

REVIEW SINTESIS RNA *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN* (PCP) PADA
MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp. DENGAN SISTEM KULTUR IN VIVO

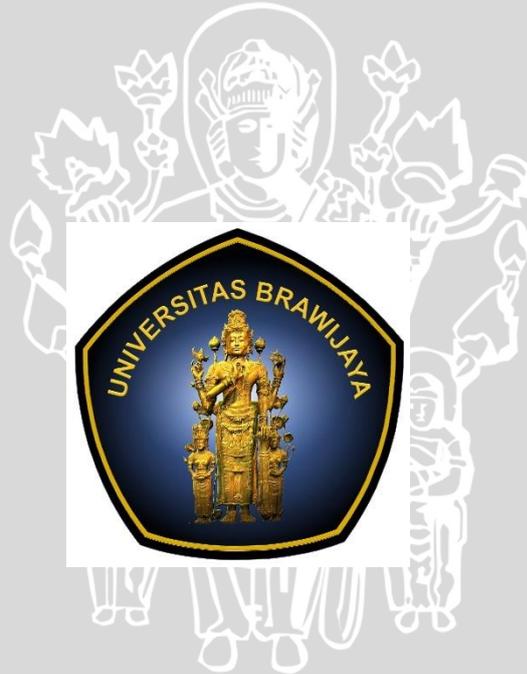
ARTIKEL SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

Oleh :

LAINI ANJARRO'AH

NIM. 125080100111014

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

REVIEW SINTESIS RNA *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN* (PCP) PADA
MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp. DENGAN SISTEM KULTUR IN VIVO

ARTIKELSKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

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

Oleh :

LAINI ANJARRO'AH

NIM. 125080100111014



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

ARTIKELSKRIPSI

REVIEW SINTESIS RNA *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN (PCP)* PADA
MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp. DENGAN SISTEM KULTUR IN VIVO

Oleh :

LAINI ANJARRO'AH

NIM. 125080100111014

Telah dipertahankan di depan penguji

Pada tanggal 5 Agustus 2016

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I



Dr. Ir. Muhammad Musa, MS

NIP. 19570507 198602 1 002

Tanggal: 16 AUG 2016

Dosen Pembimbing II



Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si

NIP. 19730404 200212 2 001

Tanggal: 16 AUG 2016



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSB

Dr. Ir. Arping Watiyeng Ekawati, MS

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal: 16 AUG 2016

REVIEW SINTESIS RNA *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN* (PCP) PADA
MIKROALGA LAUT *Spirulina* sp. DENGAN SISTEM KULTUR IN VIVO

SYNTHESIS RNA OF *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN* (PCP) ON MERINE
MICROALGAE *SPIRULINA* sp. WITH IN VIVO CULTURE SYSTEM

Laini Anjarro'ah¹, Muhammad Musa², UunYanuhar²

Program Studi Manajemen Sumber Daya Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) memiliki manfaat untuk dijadikan bahan imunostimulan yang berfungsi untuk menanggulangi serangan virus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui panjang pita cDNA dengan teknik RT – PCR yang nantinya dapat digunakan sebagai cetakan untuk memproduksi PCP. Perlakuan awal sampel *Spirulina* sp. yang didapat dari kultur diisolasi untuk mendapatkan RNA dengan menggunakan protokol *Total RNA mini kit* (Plant) yang terdiri dari pemisahan jaringan, lisis, pengikatan RNA, pencucian dan elusi RNA. mRNA yang didapat dari proses isolasi dirubah menjadi cDNA dengan menggunakan bantuan enzim *reverse transcriptase*. Amplifikasi cDNA dilakukan dengan teknik RT – PCR yang dilakukan 2 proses RT – PCR dengan menggunakan 3 primer yaitu Primer *initiated*, *adapter* dan *nested*. Hasil amplifikasi dari proses RT – PCR. Selanjutnya divisualisasi menunjukkan bahwa *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) memiliki panjang pita DNA sebesar 310 bp.

