

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada beberapa tahun terakhir, jumlah emisi karbon dioksida (CO₂) terus meningkat dan tren yang sama diperkirakan akan berlanjut di masa mendatang (Barati dkk., 2021). Penggunaan bahan bakar fosil secara berlebihan telah menyebabkan peningkatan emisi CO₂ yang mengakibatkan kerusakan lingkungan serius dan perubahan iklim (Yoro & Daramola, 2020). Lebih dari 80% total produksi energi global saat ini berasal dari pembakaran bahan bakar fosil yang menghasilkan jumlah CO₂ yang sangat besar. Karbon dioksida merupakan salah satu komponen utama dari gas rumah kaca bersama dengan metana (CH₄), nitrogen monoksida (NO), nitrogen dioksida (NO₂), dan klorofluorokarbon (CFC) (Abbasi dkk., 2022). Akumulasi gas-gas ini memiliki dampak jangka panjang. Suhu global rata-rata diprediksi akan meningkat sebesar 2°C pada tahun 2100 dan bahkan 4,2°C pada tahun 2400 (Li dkk., 2023). Hal ini berpotensi mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar. Pemanasan global telah menjadi tantangan utama yang mendesak untuk segera ditangani (Zhou dkk., 2022).

Langkah utama dalam mengurangi emisi CO₂ adalah dengan mengurangi penggunaan bahan bakar fosil (Wu dkk., 2021). Eksplorasi sumber energi alternatif yang lebih berkelanjutan dapat dilakukan untuk mengurangi penggunaan bahan bakar fosil (Razmjoo dkk., 2021). Selain itu, strategi penangkapan, penggunaan kembali, dan penyimpanan karbon adalah pendekatan yang umum digunakan saat ini untuk mengurangi emisi CO₂ (Shirmohammadi dkk., 2020). Penangkapan dan penyimpanan karbon dapat memenuhi kebutuhan energi global yang terus bertambah dengan mengubah CO₂ yang tertangkap menjadi bahan bakar sekaligus mengurangi emisi CO₂ secara simultan (Zhang & Liu, 2021).

Penangkapan karbon biologis, terutama melalui fiksasi CO₂ oleh mikroalga, merupakan salah satu metode yang paling efektif di dunia (Xu dkk., 2019). Dalam jangka panjang, cara ini ekonomis, ramah lingkungan, dan berkelanjutan dalam menangkap CO₂ (Irfan dkk., 2019). Efisiensi mikroalga dalam menangkap CO₂ melalui

fotosintesis jauh lebih tinggi, sekitar 10-50 kali lipat dibandingkan dengan tanaman terestrial, dan memiliki laju pertumbuhan yang cepat (Goswami dkk., 2022). Setiap gram biomassa mikroalga mampu menangkap sekitar 1,83 gram CO₂ (Jin dkk., 2021). Mikroalga dapat berkembang biak dengan sangat cepat, dalam beberapa jam, jauh lebih cepat dibandingkan dengan tanaman tingkat tinggi (Onyeaka dkk., 2021). Karbon dioksida dapat diubah menjadi energi melalui fotosintesis oleh mikroalga yang menjadikan metode ini ramah lingkungan dan berkelanjutan (Jaiswal dkk., 2023).

Mikroalga seperti *Chlorella* sp. yang tumbuh dengan cepat sering kali dipilih untuk aplikasi bioteknologi, meskipun umumnya memiliki kadar lipid yang lebih rendah untuk produksi energi (Aziz dkk., 2019). Peningkatan akumulasi lipid pada mikroalga dapat meningkatkan produksi energi (Zhu dkk., 2022). Namun, mikroalga menghadapi tantangan dalam proses fotosintesisnya pada kadar CO₂ yang ada pada atmosfer saat ini. Untuk mengatasi masalah fiksasi CO₂, beberapa organisme fotosintetik meningkatkan konsentrasi CO₂ di sekitar Rubisco dengan menggunakan mekanisme konsentrasi CO₂ (*CO₂-concentrating mechanisms/CCM*) (An dkk., 2023).

