

Identifikasi *Chaetoceros* sp. Secara Molekular dan Uji Antioksidan Karotenoid

M A Susetyo¹, H P Kusumaninrum², S N Jannah³

¹Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Diponegoro University Semarang, Indonesia.

Abstract

Chaetoceros is one of the largest genus of microalgae that have more than 400 species and it is the primary producers in the marine ecosystem. *Chaetoceros* sp. have some of the pigment which are very important for their survival include chlorophyll and carotenoid pigments. The purposes of this study are to know the results of *Chaetoceros* sp. molecular identification using ITS fragments, to know its kinship and to test the ability of the antioxidant activity of pigments carotenoids. The results of ITS fragments identification of *Chaetoceros* sp. are used to develop the further research, namely to complete morphological information with molecular information intended in the kinship of *Chaetoceros* sp. Antioxidant test results are used to determine antioxidant activity in *Chaetoceros* sp. The methods in this research was microalgae isolation of *Chaetoceros* sp. that used the Doyle method and Doyle, amplification of ITS4 and ITS5 fragments, sequencing analysis and antioxidant activity test. The results of DNA isolation showed a concentration of 2842.1 ng / μ l and purity of 1.97. PCR products from amplification of the ITS fragment produced 882 bp. Phylogenetic analysis showed that *Chaetoceros* sp. has a kinship close to *C. muelleri* KF 998567.1 and antioxidant activity test showed IC₅₀ values of 72,386 ppm.

Keywords: *Chaetoceros* sp., ITS4 and ITS5 Fragments, Isolation, Sequencing, Phylogenetic, Activity Test of Antioxidants.

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang memiliki lautan luas dengan keanekaragaman hayati yang tersimpan didalamnya salah satunya mikroalga. Salah satu genus mikroalga yang terdapat di Indonesia adalah *Chaetoceros*. Kelimpahan *Chaetoceros* menjadikan genus tersebut sebagai produsen primer dalam ekosistem laut (Toyoda et al., 2010). Manfaat dari *C. gracilis* menurut Richmond (1990) yaitu memiliki senyawa antibakteri dan antifungi. Setyaningsih et al., (2008) menyebutkan bahwa *C. gracilis* mempunyai aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* dan *Staphylococcus aureus*. Selain itu, *Chaetoceros* sp. memiliki beberapa kandungan pigmen yang sangat penting bagi kelangsungan hidupnya diantaranya adalah pigmen klorofil dan karotenoid. Pigmen klorofil dan karotenoid didalam sel mikroalga dibutuhkan untuk proses fotosintesis (Hirschberg et al., 1997). Pada spesies *C. gracilis* memiliki pigmen yang penting yaitu terdiri dari klorofil a, klorofil c, β -karoten, fucoxanthin, diatoxanthin, dan diadinoxanthin (Biswas, 2013). β -karoten dan fucoxanthin merupakan pigmen yang paling dominan

yang terdapat pada mikroalga jenis *Chaetoceros* sp. (Akase, 1999). Pigmen tersebut memiliki fungsi utama sebagai antioksidan, anti sel kanker dan melindungi klorofil dari kerusakan fotooksidatif selama proses fotosintesis (Takaichi, 2013). Karotenoid yang dihasilkan memiliki kandungan aktivitas antioksidan tinggi sehingga dapat menghambat serta menangkal radikal bebas. Menurut Sayuti dan Yenrima (2015), pengujian antioksidan suatu senyawa dilakukan dengan uji *in vitro* menggunakan reaksi kimia (DPPH). Pengujian antioksidan karotenoid dari *C. calcitrans* telah dilakukan oleh Azizan (2018) secara *in vitro* yang menunjukkan hasil karotenoid dari *C. calcitrans* memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Foo et al., (2015) menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan karotenoid *C. calcitrans* lebih tinggi daripada curcumin dalam meredam radikal bebas (DPPH). Keunggulan *Chaetoceros* sp. yang mempunyai pigmen karotenoid merupakan target yang potensial bagi manusia terutama dalam bidang industri, bidang kosmetik, farmasi dan kesehatan. Pentingnya kandungan karotenoid yang terdapat dalam mikroalga *Chaetoceros* sp. harus dilakukan identifikasi spesies secara molekular untuk menentukan jenis mikroalga *Chaetoceros* yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Penggunaan teknik molekular untuk tujuan identifikasi suatu organisme memiliki keunggulan yaitu lebih akurat dan lebih cepat (Cole et al., 2013). Studi mengenai identifikasi molekular dan hubungan kekerabatan spesies *Chaetoceros* sp. tidak terlepas dari isolasi DNA dan amplifikasi gen ribosomal. DNA ribosomal (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom. Pada rDNA terdapat daerah konservatif yaitu gen penyandi rRNA 18S, 5.8S dan 28S yang di antaranya terdapat daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) yang merupakan daerah variatif. Mikroalga *Chaetoceros* sp. mempunyai dua daerah ITS yaitu ITS-1 terletak di antara 18S gen dan 5.8S gen, dan ITS-2 terletak di antara 5.8S dan 28S gen. Daerah ITS mengalami perubahan atau mutasi dan berbeda atau bervariasi diantara spesies sehingga sangat baik untuk studi identifikasi spesies *Chaetoceros* sp. Keunggulan lain dari daerah ITS yaitu memiliki tingkat variasi nukleotida tertinggi dibandingkan dengan gen yang lain yaitu sebesar 85,84% sehingga sangat cocok untuk studi filogenetik (Guo et al., 2015). Yip et al., (2007) menyatakan bahwa daerah ITS biasa digunakan untuk identifikasi pada tingkat spesies, namun juga dapat diaplikasikan pada tingkat yang lebih rendah, seperti strain. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi *Chaetoceros* sp. menggunakan fragmen ITS dan mengetahui aktivitas antioksidan pigmen karotenoid.

