

Studi Awal Pertumbuhan dan Induksi Mikroalga *Haematococcus Pluvialis*

Judy Retti B. Witono, Y.I.P. Arry Miryanti, Herry Santoso, Angela Justina
Kumalaputri, Valine Novianty dan Alvin Gunadi
Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri,
Universitas Katolik Parahyangan Bandung
Email: judy@unpar.ac.id

ABSTRAK

Munculnya makanan cepat saji dan polusi udara mendatangkan kerusakan tubuh akibat radikal bebas. Untuk melawan radikal bebas, antioksidan menjadi semakin populer di berbagai kalangan dan salah satunya astaxanthin. *Haematococcus pluvialis* merupakan sumber astaxanthin alami tertinggi. Tujuan penelitian ini untuk mempelajari pertumbuhan *H. Pluvialis*. Sebagai variabel dalam penelitian ini adalah (1) konsentrasi inoculum awal yang berbeda (yaitu 10%-v/v dan 20%-v/v) terhadap kepadatan dan jumlah sel; (2) penambahan garam NaCl dan induksi cahaya terhadap rasio karotenoid dan klorofil. Mikroalga *H. pluvialis* secara fotoautotrof selama sembilan hari. Karotenogenesis diinduksi oleh penambahan NaCl 0,8%-b/v, diikuti oleh induksi di bawah intensitas cahaya tinggi. Kadar klorofil dan total karotenoid dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan *H. pluvialis* lebih baik dikulturkan dengan konsentrasi inoculum 10% dan diperoleh jumlah 70×10^5 sel/mL. Penambahan garam NaCl 0,8%-b/v disertai induksi intensitas cahaya tinggi dapat meningkatkan rasio kadar karotenoid terhadap klorofil sebesar 28,9%.

Kata kunci: *Haematococcus pluvialis*, induksi cahaya, karotenoid, klorofil, mikroalga.

ABSTRACT

Fast food and air pollution lead to the production of free radicals in our body. To fight those, it is needed anti-oxidant. That is the reason why antioxidant become a popular supplement for many people and one of them is astaxanthin. *Haematococcus pluvialis* is the highest source of natural astaxanthin. The goal of this study is to observe the cell growth of *H. pluvialis*. The variables used in this research are (1) a different initial inoculum concentrations (i.e. 10%-v/v and 20%-v/v) to the density and number of cells; (2) the addition of salt NaCl and light induction to the ratio of carotenoids to chlorophyll. Microalgae *H. pluvialis* was cultured in batch mode and photoautotrophic cultivation for nine days. The carotenogenesis was induced by addition of NaCl 0.8%-b/v, followed by induction under high-light intensity. Chlorophyll levels and total carotenoids were analyzed using a spectrophotometer. It was observed that growth of *H. pluvialis* was preferable cultured with 10% inoculum concentration and obtained 70×10^5 cells/mL. The addition of NaCl 0.8%-b/v salt followed by high light intensity induction could increase the ratio of carotenoids to chlorophyll levels by 28.9%.

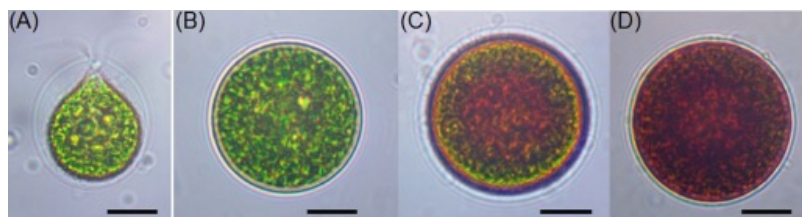
Keywords: carotenoid, chlorophyll, *Haematococcus pluvialis*, light induction, microalgae.

1. PENDAHULUAN

Mikroalga hijau terdiri lebih dari 7000 spesies yang tumbuh di berbagai habitat. *Haematococcus pluvialis* merupakan alga hijau uniseluler yang tergolong dalam kelas Chlorophyceae, ordo Volvocales, famili Haematococcaceae (Lorenz, 1999). *H. pluvialis* dapat mengakumulasi astaxantin hingga sebesar 4% dari berat kering, paling tinggi di antara semua organisme yang dapat memproduksi astaxantin (Zhang et al., 2016; Butler et al., 2017). Dengan demikian *H. pluvialis* dikenal sebagai organisme penghasil utama astaxantin yang merupakan produk komersial.

