

KULTUR MIKROALGA *Haematococcus pluvialis* UNTUK MENGHASILKAN ASTAXANTIN

Ahmad Muzaki¹⁾, Fahrudin²⁾, Ida Komang Wardana³⁾, dan Haryanti⁴⁾

ABSTRAK

Mikroalga merupakan sumberdaya biologis yang eksklusif dan berperan sangat luas untuk aplikasi penyedia komponen bernilai tinggi di bidang perikanan dalam rangka peningkatan ekonomi. Tujuan riset ini adalah mendapatkan teknik pengkulturan *Haematococcus pluvialis* dan teknik stimulasi melalui penyinaran sel untuk menghasilkan produk astaxantin. Media tumbuh Bold (PIV metal) dan modifikasi Bold (Clewat-32) diujikan untuk pengkulturan. Pengkulturan juga diterapkan dengan menggunakan 6 jenis air tawar dari sumber berbeda (mata air alam, sumur artesis, air mineral kemasan I, air mineral kemasan II, air sumur, dan air PAM). Efek stres dilakukan melalui penyinaran dengan UV selama 3 jam dan inkubasi lanjutan dengan menggunakan penyinaran intensitas cahaya tinggi untuk mendapatkan sel merah yang mengandung astaxantin. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pertumbuhan sel *H. pluvialis* pada media Bold (PIV metal) lebih baik (55×10^4 sel/mL) dan air tawar yang berasal dari mata air alam menghasilkan kepadatan sel lebih tinggi (166×10^4 sel/mL) pada hari ke-5 dan 245×10^4 sel/mL pada hari ke-13 dibandingkan air dari sumber lainnya. Penyinaran UV dan dilanjutkan dengan penyinaran intensitas cahaya tinggi mempercepat perubahan warna sel dan produksi metabolit sekunder sebagai astaxantin.

ABSTRACT: *Microalgae culture of Haematococcus pluvialis for astaxanthin production. By: Ahmad Muzaki, Fahrudin, Ida Komang Wardana, and Haryanti*

Microalgae are exclusive biological resources to provide valuable compounds in fisheries. The purpose of the research was to evaluate culture technique of H. pluvialis and stimulation technique through UV irradiation to produce astaxanthin. Growth media of Bold (PIV metal) and Bold (clewat-32) modifications were tested to culture microalgae. Other culture technique applied by using 6 fresh water from various sources (natural fresh water, deep well water, mineral water I, mineral water II, well water, and municipal water supply sample). Stress effects were tested by using UV irradiation for 3 hours and incubation with high light intensity to find red cells containing astaxanthin. Result showed that growth cell of H. pluvialis in BOLD media (PIV metal) was higher (550×10^4 sel/mL) than that of in BOLD modification media. Cell density of H. pluvialis cultured with fresh water from natural source was higher (166×10^4 sel/mL) on day 5th and 245×10^4 sel/mL on day 13th compared to other water sources. Effect of UV irradiation and high light intensity stimulated cells color change and produced secondary metabolite of astaxanthin.

KEYWORDS: *astaxanthin, microalgae, culture technology, growth cell, light intensity*

¹⁾ Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan sumberdaya alam terbesar dan terperbarui untuk penyediaan komponen bernilai tinggi bagi kepentingan di bidang perikanan, peternakan, kesehatan, farmasi, dan migas. Pada umumnya mikroalga bersifat *unisellular*, *fototroph*, dan berkembang biak di air tawar atau air laut. Hampir semua mikroorganisme fotosintetik tersebut menunjukkan peran sebagai sumberdaya biologis yang eksklusif dan berperan sangat luas untuk aplikasi bioteknologi dan peningkatan ekonomi. Menurut Fiedler *et al.* (2006), menyatakan bahwa asam lemak poly-unsaturated rantai panjang hampir seluruhnya dihasilkan oleh alga dan sedikit dari fungi serta *moss* dengan proporsi jumlah yang relatif tinggi. Sementara, produk primer yang dihasilkan dari mikroalga yang mempunyai nilai guna tinggi adalah asam lemak, pigmen, dan polisakarida. Metabolit tersebut berperan dalam pertumbuhan dan reproduksi.

Dewasa ini, produk metabolit sekunder yang dihasilkan dari mikroalga menjadi sangat menarik bagi peneliti dan *enterpreuner*, terutama adanya senyawa xanthophyll, seperti astaxantin, cantaxantin, zeaxantin, adonirobin, adonixantin, cryptoxantin, violaxantin, α -caroten, β -caroten, γ -caroten, lutein. Astaxantin merupakan pigmen carotenoid yang larut dalam lemak dan secara biologis dihasilkan oleh mikroalga *H. pluvialis* (Fiedler *et al.*, 2006; Campo *et al.*, 2007; Cysewski, 2004). *H. pluvialis* memproduksi astaxantin apabila hidup di lingkungan yang rendah nutrisi, cahaya terang atau kondisi lingkungan buruk lainnya. Diduga bahwa *Haematococcus* memproduksi astaxantin sebagai perlindungan serangan sinar ultraviolet saat lingkungan tidak menguntungkan (Kurnia, 2006).