2. Metode

2.1. Persiapan Sampel *Chaetoceros* sp.

Sampel mikroalga *Chaetoceros* sp. dari Balai Besar Riset Budidaya Air Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol, Bali dikultivasi pada media Walne di ruang inokulasi dengan perlakuan iluminasi 500 lux selama 24 jam. Isolat mikroalga *Chaetoceros* sp. dikultivasi selama 11 hari dalam air laut pada salinitas 30 ppt dengan suhu 25°C dan penambahan pupuk Walne sebagai nutrisi. Sampel mikroalga *Chaetoceros* sp. yang cukup untuk isolasi DNA, perlu dilakukan pengendapan terlebih dahulu. Sampel tersebut dibiarkan selama dua hari dalam suatu wadah untuk proses pengendapannya. Setelah dua hari, pengambilan sampel dilakukan dengan cara sentrifugasi berulang dengan kecepatan 8500 rpm selama 10 menit. Proses ini terus dilakukan sampai mendapatkan jumlah sampel yang cukup yaitu sebesar 0,3 gram dalam 450 ml kultur *Chaetoceros* cair.

2.2. Isolasi DNA *Chaetoceros* sp.

Isolasi mikroalga dengan metode Doyle and Doyle (1987) berdasarkan Toyoda (2010). Ekstraksi sampel *Chaetoceros* sp. dengan penambahan 1 ml *buffer* ekstraksi CTAB, Khloroform: isoamil-alkohol (CIA 24:1) 500 µl dan penambahan isopopanol dingin 500 µl. Pelet DNA yang didapat dilarutkan pada *bufer* TE 50 µl dan DNA disimpan pada suhu -20°C.

2.3. Uji Kuantitatif dan Kualitatif

Uji kuantitatif berfungsi untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA. Tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA dapat diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer *Nanodrop 2000*. Uji kualitatif DNA dengan menggunakan mesin *elektroforesis*. *Elektroforesis* gel agarosa 2% untuk memisahkan dan menganalisis fragmen DNA dilakukan berdasarkan Protokol pGEM-T easy. Fragman DNA yang dimasukkan kedalam sumur dipisahkan dengan menghubungkan tangki *elektroforesis* ketegangan listrik tetap 100 V selama 20 menit. Hasil *elektroforesis* divisualisasikan dengan GelDoc BioRad XR+.

2.4. Identifikasi Molekular Menggunakan Internal Transcribed Spacer

Identifikasi molekular untuk gen ribosomal DNA isolat mikroalga *Chaetoceros* sp. menggunakan metode “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR). Amplifikasi *Chaetoceros* sp. menggunakan primer ITS 4 dan ITS 5 yang memiliki sekuense primer ITS 4 (5'-- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') dan primer ITS 5 (5'--GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G –3'). Reaksi PCR menurut White *et al.*, (2016), Kusumaningrum (2018) yaitu dilakukan dengan kondisi PCR yaitu *hot start* selama 4 menit pada suhu 94°C, diikuti 30 siklus: denaturasi 1 menit pada temperatur 94°C, *annealing* 3 menit pada temperatur 55°C, dan pemanjangan rantai selama 1 menit pada temperatur 72°C. Setelah 30 siklus, dilakukan reaksi pemanjangan rantai akhir selama 7 menit pada temperatur 72°C. Komposisi PCR adalah buffer PCR: 12,5 µl *MyTaq* Red Mix (MgCl₂ 2,0 mM; dNTPs 0,2 mM; Taq DNA Polymerase 1 Unit), 3 µl Genom DNA *Chaetoceros* sp. 50 ng/µl sebagai cetakan, 1,5 µl. Primer *forward* 10 pmol, 1,5 µl primer *reverse* 10 pmol, 6,5 µl ddH₂O sehingga totalnya 25 µl.

2.5. Sekuensing

Sekuensing gen dilakukan berdasarkan prosedur yang telah ditentukan oleh laboratorium 1st Base Malaysia.

2.6. Uji Aktivitas Antioksidan Karotenoid dengan DPPH (1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl)

Menurut Azizan (2018) dan Goh (2010) metode uji aktivitas antioksidan karotenoid dengan DPPH yaitu

2.6.1. Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan endapan *Chaetoceros* sp. 0,5 gr dilarutkan ke dalam 5 ml metanol absolut dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit serta diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Sentrifugasi dilakukan dengan 3000 rpm selama 5 menit sehingga terbentuk 2 lapisan. Supernatan diambil dan dimasukkan kedalam tabung baru sehingga mempunyai konsentrasi 100.000 mg/L. Pembuatan seri konsentrasi dilakukan pada konsentrasi 10.000 mg/L, 20.000 mg/L, 30.000 mg/L dengan pengenceran 0,1 ml, 0,2 ml, dan 0,3 ml larutan stok bahan uji kedalam 3 tabung. Masing-masing tabung ditambahkan metanol sampai mencapai volume 0,5 ml.

