

Produksi dan uji aktivitas enzim *fatty acid photodecarboxylase* dari *Chlorella variabilis* melalui kultivasi pada medium CYT dan KW21

Production and enzyme activity assay of fatty acid photodecarboxylase from Chlorella variabilis through cultivation in CYT and KW21 media

Yora FARAMITHA¹⁾, Sheren Prajna PARAMITA²⁾, Fauziatul FITRIYAH¹⁾, Djoko SANTOSO¹⁾ & Irma KRESNAWATY^{1*)}

¹⁾ Pusat Penelitian Kelapa Sawit Unit Bogor, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128, Indonesia

²⁾ Departemen Ilmu Pangan dan Bioteknologi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia

Diterima tgl 15 Agustus 2022/ Disetujui tgl 10 Oktober 2022

Abstract

Chlorella variabilis is a microalgae that produce fatty acid photodecarboxylase (CvFAP) which can catalyze the decarboxylation of long chain fatty acids into hydrocarbons through a process influenced by blue light. However, CvFAP enzyme content in *C. variabilis* is relatively small and the ability of the enzyme as a biocatalyst needs to be optimized. This study aimed to compare the effect of *C. variabilis* microalgae cultivation medium types: *C* medium, yeast extract, and tryptone (CYT medium) and KW21 medium which is a commercial marine algae culture medium, on microalgae growth and the resulting protein. In addition, the CvFAP enzyme extract from each medium was tested for its ability to convert long-chain fatty acids into pentadecane by optimizing the substrate type, enzyme concentration, and incubation time. *C. variabilis* was cultivated for 2-3 weeks with a ratio of light and dark period of 8:16 (hours/hours). The protein content of *C. variabilis* was determined using the Lowry method. Proteins were extracted physico-chemically and enzyme activity assay were carried out under exposure to blue light. The pentadecane content formed from the enzyme activity assay was measured using GC-MS. The study results showed that microalgae growth and protein content of *C. variabilis* were higher in the CYT medium compare to those in KW21 medium. The protein band appears at 67-68 kDA which is speculated to affect the ternary complex bond between FAP-FAD-FA, which is a determinant of the results in the enzyme activity assay process in accumulating hydrocarbons. Meanwhile, the results of CvFAP enzyme activity assay showed that the CvFAP enzyme extracted from KW21 medium produced higher concentration of pentadecane (2.8 times) than from CYT medium.

[Keywords: Hydrocarbon biosynthesis, CvFAP enzyme, cultivation medium, pentadecane]

Abstrak

Mikroalga *Chlorella variabilis* menghasilkan enzim *fatty acid photodecarboxylase* (CvFAP) yang dapat mengkatalisis proses dekarboksilasi asam lemak rantai panjang menjadi biohidrokarbon melalui proses yang dipengaruhi oleh cahaya biru. Akan tetapi, kandungan enzim CvFAP pada *C. variabilis* relatif rendah dan kemampuan enzim tersebut sebagai biokatalis perlu dioptimasi. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh jenis medium kultivasi mikroalga *C. variabilis*, yaitu: medium C, ekstrak ragi, dan tripton (medium CYT) dan medium KW21 yang merupakan medium kultur alga komersial, terhadap pertumbuhan mikroalga dan protein yang dihasilkan. Selain itu, ekstrak enzim CvFAP dari tiap perlakuan medium diuji kemampuannya dalam mengkonversi asam lemak rantai panjang menjadi pentadekana melalui optimasi jenis substrat, konsentrasi enzim, dan waktu inkubasi. *C. variabilis* dikultivasi selama 2-3 minggu dengan rasio waktu pencahayaan terang dan gelap 8:16 (jam/jam). Protein diekstrak secara fisika kimia dan uji aktivitas enzim dilakukan dalam kondisi diberi paparan cahaya biru. Kandungan pentadekana yang terbentuk dari uji aktivitas enzim diukur menggunakan GC-MS. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pertumbuhan mikroalga dan kandungan protein *C. variabilis* lebih tinggi pada medium CYT dibanding medium KW21. Band protein muncul tipis pada 67-68 kDA yang diduga dapat mempengaruhi ikatan kompleks terner antara FAP-FAD-FA, yang merupakan penentu hasil pada proses uji aktivitas enzim dalam mengakumulasi hidrokarbon. Sementara itu, hasil uji aktivitas enzim

*) Penulis korespondensi: Irma.kresnawaty@yahoo.com

CvFAP menunjukkan bahwa ekstrak enzim *CvFAP* dari perlakuan medium KW21 menghasilkan pentadekana dengan konsentrasi yang lebih tinggi (2,8 kali lipat) dibanding dari medium CYT.

[Kata kunci: Biosintesis hidrokarbon, enzim *CvFAP*, medium kultivasi, pentadekana]

Pendahuluan

Peningkatan jumlah penduduk dan perkembangan teknologi yang pesat di era revolusi industri 4.0, memacu peningkatan konsumsi energi per kapita di seluruh dunia. Berdasarkan data yang tercatat pada BPPT tahun 2019, yaitu 90,7% penyediaan energi primer nasional dalam membantu aktivitas perekonomian didominasi oleh sumber energi fosil (BPPT, 2021). Sementara itu, kebutuhan bahan bakar fosil di Indonesia yang terus meningkat tidak dapat diimbangi dengan kemampuan produksinya yang justru terus menurun. Pada tahun 2017 konsumsi minyak bumi Indonesia mencapai 1,7 juta barel minyak per hari (BPOD), sedangkan produksinya hanya sebesar 803,8 ribu BPOD (SKK Migas, 2019). Oleh karena itu, pengembangan sumber energi yang bersifat terbarukan dan berkelanjutan sangat diperlukan dan perlu diprioritaskan.

