. Metodologi

Penelitian ini dilaksanakan selama tiga bulan. Lokasi dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponego Semarang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, aerator, lampu, toples kaca, *haemocytometer*, cawan petri, inkubator, timbangan analitik, mortar, *pestle*, mikropipet, tip, *microtube*, *refrigerator*, *sentrifuge*, plastik, autoklaf, *vortex*, pipet tetes, *sterofoam*, *Nanodrop* 2000, *gradient* PCR, elektroforesis, UV *transilluminator*, oven, dan mikroskop. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga *N. oculata* dari Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan Gondol Singaraja Bali, air laut steril, pupuk walne, alkohol 96%, aseton, media NA, kloramfenikol, bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, cakram kertas, akuades, *gel ice*, CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), isopropanol, *Chloroform Isoamil Alcohol* (CIA), etanol 70%, ddH₂O, TAE, primer ITS 4 dan ITS 5, MyTag, *florosave*, dan DNA *ladder* 1 Kb.

Cara Kerja

a. Kultivasi *Nannochloropsis oculata*

Mikroalga dikultivasi sebanyak 60 mL isolat dalam 240 mL air laut steril dengan penambahan pupuk walne sebanyak 0,3 mL. Kultivasi dilakukan pada salinitas 30-34

ppt, dengan pemberian pencahayaan lampu TL 40 watt dan aerasi 24 jam. Pengukuran kepadatan sel dihitung menggunakan *haemocytometer*.

b. Analisis β -karoten *Nannochloropsis oculata*

Beta karoten dianalisis setiap 2 hari sekali dengan mengambil 2 mL kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk ditambahkan aseton sebanyak 5 mL dan divortex, kemudian disentrifugasi hingga terbentuk fasa atas yang digunakan dalam spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 436 nm.

Perhitungan kadar β -karoten didapatkan dengan rumus menurut AOAC

$$(1995): \beta\text{-karoten } (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs } (\lambda) : (196 \times 1 \times (\text{vol. Awal} : \text{vol. Akhir}))$$

Keterangan

Abs : Nilai absorbansi

λ : Panjang gelombang yang digunakan (436 nm)

196 : Koefisien ekstingsi β -karoten

1 : Ukuran kuvet yang digunakan

c. Uji Aktivitas Antibakteri *Nannochloropsis oculata*

Aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan kertas cakram. Kertas cakram diberi kultur *N. oculata* sebanyak 10 μL , 15 μL , dan 20 μL , kontrol berupa kontrol positif sebanyak 20 μL (kloramfenikol 100 $\mu\text{g/mL}$) serta kontrol negatif (kertas cakram kosong). Kertas cakram yang telah berisi sampel uji diletakkan di permukaan agar berisi bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya menggunakan jangka sorong.

d. Karakterisasi Daerah penanda ITS *Nannochloropsis oculata*

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle & Doyle dengan *buffer* ekstraksi CTAB. Kultur mikroalga disentrifugasi untuk memisahkan sel dengan media. Sel mikroalga yang terkumpul dihaluskan menggunakan mortar diatas *gel ice* dan ditambahkan CTAB. Larutan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit yang dihomogenkan setiap 10 menit sekali. Larutan ditambahkan CIA dengan perbandingan volume 1:1 terhadap sampel dan disentrifugasi. Supernatan yang terbentuk ditambahkan isopropanol dingin dengan perbandingan 1:1 terhadap sampel kemudian di *overnight*. Sampel disentrifugasi untuk memisahkan fasa cair dengan pelet. Pelet yang terbentuk

ditambahkan 100 μ l *buffer* TE dan 500 μ l etanol absolut dan di *overnight*. Larutan di sentrifugasi dan fasa cair dihilangkan. Pelet DNA dicuci menggunakan etanol 70% sebanyak 500 μ l dan pelet yang terbentuk dikeringanginkan dan dilarutkan menggunakan 50 μ l *buffer* TE dan disimpan pada suhu -20°C .

