

TESIS

**STUDI ENZIM KARAGENASE PADA BAKTERI YANG BERSIMBIOSIS
DENGAN RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii***

Disusun dan diajukan oleh

**ANDI ALYA YUSRIYYAH
L012181001**



**PROGRAM MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**STUDY OF CARRAGEENASE ENZYME IN ALGAE *Kappaphycus alvarezii*
SYMBIOTIC BACTERIA**

**STUDI ENZIM KARAGENASE PADA BAKTERI YANG BERSIMBIOSIS
DENGAN RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii***

**ANDI ALYA YUSRIYYAH
L012181001**

THESIS

Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of
Science (M.Si)

**MASTER PROGRAM IN FISHERIES SCIENCE
FACULTY OF MARINE SCIENCE AND FISHERIES
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR**

2021

LEMBAR PENGESAHAN

STUDI ENZIM KARAGENASE PADA BAKTERI YANG BERSIMBIOSIS DENGAN RUMPUT LAUT *Kappahycus alvarezii*

Disusun dan diajukan oleh

ANDI ALYA YUSRIYYAH

L012181001

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 11 Februari 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D
NIP. 197212282006042001

Pembimbing Pendamping,



Dr. Ir. Gunarto Latama, M.Sc
NIP. 196292241988111001

Mengetahui,

Ketua Program Studi
S2 Ilmu Perikanan



Prof. Dr. Ir. Zainuddin., M.Si
NIP. 196407211991031001

Dekan Fakultas
Ilmu Kelautan dan Perikanan



Dr. St. Aisiah Farhum, M.Si.
NIP. 1969060519932002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Andi Alya Yusriyyah

NIM : L012181001

Program Studi : S2 Ilmu Perikanan

Fakultas : Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

Studi Enzim Karagenase pada Bakteri yang Bersimbiosis dengan Rumput Laut
Kappahyccus alvarezii

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar,2021



Andi Alya Yusriyyah
NIM. L012181001

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **Studi Enzim Karagenase pada Bakteri yang Bersimbiosis dengan Rumput Laut *Kappahycus alvarezii*** sebagai syarat untuk memperoleh gelar magister pada program studi Ilmu Perikanan, Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Awal hingga akhir menjalani kegiatan penelitian hingga penyusunan tesis tentu tak luput dari peranan berbagai pihak yang telah memberikan banyak bantuan, masukan, arahan maupun bimbingan yang sangat berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D selaku Ketua Komisi Penasihat dan Dr. Ir. Gunarto Latama, M.Sc selaku anggota Komisi Penasihat atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan, mulai dari penyusunan proposal hingga selesainya penulisan tesis ini.
2. Tim penilai/ penguji Prof. Dr. Ir. Rajuddin Syamsuddin, M.Sc., Prof. Dr. Ir. Haryati, M.Si dan Dr. Marlina Achmad, S.Pi., M.Si yang telah banyak memberikan masukan dan saran untuk penyusunan tesis ini.
3. Prof. Dr. Ir. Zainuddin, M.Si selaku ketua program studi Magister Ilmu Perikanan yang telah memberikan arahan.
4. Prof. Kouhei Ohnishi selaku supervisor selama menjalani program SUIJI Jp-Ms atas bantuan, bimbingan dan arahan yang telah diberikan selama melaksanakan penelitian di *Research Institute of Molecular Genetics*, Jepang.
5. Kedua orang tua penulis Ayahanda Syarifuddin Tonnek dan Ibunda Almh. Andi Faridawati atas segala dukungan moril maupun materil selama ini kepada penulis.
6. Teman-teman Program Studi Ilmu Perikanan angkatan 201801, teman-teman Program SUIJI 2019 dan *Research Institute of Molecular Genetics*, Jepang, serta seluruh pihak lain yang telah banyak membantu penulis.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf bila ada kesalahan dalam penulisan tesis ini. Kritik dan saran penulis hargai demi perbaikan penulis di masa yang akan datang. Besar harapan penulis, semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan bernilai positif bagi semua pihak yang membutuhkan.

Terima kasih

Penulis,
Andi Alya Yusriyyah

ABSTRAK

ANDI ALYA YUSRIYYAH. *Studi Enzim Karagenase pada Bakteri yang Bersimbiosis dengan Rumput Laut *Kappahycus alvarezii** (dibimbing oleh **Asmi Citra Malina** dan **Gunarto Latama**)

Kappahycus alvarezii merupakan salah satu jenis alga merah yang memiliki kandungan karagenan yang tinggi. Karagenan biasanya dimanfaatkan sebagai bahan baku pada industri makanan, obat-obatan, kosmetik dan pupuk organik. Namun, terdapat permasalahan pada pemanfaatan karagenan di bidang industri, yaitu rendahnya daya larut yang disebabkan oleh berat molekul yang besar. Salah satu metode pemecahan molekul yang dapat digunakan adalah mendegradasi karagenan dengan bantuan proses enzimatik, yaitu enzim karagenase. Enzim karagenase dapat diperoleh secara alami dari bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut. Hingga saat ini, penelitian terkait enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii* masih sangat kurang. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii*. Salah satu metode pemecahan molekul yang dapat digunakan adalah mendegradasi karagenan dengan bantuan proses enzimatik, yaitu enzim karagenase. Studi dilakukan dengan mengidentifikasi beberapa hal, yaitu jenis bakteri melalui sekuensing 16S rRNA, aktivitas enzim menggunakan uji DNS, berat molekul menggunakan uji SDS-PAGE, dan jenis enzim melalui pengurutan draf genom menggunakan NGS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii* adalah *Labrenzia* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio* sp., *Celeribacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Phaeobacter* sp. dan *Cobetia* sp. Pada pengujian DNS yang menggunakan substrat κ -karagenan dan λ -karagenan, ditemukan adanya aktivitas enzim pada substrat tersebut pada satu jenis bakteri yaitu bakteri *Alteromonas* sp. dengan berat molekul berkisar pada 47,6 kDa. Pada pengurutan draf genom, ditemukan hanya satu jenis enzim karagenase yang terdapat pada bakteri *Alteromonas* sp., yaitu ι -karagenase. Aktivitas enzim κ - dan λ -karagenase yang diperoleh dari pengujian DNS diduga merupakan suatu novelti dalam bidang penelitian ini.

