

Deteksi Gen DXS dan Penentuan Jalur Biosintesis Karotenoid pada *Chlorella pyrenoidosa*

Ramadhebi Monalita, Hermin Kusumaningrum dan Anto Budiharjo

Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jl. Prof Soedharto, SH, Tembalang, Semarang 50275

E-mail : ramadhebimc@student.undip.ac.id

Abstract

Natural carotenoid synthesis has never exceeded synthetic products on a commercial scale. Lack of understanding of the microbiological and ecophysiological aspects of carotenoid-producing isolates leads to misidentification of species. One local isolate of green algae is used as a natural food source of carotenoids in the food industry, namely *Chlorella pyrenoidosa*. Carotenoid accumulation of the non-MVA pathway in green algae is determined by the enzyme D-1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, which is encoded by the D-1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS) gene. The main purpose of this study was to detect the DXS gene as a carotenoid biosynthetic key enzyme encoder in *C. pyrenoidosa* whether or not to follow the non-MVA pathway for carotenoid biosynthesis or not. Morphological and ecophysiological characterization methods are carried out based on periodic observations and DXS gene detection using the guide Kuzuyama (2000). The results of the analysis of the similarity of the *C. pyrenoidosa* DXS gene in sustainable areas show that it can detect partial DXS genes from *Chlamydomonas reinhardtii*. The absence of growth inhibition in *C. pyrenoidosa* with lovastatin shows a non-MVA pathway that is the pathway used in carotenoid biosynthesis.

Keywords: *carotenoid, non-MVA, DXS, Chlorella pyrenoidosa*

Abstrak

Sintesis karotenoid alami belum pernah melebihi produk sintetik pada skala komersial. Kurangnya pemahaman mengenai aspek mikrobiologis dan ekofisiologis isolat penghasil karotenoid menyebabkan terjadinya kesalahan penamaan spesies. Satu isolat lokal alga hijau yang digunakan sebagai pakan alami sumber karotenoid dalam industri makanan yaitu *Chlorella pyrenoidosa*. Akumulasi karotenoid jalur non-MVA pada alga hijau ditentukan oleh enzim D-1-deoksixilulosa 5-fosfat sintase, yang disandi oleh gen D-1-deoksixilulosa 5-fosfat sintase (DXS). Tujuan utama penelitian ini adalah untuk mendeteksi gen DXS sebagai penyandi enzim kunci biosintesis karotenoid pada *C. pyrenoidosa* apakah juga mengikuti jalur non-MVA untuk biosintesis karotenoidnya atau tidak. Metode karakterisasi morfologis dan ekofisiologis dilakukan berdasarkan pengamatan secara berkala dan deteksi gen DXS menggunakan panduan Kuzuyama (2000). Hasil analisis keserupaan gen DXS *C. pyrenoidosa* pada daerah lestari memperlihatkan dapat mendeteksi parsial gen DXS dari *Chlamydomonas reinhardtii*. Tidak adanya hambatan pertumbuhan pada *C. pyrenoidosa* dengan lovastatin menunjukkan jalur non-MVA adalah jalur yang digunakan dalam biosintesis karotenoidnya.

Kata kunci : *karotenoid, non-MVA, DXS, Chlorella pyrenoidosa*

PENDAHULUAN

Karotenoid merupakan pigmen yang paling umum terdapat di alam dan disintesis oleh semua organisme fotosintetik dan fungi (Vilchez, 2011). Karotenoid diproduksi oleh berbagai jenis organisme, mulai dari non fototropik prokariot sampai tumbuhan tingkat tinggi, dengan lebih dari 700 struktur berbeda yang teridentifikasi saat ini (Stafsnes et al., 2010).

Secara umum karotenoid dikelompokkan ke dalam karoten (karotenoid murni hidrokarbon, tidak memiliki atom oksigen) dan xantofil (karotenoid pembawa atom oksigen) (Kiokias et al., 2016). Karotenoid memiliki beberapa jenis di antaranya α -karoten, β -karoten, astaxantin, likopen, lutein, zeaxantin, β -kriptosantin, dan fukosantin (Amaya, 2016). β -karoten merupakan senyawa hidrokarbon dengan ikatan rantai jenuh yang menghasilkan warna orange dan memiliki dua isomer yaitu *trans* dan *cis*. Molekulmolekul ini berperan secara fisiologis sebagai provitamin A dan penangkal radikal bebas (Marchal et al., 2013).