Mekanisme CCM meningkatkan rasio CO₂ di tempat karboksilasi yang disebut karboksisom pada prokariota dan pirenoid pada eukariota (Iñiguez dkk., 2020). Anhidrase karbonat adalah kelompok enzim utama yang terlibat dalam CCM (Jensen dkk., 2020). Enzim anhidrase karbonat terdapat pada sebagian besar organisme, termasuk mikroalga, dan berperan penting dalam mekanisme CCM ketika konsentrasi CO₂ kurang dari 3% (v/v) (Zhang & Liu, 2021). Penelitian oleh Swarnalatha dkk. (2015) menunjukkan bahwa aktivitas anhidrase karbonat meningkat saat mikroalga tumbuh dalam konsentrasi CO₂ yang rendah. Peningkatan ekspresi anhidrase karbonat pada mikroalga dapat menjadi solusi potensial untuk menangkap kelebihan CO₂ secara efisien (Lin dkk., 2018).

Pendekatan baru diperlukan untuk meningkatkan aktivitas anhidrase karbonat saat konsentrasi CO₂ di atmosfer meningkat. CRISPR atau *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* adalah sistem pertahanan dasar yang ditemukan pada bakteri, terutama *Escherichia coli* dan arkeobakteri (Khanzadi & Khan, 2020). CRISPR telah memfasilitasi para peneliti dalam memodifikasi,

Aris Muhamad Nurjamil, 2024

PERANCANGAN PLASMID SINGLE GUIDE RNA (SGRNA) AKTIVASI-CRISPR GEN ANHIDRASE KARBONAT *Chlorella sorokiniana* Shihira dan Krauss

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

mengubah, memasukkan, atau menghapus gen tertentu dari satu organisme ke organisme lain (Nidhi dkk., 2021). Aktivasi-CRISPR adalah teknik baru dari CRISPR yang dikembangkan untuk mengaktifkan gen (Russa & Qi, 2015). Tingkat aktivasi-CRISPR meningkat melalui dCas9 (*dead CRISPR-associated protein 9*) dengan aktivator transkripsi VP64 (*Virion Phosphoprotein 16 with Four Repeats*) (Chen & Qi, 2017). Peningkatan ekspresi anhidrase karbonat yang terlibat dalam CCM dapat meningkatkan laju fiksasi karbon (Mondal dkk., 2016). Hasil penelitian Sun dkk. (2016) menunjukkan bahwa percepatan fiksasi CO₂ pada *Chlorella sorokiniana* juga meningkatkan akumulasi lipid.

Salah satu permasalahan utama dalam penerapan CRISPR pada *Chlorella* sp. adalah kebutuhan akan sekuens yang tepat untuk merancang *single guide RNA* (sgRNA). Untuk mendapatkan sekuens yang sesuai, pengetahuan yang valid mengenai spesies *Chlorella* yang digunakan sangat diperlukan. Salah satu kendala dalam penentuan spesies *Chlorella* adalah sulitnya membedakan spesies ini secara morfologi karena kemiripan dan keterbatasan identifikasi berdasarkan morfologi (Krivina & Temraleeva, 2020). Selain itu, kesulitan dalam aplikasi aktivasi-CRISPR adalah perancangan sgRNA yang harus dirancang berdasarkan sekuens *upstream* dari promotor gen target atau situs awal transkripsi (*transcription start site/TSS*) untuk mengaktifkan gen target (Huang dkk., 2019). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan sekuens gen anhidrase karbonat yang tepat sesuai dengan spesies *Chlorella* yang digunakan. Sekuens yang diperoleh dapat digunakan dalam perancangan sgRNA dan plasmid aktivasi-CRISPR secara *in silico*. Pendekatan ini bertujuan untuk meningkatkan ekspresi gen anhidrase karbonat melalui teknologi aktivasi-CRISPR.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah pada penelitian ini adalah “Bagaimana cara mendapatkan sekuens gen anhidrase karbonat yang tepat sesuai dengan spesies *Chlorella* yang digunakan agar dapat merancang *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR untuk gen anhidrase karbonat?”