Kata kunci: *Peridinin Chlorophyll Protein*, *Spirulina* sp, sintesis cDNA, RT-PCR

ABSTRACT

Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) have beneficial to be used as the equipment of immunostimulant that is useful for overcoming virus. The purpose of this study is to know the length of cDNA band by RT- PCR technique that will be used as the DNA mold to produce PCP. The first treatment *Spirulina* sp. sample which was obtained from culture then isolated to get RNA by using *Total RNA mini kit* (Plant) protocol which consist of Plant tissue dissociation, lysis, RNA binding, RNA washing, and RNA elution. mRNA obtained from isolation process is changed into cDNA by using reverse transcriptase enzym. cDNA amplification was conducted by RT- PCR which was done in 2 RT-PCR processes by using 3 primers that is initiated primer, adapter primer and nested primer. From the visualization, it was showed that pcp have 310 bp DNA ribbon length.

Keyword : *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP), *Spirulina* sp, sintesiscDNA, RT-PCR

¹Mahasiswa Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan

²Dosen Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Perairan Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat tinggi. Salah satunya yaitu Mikroalga yang merupakan biota perairan yang memiliki potensi untuk dikembangkan. Manfaat yang dimiliki oleh biota perairan ini sangat banyak, antara lain sebagai sumber makanan alami untuk beberapa jenis larva udang, sebagai pangan sehat, untuk bioremediasi, untuk biofuel dan sumber komponen aktif seperti antibakteri (Setyaningsih, *at.al.* 2012).

Mikroalga sendiri merupakan organisme autotrof yang tidak memiliki organ dengan perbedaan fungsi yang nyata, bahkan dapat dianggap tidak memiliki organ seperti tumbuhan lainnya seperti akar, batang, daun, dll. Mikroalga sendiri dibagi menjadi dua yaitu fitoplankton dan zooplankton. Pakan ikan alami ini dapat hidup bebas baik pada perairan tawar, perairan payau atau perairan laut dan memiliki perkembangan biakan yang cepat (Djarijah, 1995).

Spirulina sp. juga dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulan untuk menanggulangi serangan virus, karena mengandung PCP yang memiliki fungsi utama dalam proses fisiologis yaitu sebagai zat antioksidan yang dapat melindungi sel dari efek bahaya radikal bebas karena efisien dalam menangkal radikal bebas dan juga meningkatkan tubuh vertebrata (Hirschberg *etal.*, 1997).

Peridinin Cell Protein (PCP) merupakan organel, pusat fiksasi karbondioksida dalam kloroplas ganggang. PCP tidak terikat oleh membran, tetapi PCP merupakan suatu area khusus di dalam plastida. PCP ditemukan

diantara tilakoid di tengah – tengah dari kloroplas di bagian dasar sel (Huet *al.*, 2003).

PCP sendiri terletak pada RNA yang merupakan asam ribonukleat yaitu asam nukleat berantai tunggal yang memiliki susunan atas monomer – monomer nukleotida dengan gula ribosa. Nukleotida disusun oleh tiga bagian yaitu basa nitrogen, gula pentosa, dan gugus fosfat. Pada RNA basa nitrogen tersusun atas adenin, guanin, sitisin, dan urasil. Urutan basa – basa nitrogen tersebut dapat mengkode informasi genetik (Campbell et al., 2010).

Pemanfaatan PCP dalam budidaya dapat di gunakan sebagai imunostimulan untuk menanggulangi serangan virus. Tetapi untuk membuat produk yang berbahan PCP ini mempunyai kendala yaitu keterbatasan dari jumlah bahan. PCP sendiri didalam mikroalga berbentuk RNA. Sehingga diperlukan penelitian mengenai sintesis RNA PCP dari mikroalga laut *Spirulina* sp. dengan menggunakan metode *Reverse transcription Polymerase Chain Reaction* (RT – PCR) untuk mendapatkan bentuk pita DNA.