Di bidang perikanan, astaxantin menjadi sangat diperlukan untuk mengantisipasi pudarnya warna pada ikan budidaya terutama ikan hias, udang, dan lobster. Sementara hewan akuatik tersebut mendapatkan astaxantin dari pakan yang berupa zooplankton atau krustase rendah dan mengakumulasi melalui fitoplankton. Hal yang menarik bahwa ikan dapat mengeksploitasi carotenoid sebagai senyawa yang potensial untuk antioksidan. Pada ikan salmon dan ikan *trout*, astaxantin diakumulasi secara selektif dari makanannya dan ditimbun di dalam daging untuk menghindari peroksidasi jaringan lemak atau hal-hal yang berbahaya

dalam oksidasi selama bermigrasi secara alami (Cysewski, 2004). Pada udang, peran warna dan pigmentasi dapat menentukan produk udang menjadi lebih *luxury*. Menurut Latscha (1989), bahwa warna dan pigmentasi udang dapat menggambarkan adanya variasi pemicu pada proses fisiologi dan berdampak sangat signifikan dalam pemilihan udang untuk konsumsi. Secara visual, warna udang menjadi karakteristik yang sangat penting untuk menentukan pilihan karena berhubungan dengan kesegaran, rasa, kesehatan, atau kualitas produk. Pada akhirnya akan dipertimbangkan dengan proses produksi yang tidak baik, adanya pembusukan, dan kualitas rendah.

Di bidang kesehatan peran efektif carotenoid terutama astaxantin dan lutein telah terbukti dapat mencegah penyakit degeneratif, anti-inflamatori (reumatik arthritis, kejang otot, inflamasi kulit oleh radiasi UV), kanker, liver, *Alzheimers*, dan stroke. Kebutuhan produk pigmen alami dari sumber biologi semakin meningkat, sehingga peran mikroalga semakin besar (Anonymous, 2005; Cysewski, 2004; Campo *et al.*, 2007).

Pengembangan produk astaxantin secara alami dari mikroalga *H. pluvialis* perlu mendapat perhatian mengingat metode dan penanganan kultur yang relatif sederhana dan sesuai dengan standar kultur mikroalga lain. Di samping itu, kebutuhan sebagai bahan aditif pakan ikan dan krustase yang sangat diperlukan dalam rangka meningkatkan performa warna dan pigmentasi serta berpotensi sebagai antioksidan dan disinyalir dapat meningkatkan sistem immunitas. Mengingat hal tersebut, budidaya mikroalga *H. pluvialis* dengan teknik stimulasi atau rangsangan penyinaran untuk menghasilkan astaxantin (metabolit sekunder) telah dilakukan Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol yang bertujuan untuk mendapatkan produk astaxantin dengan kandungan tinggi agar dapat dimanfaatkan sebagai bahan aditif pada pakan ikan atau krustase.

BAHAN DAN METODE

Kultur Mikroalga H. pluvialis dengan Mikronutrien Anorganik Berbeda

Mikroalga *H. pluvialis* diperoleh dari CCAC (*Culture Collection of Algae Universitas Cologne*), Jerman melalui CV Kyowa Concrete Technology dalam bentuk koloni pada agar

miring dan media cair. Untuk mengetahui optimasi pertumbuhan *H. pluvialis* pada media yang sesuai, maka tahap pertama kultur dilakukan dalam 2 jenis media dengan kandungan mikronutrien yang berbeda. Media tersebut adalah media BOLD dan modifikasi dari media BOLD. Pada prinsipnya perbedaan kedua media tersebut hanya pada penggunaan unsur mikronutrien anorganik yang berupa *trace element*. Komposisi larutan BOLD sebagai media tumbuh mikroalga *H. pluvialis* adalah menggunakan unsur mikronutrien anorganik PIV metal, sedangkan pada media modifikasi BOLD, unsur mikronutrien PIV metal digantikan dengan Clewat-32 (Teikoku Chemical Industries Co. Ltd.). Komposisi larutan pupuk dan PIV metal yang digunakan sebagai media tumbuh dalam kultur mikroalga *H. pluvialis* terdapat pada Tabel 1.

Semua senyawa mikronutrien anorganik (PIV metal) kemudian dilarutkan dalam 1.000 mL aquades dan disterilisasi dengan *autoclave* selama 30 menit pada suhu 115°C. Selanjutnya, hal yang sama juga dilakukan pada semua jenis makronutrien atau seringkali disebut pupuk (NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7$

H_2O , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , dan Vitamin B_{12}), yaitu masing-masing dilarutkan dalam 400 mL aquades dan disterilisasi basah dengan *autoclave* selama 30 menit pada suhu 115°C. Larutan makronutrien yang berupa pupuk tersebut merupakan larutan *stock* untuk digunakan dalam pembuatan media kultur. Komposisi dan jumlah makronutrien (pupuk) yang digunakan dalam media tumbuh untuk pengkulturan *H. pluvialis* tertera pada Tabel 2. Wadah yang digunakan berupa erlenmeyer dengan volume 1 L sebanyak 3 buah dengan ulangan 2 kali pada masing-masing jenis media tumbuh (media BOLD dan Modifikasi media BOLD).

Air tawar untuk kultur harus dalam kondisi steril melalui penyaringan menggunakan filter berukuran 0,2 μm . Selanjutnya 100 mL inokulan *H. pluvialis* dengan kepadatan 30×10^3 sel/mL dimasukkan dalam campuran larutan kultur tersebut. Inkubasi dilakukan dalam ruang mikroalga yang dilengkapi aerasi, cahaya (2.500–3.500 lux) dan suhu 23°C–24°C. Pengamatan kepadatan populasi sel *H. pluvialis* dihitung setiap hari menggunakan haemocytometer.