Sumber energi terbarukan yang saat ini menjadi sorotan adalah minyak sawit. Minyak sawit telah dimanfaatkan sebagai sumber biodiesel melalui proses transesterifikasi asam lemak minyak sawit menjadi *fatty acid methyl esters* atau dikenal dengan istilah FAME. Selain itu, minyak sawit juga dapat dikonversi menjadi biohidrokarbon. Biohidrokarbon memiliki keunggulan dibanding biodiesel, dimana biohidrokarbon memiliki spesifikasi yang sangat mirip dengan minyak bumi sehingga lebih kompatibel untuk digunakan sebagai bahan bakar pada banyak jenis kendaraan (Liu & Li, 2020). Produksi biohidrokarbon, secara fisika-kimia, berlangsung pada kondisi yang ekstrim (suhu dan tekanan yang sangat tinggi) dengan bantuan katalis (Maluangnont *et al.*, 2017). Tantangan dari pengembangan teknologi ini adalah pemenuhan kebutuhan katalis yang umumnya impor, dampak polutan yang dihasilkan, dan proses konversi yang tidak selektif sehingga produk yang dihasilkan berupa campuran kompleks akibat hasil reaksi samping Kolbe-and Hofer-Moest (Huijbers *et al.*, 2018).

Kelemahan-kelemahan dari penggunaan katalis dalam produksi biohidrokarbon dapat diatasi dengan menggunakan biokatalis. Salah satu enzim yang belakangan ini banyak diteliti adalah *fatty acid decarboxylase* dari mikroalga *Chlorella variabilis* NC64A atau dikenal dengan enzim *CvFAP* (Sorigué *et al.*, 2016, Sorigué *et al.*, 2017, Huijbers *et al.*,

2018, Zhang *et al.*, 2019, Ma *et al.*, 2020). Enzim *CvFAP* mampu mengkonversi asam lemak menjadi alkana/alkena yang diaktifkan oleh cahaya biru. Namun, stabilitas katalitik yang buruk pada *CvFAP* merupakan batasan utama dalam menghasilkan hidrokarbon (pentadekana). Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut dalam mempelajari pengaruh perbedaan parameter kultivasi *C. variabilis* terhadap produksi protein *CvFAP* dan kondisi operasi uji aktivitas enzim terhadap *output* penelitian diperlukan untuk meminimalisir terjadinya stabilitas katalitik yang buruk.

Dalam penelitian ini, parameter kultivasi *C. variabilis* yang diamati adalah jenis media kultivasi, yaitu media CYT dan media KW21. Media CYT merupakan media C yang ditambahkan ekstrak ragi dan tripton dan merupakan jenis media yang disarankan untuk pertumbuhan *C. variabilis* (Provasoli, 1960). Media KW21 merupakan media komersial yang umum digunakan untuk pertumbuhan mikroalga laut, khususnya *Nannochloropsis* sp.. Seperti halnya *C. variabilis*, beberapa jenis *Nannochloropsis* juga mempunyai kemampuan biosintesis hidrokarbon (Sorigué *et al.*, 2016). Oleh karena itu, media KW21 digunakan sebagai perlakuan media pertumbuhan *C. variabilis* untuk diamati pengaruhnya terhadap kuantitas protein yang dihasilkan dan kemampuannya dalam biosintesis hidrokarbon. Penelitian ini difokuskan pada dua hal yaitu kultivasi sel mikroalga dengan perbedaan media kultur (media CYT dan media KW21) serta dilanjutkan uji aktivitas enzim *CvFAP* dengan perbedaan indikator pada konsentrasi protein mikroalga, jenis substrat, dan paparan waktu inkubasi cahaya biru.

Bahan dan Metode

Bahan kimia

Inokulan *Chlorella variabilis* dengan jenis strain NIES-2541 diperoleh dari *National Institute for Environmental Studies* (NIES), *Microbial Culture Collection* (MCC), Tsukuba, Jepang. Medium KW21 merupakan medium kultur mikroalga laut komersial dan diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah. Bahan-bahan penyusun medium CYT berasal dari Sigma-Aldrich. Enzim dan bahan-bahan kimia, seperti: *Lysozyme*, *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PSMF), Tris, natrium klorida (NaCl), *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), Triton, *Bovine Serum Albumin* (BSA), reagen *Folin Ciocalteu*, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), heksana, etanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), protein marker, *coomassie brilliant blue*, asam palmitat, asam laurat, dan asam oleat diperoleh dari Sigma Aldrich. Semua bahan kimia yang digunakan adalah reagen tingkat analitis.

Kultivasi mikroalga

Chlorella variabilis dikultivasi dalam dua jenis medium, yaitu KW21 dan CYT, dengan kondisi fototropik di dalam ruangan pada skala laboratorium. Komposisi medium KW21 terdiri dari 49g L⁻¹ nitrogen (sebagai sumber N), 4 g L⁻¹ asam fosfat (sebagai sumber P), boron, manganese, iron, zinc, cobalt, EDTA, asam amino kompleks, dan campuran vitamin B1, B12, biotin, dan lainnya (www.pacific-trading.co.jp). Takaran penggunaan medium kultur KW21 adalah 1 mL medium KW21 untuk 1 L volum kultur *C. variabilis*. Medium CYT dibuat dengan menambahkan 100 mg ekstrak ragi dan 200 mg tripton ke dalam 100 mL medium C (Ichimura, 1971). Medium C disiapkan dari 15 mg Ca(NO₃)₂·4H₂O, 10 mg KNO₃, 5 mg β-Na₂glycerophosphate·5H₂O, 4 mg MgSO₄·7H₂O, 0,01 µg vitamin B₁₂, 0,01 µg biotin, 1 µg Thiamine HCl, 0,3 mL logam-logam PIV, 50 mg tris (*hydroxymethyl*) *aminomethane*, dan 99,7 mL akuades. Pada awal kultivasi, isolat *C. variabilis* ditambahkan ke medium dengan perbandingan 2:8 (v/v). Isolat dikultivasi selama 2-3 minggu dengan sumber cahaya berasal dari lampu LED putih 21 W. Sisi peninaran diatur di bagian atas dan bawah dengan rasio waktu pencahayaan terang dan gelap 8:16 (jam/jam) yang diatur menggunakan pengatur waktu otomatis. Pengadukan kultur dilakukan sehari sekali dengan cara menggoyangkan Erlenmeyer dengan putaran horizontal untuk memenuhi kebutuhan nutrisi mikroalga secara merata. Pertumbuhan biomassa mikroalga diamati setiap 2 hari sekali hingga hari ke-10 dan pada minggu ke-3 dengan mengukur nilai kerapatan optis (*optical density/OD*) kultur *C. variabilis* menggunakan spektrofotometer UV-Vis (*UV-Visible Multiskan Go Microplate, Thermo Scientific*) pada panjang gelombang 438 nm. Berdasarkan hasil kerapatan optis, perbesaran skala kultur dilakukan secara bertahap setiap 1-2 minggu dengan penambahan medium pada kultur 1:1 (v/v) hingga diperoleh biomassa yang cukup untuk kebutuhan penelitian.

