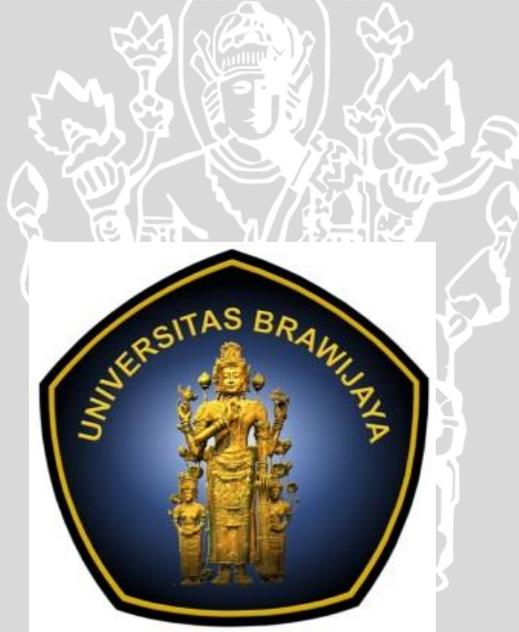


OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *HindIII* PADA MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* YANG DI KULTUR SECARA *IN VIVO*

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**VAVA ARDIKA HARNAWAN
NIM. 125080107111008**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)* RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *HindIII* PADA MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* YANG DI KULTUR SECARA *IN VIVO*

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh :

VAVA ARDIKA HARNAWAN



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**



SKRIPSI

OPTIMALISASI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *HindIII* PADA MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* YANG DI KULTUR SECARA *IN VIVO*

Oleh:

VAVA ARDIKA HARNAWAN
NIM. 125080107111008

Telah dipertahanan di depan penguji
pada tanggal 4 Agustus 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui
Dosen Penguji I

Dr. Ir. Umi Zakiyah, M.Si
NIP. 19610303 198602 2 001

Tanggal : 16 AUG 2016

Menyetujui
Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Muhammad Musa, MS
NIP. 19570507 198602 1 002

Tanggal : 16 AUG 2016

Dosen Penguji II

Dr. Agus Maizar S.H., S.Pi, MP
NIP. 19720529 200312 1 001

Tanggal : 16 AUG 2016

Dosen Pembimng II

Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, Msi
NIP. 19730404 200212 2 001

Tanggal : 16 AUG 2016



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal : 16 AUG 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Juli 2016
Mahasiswa



Vava Ardika Harnawan
NIM. 125080107111008

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan Terima Kasih Kepada:
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi

Yang Telah Membiayai :
Skema Penelitian BOPTN Unggulan Perguruan Tinggi Nomor :
033/SP2H/LT/DRPM/II/2016, Tanggal 17 Februari 2016

Dengan Judul :
"Produksi dan Pengembangan Produk Antiviral Berbasis *Peridinin Chlorophyll Cell Pigment (PCP)* Spesies Penting Mikroalga Laut untuk Komoditas Unggulan Ikan Ekspor"

Sebagai Ketua Peneliti **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.**

Anggota Tim Penelitian Sebagai Berikut:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. Nico Rahman Caesar | 13. Vava Ardika Harnawan |
| 2. Nur Aini Masruroh | 14. Laini Anjarro'ah |
| 3. Feri Setiawan | 15. Atik Aprilia Sugiono |
| 4. Yuliana | 16. Anik Purwaningsih |
| 5. Zulfa Rahmawati | 17. Suci Purwati Agustini |
| 6. Dyah Tri Rahayu | 18. Destine Validia Eldida |
| 7. Eni Mujayanah | 19. Icha Sriagusdini |
| 8. Muhammad Sumsanto | 20. Dayinta Mega Nurmala |
| 9. Miftah Arraiyan | 21. Syech Achmad Iqbal |
| 10. Aprilieni Daezna | 22. Dikky Ristian Arifullah |
| 11. Wima Arfatus S. | 23. Nurhikmah Aditya |
| 12. Fiqie Zulfikar Sya'roni | |

Ketua Peneliti,



(Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si)
NIP. 19730404 200212 2 001

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis berhasil menyelesaikan Laporan Tugas Akhir yang berjudul “Optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) dengan Enzim Restriksi *HindIII* pada Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* yang dikultur secara *in vivo*”. Tujuan dibuatnya Laporan Tugas Akhir ini adalah sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa Laporan Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak yang bersifat membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, Juli 2016



Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam membantu kelancaran hingga penulisan laporan Tugas Akhir ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Puji Syukur kepada Allah SWT yang selalu memberikan rahmad dan hidayahnya sehingga saya dapat menyelesaikan laporan tugas akhir ini.
2. Ibu (RR Dahliana), Alm. Harry Makmur (Bapak), Alm. RR Kyky Rinatasari (Kakak), Prasetya (Kakak) dan seluruh keluarga besar atas dorongan yang kuat, memberi semangat, restunya serta doa yang tiada hentinya kepada penulis.
3. Dr. Ir. Muhammad Musa, MS selaku pembimbing 1 dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, Msi selaku pembimbing 2 atas kesediaan waktunya untuk membimbing penulis hingga terselesaikan Skripsi.
4. Selaku dosen penguji atas kritik dan sarannya yang bermanfaat untuk kesempurnaan laporan ini.
5. Tim riset Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, Msi 2016 yang selama ini telah bekerja sama, berjuang, berkorban bersama atas riset yang telah dilakukan.
6. Teman - teman saya di Program Studi MSP'12 dan program studi lain atas bantuannya selama ini.
7. POHARIN TEAM H-171 Herlilian Duta, Nico Rahman, Fery Setiawan, Fandy Ahmad, Novian Ade, Satrio Sandi, Mas Taufan junghae teman-teman seperjuangan yang selama ini telah memberikan dukungan dan nasihat agar segera menyelesaikan tugas akhir ini.

8. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung dan baik sengaja maupun tidak sengaja telah berperan dalam terselesaikannya laporan ini.



Malang, Juli 2016


Penulis



RINGKASAN

VAVA ARDIKA HARNAWAN. Skripsi. Optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) Menggunakan Enzim Restriksi *HindIII* pada Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* yang di Kultur Secara *In Vivo*. Dibawah bimbingan **Dr. Ir. Muhammad Musa, MS** dan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si**

Mikroalga atau fitoplankton merupakan produsen primer di perairan karena mampu berfotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Salah satu contoh mikroalga yaitu *Nannochloropsis oculata* dari golongan alga hijau *chlorophyceae*. *N. oculata* memiliki pigmen *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang berperan dalam proses fotosintesis dan berpotensi sebagai zat antioksidan. Mengingat PCP didalam *N. oculata* memiliki peran dan potensi yang besar, hal ini memicu permintaan yang semakin bertambah memungkinkan PCP ini untuk dapat dikembangkan lebih lanjut. Untuk mendeteksi dan mengembangkan PCP secara cepat dan akurat dapat dilakukan secara molecular menggunakan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Optimalisasi perlu dilakukan untuk mengefisienkan penggunaan bahan dan waktu. Dalam proses amplifikasi pada saat berlangsungnya RT-PCR sering dihasilkan visualisasi amplifikasi cDNA yang belum optimal sehingga pita cDNA tidak terlihat. Berdasarkan hal tersebut maka diperoleh rumusan masalah, yaitu bagaimana mengoptimalkan metode RT-PCR RNA PCP *N. oculata* menggunakan enzim restriksi *HindIII*.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif dan eksploratif. Metode deskriptif dan eksploratif dalam penelitian ini bertujuan untuk mencari metode yang tepat dalam mengoptimalkan RT-PCR RNA PCP pada *N. oculata*. Selain itu juga untuk mengetahui tingkat kecocokan situs pemotongan enzim restriksi *HindIII* terhadap target panjang basa PCP (310 bp) pada *N. oculata* menggunakan teknik RT-PCR. Langkah awal dalam penelitian ini yaitu mengkultur mikroalga *N. oculata* dalam skala laboratorium dan intermediate. Setelah itu dilakukan isolasi RNA total *N. oculata*. Hasil isolasi RNA diukur kadar total RNA menggunakan *nanophotometer*. Setelah itu dilakukan proses RT-PCR, dimana RNA total ditranskripsikan menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Selanjutnya dilakukan proses amplifikasi meliputi denaturasi, *annealing*, dan elongasi. Setelah itu cDNA yang dihasilkan dari RT-PCR dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* untuk mengetahui tingkat kecocokan situs pemotongan enzim restriksi *HindIII* terhadap target panjang basa PCP (310 bp), lalu di elektroforesis menggunakan gel agarosa untuk mengetahui hasil visualisasi cDNA PCP *N. oculata*.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan metode yang tepat dalam mengoptimalkan RT-PCR dilakukan dengan menggunakan kit yang tepat dalam proses isolasi RNA, yaitu *RNA kit plant GeneAid*. Dalam penelitian ini suhu penempelan primer *annealing* yang optimal yaitu pada suhu 52 °C. Sedangkan penggunaan enzim restriksi *HindIII* menghasilkan fragmen pemotongan RNA 200 bp, 250 bp, dan 310 bp. Pada salah satu situs pemotongan menunjukkan terdapat kecocokan dengan menghasilkan situs pemotongan 310 bp, hal ini sesuai dengan target panjang basa PCP yaitu 310 bp pada *Nannochloropsis oculata*.

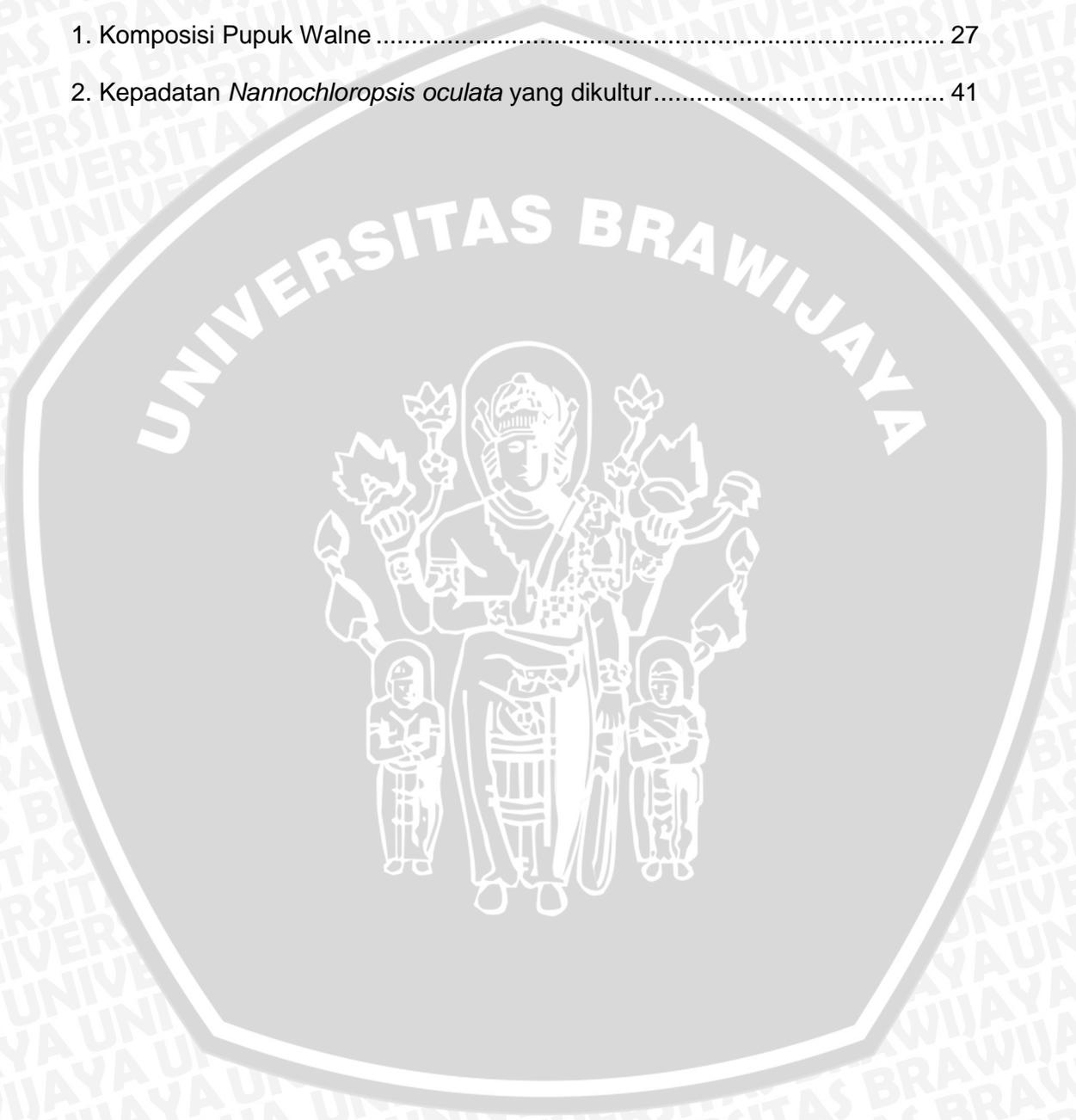
DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mikroalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Nannochloropsis Oculata</i>	7
2.1.2 Sifat dan Ekologi <i>Nannochloropsis oculata</i>	8
2.1.3 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>Nannochloropsis oculata</i>	9
2.1.4 Siklus Pertumbuhan <i>Nannochloropsis oculata</i>	12
2.1.5 Kandungan Pada <i>Nannochloropsis oculata</i>	14
2.1.6 Potensi dan Pemanfaatan <i>Nannochloropsis oculata</i>	15
2.2 <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> (PCP).....	16
2.3 RNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> (PCP)	18
2.4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	19
2.4.1 Nested <i>polymerase chain reaction</i> (PCR)	20
2.5 Enzim Restriksi Endonuklease	21
2.5.1 Enzim Restriksi <i>HindIII</i>	22
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	23
3.1 Materi Penelitian	23
3.2 Alat dan Bahan.....	23
3.3 Metode Penelitian.....	23
3.4 Teknik Pengambilan Data	24

3.4.1 Data Primer.....	24
3.4.2 Data Sekunder.....	25
3.5 Prosedur Penelitian.....	26
3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	26
3.5.2 Kultur Mikroalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	27
3.5.3 Perhitungan Kelimpahan Sel.....	31
3.5.4 Pengukuran Kualitas Air.....	32
3.5.5 Isolasi RNA <i>Nannochloropsis oculata</i>	33
3.5.6 Pengukuran Kadar Protein dan RNA total dengan <i>Nanodrop Spektrofotometri</i>	35
3.5.7 <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	36
3.5.8 Pemotongan Produk RT-PCR dengan Enzim Restriksi.....	38
3.5.9 Elektroforesis Gel Agarosa.....	38
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1 Kepadatan <i>Nannochloropsis oculata</i>	40
4.1.1 Pertumbuhan <i>Nannochloropsis Oculata</i> Skala Laboratorium.....	42
4.1.2 Analisis Kualitas Air.....	44
4.2 Isolasi RNA <i>Nannochloropsis oculata</i>	45
4.3 Kandungan Total RNA.....	47
4.4 Optimalisasi <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	47
4.4.1 Amplifikasi <i>peridinin chlorophyll protein (PCP)</i>	49
4.5 Pola Pemotongan RNA <i>Peridinin Chlorophyl Protein (PCP) Nannochloropsis oculata</i> dengan Enzim Restriksi <i>HindIII</i>	52
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	62
DAFTAR ISTILAH.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Pupuk Walne	27
2. Kepadatan <i>Nannochloropsis oculata</i> yang dikultur	41