Tabel 1. Komposisi media tumbuh dalam kultur *H. pluvialis* dengan menggunakan mikronutrien PIV metal

Table 1. Growth media composition to culture *H. pluvialis* using micronutrient inorganic of PIV metal

Jenis nutrien Nutrient contains	Jumlah Amount (g)
Makronutrien (Macronutrient)	
NaNO_3	10.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3.0
K_2HPO_4	3.0
KH_2PO_4	7.0
NaCl	1.0
Vitamin B_{12}	60.0×10^{-6}
Mikronutrien anorganik (PIV metal) Anorganic micronutrient	
Na_2EDTA (g)	30
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg)	10
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mg)	10
ZnCl_2 (mg)	10
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg)	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg)	10

Tabel 2. Komposisi dan jumlah nutrisi (pupuk) yang digunakan untuk media tumbuh *H. pluvialis*
 Table 2. Fertilizer composition and volume used for culturing microalgae *H. pluvialis*

Jenis nutrisi (pupuk) Nutrient contains (fertilizer)	Media BOLD BOLD's medium (mL)	Modifikasi media BOLD Modification of BOLD's medium (mL)
NaNO ₃	30	30
CaCl ₂ 2 H ₂ O	10	10
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	10	10
K ₂ HPO ₄	10	10
KH ₂ PO ₄	10	10
NaCl	10	10
Vitamin B ₁₂	1	1
PIV Metal	6	-
Clewat-32	-	6
Air tawar steril	940	940

Kultur *H. pluvialis* dengan Air Tawar dari Sumber yang Berbeda

Untuk mengetahui pertumbuhan *H. pluvialis* yang optimal, maka diujikan air tawar sebagai media kultur, dengan menggunakan berbagai sumber air. Dalam pengkulturan mikroalga tersebut digunakan 6 jenis air tawar dari sumber yang berbeda yaitu air tawar dari sumber mata air alam (Sanggalangit), air sumur artesis, air minum mineral dalam kemasan I dan II, air sumur tanah dan air dari PAM dengan menggunakan media kultur BOLD (PIV metal). Mikroalga *H. pluvialis* dikultur dalam wadah erlenmeyer volume 1 L sebanyak 12 buah, yaitu terdiri atas 6 perlakuan dan 2 kali ulangan. Penyiapan air tawar melalui sterilisasi dengan filter 0,20 µm. Inokulasi *H. pluvialis* dilakukan dengan kepadatan yang sama antar perlakuan (22,5 x 10⁴ sel/mL). Inkubasi dilakukan dalam ruang mikroalga yang dilengkapi aerasi, cahaya (2.500—3.500 lux) dan suhu 23°C—24°C. Pengamatan kepadatan populasi sel *H. pluvialis* dihitung setiap dua hari menggunakan haemocytometer.

Stimulasi Mikroalga *H. pluvialis* dengan Penyinaran UV

Untuk menstimulasi mikroalga *H. pluvialis* agar menghasilkan metabolit sekunder yang ditandai dengan warna sel berubah menjadi merah (terjadi stres dan memproduksi astaxantin) maka dilakukan penyinaran menggunakan lampu ultraviolet 20 W selama 3 jam. Mikroalga *H. pluvialis* yang mendapat penyinaran UV berumur 5 hari setelah

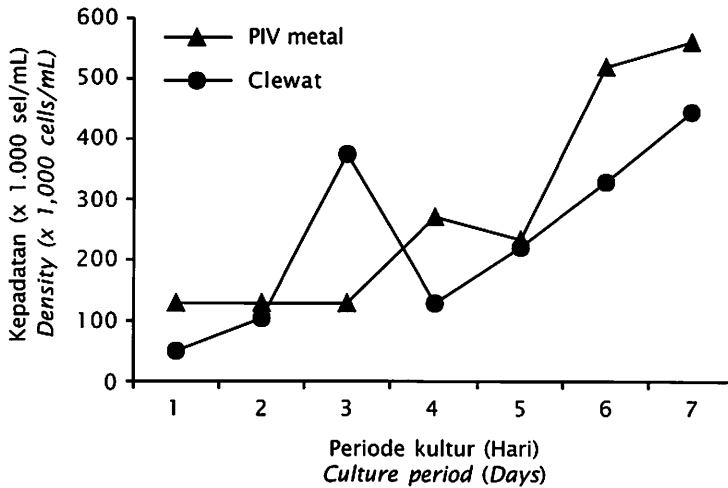
pengkulturan. Penyinaran menggunakan UV dilakukan di dalam inkubator sehingga suhu tetap stabil berkisar 20°C. Setelah proses penyinaran dengan UV, mikroalga *H. pluvialis* diinkubasi kembali dalam ruang dengan suhu 23°C—24°C, diberi aerasi dan pencahayaan lampu TL. Pada waktu inkubasi lanjutan dilakukan dengan 2 perlakuan pencahayaan, yaitu pencahayaan pada satu sisi dan 2 sisi sehingga memberikan intensitas cahaya yang berbeda, masing-masing 2.750 lux dan 5.000 lux.