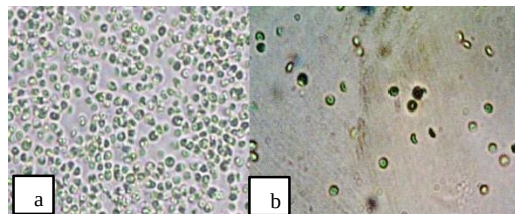
Uji kuantitatif DNA hasil isolasi dilakukan menggunakan *NanoDrop* 2000 sebanyak 1 μ l sampel yang dikalibrasi menggunakan ddH₂O sebanyak 1 μ l. Amplifikasi DNA hasil isolasi menggunakan PCR dengan primer *forward* ITS 5 dan *reverse* ITS 4. Reaksi PCR dibuat dengan mencampurkan 25 μ l My Taq, 3 μ l primer *forward* ITS 5, 3 μ l primer *reverse* ITS 4, 6 μ l *template* DNA dan 13 μ l ddH₂O. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang terdiri atas denaturasi awal selama 4 menit pada suhu 94°C , denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C , *annealing* selama 3 menit pada suhu 55°C , pemanjangan rantai selama 1 menit pada suhu 72°C serta pemanjangan akhir selama 7 menit pada suhu 72°C . Sampel hasil amplifikasi kemudian disimpan ke dalam *freezer*.

Sampel hasil amplifikasi diuji kualitatif menggunakan gel agarose 1% dengan penambahan 1 μ l *florosave*. Marker yang digunakan berupa DNA *ladder* 1kb sebanyak 3 μ l dan sampel uji sebanyak 3 μ l. DNA dielektroforesis selama 45 menit dengan voltase 100 volt. Hasil elektroforesis dilihat dibawah sinar UV menggunakan UV *transilluminator* dan pita-pita DNA yang tervisualisasi dapat diamati. DNA hasil amplifikasi kemudian di sekuensing untuk melihat urutan basa DNA. Hasil sekuensing dilakukan analisis filogenetik menggunakan BLAST pada laman NCBI dan menggunakan aplikasi berupa Clustal X, NJ Plot, dan Mega 6.

3. Hasil dan Pembahasan

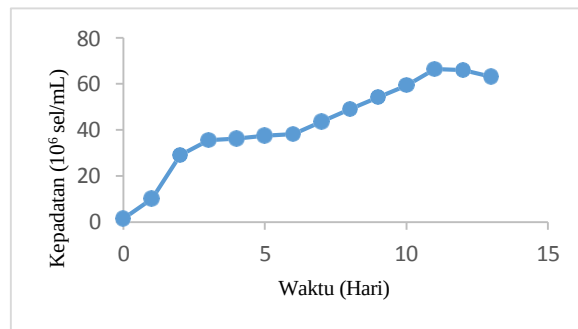
3.1 Kultivasi *Nannochloropsis oculata*

Hasil kultivasi ditunjukkan dengan adanya perubahan warna kultur dari hijau muda hingga hijau tua atau pekat. Perubahan warna kultur dikarenakan sel yang mengalami pertambahan kepadatan sehingga warna menjadi semakin pekat. Morfologi sel mikroalga *N. oculata* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Nannochloropsis oculata* perbesaran 400 kali (a) dan 1000 kali (b)

Mikroalga *N. oculata* diketahui memiliki sel berbentuk bulat berwarna hijau yang tidak memiliki flagel. Pertumbuhan sel selama masa kultivasi salah satunya dipengaruhi oleh nutrisi pada media. Menurut Kadek dkk (2017), media walne mengandung unsur N berupa NaNO_3 dan unsur P berupa NaH_2PO_4 sebagai makronutrien yang baik bagi pertumbuhan sel mikroalga. Kepadatan sel mikroalga selama masa kultivasi dapat dilihat pada Gambar 2.



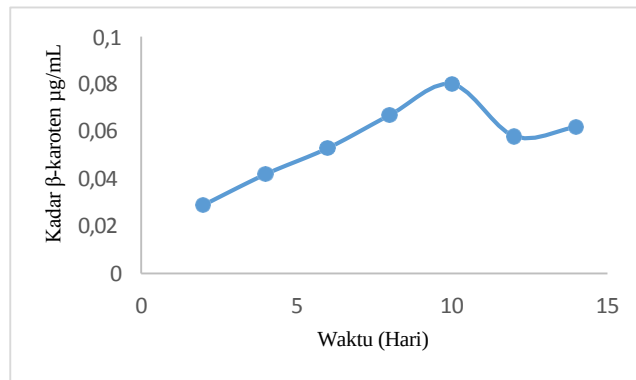
Gambar 2. Kepadatan kultivasi *Nannochloropsis oculata*

Kepadatan awal dari kultur mikroalga yaitu $10,25 \times 10^6$ sel/mL yang mengalami fase eksponensial dan mencapai puncak kepadatan pada hari ke 11 kultivasi sebanyak $66,49 \times 10^6$ sel/mL. Kabinawa (2001) menyatakan bahwa sel inokulum pada fase eksponensial memanfaatkan nutrisi dalam media tumbuh sehingga mampu mengalami pembelahan maksimal hingga dua kali lipat dari sebelumnya. Sari (2012) menyatakan bahwa keberhasilan kultur tercapai bila media kultur dipenuhi oleh populasi mikroalga. Pertumbuhan sel ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel dan banyaknya jumlah sel di dalam kultur.