1.3 Pertanyaan Penelitian

Beberapa pertanyaan penelitian muncul dari rumusan masalah yang telah diajukan, yaitu:

1. Bagaimana pola pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp. (fase lag, eksponensial, stasioner, dan fase kematian) yang diamati dalam kultur?
2. Bagaimana hasil identifikasi spesies *Chlorella* sp. berdasarkan karakteristik morfologi?
3. Bagaimana hasil identifikasi spesies *Chlorella* sp. berdasarkan gen 18S rRNA?
4. Bagaimana sekuens gen anhidrase karbonat dari spesies *Chlorella* yang berhasil diidentifikasi?
5. Bagaimana rancangan secara *in silico single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR pada gen anhidrase karbonat dari spesies *Chlorella* yang berhasil diidentifikasi?

1.4 Tujuan Umum Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan sekuens gen anhidrase karbonat yang tepat sesuai dengan spesies *Chlorella* yang digunakan agar dapat merancang *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR untuk gen anhidrase karbonat.

1.5 Tujuan Khusus Penelitian

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis pola pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp. (fase lag, eksponensial, stasioner, dan fase kematian) dalam kultur.
2. Mengidentifikasi spesies *Chlorella* sp. berdasarkan karakteristik morfologi.
3. Mengidentifikasi spesies *Chlorella* sp. berdasarkan gen 18S rRNA.
4. Menganalisis sekuens gen anhidrase karbonat dari spesies *Chlorella* yang berhasil diidentifikasi.
5. Merancang *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR pada gen anhidrase karbonat dari spesies *Chlorella* yang berhasil diidentifikasi secara *in silico*.

1.6 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melalui pengamatan pola pertumbuhan (lag, eksponensial, stasioner, dan kematian), penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman mengenai dinamika pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp. di dalam kultur. Informasi ini penting untuk optimalisasi produksi biomassa mikroalga yang berpotensi sebagai energi terbarukan.
2. Hasil amplifikasi dan sekuensing gen 18S rRNA *Chlorella* sp. memberikan data tambahan tentang keragaman genetik mikroalga. Sekuens ini dapat digunakan untuk analisis filogenetik dan rekonstruksi hubungan evolusioner *Chlorella* sp. dengan spesies lain.
3. Identifikasi dan karakterisasi gen anhidrase karbonat *Chlorella* sp. serta rancangan *single guide RNA* (sgRNA) untuk aktivasi-CRISPR secara *in silico* mendukung pengembangan CRISPR pada *Chlorella* sp.
4. Rancangan plasmid untuk aktivasi-CRISPR dapat menjadi dasar untuk pengembangan teknologi yang memungkinkan peningkatan ekspresi gen tertentu pada *Chlorella* sp. dengan potensi untuk mengoptimalkan sifat-sifat biologis yang diinginkan.

5. Hasil dari penelitian ini dapat menjadi landasan bagi penelitian lanjutan dalam bidang bioteknologi dan genetika mikroalga, khususnya terkait dengan pengembangan aktivasi-CRISPR.

1.7 Batasan Penelitian

Beberapa batasan penelitian ditetapkan agar penelitian dapat berfokus pada tujuan penelitian, meliputi:

1. Pengamatan pertumbuhan *Chlorella* sp. dilakukan selama 15 hari pada dua jenis media pertumbuhan, yaitu media ekstrak tauge 4% (MET) dan media AF6.
2. Karakterisasi morfologi *Chlorella* sp. dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x.
3. Metode CTAB yang digunakan untuk isolasi DNA pada penelitian ini dimodifikasi berdasarkan pertimbangan keamanan dan efisiensi penggunaan bahan.
4. Perancangan *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR untuk gen anhidrase karbonat pada *Chlorella* sp. dilakukan secara *in silico*. Alat yang digunakan berupa situs web Cas-Designer dan Benchling yang dapat diakses secara daring dan gratis.