HASIL DAN BAHASAN

Kultur Mikroalga *H. pluvialis* dengan Mikronutrien Anorganik Berbeda

Hasil yang diperoleh pada tahapan kultur mikroalga *H. pluvialis* dengan mikronutrien anorganik berbeda diperoleh pola pertumbuhan sel yang relatif berbeda pula (Gambar 1). Nampak bahwa pada hari ke-3 pertumbuhan sel *H. pluvialis* dengan mikronutrien Clewat-32 mencapai populasi tinggi (38 x 10⁴ sel/mL), semetara pertumbuhan sel dengan PIV metal masih rendah yaitu 13 x 10⁴ sel/mL. Namun, pada hari ke-7 dihasilkan populasi tertinggi berkisar 55-58 x 10⁴ sel/mL pada kultur dengan menggunakan PIV metal, sedangkan pengkulturan dengan Clewat-32 hanya sebesar 42-45 x 10⁴ sel/mL.

Bila dilihat dari komposisi mikronutrien anorganik PIV metal dan Clewat-32 kurang lebih tidak berbeda. Namun nampaknya pada Clewat-32 terdapat kandungan *trace element*



Gambar 1. Pola pertumbuhan mikroalga *H. pluvialis* yang dikultur dengan mikronutrien anorganik berbeda

Figure 1. Growth pattern of microalgae *H. pluvialis* cultured with various inorganic micronutrients

yang relatif lebih lengkap, walaupun dalam jumlah kecil. Keadaan ini menyebabkan sel mikroalga *H. pluvialis* mengalami pembelahan sel yang lebih cepat (pada hari ke-3) dan senyawa tersebut tidak dapat dimanfaatkan dalam waktu lama oleh sel-sel, sehingga laju perkembangbiakan hari selanjutnya relatif rendah. Clewat-32 merupakan produk dagang mikronutrien yang dikemas secara kompak mengandung 18 unsur mikronutrien anorganik, di antaranya $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Zn Cl_2 , $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , EDTA, $(\text{HOCH}_2)_2\text{N CH}_3\text{N}$, dan $(\text{CH}_3\text{COO})_3$. Sementara, pada PIV metal unsur senyawa hanya terdiri atas 6 jenis dengan konsentrasi tertentu, sehingga stimulasi terhadap perkembangbiakan sel *H. pluvialis* berlangsung secara perlahan dan gradien serta tidak ada lonjakan kepadatan sel dalam waktu singkat. Nampaknya pemanfaatan senyawa dalam PIV metal dapat diefisienkan hingga mencapai kepadatan tertinggi pada hari ke-7. Walaupun PIV metal menunjukkan pertumbuhan sel *H. pluvialis* lebih baik, namun penggunaan Clewat-32 sebagai mikronutrien dalam kultur mikroalga tersebut dapat dijadikan alternatif untuk menstimulasi pertumbuhan sel.

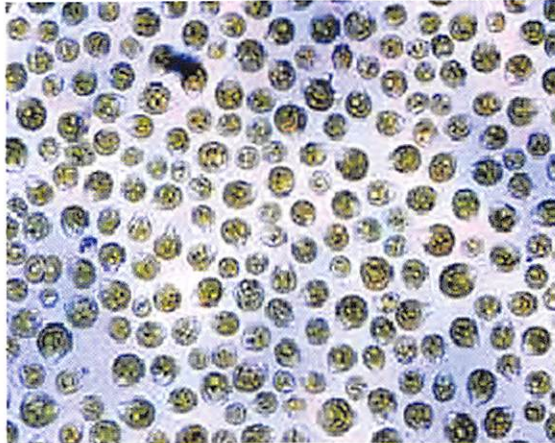
Hasil pengamatan terhadap kondisi dan keragaan sel mikroalga *H. pluvialis* secara mikroskopis menunjukkan sel yang sehat, gerakan aktif, dinding sel, serta protoplasma sel berwarna hijau (Gambar 2). Hal ini meng-

indikasikan bahwa *H. pluvialis* berkembang dan tumbuh dengan kondisi kultur yang memadai, baik menggunakan mikronutrien PIV metal atau Clewat-32, juga tanpa adanya kontaminasi dari sel lain.

Kultur *H. pluvialis* dengan Air Tawar dari Sumber yang Berbeda

Hasil pengamatan pertumbuhan mikroalga *H. pluvialis* dengan menggunakan air tawar dari berbagai sumber menunjukkan bahwa air yang berasal dari mata air alam (Sanggalangit) dan air mineral kemasan II menghasilkan kepadatan sel yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan keempat air tawar dari sumber lain. Pada hari ke-2 dan ke-3, mikroalga *H. pluvialis* yang dipelihara dengan air tawar dari 6 sumber air sudah mulai tumbuh. Pada hari ke-5 hingga ke-7, mikroalga *H. pluvialis* yang dikultur rata-rata mencapai puncak perkembangbiakan, walaupun dengan kepadatan yang berbeda. Hasil kultur dengan menggunakan air tawar dari mata air alam (Sanggalangit) memiliki kepadatan sel tertinggi (166×10^4 sel/mL) dibandingkan dengan mikroalga *H. pluvialis* yang dikultur menggunakan sumber air lain.