Sebagai pigmen yang jumlahnya berlimpah di alam, karotenoid juga memiliki manfaat yang luar biasa bagi kehidupan manusia. Karotenoid memberikan kontribusi yang besar bagi berbagai sektor kehidupan terutama sebagai provitamin A yang bermanfaat bagi organ visual, pewarna makanan, bahan aditif pada makanan, penambah sel darah merah, antioksidan, antibakteria, meningkatkan imunitas, serta pengganti sel-sel yang rusak (Ndiha dan Limantara, 2009). Pemanfaatan karotenoid sebagai bahan fungsional dalam makanan dan minuman saat ini masih terbatas karena memiliki kelarutan yang rendah di dalam air, titik leleh yang tinggi, ketidakstabilan secara kimiawi, serta bioavailabilitas yang rendah (Qian et al., 2012). Karotenoid dipercaya dapat meningkatkan respon imunitas yang lebih baik, anti kanker, antioksidan dan juga sebagai *treatment* penyakit yang sensitif terhadap cahaya (Nugraheni, 2010).

Pada tumbuhan dan algae, karotenoid memegang peranan penting dalam proses fotosintesis bersama dengan klorofil. Mikroalga merupakan salah satu sumber alami yang mengandung berbagai senyawa penting, termasuk karotenoid (del Campo et al., 2007). *Chlorella* merupakan spesies mikroalga hijau yang dijumpai di semua habitat air dan telah diisolasi dari air tawar serta habitat air laut (Iwamoto, 2004). *Chlorella pyrenoidosa* diketahui sebagai penghasil beberapa jenis karotenoid, seperti β -karoten, α -karoten, lutein, zeaxantin, astaxantin, dan neoxantin. Mikroalga *C. pyrenoidosa* menghasilkan senyawa lutein kasar 100

$\mu\text{g/g}$ berat basah selnya. Dari hasil fraksinasi dan purifikasi diperoleh ekstrak lutein murni sebesar 0,878 $\mu\text{g/g}$ berat basah sel mikroalga (Kusmiati et al., 2010). Setiap gram massa sel kering terkandung karotenoid total 7 mg (3,5 mg lutein, 0,5 mg α -karoten, 0,6 mg β -karoten) dan 35 mg klorofil (Iwamoto, 2004).

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) mengkatalisis reaksi pembatas pertama dan laju dalam jalur mevalonat, kondensasi gliseraldehid 3fosfat (GAP) dan piruvat. Produk DXS juga digunakan untuk biosintesis tiamin (vitamin B1) dan piridoksol (vitamin B6). DXS mengkatalisis langkah pertama dan langkah pembatas laju jalur mevalonat dan merupakan target yang menarik untuk pengembangan antibiotik baru, antimalaria, dan herbisida (Xiang, 2007).

Alga fotosintetik membentuk IPP dengan menggunakan dua jalur. Jalur MVA digunakan untuk biosintesis sterol pada sitosol sedangkan jalur nonMVA digunakan untuk biosintesis karotenoid, fitol, dan isoprene pada plastida. Gen-gen dari jalur non-MVA disintesis di dalam inti sel. Meskipun terdapat dikotomi yang sama pada alga fotosintetik, dijumpai kekhususan pada anggota *Chlorophyta*. *Chlorella fusca*, *Scenedesmus obliquus* dan *Chlamydomonas reinhardtii* menggunakan jalur non-MVA tidak hanya untuk sintesis isoprenoid plastida, namun juga sterol sitosol (Lichtenthaler, 2000).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika (FSM) Universitas Diponegoro (UNDIP) dan Laboratorium Terpadu UNDIP. Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan November 2018 – Maret 2019.

a. Alat dan bahan

Alat-alat yang diperlukan antara lain spektrofotometer, kuvet, termometer ruangan, pH meter, *microsentrifuge*, *mikrotube*, vortex, mikropipet, tip, gunting, plastik, mortar, *pestle*, klip, *sprayer*, *Nanodrop* 2000, mesin PCR, sterofom, gelas beker, keranjang, oven, *freezer*, komputer, kertas label, kertas tissue, alat tulis, dan alat dokumentasi.

Bahan yang digunakan antara lain sampel mikroalga *C. pyrenoidosa* sebanyak 500 ml yang didapat dari BPPT Jepara, aseton murni, lovastatin, gel ice, alkohol 70%, PCR buffer, dNTPs, MgCl_2 , reagen Trizol, primer FDXS1 dan primer RDXS1, MyTaq oneStep Rt-PCR Kit, ddH₂O, dan DEPC-H₂O.

b. Pengamatan Morfologis dan Ekofisiologis *C. pyrenoidosa*

Pengamatan morfologis *C. pyrenoidosa* dilakukan menggunakan mikroskop optik dengan skala perbesaran 1000 kali. Sampel mikroalga ditetaskan pada kaca preparat dan kemudian diamati selnya.