Astaxantin (3,3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione) adalah karotenoid sekunder berwarna merah terang dari keluarga yang sama dengan likopen, lutein, dan β -karoten. Astaxantin disintesis secara *de novo* oleh beberapa mikroalga, tanaman, ragi, bakteri. Astaxantin juga terkandung dalam banyak makanan laut seperti salmon, ikan trout, ikan *breem* laut merah, udang, lobster, dan telur ikan (Shah et al., 2016). Astaxantin alami memiliki bioaktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan astaxantin yang disintesis (Zhang et al., 2016). Saat ini, lebih dari 95% astaxantin yang tersedia di pasar diproduksi secara sintetik sementara astaxantin alami yang berasal dari *H. pluvialis* jumlahnya kurang dari 1%. Dalam hal aktivitas antioksidan, astaxantin 65 kali lebih kuat dari vitamin C, 54 kali lebih kuat dari β -karoten, 10 kali lebih ampuh dari β -karoten, *canthaxanthin*, *zeaxanthin*, dan lutein; dan 100 kali lebih efektif daripada α -tokoferol (Shah et al., 2016). Di bidang kesehatan peran aktif karotenoid terutama astaxantin dan lutein telah terbukti dapat mencegah penyakit degeneratif, anti inflamasi (reumatik arthritis, kejang otot, inflamasi kulit oleh radiasi UV), kanker, liver, *Alzheimer's*, dan *stroke* (Muzaki et al., 2008). Selain itu, astaxantin memiliki potensi besar di pasar global karena berdaya nilai jual tinggi (\$2500–7000/kg) (Shah et al., 2016).

Sel *H. pluvialis* berwarna hijau dan vegetatif di bawah kondisi lingkungan yang sesuai (intensitas cahaya rendah dan nutrisi yang cukup). Namun, *H. pluvialis* menunjukkan penurunan dramatis dalam tingkat proliferasi sel dan peningkatan sel *cyst* di bawah tekanan intensitas cahaya tinggi. Akumulasi karotenoid sekunder terjadi pada sel-sel *cyst* di bawah kondisi lingkungan yang tidak sesuai seperti intensitas cahaya tinggi, kekurangan nutrisi, penambahan garam dan stres oksidatif. Morfologi sel *H. pluvialis* dalam siklus hidupnya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Sel mikroskopis *H. pluvialis* dalam siklus hidupnya. (A) Sel motil vegetatif hijau; (B) Sel *palmella* vegetatif hijau; (C) Sel *palmella* mulai mengakumulasi astaxantin dalam transisi ke *aplanospore*; (D) Sel *aplanospore* mengakumulasi astaxantin (Shah et al., 2016).

Parameter budidaya seperti konsentrasi inokulum akan menentukan produktivitas biomassa. Selain itu, dalam tahap *haematocyst* kandungan karotenoid total meningkat dan pola karakteristik karotenoid utama tahap vegetatif digantikan oleh karotenoid sekunder. Rasio karotenoid terhadap klorofil adalah sekitar 0,2 pada tahap hijau dan meningkat pada tahap merah mencapai sekitar 2–9 (Shah et al., 2016). Oleh karena itu, untuk menguji hipotesis tersebut, pada penelitian ini diuji rasio kadar karotenoid terhadap klorofil yang juga dapat menunjukkan keberadaan astaxantin.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Budidaya Mikroalga *H. pluvialis* dengan Konsentrasi Inokulum yang Berbeda