ABSTRACT

ANDI ALYA YUSRIYYAH. *Study of Carrageenase Enzyme in Algae Kappahycus alvarezii Symbiotic Bacteria* (Supervised by **Asmi Citra Malina** and **Gunarto Latama**).

Kappahycus alvarezii is type of the red algae contained high carrageenan. Carrageenan is used as raw material in the food, pharmacy, cosmetic and organic fertilizer industries. However, the problem of carrageenan utilization in industrial is low solubility due to its large molecular weight. One of the molecular breakdown methods that can be used in degrading carrageenan by enzymatic process, namely the carrageenase enzyme. Carrageenase enzyme is obtained naturally in *K. alvarezii* symbiotic bacteria. Thus far, the research related to carrageenase enzyme in algae *K. alvarezii* symbiotic bacteria is still lacking. The study aims to identify carrageenase enzyme in algae *K. alvarezii* symbiotic-bacteria. The study was conducted by identifying several methods, including the following: bacteria using 16S rRNA sequencing, enzyme activity using DNS method, molecular weight using SDS-PAGE method and types of enzymes using draft genome sequencing. The results showed that *K. alvarezii* symbiotic-bacteria was *Labrenzia* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio* sp., *Celeribacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Phaeobacter* sp. and *Cobetia* sp. In the DNS assay using κ -carrageenan dan λ -carrageenan as a substrate, this study was found an enzyme activity on that substrate in only one type of bacteria, namely *Alteromonas* sp. and the molecular weight was around 47.6 kDa. In the draft genome sequencing, only one type of caragenase enzyme was found in *Alteromonas* sp., namely ι -caragenase. The activity of the κ - and λ -caragenase enzymes obtained from DNS assay is thought to be a novelty in this field of research

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian	3
E. Batasan Penelitian	3
TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Biologi dan Klasifikasi Rumput Laut <i>Kappaphycus alvarezii</i>	4
B. Karagenan	5
C. Enzim Karagenase	7
D. Degradasi Karagenan	7
E. Teknik DNS (dinitrosalicylic acid)	8
F. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)	9
G. Next-generation sequencing (NGS)	10
H. Kerangka Pikir Penelitian	12
I. Hipotesis	13
METODE PENELITIAN	14
A. Waktu dan Tempat	14
B. Alat dan Bahan	14
1. Alat penelitian	14
2. Bahan penelitian	14
C. Prosedur Penelitian	15
1. Isolasi bakteri pada rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i>	16

2.	Identifikasi jenis bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i>	16
a.	Isolasi bakteri pada media agar <i>artificial seawater</i>	16
b.	Analisis zona bening <i>congo red</i>	16
c.	Isolasi bakteri pada media agar <i>marine broth</i>	17
d.	Isolasi DNA bakteri.....	17
e.	Purifikasi DNA bakteri.....	17
f.	Identifikasi bakteri pendegradasi karagenan dengan metode sekuensing 16S rRNA.....	18
3.	Identifikasi aktivitas enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i> Uji <i>Dinitrosalicylic acid</i> (DNS).....	18
4.	Identifikasi berat molekul enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i> melalui Uji <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE).....	20
5.	Identifikasi jenis enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i> melalui Pengurutan draf genom dengan metode <i>Next-generation Sequencing</i> (NGS).....	20
D.	Parameter Penelitian.....	21
E.	Analisis Data.....	21
HASIL	22
A.	Identifikasi jenis bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappahycus alvarezii</i> melalui sekuensing 16S rRNA.....	22
B.	Identifikasi aktivitas enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappahycus alvarezii</i> melalui Uji <i>Dinitrosalicylic acid</i> (DNS).....	24
C.	Identifikasi berat molekul enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappahycus alvarezii</i> menggunakan uji <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE).....	27
D.	Identifikasi jenis enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappahycus alvarezii</i> menggunakan pengurutan draf genom dengan metode <i>Next-generation Sequencing</i> (NGS).....	28
PEMBAHASAN	30
A.	Analisis jenis bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappahycus alvarezii</i>	30
B.	Analisis enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappahycus alvarezii</i>	32
KESIMPULAN DAN SARAN	36
A.	Kesimpulan.....	36
B.	Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil pengukuran absorbansi pada hasil purifikasi DNA bakteri	23
Tabel 2. Bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>K. alvarezii</i>	23
Tabel 3. Aktivitas enzim pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i>	24
Tabel 4. Konsentrasi DNA isolasi genom DNA pada <i>A. tagae</i> (KC3) dan <i>A. macleodii</i> (KC14)	29
Tabel 5. Anotasi gen ι -karagenase pada <i>A. tagae</i> (KC3) dan <i>A. macleodii</i> (KC14)	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Rumput laut <i>K. alvarezii</i> (Dokumentasi pribadi).....	5
Gambar 2. Varietas komersial <i>Kappahycus</i> spp. yang umumnya dibudidayakan di seluruh dunia	5
Gambar 3. Struktur karagenan (κ -karagenan, λ -karagenan dan ι -karagenan).....	6
Gambar 4. Pemecahan ikatan polimer pada karagenan ditunjukkan oleh tanda panah	7
Gambar 5. Reduksi gula yang disebabkan oleh metode DNS.....	8
Gambar 6. Ilustrasi perubahan protein akibat pengaplikasian SDS.....	9
Gambar 7. Ilustrasi SDS-PAGE	10
Gambar 8. Alur kerja NGS	11
Gambar 9. Hasil elektroforesis produk PCR.....	22
Gambar 10. Perbandingan warna uji DNS enzim inaktif dan aktif pada bakteri KC3 dan KC14	24
Gambar 11. Aktivitas enzim karagenase pada 14 isolat bakteri	25
Gambar 12. Aktivitas enzim pada hasil fraksinasi KC3 dan KC14.....	26
Gambar 13. Uji SDS-PAGE pada lembar karagenan	28