Bagian yang diamati yaitu bentuk sel, flagel, dinding sel, dan inti sel. Mikroalga *C. pyrenoidosa* yang diamati diambil pada saat fase eksponensial yang ditentukan dari jumlah kerapatan sel karena sel sedang dalam masa berkembangbiakan.

Pengamatan ekofisiologis dilakukan menggunakan termometer ruangan dan pH meter. Termometer ruangan digantung pada ruangan kultivasi *C. pyrenoidosa*. pH meter diletakkan pada kultur *C. pyrenoidosa* selama beberapa menit sampai pH stabil. Angka yang muncul pada termometer ruangan dan pH meter kemudian dicatat. Tabung-tabung Erlenmeyer yang berisi *C. pyrenoidosa* diletakkan di bawah cahaya lampu. Cahaya yang digunakan pada penelitian ini adalah 500 lux dengan menggunakan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Perubahan warna yang terjadi pada *C. pyrenoidosa* juga diamati setiap hari.

Penghitungan kerapatan sel *C. pyrenoidosa* dilakukan selama delapan hari tanpa penambahan lovastatin dan *C. pyrenoidosa* dengan penambahan lovastatin kadar 5 µg/ml dan 10 µg/ml yang diletakkan masing-masing pada tabung Erlenmeyer berukuran 500 ml. Untuk memudahkan penghitungan yang diamati biasanya menggunakan alat bantu hand counter dan haemocytometer.

b. Analisis Produksi Karotenoid *C. pyrenoidosa*

Kandungan karotenoid diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Mikroalga *C. pyrenoidosa* ditimbang beratnya 0,1 g, kemudian digerus dengan mortar. Mikroalga *C. pyrenoidosa* yang sudah digerus kemudian diekstraksi dengan 10 mL aseton 80%. Ekstrak tersebut kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat kemudian dimasukkan dalam cuvet untuk selanjutnya diukur kandungan karotenoid dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm, 645 nm, dan 663 nm.

c. Isolasi RNA

Sampel mikroalga dikeluarkan dari freezer diletakkan dalam mortar pestel. Ekstraksi RNA dengan menggunakan nitrogen cair atau secara langsung menggunakan larutan ekstraksi. Pengerjaan dilakukan di atas gel es untuk mencegah degradasi RNA dan mengurangi aktivitas RNase. Sampel mikroalga yang digunakan dipindahkan ke dalam microtube dan dilakukan penambahan 1 mL reagen TRIzol sebanyak 5 µl ke dalam microtube. Lalu ditambahkan 0,5 mL isopropanol ke dalam microtube dan diinkubasi selama 10 menit. Kemudian sentrifus selama 10 menit dengan

kecepatan 12000 x g pada suhu 40°C. Buang supernatan menggunakan mikropipet dan dilakukan penambahan 1 mL ethanol 75% ke pellet. Vorteks sampel secara continuous dan sentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 7500 x g pada suhu 40°C. Supernatant dibuang kembali menggunakan mikropipet dan pellet RNA dikering anginkan selama 5-10 menit. Kemudian dilakukan penambahan 20-50 µL RNase-free water dengan cara pipetting dan inkubasi menggunakan waterbath selama 10-15 menit pada suhu 55-60°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Morfologi dan Ekofisiologi *C. pyrenoidosa*

Hasil penelitian karakterisasi morfologi dan ekofisiologi sel *C. pyrenoidosa* diperlihatkan pada gambar 4.1, dimana sel berbentuk sferis atau oval, mempunyai dinding sel dan inti. Mikroalga *C. pyrenoidosa* berkembang biak dengan membelah diri membentuk suatu sel anakan atau berpasangan. Gerakan sel sangat aktif dan mempunyai sepasang flagella pada bagian anterior. Model gerakan sel adalah berenang dengan flagella mendorong sel maju maupun berputar. Mikroalga *C. pyrenoidosa* berkembang biak dengan membelah diri membentuk suatu sel anakan.



Gambar 4.1 Sel *C. pyrenoidosa* perbesaran 1000 kali (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Suhu optimum pertumbuhan *C. pyrenoidosa* pada suhu 27°C di bawah perlakuan iluminasi dan aerasi, pH optimum pertumbuhan 7. Mikroalga *C. pyrenoidosa* bersifat halofilik. Mikroalga *C. pyrenoidosa* mempunyai siklus hidup delapan hari. Sel pada fase logaritmik berwarna hijau cerah dan pada fase stasioner berubah warna menjadi hijau kekuningan yang berkaitan dengan pembentukan karotenoid.

b. Pertumbuhan dan Analisis produksi Karotenoid pada *C. pyrenoidosa*

Pertumbuhan *C. pyrenoidosa* dalam medium Walne terlihat pada Gambar 4.3 dengan siklus hidup

delapan hari. Kerapatan sel tertinggi dicapai pada hari ke-4 dan mulai menurun pada hari ke-5. Penurunan kerapatan sel ini terjadi sekitar 18%. Pertumbuhan *C. pyrenoidosa* pada hari pertama sampai hari kedelapan dengan penambahan lovastatin tidak memperlihatkan perbedaan yang berarti dengan pertumbuhan *C. pyrenoidosa* tanpa penambahan lovastatin.