Pemanenan biomassa *C. variabilis* dan pengeringan

Proses pemanenan dilakukan berdasarkan pemisahan berat molekul antara sel mikroalga (pelet) dan medium (supernatan) menggunakan *centrifuge* (*Centrifuge 5804 R, Eppendorf*) yang diatur pada kondisi 8.000 rpm, 25°C selama 5 menit. Pemanenan dilakukan pada 1,5 L kultur mikroalga untuk memperoleh biomassa dalam bentuk *slurry*. Selanjutnya pelet biomassa basah dikumpulkan dalam botol duran, dibekukan pada suhu -20°C selama 24 jam, dan kemudian dikeringkan menggunakan teknik *freeze drying* selama 72 jam pada suhu -50°C. Biomassa mikroalga yang telah terbebas dari kandungan air disimpan di *freezer*

(-20°C) sampai kemudian digunakan untuk ekstraksi protein.

Ekstraksi protein

Proses ekstraksi protein *C. variabilis* dilakukan dengan mengacu metode dari Sorigué *et al.* (2017) dengan beberapa modifikasi pada teknik pemecahan dinding sel dan optimalisasi ekstraksi enzim. Pemecahan dinding sel *C. variabilis* dilakukan dengan menggerus biomassa kering *C. variabilis* menggunakan *mortar* dan *pestle* dengan bantuan nitrogen cair. Selanjutnya, biomassa yang telah digerus dipindahkan ke dalam tabung falcon 50 mL dan ditambahkan 5 mL *buffer* lisis A (20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, dan 1 mM EDTA), 300 ppm enzim *lysozyme*, dan 0,5 mM PSMF. Campuran sampel kemudian disonikasi dengan siklus nyala/mati 30 detik selama 5 menit pada amplitudo 55±5 µm dan suhu 4°C. Selanjutnya, sampel disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm dan suhu 4°C selama 2 x 40 menit dan 1x60 menit untuk memisahkan protein dari komponen yang tidak diperlukan. Bagian supernatan diambil dan dilakukan agitasi semalaman dalam 2,7 mM Triton X 100 pada vial tertutup.

Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein *C. variabilis* dari kedua medium diuji menggunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951) dengan 3 kali ulangan. Sampel ekstrak protein *CvFAP* yang digunakan merupakan sampel dengan pengenceran 100x menggunakan akuades. Deret standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) dibuat dengan menyiapkan larutan BSA dengan konsentrasi 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, dan 180 ppm. Untuk setiap konsentrasi larutan BSA dan sampel ekstrak protein *CvFAP*, diambil masing-masing sebanyak 200 µL dan ditempatkan di *microtube* yang berbeda. Selanjutnya, sebanyak 1 mL pereaksi Lowry ditambahkan ke tiap *microtube* dan diinkubasi selama 10 menit dalam kondisi gelap. Kemudian, sebanyak 100 µL reagen *Folin-Ciocalteu* (1N) ditambahkan dan kembali diinkubasi selama 30 menit hingga warna pada larutan berubah. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (*UV-Visible Multiskan Go Microplate, Thermo Scientific*) pada panjang gelombang 750 nm. Deret standar BSA yang terbentuk digunakan sebagai penentu kadar protein *C. variabilis*.

Identifikasi berat molekul protein

Identifikasi berat molekul protein dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE dengan formulasi *separating gel* 12,5% dan *stacking gel* 4%. Untuk persiapan sampel, sebanyak 15 µL larutan ekstrak protein dicampurkan dengan 5 µL *buffer loading* dalam *microtube*. Larutan sampel dipanaskan pada

suhu 100°C selama 5 menit dan kemudian didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya, sampel protein ekstrak kasar dan *marker* dimasukkan ke dalam tiap sumur gel dengan volume sebanyak 1 µL/sumur. Gel kemudian dielektroforesis pada tegangan listrik 60 V selama 2x125 menit pada suhu ruang. Setelah itu, gel dilepas dari kaca dan direndam semalaman dalam larutan *staining* protein berupa *Coomassie brilliant blue* 0,1%. Terakhir, gel dibilas dengan akuades sambil dipanaskan di dalam *microwave oven* sampai gel bening dan gel siap dianalisa.

Uji aktivitas enzim

Filtrat hasil ekstraksi protein diuji untuk mengidentifikasi dan menguji kemampuan enzim *CvFAP* dalam mengkonversi asam lemak menjadi hidrokarbon. Tahapan yang dilakukan yaitu dengan menyiapkan campuran reaksi dalam botol vial yang terdiri dari: ekstrak protein *Cv*, substrat dalam etanol 10 mM, DMSO 30%, dan 0,1 M Tris HCl pH 8,5. Proses fotoenzim dilakukan dengan menginkubasi sampel sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kisaran kecepatan 550 rpm dan diberi paparan *blue light* dengan intensitas 2264x10 Lux. Suhu reaksi dijaga 30°C dengan cara merendam reaktor fotoenzim dalam air es. Kerja enzim dihentikan melalui penambahan 20 µL NaOH 10 M. Pemisahan fase dilakukan melalui penambahan 1 mL heksana serta dilakukan *sonikasi bath* selama 5 menit untuk mengekstraksi fase hidrokarbon ke dalam fase heksana melalui getaran. Sampel kemudian disentrifus sehingga terbentuk 3 fase, yaitu fase heksana (atas), fase lemak (tengah), dan fase polar (bawah). Proses *pipetting* untuk mengambil fase atas (heksana) dilakukan untuk selanjutnya dianalisis menggunakan GC-FID.