Metode RT – PCR ini merupakan metode paling sensitif dalam mensintesis DNA tunggal dari mRNA. RT-PCR memiliki prinsip dasar yaitu mengubah untai mRNA menjadi DNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* yang akan membentuk untai DNA awal dengan mensintesis basa-basa nukleotida mRNA dengan basa komplementernya. Setelah untai pertama DNA terbentuk, cetakan mRNA didegradasi dengan bantuan enzim RNase (Kendall dan Riley, 2000). RT – PCR dalam penelitian ini untuk mensintesis RNA dan mengamplifikasi cDNA PCP, sehingga

nantinya didapatkan cetakan cDNA untuk memproduksi PCP.

1.2. Kegunaan

Kegunaan dilakukannya penelitian secara teoritis adalah untuk memberikan informasi mengenai PCP dari *Spirulina* sp. yang diharapkan dapat dijadikan referensi untuk mengeksploitasi PCP yang nantinya dapat dimanfaatkan untuk bahan pembuatan immunostimulan untuk mencegah ikan terserang virus.

1.3. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Genetik dan Biomolekul Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, dan Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, pada bulan Maret-Juni 2016.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Materi Penelitian

Materi dari penelitian ini adalah sintesis RNA Peridinin chlorophyll protein (PCP) mikroalga laut *Spirulina* sp. yang dikultur secara in vivo. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan komplemen DNA dari PCP. PCP diperoleh dari hasil isolasi asam ribonukleat (RNA) *Spirulina* sp. Mikroalga laut *Spirulina* sp. didapatkan dari sistem kultur in vivo.

2.2 Metode Penelitian

Sedangkan untuk penelitian deskriptif eksploratif yaitu penelitian yang bertujuan untuk 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 mendapatkan RNA RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dari *Spirulina* sp. dengan teknik pengambilan data dalam penelitian ini meliputi data primer dan sekunder.

Selanjutnya proses penelitian diawali dengan kultur *Spirulina* sp. pada skala lab wadah toples volume 3-4 L dengan suhu terkontrol 23^o C lalu diberi pupuk walne dan vitamin. pada kultur skala lab wadah carboy volume 7-8 L dengan suhu terkontrol 20^o C lalu diberi penambahan pupuk walne dan vitamin. Untuk kultur skala Intermediate volume 500-3000 L dengan suhu tidak terkontrol dan hanya ditambah pupuk walne. Selanjutnya dilakukan perhitungan kelimpahan sel setiap hari pada saat kultur, agar dapat diketahui jika fase pertumbuhannya sudah pada tahap stasioner yang siap untuk dipanen. Perhitungannya kelimpahan sel dengan mengamati sampel pada haemocytometer dibawah perbesaran 100 kali.

Pengukuran kualitas air pada saat kultur yaitu diukur pH dengan alat pH meter dengan cara memasukkan pH meter ke dalam air sampel. Suhu dengan alat thermometer raksa (Hg) dengan cara mencelupkan Thermometer ke dalam perairan selam 3 menit. Salinitas menggunakan alat refraktometer dengan cara meneteskan sampel pada refraktometer lalu dilihat nilai salinitas.

Selanjutnya dilakukan isolasi RNA *Spirulina* sp. dengan menggunakan metode Mini KIT (Plant) GeneAid Protocol. Langkah awal dilakukan pemisahan jaringan dengan menggerus 50 – 100 mg sampel menggunakan nitrogen cair, lalu dipindah ke tabung

ependorf 1,5 ml.. langkah kedua yaitu lysis menggunakan 500 µl buffer RB dan 5 µl, lalu divortex 1 menit dan diinkubasi selama 5 menit di suhu 60⁰ C, setelah selesai disentrifuse dan dipindahkan pada tabung ependorf 1,5 ml yang baru. Langkah ketiga dilakukan pengikatan RNA menggunakan etanol dan dipindah ke RB Column yang ditempatkan dalam tabung koleksi 2 ml, selanjutnya disentrifuse dan membuang cairan yang dihasilkan, karena RNA sudah terjerap pada RB Column.

Langkah keempat yaitu pencucian menggunakan 400 µl W1 Buffer lalu disentrifuse, membuang cairan yang telah disaring lalu memasukkan RB Column kembali pada tabung koleksi 2 ml lalu disentrifuse kembali hingga matrix kering. Langkah terakhir yaitu pemurnian RNA dengan cara menambah 50 µl RNase free water ke dalam matrix column, melakukan sentrifuse sehingga didapat RNA murni.