2.6.2. Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

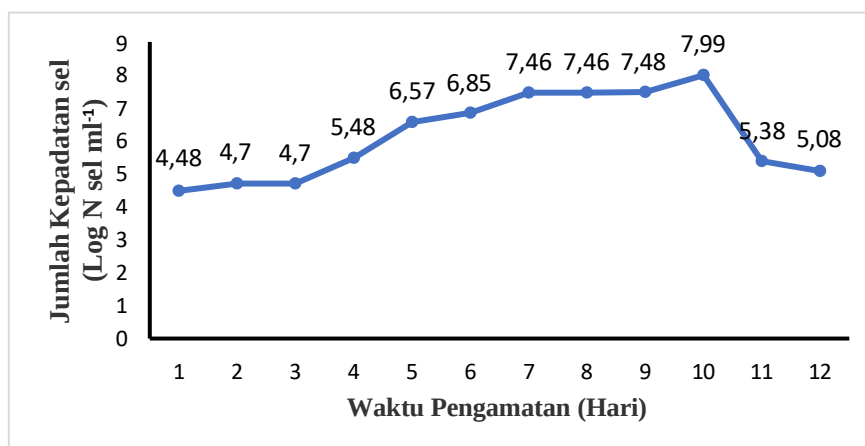
Sampel ekstrak masing-masing konsentrasi ditambahkan 1,5 ml DPPH 0,1 mM (0,002 gr DPPH, 50ml metanol) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang $\lambda = 517$ nm. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Arindah, 2010). Nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) dapat didefinisikan sebagai konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100- 150), dan lemah (151-200). Semakin kecil nilai IC₅₀ semakin tinggi aktivitas antioksidan. (Badarinath, 2010). Nilai IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi. Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol *p.a.*

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Pertumbuhan *Chaetoceros* sp.

Pertumbuhan *Chaetoceros* sp. dapat dilihat pada Gambar 1. Kultur mencapai puncak pada hari ke-10. Ditandai dengan meningkatnya laju pertumbuhan mencapai 99×10^6 sel/ml. Sureshkhumar *et al.*, (2014) melakukan kultur *C. calcitrans* dengan fase puncak mencapai 21×10^5 sel/ml yang terjadi pada hari ke-9. Peningkatan laju pertumbuhan didukung oleh ketersediaan nutrisi dan lingkungan yang baik sehingga pertumbuhannya optimal. Shevchenko *et al.*, (2008) mengatakan bahwa pada *C. socialis* dan didapatkan hasil bahwa fase puncak logaritmik terjadi pada hari ke-7. Setelah hari ke-7 mengalami penurunan yang sangat drastis. Sementara penelitian yang dilakukan oleh Bindhu (2013) pada *C. calcitrans* konsentrasi kepadatan terjadi peningkatan yang sangat signifikan pada hari ke-20. Suantika (2009), menjelaskan bahwa laju pertumbuhan spesifik menggambarkan banyaknya individu baru yang muncul per satuan waktu tertentu. Laju pertumbuhan spesifik kultur *Chaetoceros* sp. umumnya akan meningkat hingga mencapai laju pertumbuhan maksimum, kemudian menurun karena terjadi penurunan kualitas dan kuantitas nutrisi, serta berbagai faktor abiotik lainnya. Selain itu laju pertumbuhan spesifik kultur dipengaruhi oleh kepadatan awal inokulum.

Reproduksi pada *Chaetoceros* sp. terjadi secara aseksual dan seksual. Reproduksi aseksual sendiri terjadi pada fase logaritmik dimana jumlah sel dari *Chaetoceros* sp. yang mengalami kenaikan yang sangat signifikan. Reproduksi ini ditandai dengan pembelahan sitoplasma dalam frustula, sehingga epiteka induk akan menghasilkan hipoteka yang baru dan hipoteka yang lama akan menjadi epiteka yang menghasilkan hipoteka yang baru dan seterusnya sampai pada anaknya. Pembelahan sel ini akan terus berlanjut sampai ukuran sel semakin kecil yang kemudian dilanjutkan dengan pembelahan seksual. Reproduksi secara seksual terjadi pada fase kematian yaitu pada hari ke-11 sampai seterusnya. Reproduksi seksual ini ditandai dengan pembentukan auxospora yang diproduksi oleh sel vegetatif. Schevchenko (2008), menyatakan bahwa pada *C. socialis* terjadi reproduksi seksual dengan pembentukan auxospora pada fase kematian yang diproduksi oleh sel vegetatif. Sel anakan akan keluar dari cangkang dan akan tumbuh menjadi besar hingga ukurannya sama dengan indukannya dan melakukan reproduksi aseksual lagi.



Gambar 1. Grafik Pertumbuhan *Chaetoceros* sp.