3.2 Analisis β -Karoten *Nannochloropsis oculata*

Pengukuran pigmen β -karoten pada *N. oculata* dilakukan setiap 2 hari sekali selama 14 hari masa kultivasi *N. oculata*. Hasil perhitungan kadar β -karoten pada *N. oculata* dapat

dilihat pada Gambar 3. Kadar β -karoten *N. oculata* berdasarkan grafik diketahui meningkat hingga kultur 10 hari dengan kadar β -karoten tertinggi sebesar 0,08 $\mu\text{g/mL}$ kemudian menurun hingga waktu kultur 14 hari.



Gambar 3. Kadar β -karoten *Nannocloropsis oculata*

Produksi pigmen selama masa kultivasi dapat meningkat disebabkan oleh komposisi media yang digunakan. Penelitian Forjan *et al.*, (2007) mengenai pengaruh kekurangan nutrisi pada kultur *N. gadiatana* menunjukkan peningkatan kadar karotenoid total meningkat pada media kekurangan fosfat dan sulfur. Dimana kadar β -karoten *N. gadiatana* pada medium dengan kandungan sulfur rendah menghasilkan kadar β -karoten yang meningkat pada kultur 3 hari sebesar 16,9 $\text{ng}/10^6$ sel. Selain itu kondisi kekurangan nutrisi berupa nitrogen, sulfur, dan fosfat rendah mampu meningkatkan produksi pigmen klorofil pada *N. gadiatana*.

Penurunan kadar pigmen β -karoten pada penelitian *N. oculata* mampu disebabkan perubahan kondisi lingkungan selama masa kultur berupa kadar salinitas yang meningkat dari 30 ppt hingga 36 ppt pada kultur hari ke 14. Penelitian Gu *et al.*, (2012) juga menjelaskan bahwa kadar salinitas pada kultur ruangan *N. oculata* meningkat dari 35-55 g/L selama 5 hari masa kultur menunjukkan penurunan kadar karotenoid yang dihasilkan. Berdasarkan penelitian konsentrasi pigmen karotenoid pada mikroalga dapat menurun dengan meningkatkannya kadar salinitas pada kultur. Menurut Guedes *et al.*, (2011) pigmen karotenoid berperan pada proses fotosintesis seluler dalam penyerapan cahaya serta sebagai fotoprotektor dan dapat dihasilkan saat mikroalga mengalami stress akibat terpapar perubahan lingkungan

tertentu. Penelitian Lubian *et al.* (2000) menyatakan bahwa konsentrasi karotenoid pada mikroalga meningkat seiring dengan lamanya waktu kultivasi.

3.3 Uji Aktivitas Antibakteri *Nannochloropsis oculata*

Uji aktivitas antibakteri ditandai dengan zona hambat yang terbentuk menandakan adanya penghambatan pertumbuhan yang dihasilkan oleh sel mikroalga *N. oculata* terhadap bakteri patogen uji *E. coli* dan *S. aureus*. Nilai zona hambat kultur *N. oculata* yang dihasilkan terhadap bakteri patogen uji *E. coli* dan *S. aureus* yang diukur dalam satuan mm dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran zona hambat kultur *Nannochloropsis oculata* terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*

No	Sampel Uji	Rata-Rata Zona Hambat Bakteri Uji (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	10 µL (Kultur <i>N. oculata</i>)	6,13	6,15
2	15 µL (Kultur <i>N. oculata</i>)	6,5	6,46
3	20 µL (Kultur <i>N. oculata</i>)	6,81	6,69
4	Kontrol + (Kloramfenikol 100 µg/mL)	30,74	31,86
5	Kontrol – (Kertas cakram steril)	0,00	0,00

Mikroalga menghasilkan senyawa antibakteri yang mampu dihasilkan di luar sel, juga terdapat di dalam sel mikroalga. Greque *et al.*, (2015) menyatakan bahwa mikroalga mampu menghasilkan berbagai macam senyawa bioaktif berupa polisakarida, protein, lipid, vitamin, enzim dan sterol yang terdapat pada biomasa sel serta dikeluarkan ke media pertumbuhan. Salah satu komponen bioaktif berupa polisakarida ekstraseluler yaitu eksopolisakarida (EPS) mampu dihasilkan mikroalga yang memiliki aktivitas antimikroba. Penelitian Guzman *et al.*, (2001) menyatakan mikroalga *N. oculata* dikultur pada medium F2 menghasilkan komponen bioaktif ekstraseluler eksopolisakarida (EPS). Pengujian senyawa eksopolisakarida tersulfatasi dari *N. oculata* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Helicobacter pylori*.