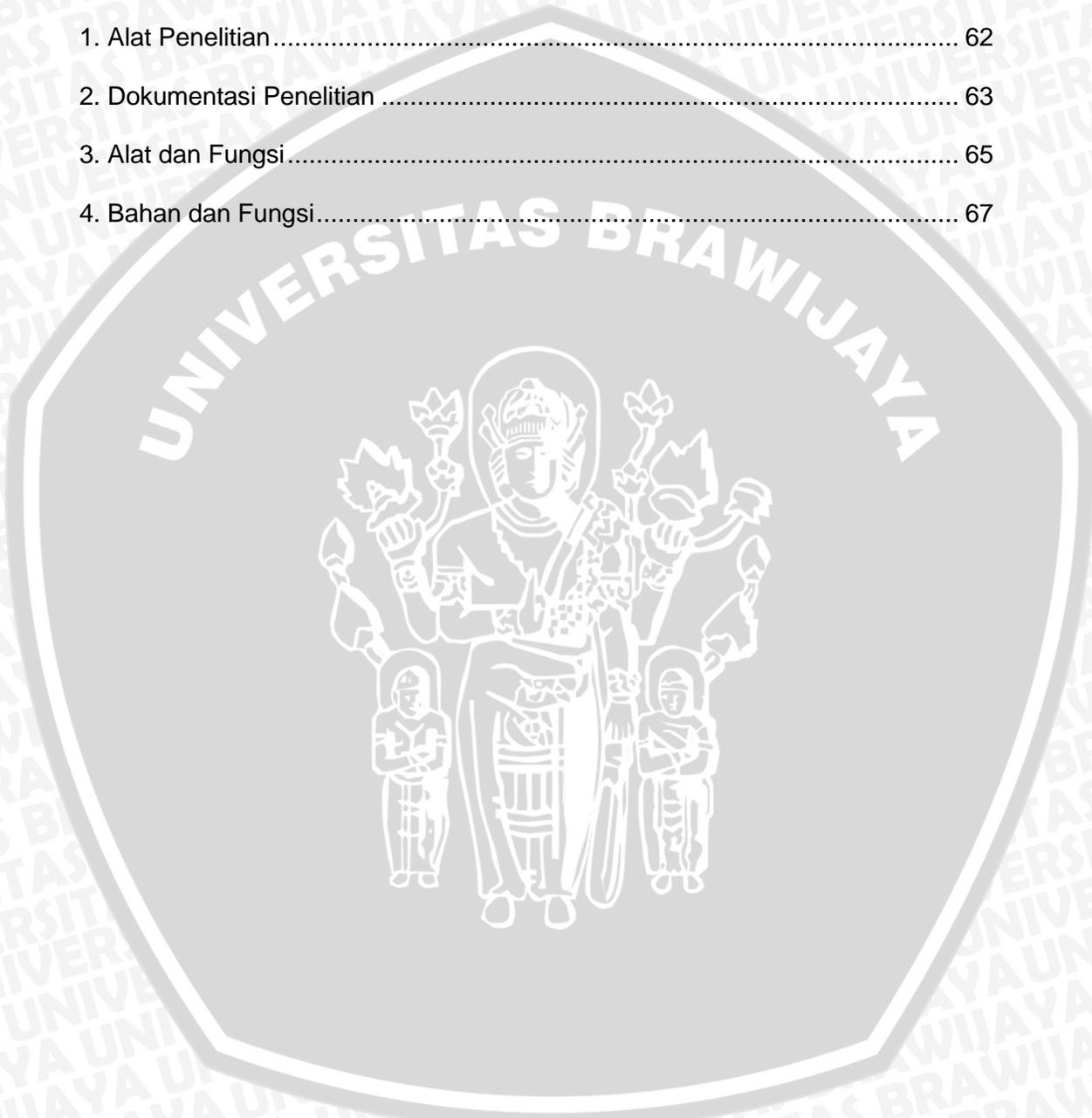


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pendekatan Masalah	3
2. <i>Nannochloropsis oculata</i>	6
3. Morfologi <i>Nannochloropsis oculata</i>	8
4. Karakteristik pertumbuhan sel alga	13
5. Letak Pirenoid/PCP di dalam sel.....	18
6. Pola Pemotongan Enzim Restriksi <i>HindIII</i>	22
7. Pengamatan <i>Nannochloropsis oculata</i>	40
8. Kultur <i>Nannochloropsis oculata</i>	42
9. Grafik Pertumbuhan <i>Nannochloropsis oculata</i>	43
10. Kultur pada Carboy	43
11. Proses Isolasi RNA	46
12. NanoPhotometerTM [Implen]	47
13. Proses RT-PCR	49
14. Perhitungan Melting Temperature.....	50
15. Visualisasi Amplifikasi cDNA.....	51
16. Hasil Pemotongan dengan Enzim Restriksi <i>HindIII</i>	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian.....	62
2. Dokumentasi Penelitian.....	63
3. Alat dan Fungsi.....	65
4. Bahan dan Fungsi.....	67



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga umumnya lebih dikenal sebagai fitoplankton atau ganggang yang hidupnya melayang-layang di permukaan air laut ataupun air tawar, merupakan produsen primer di perairan karena mampu berfotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi lainnya (Kawaroe *et al.*, 2010). Salah satu contoh mikroalga yaitu *Nannochloropsis oculata* dari golongan alga hijau *chlorophyceae*. *Nannochloropsis oculata* jenis ini merupakan mikroalga yang banyak terdapat di perairan dan merupakan salah satu jenis dari mikroalga yang telah banyak dibudidayakan dan digunakan sebagai pakan alami dalam usaha pembenihan ikan dan udang (Atmadja, 1996 dalam Burtin, 2003).

Nannochloropsis oculata memiliki pigmen yang berperan dalam proses fotosintesis sebagai penerima cahaya yaitu *Peridinin chlorophyll protein* (PCP). PCP hanya ditemukan pada sebagian jenis mikroalga tertentu (Weis *et al.*, 2001). Peran peridinin yang sangat penting yaitu sebagai zat antioksidan yang melindungi sel dari bahaya radikal bebas. Selain itu peridinin juga terlibat pada proses transfer energy dan dapat berperan dalam mengurangi resiko kanker jika dikonsumsi dalam bentuk karotenoid (Hirschberg *et al.*, 1994).

Terdapat berbagai macam cara yang dapat dilakukan untuk mendeteksi PCP, salah satunya dengan cara modern menggunakan reaksi berantai seperti *polymerase chain reaction* (PCR). PCR merupakan sebuah teknik menggunakan enzim polymerase yang digunakan untuk amplifikasi DNA atau RNA dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif singkat. Untuk amplifikasi RNA proses PCR terlebih dahulu dilakukan dengan *reverse transcriptase* terhadap molekul RNA sehingga diperoleh

molekul cDNA. Hal ini dilakukan karena dalam proses PCR enzim DNA polymerase hanya dapat bekerja pada cetakan DNA. Molekul cDNA selanjutnya dapat digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR, proses ini disebut *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Auerkari, et al., 1998).

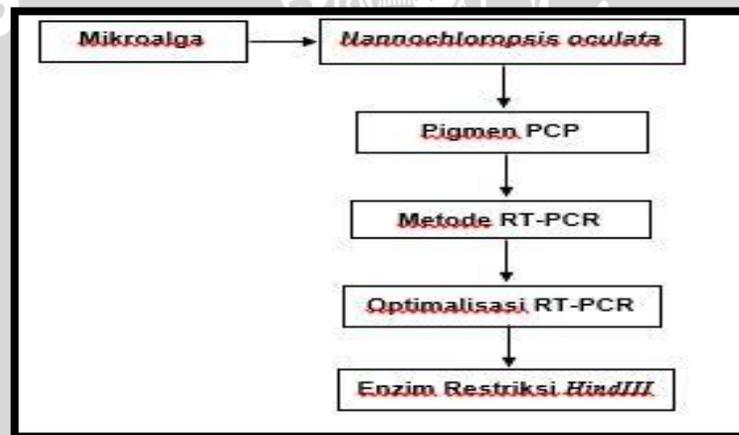
Terdapat beberapa komponen yang terdapat dalam proses RT-PCR antara lain cDNA cetakan yang akan digandakan, primer yaitu suatu potongan dari oligonukleotida pendek yang digunakan untuk mengawali proses sintesis cDNA, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dan enzim DNA polymerase yaitu enzim yang mampu menggabungkan cDNA, enzim ini membutuhkan primer serta cDNA cetakan untuk membentuk untaian molekul cDNA yang panjang (Erich, 1989). Setelah RNA murni telah di transkripsi balik menjadi cDNA proses selanjutnya melakukan proses PCR yang diawali dengan reaksi amplifikasi. Reaksi amplifikasi terdiri dari denaturasi yaitu cDNA cetakan menjadi rantai tunggal, kemudian proses *annealing* suhu pada saat penempelan primer harus disesuaikan sedemikian rupa agar primer dapat menempel pada cDNA cetakan yang berantai tunggal. Selanjutnya proses elongasi dimana enzim polymerase melakukan proses polymerase rantai cDNA yang baru sebagai cetakan bagi reaksi polymerase berikutnya (Yuwono, 2006).

Mengingat *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) didalam mikroalga *Nannochloropsis oculata* memiliki peran dan potensi yang besar, hal ini memicu permintaan yang semakin bertambah memungkinkan PCP ini untuk dapat dikembangkan lebih lanjut. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengembangkan *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) ini yaitu melalui teknik *Reverse Transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Dalam proses amplifikasi pada saat berlangsungnya RT-PCR sering dihasilkan visualisasi amplifikasi cDNA yang belum optimal sehingga pita cDNA tidak terlihat. Hal ini disebabkan oleh beberapa

faktor, yaitu pemilihan primer dan penggunaan kit yang kurang tepat, terdapat kontaminan pada saat proses isolasi RNA, serta perlakuan suhu pada saat *annealing* yang kurang tepat. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bagaimana mengoptimalkan metode *Reverse Transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) RNA PCP *N.oculata* menggunakan enzim restriksi *HindIII* pada mikroalga laut *Nannochloropsis oculata* yang dikultur secara *in vivo*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan pada sub bab sebelumnya diperoleh pendekatan masalah yang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Pendekatan Masalah

Mikroalga umumnya lebih dikenal sebagai fitoplankton merupakan produsen primer di perairan karena mampu berfotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Salah satu contoh mikroalga yaitu *Nannochloropsis oculata* dari golongan alga hijau *chlorophyceae*. *Nannochloropsis oculata* memiliki pigmen yang berperan dalam proses fotosintesis sebagai penerima cahaya yaitu *Peridinin*

chlorophyll protein (PCP). PCP hanya ditemukan pada sebagian jenis mikroalga tertentu

Mengingat *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) didalam mikroalga *Nannochloropsis oculata* memiliki peran dan potensi yang besar, hal ini memicu permintaan yang semakin bertambah memungkinkan PCP ini untuk dapat dikembangkan lebih lanjut. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengembangkan *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) ini yaitu melalui teknik *Reverse Transcriptase polymerase chain reaction* (PCR). Dalam proses amplifikasi pada saat berlangsungnya RT-PCR sering dihasilkan visualisasi amplifikasi cDNA yang belum optimal sehingga pita cDNA tidak terlihat. Berdasarkan hal tersebut maka diperoleh rumusan masalah, yaitu bagaimana mengoptimalkan metode RT-PCR RNA PCP *N. oculata* menggunakan enzim restriksi *HindIII* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya, tujuan penelitian ini yaitu :

1. Untuk mengetahui metode yang tepat dalam mengoptimalkan RT-PCR RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada *Nannochloropsis oculata*
2. Untuk mengetahui tingkat kecocokan situs pemotongan enzim restriksi *HindIII* terhadap target panjang basa *peridinin chlorophyll protein* (PCP) 310 bp pada *Nannochloropsis oculata* menggunakan teknik RT-PCR.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian mengenai optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) menggunakan enzim restriksi *HindIII* adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai optimalisasi metode RT-PCR sehingga proses deteksi dan pengembangan PCP dapat dilakukan dengan cepat dan tepat dan dapat dihasilkan visualisasi cDNA yang terlihat jelas.
2. Memberikan informasi mengenai penggunaan enzim restriksi *HindIII* sehingga dapat menghasilkan pemotongan RNA yang spesifik sesuai target panjang basa PCP 310 bp pada *Nannochloropsis oculata*.
3. Memberikan pengetahuan dalam pengembangan PCP mikroalga laut *Nannochloropsis oculata* melalui teknik RT-PCR

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo untuk melakukan kultur mikroalga *Nannochloropsis oculata* secara *in vivo*, dan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang untuk melakukan proses *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) pada bulan Maret-Mei 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Nannochloropsis oculata*

Mikroalga merupakan spesies *uniseluler* yang dapat hidup soliter maupun berkoloni. Terdapat berbagai macam bentuk dan ukuran mikroalga berdasarkan spesiesnya. Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang memiliki kemampuan untuk menggunakan sinar matahari dan karbondioksida untuk menghasilkan biomassa serta menghasilkan sekitar 50% oksigen yang ada di atmosfer. Mikroalga mempunyai keanekaragaman yang sangat tinggi, dimana terdapat 200.000 – 800.000 spesies mikroalga di bumi, dan baru sekitar 35.000 spesies saja telah diidentifikasi (Assadad *et al.*, 2011). Mikroalga merupakan produsen primer di perairan karena mampu berfotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Penyebaran habitat mikroalga umumnya terdapat di perairan tawar dan perairan laut, mikroalga yang hidup dilaut dikenal dengan sebutan *marine microalgae* atau mikroalga laut. Mikroalga laut berperan penting dalam jaring - jaring makan di laut (Kawaroe *et al.*, 2010).



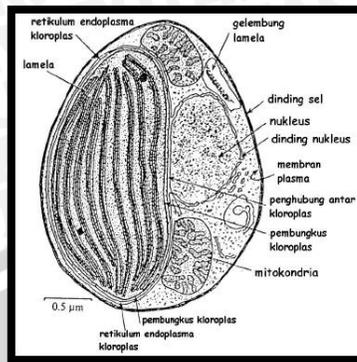
Gambar 2. *Nannochloropsis oculata*
(Sumber : Baharuddin, 2011)

Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jenis *Nannochloropsis oculata eustigmatophyceae*. Mikroalga jenis ini digolongkan ke dalam kategori alga hijau dan memiliki sel berwarna kehijauan. Selnya berbentuk bola berukuran sedang dengan diameter 2-4 μm dan memiliki dua flagella yang salah satu flagellanya sangat tipis (Maruyama *et al.*, 1986).

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi *Nannochloropsis Oculata*

Mikroalga merupakan protista autotrof *eukariotik*, yang dibedakan atas dinding sel, flagella, kloroplast dan cadangan makanan. Mikroalga memiliki pigmen fotosintetik hijau (klorofil), coklat (fikosantin), biru kehijauan (fikobilin), dan merah (fikoreritrin) dan kebanyakan hidup di air (mensuplai 50% oksigen perairan dan penyusun utama plankton), lainnya di permukaan yang lembab. Secara morfologis, mikroalga dapat berupa sel tunggal atau membentuk koloni dan mampu bertahan hidup hampir di seluruh habitat perairan (Reynold, 2006). Menurut Hibberd (1981), klasifikasi *Nannochloropsis oculata* yaitu sebagai berikut :

Kingdom	: Protista
Sub Kingdom	: Eukaryotes
Phylum	: Chromophyta
Class	: Eustigmatophyceae
Ordo	: Eustigmatales
Family	: Monodopsidaceae
Genus	: <i>Nannochloropsis</i>
Spesies	: <i>Nannochloropsis oculata</i>



Gambar 3. Morfologi *Nannochloropsis oculata*
(Sumber: Hoek *et al.*, 1998)

Sel mikroalga *Nannochloropsis oculata* ini berbentuk bola, berukuran kecil dengan ukuran sel 2-4 mikron, berwarna hijau dan memiliki dua flagella yang salah satu flagella berambut tipis. *Nannochloropsis oculata* memiliki kloroplas dan nukleus yang dilapisi membran. *Nannochloropsis oculata* dapat berfotosintesis karena memiliki klorofil. Ciri khas dari *Nannochloropsis oculata* yaitu memiliki dinding sel yang terbuat dari komponen selulosa (Maruyama *et al.*, 1986).

2.1.2 Sifat dan Ekologi *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis oculata dapat tumbuh optimum dengan salinitas 25-35 ppt, kisaran suhu yang optimal untuk pertumbuhannya yaitu 25-30 °C. Mikroalga ini dapat tumbuh baik pada kisaran pH 8-9,5 dan intensitas cahaya 100-10.000 lux. Bereproduksi secara aseksual dengan pembelahan sel. Kepadatan optimum yang dapat dicapai untuk skala laboratorium 50- 60 juta sel/mL, skala semi massal 20-25 juta sel/mL dan skala massal 15-20 juta sel/mL dengan masa kultur 4-7 hari (Anon, 2009). Menurut Meritasari *et al.*, (2010), mikroalga *Nannochloropsis oculata* dapat dikultur di berbagai macam perlakuan, seperti perlakuan di ruangan dingin, perlakuan di ruangan

panas, dan perlakuan di bawah paparan sinar matahari langsung yang dapat tumbuh secara optimal.