Gambar 4.8 Pengaruh lovastatin terhadap produksi karotenoid *C. pyrenoidosa* (Biru : 0, Merah : 5 µg/ml, Hijau : 10 µg/ml)

Kajian biokimia terhadap biosintesis karotenoid *C. pyrenoidosa* telah menunjukkan bahwa lovastatin tidak menunjukkan hambatan terhadap pertumbuhan dan produksi karotenoidnya. Hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan yang dikemukakan oleh Lichtenthaler (2000) bahwa senyawa lovastatin tidak menghambat pertumbuhan dan produksi pigmen Chlorophyta. Berdasarkan hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa Chlorophyta tidak menggunakan jalur MVA dalam biosintesis karotenoidnya. Mengingat produksi karotenoid *C. pyrenoidosa* tidak terhambat oleh lovastatin pada Gambar 4.8 maka alga tersebut juga memiliki kecenderungan tidak menggunakan jalur MVA dalam biosintesis karotenoidnya.

Mikroalga *C. pyrenoidosa* yang ditumbuhkan pada suhu 27° tetap hidup dan dapat memperbanyak diri. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil yang dikemukakan oleh Prabowo (2009) bahwa kisaran suhu 25 o -30 o merupakan suhu yang optimal bagi Chlorella untuk pertumbuhan dan dapat meningkatkan aktivitas biologisnya dari organisme sebesar 2-3 kali lipatnya.

Media kultur *C. pyrenoidosa* memiliki derajat keasaman (pH) yang berbeda-beda setiap harinya. Pada awal kultivasi media *C. pyrenoidosa* memiliki pH 5 (asam). Pada hari ke-2 sampai hari ke-4 meningkat menjadi 6 (asam). Pada hari ke-5 sampai hari ke-7 yang menunjukkan fase eksponensial dan nilai pH mengalami peningkatan menjadi netral yaitu 7. Pada hari ke-8 pH berubah menjadi 8 (basa). Menurut Prabowo (2009) menyatakan peningkatan pH terjadi karena adanya aktifitas fotosintesis. Dalam keadaan pH netral sangat mendukung kelimpahan sel, perubahan pH diduga karena adanya

aktifitas fotosintesis yang dapat merubah kelarutan CO₂ dan mineral di dalam media pertumbuhan, hal ini yang menyebabkan pH mengalami peningkatan yang signifikan.

Hasil pengamatan kualitatif menunjukkan cahaya memengaruhi pembentukan karotenoid pada *C. pyrenoidosa* dan mengubah warna sel dari hijau menjadi kuning kecoklatan. Cahaya yang digunakan pada penelitian ini adalah 500 lux dengan menggunakan fotoperiodisitas 14 jam terang 10 jam gelap karena intensitas cahaya memiliki peranan penting bagi mikroalga karena cahaya digunakan sebagai sumber fotosintesis bagi mikroalga. Penyinaran harus disesuaikan yaitu 14 jam terang dan 10 jam gelap. Wijihastuti (2011) menyatakan apabila pemberian cahaya secara terus menerus akan mengakibatkan efek merugikan bagi proses fotosintesis.

Venkataraman (1969) menyatakan bahwa kandungan klorofil berbanding secara seimbang terhadap cahaya matahari selama pertumbuhan. Cahaya yang cukup akan menghambat sintesis klorofil dan cahaya yang terbatas akan meningkatkan kandungan klorofil. Klorofil dan karotenoid akan disintesis dalam jumlah yang seimbang dalam kloroplas. Pada saat keseimbangan ini berubah akibat naiknya karotenoid, struktur plastid akan berubah dan akibatnya klorofil akan terdegradasi.

c. Analisis Sekuensing Gen *DXS C. pyrenoidosa*

Hasil sekuensing produk PCR bagian hulu menunjukkan panjang sekuen yang didapat sebesar 888 bp. Hal ini sesuai dengan hasil visualisasi produk amplifikasi PCR yaitu sekitar 900 bp. Analisis contig digunakan untuk membuang daerah yang bukan merupakan hasil konsensus dari kedua sekuen. Hasil sekuensing produk PCR ditunjukkan dari grafik kromatogram pada Lampiran 3.