3.4 Karakterisasi Daerah Penanda ITS *Nannochloropsis oculata*

Isolasi DNA dari mikroalga *N. oculata* didapatkan hasil kuantitas DNA untuk mengetahui konsentrasi DNA yang dihasilkan dari proses isolasi serta nilai kemurnian DNA. Hasil uji kuantitas DNA dapat dilihat pada Tabel 2.

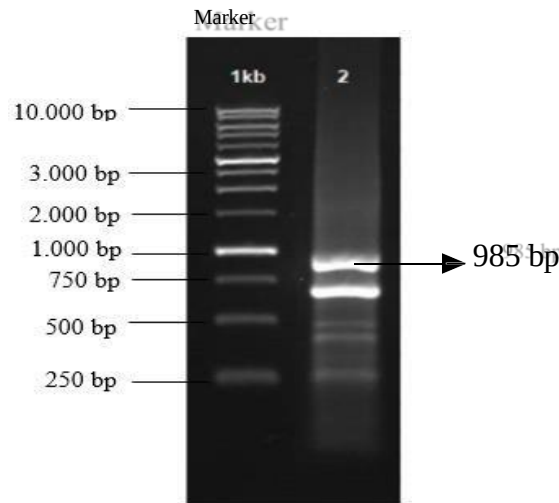
Tabel 2. Hasil uji kuantitas DNA *Nannochloropsis oculata*

Nama Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	λ 260	λ 280	Kemurnian (260/280)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	193,5	3,871	1,996	1,94

Nilai kemurnian DNA yang didapat berupa 1,94 merupakan nilai yang termasuk ke dalam rentang kemurnian yang baik dari hasil isolasi DNA. Sambrook *et al.*, (1989) menyatakan bahwa nilai kemurnian DNA berada pada rentang 1,8 – 2,0. Pendapat Devereux & Wilkinson (2004) menyatakan bahwa nilai kemurnian menunjukkan kurang dari 1,8 maka mengindikasikan adanya kontaminasi senyawa fenol atau protein pada DNA hasil isolasi. Menurut Khosravinia (2007) nilai kemurnian DNA yang lebih dari 2,0 mengindikasikan adanya kontaminasi RNA pada DNA hasil isolasi.

Karakterisasi *N. oculata* Gondol Bali dilakukan dengan mengamplifikasi fragmen DNA pada daerah penanda ITS. Hasil visualisasi produk amplifikasi PCR pada gel agarose dapat dilihat pada Gambar 4. Lintasan DNA sampel menunjukkan adanya pita ganda dengan ukuran pita paling atas berada pada posisi sekitar 900bp terlihat pada gel agarosa yang telah dielektroforesis. Hasil penelitian Liu *et al.* (2013) yang terkait amplifikasi DNA mikroalga menggunakan PCR pada daerah penanda

ITS menghasilkan ukuran pita bervariasi dari 600bp sampai 1000bp.