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kappaphycus alvarezii merupakan jenis alga merah yang memiliki kandungan karagenan (Baweja *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2013; Kanatt *et al.*, 2015; Sahu *et al.*, 2011). Pada pasar dunia, polisakarida hidrokolloid dari *K. alvarezii* ini memiliki nilai yang cukup tinggi. Karagenan memiliki harga eceran per kg (\$10,4 US/kg) dengan total produksi dunia 60.000 ton/tahun sehingga karagenan memberikan kontribusi total nilai tertinggi (Rhein-Knudsen *et al.*, 2015). Jepang menjadi salah satu produsen karagenan terbesar yang mengimpor karagenan ke berbagai Negara untuk dimanfaatkan (Pakarti, 2010). Karagenan memiliki kemampuan untuk membentuk gel dan sebagai *stabilizer* sehingga banyak digunakan dalam industri makanan. Selain itu karagenan bersifat biodegradasi, tidak beracun, ramah lingkungan dan bisa di konsumsi. Pemanfaatan kandungan karagenan *K. alvarezii* ini biasanya digunakan sebagai bahan dalam industri makanan, kosmetik, farmasi dan pupuk organik (Parenrengi *et al.*, 2010). Karagenan digunakan untuk membantu proses pembuatan maupun sebagai bahan pengental dan *stabilizer* pada daging olahan, es krim, coklat, puding, makanan hewan, pasta gigi, krim cukur, sampo, produk pembersih (Hotchkiss *et al.*, 2016; Barrett, 2018). Penemuan terbaru oleh Pacheco-Quito *et al.*, (2020) mengenai pemanfaatan karagenan adalah sebagai agen bioaktif yang mampu mengendalikan infeksi virus Human papillomavirus (HPV), Herpes simplex virus (HSV) dan SARS-CoV-2. Karagenan dinilai sangat aman, efektif, bersifat biokompatibel dan biodegradasi serta tidak beracun.

Karagenan terdiri dari tiga kelompok utama yang berpotensi sangat besar untuk diproduksi dalam skala industri, yaitu κ -karagenan, λ -karagenan dan ι -karagenan (Kulkarni & Shaw, 2016). Namun, permasalahan yang terjadi dalam industri karagenan saat ini adalah pemanfaatan karagenan secara komersial yang masih menggunakan karagenan dengan berat molekul yang besar sehingga mempengaruhi daya larutnya (Sandria *et al.*, 2017). Kalitnik *et al.* (2013) juga menjelaskan bahwa ukuran molekul pada polisakarida karagenan dapat mempengaruhi dan membatasi pemanfaatan dari karagenan. Dibandingkan dengan polisakarida karagenan, bentuk oligosakarida terbukti lebih bermanfaat karena strukturnya yang homogen dan toksisitas yang rendah (Subaryono, 2018). Oleh karena itu, perlu dilakukan upaya untuk memecah ikatan polimer karagenan dari polisakarida menjadi oligosakarida dengan metode yang bertujuan untuk mendegradasi karagenan.

Degradasi karagenan merupakan suatu proses untuk memecah ikatan polimer pada karagenan. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa dengan profil biologis yang lebih baik dengan mengubah karagenan menjadi oligosakarida yang memiliki berat molekul yang lebih rendah (Ghanbarzadeh *et al.*, 2018). Beberapa cara yang digunakan untuk memecah ikatan polimer pada karagenan menjadi berat molekul yang lebih kecil, yaitu metode fisik melalui penyinaran atau menggunakan *microwave* yang dilengkapi tekanan (Relleve *et al.*, 2005; Subaryono, 2018), metode kimia dengan menggunakan bahan kimia dan hidrolisis (Siregar *et al.*, 2016; Subaryono, 2018) dan metode biologi secara enzimatik oleh enzim karagenase (Guibet *et al.*, 2007; Subaryono, 2018). Beberapa studi menjelaskan bahwa proses enzimatik lebih menguntungkan karena oligosakarida yang dihasilkan oleh proses enzimatik memiliki berat molekul yang lebih seragam dan penggunaan enzim yang spesifik dapat menghindari adanya efek samping yang menyebabkan modifikasi yang tidak diinginkan dari struktur aslinya (Ghanbarzadeh *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2014).