3.2. Uji Kuantitatif DNA *Chaetoceros* sp.

Hasil uji kuantitatif dengan menggunakan nanodrop pada jumlah sel sebesar 287×10^4 sel/ml diperoleh kemurnian 1,97 dan konsentrasi 2842,1 ng/ μ l (Tabel 1) hal tersebut menunjukkan hasil isolasi DNA *Chaetoceros* sp. tidak terdapat kontaminan. Hasil tersebut sesuai dengan Simonelli (2009) yang

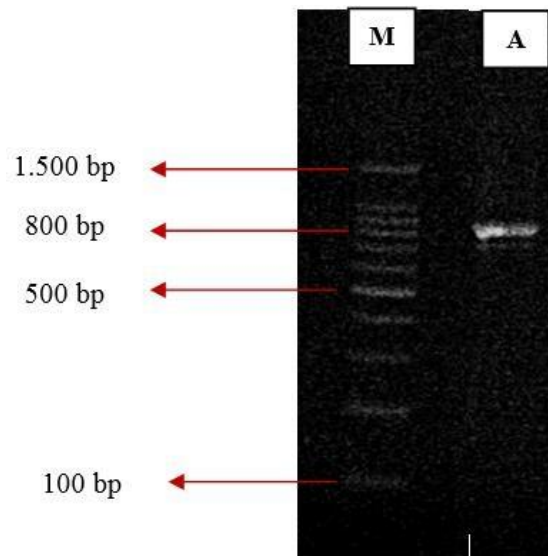
melakukan penelitian mengisolasi *C. debilis* memperoleh kemurnian sebesar 1.99 dan konsentrasi 1989 ng/ μ l. Menurut Sambrook *et al.*, (1989) nilai DNA dinyatakan murni apabila memiliki rasio A_{260}/A_{280} berkisar antara 1,8-2,0. Nilai kemurnian DNA yang kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminan fenol atau protein pada hasil ekstraksi DNA, sedangkan nilai kemurnian DNA yang lebih dari 2 menunjukkan bahwa DNA masih terkontaminasi oleh RNA.

Tabel 1. Kuantitas DNA Hasil Isolasi *Chaetoceros* sp.

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
<i>Chaetoceros</i> sp.	2842,1	56,841	28,851	1,97

3.3. Amplifikasi DNA *Chaetoceros* sp.

Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer ITS5 dan ITS4 pada Gambar 2. menunjukkan adanya pita yang berukuran 882 bp. Hal itu menunjukkan bahwa daerah ITS dapat teramplifikasi dengan baik. Hal tersebut sesuai dengan Michael *et al.*, (2011) bahwa penggunaan primer ITS dapat mengamplifikasi daerah ITS1 dan ITS2. Hasil yang didapatkan tidak jauh berbeda dengan hasil yang didapatkan oleh Toyoda *et al.*, (2010) yang mendapatkan pita DNA mikroalga spesies *C. tenuissimus* Meunier sebesar 641 bp. Perbedaan hasil yang didapatkan antara *Chaetoceros* sp. dan *C. tenuissimus* Meunier disebabkan karena setiap spesies memiliki daerah ITS yang berbeda-beda. Moniz *et al.*, (2010) mengatakan bahwa ITS merupakan marker atau penanda terbaik yang memiliki persentase tertinggi dalam membedakan spesies diatom. Selain itu, optimalnya suhu annealing memberikan hasil visualisasi yang baik dengan pita DNA yang jelas dan tidak adanya *smear*. Sunarno *et al.*, (2014) menyatakan bahwa keberhasilan amplifikasi gen dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya kualitas dan kuantitas sampel yang berupa materi genetik DNA.



Gambar 2. Hasil Visualisasi Produk PCR Gen ITS *Chaetoceros* sp.
(Keterangan: M. Marker 100 bp; A. *Chaetoceros* sp.)

3.4. Analisis Sekuens DNA *Chaetoceros* sp.

Hasil dari BLAST menunjukkan *Chaetoceros* sp. memiliki kesamaan basa dengan *C. muelleri* KF998567.1 sebanyak 873 dari 878 atau nilai prosentasenya sekitar 99%. Selain itu, hasil pensejajaran juga menunjukkan tidak adanya *gap*. Menurut Mount (2001) jika terdapat *gap* menunjukkan terjadinya

proses mutasi baik berupa delesi maupun insersi dalam satu atau lebih karakter sekuen selama evolusi. Kusumaningrum (2018) menjelaskan bahwa adanya delesi dan insersi berpotensi menunjukkan karakter sifat dari suatu spesies tersebut. Pensejajaran basa *Chaetoceros* sp. dengan *C. muelleri* KF998567.1 menunjukkan letak persamaan sekaligus perbedaan basa. Perbedaan antara *Chaetoceros* sp. dengan *C. muelleri* KF998567.1 ditunjukkan dengan substitusi basa yaitu pada *Chaetoceros* sp. guanin (G) menjadi adenin (A) pada *C. muelleri* KF998567.1. Substitusi ini adalah pergantian antara pasangan basa yang sama (purin). Selain itu juga, terdapat pergantian antara pasangan basa pirimidin yaitu timin (T) menjadi sitosin (C). Menurut Nei et al., (2000) perubahan basa tersebut pada akhirnya akan menyebabkan adanya evolusi pada organisme. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa *Chaetoceros* sp. memiliki kemiripan karakteristik dengan *C. muelleri* KF998567.1. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan analisis filogenetik untuk mengetahui seberapa dekat atau jauhnya hubungan kekerabatan antara *Chaetoceros* sp. dengan *C. muelleri* KF998567.1.