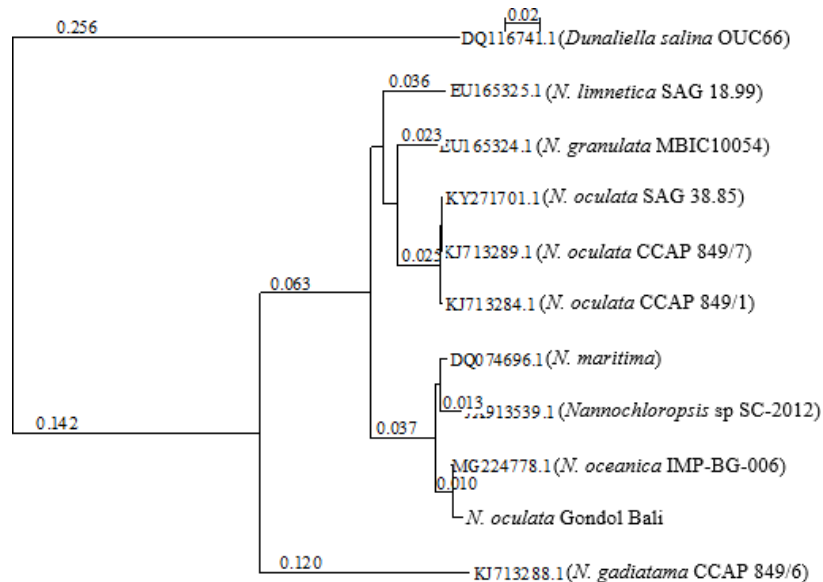


Gambar 4. Visualisasi DNA hasil PCR pada gel agarosa hasil elektroforesis

Daerah penanda ITS banyak digunakan sebagai penanda DNA untuk analisis filogenetik pada tingkat mikroalga. Hasil PCR yang terlihat terdapat dua pita (band) tebal yang terbentuk dan beberapa pita tipis. *Double band* diduga terjadi karena daerah ITS dapat mempunyai beberapa salinan yang berbeda. Fenomena Stern *et al.* (2012) yang meneliti Dinoflagellata menyatakan bahwa ITS juga merupakan penanda yang mempunyai beberapa salinan berbeda sehingga dapat menimbulkan kesulitan dalam analisis karena adanya kemungkinan variasi intra dan intergenomik yang tinggi dan adanya kehadiran insersi dan delesi yang dapat membuat penyelarasan urutan basa perlu dilakukan dengan cermat. Data ITS dapat digunakan untuk membedakan spesies yang diteliti dengan akurat. Munculnya beberapa pita hasil amplifikasi menurut Shenghe *et al.* (2016) dapat disebabkan oleh suhu *annealing* yang terlalu rendah sehingga menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik sehingga primer mampu menempel pada beberapa tempat.

Urutan basa nukleotida yang didapatkan selanjutnya dibandingkan urutan sekuennya dengan sekuen yang terdapat dalam *GenBank* menggunakan fasilitas *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs *website* NCBI. Perbandingan sekuen hasil penelitian dilakukan untuk mengetahui homologi dengan spesies lain yang memiliki kemiripan urutan sekuen yang tinggi. Hasil BLAST menunjukkan bahwa sekuen *N. oculata* memiliki kesamaan dengan sekuen *Nannochloropsis*

oceanica strain IMP-BG-006 dengan nilai presentase homologi 99,43%. Analisis filogenetik melalui kontruksi pohon filogenetik yang bertujuan untuk melihat kekerabatan antara spesies *N. oculata* sebagai sampel berdasarkan hubungan evolusionernya dengan sekuen spesies pembanding yang didapatkan dari situs *website* NCBI.



Gambar 5. Pohon filogenetik berdasarkan daerah penanda ITS

Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *neighbor joining tree*. Menurut Saitou & Nei (1987), metode *neighbor joining tree* akan memilih sekuen untuk digabungkan akan memberi estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen. Pohon filogenetik diuji menggunakan metode *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan. Menurut Hall (2001) bahwa nilai *bootstrap* sebanyak 100 sampai 1000 ulangan digunakan untuk memperkirakan tingkat kepercayaan sebuah pohon filogenetik.

Hasil analisis urutan basa pada daerah penanda ITS menunjukkan bahwa *N. oculata* Gondol Bali termasuk dalam anggota mikroalga kelas Eustigmatophyceae. Kontruksi pohon filogenetik yang ditunjukkan pada Gambar 5. dan analisis homologi pada Gambar 6. menunjukkan bahwa takson sampel, yaitu *N. oculata* Gondol Bali berada dalam satu kelompok monofiletik dengan spesies *N. oceanica* strain IMP-BG-006. Hidayat (2008) menyatakan bahwa suatu kelompok organisme yang anggotanya

memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang sehingga membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama.