Pada uji aktivitas enzim, optimasi proses dilakukan secara bertahap: 1) waktu inkubasi (0, 1,3, dan 5 jam); 2) jenis substrat (asam palmitat, asam oleat, dan asam laurat); 3) konsentrasi protein (0, 1x, 1,5x, dan 2,5 x). Pada optimasi waktu inkubasi, asam palmitat digunakan sebagai substrat dengan konsentrasi protein 1x. Selanjutnya, waktu reaksi terbaik yang diperoleh digunakan untuk optimasi jenis substrat. Terakhir, pada optimasi konsentrasi protein, asam palmitat digunakan sebagai substrat dan proses inkubasi menggunakan waktu reaksi terbaik.

Identifikasi konversi pentadekana

Identifikasi menggunakan instrument kromatografi gas (GC) *Agilent 7890A with flame ionize detector* (FID). Kolom yang digunakan adalah *Agilent VF-17*, panjang 30 meter, suhu kolom 60-350°C, laju kolom 1 mL permenit, suhu *detector* 250°C, gas pembawa *helium*, laju aliran 34 mL/menit. Larutan berupa standar kontrol

(heksadekana) dan sampel pentadekana hasil konversi aktivitas enzim *CvFAP* dianalisis dengan menginjektikan 1 µL ke dalam GC. Pendeteksian molekul target oleh detektor FID selama 26 menit, menghasilkan kromatogram berupa *peak* yang ditampilkan pada *software* komputer.

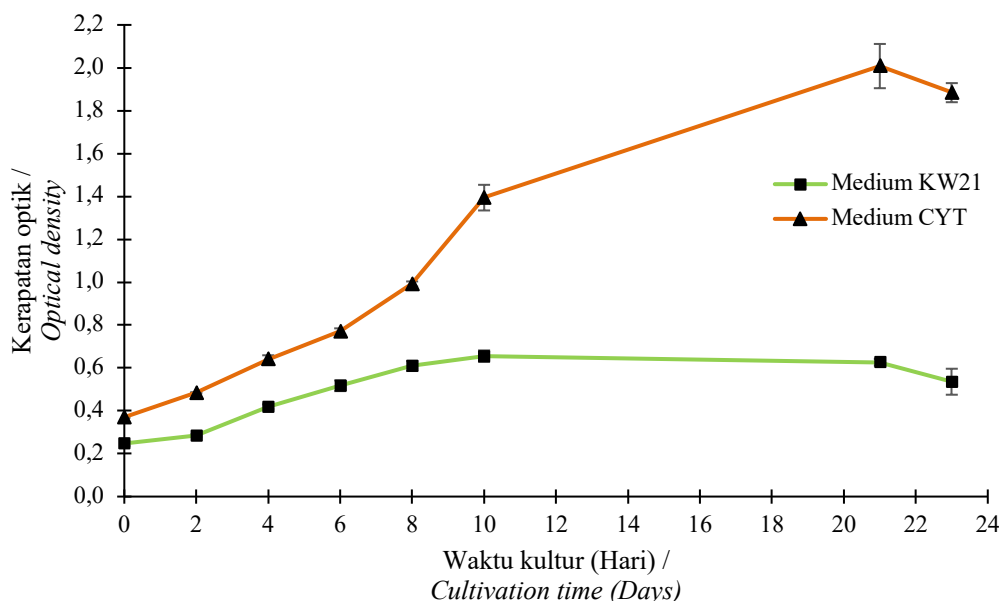
Hasil dan Pembahasan

Kurva pertumbuhan *C. variabilis*

Kurva pertumbuhan *C. variabilis* disajikan pada Gambar 1. Hasil data pengukuran absorbansi pada hari ke-0 (H_0) didapatkan rata-rata OD di dalam medium KW21 sebesar 0,248 dan medium CYT sebesar 0,370. Tahap awal ini disebut dengan fase lag, yaitu proses mikroalga beradaptasi di dalam medium baru. Setelah memperoleh kondisi ideal, sel mikroalga mengalami pertumbuhan secara cepat atau yang disebut dengan fase eksponensial (Barahoei, 2021). Hal ini ditandai dengan pembelahan sel secara signifikan yang berlangsung dari H_{2-10} masa kultur, yaitu medium KW21 $H_2=0,284$; $H_4=0,419$; $H_6=0,517$; $H_8=0,609$; dan $H_{10}=0,655$ serta medium CYT $H_2=0,484$; $H_4=0,641$; $H_6=0,770$; $H_8=0,991$; dan $H_{10}=1,394$. Pada H_{21} , terjadi sedikit penurunan jumlah sel *C. variabilis* di medium KW21 yang ditunjukkan dengan nilai OD sebesar 0,627. Hal ini menandakan bahwa, sudah berhentinya masa pertumbuhan mikroalga di rentang waktu H_{10-21} . Menurut Abdulla *et al.*, (2019) fase tersebut dinamakan fase stasioner, yang terjadi akibat menipisnya nutrisi dalam medium. Hal tersebut dapat memengaruhi kemampuan pembelahan sel dan perlahan-lahan mati, karena medium tidak sanggup lagi memberikan kondisi tumbuh bagi kultur. Sebaliknya, pada H_{10-21} di medium CYT masih terjadi fase eksponensial, yang ditunjukkan dengan terjadinya kenaikan nilai OD mencapai 2,008 dan dilanjutkan dengan fase stasioner. Selanjutnya, fase kematian pada H_{23} diindikasikan oleh penurunan jumlah sel yang cepat melalui pengecekan OD di medium KW21 menjadi 0,536 dan di medium CYT menjadi 1,884. Kematian sel mikroalga disebabkan oleh kandungan nutrisi dalam medium semakin terbatas serta perubahan kualitas air ke arah yang buruk akibat dari kemampuan metabolisme mikroalga yang semakin menurun (Halima *et al.*, 2020).