Mikroalga *H. pluvialis* diperoleh dari Ugo Plankton, Purworejo, Jawa Tengah dalam bentuk media cair. Media tumbuh atau nutrisi yang digunakan adalah media WALNE'S (tanpa vitamin B₁₂). Media tumbuh diautoklaf pada 121°C selama 15 menit dan diatur pada pH 7 dengan 0,5 M sodium hidroksida steril. Kultur *H. pluvialis* ditumbuhkan pada botol Schott Duran 1000 mL. Air tawar untuk kultur yang digunakan adalah air minum mineral VIT dalam kondisi steril. Selanjutnya 10%-v/v dan 20%-v/v inokulan *H. pluvialis* dimasukkan dalam larutan kultur tersebut. Jumlah nutrisi yang ditambahkan adalah 1mL/L kultur. Kultur *H. pluvialis* ditumbuhkan selama sembilan hari dalam kondisi fotoautotrof yang dilengkapi dengan aerasi, intensitas cahaya 3.200 lux dengan siklus gelap/terang 10:14 jam. Setiap hari dilakukan pengamatan kepadatan sel *H. pluvialis* (absorbansi) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang $\lambda = 680$ nm dan pengamatan jumlah sel *H. pluvialis* menggunakan haemocytometer.

2.2 Induksi Mikroalga *H. pluvialis* dengan NaCl 0,8%-b/v

Pada kultur sel hijau dengan kepadatan 75×10^4 sel/mL ditambahkan garam NaCl 0,8%-b/v. Setelah proses penambahan garam NaCl, mikroalga *H. pluvialis* disimpan kembali dalam botol Schott Duran 250 mL diberi aerasi dan intensitas cahaya 6800 lux dengan siklus gelap/terang 10:14 jam selama dua hari.

2.3 Ekstraksi Karotenoid dan Klorofil

Kultur mikroalga *H. pluvialis* sel hijau dan yang telah diinduksi dibekukan dan dikeringkan dengan *freeze dryer* -86°C. Satu gram sampel kering ditumbuk dengan sedikit aseton 100% dalam mortar kemudian ditambah aseton hingga 50 mL. Larutan ekstrak sampel yang sudah homogen disaring kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama sepuluh menit. Supernatan dipisah dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer. Absorbansi diukur pada panjang gelombang $\lambda = 662$ nm untuk analisis klorofil a, $\lambda = 645$ nm untuk analisis klorofil b, dan $\lambda = 470$ nm untuk analisis karotenoid. Jumlah pigmen tersebut dihitung berdasarkan rumus Lichtenthaler dan Wellburn (1985) yang ditunjukkan pada Tabel 1 (Dere et al., 1998; Zawislak dan Wierdak, 2014).

Tabel 1. Rumus untuk perhitungan kadar klorofil a, klorofil b, dan total karotenoid

$C_a =$	$11,75 A_{662} - 2,350 A_{645}$
$C_b =$	$18,61 A_{645} - 3,960 A_{662}$
$C_{x+c} =$	$1000 A_{470} - 2,270 C_a - 81,4 C_b/227$
$C_a =$ klorofil a, $C_b =$ klorofil b, $C_{x+c} =$ total karotenoid	

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pertumbuhan Mikroalga *H. pluvialis* dengan Konsentrasi Inokulum yang Berbeda