2.1.3 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*

a) pH

pH atau derajat keasaman merupakan aktivitas ion hydrogen dalam perairan. Batas pH untuk pertumbuhan atau perkembangbiakan suatu mikroorganisme merupakan suatu gambaran dari batas pH bagi kegiatan enzim. Metabolisme dan pertumbuhan mikroalga dapat dipengaruhi oleh variasi pH dalam beberapa hal yaitu, mengubah ketersediaan nutrient, dapat mempengaruhi fisiologis sel, dan mengubah keseimbangan dari karbon organik (Suriawiria, 2005).

pH akan mempengaruhi toksisitas semua senyawa kimia. Variasi pH dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan mikroalga dalam beberapa hal, antara lain mengubah keseimbangan dari karbon organik, mengubah ketersediaan nutrient, dan dapat mempengaruhi fisiologis sel. Secara umum kisaran pH yang optimum pada kultur *Nannochloropsis* sp. antara 7-9 (Effendi, 2003). Nilai keasaman pH merupakan salah satu faktor penting didalam pertumbuhan mikroalga baik jenis alga hijau biru dan alga hijau pada umumnya (Hariyati, 2008).

b) Salinitas

Kisaran salinitas yang berubah-ubah dapat mempengaruhi dan menghambat pertumbuhan dari mikroalga. Beberapa mikroalga dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang tinggi tetapi ada juga mikroalga yang dapat tumbuh dalam kisaran salinitas yang rendah. Pengaturan salinitas pada medium yang diperkaya dapat dilakukan dengan pengenceran dengan menggunakan air tawar. Kisaran salinitas

yang dimiliki oleh *Nannochloropsis sp.* antara 32 – 36 ppt, tetapi salinitas paling optimum untuk pertumbuhan *Nannochloropsis sp.* adalah 33- 35 ppt (Effendi, 2003).

Salinitas merupakan salah satu faktor yang dapat berpengaruh secara langsung maupun tidak langsung terhadap pertumbuhan suatu organisme. Pertumbuhan mikroalga terpengaruh oleh kisaran salinitas yang berubah-ubah. Terdapat beberapa mikroalga yang dapat tumbuh dalam salinitas yang tinggi maupun kisaran salinitas yang rendah. Namun sebagian besar jenis mikroalga dapat tumbuh optimal pada salinitas dibawah habitat asal. Pada kultur mikroalga pengaturan salinitas dapat dilakukan dengan cara pengenceran menggunakan air tawar (Fachrullah, 2011).

c) Suhu

Setiap organisme mempunyai kemampuan yang terbatas untuk mentolerir perubahan suhu yang terjadi di sekitarnya. Suatu organisme dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik pada kondisi suhu yang optimal. Jika terjadi perubahan suhu secara signifikan dibawah atau diatas suhu optimal dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan organisme tersebut, bahkan dapat mengalami kematian (Wahyudi, 1999).

Menurut Fogg (1975), salah satu faktor penting yang berpengaruh dalam kehidupan dan laju pertumbuhan suatu organisme adalah suhu. Pengaruh secara langsung yaitu terhadap aktivitas enzim dalam metabolisme sel suatu organisme, sedangkan pengaruhnya secara tidak langsung yaitu akan dapat mempengaruhi kondisi lingkungan media pertumbuhan organisme tersebut.

d) Cahaya

Proses fotosintesis dilakukan oleh tanaman pada umumnya begitu juga pada mikroalga. Sumber energi untuk melakukan proses fotosintesis yaitu cahaya. Oleh karena itu periode penyinaran, kualitas dan intensitas cahaya perlu diperhatikan. Dalam budidaya mikroalga, intensitas cahaya berperan penting tergantung kebutuhannya. Jika intensitas cahaya terlalu tinggi dapat menghambat proses fotosintesa. Maka dari itu mikroalga membutuhkan cahaya untuk pertumbuhannya (Ekawati, 2005).

Cahaya merupakan sumber energi dalam proses fotosintetis yang berguna untuk pembentukan senyawa karbon organik. Kebutuhan akan cahaya bervariasi tergantung kedalaman kultur dan kepadatannya. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat menyebabkan pemanasan. Intensitas cahaya 1.000 lux sesuai untuk kultur dalam Erlenmeyer, sedangkan intensitas 5.000-10.000 lux untuk volume yang lebih besar (Coutteau, 1996).

e) Nutrien

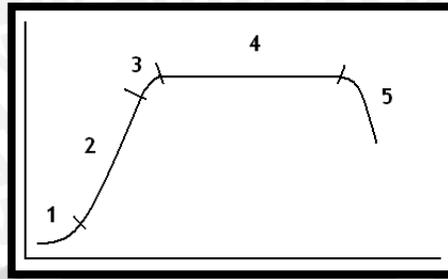
Nannochloropsis oculata dapat tumbuh dengan optimum jika kebutuhan nutrient dapat tercukupi. Terdapat tiga komponen penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel *Nannochloropsis oculata* yaitu karbondioksida, cahaya dan nutrient (Diharmi, 2001). Senyawa anorganik baik hara makro (N, P, K, S, Na, Si dan Ca) maupun hara mikro (Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Mo, Co, B) dibutuhkan pada kultur plankton. Setiap unsur hara tersebut mempunyai peran dalam pembentukan protein, seperti unsur N, P dan S (Pamukas, 2011).

f) Aerasi

Aerasi dalam kultur mikroalga digunakan untuk proses pengadukan medium kultur. Pengadukan sangat penting dilakukan yang bertujuan untuk mencegah dari pengendapan sel, nutrisi dapat tersebar sehingga mikroalga dalam kultur mendapatkan nutrisi yang sama, mencegah stratifikasi suhu, dan meningkatkan pertukaran gas dari udara ke medium. Budidaya dengan kepadatan tinggi CO₂ yang berasal dari udara mengandung 0,03%. Karbondioksida merupakan faktor pembatas dalam pertumbuhan mikroalga, maka dari itu perlu dilakukan proses aerasi untuk memasok oksigen didalam media budidaya mikroalga (Ekawati, 2005). Proses aerasi dilakukan dengan tujuan agar sel dapat memperoleh nutrisi dalam media kultur secara merata karena adanya sirkulasi air didalam wadah kultur mikroalga (Amini, 2006).

2.1.4 Siklus Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*

Menurut Hadiwigeno (1990) *Nannochloropsis oculata* perkembangbiakannya terjadi secara aseksual dengan melakukan pembelahan sel dari sel induknya. Mikroalga jenis *Nannochloropsis oculata* ini hidup menempel bebas pada binatang invertebrata. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Widianingsih *et al.*, (2011) bahwa usia kultur *Nannochloropsis oculata* dari fase awal sampai kematian berlangsung selama 1-18 hari tergantung pada ketersediaan unsur hara. Berikut merupakan gambar keempat fase tersebut dapat ditunjukkan dengan kurva jumlah sel terhadap waktu seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Karakteristik pertumbuhan sel alga (Fogg 1975)

Keterangan:

1. Fase lag (adaptasi)
2. Fase eksponensial (logaritmik)
3. Fase deklinasi
4. Fase stasioner
5. Fase Kematian

Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1975), Fase atau siklus pertumbuhan mikroalga *Nannochloropsis oculata* terdiri dari beberapa fase. Siklus tersebut yaitu :

a) Fase Istirahat (Fase Lag)

Pada fase ini setelah pemberian inokulum ke dalam media kultur, terjadi fase lag karena sel memerlukan penyesuaian dengan lingkungan yang baru sebelum memulai pembiakan (pembelahan). Penyesuaian dalam hal ini berarti suatu masa ketika sel mengalami kekurangan metabolit dan enzim akibat keadaan yang tidak menguntungkan dalam pembiakan sebelumnya. Pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah sel.

b) Fase Eksponensial (Logaritmik)

Selama fase ini sel membelah dengan cepat, jumlah sel bertambah dengan kecepatan konstan, dan sel-sel berada dalam keadaan stabil. Bahan sel baru terbentuk dengan konstan dan massa bertambah secara eksponensial. Hal ini

bergantung pada beberapa faktor contohnya yaitu jika tidak satu atau lebih zat makanan dalam pembenihan habis, maka tentu hasil metabolisme beracun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.

c) Fase penurunan laju pertumbuhan

Pada fase ini, laju pertumbuhan sel menurun. Penurunan pertumbuhan ini terjadi akibat adanya kompetisi yang tinggi dalam media hidup dan zat makanan yang tersedia dalam media tidak mencukupi kebutuhan populasi yang bertambah dengan cepat pada fase eksponensial. Akibatnya hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan cukup nutrisi untuk tumbuh dan membelah diri.

d) Fase Stasioner

Selama fase ini jumlah sel cenderung konstan. Hal ini disebabkan oleh semakin menipisnya ketersediaan nutrisi dan habisnya nutrisi dalam medium atau karena menumpuknya hasil metabolisme yang beracun sehingga mengakibatkan pertumbuhan berhenti. Pada fase ini, adanya kehilangan sel yang lambat karena kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel yang baru melalui pembelahan.

e) Fase Kematian

Pada fase ini jumlah populasi menurun. Jumlah sel yang mati per satuan waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan. Hal ini ditandai dengan perubahan kondisi operasi.

2.1.5 Kandungan Pada *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis oculata memiliki sejumlah kandungan pigmen dan nutrisi seperti protein (52,11%), karbohidrat (16%), vitamin C (0,85%), dan klorofil a (0,89%).

Nannochloropsis oculata. Memiliki kandungan lemak yang cukup tinggi (31-68%),

sedangkan Isochrysis (17,07%) dan Dunaliella hanya (6%) (Erlania, 2010). Komposisi asam lemak dari *Nannochloropsis oculata* dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan seperti intensitas cahaya. Faktor tersebut juga mempengaruhi proses fotosintesis dan mempengaruhi sel asam lemak sintesis dan metabolismenya. Menurut Chiu *et al.*, (2008) mengatakan bahwa mikroalga *Nannochloropsis oculata* dapat tumbuh dengan baik dengan aerasi karbondioksida daripada aerasi biasa, kaitannya dengan pertumbuhan mikroalga dengan sumber karbon yang cukup tanpa pembatasan sumber karbon. Dibiidang budidaya *Nannochloropsis oculata* banyak dimanfaatkan sebagai tambahan nutrisi untuk pakan larva ikan dan udang.

Nannochloropsis oculata memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi yaitu antara 31-68% berat kering. *Nannochloropsis sp.* mengandung Vitamin B12 dan *Eicosapentaenoic acid* (EPA) sebesar 30,5% dan total kandungan omega 3 HUFAs sebesar 42,7%, serta mengandung protein 57,02% dikultur untuk pakan *Barchionus plicatilis* atau *Rotifer* karena mengandung Vitamin B12 (Fachrullah, 2011). *Nannochloropsis oculata* juga memiliki pigmen seperti violaxanthin, astaxanthin, antheraxanthin, vaucheriaxanthin, zeaxanthin, canthaxanthin, *B-carotene*, dan chlorophyll *a*. *B-carotene*, vaucheriaxanthin, dan violaxanthin merupakan pigmen terbesar yang terdapat didalam *Nannochloropsis oculata* (Karlson *et al.*, 1996).

2.1.6 Potensi dan Pemanfaatan *Nannochloropsis oculata*

Sebagai salah satu komoditi hasil perairan, mikroalga dapat menjadi alternatif untuk dikembangkan karena memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan sebagai pakan maupun pangan. Pada umumnya spesies mikroalga dapat menghasilkan produk yang khas seperti karotenoid, antioksidan, dan asam lemak. Salah satu contoh mikroalga laut yaitu *Nannochloropsis oculata* dari kelas *eustigmatophyceae*,

merupakan mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan terutama sebagai sumber karotenoid. (Hossain *et al.*, 2008). Menurut Del Campo *et al.*, (2001), mikroalga merupakan sumber alami untuk berbagai senyawa penting, termasuk pigmen. Selain memiliki klorofil sebagai pigmen fotosintesisnya, mikroalga khususnya alga hijau juga memiliki karotenoid sebagai pigmen tambahan. Mikroalga dan makroalga merupakan salah satu penghasil karotenoid terbesar. Karotenoid utama yang dimiliki alga hijau diantaranya β -karoten, lutein, violaxantin, anteraxantin, zeaxantin, dan neoxantin. Karotenoid-karotenoid tersebut diproduksi oleh beberapa spesies mikroalga yaitu *Dunaliella salina*, *Haemotococcus pluvialis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Anthrospira platensis*, serta *Nannochloropsis oculata*, dan juga beberapa spesies makroalga lainnya (Atmadja, 1996 dalam Burtin, 2003).

Pada tumbuhan dan algae karotenoid memegang peranan penting dalam proses fotosintesis bersama dengan klorofil. Karotenoid mempunyai manfaat bagi kehidupan manusia karena jumlah pigmen yang berlimpah di alam. Karotenoid memberikan kontribusi yang besar bagi berbagai sektor kehidupan terutama sebagai sumber vitamin A yang bermanfaat bagi organ visual, pewarna makanan, bahan aditif pada makanan, penambah sel darah merah, antioksidan, antibakteria, meningkatkan imunitas, serta pengganti sel-sel yang rusak (Ndiha, 2009 dan Kusmiati *et al.*, 2010).

2.2 Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)

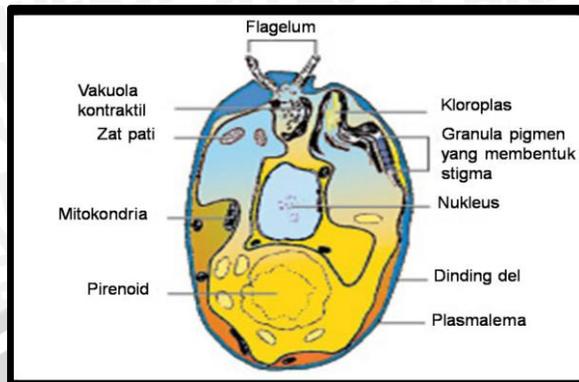
Pigmen yang berfungsi sebagai penerima cahaya dalam proses fotosintesis yaitu *Peridinin chlorophyll protein* (PCP). Pada panjang gelombang 470-550 nm (warna hijau-biru) PCP ini dapat menyerap energi matahari. PCP mempunyai dua macam yaitu monomer (bentuk panjang) dan modimer (bentuk pendek). Bentuk bentuk panjang *monomer* memiliki masa molekul sekitar 30-35 kDa, sedangkan

bentuk pendek *modimer* memiliki masa molekul sekitar 14-16 kDa. Namun yang ditemukan hanya memiliki satu bentuk pirenoid pada sebagian jenis alga. (Weis *et al.*, 2001). Peridinin merupakan pigmen utama dari PCP, dan PCP berbeda dengan penerima cahaya lain yang berbasis karotenoid. Struktur kristal PCP menunjukkan kontak erat antar kelompok pigmen. Unit pigmen terkecil PCP terdiri atas empat molekul peridinin yang mengelilingi pusat sebuah klorofil a. (Krueger *et al.*, 2001).

PCP (*peridinin chlorophyll protein*) merupakan bagian dari pirenoid (*peridinin cell pigment*). Pada bagian belakang kloroplas yang menebal terdapat pirenoid tersebut. Pada saat intensitas cahaya tinggi, peridinin terlihat besar. Sedangkan pada saat intensitas rendah, peridinin tampak longgar dan berbeda, terdapat banyak gelembung-gelembung lemak kecil yang tersebar di seluruh bagian kloroplas. (Ginzburg, 1988).

Kaitannya dengan klorofil, PCP merupakan salah satu komponen penyusun nutrisi pada *Nannochloropsis oculata*. PCP merupakan pigmen protein kompleks dan dalam proses fotosintesis berperan sebagai penerima cahaya, PCP merupakan protein yang larut dalam air. Protein termasuk dalam karotenoid berfungsi sebagai penerima cahaya. PCP sebagai pendukung kerja kloroplas menyerap gelombang cahaya yang tidak dapat diserap oleh kloroplas itu sendiri (450-550 nm) sehingga penyerapan cahaya dapat berlangsung dengan optimal (Ogata *et al.*, 2009).

Peridinin mempunyai peran yang sangat penting pada saat proses fotosintesis didalam organisme eukariotik. Peran peridinin yang sangat penting yaitu sebagai zat antioksidan yang melindungi sel dari bahaya radikal bebas. Selain itu peridinin juga terlibat pada proses transfer energy dan dapat berperan dalam mengurangi resiko kanker jika dikonsumsi dalam bentuk karotenoid (Hirschberg *et al.*, 1994).