Enzim yang berperan dalam degradasi karagenan disebut sebagai enzim karagenase yang spesifik berdasarkan jenisnya, yaitu κ -karagenase, λ -karagenase dan ι -karagenase. Enzim tersebut berperan dalam membelah ikatan β -1,4 glikosidik dari karbohidrat yang bekerja sama dengan polisakarida sulfatase dalam pembelahan ikatan ester sulfat (Michel *et al.*, 2006). Menurut Chauhan & Saxena (2016), enzim karagenase dapat diperoleh melalui bakteri laut gram negatif. Terdapat beberapa penelitian sebelumnya mengenai enzim karagenase yang diperoleh melalui bakteri laut yang bersimbiosis dengan rumput laut, yaitu *Pseudoalteromonas* sp. QY203 yang diperoleh dari alga merah yang membusuk di pantai Qindao, China (Li *et al.*, 2013). *Tamlana* sp. HC4 yang diisolasi dari alga merah *Hyalosiphonia caespitosa* di perairan Dalian, China (Sun *et al.*, 2010), *Cytophaga* sp. yang diisolasi dari alga merah *Eucheuma gelatinue* yang diperoleh dari Pulau Hainan, China (Mou *et al.*, 2004) yang mampu mendegradasi κ -karagenan. Berdasarkan beberapa penelitian terdahulu diatas, terlihat bahwa penelitian sebelumnya mengenai enzim karagenase dari bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappahycus alvarezii* yang merupakan salah satu sumber karagenan yang cukup besar (Whistler & BeMiller, 1997) masih sangat kurang. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai identifikasi enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii*.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apa jenis bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappahycus alvarezii*?
2. Apakah terdapat aktivitas enzim pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappahycus alvarezii*?
3. Berapa berat molekul enzim karagenase yang diperoleh dari bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*?
4. Apa jenis enzim yang mampu mendegradasi karagenan pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappahycus alvarezii*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengidentifikasi jenis bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*
2. Untuk mengidentifikasi adanya aktivitas enzim pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii*
3. Untuk menentukan berat molekul protein enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii*
4. Untuk mengidentifikasi jenis enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii*

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini berguna untuk memanfaatkan enzim karagenase yang dihasilkan oleh bakteri yang bersimbiosis dengan *K. alvarezii* menjadi beberapa produk olahan yang dapat dikembangkan menjadi produk industri.

E. Batasan Penelitian

Batasan penelitian ini adalah mengidentifikasi jenis bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *K. alvarezii*, selanjutnya mengidentifikasi aktivitas enzim karagenase, berat molekul, dan jenis enzim karagenase pada bakteri yang diisolasi tersebut.

TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi dan Klasifikasi Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii*

Genus *Eucheuma* dan *Kappaphycus* (*red algae*) adalah rumput laut yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi karena kandungan karagenannya. Karagenan ini digunakan pada berbagai industri seperti industri makanan, kosmetik, tekstil dan farmasi karena dapat berfungsi sebagai pengental, pengemulsi, penggumpal dan pengisi material. Sejak tahun 2008, Indonesia merupakan negara penghasil terbesar *cottonii* (*Kappaphycus alvarezii*) di dunia dan pada tahun 2009, sebanyak 94% produksi *cottonii* di dunia berasal dari Indonesia dan Filipina (Bixler dan Porse, 2011 dalam Lideman dan Laining, 2015). Menurut Parenrengi *et al.* (2010), klasifikasi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* adalah sebagai berikut:

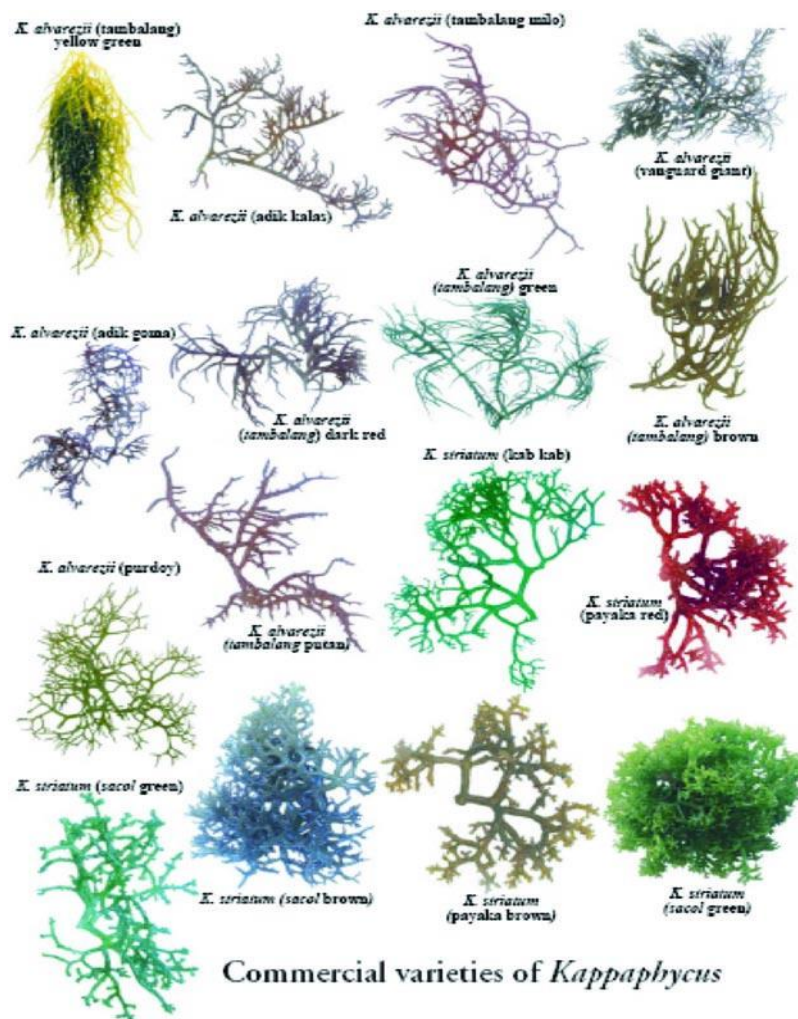
Phylum	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Sub Kelas	: Florideophycidae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Soliericeae
Genus	: <i>Kappaphycus</i>
Spesies	: <i>Kappaphycus alvarezii</i>