Analisis keserupaan daerah penanda ITS pada mikroalga *N. oculata* dengan data sekuens dari *GeneBank* NCBI ditunjukkan pada Gambar 4.6 memperlihatkan tingkat keserupaan sekuens sebesar 99 % dengan gen pada daerah penanda ITS *N. oceanica strain* IMP-BG-006. Tingkat keserupaan sekuens menunjukkan bahwa spesies *N. oculata* Gondol Bali berkerabat dekat dengan spesies *N. oceanica strain* IMP-BG-006. Spesies *Nannochloropsis oceanica* termasuk dalam kelas Eustigmatophyceae, ordo Eustigmatales, famili Monodopsidaceae dan genus *Nannochloropsis*.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1587	0.0	868/873(99%)	0/873(0%)	Plus/Plus
bits(859)		)		
<i>N. oculata</i> 51	ATCATTACCAAAACACATCATGCCTCCTGGCGTATG	11		
	CTTCGAGGCATTACACTTCACAAC	0		
<i>N. oceanica</i> 1	ATCATTACCAAAACACATCATGCCTCCTGGCGTACG	60		
	CTTCGAGGCATTACACTTCACAAC			
<i>N. oculata</i> 111	CTGTGCATTGTTTACTCCTGTGAACGCTATACACGC	17		
	ACGTGCTCCCGGCCACGCCCTGCG	0		
<i>N. oceanica</i> 61	CTGTGCATTGTTTACTCCTGTGAACGCTATACAAGC	12		
	ACGTGCTCCCGGCCACGCCCTGCG	0		
<i>N. oculata</i> 171	ATGGTTGCTTTGGATGGTTCCTCGGAACACGTCGAA	23		
	GCCGTGGCCGAATGTGGGAGGGCG	0		
<i>N. oceanica</i> 121	ATGGTTGCTTTGGATGGTTCCTCGGAACACGTCGAA	18		
	GCCGTGGCCGAATGTGGGAGGGCG	0		
<i>N. oculata</i> 231	TCTCTAAATAACCTCAAACACCATTCGCAACATTTT	29		
	ATCAACCTTTCCAAACCGATTGTT	0		

<i>N. oceanica</i>	181	TCTCTAAATAACCTCAAACACCATTTCGCAACATTTT	24
		ATCAACCTTTCCAAACCGATTGTT	0
<i>N. oculata</i>	291	TATACCTCATTCAAGGCTTTTCTAGTCTTCGGACGG	35
		AAAAAGCCTGGTGCATGTTTCCAT	0
<i>N. oceanica</i>	241	TATACCTCATTCAAGGCTTTTCTAGTCTTCGGACGG	30
		AAAAAGCCTGGTGCATGTTTCCAT	0
<i>N. oculata</i>	351	GCGAAACGAGCGCCCGCAATGAAAATACAACCTTTC	41
		AGCAACGGATGTCTTGGCTCCCACA	0
<i>N. oceanica</i>	301	GCGAAACGAGCGCCCGCAATGAAAATACAACCTTTC	36
		AGCAACGGATGTCTTGGCTCCCACA	0
<i>N. oculata</i>	411	ACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG	47
		CGAATTGCAGAATTCCGCGAGTCAT	0
<i>N. oceanica</i>	361	ACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG	42
		CGAATTGCAGAATTCCGCGAGTCAT	0
<i>N. oculata</i>	471	CAAACCTTTGAACGCACCTTGCGCTTTCGGGATATG	53
		CCCGTTAGCATGTTTGTGAGTG	0
<i>N. oceanica</i>	421	CAAACCTTTGAACGCACCTTGCGCTTTCGGGATATG	48
		CCCGTTAGCATGTTTGTGAGTG	0
<i>N. oculata</i>	531	TCTGTTAACCCCAATCACCACCTTGTTGTGACTTCA	59
		GAGTCATGCCAAGCAGTCGGTGGA	0
<i>N. oceanica</i>	481	TCTGTTAACCCCAATCACCACCTTGTTGTGACTTCA	54
		GAGTCATGCCAAGCGGTCGGTGGA	0
<i>N. oculata</i>	591	CGTTACTTGCTCCCGATACTTCGCCCGCTGCGAATT	65
		CTGTTGTCACCTCCTCTGACGAGG	0
<i>N. oceanica</i>	541	CGTTACTTGCTCCCGATACTTCGCCCGCTGCGAATT	60
		CTGTTGTCACCTCCTCTGACGAGG	0
<i>N. oculata</i>	651	AACTGGCCAGAAGCTGGAGTGCGGGCGTGGAGTGA	71