Gambar 5. Letak Pirenoid/PCP di dalam sel (Sumber : Fitri, 2012)

2.3 RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP)

Asam ribonukleat (RNA) merupakan asam nukleat beruntai tunggal yang berperan utama dalam proses ekspresi gen. Salah satu molekul asam nukleat yang terbentuk dari asam dioksiribonukleat (DNA) yaitu asam ribonukleat (RNA). Fungsi dari RNA yaitu mensintesis protein dalam inti sel (Tiara *et al.*, 2014). RNA merupakan polimer yang disebut polinukleotida, dimana setiap polinukleotida yang tersusun atas monomer-monomer nukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas tiga bagian, yaitu gugus fosfat, basa nitrogen dan gula pentose. Basa nitrogen RNA terdiri dari adenin, guanin, sitosin dan urasil. Urutan basa-basa nitrogen tersebut dapat mengkode informasi genetik (Campbell *et al.*, 2010 dalam Annisa, 2012).

Bahan genetik yang berperan penting dalam ekspresi genetic yaitu asam ribonukleat (RNA). RNA merupakan perantara informasi yang dibawa DNA dan ekspresi fenotipik yang diwujudkan dalam bentuk protein dalam genetika molekular. RNA yang tersebar di alam terdapat dalam berbagai wujud atau tipe. RNA berwujud sepasang pita (dsRNA) sebagai bahan genetika, sementara dalam genetika molekular terdapat tiga tipe RNA yang terlibat dalam proses sintesis protein, yaitu *messenger*-RNA (mRNA), *ribosomal*-RNA (rRNA), *transfer*-RNA (tRNA). rRNA dengan protein

ribosomal berfungsi untuk membentuk ribosom sebagai tempat sintesis protein. mRNA berfungsi sebagai penyandi urutan asam amino pada polipeptida. Sedangkan *transfer-RNA* (tRNA) berfungsi membawa asam amino ke ribosom pada saat translasi (Agustina *et al.*, 2011).

2.4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) merupakan salah satu varian dari *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ini dikembangkan untuk melakukan analisis terhadap molekul RNA hasil transkripsi yang terdapat dalam jumlah sedikit di dalam sel. PCR tidak dapat dilakukan dengan menggunakan RNA sebagai cetakan sehingga terlebih dahulu dilakukan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementary DNA*). Selanjutnya molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Teknik RT-PCR berguna untuk amplifikasi RNA sebelum dilakukan cloning dan analisis dan untuk mendeteksi ekspresi gen (Yuwono, 2006).

Enzim yang digunakan dalam proses RT PCR yaitu enzim *reverse transcriptase* dimana hanya enzim jenis ini yang dapat mensintesis DNA dengan cetakan RNA. Enzim ini merupakan enzim DNA polymerase yang menggunakan molekul RNA sebagai cetakan untuk menyintesis molekul DNA (cDNA) yang komplementer dengan molekul RNA tersebut. Beberapa enzim *transcriptase* yang dapat digunakan yaitu *mesophilic viral reverse transcriptase* (RTase) dan Tth DNA polymerase (Yuwono, 2006).

RT-PCR menggunakan sepasang primer yang berkomplemen dengan sequens yang jelas dari masing-masing dua untai cDNA. Tahap pertama terjadi proses *annealing* untuk memasang primer untuk memperpanjang segmen cDNA. Primer tersebut kemudian diperpanjang dengan bantuan enzim DNA polymerase dan akan menghasilkan sebuah untai gandaan pada setiap siklusnya dan seterusnya mengikuti amplifikasi logaritmik. Setelah terbentuk segmen cDNA ini, baru kemudian masuk kepada proses PCR biasa (Hoffman *et al.*, 2009).

2.4.1 Nested *polymerase chain reaction* (PCR)

Dalam Nested *polymerase chain reaction* (PCR) digunakan dua set primer dengan satu set primer yang lebih panjang untuk amplifikasi awal dan satu set primer yang lebih pendek untuk mengamplifikasi kembali amplicon dari amplifikasi oleh primer yang lebih panjang. Nested PCR digunakan untuk meningkatkan sensitivitas serta spesifitas dari amplifikasi DNA (Newton dan Graham, 1994).

Dalam proses nested *polymerase chain reaction* (PCR) ini dapat mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dalam metode ini menggunakan dua set primer, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut primer inner disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai outer primer. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan outer primer, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan inner primer atau nested primer menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. Nested primer akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek dari pada produk yang pertama (Yusuf, 2010).

2.5 Enzim Restriksi Endonuklease

Pada tahun 1962 enzim restriksi endonuclease ini ditemukan oleh Arber, kemudian pada tahun 1974 Nathans dan H. Smith melakukan purifikasi dan karakterisasi enzim tersebut (Alberts *et al.*, 1983). Nuklease merupakan enzim yang memotong molekul DNA dengan memutuskan ikatan fosfodiester antara nukleotida satu dengan nukleotida berikutnya. Secara umum enzim nuclease dibedakan menjadi dua yaitu DNase (mendepolimerisasi DNA) dan RNase (mendepolimerisasi RNA). DNase dibedakan menjadi dua macam yaitu eksonuklease yaitu DNase yang memotong DNA dari ujung molekul 5' atau dari ujung 3', dan endonuclease yaitu DNase yang memotong DNA dari bagian dalam untaian DNA. Enzim endonuclease memiliki ciri khas yaitu hanya memotong DNA untai ganda yang mempunyai urutan nukleotida tertentu (Yuwono, 2008).

Enzim endonuklease restriksi dibagi menjadi tiga tipe berdasarkan perbedaan dalam cara pemotongannya. Terdapat tiga tipe endonuklease restriksi yaitu tipe I, tipe II, dan tipe III. Endonuklease restriksi tipe II tersebar luas di alam. Sebagian besar enzim ini ditemukan pada bakteri, namun enzim ini juga dapat diisolasi dari virus, archaea, dan eukariota (Pingoud *et al.*, 1993).

Saat ini telah ditemukan lebih dari 3000 jenis enzim restriksi dan banyak di antaranya yang merupakan isoschizomer atau neoschizomer. Neoschizomer merupakan suatu enzim lain yang mengenal sekuens DNA yang sama namun memotong pada situs yang berbeda dengan enzim restriksi endonuklease tersebut (Roberts dan Halford, 1993). Sedangkan isoschizomer merupakan suatu enzim lain yang memiliki sekuens pengenalan dan pemotongan DNA yang sama dengan enzim restriksi endonuklease (Pingoud *et al.*, 1993).

2.5.1 Enzim Restriksi *HindIII*

Enzim restriksi berasal dari bakteri *Haemophilus influenza* Rd dan memotong DNA pada urutan pasang basa A/AGCT dengan bantuan Mg^{2+} . Enzim *HindIII* mempunyai berat molekul sebesar 34.950 Da dan terdiri dari 300 asam amino. Sedangkan urutan DNA yang mengkode enzim *HindIII* ini terdiri atas 903 bp (Watanabe, *et al.*, 2009). Pada gambar berikut menunjukkan pola pemotongan enzim *HindIII* dengan pola *sticky end* (ujung lancip) :



Gambar 6. Pola Pemotongan Enzim Restriksi *HindIII*
(Sumber: Campbell, 2010)

Penggunaan enzim restriksi *HindIII* secara umum sama dengan enzim restriksi pada umumnya. Enzim *HindIII* ini bekerja dengan optimal pada suhu 37°C dalam campuran enzim, jumlah DNA, dan buffer yang tepat (Fatchiyah *et al.*, 2011). Enzim *HindIII* termasuk dalam enzim restriksi tipe II. Enzim restriksi tipe II lebih spesifik dalam memotong urutan DNA jika dibandingkan dengan enzim restriksi tipe I dan tipe III. Enzim restriksi tipe I dan tipe III dalam memotong DNA kurang spesifik karena akan memotong jauh dari urutan yang dikenali oleh enzim tersebut. Sedangkan enzim *HindIII* yang termasuk dalam enzim restriksi tipe II memotong tepat pada urutan yang dekat atau dikenali dengan urutan yang dikenalnya (Sudjadi, 2008).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah optimalisasi *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) menggunakan enzim restriksi *HindIII* pada mikroalga laut *Nannochloropsis oculata* yang dikultur secara *in vivo*. Sebagai data pendukung dalam penelitian ini juga dilakukan pengamatan kepadatan sel dan pengamatan parameter kualitas air kultur *N. oculata*.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan berguna untuk menunjang penelitian ini. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 3 dan 4.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif dan eksploratif. Menurut Suharsimi (2006), metode deskriptif merupakan metode penelitian yang dimaksudkan untuk mengumpulkan informasi mengenai status suatu gejala yang ada, secara apa adanya pada saat penelitian dilakukan. Teknik pengambilan data dalam penelitian ini meliputi data primer dan sekunder. Metode deskriptif dalam penelitian ini bertujuan untuk melaporkan hasil optimalisasi RT-PCR RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Nannochloropsis oculata*.

Penelitian eksploratif bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru, menggambarkan keadaan suatu fenomena, tidak dimaksudkan untuk menguji

hipotesis tertentu tetapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variable, gejala atau keadaan (Arikunto, 2002 dalam Mabrudy, 2013). Metode eksploratif pada penelitian ini bertujuan untuk mencari metode yang tepat dalam mengoptimisasi *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Nannochloropsis oculata* dan untuk mengetahui tingkat kecocokan situs pemotongan enzim restriksi *HindIII* terhadap target panjang basa PCP (310 bp) pada *Nannochloropsis oculata* menggunakan teknik RT-PCR.

3.4 Teknik Pengambilan Data

3.4.1 Data Primer

Data primer adalah data yang diperoleh atau dikumpulkan oleh peneliti secara langsung dari sumber data utama. Data primer disebut juga sebagai data asli atau data baru yang memiliki sifat *up to date*. Untuk mendapatkan data primer, peneliti harus mengumpulkannya secara langsung. Teknik yang dapat digunakan peneliti untuk mengumpulkan data primer antara lain observasi, wawancara, dan penyebaran kuesioner (Aedi, 2010).

1. Wawancara (Interview)

Menurut Sugiyono (2012) wawancara dapat dilakukan secara terstruktur (peneliti telah mengetahui dengan pasti tentang informasi apa yang akan diperoleh) maupun tidak terstruktur (peneliti tidak menggunakan pedoman wawancara yang telah tersusun secara sistematis dan lengkap sebagai pengumpul datanya) dan dapat dilakukan secara langsung (tatap muka) maupun secara tidak langsung (melalui media seperti telepon).

2. Observasi

Observasi yakni teknik pengumpulan data dimana penyelidik mengadakan pengamatan secara langsung terhadap gejala - gejala subyek yang diselidiki, baik pengamatan itu dilakukan dalam situasi sebenarnya maupun dilakukan di dalam situasi buatan yang khusus diadakan (Surakhmad, 2004).

3. Partisipasi Aktif

Partisipasi aktif adalah keterlibatan dalam suatu kegiatan yang dilakukan secara langsung di lapangan (Nazir, 1988). Pada penelitian ini, kegiatan partisipasi aktif yang diikuti secara langsung adalah kultur dan pemanenan *Nannochloropsis oculata* serta isolasi RNA *N. oculata*, dan PCR *N. oculata*.

4. Dokumentasi

Dokumentasi merupakan cara mengumpulkan data melalui mempelajari, mencatat, menyalin dokumen atau catatan yang bersumber dari peninggalan tertulis seperti arsip, termasuk juga buku tentang teori, pendapat, dalil dan hukum (Widiastuti, 2014). Pada Penelitian ini, dokumentasi dilakukan dengan cara mengambil gambar atau foto dengan menggunakan kamera dan mencatat data dari Laboratorium pakan alami di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo.

3.4.2 Data Sekunder

Data sekunder merupakan data yang diperoleh secara tidak langsung, pengumpulannya diperoleh oleh peneliti atau berasal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari Biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Menurut Widi (2010), data sekunder dapat diperoleh melalui beberapa kategori, antara lain: (1) publikasi lembaga pemerintahan atau non

pemerintahan seperti: data sensus, data statistik, survei pekerja, laporan kesehatan, informasi ekonomi, informasi demografi. (2) penelitian terdahulu (3) laporan atau catatan pribadi (4) media massa. Hal yang harus diperhatikan dalam pengambilan penggunaan data sekunder yaitu kebenaran data dan valid tidaknya suatu data. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, majalah, internet, buku-buku serta instansi pemerintahan yang terkait guna menunjang keberhasilan penelitian.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan untuk kultur *Nannochloropsis oculata* harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi merupakan suatu perlakuan yang bertujuan untuk membersihkan alat dan bahan dari mikroorganisme yang tidak diinginkan. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk melakukan sterilisasi alat dan bahan sehingga bebas dari kontaminasi, misalnya dengan menggunakan autoclave, perebusan, penyaringan dan penambahan kaporit. Adapun langkah-langkah yang dilakukan pada sterilisasi ini antara lain :

- Peralatan yang terbuat dari gelas seperti test tube, erlenmeyer, gelas ukur, dan pipet tetes disterilkan menggunakan stericell. Peralatan tersebut dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun, dibilas dengan air tawar dan ditunggu hingga kering. Setelah kering ditutup rapat menggunakan aluminium foil.
- Peralatan kemudian diatur rapi dalam stericell dan dioperasikan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Sterilisasi peralatan lain seperti toples, carboy, selang aerasi dan batu aerasi dilakukan dengan mencuci dan menyikat terlebih dahulu dengan menggunakan detergen, kemudian dibilas dengan air tawar.

- Untuk carboy dan aerator, setelah dicuci kemudian direndam dengan menggunakan larutan kaporit dengan dosis 10 ppm selama 24 jam. Bak conicel disterilisasi dengan cara dicuci dan disikat dengan detergen sampai kotoran-kotoran yang menempel hilang, kemudian dibilas dengan air tawar. Selanjutnya dinding bak disiram dengan kaporit hingga kaporit kering. Setelah kering, sikat kembali dan bilas dengan air tawar.
- Menyimpan alat dan bahan yang sudah disterilisasi.

3.5.2 Kultur Mikroalga *Nannochloropsis oculata*

Media yang digunakan untuk kultur adalah air laut yang telah disterilkan dan ditambah nutrisi (dipupuk). Air laut disterilkan dengan cara penyaringan, perebusan, dan penambahan larutan kaporit. Jenis pupuk yang digunakan pada kultur mikroalga *Nannochloropsis oculata* adalah pupuk Conway atau Walne dengan dosis pemakaian 1 ml/L. Pupuk Walne digunakan karena komposisinya sederhana. Adapun komposisi dari pupuk Walne disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Pupuk Walne

Skala Laboratorium		Skala Intermediate	
Bahan	Dosis	Bahan	Dosis
Aquades	1 ltr	Air	10 liter
EDTA	45 gr	KNO ₃	1000 gr
NaNO ₃	100 gr	Na ₂ HPO ₄	100 gr
H ₃ BO ₃	33,6 gr	FeCl ₃	13 gr
NaH ₂ PO ₄	20 gr	EDTA	100 gr
MnCl	0,36 gr		
FeCl ₃	1,3 gr		

Kultur murni *Nannochloropsis oculata* terbagi menjadi dua tahapan. Tahap pertama merupakan tahap kultur laboratorium yang dimulai dengan melakukan kultur pada tes tube, erlenmeyer, toples volume 3 liter dan carboy volume 15 liter. Tahap

kedua yaitu kultur intermediet yang dilakukan pada bak conicel dengan volume 500-1000 liter. Bibit awal *Nannochloropsis oculata* diperoleh dari air laut, kemudian dibiakkan dalam media agar. Koloni *Nannochloropsis oculata* yang telah tumbuh banyak kemudian diisolasi dan digunakan sebagai starter. Menurut BPBAP Situbondo (2012), tahap-tahap kultur murni plankton skala laboratorium dan intermediet adalah sebagai berikut.