1.8 Struktur Organisasi Skripsi

Skripsi ini terdiri dari lima bab dengan gambaran mengenai pembahasan dalam setiap bab sebagai berikut:

1. Bab I Pendahuluan

Bab I terdiri dari beberapa sub-bab yang meliputi latar belakang, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, tujuan umum penelitian, tujuan khusus penelitian, manfaat penelitian, dan batasan penelitian. Sub-bab latar belakang menjelaskan peningkatan emisi CO₂ akibat penggunaan bahan bakar fosil dan pentingnya penangkapan karbon, khususnya melalui mikroalga seperti *Chlorella* sp. yang menggunakan enzim anhidrase karbonat dalam mekanisme konsentrasi CO₂. Rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana cara memperoleh sekuens gen anhidrase karbonat yang tepat untuk spesies

Aris Muhamad Nurjamil, 2024

PERANCANGAN PLASMID SINGLE GUIDE RNA (SGRNA) AKTIVASI-CRISPR GEN ANHIDRASE KARBONAT *Chlorella sorokiniana* Shihira dan Krauss

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Chlorella yang digunakan agar dapat merancang *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR yang sesuai. Pertanyaan penelitian mencakup aspek pertumbuhan, identifikasi morfologi, isolasi dan analisis DNA, serta rancangan sgRNA dan plasmid aktivasi-CRISPR. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mendapatkan sekuens gen anhidrase karbonat yang tepat agar dapat merancang sgRNA dan plasmid aktivasi-CRISPR untuk gen tersebut pada spesies *Chlorella* yang digunakan. Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk menganalisis pola pertumbuhan *Chlorella* sp., mengidentifikasi spesiesnya berdasarkan morfologi dan gen 18S rRNA, serta menganalisis sekuens gen anhidrase karbonat dan merancang sgRNA serta plasmid aktivasi-CRISPR secara *in silico*. Manfaat penelitian meliputi pemahaman dinamika pertumbuhan mikroalga, analisis genetik, pengembangan alat bioteknologi, dan dasar untuk penelitian lanjutan. Batasan penelitian menetapkan fokus pada pengamatan selama 15 hari, karakterisasi morfologi, metode isolasi DNA yang dimodifikasi, serta perancangan sgRNA dan plasmid secara *in silico* menggunakan Cas-Designer dan Benchling.

2. Bab II Teknik Molekuler dan Aplikasi CRISPR pada Mikroalga *Chlorella* sp.

Bab II mencakup dua belas sub-bab yang membahas topik-topik penting terkait penelitian. Sub-bab pertama, *Chlorella* sp., membahas mikroalga uniseluler yang mudah dibudidayakan dan memiliki berbagai kegunaan. Sub-bab kedua, isolasi DNA, menguraikan teknik isolasi DNA dari sel untuk mendapatkan DNA murni. Sub-bab ketiga, elektroforesis, menjelaskan teknik pemisahan molekul menggunakan medan listrik. Sub-bab keempat, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), membahas metode amplifikasi DNA secara *in vitro*. Sub-bab kelima, sekuensing DNA, menjelaskan teknik penentuan urutan basa dalam DNA. Sub-bab keenam, gen 18S rRNA, membahas penggunaannya dalam identifikasi mikroalga. Sub-bab ketujuh, analisis filogenetik, menjelaskan analisis filogenetik untuk menentukan hubungan evolusi antarorganisme menggunakan data molekuler dan pohon filogenetik, serta tantangan dalam identifikasi spesies mikroalga *Chlorella*. Sub-bab kedelapan, anhidrase karbonat, menguraikan enzim yang mengkatalisis reaksi konversi CO₂ pada mikroalga. Sub-bab kesembilan, aktivasi-CRISPR, membahas teknologi CRISPR untuk aktivasi

Aris Muhamad Nurjamil, 2024

PERANCANGAN PLASMID SINGLE GUIDE RNA (SGRNA) AKTIVASI-CRISPR GEN ANHIDRASE KARBONAT *Chlorella sorokiniana* Shihira dan Krauss

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

gen, termasuk penggunaan dCas9 dan domain pengaktif VP64. Sub-bab kesepuluh, *single guide RNA* (sgRNA), menjelaskan pentingnya rancangan sgRNA dalam aktivasi-CRISPR terutama dalam mengurangi efek *off-target* dalam aktivasi gen. Sub-bab kesebelas, plasmid, menjelaskan plasmid sebagai vektor DNA yang penting dalam manipulasi genetik. Sub-bab kedua belas, perkembangan CRISPR pada *Chlorella* sp., membahas penggunaan teknologi CRISPR pada mikroalga *Chlorella* sp. untuk meningkatkan produksi senyawa bernilai tinggi dan bahan bakar hayati.