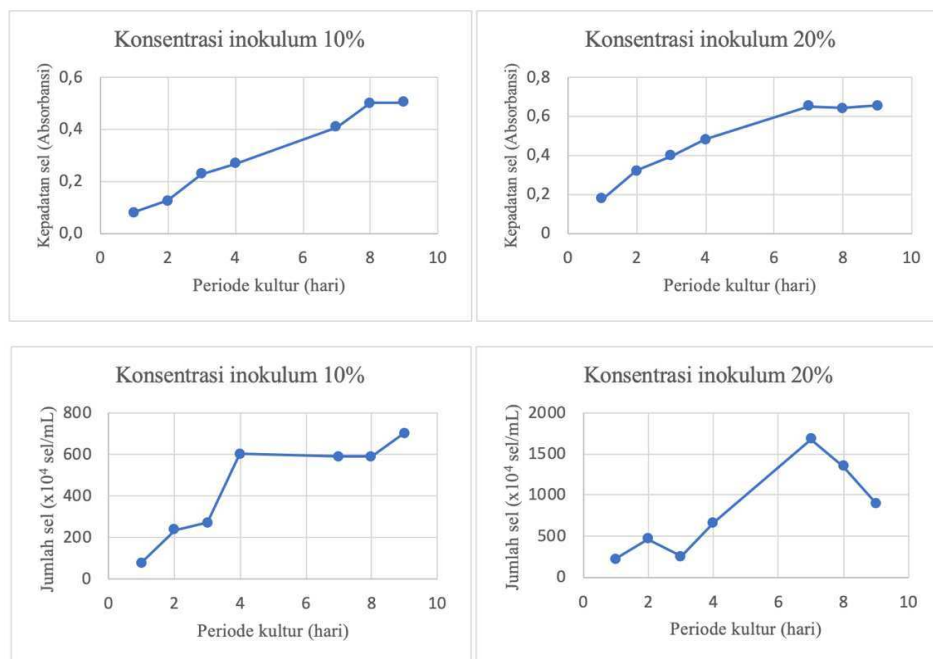
Hasil pertumbuhan kultur mikroalga *H. pluvialis* dengan konsentrasi inokulum 10%-v/v dan 20%-v/v menunjukkan pola pertumbuhan sel yang relatif sama diamati dari kepadatan selnya namun relatif berbeda terhadap jumlah sel (Gambar 2). Dapat dilihat bahwa pada hari ke-8 untuk konsentrasi inokulum 10%-v/v dan pada hari ke-7 untuk konsentrasi inokulum 20%-v/v kepadatan sel mulai konstan. Namun, jika dilihat dari jumlah selnya untuk konsentrasi inokulum 10%-v/v pada hari ke-9 terjadi peningkatan mencapai 70×10^5 sel/mL sedangkan untuk konsentrasi inokulum 20% pada hari ke-8 jumlah selnya menurun dan mengalami penurunan lagi pada hari ke-9.

Hal ini disebabkan kepadatan sel yang diwakili oleh absorbansi dapat menunjukkan bahwa baik sel yang hidup maupun yang mati dapat terukur semuanya sedangkan jumlah sel yang dihitung dengan haemocytometer hanya mengukur sel yang hidup saja. Sehingga terjadi perbedaan pola pertumbuhan antara kepadatan sel dan terhadap jumlah sel. Kultur dengan konsentrasi inokulum 20%-v/v pada hari ke-4 sampai ke-7 mengalami pembelahan sel yang lebih cepat sehingga laju perkembangbiakan hari selanjutnya cenderung menurun. Oleh karena itu konsentrasi inokulum 10%-v/v menunjukkan pertumbuhan sel *H. pluvialis* yang lebih baik.

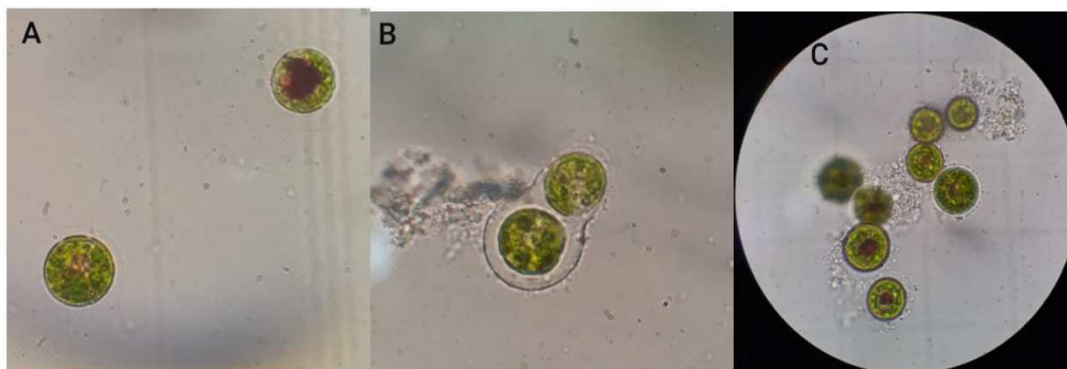
3.2 Induksi Mikroalga *H. pluvialis* dengan NaCl 0,8%-b/v

Pada penambahan garam NaCl 0,8%-b/v dan selanjutnya aplikasi intensitas cahaya yang lebih tinggi menunjukkan sel *H. pluvialis* mengalami stres yang diikuti dengan perubahan morfologis (Gambar 3). Sel-sel motil hijau kehilangan flagella dan motilitas mereka dan kemudian berubah menjadi sel-sel non-motil yang lebih besar selama dua hari pertama (fase transformasi sel).