Sekuen *C. pyrenoidosa* yang diperoleh dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui homologi gen *DXS C. pyrenoidosa* dengan *Chlamydomonas reinhardtii*. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kesamaan dan perbedaan sekuen *C. pyrenoidosa* dengan sekuen gen *DXS Chlamydomonas reinhardtii* yang terdapat di Genbank secara keseluruhan.

1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, partial [Chlamydomonas reinhardtii]
Sequence ID: XP_001702062.1 Length: 708 Number of Matches: 1

Range 1: 70 to 93			GenPept	Graphics	Next Match		Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame	
29.6 bits(65)	1.9	Composition-based stats.	12/24(50%)	17/24(70%)	0/24(0%)	+2	
Query	113	ESLPKLCDELRLRYLLDSVRSRSGH		184			
		E L +LC ELR ++ +VSR+ GH					
Subjct	70	EQLKQLCKELRSQIVHTVSRGGH		93			

Gambar 4.9 Alignment gen DXS *C. pyrenoidosa* dengan gen DXS *Chlamydomonas reinhardtii*

Berdasarkan hasil alignment pada Gambar 4.9 tersebut menunjukkan bahwa urutan asam amino ESLPKLCDELRRYLLDSVSRSSGH pada gen DXS *C. pyrenoidosa* memiliki urutan asam amino yang homolog dengan urutan asam amino EQLKQLCKELRSDIVHTVSRTGGH pada parsial gen DXS *Chlamydomonas reinhardtii*. Hasil pensejajaran antara gen DXS *C. pyrenoidosa* dengan gen DXS *Chlamydomonas reinhardtii* menunjukkan bahwa gen DXS *C. pyrenoidosa* mempunyai kesamaan basa 12 dari 24 fragmen gen DXS *Chlamydomonas reinhardtii* atau persentasenya sekitar 50%.

Hasil analisis menunjukkan bahwa penggunaan primer gen DXS *E. coli* menjadi kurang tepat apabila digunakan sebagai dasar perancangan primer untuk memperoleh gen DXS *C. pyrenoidosa* mengingat bahwa organisme prokariot tidak sekompleks eukariot yang mempunyai intron dalam gennya sehingga akan menambah kesulitan dalam menganalisis urutan basa hasil sekuensing yang diperoleh. Kusumaningrum (2003) menyatakan perancangan primer untuk mengamplifikasi gen DXS pada *C. pyrenoidosa* berdasarkan pada hasil analisis gen DXS dari berbagai organisme yang termuat dalam Genbank. Gen DXS alga prokariot tidak megelompok satu kluster dengan gen DXS eukariot. Meskipun demikian, gen DXS mempunyai urutan lestari yang muncul baik pada organisme eukariot maupun prokariot. Mikroorganisme *E. coli* berada pada posisi di tengah antara organisme eukariot dan prokariot sehingga merupakan organisme yang sesuai digunakan bagi perancangan primer keduanya.