1. Kultur Skala Laboratorium

a) Kultur pada Test Tube

Langkah-langkah yang dilakukan dalam kultur plankton pada test tube yaitu :

- Menyiapkan air laut yang telah steril sebagai media kultur
- Menambahkan pupuk Walne dan vitamin (B12 dan B1) dengan dosis 1 ml/L untuk melengkapi nutrisi plankton
- Mengambil starter atau bibit dari media agar dengan menggunakan jarum ose dan dimasukkan kedalam media. Perbandingan bibit dan media kultur adalah 1:4
- Menutup ujung tabung dengan aluminium foil agar tidak ada kontaminasi yang masuk
- Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt
- Melakukan panen kultur fitoplankton setelah usia 6-7 hari (fase stasioner), selanjutnya digunakan sebagai bibit pada kultur tahap berikutnya.

b) Kultur pada Erlenmeyer

Langkah-langkah yang dilakukan pada kultur plankton pada erlenmeyer adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan media kultur yaitu air laut yang telah disterilkan dengan menggunakan kaporit.
- Menambahkan nutrisi Walne dan vitamin dengan dosis masing-masing 1 ml/L
- Memasukkan starter atau bibit dari kultur test tube ke dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4
- Menutup ujung erlenmeyer dengan aluminium foil untuk mencegah kontaminasi, jika ada kontaminasi yang masuk maka *Nannochloropsis oculata* yang dikultur bisa mati.
- Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt
- Melakukan panen kultur plankton setelah usia mencapai 6-7 hari, untuk digunakan sebagai bibit pada kultur tahap berikutnya.

c) Kultur pada Toples 3 Liter

Langkah-langkah yang dilakukan pada kultur plankton pada erlenmeyer adalah sebagai berikut :

- Membersihkan rak yang akan digunakan untuk meletakkan toples dengan menggunakan alkohol agar tidak ada kontaminasi.
- Menyiapkan media kultur yaitu air laut yang telah disterilkan dengan cara direbus dengan volume 2/3 toples
- Memasang aerasi agar plankton dapat berfotosintesis.
- Menambahkan nutrisi Walne dan vitamin dengan dosis masing-masing 1 ml/L
- Memasukkan starter atau bibit dari kultur erlenmeyer dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4
- Menutup toples dengan menggunakan plastik dan diikat dengan karet gelang.

- Memberi keterangan jenis plankton dan tanggal kultur dengan kertas label
- Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt
- Menghitung kepadatannya setiap 24 jam sekali dengan *haemocytometer* di bawah mikroskop. Apabila kepadatan sudah tinggi dan mulai mengalami penurunan, kultur siap dipanen.

d) Kultur pada Carboy

Langkah-langkah yang dilakukan pada kultur plankton skala carboy adalah sebagai berikut :

- Membersihkan rak dan meja yang akan digunakan untuk meletakkan carboy dengan menggunakan alkohol sehingga tidak ada kontaminasi.
- Mengisi carboy dengan air laut yang telah disterilkan dengan kaporit dan dipasang aerasi.
- Menetralkan media air laut dengan Na-*thiosulfat* 5 ppm.
- Mengecek kenetralan media kultur setelah 15 menit dengan menggunakan *Chlorine test*.
- Menambahkan pupuk Walne dan vitamin dengan masing-masing dosis 1 ml/L. Hal ini bertujuan untuk menyediakan nutrisi yang dibutuhkan plankton.
- Memasukkan starter atau bibit dari kultur pada toples ke dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4.
- Menutup carboy dan diberi label jenis plankton dan tanggal kultur.
- Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 20°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt.

- Menghitung kepadatannya setiap 24 jam sekali dengan *haemocytometer* di bawah mikroskop. Apabila kepadatan sudah tinggi dan mulai mengalami penurunan (fase stasioner), kultur siap dipanen dan digunakan sebagai bibit pada kultur skala intermediet.

2. Kultur Intermediate

Kultur aquarium 100 liter dan Kultur conicel 500 liter – 1 ton. Mensterilisasi air laut menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat 5 ppm, lama sterilisasi min 24 jam. Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk TG (Technical Growth) dengan dosis 1 ml/l. Untuk species diatom menggunakan pupuk diatao (TG) jika untuk species Chlorophyceae menggunakan pupuk Walne (TG). Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 :7. Kultur dilakukan pada ruangan semi outdoor dengan atap fiber tembus cahaya matahari Dan lama inkubasi 5-7 hari.

3.5.3 Perhitungan Kelimpahan Sel

Perhitungan kelimpahan sel fitoplankton digunakan sebagai tolak ukur untuk mengetahui pertumbuhan fitoplankton, kelimpahan pada awal kultur dan kelimpahan pada saat panen. *Haemocytometer* merupakan alat untuk menghitung jumlah fitoplankton yang dihasilkan dalam skala waktu.

Menurut Chalid *et al.*, (2006), Perhitungan jumlah plankton dengan *haemocytometer* ini yaitu dengan cara meneteskan kultur sel mikroalga yang akan dianalisa kepadatan selnya sebanyak satu tetes ke masing-masing dua bagian *haemocytometer*. Alat ini dilengkapi dengan mikroskop. *Haemocytometer* yang telah diberikan kultur sel mikroalga diletakkan di bawah lensa objektif dan difokuskan

hingga terlihat kisi-kisi tempat perhitungan sel yang terdiri dari lima kisi perhitungan.

Selanjutnya jumlah sel plankton dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{\text{Jumlah Total Sel}}{\text{Jumlah Kotak yang Dihitung}} \times 16 \times 10^4$$

3.5.4 Pengukuran Kualitas Air

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kualitas air pada kultur mikroalga yang bertujuan untuk mengontrol kualitas air dan mengetahui parameter fisika, kimia maupun biologi yang sesuai untuk pertumbuhan mikroalga. Parameter kualitas air yang diukur meliputi parameter fisika yaitu suhu; parameter kimia yaitu pH, salinitas.

Cara pengukuran kualitas air adalah sebagai berikut :

a) Suhu (Suprpto, 2011)

Suhu di ukur dengan menggunakan alat DO meter. Prosedur awal yang dilakukan dalam pengukuran suhu yaitu mengkalibrasi DO meter ke dalam perairan dan dilakukan dengan menggunakan larutan aquades untuk menetralkan DO pada probe DO meter. Pengukuran suhu di perairan diawali dengan memasukkan kabel DO meter atau probe ke dalam kolam. Selanjutnya ditunggu 1 sampai 2 menit hingga nilai pada layar DO meter menunjukkan angka suhu dan stabil pada angka tersebut. Hasil yang ditunjukkan kemudian dicatat pada lembar kerja pengamatan.

b) pH (Suprpto, 2011)

pH meter merupakan salah satu alat yang digunakan untuk mengukur pH dalam perairan. Pengukuran pH dilakukan secara temporal pada pagi, siang, dan sore hari. Prosedur awal yang dilakukan dalam pengukuran pH yaitu mengkalibrasi pH meter ke dalam perairan dan dilakukan dengan menggunakan larutan aquades untuk menetralkan pH pada probe pH meter. Langkah berikutnya masukkan pH meter ke

dalam perairan kurang lebih selama 2 menit disertai dengan menekan tombol hold sampai menunjukkan angka yang stabil pada display pH meter tersebut.

c) Salinitas (Hariyadi, 1992)

Pengukuran salinitas air kolam budidaya dapat dilakukan dengan menggunakan refraktometer. Prosedur pertama yang harus dilakukan adalah mengkalibrasi refraktometer sebelum melakukan pengukuran salinitas. Pada refraktometer buka kaca prisma dan lakukan kalibrasi menggunakan aquades. Kemudian dibersihkan kaca prisma tersebut dengan menggunakan tissue secara searah. Agar tidak timbul gelembung yang dapat mempengaruhi hasil, ambil sampel air kolam dan teteskan ke kaca prisma refraktometer dan tutup secara perlahan. Selanjutnya arahkan refraktometer ke arah cahaya dan baca pada skala dengan melihat kaca pengintai pada refraktometer tersebut.

3.5.5 Isolasi RNA *Nannochloropsis oculata*

Total RNA diekstraksi menggunakan *RNA kit plant GeneAid*. Terdapat beberapa langkah isolasi RNA sesuai prosedur pabrik RNA Kit. Langkah-langkah isolasi RNA tersebut meliputi :

A. Pemisahan Jaringan

- Memotong 50 hingga 100 mg jaringan dari sampel segar atau beku.
- Membekukan sampel dengan nitrogen cair.
- Menggerus sampel hingga menjadi bubuk kemudian memindahkan ke tabung eppendorf 1.5 ml (beberapa jaringan dapat digerus tanpa menggunakan nitrogen cair).

B. Pemecahan

- Menambahkan 500 µl buffer RB atau PRB dan 5 µl β-mercaptoethanol dalam sampel halus.
- Mencampur menggunakan vortex kemudian menginkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit.
- Menempatkan kolom penyaring dalam tabung koleksi 2 ml kemudian memindahkan campuran sampel ke dalam kolom.
- Mensentrifuse selama 1 menit pada 1000 rpm kemudian membuang kolom penyaring.
- Hati-hati dalam memindahkan cairan bening (supernatant) ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml yang baru.

C. Pengikatan RNA

- Menambahkan ½ volume ethanol absolut dalam cairan kemudian mengocok secara perlahan
- Menempatkan kolom RB dalam tabung koleksi volume 2 ml, kemudian memindahkan campuran ke kolom RB
- Melakukan sentifuse pada 14-16.000 x g selama 1 menit (jika campuran tidak dapat mengalir melalui membran kolom RB melalui sentrifugasi, waktu sentrifuse dinaikkan hingga mengalir seluruhnya)
- Membuang semua cairan kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml. Cairan dibuang karena RNA sudah terjerap pada kolom RB.

D. Pencucian

- Menambahkan 400 µl buffer W1 ke dalam kolom RB.

- Mensentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 30 detik.
- Membuang cairan dalam tabung kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml.
- Menambahkan 600 μ l buffer wash (pastikan ethanol ditambahkan) ke dalam kolom RB.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit.
- Membuang cairan kemudian menempatkan pada kolom RB kembali pada tabung koleksi 2 ml.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 3 menit hingga matrik kolom kering.

E. Pemurnian RNA

- Menempatkan kolom RB kering dalam tabung eppendorf 1.5 ml.
- Menambahkan 50 μ l RNase free water ke dalam matrik kolom.
- Membiarkan selama minimal 2 menit untuk memastikan RNase free water benar-benar terserap.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan RNA murni.

3.5.6 Pengukuran Kadar RNA total dengan *Nanophotometer*

Setelah sampel RNA diisolasi kemudian diukur konsentrasi proteinnya dengan menggunakan *nanodrop photometer*. *Nanodrop photometer* dinyalakan dan tekan bagian protein. Pedestal yang digunakan untuk meletakkan sampel dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan ddH₂O. Dilakukan pengukuran blank dengan menggunakan *RNAase-free Water* sebanyak 1 μ l, kemudian klik bagian BLANK pada

layar. Setelah selesai pedestal dibersihkan dengan tisu. Selanjutnya larutan isolat RNA sebanyak 1 μ l dimasukkan ke dalam pedestal, kemudian klik *measure* hingga layar akan menampilkan spektrum dan jumlah konsentrasi protein yang dihitung. Sebelum mesin dimatikan, pedestal dibersihkan kembali menggunakan ddH₂O.

3.5.7 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Setelah tahap isolasi selesai diperoleh RNA total yang selanjutnya akan ditranskripsikan menjadi DNA komplemen (cDNA). Tahapan ini dilakukan dengan menggunakan mesin PCR dengan metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Tahapan-tahapan RT-PCR sesuai protocol kit, amplifikasi dengan RT-PCR dilakukan dengan 3 tahapan yaitu denaturasi sampel RNA, tahap reverse transcription, dan proses PCR, Abnova (2016). Adapun tahapannya sebagai berikut :

A. Denaturasi Sampel RNA

- Menambahkan Primer dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan RNA (10pg-5ug) dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan 10 mM dNTP dalam tabung eppendorf sebanyak 2 μ l
- Menambahkan DEPC – treated water dalam tabung eppendorf sebanyak 12 μ l
- Menginkubasi larutan yang sudah tercampur di dalam tabung eppendorf pada suhu 65°C selama 5 menit untuk mendenaturasi RNA

B. Tahap Reverse Transcription

- Menyiapkan campuran reaksi reverse transcription
- Menambahkan cDNA sintesis buffer dalam tabung eppendorf sebanyak 4 μ l
- Menambahkan RNase dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l

- Menambahkan DEPC – treated water dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan ThermoScript RT dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan hasil denaturasi RNA dan primer dalam tabung eppendorf sebanyak 12 μ l
- Memindahkan sampel ke dalam thermal cycler pada suhu 25°C selama 10 menit, dilanjutkan 60 menit pada suhu 50°C, dan diakhiri pada suhu 85°C selama 5 menit
- Menyimpan hasil sintesis cDNA pada suhu -20°C atau dapat juga langsung digunakan untuk proses PCR.

C. Proses PCR

- Menyiapkan campuran reaksi PCR
- Menambahkan PCR buffer dalam tabung eppendorf sebanyak 5 μ l
- Menambahkan 50 mM MgCl₂ dalam tabung eppendorf sebanyak 1,5 μ l
- Menambahkan 10 mM dNTP dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan 10 μ M sense primer dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan 10 μ M anti sense primer dalam tabung eppendorf sebanyak 1 μ l
- Menambahkan Taq DNA polymerase (5U/ μ l) dalam tabung eppendorf sebanyak 0,4 μ l
- Menambahkan cDNA dalam tabung eppendorf sebanyak 2 μ l
- Menambahkan DEPC-treated water dalam tabung eppendorf sebanyak 38,1 μ l, sehingga berat total campuran PCR sebanyak 50 μ l
- Melakukan proses PCR
- Menganalisa sampel PCR dengan agarose gel elektroforesis

Setelah rangkaian tahapan PCR selesai, PCR tube dalam mesin dikeluarkan. Selanjutnya, hasil PCR ditambahkan 1 μ l primer 2 yaitu nested primer (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'). Kemudian PCR tube dimasukkan kedalam mesin PCR kembali atau biasa disebut dengan *nested* PCR. Mesin PCR dioperasikan sama seperti proses PCR yang pertama. Jika mesin PCR telah berhenti beroperasi, sampel kemudian dikeluarkan dan dapat dilakukan running elektroforesis. Sampel juga dapat disimpan dalam freezer jika tidak langsung dilakukan running elektroforesis.

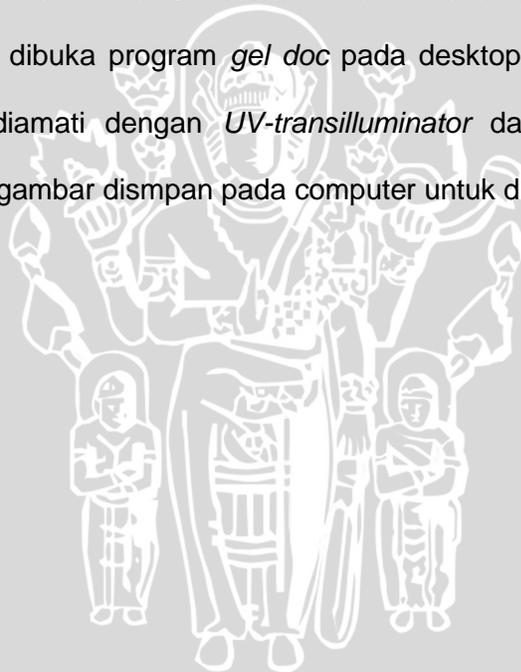
3.5.8 Pematongan Produk RT-PCR dengan Enzim Restriksi

Setelah amplifikasi fragmen RNA target berhasil selanjutnya hasil amplifikasi dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII*. Pematongan RNA dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII* dilakukan sesuai dengan petunjuk yang disarankan oleh pihak yang memproduksi enzim tersebut. Campuran dari keseluruhan ini kemudian dicampur menggunakan vortex kemudian di sentrifuge, lalu diinkubasi di dalam suhu 37°C selama 4 jam. Volume total 50 μ l terdiri dari 40,75 μ l ddH₂O, 5 μ l RE 10X buffer, 0,5 μ l Acetylated BSA 10 μ g/ μ l, 2,5 μ l DNA 1 μ g/ μ l, 1,25 μ l enzim restriksi *HindIII* 10U/ μ l.

3.5.9 Elektroforesis Gel Agarosa cDNA

Kualitas hasil pematongan enzim dilihat menggunakan gel agaros 2%. Gel agaros 2% dibuat dengan cara mencampur 0,5 gram agaros dan ditambahkan 25 ml buffer TAE 1X, selanjutnya dipanaskan dalam microwave selama 3 menit. Selanjutnya ditambahkan EtBr sebanyak 2 μ l ke dalam larutan agaros dalam kondisi suhu hangat. Larutan agaros dituangkan dalam cetakan yang telah dilengkapi dengan sisir dan didiamkan sampai gel mengeras.