Ciri-ciri dari rumput laut *K. alvarezii* secara umum adalah memiliki thalus silindris, permukannya licin, cartilagineus, ada yang berwarna hijau, hijau kekuningan, abu-abu, coklat atau merah. Bentuk thalusnya bervariasi mulai dari bentuk sederhana hingga kompleks. Terdapat duri pada thalus namun tidak bersusun melingkari thalus seperti *E. denticulatum*. Percabangan ke berbagai arah dengan batang-batang utama keluar saling berdekatan. Tumbuh melekat ke substrat dengan alat perekat berupa cakram. Cabang pertama dan kedua membentuk rumpun yang rimbun dengan ciri mengarah ke arah datangnya sinar matahari. Cabang tersebut tampak ada yang memanjang atau melengkung seperti tanduk (Parenrengi *et al.*, 2010).

K. alvarezii hidup pada habitat pasang surut, rata-rata terumbu karang dan menempel pada substrat yang keras. Thalus lunak seperti tulang rawan, warna merah-coklat, berbentuk silindris, percabangan tidak teratur, dikhotomous, mempunyai duri yang pendek (Soekendarsi *et al.* 2004 dalam Erlania, 2013). Gambar rumput laut *K. alvarezii* dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan varietas komersial *Kappaphycus* spp. yang umumnya dibudidayakan di seluruh dunia dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Rumput laut *K. alvarezii* (Dokumentasi pribadi).



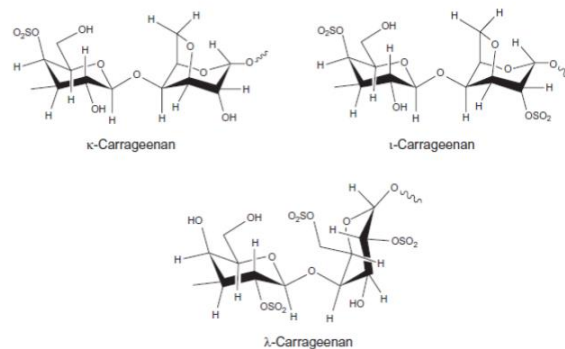
Gambar 2. Varietas komersial *Kappahycus* spp. yang umumnya dibudidayakan di seluruh dunia (Hurtado *et al.*, 2008).

B. Karagenan

Karagenan merupakan polisakarida yang terekstraksi dari alga merah (*Chondrus*, *Gigartina*, *Euchema* dan *Kappahycus*) dan dibentuk oleh unit D-galactosa dan 3,6-anhidrogalaktosa yang dihubungkan oleh 1,3 dan 1,4 glikosidik serta

mengandung antara 15-40% ester sulfat (Manuhara *et al.*, 2016; Pacheco-Quito *et al.*, 2020). Karagenan dideskripsikan sebagai salah satu kelas polisakarida galaktan yang tersulfasi, biasanya ditemukan pada dinding sel spesies rumput laut merah (Popescu *et al.*, 2007). Menurut Kariduraganavar *et al.*, (2014), terdapat tiga bentuk utama karagenan yaitu:

- κ -karagenan, membentuk gel yang bersifat kuat dan kaku, mengandung ion kalium dan dapat bereaksi dengan protein susu. Karagenan ini umumnya dapat ditemukan pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii*.
- ι -karagenan, berupa gel lunak dan mengandung ion kalsium. Karagenan ini umumnya dapat ditemukan pada rumput laut *Eucheuma denticulatum*.
- λ -karagenan, tidak membentuk gel serta memiliki fungsi untuk mengentalkan produk susu. Karagenan ini umumnya ditemukan pada rumput laut *Gigartina*.



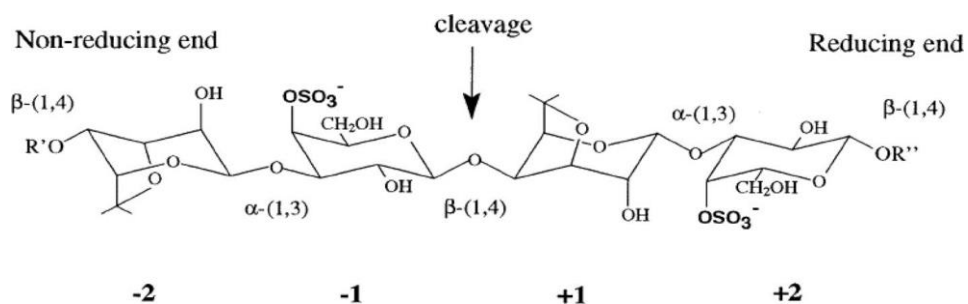
Gambar 3. Struktur karagenan (κ -karagenan, λ -karagenan dan ι -karagenan)
(Kariduraganavar *et al.*, 2014)

Perbedaan utama yang mempengaruhi sifat masing-masing bentuk karagenan adalah jumlah dan posisi gugus ester sulfat pada unit galaktosa berulang. Struktur ketiga bentuk utama karagenan dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan sifat fisikokimianya, karagenan sering digunakan sebagai stabilisator, agen pembentuk gel, pengemulsi dan pengental dalam industri makanan. Karagenan telah digunakan secara luas, terutama sebagai pengikat dalam pasta gigi, pengental dan penstabil dalam kosmetik, daging olahan, susu dan makanan penutup (jeli). Hal ini disebabkan karena kemampuannya untuk menggantikan lemak dan bercampur dengan protein susu dengan mudah untuk meningkatkan kelarutan dan tekstur. Karagenan juga digunakan dalam pembuatan pasta gigi dan makanan hewan (Hotchkiss *et al.*, 2016; Rhein-Knudsen *et al.*, 2015; Tobacman, 2001). Selain itu, penelitian Cotas *et al.* (2020) menunjukkan bahwa karagenan yang diperoleh dari *Gigartina pistillata* memiliki potensi antitumor pada sel-sel kanker usus besar.