	AGTAGGGCCGGCCACATACAGTCAC	0
<i>N. oceanica</i> 601	AACTGGCCAGAAGCTGGAGTGCGGGCGTGGAGTGA	66
	AGTAGGGCCGGCCACATACAGTCAC	0
<i>N. oculata</i> 711	TGGGACCACGCAACTCCTAGAGCTGCCCCCGTGAAC	77
	GTGACGAGTCTTCTAATCAAGGCA	0
<i>N. oceanica</i> 661	TGGGACCACGCAACTCCTAGAGCTGCCCCCGTGAAC	72
	GTGACGAGTCTTCTAATCAAGGCA	0
<i>N. oculata</i> 771	ATCCGTTTGCGGTCTAAAAGGTGCTCGTTTGACGGA	83
	AGCGCTAGTCTACACCAAACAGTT	0
<i>N. oceanica</i> 721	ATCCGTTTGCGGTCTAAAAGGTGCTCGTTTGACGGA	78
	AGCGCTAGTCTACACCAAACAGTT	0
<i>N. oculata</i> 831	TCGACTTGGCGGCATCTTCTCGGTGCCATAACAAAC	89
	ACTGAGAAAGCCTTTGGACTGATC	0
<i>N. oceanica</i> 781	TCGACTTGGCGGCATCTTCTCGGTGCCATAACAAAC	84
	ACYGAGAAAGCCTTTGGACTGATC	0
<i>N. oculata</i> 891	CTGGCACTCGTTGCCGTGTCATTCCATCTCCAA	923
<i>N. oceanica</i> 841	CTGGCACTCGTTGCCGTGTCATTCCATCTCCAA	873

Gambar 6. keserupaan urutan basa daerah penanda ITS *N. oculata* dengan *N. oceanica*

Hasil penelitian yang diperoleh dari sampel *N. oculata* Gondol Bali mengindikasikan bahwa mikroalga yang *N. oculata* yang terdapat pada Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan Gondol Singaraja Bali merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas Eustigmophyceae spesies *Nannochloropsis*. Mikroalga *Nannochloropsis* yang mampu menghasilkan pigmen karotenoid salah satunya β -karoten dapat dimanfaatkan bagi budidaya hewan laut untuk pertumbuhan serta ketahanan hidup hewan budidaya. Kemampuan mikroalga *N. oculata* sebagai penghasil senyawa antibakteri mampu dimanfaatkan sebagai agen antibakteri yang berguna untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh bakteri serta

mampu bermanfaat pula pada penambahan pakan bagi budidaya hewan laut agar terhindar dari penyakit yang disebabkan oleh bakteri.

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa sampel mikroalga *Nannochloropsis oculata* Gondol Bali menghasilkan pigmen karotenoid berupa β -karoten dengan kadar tertinggi diperoleh pada usia kultur 10 hari. Kultur *N. oculata* yang digunakan dalam uji antibakteri diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Daya hambat dari rata-rata diameter zona bening yang dihasilkan termasuk kategori sedang. Karakterisasi molekuler mikroalga *N. oculata* menunjukkan kekerabatan yang dekat dengan mikroalga *Nannochloropsis oceanica* strain IMP-BG-006.

Daftar Pustaka

- Abdurrachman, O., M. Mutiara, dan L. Buchori. 2013. Pengikatan Karbondioksida dengan Mikroalga (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp., *Spirulina* sp.) dalam Upaya untuk Meningkatkan Kemurnian Biogas. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2(4): 212-216.
- Amaro, H.M, A.C. Guedes, and F.X. Malcata. 2011. Chapter: Antimicrobial activities of microalgae: An invited review. In: Mendez-Vilas A., editor. Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Volume 2 Formatex Research Center. Badajoz, Spain: Formatex Microbiology Book Series.
- Baharuddin, M. 2011. Analisis Perbedaan Kandungan Lipida Mikroalga (*Tetraselmis chuii* dan *Nannochloropsis oculata*) pada Air Laut dan Air Payau. *Jurnal Teknosains*. 5(1): 26-32.
- Beeck, M., Lievens, B. Busschaert, P. Declerck, S. Vangronsveld, and Colpaert, J. V. 2014. Comparison and Validation of some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS ONE*. 9(6).
- Darsi, R., A. Supriadi, dan A.D. Sasanti. 2012. Karakteristik Kimiawi dan Potensi Pemanfaatan *Dunaliella salina* dan *Nannochloropsis* sp. *Fishtech*. 1(1): 14-25.
- Deutsch. 1995. Vitamins and Other Nutrients. AOAC Official Methods. Chemical Methods. Carotenes and Xanthophylls. 45: 5-6.
- Devereux, R. and S.S. Wilkinson 2004. *Amplification of Ribosomal RNA Sequences*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