Kadar protein *C. variabilis*

Berdasarkan data kadar protein *C. variabilis* pada Tabel 1, rata-rata kadar protein *C. variabilis* yang dikultivasi di medium CYT lebih tinggi dibandingkan yang dikultivasi di medium KW21 (0,877% : 0,397%). Tinggi rendahnya kadar protein yang terbentuk antar medium disebabkan oleh



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Chlorella variabilis*
 Figure 1. *Chlorella variabilis* growth curve

Tabel 1. Kadar Protein *C. variabilis*
 Table 1. Protein content of *C. variabilis*

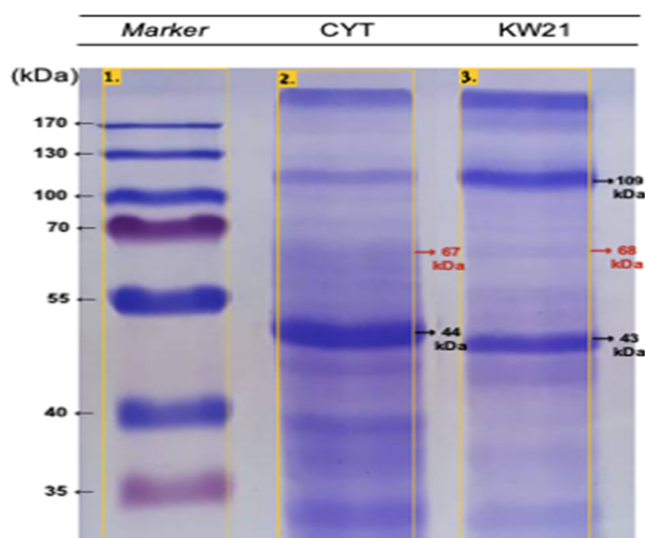
| Medium pertumbuhan Growth medium | Kadar protein (%) Protein content (%) |
|-------------------------------------|------------------------------------------|
| KW21 | 0,397 ± 0,022 |
| CYT | 0,877 ± 0,018 |

berbagai parameter lingkungan seperti cahaya dan suplai nutrisi. Parameter lingkungan seperti proses budidaya *C. variabilis* medium KW21 menggunakan fotobioreaktor sistem terbuka, dimana mikroalga dikultivasi pada kolam buatan berbentuk tabung. Sedangkan proses budidaya *C. variabilis* medium CYT dilakukan pada fotobioreaktor sistem tertutup, dimana mikroalga dikultivasi secara aseptis pada *glassware*. Secara tidak langsung, kondisi fisik kultur pada medium CYT memberikan beberapa keuntungan seperti meminimalisir kontaminasi, kemudahan proses agitasi dan paparan cahaya yang lebih merata pada kultur *C. Variabilis*. Hal tersebut juga didukung oleh Gultom (2022), yang menyatakan bahwa produktivitas mikroalga pada sistem tertutup

menghasilkan jumlah sel yang lebih tinggi dengan pertumbuhan mudah dikontrol apabila dibandingkan sistem terbuka. Perbedaan parameter tersebut, memengaruhi aktivitas fotosintesis, produktivitas sel serta komposisi fisiologis dan biokimia mikroalga.

Berat molekul protein *C. variabilis*

Hasil pemisahan *band* yang terbentuk memiliki rentang rata-rata BM 43-44 dan 109 (Gambar 2), dengan jenis praduga protein seperti yang disajikan pada Tabel 2. Protein psbC yang terletak di membran tilakoid merupakan protein pengikat pigmen yang berfungsi menangkap energi matahari dan mengirimkannya dalam bentuk energi eksitasi ke kompleks inti pada fotosistem II (Luciński & Jackowski, 2006). *Band* tebal yang terbentuk pada BM 109 merupakan protein 6ZH7, ligan FAD. Dalam proses dekarboksilasi, protein ini sangat penting dalam menunjang siklus katalitik, karena di dalam ligan terdapat atom donor yaitu atom yang memiliki pasangan elektron bebas guna membentuk ikatan. Penelitian yang dilakukan oleh Sorigue *et al.* (2017) menduga berat molekul target enzim *CvFAP* terletak pada rentang 69 kDa. Dalam penelitian ini, ditemukannya *band* tipis pada 67-68 kDa yang diduga sebagai target protein *CvFAP*.



Gambar 2. Hasil destaining gel SDS-PAGE dan praduga kadar protein *Chlorella variabilis*
 Figure 2. SDS-PAGE destaining gel results and presumption of *Chlorella variabilis* protein level

Tabel 2. Praduga kadar protein *C. variabilis*

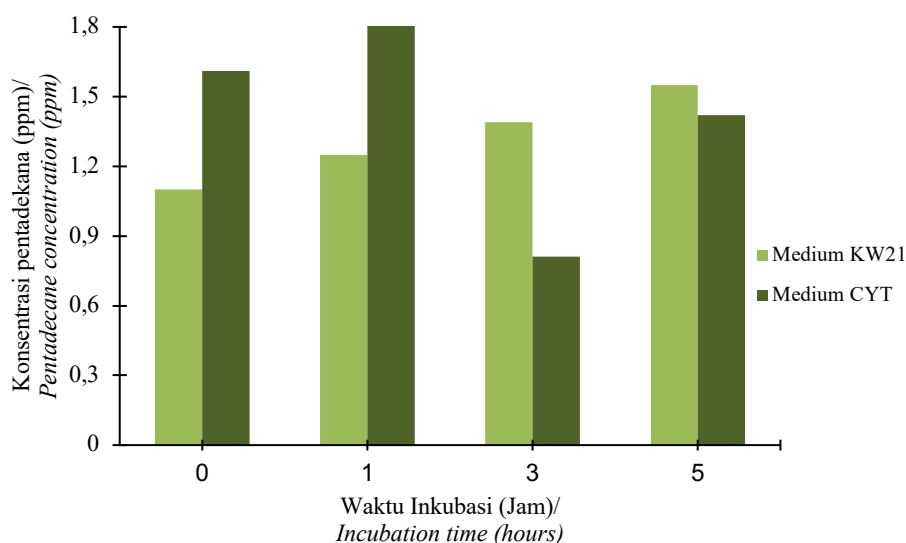
Table 2. Presumption of *C. variabilis* protein content

| Berat molekul (kDa) Molecular weight (kDa) | Protein Protein | Fungsi Function | Sumber literatur Reference |
|-----------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 43 & 44 | psbC; CHL00035 | Produk protein fotosistem II | NCBI (Kuroda <i>et al.</i> , 2007; Luciński & Jackowski, 2006) |
| 109 | 6ZH7 | Ligan FAD & STE, dalam memberikan donor elektron untuk aktivitas katalitik | RCSB Protein Data Bank (Hadjidemetriou <i>et al.</i> , 2021) |