Nampak dari hasil perhitungan (Tabel 2) rasio kadar karotenoid terhadap klorofil pada kultur sel hijau didapatkan sebesar 0,29 $\mu\text{g}/\text{gram}$ *fresh weight* sedangkan pada kultur sel setelah diinduksi selama 2 hari didapatkan rasio kadar karotenoid terhadap klorofil sebesar 0,38 $\mu\text{g}/\text{gram}$ *fresh weight*. Terjadi peningkatan rasio kadar karotenoid terhadap klorofil sebesar 28,9%. Karotenoid sekunder terbentuk karena asam 3-fosfoglisarat (3PGA) yang dihasilkan pada tahap fiksasi siklus Calvin sebagian besar dialihkan ke tahap glikolisis untuk memproduksi asetil-CoA guna memenuhi kebutuhan besar akan kerangka karbon bagi sintesis asam lemak dan karotenoid (Gu et al., 2014). Berdasarkan parameter kinetik bahwa rute yang paling menguntungkan untuk menghasilkan astaxantin adalah melalui 4,4'-oksigenase pada β -karoten menjadi echinenone kemudian canthaxanthin dan konversi berikutnya menjadi phoenicoxanthin kemudian astaxantin oleh hidroksilase. Rute tersebut ditunjukkan pada Gambar 4. Hal ini juga didukung oleh hasil penelitian Fan et al. (1995) dari hasil identifikasi biosintesis astaxantin dalam *H. pluvialis* terdapat sejumlah echinenone dan canthaxanthin yang signifikan.



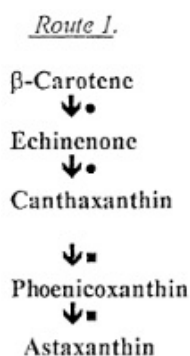
Gambar 2. Pola pertumbuhan mikroalga *H. pluvialis* yang diwakili oleh kepadatan sel (absorbansi) dan jumlah sel (sel/mL) pada konsentrasi inokulum 10%-v/v dan 20%-v/v



Gambar 3. (A) Sel *H. pluvialis* motil vegetatif hijau; (B) *Sporocyst* melepaskan *zoospores*; (C) Sel *H. pluvialis* non-motil *palmella*

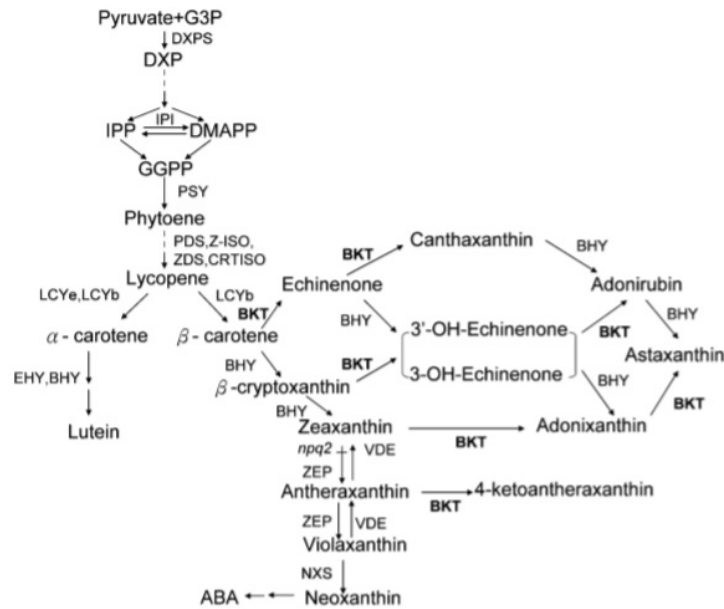
Tabel 2. Kadar klorofil a, klorofil b, total karotenoid, dan rasio kadar karoten terhadap klorofil

	Kultur sel vegetatif hijau	Kultur setelah diinduksi
Kadar klorofil a	5,77 $\mu\text{g/gfw}$	0,59 $\mu\text{g/gfw}$
Kadar klorofil b	2,16 $\mu\text{g/gfw}$	0,3 $\mu\text{g/gfw}$
Kadar total karotenoid	2,35 $\mu\text{g/gfw}$	0,34 $\mu\text{g/gfw}$
Rasio kadar karotenoid thd klorofil	0,29	0,38



Gambar 4. Rute enzimatik untuk pembentukan astaxanthin; reaksi dikatalisis oleh 4,4'-oksigenase (●), reaksi dikatalisis oleh 3,3'-hidroksilase (■) (Fraser et al., 1998).