Pengkulturan mikroalga *H. pluvialis* dengan air mineral kemasan II juga menunjukkan laju perkembangbiakan dengan indikasi kepadatan sel yang tinggi pada hari ke-7 (150×10^4 sel/mL). Hal yang sangat berbeda nyata



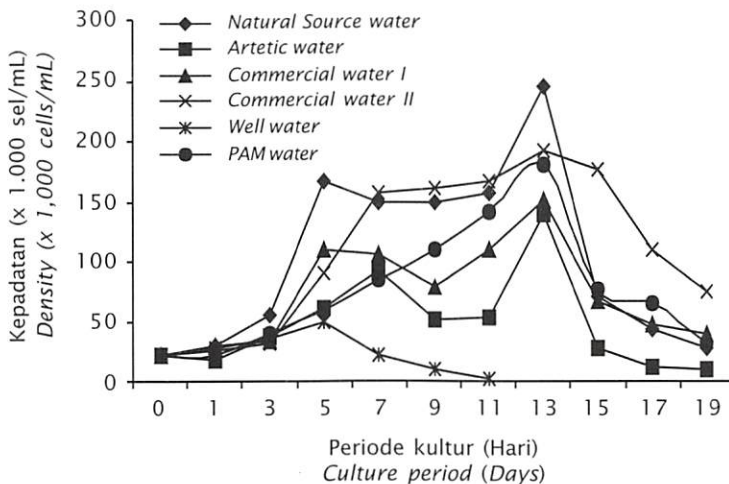
Gambar 2. Keragaan sel mikroalga *H. pluvialis* yang dikultur dengan mikronutrien anorganik berbeda

Figure 2. Performance of *H. pluvialis* microalgae cultured with various inorganic micronutrients

ditunjukkan dari kultur dengan menggunakan air dari sumber sumur, mikroalga mencapai kepadatan tertinggi 51×10^4 sel/mL dan hanya bertahan hingga hari ke-11, sementara sel mikroalga pada perlakuan lain mengalami masa penurunan kepadatan hingga hari ke-19.

Gambar 3 memperlihatkan bahwa pada hari ke-13 setelah kultur, semua perlakuan menghasilkan kepadatan tertinggi. Mikroalga *H.*

pluvialis yang dikultur dengan air tawar berasal dari sumber mata air alam (Sanggalangit) menghasilkan kepadatan tertinggi (250×10^4 sel/mL), sedangkan pada mikroalga yang dikultur dengan air mineral kemasan I dan II masing-masing memberikan kepadatan 150×10^4 sel/mL dan 192×10^4 sel/mL. Penggunaan air sumur artesis untuk kultur memberikan kepadatan (150×10^4 sel/mL) yang relatif tidak



Gambar 3. Pola pertumbuhan mikroalga *H. pluvialis* yang dikultur dengan menggunakan air tawar dari sumber air berbeda

Figure 3. Growth pattern of microalgae *H. pluvialis* cultured in freshwater from various sources of water

berbeda nyata dengan air mineral kemasan I. Nampaknya penggunaan air tawar sebagai media kultur mikroalga *H. pluvialis* dari sumber berbeda perlu dicermati. Hal ini berhubungan dengan kandungan mikronutrien anorganik dalam air dan juga efisiensi biaya kultur.

Adanya perbedaan pertumbuhan sel diduga berhubungan dengan kandungan unsur hara terutama mikronutrien yang ada dalam air dan berpengaruh pada siklus hidup *H. pluvialis*. Dalam pertumbuhannya mikroalga *H. pluvialis* mengalami pertumbuhan vegetatif sel, dilanjutkan dengan terjadinya enkapsulasi dan *maturasi* serta *germination* (Fiedler *et al.*, 2006). Pada saat *germination* tersebut, sel baru dilepas dari sel induk sehingga terjadi siklus hidup berikutnya. Pada umumnya proses tersebut berlangsung selama 5–6 hari pada kondisi kultur yang memadai. Mikronutrien merupakan senyawa yang sangat diperlukan pada perkembangbiakan sel mikroalga untuk membantu dalam proses metabolisme, pembentukan dinding sel, protoplasma, dan proses fisiologi lain dalam sel (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Walaupun jumlah yang diperlukan sangat kecil, namun ketersediaan dalam media tumbuh sangat diperlukan.

Stimulasi *H. pluvialis* Menggunakan Lampu UV

Hasil pengamatan terhadap stimulasi penyinaran UV selama 3 jam dengan suhu kultur 20°C (dalam inkubator) pada kultur mikroalga berumur 5 hari menunjukkan bahwa sel mengalami stres dengan respon menghasilkan warna merah yang merupakan produk metabolit sekunder dengan kandungan astaxantin.

Diketahui bahwa dalam siklus hidup mikroalga *H. pluvialis* mempunyai 5 fase pertumbuhan. Fase I merupakan fase sel dengan biflagella tumbuh cepat dan bergerak aktif. Selanjutnya pada fase ke-II flagella lepas, tumbuh dalam bentuk sel *spherical palmeloid*. Pada fase III, sel induk mengalami pembelahan vegetatif dengan menghasilkan sel baru yang dilengkapi flagella, sel tumbuh secara kontinu, terbentuk dinding sel multilayer. Kemudian pada fase IV sel baru dilepaskan dari sel induk dan terjadi siklus baru berikutnya. Bila kondisi tidak menguntungkan, maka sel berhenti membelah, dinding sel menjadi tebal (*cyste*) dan membesar dan sel berubah menjadi merah karena adanya pembentukan astaxantin dalam jumlah banyak (Fiedler *et al.*, 2006; Anonimous,

2008a). Dengan demikian secara morfologi sel dapat dirubah dengan memberikan stimulasi yang menimbulkan efek stres. Penyinaran UV juga dapat menyebabkan kerusakan pada DNA, kulit, dan mata manusia (Alatas & Yanti, 2003). Di antara stimulasi yang pernah dilakukan adalah penyinaran dengan intensitas cahaya tinggi (Orosa *et al.*, 2001), penyinaran UV dalam bioreaktor (Anonimous, 2006), penggunaan CO₂ (Tripathi *et al.*, 2001), penggunaan NaCl dan Fe²⁺ (Fiedler *et al.*, 2006).