Untuk mengetahui total dan kemurnian RNA yang didapat dari proses isolasi, maka dilakukan pengukuran RNA total dan nilai kemurnian RNA menggunakan NanoPhotometer. Setelah diketahui nilai total dan kemurnian RNA maka dilanjutkan dengan RT-PCR. RNA total yang diperoleh dalam tahap isolasi akan ditranskripsi menjadi DNA komplemen (cDNA) dengan bantuan mesin PCR menggunakan metode *Reverse transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Prosedur RT-PCR dilakukan sesuai dengan *Maxime PCR Premix Kit*. Pertama memasukkan 1 µl isolat RNA ke dalam PCR tube 1ml, ditambah primer *initiated* (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3') sebanyak 1 µl dan primer *adapter* (5' – CTCGTTGCTGGCTTTGATG – 3') sebanyak 1 µl, selanjutnya menambahkan *free water* sebanyak 17 µl. Lalu dimasukkan ke mesin PC

	Siklus PCR	Suhu	Waktu
	Initial denaturation	94 ⁰ C	2 menit
40 Siklus	Denaturatio n	94 ⁰ C	20 detik
	Annealing	2 ⁰ C	20 detik
	Extention	72 ⁰ C	1 menit
	Final Extension	72 ⁰ C	3 menit

Tabel 1. Pengaturan Pengoperasian Program RT-PCR

Selanjutnya mengeluarkan PCR tube dari mesin PCR setelah rangkaian RT-PCR selesai. Selanjutnya hasil RT-PCR ditambah 1 µl primer 2 yaitu primer *nested* (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'). PCR tube dimasukkan kembali untuk dilakukan nested PCR. Mesin PCR dioperasikan sama seperti Proses PCR yang pertama. Jika mesin telah berhenti, maka PCR tube dikeluarkan dan dapat dilakukan elektroforesis. Sampel juga dapat disimpan dalam *freezer* jika tidak langsung digunakan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Kultur Mikroalga *Spirulina* sp.

Kultur mikroalga *Spirulina* sp. Dilaksanakan di BPBAP Situbondo. Kultur mikroalga dilakukan di dalam laboratorium dan di luar laboratorium. Pada penelitian ini menggunakan prinsip kultur fitoplankton dari volume kecil ke volume yang lebih besar atau biasa disebut kultur bertingkat (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Kultur Dibagi menjadi dua tahap yang pertama kultur laboratorium yang dimulai dari kultur pada tes tube, erlenmeyer, toples

volume 3 liter dan carboy volume 15 liter. Pada tahap kedua yaitu kultur intermediate yang dilakukan pada bak fiber dengan volume 500 – 1000 liter. Bibit awal diperoleh dari laut yang kemudian dibiakkan dalam media agar. Setelah tumbuh berkoloni kemudian diisolasi dan digunakan starter untuk tahap selanjutnya. Bak – bak kultur yang sudah disterilisasi kemudian diisi dengan air payau sebagai media utama pertumbuhan *Spirulina* sp. Selanjutnya diberi pupuk walne dan vitamin untuk pendukung pertumbuhan *Spirulina* sp. sebelum bibit ditebar. pada kultur yang berada didalam ruangan, diberi pencahayaan menggunakan lampu TL 40 Watt. Penggunaan lampu TL ini dimaksudkan sebagai pengganti cahaya matahari yang digunakan sebagai sumber energi untuk proses fotosintesis.

Spirulina sp. yang digunakan dalam mensintesis RNA PCP dalam penelitian ini didapat dari fase stasioner. Hal ini karena pada fase stasioner jumlah kelimpahan pertumbuhan tertinggi dan akan mengalami penurunan pada fase selanjutnya sehingga harus dipanen pada fase ini. Pengambilan sampel dilakukan pada kultur intermediate karena jumlah sampel yang dibutuhkan untuk penelitian hanya ± 1 ton berat basah mikroalga yang dihasilkan dari 1 bak fiber pada kultur intermediate. Setelah dilakukan pemenuhan dilanjutkan dengan menyaring *Spirulina* sp. untuk membuang airnya dan diperoleh endapan *Spirulina* sp. dalam bentuk bubuk yang selanjutnya akan digunakan dalam proses isolasi RNA PCP pada *Spirulina* sp.