Urutan basa yang homolog antara gen DXS *C. pyrenoidosa* dengan gen DXS *Chlamydomonas reinhardtii* yang menunjukkan asam aminonya ditunjukkan pada Gambar 4.10. Urutan basa yang menunjukkan gen DXS *C. pyrenoidosa* terletak pada urutan ke-113 hingga urutan ke-184. Urutan basa yang menunjukkan gen DXS *Chlamydomonas reinhardtii* terletak pada urutan ke-70 hingga urutan ke-93. Warna hitam menunjukkan basa yang memiliki kemiripan antara kedua spesies dan tergolong ke dalam kelompok asam amino yang sama. Warna merah menunjukkan basa yang tidak memiliki kemiripan antara kedua spesies. Warna hijau menunjukkan basa yang memiliki kemiripan 2 basa antara kedua spesies namun tidak tergolong dalam kelompok asam amino yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaya, D. B. R. 2016. Natural Food Pigments And Colorants. *Current Opinion in Food Science* 5(7): 20 – 26.
- Bacon, K. 2001. Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics. Kluwer Academics Publisher, Netherland.
- Bai, C., T. Capell, J. Berman, V. Medina, G. Sandmann, P. Christou and Zhu. 2015. Bottlenecks In Carotenoid Biosynthesis And Accumulation In Rice Endosperm Are Influenced By The Precursor–Product Balance. *Plant Biotechnology Journal* 14(1): 195–205.
- Beltrán, J., B. Kloss, J.P. Hosler, J. Geng, A. Liu, A. Modi, J.H. Dawson, M. Sono, M. Shumskaya and C. Ampomah-Dwamena. 2015. Control Of Carotenoid Biosynthesis Through A Heme-Based Cis-Trans Isomerase. *Nature Chemical Biology* 11(8): 598–605.
- Bishop, W.M. and H.M. Zubeck. 2012. Evaluation Of Microalgae For Use As Nutraceuticals And Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition and Food Science* 2(5): doi:10.4172/2155-9600.1000147
- Brown, M. S and J.G. Hay. 2009. Essentials of Medical Genomics. New Jersey, USA.
- Carretero-Paulet, L., A. Cairó, D. Talavera, A. Saura, S. Imperial, M. Rodríguez-Concepción, N. Campos and A. Boronat. 2013. Functional And Evolutionary Analysis Of DXL1, A NonEssential Gene Encoding A 1- Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase Like Protein In *Arabidopsis Thaliana*. *Gene* 524(1): 40–53.
- Cazzonelli, C.I. and B.J. Pogson. 2010. Source to Sink: Regulation Of Carotenoid Biosynthesis In Plants. *Trends in Plant Science* 15(5): 266–274.
- Chacon-Lee T.L. and G.E. Gonzalez-Marino. 2010. Microalgae For “Healthy” Foods Possibilities And Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(6): 655–675.
- Cunningham, F.X., H. Lee and E. Gantt. 2007. Carotenoid Biosynthesis In The Primitive Red Alga Cyanidioschyzon Merolae. *Eukaryotic Cell* 6(3): 533–545.
- del Campo, A.J., M. Garcia-González, and M.G. Guerrero. 2007. Outdoor Cultivation Of Microalgae For Carotenoid Production: Current State And Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(6): 1163–1174.
- Eisenreich, W., A. Bacher, D. Arigoni and F. Rohdich. 2004. Biosynthesis Of Isoprenoids Via The NonMevalonate Pathway. *Cellular and Molecular Life Science* 61(12): 1401–1426.
- Estevez, J. M., A. Cantero, A. Reindl, S. Reichler and P. Leon. 2001. 1-Deoxy-D-Xylulose-5-

- Phosphate Synthase, A Limiting Enzyme For Plastidic Isoprenoid Biosynthesis In Plants. *The Journal of Biology Chemistry* 276(25): 22901–22909.
- Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P.B Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett and K.E. Nelson. 2006. Metagenomic Analysis Of The Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312(5778): 1355–1359.
- Gonzalez-Jorge, S., S.H. Ha, M. Magallanes-Lundback, L.U. Gilliland, A. Zhou, A.E. Lipka, Y.N. Nguyen, R. Angelovici, H. Lin and J. Cepela. 2013. Carotenoid Cleavage Dioxygenase4 is A Negative Regulator Of B-Carotene Content In Arabidopsis Seeds. *The Plant Cell* 25(12):4812–4826.
- Hendry, G.A.F. and Grime, J.P. 1993. Methods on Comparative Plant Ecology, A Laboratory Manual. London: Chapman and Hill.
- Iwamoto, H. 2004. Industrial Production Of Microalgal Cell-mass and Secondary Products-Major Industrial Species: *Chlorella*. In : A. Richmond (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing.
- Jahns, P. and A.R. Holzwarth. 2012. The Role Of The Xanthophyll Cycle And Of Lutein In Photoprotection Of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1817(1): 182–193.
- Jones, OG. 2016. Recent Advances In The Functionality Of Non-Animal-Sourced Proteins Contributing To Their Use In Meat Analogs. *Current Opinion in Food Science* 9(7): 7–13.
- Kiokias, S., C. Proestos and Varzakas. 2016. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science* 2(4): 25-37.
- Kong, W., S. Hua, H. Cao, Y. Mu, H. Yang, H. Song and C. Xia. 2012. Optimization Of Mixotrophic Medium Components For Biomass Production And Biochemical Composition Biosynthesis By *Chlorella Vulgaris* Using Response Surface Methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 43(3):360-367.
- Krinsky N.I. and E.J. Johnson. 2005. Carotenoid Actions And Their Relation To Health And Disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 26(6):459–516.
- Kusumaningrum, H.P., 2003. Karakterisasi Alga Hijau *Dunaliella* sp. dan Isolat Sianobakteria serta Deteksi Gen *DXS* Penyandi Enzim Kunci Biosintesis Karotenoid. *Disertasi*. Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada.
- Kusumaningrum, H.P. and M. Zainuri. 2013. Aplikasi Pakan Alami Kaya Karotenoid Untuk Post Larvae *Penaeus Monodon* Fab. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*. 3(18): 143 – 149.
- Kusmiati, Agustini, S.R. Tamat and M. Irawati. 2010. Ekstraksi Danpurifikasi Senyawa Lutein Dari Mikroalga *Chlorella Pyrenoidosa* Galur Lokal Ink. *Jurnal Kimia Indonesia* 1(5): 30-34.
- Li, L. and H. Yuan. 2013. Chromoplast Biogenesis And Carotenoid Accumulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539(2): 102–109.
- Lichtenthaler, H.K. 2000. Non-mevalonate Isoprenoid Biosynthesis: Enzymes, Genes and Inhibitors. *Biochemical Society Transactions* 28(6):785-9.
- Liu, G., H. Gerken, J. Huang and F. Chen. 2013. Engineering Of An Endogenous Phytoene Desaturase Gene As A Dominant Selectable Marker For *Chlamydomonas reinhardtii* Transformation And Enhanced Biosynthesis Of Carotenoids. *Process Biochemistry* 48(5-6): 788795.
- Liu, J., Y. Xu, L. Liang and J. Wei. 2015. Molecular Cloning, Characterization And Expression Analysis Of The Gene Encoding 1-Deoxy-DXylulose 5-Phosphate Reductoisomerase From *Aquilaria Sinensis* (Lour.). *Gilg. Journal Of Genetics* 94(2): 239–249.
- Lohr, M., C. Im and A.R. Grossman. 2005. Genomebased Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 138(1):490-515
- Marchal, L., M. Mojaat-Guemir, A. Foucalt And J. Pruvast. 2013. Centrifugal Partition Extraction Of B-Carotene From *Dunaliella Salina* For Efficient And Biocompatible Recovery Of Metabolites. *Bioresource Technology* 1(134): 396-400.
- Mikami, K and M. Hosokawa. 2013. Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. *Internationa Journal of Molecular Science* 14(7): 13763-13781.
- Merchant, R. and C.A. Andre. 2000. A Review Of Recent Clinical Trials Of The Nutritional Supplement *Chlorella Pyrenoidosa* In The Treatment Of Fibromyalgia, Hypertension, And