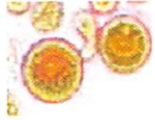

Secara morfologi dapat digambarkan bahwa ukuran sel *H. pluvialis* sebelum mendapat penyinaran UV relatif lebih kecil, sel keseluruhan berwarna hijau. Namun, setelah mendapat stimulasi dengan penyinaran UV maka sel berwarna hijau kemerahan dan merah dan terjadi pembengkakan sel. Hal ini digambarkan pada Tabel 3, terlihat bahwa terjadi pembesaran ukuran sel *H. pluvialis* setelah mendapatkan penyinaran UV. Hal ini menunjukkan bahwa ada respon terhadap penyinaran UV yang menimbulkan stres sehingga terjadi produksi astaxantin sebagai produk metabolit sekunder dan dimungkinkan perlindungan terhadap sinar UV.

Dari hasil penyinaran dengan UV selama 3 jam selanjutnya dilakukan inkubasi lanjutan pada kultur mikroalga *H. pluvialis* dengan memberikan penyinaran menggunakan lampu TL pada 1 sisi (2.750 lux) dan 2 sisi (5.000 lux). Menurut Orosa *et al.* (2001), penyinaran dengan intensitas cahaya tinggi juga memberikan efek stres pada sel mikroalga, sehingga diharapkan terjadi produksi astaxantin yang lebih cepat dan jumlah banyak. Efek penyinaran UV terhadap persentase terjadinya perubahan warna sel dari hijau menjadi warna merah sebagai indikasi adanya produk astaxantin disajikan pada Gambar 4.

Pada Gambar 4 terlihat bahwa *H. pluvialis* pada hari pertama setelah penyinaran UV dengan diinkubasi menggunakan penyinaran lampu TL pada 2 sisi menunjukkan adanya perubahan warna sel menjadi hijau kemerahan (1,83%) dan merah (1,01%). Sementara pada hari ke-4, perubahan warna sel meningkat hingga pada hari ke-18 warna sel *H. pluvialis* tidak ada yang berwarna hijau, serta populasi sel merah sebanyak 31,25% dan hijau kemerahan 68,75%.

Pada sel *H. pluvialis* yang diinkubasi menggunakan penyinaran lampu TL hanya pada 1 sisi setelah penyinaran UV menunjukkan perubahan warna sel menjadi hijau

Tabel 3. Keragaan dan ukuran sel mikroalga *H. pluvialis* sebelum dan sesudah mendapatkan stimulasi dengan penyinaran UV
 Table 3. Performance and cell size of microalgae *H. pluvialis* before and after treated with UV irradiation

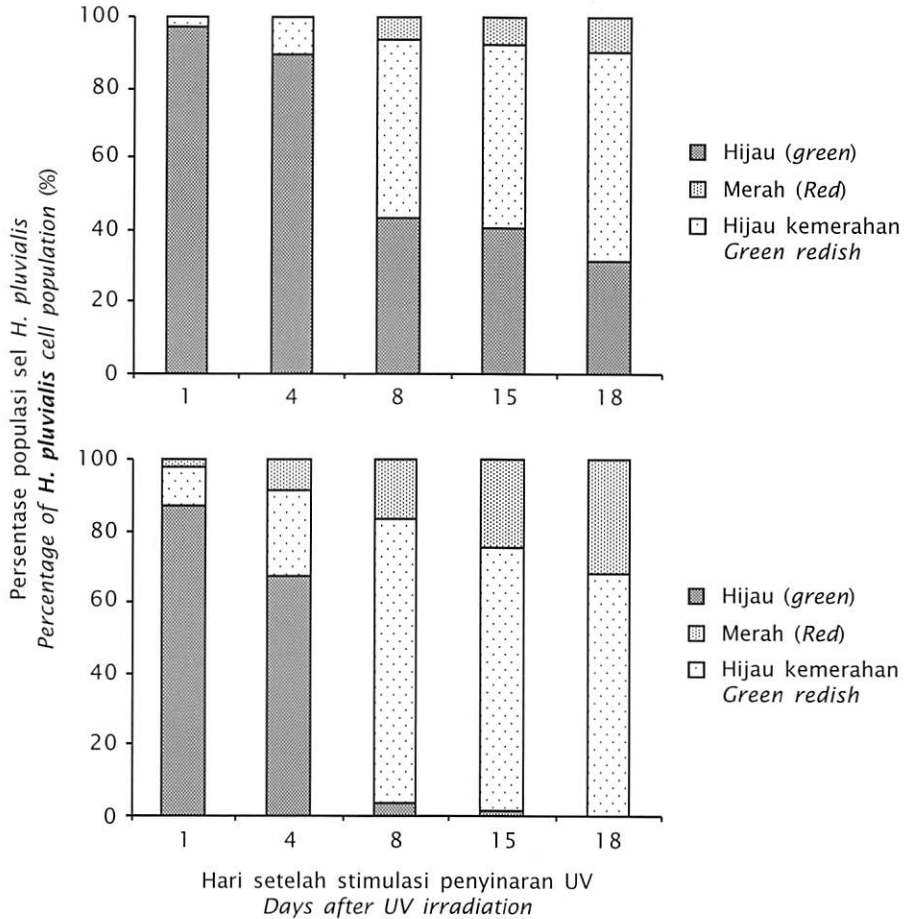
Keragaan sel Cell performance	Ukuran sel (Cell size) (μm)
Sel <i>H. pluvialis</i> sebelum penyinaran UV Cell of <i>H. pluvialis</i> before UV irradiation Sel berwarna hijau (Green cell colour)	17.06 \pm 1.45
	