Analisis GC-FID

Hasil konsentrasi pentadekana yang dihasilkan dari variasi waktu inkubasi disajikan pada Gambar 3 dimana *C. variabilis* medium KW21 mengalami peningkatan yang linear jam ke 0 hingga 5 jam proses uji aktivasi enzim. Konsentrasi pentadekana yang dihasilkan berturut-turut adalah 1,10; 1,25; 1,39; dan 1,55 ppm serta nilai konversi yaitu 0,52; 0,59; 0,65; dan 0,73%. Sedangkan konsentrasi pentadekana yang diperoleh pada *C. variabilis* medium CYT mengalami hasil yang fluktuatif. Konsentrasi pentadekana berturut-turut adalah 1,61; 1,84; 0,81; dan 1,42 ppm serta nilai konversi yaitu 0,76; 0,87; 0,38; dan 0,67%. Secara keseluruhan,

reaksi aktivasi enzim *CvFAP* bergantung pada iluminasi cahaya biru untuk meningkatkan produksi pentadekana. Menurut penelitian López-Vidal *et al.* (2021) waktu yang terbaik untuk mengkonversi ($\geq 90\%$) substrat adalah 14 jam, dimana seperti yang didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Huijbers *et al.*, (2018) iluminasi cahaya biru selama 14 jam melalui penggunaan substrat asam palmitat 27,7 mM mampu dikonversi menjadi 96%. Pengadaptasian *CvFAP* yang bergantung cahaya biru memerlukan perhatian lebih, karena apabila enzim terpapar cahaya biru secara terus menerus dapat menurunkan viabilitas sel dan menyebabkan fotoinaktivasi (Amer *et al.*, 2020a).



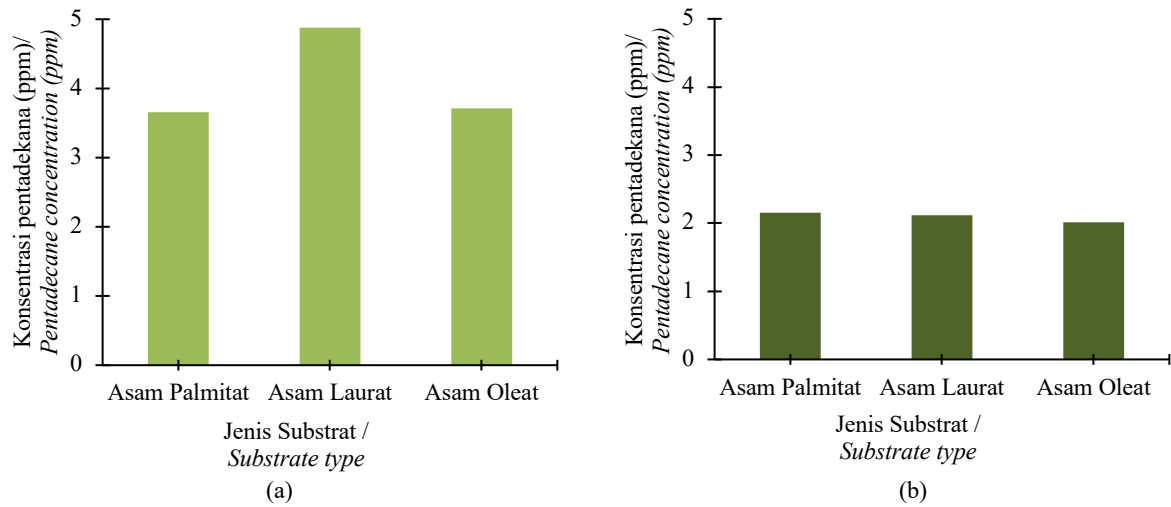
Gambar 3. Konsentrasi pentadekana pada variasi waktu inkubasi. Reaksi pada uji aktivitas enzim menggunakan konsentrasi protein 1x dan substrat asam palmitat, dengan suhu reaksi dijaga 30°C pada inkubasi cahaya biru 1692x10 Lux dan kecepatan pengadukan 300 rpm.

Figure 3. Pentadecane concentration at the variation of incubation time. The reaction in the enzyme activity assay used 1x protein concentration and palmitic acid substrate, with reaction temperature maintained at 30°C, blue light incubation at 1692x10 Lux, and stirring speed of 300 rpm.

Asam palmitat, asam oleat, dan asam laurat merupakan beberapa jenis asam lemak penyusun minyak sawit (GAPKI, 2016). Konsentrasi pentadekana dari hasil konversi jenis substrat asam palmitat, asam oleat, dan asam laurat di medium KW21 berturut-turut adalah 3,66; 4,88; dan 3,71 ppm serta nilai konversi yaitu 1,73; 2,30; dan 1,75% (Gambar 4). Sedangkan konsentrasi pentadekana yang dikonversi oleh *C. variabilis* medium CYT pada asam palmitat (2,15 ppm), asam oleat (2,12 ppm), dan asam laurat (2,01 ppm) dengan nilai konversi berturut-turut yaitu 1,01; 1; dan 0,95%. Sejah ini hasil variasi substrat yang didapatkan sudah sesuai, dalam menghasilkan peningkatan pentadekana dari kondisi yang dioptimasi pada variasi sebelumnya. Substrat asam oleat dan asam palmitat secara keseluruhan dapat mengkonversi pentadekana yang tinggi apabila dibandingkan dengan asam laurat. Keberadaan substrat diketahui dapat melindungi *CvFAP* dari fotoinaktivasi karena rute pada jalur yang bersaing untuk donor elektron ke flavin menjadi tersedia, sehingga situs aktif jenuh dengan substrat FFA dan flavin tidak mengarah pada pembentukan radikal organik. Namun pengikatan substrat berupa asam laurat menyebabkan oligomerisasi untuk membentuk heksamerik dari *CvFAP* (Lakavath *et al.*, 2020). Aktivitas asam karboksilat rantai menengah berupa C₁₂ menghasilkan hasil konversi yang rendah, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Amer *et al.* (2020b). *CvFAP* menunjukkan preferensi aktivitas