- Ulcerative Colitis. *Alternative therapies in health and medicine* 7(3): 79-91.
- Ndiha, B. and L. Limantara. 2009. Karotenoid pada Bahan Makanan. Prosiding Seminar Nasional Biologi, Lingkungan dan Pembelajarannya. *Juridik Biologi. FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta* P. 75-84.
- Neilson, J.A.D. and D.G. Durnford. 2010. Structural And Functional Diversification Of The LightHarvesting Complexes In Photosynthetic Eukaryotes. *Photosynthesis Research* 106(1-2): 57-71.
- Neuman, H., N. Galpaz, F.X. Cunningham, D. Zamir and J. Hirschberg. 2014. The Tomato Mutation Nxd1 Reveals A Gene Necessary For Neoxanthin Biosynthesis And Demonstrates That Violaxanthin Is A Sufficient Precursor For Absciscic Acid Biosynthesis. *The Plant Journal* 78(1): 80-93.
- Nisar N., L. Li, S. Lu, N.C. Khin and B.J. Pogson. 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* 8(1):68-82.
- Nugraheni, A. S., M. Majid, K. Lia, W. Yustin and O.K. Radjasa. 2010. Characterization of Carotenoid Pigmen from Bacterial Symbionts of Seagrass *Thalassia hemprichii*. *J. Coast. Dev* 14 (1): 51-60.
- Pankratov, I., R. McQuinn, J. Schwartz, E. Bar, Z. Fei, E. Lewinsohn, D. Zamir, J.J. Giovannoni and J. Hirschberg. 2016. Fruit Carotenoid-Deficient Mutants In Tomato Reveal A Function Of The Plastidial Isopentenyl Diphosphate Isomerase (IDI1) In Carotenoid Biosynthesis. *The Plant Journal* 88(1): 82-94.
- Pattanaik, B. and P. Lindberg. 2015. Terpenoids And Their Biosynthesis In Cyanobacteria. *Life* 5 (1): 269-293.
- Prabowo, D. A. 2009. Optimasi Penembangan Media Untuk Pertumbuhan *Chlorella* sp. Pada Skala Laboratorium. *Skripsi*. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Prayoga, W. dan A.K. Wardani. 2015. Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi *Salmonella* sp. Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(2):483-488.
- Qian, C., E.A. Decker, H. Xiao, D.J. McClements. 2012. Physical And Chemical Stability Of BCarotene-Enriched Nanoemulsions: Influence Of Ph, Ionic Strength, Temperature, And Emulsifier Type. *Journal of Food Chemistry* 132(3): 1221-1229.
- Rodrigo-Baños M., I. Garbayo, C. Vilchez, M.J. Bonete and R.M. Martínez-Espinosa. 2015. Carotenoids From Haloarchaea And Their Potential In Bioatechnology. *Marine Drugs* 13(9): 5508-5532.
- Rodriguez-Concepcion, M. and A. Boronat. 2002. Elucidation Of The Methylerythritol Phosphate Pathway For Isoprenoid Biosynthesis In Bacteria And Plastids. A Metabolic Milestone Achieved Through Genomic. *Plant Physiology* 130(3): 1079-1089.
- Ruiz-Sola, M.A., D. Coman, G. Beck, M.V. Barja, M. Colinas, A. Graf, R. Welsch, P. Rutimann, P. Buhlmann and L. Bigler. 2016. Arabidopsis Geranylgeranyl Diphosphate Synthase 11 Is A Hub Isozyme Required For The Production Of Most Photosynthesis-Related Isoprenoids. *New Phytologist* 209(1): 252-264.
- Safi, C, D.Z. Liu, B.H.J. Yap, G.J.O. Martin, C. VacaGarcia and P.Y. Pontalier. 2014. A Two-Stage Ultrafiltration Process For Separating Multiple Components Of *Tetraselmis Suecica* After Cell Disruption. *Journal of Applied Phycology* 26(6): 2379-2387.
- Sambrook, J dan Russel D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York.
- Sari, L. 2011. Rekayasa Proses Pembuatan Kurva Standart dari Larutan Betakaroten. Banjar baru, Teknologi Industri Pertanian.
- Schubert, N., E. García-Mendoza and I. Pacheco-Ruiz. 2006. Carotenoid Composition Of Marine Red Algae. *Journal of Phycology* 42(6): 1208-1216.
- Shumskaya, M. and E.T. Wurtzel. 2013. The Carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions. *Plant Science* 59(208): 58-63.
- Simamora, L.A., Sudarno and T. Istirokhatun. 2017. Kultivasi mikroalga sebagai metode pengolahan dalam menyisihkan kadar COD dan amonium pada limbah cair tahu. *Jurnal Teknik Lingkungan* 6(1): 1-14.
- Stafsnes, M. H., D.J. Kjell, K.A. Geir, V. Svein, E.E. Trond and B. Per. 2010. Isolation and Characterization of Marine Pigmented Bacteria from Norwegian Coastal Waters and Screening for Carotenoids with UVA-Blue Light Absorbing Properties. *Journal Microbiology* 48(1): 16-23.
- Takekoshi, H., G. Suzuki and H. Chubachi. 2005. Effect Of *Chlorella Pyrenoidosa* On Fecal Excretion And Liver Accumulation Of Polychlorinated Dibenzo-P-Dioxin In Mice. *Chemosphere* 59(2): 297-304.
- Tong, Y., P. Su, Y. Zhao, M. Zhang, X. Wang, Y. Liu, X. Zhang, W. Gao and L. Huang. 2015.