Sel vegetatif hijau menunjukkan aktivitas karotenoid hidroksilase/BHY yang tinggi sehingga mampu membentuk lutein dan zeaxantin yang merupakan karotenoid primer walaupun kekurangan aktivitas β -karoten ketolase/BKT (oksigenase). Karena hal tersebut pula sel vegetatif hijau tidak mampu mensintesis astaxantin yang merupakan karotenoid sekunder. Dikarenakan ketolase (oksigenase) diketahui lebih menyukai cincin β -ionone yang tidak tersubstitusi, sintesis astaxantin hanya mungkin terjadi jika konsentrasi ketolase secara signifikan lebih tinggi daripada tingkat hidroksilase endogennya. Jalur biosintesis untuk astaxantin dapat dilihat pada Gambar 5 (Zhong et al., 2011).



Gambar 5. Jalur biosintesis astaxantin dan lutein

Pada hari kedua sel baru mulai mengalami perubahan menjadi sel-sel non-motil *palmella*. Hal ini menyebabkan konsentrasi ketolase yang terproduksi belum secara signifikan lebih tinggi daripada konsentrasi hidroksilase. Kondisi ini mungkin menyebabkan sintesis astaxantin belum maksimal sehingga peningkatan rasio kadar karotenoid terhadap klorofil belum terlalu besar.

4. KESIMPULAN

- Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan *H. pluvialis* lebih baik dikulturkan dengan konsentrasi inoculum awal 10% dengan perolehan jumlah kultur 70×10^5 sel/mL atau mengalami penggandaan kelipatan 10.
- Penambahan garam NaCl 0,8%-b/v disertai induksi intensitas cahaya tinggi dapat meningkatkan rasio kadar karotenoid terhadap klorofil sebesar 28,9%.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Butler TO, McDougall GJ, Campbell R, Stanley MS, Day JG. 2017. Media screening for obtaining *Haematococcus pluvialis* red motile macrozooids rich in astaxanthin and fatty acids. *Biology* 7(1), 2. 15 pp.
- [2] Dere S, Güneş T, Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll – A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22(1):13-17.
- [3] Fan L, Vonshak A, Gabbay R, Hirshberg J, Cohen Z, Boussiba S. 1995. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant and Cell Physiology* 36(8):1519-1524.
- [4] Fraser PD, Shimada H, Misawa N. 1998. Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate *in vitro* assay. *European Journal of Biochemistry* 252(2):229-236.

- [5] Gu W, Li H, Zhao P, Yu R, Pan G, Gao S, Xie X, Huang A, He L, Wang G. 2014. Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-response strategies. *Scientific Reports* 4(1): 1-12.
- [6] Lorenz RT. 1999. A technical review of *Haematococcus* algae. *NatuRose Technical Bulletin* #060. 12 pp.
- [7] Muzaki A, Fahrudin, Wardana IK, Haryanti. 2008. Kultur mikroalga *Haematococcus pluvialis* untuk menghasilkan astaxantin. *Jurnal Riset Akuakultur* 3(3):351-361.
- [8] Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. 2016. Astaxanthin-producing green microalgae *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science* 7:531. 28 pp.
- [9] Zawisłak G, Wierdak RN. 2014. Evaluation of the yield and biological value of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) in the bunch harvest cultivation. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 13(4):185-198.
- [10] Zhang Z, Wang B, Hu Q, Sommerfeld M, Li Y, Han D. 2016. A new paradigm for producing astaxanthin from unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering* 113(10):2088-2099.
- [11] Zhong Y-J, Huang J-C, Liu J, Li Y, Jiang Y, Xu Z-F, Sandmann G, Chen F. 2011. Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62(10):3659-3669.