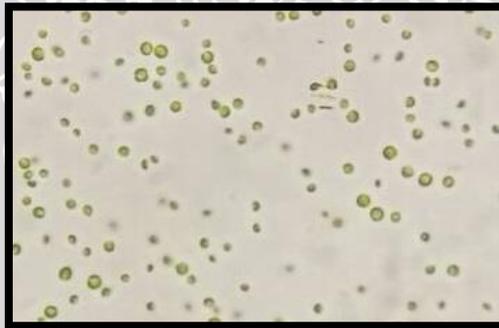
Elektroforesis dilakukan menggunakan buffer TAE 1X, campurkan *loading dye* sebanyak 2 μ l dengan 4 μ l sampel RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) *Nannochloropsis oculata* menggunakan micropipet kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dengan hati-hati. Elektroforesis dijalankan pada 100 volt selama 30 menit. Pada saat melakukan proses elektroforesis gunakan masker dan sarung tangan agar terhindar dari kontaminasi yang menyebabkan rusaknya sampel. Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan *ethidium bromida* selama 15-20 menit. Kemudian hidupkan UV transiluminator dan computer tunggu 10 menit, lalu masukkan gel agarosa kedalam alat *UV transiluminator*. Tekan tombol UV pada alat *UV transiluminator*, lalu dibuka program *gel doc* pada desktop computer. Pita-pita DNA yang terbentuk diamati dengan *UV-transilluminator* dari computer. Untuk keperluan dokumentasi gambar disimpan pada computer untuk dilakukan analisis.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kepadatan *Nannochloropsis oculata*

Dari hasil kultur *Nannochloropsis oculata* yang telah dilakukan di BPBAP Situobondo, dilakukan pengamatan *N. oculata* menggunakan mikroskop binokuler. Pengamatan *N. oculata* dilakukan dengan perbesaran 40x. Dari hasil pengamatan terlihat sel *N. oculata* berwarna kehijauan dan berbentuk bulat. Hal ini sesuai dengan pendapat Biondi dan Tredici (2011) yang menyatakan bahwa sel *N. oculata* berbentuk bulat, memiliki diameter 2-4 μm , dan memiliki pirenoid dalam kloroplas tunggal dan mengandung klorofil-a. Berikut merupakan dokumentasi pribadi hasil pengamatan *nannochloropsis oculata* dengan perbesaran 40x.



Gambar 7. Pengamatan *Nannochloropsis oculata*

Untuk mengetahui pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* dalam budidaya maka perlu dilakukan pengamatan. Pengamatan pertumbuhan dapat dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi dari awal penebaran bibit. Namun pengamatan paling baik adalah dengan melakukan perhitungan kepadatan dengan menggunakan *haemocytometer* yang diamati dibawah mikroskop. Pada perhitungan *Nannochloropsis oculata* alat yang digunakan untuk perhitungan adalah *Haemocytometer*.

Dari hasil perhitungan kepadatan *Nannochloropsis oculata* yang dikultur di BBAP Situbondo dapat diketahui bahwa pada awal pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* peningkatan kepadatan sel berlangsung bertahap, hal ini sesuai dengan pendapat Fogg (1987) dalam Bahua (2015), yang menyatakan bahwa sel fitoplankton membutuhkan waktu untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan yang baru. Setelah mengalami fase lag, pada hari ke- 4 sampai hari ke-6 diperkirakan memasuki fase eksponensial (periode puncak) dimana perkembangan sel *Nannochloropsis oculata* mengalami pertumbuhan puncak. Selanjutnya pada hari ke- 7 merupakan fase kematian dimana terjadi penurunan jumlah populasi mikroalga. Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* yang dibudidayakan dapat dilihat hasil perhitungan kepadatan yang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Kepadatan *Nannochloropsis oculata* yang dikultur

Usia (Hari)	Kepadatan (10^4 Sel/ml)		
	Erlenmeyer	Carboy	Bak Fiber
1	260	264	80
2	332	324	104
3	396	472	188
4	416	520	260
5	552	644	216
6	628	684	-
7	696	756	-
8	728	772	-
9	644	-	-
10	532	-	-

Usia yang baik untuk panen dapat diketahui berdasarkan pola pertumbuhan fitoplankton tersebut. Panen dilakukan pada hari ke 5-7 untuk selanjutnya dimanfaatkan sebagai bibit dan pakan. Menurut Sari (2012) pemanenan harus dilakukan pada saat fitoplankton telah mencapai puncak populasi atau fase akhir

eksponensial. Berdasarkan hal ini sesuai dengan pertumbuhan fitoplankton yang diperoleh dari hasil kultur di BBAP Situbondo.

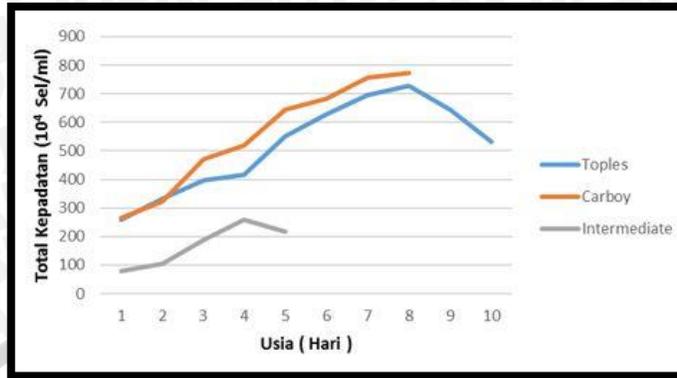
4.1.1 Pertumbuhan *Nannochloropsis Oculata* Skala Laboratorium

a) Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada Erlenmeyer dengan Aerasi

Pada kultur *Nannochloropsis oculata* skala laboratorium kepadatan awal adalah 260×10^4 dan mencapai puncaknya pada hari ke-8 728×10^4 sel/ml. Kepadatan *Nannochloropsis oculata* meningkat pesat pada saat memasuki fase eksponensial. *Nannochloropsis oculata* yang di kultur mengalami fase puncak pada hari ke 8 yaitu dengan kepadatan 728×10^4 sel/ml. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kabinawa (2006), yang menyatakan sel inokulum pada fase eksponensial sudah memanfaatkan nutrisi dalam media tumbuh dan telah terjadi proses biosintesis sel sehingga sel mampu tumbuh dan bereproduksi lebih banyak. Pada fase eksponensial sel inokulum mengalami pembelahan maksimal yaitu menjadi dua kali lipat dari sebelumnya. Di bawah ini merupakan dokumentasi pribadi proses kultur *N. oculata* dalam Erlenmeyer menggunakan aerasi beserta grafik pertumbuhan kultur *Nannochloropsis oculata* pada skala laboratorium dan intermediate yaitu menggunakan Erlenmeyer dengan aerasi.



Gambar 8. Kultur *Nannochloropsis oculata*



Gambar 9. Grafik Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*

b) Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* Pada Carboy

Kepadatan awal kultur *Nannochloropsis oculata* skala carboy yaitu 264 x 10⁴ sel/ml. Kepadatannya mengalami puncak atau fase eksponensial pada hari ke 8 yaitu 756 x 10⁴ sel/ml. Pada hari ke-9 kultur *Nannochloropsis oculata* pada carboy dilakukan subkultur pada Bak Fiber 500 Liter. Hal ini didukung oleh Fachrullah (2011) dan Sari (2012) juga memperlihatkan fase eksponensial pada jenis *Nannochloropsis oculata* berkisar antara hari ke 6 sampai hari ke 8. Fase ini ditandai dengan naiknya laju pertumbuhan hingga kepadatan populasi meningkat beberapa kali lipat. Pada fase ini juga sel alga sedang aktif berkembang biak melalui pembelahan. Di bawah ini merupakan dokumentasi pribadi proses kultur *N. oculata* pada carboy menggunakan aerasi.



Gambar 10. Kultur pada Carboy

Selama fase eksponensial sel *Nannochloropsis oculata* membelah dengan cepat, selain itu sel-sel berada dalam keadaan stabil dengan jumlah sel yang bertambah dengan kecepatan konstan, bahan sel baru terbentuk dengan laju tetap akan tetapi bahan-bahan tersebut bersifat katalitik massa bertambah secara eksponensial (Anggraeni, 2009), hal ini dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dalam media.

4.1.2 Analisis Kualitas Air

Setiap organisme membutuhkan beberapa syarat agar dalam pertumbuhan dan perkembangannya dapat berlangsung dengan optimal. Seperti pada organisme *Nannochloropsis oculata* salah satu syarat tersebut adalah kualitas air. Parameter yang digunakan dalam kultur mikroalga *Nannochloropsis oculata* antara lain suhu, derajat keasaman, dan salinitas.

a) Suhu

Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh suhu dan merupakan salah satu faktor penting. Setiap mikroalga mempunyai suhu optimum yang berbeda-beda agar mampu tumbuh dan berkembang dengan baik. *Nannochloropsis oculata* dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada kisaran suhu yang optimal 25-30 °C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Dari hasil kegiatan kultur *Nannochloropsis oculata* yang dilakukan di BBAP Situbondo, dengan suhu pada skala *intermediate* berkisar antara 26^o – 29^oC, pada skala laboratorium berkisar antara 22^oC, hal ini telah sesuai untuk kebutuhan pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*.

b) Derajat Keasaman (pH)

Untuk mencapai pertumbuhan yang optimal bagi mikroalga dibutuhkan kisaran toleransi pH yang optimal. Dalam kegiatan kultur *Nannochloropsis oculata*

yang terdapat di BBAP Situbondo diperoleh nilai pH yang terdapat pada skala intermediate sebesar 8 – 8,5, sedangkan pada skala laboratorium yaitu 8. Menurut Tjahjo (2002) dan Cahyaningsih (2009), menyatakan bahwa pH optimal bagi *Nannochloropsis oculata* berkisar 8-8,5. Berdasarkan kisaran pH tersebut kultur murni sudah sangat memenuhi syarat untuk dapat tumbuh.

c) Salinitas

Pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme secara langsung maupun tidak langsung dipengaruhi oleh salinitas yang merupakan salah satu sifat kimia air. Pada saat kultur dapat terjadi kenaikan salinitas akibat dari adanya pengendapan dan adanya hasil metabolisme. Dalam kultur *Nannochloropsis oculata* yang ada pada BBAP Situbondo, salinitas yang digunakan pada skala laboratorium berkisar 33 ppt, sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 34 ppt. Hal ini sesuai dengan pendapat Tjahjo (2002), yang menyatakan bahwa *Nannochloropsis oculata* dapat tumbuh pada salinitas 30-35 ppt. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa air laut yang digunakan dalam kultur *Nannochloropsis oculata* di BBAP Situbondo telah memenuhi syarat untuk dapat mendukung pertumbuhannya.

4.2 Isolasi RNA *Nannochloropsis oculata*

Isolasi RNA menggunakan *RNA kit plant GeneAid*. Didalam melakukan isolasi RNA, DNA dan protein dipisahkan untuk memisahkan molekul RNA dari molekul-molekul lain yang tidak diinginkan. Terdapat tiga tahap utama dalam ekstraksi RNA dalam isolasi molekul RNA *Nannochloropsis oculata* berdasarkan RNA purification kit yang digunakan dalam penelitian, yaitu pemecahan dinding sel (lisis), pengikatan RNA, pencucian dan pemurnian RNA. Dilakukan penambahan nitrogen cair pada saat perusakan jaringan yang berfungsi untuk mempermudah penggerusan dan menjaga

agar RNA tidak mengalami kerusakan. Tahap pertama dari proses isolasi ini adalah pemecahan dinding sel dan pengikatan RNA menggunakan larutan *lysis buffer* (RB Buffer), kemudian dilakukan inkubasi selama 5 menit pada suhu 60°C yang bertujuan untuk memecah dinding sel mikroalga dan mengikat RNA. Larutan *lysis buffer* dapat melisiskan sampel dan mematikan RNase yang mengandung zat guanidine tiosianat (Fermentas, 2011)

Setelah dilakukan penambahan *lysis buffer*, kemudian sampel ditambahkan wash buffer ke dalam RB kolom yang berfungsi untuk menghilangkan sisa kotoran protein yang terikat pada RNA. Setelah tahap pencucian, kemudian ditambahkan Rnase-free water ke dalam matrik kolom yang berfungsi untuk mensterilkan RNA sehingga diperoleh isolat murni RNA. Zat kontaminan yang masih tersisa pada membran kolom dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi menggunakan larutan *wash buffer*. Molekul RNA kemudian disterilkan dengan menggunakan *nuclease-free water* (Fermentas, 2011). Isolat RNA kemudian dianalisis konsentrasinya dengan menggunakan *nanodrop spektrofotometer*. Di bawah ini merupakan dokumentasi pribadi proses isolasi RNA *N. oculata*.



Gambar 11. Proses Isolasi RNA

4.3 Kandungan Total RNA

Hasil isolasi RNA yang telah dilakukan sebelumnya diukur kemurnian dan konsentrasinya menggunakan NanoPhotometer™ [Implen] untuk mengukur kadar RNA total. Kandungan total RNA diukur pada panjang gelombang 260, 280 dan 320 nm. Kemurnian RNA diukur pada nisbah A260/A280 karena protein diserap pada panjang gelombang 280 nm (Aranda *et al.*, 2009). Berikut merupakan dokumentasi pribadi pengukuran kadar RNA total pada *Nannochloropsis oculata*.



Gambar 12. NanoPhotometer™ [Implen]

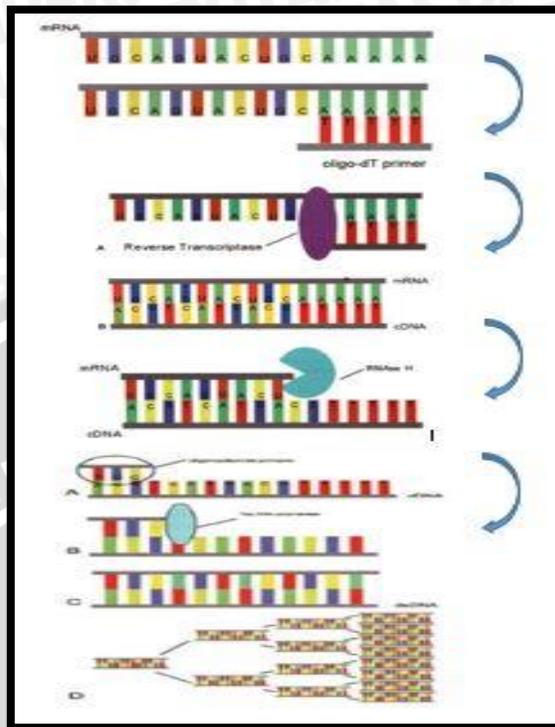
Berdasarkan hasil pengukuran total RNA diperoleh kadar RNA total sebesar 23,6 mg/ml. Hasil pengukuran kadar RNA total ini menunjukkan hasil yang baik, hal ini karena dalam proses isolasi RNA menggunakan kit komersial RNA yaitu *Total RNA mini kit Plant GeneAid*. Hal ini sesuai dengan pendapat (Adipura *et al.*, 2012) yang menyatakan bahwa, ekstraksi RNA menggunakan kit komersial dapat menghasilkan RNA dengan kemurnian yang tinggi.

4.4 Optimalisasi *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Dalam metode RT-PCR ini terdapat dua tahapan utama yaitu sintesis cDNA dari RNA total menggunakan primer dan amplifikasi cDNA dengan teknik PCR. Hal ini

dilakukan karena isolat RNA tidak dapat digunakan langsung sebagai cetakan dalam proses PCR, sehingga RNA harus ditranskripsikan balik menjadi komplemen cDNA. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hewajuli (2014) yang menyatakan bahwa, untuk mengamplifikasi DNA atau RNA dapat digunakan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sebelum proses PCR, untuk amplifikasi RNA molekul mRNA harus melalui proses *reverse transcriptase* sehingga diperoleh molekul komplemen DNA (cDNA).