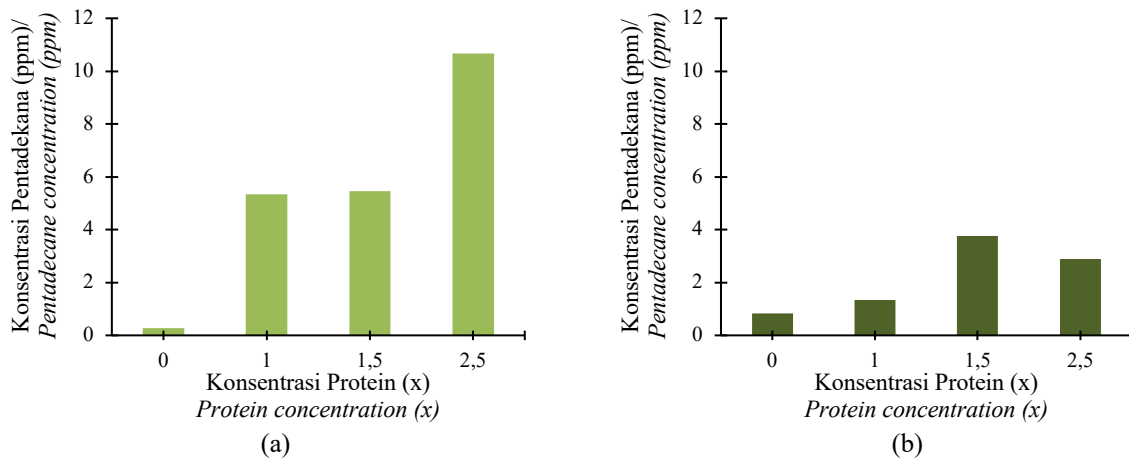
katalitik menurun secara dramatis dengan asam karboksilat rantai yang lebih pendek dari C₁₆-C₁₇.

Hasil konsentrasi pentadekana yang dikonversi oleh konsentrasi protein *C. variabilis* (Gambar 5) medium KW21 mengalami peningkatan yang signifikan, khususnya pada protein 2,5x. Hasil keseluruhan konsentrasi pentadekana pada protein 0x hingga 2,5x berturut-turut adalah 0,28; 5,34; 5,47; dan 10,67 ppm serta kadar 0,13; 2,51; 2,57; dan 5,03%. Konsentrasi pentadekana yang dikonversi oleh *C. variabilis* medium CYT mengalami peningkatan yang fluktuatif. Peningkatan konsentrasi mulai terjadi dari sampel yang tidak memiliki protein *CvFAP* hingga konsentrasi 1,5x, kemudian mengalami penurunan pada protein 2,5x. Penelitian yang dilakukan Duong *et al.* (2021) mengungkapkan konsentrasi enzim yang terlalu tinggi ini dapat disebabkan dari keterbatasan penggunaan foton sehingga membatasi laju peningkatan konversi substrat. Pada penelitian ini, konversi substrat dari konsentrasi protein *C. variabilis* medium CYT 0x hingga 2,5x yang diperoleh secara berturut-turut yaitu 0,84; 1,33; 3,76; dan 2,89 ppm serta kadar 0,39; 0,62; 1,77; dan 1,36%. Seperti variasi sebelumnya, didapatkan kondisi yang semakin optimum pada intensitas cahaya yang sama. Hal ini ditunjukkan melalui peningkatan hingga mencapai 2x hasil tertinggi di variasi substrat. Hasil akhir produk yang terbentuk mengalami peningkatan secara linier dengan tingginya konsentrasi enzim (Duong *et al.*, 2021).



Gambar 4. Konsentrasi pentadekana hasil uji aktivitas enzim dengan perlakuan variasi substrat. (a) menggunakan ekstrak protein *C. variabilis* dari medium KW21 dengan waktu inkubasi 5 jam, dan (b) menggunakan ekstrak protein *C. variabilis* dari medium CYT dengan waktu inkubasi 1 jam. Reaksi pada uji aktivitas enzim menggunakan konsentrasi protein 1x, suhu reaksi dijaga 30°C, paparan cahaya biru dengan intensitas 2264x10 Lux, dan kecepatan pengadukan 550 rpm.

Figure 4. The pentadecane concentration from the enzyme activity assay at various substrates. (a) using *C. variabilis* protein extract from KW21 medium with 5 hours incubation, and (b) using *C. variabilis* protein extract from CYT medium with 1 hour incubation. The reaction in the enzyme activity assay used 1x protein concentration, the reaction temperature was maintained at 30°C, exposure to blue light with an intensity of 2264x10 Lux, and a stirring speed of 550 rpm.



Gambar 5. Konsentrasi pentadekana hasil uji aktivitas enzim dengan perlakuan variasi konsentrasi protein. (a) menggunakan ekstrak protein *C. variabilis* dari medium KW21 dengan waktu inkubasi 5 jam, dan (b) menggunakan ekstrak protein *C. variabilis* dari medium CYT dengan waktu inkubasi 1 jam. Reaksi pada uji aktivitas enzim menggunakan substrat asam palmitat, suhu reaksi dijaga 30°C, paparan cahaya biru dengan intensitas 2264x10 Lux, dan kecepatan pengadukan 550 rpm.

Figure 5. The pentadecane concentration from the enzyme activity assay at various protein concentrations. (a) using *C. variabilis* protein extract from KW21 medium with 5 hours incubation, and (b) using *C. variabilis* protein extract from CYT medium with 1 hour incubation. The reaction in the enzyme activity assay used palmitic acid as the substrate, the reaction temperature was maintained at 30°C, exposure to blue light with an intensity of 2264x10 Lux, and a stirring speed of 550 rpm.

Kesimpulan

Pertumbuhan mikroalga *C. variabilis* dan konsentrasi protein tertinggi diperoleh dari penggunaan medium CYT. Akan tetapi konsentrasi pentadekana tertinggi diperoleh dari penggunaan medium KW21 dengan nilai konversi 5%, berdasarkan hasil uji aktivitas enzim *fatty acid photodecarboxylase* dari ekstrak biomassa *C. variabilis*. Kondisi ini dicapai dengan menggunakan konsentrasi protein 2,5 kali, substrat asam palmitat, suhu reaksi dijaga 30°C, waktu inkubasi 5 jam, dan intensitas cahaya biru 2264x10 Lux.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini terlaksana atas dukungan biaya dari Badan Pengelola Dana Perkebunan Kelapa Sawit (BPDPKS) periode tahun 2020-2022 Nomor PRJ-14/DPKS/2020. Kami juga ucapkan terima kasih kepada Saudari Ayu Rahayu Saraswati dan Indriana Putri Damaiyanti yang telah membantu pelaksanaan kegiatan penelitian.