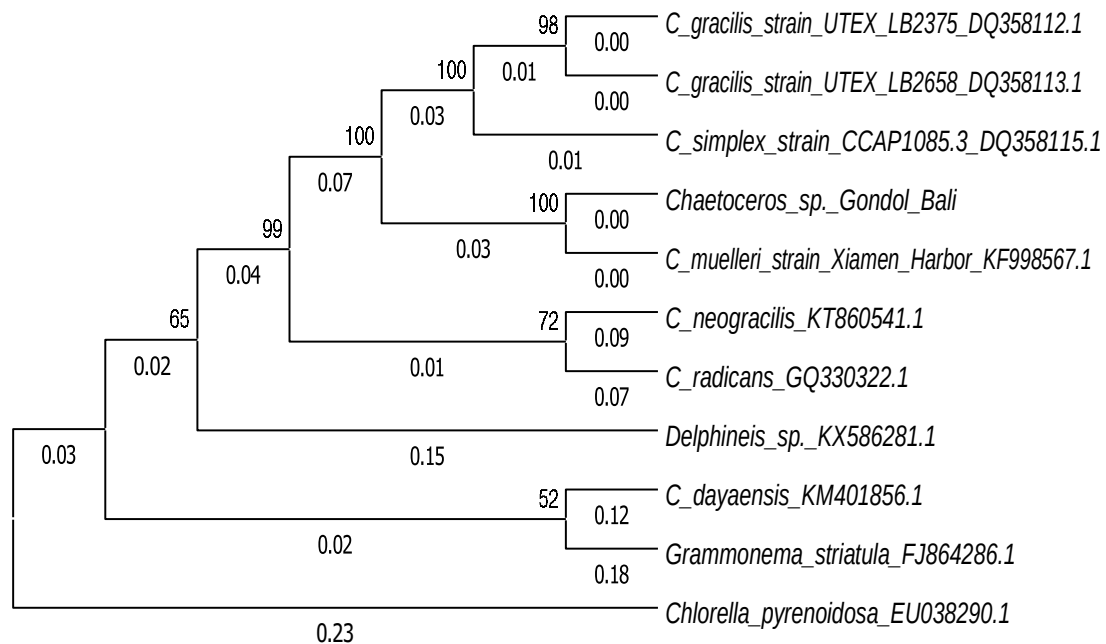
Score		Expect	Identities	Gaps	Strand
1565 bits (1735)		0.0	873/878 (99%)	0/878 (0%)	Plus/Plus
Chaetoceros sp.	1	TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACACACCGATCTAAGAT	60		
C. muelleri	2	TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACACACCGATCTAAGAT	61		
Chaetoceros sp.	61	CTCAACTCCCAGAGAAGGAGCAGTGCCTGCGTGTGTGACCTCTTGGCCAGTCCAGGAGGCA	120		
C. muelleri	62	CTCAACTCCCAGAGAAGGAGCAGTGCCTGCGTGTGTGACCTCTTGGCCAGTCCAGGAGGCA	121		
Chaetoceros sp.	121	CGGCAGCGAGTCAGCACTGCGACTATGYTTTACATAATAAACCTTGCAATGGAGACAAAC	180		
C. muelleri	122	CGGCAGCGAGTCAGCACTGCGACTATGTTTACATAATAAACCTTGCAATGGAGACAAAC	181		
Chaetoceros sp.	181	TGGTACTTTCCAGTGAGTCTCTCCTGCCAAAAACACAAAAGCGAAGAGGATGAGGCACAA	240		
C. muelleri	182	TGGTACTTTCCAGTGAGTCTCTCCTGCCAAAAACACAAAAGCGAAGAGGATGAGGCACAA	241		
Chaetoceros sp.	241	TGTGCCACCGTCCGCTTCCTTCCATACAAAATAACATACCTATAACCTGAAATGAAAGT	300		
C. muelleri	242	TGTGCCACCGTCCGCTTCCTTCCATACAAAATAACATACCTATAACCTGAAATGAAAGT	301		
Chaetoceros sp.	301	GGGGCATGACACGATCGTGCCCCATATCATACTATCAACAATGTAAATACAACCTTCAGC	360		
C. muelleri	302	GGGGCATGACACGATCGTGCCCCATATCATACTATCAACAATGTAAATACAACCTTCAGC	361		
Chaetoceros sp.	361	GATGGATGTCTAGGCTCCACACGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATACGTAATGCGA	420		
C. muelleri	362	GATGGATGTCTAGGCTCCACACGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATACGTAATGCGA	421		
Chaetoceros sp.	421	ATTGCAGGACTTCGTGAATCATCAAAATTTGAACGCACATTGCGCTTCCGGGAAATGCC	480		
C. muelleri	422	ATTGCAGGACTTCGTGAATCATCAAAATTTGAACGCACATTGCGCTTCCGGGAAATGCC	481		
Chaetoceros sp.	481	CGGTAGCATGCCTGGTTGAGTGTTCGTGGACCCCCCTTGGCCGCCATGCCACTTACGAGA	540		
C. muelleri	482	CGGTAGCATGCCTGGTTGAGTGTTCGTGGACCCCCCTTGGCCGCCATGCCACTTACGAGA	541		
Chaetoceros sp.	541	GTAAGTTAGCAGCGGGCAGCCAGAGTATGGACTGGTATGCGATGTAGATTGCATGCCTG	600		
C. muelleri	542	GTAAGTTAGCAGCGGGCAGCCAGAGTATGGACTGGTATGCGATGTAGATTGCATGCCTG	601		
Chaetoceros sp.	601	GCCAAAGTGAGCATTTGCGCGCAGTCTCTGGATGGCATTTTGGCAGTGGATCTGCAGAA	660		
C. muelleri	602	GCCAAAGTGAGCATTTGCGCGCAGTCTCTGGATGGCATTTTGGCAGTGGATCTGCAGAA	661		
Chaetoceros sp.	661	TGTCTTGTGCCTGAGGAGACAATGGTCTGTGCATCTGGTAACTCTGCGCCGAATGCGTGC	720		
C. muelleri	662	TGTCTTGTGCCTGAGGAGACAATGGTCTGTGCATCTGGTAACTCTGCGCCGAATGCGTGC	721		