Komplemen DNA (cDNA) dapat terbentuk karena bantuan dari primer oligo (dT) dan enzim transcriptase balik. Ekor 3' poli-A mRNA dihibridasi oleh primer oligo (dT). Proses inkubasi RNA mix pada suhu 65 °C selama 10 menit merupakan proses denaturasi, selanjutnya proses *annealing* terjadi pada suhu 4 °C selama 50 menit. Pada saat primer oligo (dT) melekat pada untai RNA, enzim *reverse transcriptase* mulai mengkonstruksi untai pertama cDNA serta mengubah basa urasil menjadi basa timin. Hasil dari sintesis ini berupa DNA untai tunggal. Setelah DNA untai tunggal terbentuk, DNA polymerase akan mensintesis untai DNA pasangannya sehingga dihasilkan DNA untai ganda. Molekul cDNA ini yang selanjutnya digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Sehingga proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi RNA disebut sebagai proses RT-PCR. Proses RT-PCR dapat dilihat pada gambar 13 sebagai berikut.



Gambar 13. Proses RT-PCR
(Sumber : Kendall dan K.Riley, 2000)

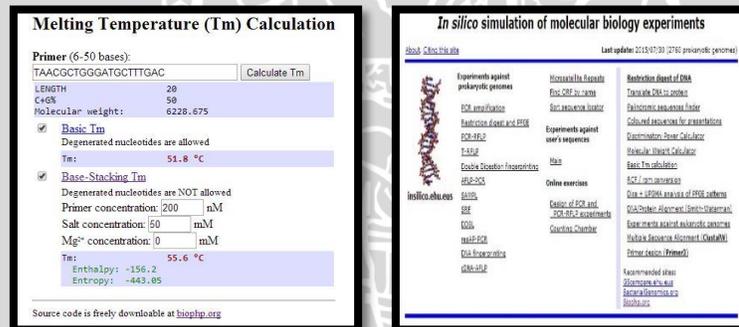
4.4.1 Amplifikasi cDNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP)

Keberhasilan proses amplifikasi dalam PCR ditentukan oleh kesesuaian primer yang digunakan serta optimasi dan efisiensi dalam proses PCR. Penggunaan primer yang tidak spesifik dan kurang tepat dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain didalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau tidak terdapat daerah genom yang teramplifikasi. Maka dari itu, diperlukan optimasi khusus terutama pada optimasi cetakan DNA dan primer yang akan digunakan dalam masing-masing proses PCR (Grunenwald 2003).

Dalam penelitian ini terdapat faktor yang diuji untuk mengoptimalkan RT-PCR yaitu suhu penempelan primer dan primer. Primer yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan primer yang spesifik didesain untuk gen *Peridinin Chlorophyll*

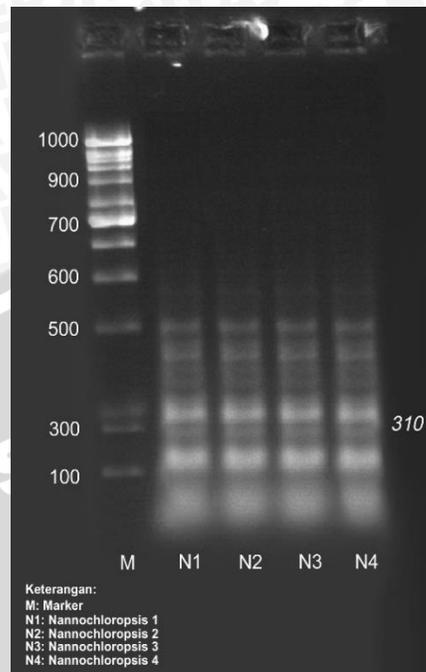
Protein (PCP) dari *N. oculata*, dimana perancangan primer dilakukan dengan merujuk pada data cDNA dari gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* yang terdapat pada database *GenBank* dengan panjang pita 310 bp. Primer yang digunakan yaitu primer P1 (*inisiated*) (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3'), primer P2 (*nested*) (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3') dan RNA adapter.

Penempelan primer *annealing* merupakan proses pelekatan primer pada cDNA cetakan. Proses tersebut memerlukan suhu yang berkisar pada *melting temperature* (Tm). Menurut fatchiyah *et al.*, (2011) Untuk mendapatkan *melting temperature* (Tm) yang tepat dapat menggunakan rumus, $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$. Selain itu penentuan *melting temperature* (Tm) pada saat proses *annealing* dapat diketahui melalui situs insilico.ehu.eu dan BioPHP minitools/melting_temperature seperti pada gambar berikut :



Gambar 14. Perhitungan Melting Temperature

Berdasarkan situs insilico.ehu.eu dan BioPHP minitools/melting_temperature, penentuan *melting temperature* (Tm) yang direkomendasikan yaitu 51,8 °C. Namun dalam penelitian ini dilakukan perlakuan gradient suhu untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang maksimal, dengan menggunakan 6 level suhu yang berbeda yaitu pada suhu 44°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C, dan 58°C.



Gambar 15. Visualisasi Amplifikasi cDNA *peridinin chlorophyll protein (PCP)*

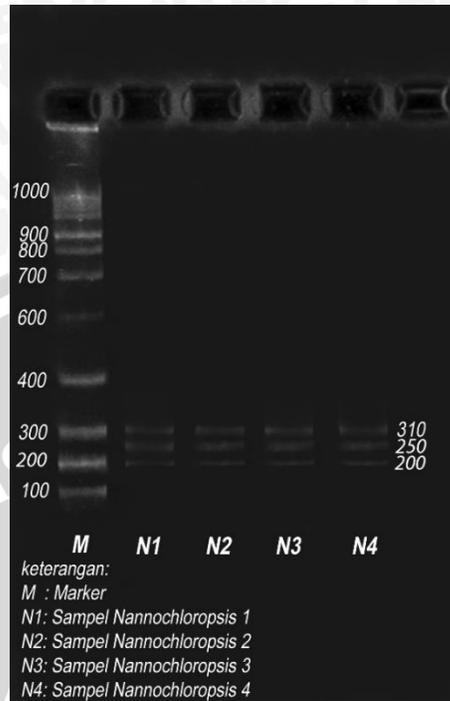
Dalam penelitian ini suhu penempelan primer *annealing* yang optimal yaitu pada suhu 52°C selama 1 menit. Perlakuan suhu penempelan primer *annealing* yang tepat dan penggunaan primer yang sesuai dengan panjang gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* yang dijadikan referensi *GenBank*, dapat menghasilkan amplifikasi cDNA secara optimal, hal ini ditandai dengan hasil visualisasi pita cDNA pada gel elektroforesis yang terlihat jelas. Perlakuan suhu *annealing* yang terlalu tinggi dan terlalu rendah mengakibatkan primer yang digunakan tidak dapat melekat pada tempat yang spesifik sehingga tidak diperoleh hasil amplifikasi cDNA target. Hal ini sesuai dengan pernyataan Roux, (2009) yang menyatakan bahwa, untuk menghasilkan karakter yang diinginkan diperlukan optimalisasi PCR, yaitu dengan melakukan optimasi suhu *annealing* cDNA dalam proses PCR. Selanjutnya hasil

amplifikasi dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* untuk menghasilkan pemotongan RNA PCP yang spesifik pada *Nannochloropsis oculata*.

4.5 Pola Pemotongan RNA *Peridinin Chlorophyl Protein (PCP) Nannochloropsis oculata* dengan Enzim Restriksi *HindIII*

Pola atau hasil pemotongan RNA menggunakan enzim restriksi dapat bervariasi antara spesies yang sama maupun antar spesies yang berbeda. Perbedaan pada urutan nukleotida pada masing-masing spesies atau individu mengakibatkan pola atau hasil pemotongan RNA oleh enzim restriksi yang berbeda juga. Menurut (Campbell, 2010) yang menyatakan bahwa jika pada situs restriksi terdapat perbedaan nukleotida antara dua sepasang gen, maka didalam elektroforesis gel akan dapat menghasilkan campuran fragmen atau bagian yang berbeda dan pola pita masing-masing.

Pada penelitian ini menggunakan enzim restriksi tipe II yaitu enzim restriksi *HindIII*. Enzim restriksi mempunyai ciri utama yaitu setiap enzim mengenal urutan spesifik pada molekul RNA yang akan dipotong. Pada enzim restriksi tertentu dapat memotong fragmen RNA dalam konsentrasi pH, suhu, dan garam yang sesuai dengan karakter enzim restriksi yang digunakan (Roberts dan Macelis 2001).



Gambar 16. Hasil Pemotongan dengan Enzim Restriksi *HindIII*

Hasil pemotongan RNA PCP *Nannochloropsis oculata* menggunakan enzim restriksi *HindIII* dilihat menggunakan gel agarose. Berdasarkan gambar 16 hasil situs pemotongan fragmen RNA PCP *Nannochloropsis oculata* menggunakan enzim restriksi *HindIII* dihasilkan situs pemotongan RNA pada ukuran 200 bp, 250 bp, dan 310 bp. Pada salah satu situs pemotongan oleh enzim restriksi *HindIII* menunjukkan terdapat kecocokan dengan menghasilkan situs pemotongan 310 bp, hal ini sesuai dengan target panjang basa *peridinin chlorophyll protein* (PCP) yaitu 310 bp pada *Nannochloropsis oculata*.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian tentang optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada *Nannochloropsis oculata* yang dikultur secara *in vivo* dapat disimpulkan, yaitu :

1. Metode yang tepat dalam mengoptimalkan PCR dilakukan dengan menggunakan kit yang tepat dalam proses isolasi RNA, yaitu *RNA kit plant GeneAid*. Dalam penelitian ini suhu penempelan primer *annealing* yang optimal yaitu pada suhu 52 °C selama 1 menit.
2. Jumlah fragmen RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada *Nannochloropsis oculata* yang dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* menghasilkan 3 fragmen, yang berukuran 200 bp, 250 bp, dan 310 bp. Pada salah satu situs pemotongan oleh enzim restriksi *HindIII* menunjukkan terdapat kecocokan dengan menghasilkan situs pemotongan 310 bp, hal ini sesuai dengan target panjang basa *peridinin chlorophyll protein* (PCP) yaitu 310 bp pada *Nannochloropsis oculata*.

5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan penelitian diatas dan dalam dalam upaya perbaikan penelitian agar lebih baik lagi, saran dari penelitian ini yaitu perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai kualitas dari sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) mengenai sequencing dan cloning cDNA PCP *N. oculata* sehingga selanjutnya dapat dilakukan produksi *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) yang dapat digunakan sebagai salah satu solusi pencegahan terhadap serangan penyakit pada ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abnova. 2016. Video Step Reverse Transcription PCR. <http://www.abnova.com/abvideo/Reverse-Transcription-PCR.html>. Diakses tanggal 10 Juli 2016.
- Adiputra, J., Hidayat, S.H. dan Damayanti, T.A. 2012. Evaluasi Tiga Metode Preparasi RNA Total untuk Deteksi *Turnip mosaic potyvirus* dari Benih *Brassica rappa* dengan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. Jurnal Fitopatologi Indonesia. 8(2) : 44 – 49.
- Aedi, Nur. 2010. Pengolahan dan Analisis Data Hasil Penelitian. Bahan Belajar Mandiri Metode Penelitian Pendidikan. Jakarta : Universitas Pendidikan Indonesia.
- Agustina, D., C.T. Sardjono, B. Setiawan, F. Sandra. 2011. Peranan RNA *interference* pada *Embryonic Stem Cell*. CDK 186 Vol. 38 (5): 332-335.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, dan J.D. Watson. 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York.
- Amini, S dan Syamdidi. 2006. Konsentrasi Unsur Hara pada Media dan Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* dengan pupuk anorganik teknik dan analisis. *Jurnal Perikanan*. Vol VIII. No.2. Hal: 201-206.
- Anggraeni, N. 2009. Penentuan Parameter Pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. Disertasi. Fakultas Teknik. ITB.
- Annisa. 2012. Isolasi RNA dan Pengklonan Gen Tripsin Kation dari Pankreas Sapi ke *Echerichia coli* DH5 α . (SKRIPSI). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi Universitas Indonesia. Depok
- Anon, Sen M.A.T., Kocer M.T. Alp, dan H. Erbas. 2009. *Studies on Growth Marine Microalgae in Batch Cultures: III. Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyta)*. Departement of Basic Aquatic Sciences, Faculty of Aquaculture, Firat University, Elazig, Turkey. *Asian Journal of Plant Sciences*. 4(6) : 642-644.
- Assadad, Luthfi., Bagus., dan Rodiah. 2011. *Pemanfaatan Mikroalga Sebagai Bahan Baku Etanol*. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan : 2.

Atmadja WS, Kadi A, Sulistijo, Rachmaniar. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia. Puslitbang Oseanologi- LIPI, Jakarta.

Auerkari, E.I, Sunarto H, A. Djaiz. 1998. RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) : Suatu Cara Pendeteksi Perubahan-perubahan Ekspresi Gen pada Penyakit. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*: 5 (3): 162-165.

BPBAP Situbondo. 2012. Petunjuk Teknis Produksi Pakan Alami. DKP Jatim.

Baharuddin, Maswati. 2011. Analisis Perbedaan Kandungan Lipid Mikroalga (*Tetraselmis chuii* dan *Nannochloropsis oculata*) Pada Air Laut dan Air Payau. *Teknosains*. 5(1): 26-32.

Bahua, H., Y. Hendrawan dan R. Yulianingsih. 2015. Pengaruh Pemberian Auksin Sintetik Asam Naftalena Asetat Terhadap Pertumbuhan Mikroalga (*Nannochloropsis oculata*). *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*. 3(2) : 179-186.

Biondi and Tredici. 2011. Algae and Aquatic Biomass for a Sustainable Production of 2nd Generation Biofuels. UNIFI. Page 148 – 150.

BioPHP. 2016. BioPHP - Melting Temperature (Tm) Calculation. www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?primer. Diakses tanggal 12 Juli 2016.

Burtin P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *EJEAF Che* 2: 498-503.

Cahyaningsih, S., A.N.M. Muchtar, S.J. Purnomo, I. Kusumaningrum, Pujiati, A. Haryono, Slamet dan Asniar. 2009. Juknis Produksi Pakan Alami. Departemen Kelautan dan Perikanan Direktorat Jendral Perikanan Budidaya Balai Budidaya Air Payau Situbondo.

Campbell, N.A., dan J. B. Reece. 2010. *Biologi*. Terj. Dari *Biology*, oleh Damaring Tyas Wulandari. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Chalid, S. Y., S. Amini dan S. D. Lestari. 2006. Kultivasi *Chlorella sp.* pada Media Tumbuh yang Diperkaya dengan Pupuk Anorganik dan Soil Ekstrak. *Laporan Penelitian*. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.

Chiu, S. Y, Y. K. Chien, T.T. Ming, C.O. Seow, H.C. Chiun, dan S.L. Chih. 2008. *Lipid Accumulation and CO2 Utilization of Nannochloropsis oculata in Response to CO2 Aeration*. *Bioresource Tech*. 100: 833-838.

- Coutteau, P. 1996. *Microalgae In Manual on Production and Use of Live Food foa Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. Lavens, P and P. Sorgeloos Edition. Rome, Italia : 8-47.
- Del Campo JA, Rodr´ıguez H, Moreno J, Vargas M, Rivas A, Guerrero MG. 2001. *Lutein production by Muriellopsis sp. in an outdoor tubular photobioreactor*. J Baiotechnol 85, 289–295.
- Diharmi A. 2001. Pengaruh Pencahayaan Terhadap Kandungan Pigmen Bioaktif Mikroalga *Spirulina platensis* Strain Local (Ink). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Effendi, H. 2003. *Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan Perairan*. Kanisius, Yogyakarta : 66-73.
- Ekawati, A. W. 2005. Budidaya Makanan Alami. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Erlania. 2010. *Penyimpanan Rotifera Instan (Branchionus rotundiformis) Pada Suhu yang Berbeda Dengan Pemberian Pakan Mikroalga Konsentrat*. J. Ris. Akuakultur 5: 287-297.
- Erlich, H.A. 1989. *Polymerase Chain Reaction*. Journal of Clinical Immunology 9: 437–447.
- Fachrullah, M. R. 2011. *Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis Chlorella sp. dan Nannochloropsis sp. yang Dikultivasi dengan Menggunakan Air Limbah Hasil Pnambangan Timah Pulau Bangka*. Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor : 5-6.
- Fatchiyah., Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Erlangga.
- Fermentas. 2011. GeneJet RNA purification kit. Fermentas Inc., New York: 17 hlm.
- Fogg G. E. 1975. *Algae Culture and Phytoplankton Ecology*. London: The University of Wisconsin. London.
- Gibbs RA. 1990. DNA amplification by the polymerase chain reaction. Anal Chem. 62:1202-1214.