Sel <i>H. pluvialis</i> setelah mendapatkan penyinaran UV Cell of <i>H. pluvialis</i> after UV irradiation Sel berwarna (Cell colour)	
- Hijau kemerahan (Green redish)	21.96 \pm 2.10
	
- Merah (Red)	27.63 \pm 2.23
	

kemerahan hanya sebesar 2,56% dan persentase perubahan sangat lambat, hingga hari ke-6 sel berwarna hijau kemerahan sebanyak 10,71%; sedangkan sel lainnya tetap berwarna hijau. Pada hari ke-12 sudah ada sel *H. pluvialis* yang berwarna merah 6,82%. Sampai hari ke-17 masih ada sel *H. pluvialis* yang berwarna hijau sebanyak 31,06%, yang berwarna hijau kemerahan meningkat hingga 59,01%, demikian juga dengan yang berwarna merah juga meningkat menjadi 9,94%.

Adanya perbedaan perubahan sel dari hijau menjadi merah nampaknya sangat dipengaruhi oleh intensitas cahaya, di samping juga efek stres dari penyinaran UV. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian pencahayaan dengan intensitas tinggi berpengaruh dan memperberat tingkat stres terhadap *H. pluvialis*. Pencahayaan yang terus-menerus merupakan salah satu kondisi yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan *H. pluvialis* (Anonimus, 2008b).

Untuk mengetahui perkembangan sel *H. pluvialis*, maka dilakukan pengamatan performa sel pada saat sebelum mendapatkan penyinaran UV dan masa inkubasi dengan interval waktu tertentu setelah penyinaran UV. Inkubasi lanjutan ini dilakukan dengan penyinaran satu sisi dan dua sisi. Nampak bahwa sel mikroalga *H. pluvialis* dengan intensitas penyinaran tinggi lebih banyak menghasilkan astaxantin dibandingkan pada penyinaran intensitas rendah. Dengan demikian, stimulasi penyinaran, baik dengan UV maupun lampu TL dengan intensitas tinggi pada mikroalga *H. pluvialis* dapat memberikan efek stres hingga menghasilkan produk astaxantin sebagai metabolit sekunder (Gambar 5).

Hasil pengamatan terhadap bobot total sel *H. pluvialis* yang dikeringkan dengan freeze dried dalam volume 500 L dengan kepadatan 160×10^4 sel/mL maka dapat menghasilkan bobot 0,53 g sel kering. Bila diestimasi



Gambar 4. Persentase (%) perubahan warna pada populasi mikroalga *H. pluvialis* yang diinkubasi menggunakan lampu pada 1 sisi (A) dan 2 sisi (B) setelah diberikan stimulasi penyinaran UV

Figure 4. Percentage (%) of cell color change in population of microalgae *H. pluvialis* incubated in high light intensity at one site (A) and 2 sites (B) after irradiated by UV light

kandungan astaxantin setelah melalui proses ekstraksi hanya 40% dari bobot kering maka kandungan astaxantin total adalah 2,12 mg/g biomassa. Menurut Orosa *et al.* (2001), menyatakan bahwa laju akumulasi astaxantin pada *H. pluvialis* lebih tinggi (2,7 mg/L/hari) dibandingkan dengan mikroalga lainnya. Akumulasi astaxantin pada *Nannochloris wimmeri* adalah 19,2 mg/g biomassa, sedangkan pada *Chlorella zofingiensis* dan *Scenedesmus vacuolatus* masing-masing sebesar 6,8 dan 2,7 mg/g biomassa.

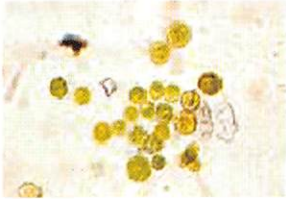
Dengan demikian, terlihat jelas bahwa astaxantin yang dihasilkan dari mikroalga *H.*

pluvialis mempunyai prospek sebagai bahan aditif dan suplemen pada budidaya ikan atau krustase.

KESIMPULAN

- ◆ Kultur mikroalga *H. pluvialis* menggunakan media BOLD dengan mikronutrien anorganik (PIV metal) memberikan kepadatan sel yang lebih tinggi (55×10^4 sel/mL) daripada penggunaan media BOLD dengan Clewat-32 (45×10^4 sel/mL).
- ◆ *H. pluvialis* dapat tumbuh dan berkembang dengan lebih baik menggunakan sumber air

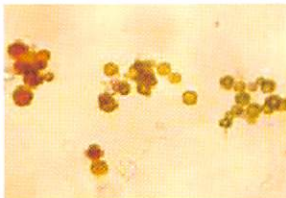
Inkubasi dengan pencahayaan pada 1 sisi
Incubation used 1 site lighting