<i>Chaetoceros</i> sp.	721	GTGTGTTAGTAGAGGTAGATGTCTGTCGTCCTGAGCAGGATGCTCGAGCAGTTTGTCCA	780
<i>C. muelleri</i>	722	GTGTGTTAGTAGAGGTAGATGTCTGTCGTCCTGAGCAGGATGCTCGAGCAGTTTGTCCA	781
<i>Chaetoceros</i> sp.	781	ATCACCGTGAAGAGGAGGGAGGCGAGTCCTCTCATCTTTGTCCATTCCAATTTGCAAT	840
<i>C. muelleri</i>	782		841
		ATCACCGTGAAGAGGAGGGAGGCGAGTCCTCTCATCTTTGTCCATTCCAATTTGCAAT	
<i>Chaetoceros</i> sp.	841	CTCAGCTTGGTAGGGATACCCGCTGAATTTAAGCATAT	878
<i>C. muelleri</i>	842	CTCAGCTTGGTAGGGATACCCGCTGAATTTAAGCATAT	879

Gambar 3. Analisis Homologi Pensejajaran Sekuens Nukleotida *Chaetoceros* sp. dengan *C. muelleri* KF998567.1 dari NCBI.

3.5. Analisis Filogenetik *Chaetoceros* sp.

Hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa *Chaetoceros* sp. berada dalam satu cabang dengan sekuens pembanding *C. Muelleri* KF998567.1 yang berasal dari China. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Chaetoceros* sp. berkerabat dekat dengan *C. muelleri* KF998567.1 yang telah terdaftar di NCBI atau berasal dari nenek moyang yang sama sehingga termasuk ke dalam kelompok monofiletik. Hubungan evolusi antar organisme yang anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang, semua turunan tersebut akan membentuk sebuah kelompok monofiletik. Anggota-anggota di dalam kelompok monofiletik diasumsikan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama (Topik, 2005). Hidayat (2005) menyatakan bahwa kelompok monofiletik merupakan kelompok yang anggotanya barasal dari satu nenek moyang. Pohon filogenetik dibuat menggunakan metode *Neighbour Joining Tree*. Hasil pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 4. Nilai *bootstrap* yang ditunjukkan dari hasil pohon filogenetik menunjukkan nilai 100. Nilai tersebut menunjukkan bahwa konstruksi pohon filogenetik mempunyai nilai 100% yaitu percabangan pohon filogenetik tidak akan berubah. Menurut Felsenstein (1985), *clade* dengan nilai 95% atau lebih dan minimal 90% dapat dikatakan bahwa *clade* tersebut dikatakan benar-benar stabil dan tidak akan mengalami perubahan dalam konstruksi pohon filogenetik. Nilai panjang cabang antara *Chaetoceros* sp. dengan *C. muelleri* KF998567.1 yaitu 0,03 yang mengindikasikan setiap 100 basa terjadi substitusi sebanyak 3 basa, hal ini menunjukkan adanya perbedaan urutan basa sekuens *Chaetoceros* sp. dengan *C. muelleri* KF998567.1 yang telah terdaftar di NCBI namun masih mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Konstruksi pohon filogenetik menempatkan *Chlorella pyrenoidosa* EU038290.1 sebagai *out group*. *Out group* merupakan bagian penting dari suatu konstruksi pohon filogenetik. Hal tersebut sesuai dengan Hidayat (2005) yang menyatakan bahwa *out group* berfungsi untuk mendapatkan informasi yang meyakinkan dari sekuesns yang berhubungan. Selain itu juga, dari hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa persebaran mikroalga *Chaetoceros* diduga berasal dari daerah Asia dan kebanyakan berasal dari negara China. Dibuktikan dengan *Chaetoceros* sp. juga memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *C. simplex* strain CCAP DQ358115.1, *C. gracilis* strain UTEX DQ358113.1 dan *C. gracilis* strain UTEX DQ358112.1 yang berasal dari China.