C. Enzim Karagenase

Enzim karagenase merupakan enzim yang mampu mendegradasi karagenan. Enzim-enzim ini terdiri dari κ -karagenase, ι -karagenase dan λ -karagenase. Enzim tersebut bertugas untuk memecah ikatan polimer karagenan yang kemudian menghasilkan produk oligo-karagenan. Oligo-karagenan yang dihasilkan oleh aktivitas enzim ini lebih menguntungkan daripada yang dihasilkan melalui hidrolisis asam karena enzim bersifat spesifik (Yao *et al.*, 2014). Pemecahan ikatan polimer pada karagenan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pemecahan ikatan polimer pada karagenan ditunjukkan oleh tanda panah (Michel *et al.*, 2003)

Karagenase biasanya diperoleh dari bakteri laut, yaitu proteobacteria dan bacteroidetes. Karagenase dari bakteri sering digunakan dalam degradasi polisakarida terutama karagenan yang menjadi bahan baku utama beberapa industri. Bakteri-bakteri yang memproduksi karagenase Sebagian besar merupakan bakteri gram negative, yaitu *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Cellulophaga*, *Cytophaga*, *Tamlana*, *Vibrio*, *Catenovulum*, *Microbulbifer*, *Zobellia*, *Alteromonas* (Chauhan & Saxena, 2016).

D. Degradasi Karagenan

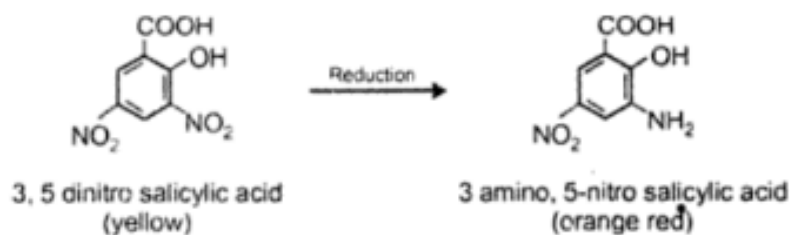
Degradasi karagenan merupakan suatu proses untuk memecah ikatan polimer pada karagenan. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa dengan profil biologis yang lebih baik dengan mengubah karagenan menjadi oligosakarida yang memiliki berat molekul yang lebih rendah (Ghanbarzadeh *et al.*, 2018). Degradasi karagenan dapat terjadi melalui beberapa cara, yaitu penyinaran, enzimatik dan bahan kimia. Menurut penelitian Ralleve *et al.* (2005), degradasi yang disebabkan oleh radiasi sinar gamma dapat terjadi di ketiga bentuk utama karagenan yaitu κ -karagenan, λ -karagenan dan ι -karagenan baik dalam bentuk padat maupun gel yang ditandai dengan adanya proses degradasi berupa munculnya puncak penyerapan UV. Pada penelitian Siregar *et al.*, (2016), penggunaan hidrogen peroksida menyebabkan bobot

molekul κ -karagenan murni menjadi menurun yang menunjukkan terjadinya proses degradasi karagenan.

Menurut Ghanbarzadeh et al. (2018) dan Yao et al. (2014) degradasi karagenan melalui proses enzimatik lebih menguntungkan karena oligosakarida yang dihasilkan oleh proses enzimatik pada mikroba memiliki berat molekul yang lebih seragam dan penggunaan enzim yang spesifik dapat menghindari adanya efek samping yang dapat menyebabkan modifikasi yang tidak diinginkan dari struktur aslinya. Beberapa penelitian mengenai potensi degradasi karagenan melalui proses enzimatik adalah penelitian Michel et al. (2001) yang menjelaskan struktur bakteri *Pseudoalteromonas carrageenovora* yang memiliki kemampuan dalam degradasi κ -karagenan. Penelitian Michel et al., (2003) yang menemukan enzim yang dianggap berasal dari family GH82 ι -karagenase yang merupakan modul pengikat karbohidrat namun spesifik terhadap pengikatan ι -karagenase. Penelitian Guibet et al., (2007) mengenai degradasi karagenan yang disebabkan oleh adanya aktivitas enzim λ -karagenase pada bakteri *Pseudoalteromonas carrageenovora*. Aktivitas enzim yang ditemukan merupakan bagian dari famili baru GHs (*Glicoside hydrolases*) yang tidak memiliki kaitan dengan κ -karagenan dari famili GH16 dan ι -karagenase dari family GH82. Penelitian Jouanneau et al. (2010) pada bakteri *Alteromonas formis* yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi ι -karagenan.

E. Teknik DNS (dinitrosalicylic acid)

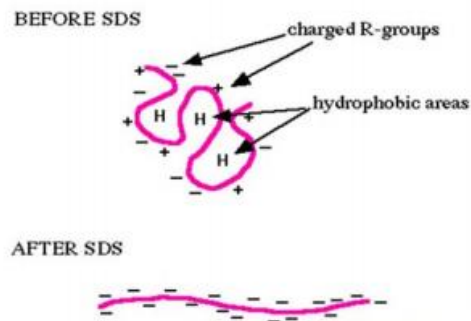
Metode DNS (*dinitrosalicylic acid*) telah digunakan sejak awal untuk menentukan gula pereduksi. Metode ini merupakan teknik kolorimetri yang terdiri dari reaksi redoks antara asam 3,5-dinitrosalisilat dan gula pereduksi yang terdapat di dalam sampel. Daya reduksi gula ini berasal dari gugus karbonilnya, yang dapat dioksidasi menjadi gugus karboksil oleh zat pengoksidasi ringan, sedangkan DNS (berwarna kuning) direduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat (berwarna merah) yang dapat dikuantifikasi dengan UV-Vis spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Garriga et al., 2017). Reduksi gula yang disebabkan oleh metode DNS dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Reduksi gula yang disebabkan oleh metode DNS (Harisha, 2006).