Hari ke 3 setelah UV
3 days after UV irradiation



Hari ke 6 setelah UV
6 days after UV irradiation

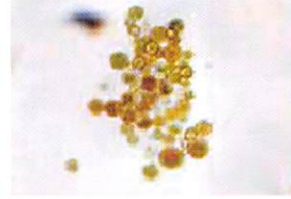


Hari ke 12 setelah UV
12 days after UV irradiation

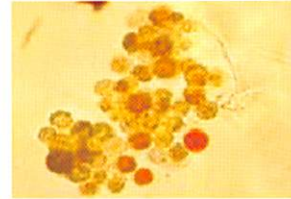


Hari ke 17 setelah UV
17 days after UV irradiation

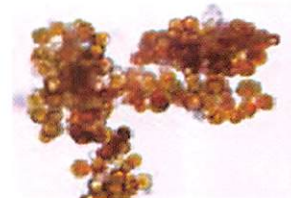
Inkubasi dengan pencahayaan pada 2 sisi
Incubation used 2 site lighting



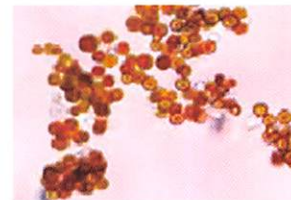
Hari ke 1 setelah UV
1 day after UV irradiation



Hari ke 4 setelah UV
4 days after UV irradiation



Hari ke 8 setelah UV
8 days after UV irradiation



Hari ke 18 setelah UV
18 days after UV irradiation

Gambar 5. Perkembangan sel mikroalga *H. pluvialis* pada inkubasi lanjutan setelah mendapatkan penyinaran UV

Figure 5. Development of microalgae *H. pluvialis* incubated after treated with UV irradiation

dari mata air alam sebagai media kultur, dibandingkan dengan sumber air tawar lainnya. Kepadatan yang diperoleh 170×10^4 sel/mL pada hari ke-5 dan 245×10^4 sel/mL pada hari ke-13.

- ◆ Penyinaran UV selama 3 jam dengan inkubasi lanjutan menggunakan intensitas cahaya tinggi (penyinaran 2 sisi) dapat mempercepat sel mikroalga *H. pluvialis* menghasilkan sel berwarna merah yang

diindikasikan sebagai astaxantin.

SARAN

- ♦ Analisis jumlah kandungan astaxantin mikroalga *H. pluvialis* harus dilakukan secara akurat menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) atau *Thin Layer Chromatography* (TLC).
- ♦ Kultur massal mikroalga *H. pluvialis* perlu direalisasikan untuk menghasilkan astaxantin dalam jumlah banyak.
- ♦ Pengujian astaxantin dari mikroalga *H. pluvialis* sebagai bahan aditif dan suplemen untuk pakan ikan dan krustase perlu dimulai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih atas bantuan dan kerja sama rekan-rekan teknisi dan kelompok peneliti Bioteknologi serta peran nyata Dr. Osamu Itsuka dari Kyowa Concrete Ltd. sehingga riset ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Alatas, Z. dan L. Yanti. 2003. Efek Kesehatan Radiasi Non Pengion pada Manusia. Cermin Dunia Kedokteran. di akses tanggal 7 Juni 2008. www.kalbe.co.id/files/cdk/files/10_EfekKesehatanRadiasiNonPengion.pdf/10_EfekKesehatanRadiasiNonPengion.html. p. 34—40.
- Anonimous. 2005. General principles and Astaxanthin. Summary of the Opinion. EFSA-003-060. 2 pp.
- Anonimous. 2006. Yamaha motor launches full-scale life science business. Official announcement data of Yamaha motor. p. 1—6.
- Anonimous. 2008a. Green algae: Physiology, Cellular and Molecular Biology. www.bgu.ac.il/~aflaloc/hilights.html. diakses tanggal 7 Juni 2008.
- Anonimous. 2008b. *Haematococcus pluvialis* Algal Meal Produced With Mera Pharmaceuticals' Proprietary Technology: A Unique Source Of Natural Astaxanthin And Algal Nutrients. www.astafactor.com/tech_reports/tr3004-001.htm. diakses tanggal 7 Juni 2008.
- Borowitzka M.A. and L.J. Borowitzka. 1988. *Microalgae Biotechnology*. Cambridge University Press. 477 pp.
- Campo, J.A.D., M. Garcia-Gonzalez, and M.G. Guerrero. 2007. Outdoor cultivation of mikroalga for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Cysewski, G. 2004. Analytical Methods for Measuring Astaxanthin. *Nutritional Outlook*. 4 pp.
- Fiedler, D., U. Hager, H. Franke, U. Soltmann, and H. Bottcher. 2006. Algae biocers: astaxanthin formation in sol-gel immobilized living mikroalga. *J. of Material Chemistry*. 17: 261—266.
- Kurnia, A. 2006. Lebih Jauh Tentang Bahan Pewarna Ikan (I). www.beritaiptek.com. Di akses tanggal 6 juni 2008.
- Latscha, T. 1989. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture. AQUACOP IFREMER Actes de Colloque*. 9: 319—325.
- Orosa, M., J.F. Valero, C. Herrero, and J. Abalde. 2001. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green mikroalga under N-starvation and high light condition. *Biotechnology letter*. 23(13): 1,079--1,081.
- Tripathi, Usha, R. Sarada, and G.A. Ravishankar. 2001. A culture method for mikroalgal forms using two-tier vessel providing carbon-dioxide environment : studies on growth and carotenoid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17(4): 325—329.