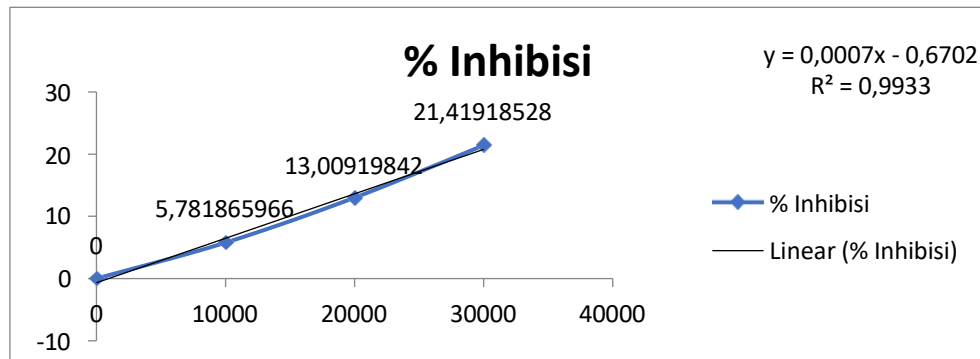
Gambar 4. Hasil Pohon Filogenetik berdasarkan gen ITS *Chaetoceros* sp.

3.6. Uji Aktivitas Antioksidan *Chaetoceros* sp.

Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan pelarut methanol dari ekstrak mikroalga *Chaetoceros* sp. berdasarkan Tabel 2. dapat diketahui bahwa pada konsentrasi 10.000 mg/L diperoleh hasil 5,78, konsentrasi 20.000 mg/L diperoleh hasil 13,01 dan pada konsentrasi 30.000 mg/L diperoleh hasil 21,42. Pelarut metanol yang digunakan merupakan salah satu pelarut yang sangat baik digunakan dalam mengekstrak mikroalga. Hal tersebut sesuai dengan Jaswir (2012), yang menyatakan bahwa metanol merupakan pelarut yang digunakan untuk mengekstrak senyawa bioaktif karotenoid pada mikroalga. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Foo et al., (2015) menyatakan bahwa pelarut methanol menghasilkan ekstrak karotenoid yang paling tinggi dibandingkan dengan pelarut aseton dan etanol. Azizan (2018) juga menyebutkan bahwa pelarut methanol menunjukkan hasil yang sangat kuat dalam menghambat radikal bebas pada IC₅₀. Hasil prosentase inhibisi, dibuat grafik yang memiliki nilai R²= 0,993 dan memiliki nilai y= 0,0007x - 0,6702 sehingga dapat diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 72,386 ppm. Berdasarkan hasil tersebut, dapat digolongkan bahwa *Chaetoceros* sp. memiliki aktivitas antioksidan yang kuat Goh (2010) menyebutkan bahwa hasil aktivitas antioksidan IC₅₀ pada *Chaetoceros* sp. sebesar 39,22 ppm menunjukkan aktivitas antioksidan pada sampel tersebut tergolong sangat tinggi. Menurut Badarinath (2010) suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ memiliki nilai kurang dari 50 ppm, antioksidan kuat memiliki nilai 50-100 ppm, antioksidan sedang memiliki nilai 100-150 ppm, dan antioksidan lemah memiliki nilai 151-200 ppm. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidan.

Tabel 2. Hasil Perhitungan Uji Aktivitas Antioksidan IC₅₀ *Chaetoceros* sp.

Konsentrasi (mg/L)	% Inhibisi	Nilai IC ₅₀
0	0	72,386 ppm
10.000	5,78	
20.000	13,01	
30.000	21,42	

Gambar 5. Grafik Persentase Inhibisi Aktivitas Antioksidan *Chaetoceros* sp.

4. Kesimpulan

Identifikasi *Chaetoceros* sp. dengan menggunakan primer ITS5 dan ITS4 menunjukkan bahwa secara molekular mikroalga *Chaetoceros* sp. yang berasal dari Gondol Bali memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *C. muelleri* KF998567.1 yang berasal dari China dengan memiliki kesamaan ciri-ciri sebesar 99%. Berdasarkan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH, *Chaetoceros* sp. memiliki nilai *Inhibitor Concentration* (IC₅₀) sebesar 72,386 ppm yang menunjukkan bahwa *Chaetoceros* sp. memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

Daftar Pustaka

- Akase, S., Yoshikawa, T., and Sakata, T. 1999. Pigment Analysis of Marine Microalgae by TLC and HPLC Methods.
- Azizan, A., Bustamam, MSA., Maulidiani, M., Shaari, K., Ismail, IS., Nagao, N., and Abas, F. 2018. Metabolite Profiling of the Microalgal Diatom *Chaetoceros Calcitrans* Correlation with Antioxidant and Nitric Oxide Inhibitory Activities via 1H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Marine Drugs*.
- Badarinath, A., Rao, K., Chetty, C.S., Ramkanth, S., Rajan, T., and Gnanaprakash, K. 2010. a Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 1276-1285.