- Molecular Cloning And Characterization of DXS and DXR Genes In The Terpenoid Biosynthetic Pathway of *Tripterygium Wilfordii*. *International Journal of Molecular Science* 16(10):25516–25535.
- Venkataraman, G .S . 1969. The Cultivation of Algae. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi.
- Viegas C.V., I. Hachemi, P. Maki-Arvela, A. Smeds, A. Aho, D.Y. Murzin. 2015. Algal Products Beyond Lipids: Comprehensive Characterization Of Different Products In Direct Saponification Of Green Alga *Chlorella* sp. *Algal Research* 2(11): 156-164.
- Vilchez, C., E. Forjan, M. Cuaresma, F. Bedmar, I. Garbayo and J.M. Vega. 2011. Marine Carotenoids: Biological Function and Commercial Applications. *Marine Drugs* 9(3): 319-333.
- Waghmare, A. and K. Salve. 2016. Concentration And Characterization Of Microalgae Proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing* 3(1) : 2-9.
- Wijihastuti. 2011. Optimasi lingkungan Tumbuh Mikroalga dari Kawah Ratu Sukabumi yang Berpotensi sebagai Sumber biodiesel. Bogor, ITB.
- Xiang, S., G. Usunow, G. Lange, M. Busch and L. Tong. 2007. Crystal Structure of 1-Deoxy-Dxylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis. *Journal of Biology Chemistry* 282(4): 2670-2681.
- Yoon, S.H., A. Das, H.K. Ryu, H.J. Jang, J.Y. Kim, D.K. Oh, J.D. Keasling and S.W. Kim. 2009. Combinatorial Expression Of Bacterial Whole Mevalonate Pathway For The Production Of Beta-Carotene In *E. Coli* . *J. Biotechnol* 140(3-4): 218-222.