Ginzburg, M. 1988. *Dunaliella* : a Green Alga Adapted to Salt. *Botanical Research*. Vol 14. The Hebrew University of Jerusalem : Israel.

Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. Di Dalam: JMS Bartlett and D Stirling (Eds). 2003. *Methods in Molecular Biology: PCR Protocol* second edition. Totowa: Humana press. 89-99.

Hadiwigeno, S. 1990. *Petunjuk Teknis Budidaya Pakan Alami Ikan dan Udang*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta.

Hariyadi, S., Suryadiputra dan B. Widigdo. 1992. *Limnologi Metode Kualitas Air*. Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Hariyati, R. 2008. Pertumbuhan dan Biomassa *Spirulina sp* dalam Skala Laboratoris. 10(1): 19-22.

Hewajuli, D.A., dan N.L.P.I. Dharmayanti. 2014. Perkembangan teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam mengidentifikasi genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases. *Wartazoa*. 24(1): 16-29.

Hibberd, D.J. 1981. Notes on the Taxonomy and Nomenclature of the Alga Classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Journal of the Linnean Society of London, Botany*.

Hirschberg J, Chamovitz D. 1994. "Carotenoids in cyanobacteria." In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Bryant DA, ed. (Dordrecht: Kluwer) pp 559–579.

Hoek, E., P. Marinos., M. Benissi. 1998. Applicability of The Geological Strength Index(GSI) Classification for Very Weak and Sheared Rock Masses. The Case of The Athens Schist Formation, *Bull Eng Geo Env* 57:151-160.

Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M. 2009. Rapid and highly sensitive pathotyping of Avian Influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 45:600-603.

Hossain, A.B.M., A. Salleh, A.N. Boyce, P. Chowdhury, M. Naquiddin. 2008. *Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Vol 4 (3) :250-254

Isnansetyo, A. dan Kusniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplanton dan Zooplankton*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

Kabinawa, IN.K., D.Susilaningsih, dan N.W.S.Agustini. 1994. *Produksi Biomasa Mikroalga Chlorella Pyrenoidosa Dalam Skala Rumah Kaca*. (online). (<http://katalog.pdii.lipi.go.id> diakses 11 Mei 2010).

Karlson B, Potter D, Kuylenstierna M, Andersen RA. 1996. *Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for Nannochloropsis granulata sp. (Monopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankton isolated from Skagerrak, northeast Atlantic Ocean*. *Phycologia* 35: 253–260.

Kawaroe M., Prartono T., Sunuddin A., Wulan Sari D., Augustine D. 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.

Kendall, V.L., dan L. K. Riley. 2000. *Research Animal Diagnostic and Investigative Laboratory, Department of Veterinary Pathology, University of Missouri, Columbia*. Volume 39. No. 1

Krueger, B. P., S.S. Lampoura, I.H.M.V Stokkum, E. Papagiannakis, J. M. Salverda, C.C. Gradinaru, D. Rutkauskas, R.G. Hiller, R.V. Grondelle. 2001. *Energy Transfer in the Peridinin Chlorophyll-a Protein of Amphidinium carterae Studied by Polarized Transient Absorption and Target Analysis*. *Biophysical Journal*. Vol. 80 : 2843–2855.

Kusmiati, Agustini NWS, Tamat SR, Irawati M. 2010. *Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga Chlorella pyrenoidosa*. *Galur Lokal Ink. J Kimia Indonesia* 5: 30-34.

Mabrudy, M. 2013. *Penggunaan Self-Assesment Untuk Mengungkap Pemahaman Siswa yang Berorientasi Pada Teori Marzano dalam Konsep Usaha dan Energi*. *Skripsi*. Universitas Pendidikan Indonesia

Maruyama I, Nakamura T, Matsubayashi T. 1986. *“Identification of The Alga Known as ‘Marine Chlorella’ As a Member of The Eustigmatophyceae”*, *Jpn. J. Bot*, Vol. 34, hal. 319-325.

Marzuki. 1983. *Metodologi Riset*. Fakultas Ekonomi. UII Yogyakarta.

Meritasari, D., R. Jannah, D. Irshalina dan S. Innayah. 2010. *Eksplorasi Bahan Aktif Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata Sebagai Antibakteri (Penghambat Vibrio alginolyticus)*. Program Kreativitas Mahasiswa Universitas Airlangga.

Mudjiman, A. 2004. *Makanan Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta.

Nazir, M. 1988. *Metodologi Penelitian*. Jakarta : Ghalia Indonesia.

- Ndiha BBA, Limantara L. 2009. *Karotenoid pada Bahan Makanan*. Prosiding Seminar Nasional Biologi, Lingkungan dan Pembelajarannya. Jurdik Biologi. FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta. p. 75-84.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR. UK: Bios Scientific Publisher.
- Ogata, A., Dominguez, A., Lamela, T., Garcia, D. dan Fabregas, J. 2009. Steady states of semicontinuous cultures of a marine diatom: effect of saturating nutrient concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 227, 23-34.
- Pamukas, N. A. 2011. Perkembangan Kelimpahan Fitoplankton dengan Pemberian Pupuk Organik Cair Berkala Perikanan Terubuk. Vol 39. No.1. Hal: 79-90.
- Pingoud, A., J. Alves, dan R. Geiger. 1993. Restriction enzymes. Di dalam: Burrell, M.M. (Ed.). *Methods in Molecular Biology Volume 16*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Reynold, C. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press. NY.
- Roberts, R.J., dan S.E. Halford. 1993. Type II restriction enzymes. Di dalam: *Nucleases, 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Roberts, R. J., and Macelis, D. 2001. REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* 29:268–269.
- Roux KH. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbour Laboratory Press* 4(4): 1-6.
- Sari IP, Abdul M. 2012. Pola pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada skala laboratorium, intermediet dan masal. *Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* 4(2) : 123-127.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Suharsimi, Arikunto. 2006. *Metodologi Penelitian*. Jakarta : Rineka Cipta.
- Suprpto. 2011. *Metode Analisis Parameter Kualitas Air Untuk Budidaya Udang*. Shrimp Club Indonesia.
- Surakhmad, W. 2004. *Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar, Metode dan Teknik (Edisi Revisi)*. Bandung : Penerbit Tarsito.

Suriawiria, U. 2005. Mikrobiologi Air dan Dasar-dasar Pengolahan buangan secara biologis. PT. Alumni, Bandung.

Tiara, S., A. Arziani, N. Siti, E. Aprilia, S. Retalia, D. Yunus, M. Sapta, A. N. Huda, M. Alkahfi. 2014. Isolasi dan Kuantifikasi RNA pada Organ Usus Ikan Betok (*Anabas testudineus*) dengan Menggunakan Metode Isogen/Genezol. *Laporan Praktikum Bioteknologi Akuakultur*. IPB : Bandung.

Tjahjo, W. L. Erawati dan Hanung, S. 2002. Biologi Fitoplankton dalam Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Balai Budidaya Laut, Direktorat Jendral Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan. Bandar Lampung.

Wahyudi, P. 1999. Chlorella: Mikroalga Sumber Protein Sel Tunggal. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 1(5) :35-41.

Watanabe, N., Takasaki, Y., Sato, C., Ando, S., Tanaka, I. 2009. Structures of restriction endonuclease HindIII in complex with its cognate DNA and divalent cations. *Acta Crystallography*. D65.

Weis, V.M., E. A. Verde, W.S. Reynolds. 2001. Characterization of a Short Form Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) cDNA and Protein from The Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium Muscatinei* (Dinophyceae) From The Sea Anemone *Anthopleura Elegantissima* (Cnidaria). *J. Phycol.*38 : 157–163.

Widi, Restu Kartiko. 2010. Asas Metodologi Penelitian. Graha Ilmu. Yogyakarta

Widianingsih, R. Hartati, H. Endrawati, E. Yadiati, V. R. Iriani. 2011. Pengaruh Pengurangan Konsentrasi Nutrient Fosfat dan Nitrat terhadap Kandungan Lipid Total *N. oculata*. Vol 16. No.1. Hal: 24-29.

Yusuf, Z.K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Saintek*. 5 (6).

Yuwono T. 2006. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Yogyakarta (Indonesia): Penerbit Andi.

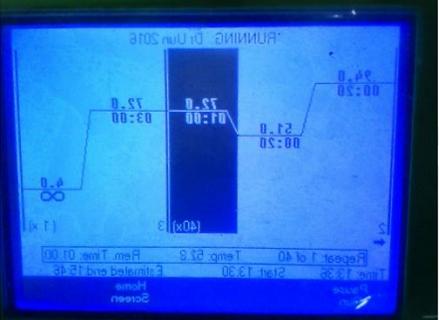
LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat Penelitian

NO.	ALAT YANG DIGUNAKAN	KETERANGAN
1		<p>PCR <i>Bio-rad Thermal Cycler</i></p>
2		<p>Sentrifuge <i>Bio-rad</i></p>
3		<p>UV Transilluminators <i>Bio-rad</i></p>
4		<p>Waterbath <i>Memmert</i></p>

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian

NO.	FOTO KEGIATAN	KETERANGAN
1		<p>Kegiatan kultur <i>Nannochloropsis oculata</i> di BBPAP Situbondo</p>
2		<p>Isolasi RNA</p>
3		<p>Pengujian nanodrop untuk mengetahui kadar protein dalam <i>Nannochloropsis oculata</i></p>
4		<p>Elektroforesis gel agaros 1% untuk melihat hasil isolasi DNA</p>

NO.	FOTO KEGIATAN	KETERANGAN
5		<p>Amplifikasi menggunakan PCR</p>
6		<p>Elektroforesis gel agaros 1% untuk melihat hasil PCR</p>
7		<p>Proses pemotongan dengan enzim restriksi <i>HindIII</i></p>

Lampiran 3. Alat dan Fungsi

No	Nama alat	Fungsi
1	Karet pengisap	masuk ke dalam pipet kapiler
2	Pipet kapiler	Untuk menampung air sampel
3	Erlenmeyer	Sebagai media budidaya skala laboratorium
4	Toples kaca	Sebagai media budidaya skala laboratorium
5	Karboy	Sebagai media budidaya skala laboratorium
6	Bak fiber	Sebagai media budidaya skala intermediet
7	Oven	Untuk proses pengeringan phytoplankton
8	Autoclave	Untuk mensterilisasi
9	Timbangan	Untuk menimbang bahan
10	Selang aerasi	Sebagai saluran masuknya oksigen
11	Batu aerasi	Sebagai sumber oksigen
12	Haemocytometer	Untuk menghitung kepadatan phytoplankton
13	Mikroskop	Untuk melihat phytoplankton
14	Sedgewich rafter	Untuk menghitung kepadatan phytoplankton
15	Blender	Sebagai alat untuk menghaluskan phytoplankton
16	Pipa	Untuk sebagai saluran air dan oksigen
17	Filter bag	Sebagai penyaring air ke filter bag
18	Kompas gas	Sebagai sumber api
19	Keranjang	Sebagai wadah untuk menyimpan erlenmeyer
20	Panci	Untuk menampung air yang akan direbus
21	Gayung	Untuk mengambil air dari drum/panci ke toples
22	Jerigen	Untuk menampung pupuk dan silikat
23	Kain	Untuk menyaring phytoplankton yang dipanen
24	Saringan	Untuk menyaring bahan
25	Alumunium foil	Sebagai penutup erlenmeyer
26	Plastik	Sebagai penutup erlenmeyer dan toples kaca
27	Sikat	Untuk menyikat bak fiber

28	Schoring beag	Untuk membersihkan alat
29	Nampan	Untuk menampung phytoplankton
30	Gelas ukur	Untuk mengukur bahan
31	Drum	Untuk menampung air pada skala laboratorium
32	Lampu	Sebagai penerang skala laboratorium
33	AC	Sebagai pendingin ruangan
34	Sentrifuge	Untuk memisahkan partikulat padat dalam cairan
35	Thermal Cycler	Untuk memperbanyak segmen DNA melalui polymerase chain reaction (PCR)
36	UV Transilluminators	Untuk men-visual-kan DNA setelah di <i>loading</i> atau <i>running</i> dalam DNA elektroforesis.
37	Waterbath	Untuk menciptakan suhu yang konstan dan digunakan untuk inkubasi pada analisis mikrobiologi
38	Micropipet	Untuk memindahkan cairan dalam jumlah kecil secara akurat
39	Nanodrop	Untuk mengukur kuantitas DNA/RNA/Protein
40	Freezer	Untuk menyimpan sampel pada suhu -20°C
41	Mortar alu	Untuk menggerus sampel
42	Vortex Mixer	Untuk mencampur cairan dalam wadah kecil
43	Microtube	Sebagai wadah sampel dengan ukuran 0,2-2 ml
44	Blue tip	Untuk mengambil sampel dengan ukuran 200 ul-1 ml
45	Yellow Tip	Untuk mengambil sampel dengan ukuran 10-200 ul
46	Enzyme Tip	Untuk mengambil sampel dengan ukuran 0.5-10 ul
47	Mini-SubCell GT Cell	Sebagai wadah gel agarosa dan berfungsi dalam proses elektroforesis untuk mengetahui ukuran fragmen DNA, pemurnian DNA, dan memisahkan fragmen DNA yang berbeda ukuran
48	Power suply	Untuk memberikan arus listrik dalam proses elektroforesis

Lampiran 4. Bahan dan Fungsi

NO	BAHAN	Fungsi
1	Air laut	Sebagai media pemeliharaan
2	Air tawar	Sebagai sterilisasi air
3	Phytoplankton	Sebagai boita yang di kultur
4	Pupuk walne	Sebagai pupuk phytoplankton berwarna hijau
5	Soda api	Untuk mengendapkan phytoplankton
6	Aquades	Sebagai sterilisasi air
7	Vitamin	Sebagai vitamin phytoplankton pada skala laboratorium
8	Thiosulfat	Untuk menetralkan air
9	Chlorin test	Untuk mengecek kenetralan air media
10	Detergen	Untuk mencuci bak
11	Kaporit	Untuk sterilisasi air laut dan wadah kultur
12	Alkohol	Untuk membersihkan rak-rak kaca skala laboratorium
13	HCL	Untuk membersihkan erlenmeyer
14	Nitrogen cair	Sebagai bahan untuk isolasi RNA
15	<i>Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit</i>	Sebagai bahan untuk isolasi RNA <i>Nannochloropsis oculata</i>
16	Enzim restriksi <i>HindIII</i>	Untuk memotong ikatan RNA pada <i>Nannochloropsis oculata</i>
17	Gel agarosa	Untuk elektroforesis gel, memisahkan dan menganalisis protein dan DNA dalam proses elektroforesis
18	Loading buffer	Sebagai pemberat agar tidak keluar dari sumuran dalam proses elektroforesis

DAFTAR ISTILAH

Istilah	Deskripsi
Amplifikasi	Proses penggandaan untai DNA melalui teknik PCR
<i>Annealing</i>	Proses penempelan primer pada template DNA dalam proses PCR
<i>Complementary DNA (cDNA)</i>	DNA untai tunggal (<i>single-stranded</i>) yang disalin dari untai <u>mRNA</u> menggunakan teknik RT-PCR dengan memanfaatkan <u>enzim</u> <i>reverse transcriptase</i>
Denaturasi	Proses pembukaan untai ganda DNA menjadi untai tunggal dalam proses PCR
<i>Deoxyribonucleic Acid (DNA)</i>	Asam nukleat beruntai ganda yang berperan dalam proses ekspresi gen
Elektroforesis	Teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi dalam medan listrik yang dialirkan pada medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan
Elongasi	Proses pemanjangan primer dalam proses PCR
Isolasi RNA	Proses pemisahan RNA dari komponen-komponen lain seperti DNA dan protein
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	Suatu teknik yang digunakan untuk mengamplifikasi atau menggandakan DNA
Primer	Oligonukleotida pendek beruntai tunggal yang berfungsi sebagai komplemen DNA target
<i>Reverse Transcriptase</i>	Enzim yang membalikkan atau memfotocopy urutan balik RNA
<i>Ribonucleic Acid (RNA)</i>	Asam nukleat beruntai tunggal yang berperan dalam proses ekspresi gen
Sintesis RNA	Suatu proses untuk mendapatkan atau memperbanyak RNA
Transkripsi balik	Proses penyalinan urutan nukleotida yang terdapat pada molekul RNA