Daftar Pustaka

- Abdulla R, T King, S Jambo & A Faik (2019). Microalgae *Chlorella* as a sustainable feedstock for bioethanol production. *In Green Engineering for Campus Sustainability*. Singapore, Springer. P. 81-103.
- Amer M, H Toogood & NS Scrutton (2020b). Engineering nature for gaseous hydrocarbon production. *Microb Cell Factories* 19(1), 1-14.
- Amer M, R Hoeven, P Kelly, M Faulkner, MH Smith, HS Toogood & NS Scrutton (2020a). Renewable and tuneable bio-LPG blends derived from amino acids. *Biotechnol. biofuels* 13(1), 1-15.
- Barahoei M, M Hatamipour & S Afsharzadeh (2021). Direct brackish water desalination using *Chlorella vulgaris* microalgae. *Process Saf and Environ Prot* 148, 237-248.
- BPPT (2021). *Outlook Energi Indonesia 2021 Perspektif Teknologi Energi Indonesia: Tenaga Surya untuk Penyediaan Energi Charging Station*. Jakarta: Pusat Pengkajian Industri Proses dan Energi (PPIPE).
- Duong HT, Y Wu, A Sutor, BO Burek, F Hollmann & JZ Bloh (2021). Intensification of photobiocatalytic decarboxylation of fatty acids for the production of biodiesel. *ChemSusChem* 14(4), 1053-1056.
- Gapki (2016). *Mengenal Minyak Sawit Dengan Beberapa Karakter Unggulnya*. Retrieved from <http://gapki.id/wp-content/uploads/2016/04/Buku-Mengenal-Minyak-Sawit-Dengan-Beberapa-Karakter-Unggulnya-GAPKI.pdf>
- Gultom SO (2018). Mikroalga: Sumber energi terbarukan masa depan. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology* 11(1), 95-103.
- Hadjidemetriou K, N Coquelle, M Weik, I Schlichting, TRM Barends, JP Colletier (2021). *Crystal structure of fatty acid photodecarboxylase in the dark state determined by serial femtosecond crystallography at room temperature*. April 14, 2021. Diakses dari <https://www.rcsb.org/structure/6ZH7> [20 Maret, 2022]
- Halima A, N Nursyirwani & H Ambarsar (2020). Potential microalga *Chlorella vulgaris* for bioremediation of heavy metal Pb. *Asian Journal of Aquatic Sciences* 2(3), 224-234.
- Huijbers MM, W Zhang, F Tonin & F Hollmann (2018). Light-driven enzymatic decarboxylation of fatty acids. *Angew Chem Int* 57(41), 13648-13651.
- Ichimura T (1971). Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. *In Proceedings of the 7th international seaweed symposium, 1971* (pp. 208-214). University of Tokyo Press.
- Kuroda H, H Suzuki, T Kusumegi, T Hirose, Y Yukawa & M Sugiura (2007). Translation of psbC mRNAs starts from the downstream GUG, not the upstream AUG, and requires the extended Shine-Dalgarno sequence in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 48(9), 1374-1378.
- Lakavath B, TM Hedison, DJ Heyes, M Shanmugam, M Sakuma, R Hoeven, V Tilakaratna & NS Scrutton (2020). Radical-based photoinactivation of fatty acid photodecarboxylases. *Analyt biochem* 600, 113749.
- Liu K & S Li (2020). Biosynthesis of fatty acid-derived hydrocarbons: perspectives on enzymology and enzyme engineering. *Current opinion in biotechnology* 62, 7-14.
- López-Vidal MG, G Gamboa, G Oksdath-Mansilla & FR Bisogno (2021). Photobiocatalysis. *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, 317-359.
- Lowry OH (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Luciński R & G Jackowski (2006). The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochim Pol* 53(4), 693-708.
- Ma Y, X Zhang, W Zhang, P Li, Y Li, F Hollmann & Y Wang (2020). Photoenzymatic production of next generation biofuels from natural

- triglycerides combining a hydrolase and a photodecarboxylase. *Chem Photo Chem* 4(1), 39-44.
- Maluangnont T, C Dararat, T Kulrat, S Soontontaweesub, T Anothaiwalaikul, P Bunprechawong, R Chandra, J Kanchanawarin, P Kidkhunthod & T Sooknoi (2017). Production of liquid fuel from palmitic acid over nanocrystalline CeO₂-based catalysts with minimal use of H₂. *Catalysis Communications* 102, 123-126.
- Provasoli L (1960). Artificial media for fresh water algae: problems and suggestions. *The ecology of algae* 2, 84-96.
- SKK Migas (2019). Langkah Strategis Meningkatkan produksi minyak bumi melalui pengelolaan waduk. *BUMI*, 6-7.
- Sorigué D, B Légeret, S Cuiné, P Morales, B Mirabella, G Guédency, Y Li-Beisson, R Jetter, G Peltier & F Beisson (2016). Microalgae synthesize hydrocarbons from long-chain fatty acids via a light-dependent pathway. *Plant Physiol* 171(4), 2393-2405.
- Sorigué D, B Légeret, S Cuiné, S Blangy, S Moulin, E Billon, P Richaud, S Brugière, Y Couté, D Nurizzo, P Müller, K Brettel, D Pignol, P Arnoux, Y Li-Beisson, G Peltier & F Beisson (2017). An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons. *Science* 357(6354), 903-907.
- Zhang W, M Ma, MM Huijbers, GA Filonenko, EA Pidko, M van Schie, S de Boer, BO Burek, JZ Bloh, WJH van Berkel, WA Smith & F Hollmann (2019). Hydrocarbon synthesis via photoenzymatic decarboxylation of carboxylic acids. *J Am Chem Soc* 141(7), 3116-3120.