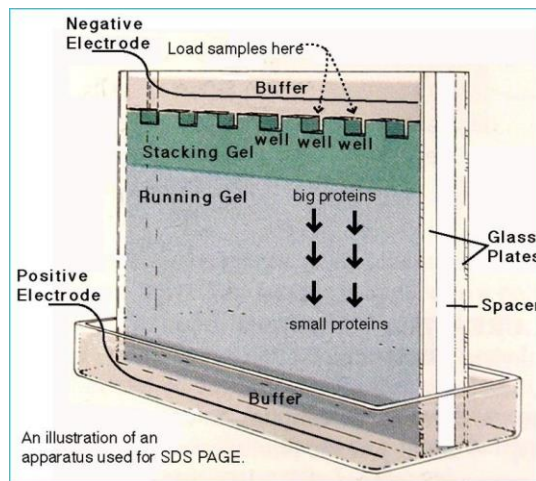
F. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)

Elektroforesis merupakan istilah umum yang menggambarkan migrasi dan pemisahan partikel bermuatan (ion) di bawah pengaruh medan listrik. Sistem ini terdiri dari dua elektroda yang bermuatan berlawanan (anoda dan katoda) dihubungkan oleh media konduktor yang disebut elektrolit. SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) merupakan salah satu teknik elektroforesis yang menggunakan poliakrilamida sebagai gelnya (Fritsch & Krause, 2003). Komponen utama yang digunakan dalam SDS-PAGE adalah gel poliakrilamida dan SDS. Menurut Büyükköroğlu *et al.*, (2018) gel poliakrilamida didasarkan pada prinsip polimerisasi radikal bebas akrilamida dan ikatan silang N,N'-metilen-bis-akrilamida. SDS (*Sodium dodecyl sulphate*) merupakan komponen organik dengan rumus kimia $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$. Komponen ini merupakan surfaktan anionik yang digunakan dalam produk pembersih. SDS merupakan deterjen yang memiliki muatan negatif. Dengan mengaplikasikan SDS maka protein akan memiliki banyak muatan negatif sehingga menghasilkan protein yang hanya mempertahankan struktur primer dan semua protein memiliki muatan negatif (Roy & Kumar, 2014). Ilustrasi perubahan yang terjadi akibat pengaplikasian SDS dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Ilustrasi perubahan protein akibat pengaplikasian SDS (Roy & Kumar, 2014)

Menurut Roy & Kumar (2014), prinsip dari elektroforesis SDS-PAGE melibatkan adanya pemisahan protein berdasarkan ukurannya. Dengan memanaskan sampel dalam kondisi denaturasi, protein menjadi terbuka yang kemudian dilapisi dengan SDS, sehingga memperoleh muatan negative yang tinggi dan sebanding dengan panjang rantai polipeptida. Ketika dimuat ke dalam gel poliakrilamida dan ditempatkan pada medan listrik, molekul protein bermuatan negatif bermigrasi ke arah elektroda positif. Setelah divisualisasi dengan teknik pewarnaan khusus protein, ukuran protein dapat diperkirakan dengan membandingkan jarak migrasi dengan standar dari berat molekul yang diketahui. Ilustrasi SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 7.



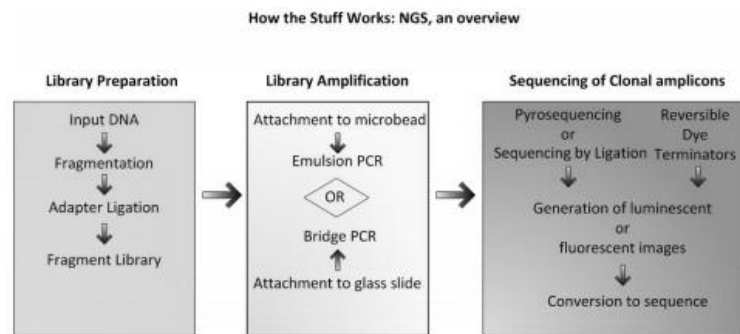
Gambar 7. Ilustrasi SDS-PAGE (Pegiou, 2014).

G. Next-generation sequencing (NGS)

DNA merupakan salah satu unsur kehidupan yang terdiri dari senyawa kimia yang disebut nukleotida. Nukleotida terdiri dari tiga bagian yaitu fosfat, gugus gula dan urutan basa nitrogen (*adenine, thymine, guanine* dan *cytosine*). Untuk membentuk untai DNA, nukleotida dihubungkan ke rantai dengan gugus fosfat dan gula secara bergantian. Urutan basa nitrogen ini menentukan instruksi biologis yang terkandung dalam untai DNA. Untuk mengkarakterisasi cDNA yang baru dikloning, digunakan metode sekuensing DNA. Tujuannya adalah untuk mengkonfirmasi identitas kloning atau mutasi yang terjadi, untuk memeriksa ketepatan mutasi yang baru dibuat, produk PCR dan alat skrining untuk mengidentifikasi polimorfisme (Bisht dan Panda, 2013).