3. Bab III Metode Penelitian

Bab III membahas tentang jenis penelitian deskriptif yang digunakan untuk menguraikan karakteristik variabel terkait dengan langkah-langkah penelitian meliputi kultur *Chlorella* sp., identifikasi spesies, isolasi DNA, amplifikasi gen 18S rRNA, sekuensing, dan perancangan *single guide RNA* (sgRNA) serta plasmid aktivasi-CRISPR secara *in silico*. Waktu dan lokasi penelitian yang dilaksanakan dari Februari hingga Juni 2024 di Laboratorium Riset Bioteknologi UPI dan First BASE Laboratories. Populasi, sampel, alat, dan bahan yang digunakan dalam penelitian. Prosedur penelitian yang terbagi menjadi beberapa tahap, yaitu tahap persiapan, penelitian di laboratorium, dan analisis *in silico*. Tahapan penelitian mencakup persiapan alat, kultur dan pengamatan *Chlorella* sp., identifikasi morfologi, isolasi dan analisis DNA, amplifikasi dan sekuensing gen 18S rRNA, analisis bioinformatika, identifikasi gen anhidrase karbonat, perancangan sgRNA, dan plasmid aktivasi-CRISPR.

4. Bab IV Temuan dan Pembahasan

BAB IV membahas berbagai temuan dan pembahasan terkait pertumbuhan dan identifikasi spesies *Chlorella* sp., serta langkah-langkah perancangan plasmid untuk aktivasi gen anhidrase karbonat menggunakan sistem aktivasi-CRISPR. Sub-bab 4.1 membahas kurva pertumbuhan *Chlorella* sp. yang dipengaruhi oleh media pertumbuhan, intensitas cahaya, dan pH. Sub-bab 4.2 menguraikan identifikasi spesies *Chlorella* sp. berdasarkan karakteristik morfologi. Sub-bab 4.3 hingga 4.5 menjelaskan isolasi DNA menggunakan metode CTAB dan keberhasilan amplifikasi gen 18S rRNA. Sub bab 4.6 dan 4.7 membahas analisis filogenetik menggunakan sekuens gen

Aris Muhamad Nurjamil, 2024

PERANCANGAN PLASMID SINGLE GUIDE RNA (SGRNA) AKTIVASI-CRISPR GEN ANHIDRASE KARBONAT *Chlorella sorokiniana* Shihira dan Krauss

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

18S rRNA untuk mengidentifikasi spesies *Chlorella*. Sub bab 4.8 dan 4.9 menguraikan perancangan *single guide RNA* (sgRNA) dan plasmid aktivasi-CRISPR secara *in silico* untuk merancang plasmid yang dapat meningkatkan ekspresi gen anhidrase karbonat guna meningkatkan penyerapan CO₂ melalui fotosintesis serta ilustrasi skematik aktivasi gen anhidrase karbonat.

5. Bab V Simpulan, Implikasi, dan Rekomendasi

Bab V membahas tiga sub-bab utama. Sub-bab simpulan menjelaskan pola pertumbuhan, karakteristik morfologi dan molekuler *Chlorella sorokiniana*, serta perancangan sistem aktivasi CRISPR untuk mengaktifkan gen anhidrase karbonat secara *in silico*. Sub-bab implikasi menjelaskan potensi aplikasi teknologi aktivasi-CRISPR untuk meningkatkan produktivitas mikroalga melalui regulasi ekspresi gen. Sub-bab rekomendasi memberikan saran praktis untuk optimalisasi pertumbuhan *Chlorella* sp., peningkatan kemurnian DNA, serta evaluasi efektivitas rancangan sgRNA dan plasmid aktivasi-CRISPR melalui eksperimen laboratorium.