- Bindhu, K.B. 2013. Optimum Nutritional Requirement for the growth of *Chaetoceros Calcitrans*. *Research Journal of Marine Sciences* 1(3).
- Biswas, H., Bandyopadhyaya, B. 2013. Effects of Iron Availability on Pigment Signature and Biogenic Silica Production in the Coastal Diatom *Chaetoceros Gracilis*. *Journal of Oceanogra. Limnol* 4 (1): 20-42.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras, A.A., Kuske, C.R., and Tiedje, J.M. 2013. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Journal of Nucleic Acids Research* 42: 633-642.
- Doyle, J.J., J.L. and Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue Phytochem. *Journal of Bull.* 19:11-15.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limitson Phylogenies: an approach using the bootstrap. *Journal of Evolution* 39: 783-791.
- Foo, S.C., Fatimah, M., Yusoff, Ismail, M., Basria, M., Yaua, S.K., Nicholas, Khonga, Chana, K.W., and Ebrahimi, M. 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influencedby their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology* 241: 175–183.
- Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Chan, K.W., Khong, N.M.H., and Yau, S.K. 2015. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Journal of Algae Research*. 12: 26–32.
- Goh, S.H. 2010. A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom, *Chaetoceros* sp. and a Green Microalga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science* 2(3).
- Guo. L, Sui, Z., Zhang, S., Ren Y., and Liu, Y. 2015. Comparison of potential diatom ‘barcode’ genes the 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology* 65: 1369–1380.
- Hidayat, T., Yukuwa, T., and Ito, M. 2005. Molecular Phylogenetic of Subtribe aeridinaezzz: Insights from Plastid matK and Nuclear Ribosomal ITS Sequence. *Journal of Plant*. 18:271-284.
- Hirschberg, J., M. Cohen, M. Harker, T. Lotan, V. Mann, and I. Pecker. 1997. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Journal of Pure and Applied Chemical* 10: 2151.
- Jaswir, D. Noviendri, H.M. Salleh, and K. Miyashita. 2012. Fucoxanthin extractions of brown seaweeds and analysis of their lipid fraction in methanol. *Journal of Food Science Technology Research* 18:251–257.
- Kusumaningrum, H.P., Budiharjo, A., Suprihadi, A., Eshananda, Y, Fadillah, A and Pangestuti, D.R. 2018. The characterization of *Citrus* sp. from Parang Island Karimunjawa based on morphological, DNA barcoding and nutritional analysis *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 10(3): 26-38.
- Michael, L., Macgillivray, and Kaczmariska, I. 2011. Survey of the Efficacy of a Short Fragment of the rbcL Gene as a Supplemental DNA Barcode for Diatoms. *Journal of Eukaryot Microbiology*: 1–8.
- Moniz, M. B. J., and Kaczmariska, I. 2010. Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Journal of Protist* 161:7–34.
- Mount, D.W. 2001. Phylogenetic prediction. In: Bioinformatic, Sequence and Genome

- Analysis. Cold Spring Harbor laboratory. New York Press 237 –280.
- Nei, M., and Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, United Kingdom.
- Richmond, A. 2004. Handbook of Microalgae Culture. *Journal of Biotechnology and Applied Phycology*. 545.
- Sambrook, J., Fritschi, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sayuti, K., R. and Yenrina. 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik. Andalas University Press, Padang.
- Shevchenko, T., Yu, Orlova., and Aizdaicher. 2008. Development of the Diatom *Chaetoceros socialis* f. *radians* (Schütt) Proschkina–Lavrenko 1963 in Laboratory Culture O. G. *Journal of Institute of Marine Biology* 4 (34): 224-229.
- Setyaningsih, I., Hardjito, L., Monintja, D.R., Sondita, M.F., Bintang, M., Lailati, N., Panggabean, L. 2008. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari Diatom *Chaetoceros gracilis* dengan Berbagai Metode. *Jurnal Biologi Indonesia* 5(1): 23-33.
- Suantika, G., Adityawati, P., Astuti, D. A., and Sofyan, Y. 2009. Pengaruh Kepadatan Awal Inokulum terhadap Kualitas Kultur *Chaetoceros gracilis* (Schütt) pada Sistem Batch.. *Jurnal Matematika dan Sains* 14 (1).
- Sunarno, M. F., Fitri, N., Malik, A., Karuniawati, A., and Soebandrio, A. 2014. Metode cepat ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk pemeriksaan PCR. *Jurnal Buletin Penelitian Kesehatan*. 42 (2): 85-92.
- Sureshkumar, S., Jasmin, B., Mujeeb, K.M.R., and Mohammed. A.A.H. 2014. Growth enhancement of microalgae *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* using selected bacterial strains. *International Journal of Current Microbiology Applied Science* 3(4): 352-359.
- Takaichi, A. 2013. Distributions, biosynthesis and functions of carotenoids in algae. *Journal of Agrotechnology Food Industry Hi Tech*. 24.
- Topik H. 2005. Systematic study of subtribe Aeridinae (Orchidaceae) (disertasi). University of Tokyo, Tokyo.
- Toyoda. K, Nagasaki, K., and Tomau, Y. 2010. Application of real-time PCR assay for detection and quantification of bloom-forming diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Journal of Plankton Benthos Res* 5 (2): 56–61.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*.
- Yip, P.Y., Chi F. C., Chun Y. M., and Hoi S. K. 2007. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Journal of Chinese Medicine* 2:9.