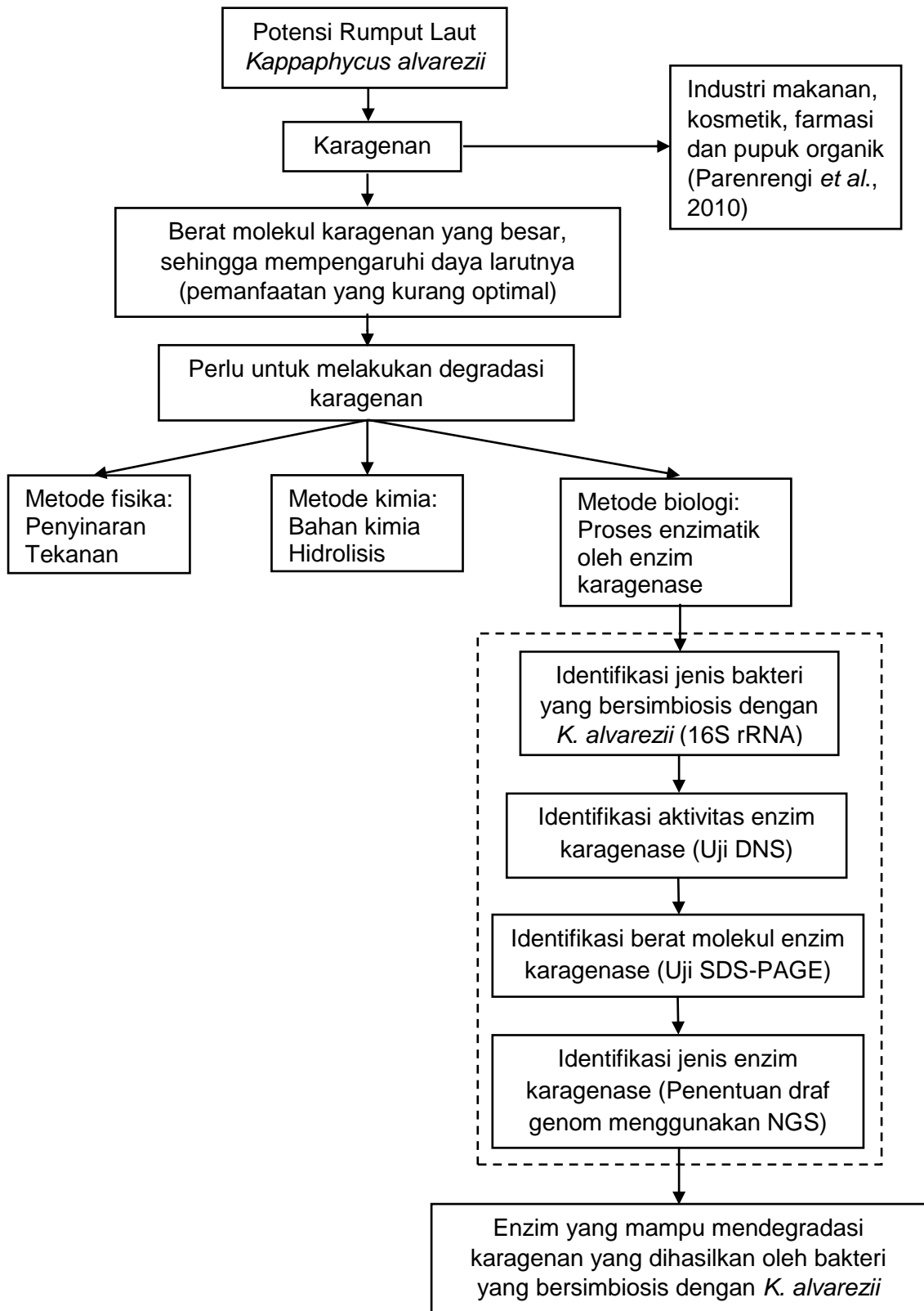
Salah satu metode sekuensing DNA adalah *next generation sequencing* (NGS). Teknik sekuensing ini dapat diterapkan pada pengaplikasian yang beragam seputar genomic, transkriptomik, epigenomik dan metagenomik. Komponen utama pada alur kerja NGS ini adalah persiapan template, pengurutan dan analisis lanjutan (Herzyk, 2014). Prinsip dasar NGS mirip dengan metode sekuensing Sanger tradisional yang melibatkan elektroforesis kapiler. NGS dimulai dengan persiapan template yang bersumber dari DNA genomic, DNA yang dipresipitasi dengan imuno, RNA atau cDNA yang ditranskrip terbaik (Rizzo & Buck, 2012). Raza & Ahmad (2016) menjelaskan bahwa langkah awal yang diperlukan adalah persiapan template yang sesuai, sehingga membutuhkan beberapa langkah umum seperti fragmentasi, pemilihan ukuran dan ligasi adaptor. Setelah itu, proses selanjutnya melibatkan amplifikasi template untuk menghasilkan sinyal yang signifikan untuk penambahan nukleotida. Proses ini melibatkan penempelan fragmen DNA pada *microbead* atau menempel pada kaca slide, ketika diikuti dengan beberapa teknik PCR. Amplifikasi template pada akhirnya akan mengarah pada reaksi sekuensing dan proses visualisasi. Tujuan utama

NGS adalah untuk menganalisis data yang dihasilkan melalui proses pengurutan ini. Alur kerja dari NGS dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Alur kerja NGS (Raza & Ahmad, 2016).

H. Kerangka Pikir Penelitian



I. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* atau tidak terdapat bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*
2. Terdapat aktivitas enzim pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* atau tidak terdapat aktivitas enzim yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*
3. Terdapat berat molekul protein enzim pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* atau tidak terdapat berat molekul protein enzim yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*
4. Terdapat jenis enzim karagenase pada bakteri yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* atau tidak terdapat jenis enzim karagenase yang bersimbiosis dengan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*.