- Fakhri, M., N.B. Arifin, A.M. Hariati, dan A. Yuniarti. 2017. Pertumbuhan, Biomassa, dan Konsentrasi Pigmen Klorofil-a dan Karotenoid *Nannochloropsis* sp. Strain BJ17 pada Intensitas Cahaya Berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 16(1): 15-21.
- Forjan, E, L. Garbayo, C. Casal, and C. Vilchez. 2007. Enhancement of Carotenoid Production in *Nannochloropsis* by Phosphate and Sulphur Limitation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 356-364.
- Greque de Morais, Michele, V. Bruna dan Silva, E. Greque de Morais, and J.A.V. Costa. 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *Biomed Research International*. 1- 15.
- Gu, N., Lin, Q., Li, G., Qin, G., Lin, J., & Huang, L. 2012. Effect of Salinity Change on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43(1): 97–106.
- Guedes, A.C, H.M. Amaro, and F.X. Malceta. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Journal Marine Drugs*. 9: 625-644.
- Guzman-Murillo, M.A and F. Ascencio. 2001. Anti-adhesive Activity of Sulphated Exopolysaccharides of Microalgae on Attachment of Red Sore Disease-associated Bacteria and *Helicobacter pylori* to Tissue Culture Cells. *Journal of Microbiology*. 30(6).
- Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy A How to Manual for Molecular Biologist*. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Hasidah, M. D.,W., dan Rousdy. 2017. Kandungan Pigmen Klorofil, Karotenoid dan Antosianin Daun *Caladium*. *Jurnal Protobiont*. 6(2). 29-37.
- Hidayat, T, Adi P. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. 4(1): 35-40.
- Hossain, A.B.M., A. Salleh, A.N. Boyce, P. Chowdhury, and M. Naiquiuddin. 2008. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4(3): 250-254.
- Hu, H., and K. Gao. 2003. Optimization of Growth and Fatty Acid Composition of a Unicellular Marine Picoplankton, *Nannochloropsi* sp. with Enriched Carbon Sources. *Biotechnology Letters*. 25(5):421-425.
- Kabinawa. 2001. *Mikroalga sebagai Sumber Daya Hayati Perairan dalam Perspektif*

Bioteknologi. Bogor: Puslitbang Biotek LIPI.

- Kadek, D.W.D.B, A.A.M. Dewi Anggreni, dan N.S. Antara. 2017. Pengaruh Konsentrasi Natrium Nitrat dan Natrium Dehidrogen Fosfat pada Media Walne terhadap Konsentrasi Biomassa dan Protein *Nannochloropsis oculata*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 5(1): 40-49.
- Khosravinia, H. 2007. Optimazing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood. *African Journal of Biotechnology*. 6(4): 481-486.
- Liu, Jin, H. Gerken, and Y. Li. 2013. Single-tube Colony PCR for DNA Amplification and Transformant Screening of Oleaginous Microalgae. *J Appl Phycol*. 1-9.
- Lubian, L.M., O. Montero, I.M. Garrido, I.E. Huertas, C. Sobrino, M.G.D. Valle, and G. Pares. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmophyceae) as Source of Commercially Valuable Pigments. *Journal of Applied Phycology*. 12: 249-255.
- Rumengan, Inneke F.M., N.D. Rumampuk, J. Rimper dan F. Losung. 2014. Produksi dan Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Bioaktif yang Diekstrak dari Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Strain Lokal. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. 1(1): 56-70.
- Saitou N, and Nei M. 1987. The neighbor-joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Lab Press.
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., and Andersen, B. 2010. *Food and Indoor Fungi*. (P.Crous & R. . Samson, Eds.). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center.
- Sari, I. P., dan A. Manan. 2012. Pola Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada Kultur Skala Laboratorium, Intermediet, dan Massal. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 4(2): 123-127.
- Shenghe, C., S. Wei, Z. Zhaoxi, L. Jingyang, D. Minjie, and S. Haiyan. 2016. A Weird DNA Band in PCR and Its Cause. *Journal of Plant Science & Molecular Breeding*. 5(2): 1-6.
- Srivastava, Neha, M.R. Suseela, K. Toppo, and R. Lawrence. 2017. Antimicrobial Activity of some Potential Green Algal Strains Isolated from Bundelkhand Region Uttar Pradesh. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Science*. 7(4): 15-26.
- Stern R.F. Andersen R.A., Jameson I., Kupper F.C., Coffroth M.A., Vulot D., Le Gall F., Ve´ron B., Brand J.J., Skelton H., Kasai F., Lilly E.L., and Keeling P.J. 2012. Evaluating the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) as a Candidate Dinoflagellate Barcode Marker. *PLOS ONE*. 7(8): 1-12.

Yulianawati, T.A, dan J.T. Isworo. 2012. Perubahan Kandungan Beta Karoten, Total Asam, dan Sifat Sensorik Yoghurt Labu Kuning Berdasarkan Lama Simpan dan Pencahayaan. *Jurnal Pangan dan Gizi* Vol 3(6): 37-48.