3.2 Kelimpahan Sel *Spirulina* sp.

Dari hasil perhitungan kepadatan *Spirulina* sp. yang dihitung dengan

Haemocytometer di BPBAP Situbondo, didapatkan hasil sesuai dengan Tabel 2.

Tabel 2. Kepadatan *Spirulina* sp yang dikultur

Usia (Hari)	Kepadatan Pertumbuhan (10^4 sel/ml)		
	Toples (3L)	Carboy (15 L)	Bak Fiber (500 L)
0	340	378	1400
1	396	500	2050
2	560	800	3250
3	720	980	5400
4	880	1120	8130
5	924	1920	5770
6	1078	2300	-
7	2160	2640	-
8	2640	2880	-
9	2900	3520	-
10	3600	3600	-
11	5400	4230	-
12	5560	4980	-
13	6300	5340	-
14	6600	5600	-
15	6930	6740	-
16	7150	6600	-
17	4000	6120	-

Dari Tabel 2. Dapat dilihat kepadatan pertumbuhan *Spirulina* sp. Pada skala lab didapatkan hasil fase lag dimulai dari hari pertama sampai hari ke enam yaitu 396×10^4 – 1078×10^4 Sel/ml, fase logaritmik pada hari ketujuh sampai hari kesepuluh yaitu 2160×10^4 – 3600×10^4 sel/ml, untuk fase penurunan laju pertumbuhan dimulai dari hari ke sebelas sampai keempat belas yaitu 5400×10^4 – 6600×10^4 sel/ml, dan untuk fase stasioner terjadi pada hari kelima belas dan enam belas yaitu 6930×10^4 – 7150×10^4 sel/ml, selanjutnya mengalami fase kematian pada hari ketujuh belas. Untuk pertumbuhan pada skala carboy dimulai dari fase lag yaitu pada hari pertama

sampai keempat yaitu $500 \times 10^4 - 1120 \times 10^4$ sel/ml, untuk skala log dimulai hari kelima selanjutnya sampai kedua belas yaitu $1920 \times 10^4 - 4980 \times 10^4$ sel/ml, untuk fase penurunan laju pertumbuhan dimulai hari ketiga belas sampai hari kelima belas yaitu $5340 \times 10^4 - 6740 \times 10^4$ sel/ml, untuk fase stasioner pada hari keenam belas yaitu 6600×10^4 sel/ml dan dilanjutkan fase kematian pada hari ketujuh belas. Untuk pertumbuhan pada bak fiber dimulai dari hari pertama mengalami fase lag sebesar 2050×10^4 sel/ml, dilanjutkan dengan fase logaritmik pada hari kedua sebesar 3250×10^4 , kemudian fase penurunan laju pertumbuhan terjadi pada hari ketiga sebesar 5400×10^4 sel/ml, lalu fase stasioner terjadi pada hari keempat sebesar 8130×10^4 sel/ml dan dilanjutkan fase kematian dimulai dari hari kelima.

Fase lag mengalami kelambanan dalam pertumbuhan karena masih menyesuaikan diri dengan lingkungan, fase eksponensial mengalami kenaikan pertumbuhan karena banyaknya nutrisi yang ada sehingga terjadi pembelahan sel menyebabkan pertumbuhan *Spirulina* sp. Berjalan dengan cepat, pada fase yaitu stasioner mengalami pelambatan karena berkurangnya jumlah nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhannya, tetapi masih dapat membelah meskipun tidak sebanyak fase sebelumnya dan dilanjutkan dengan fase kematian yang dapat disebabkan beberapa hal yaitu : nutrisi tidak mencukupi, berkurangnya intensitas cahaya karena pencahayaan sendiri serta kompetisi yang semakin meningkat (Hariyati, 2008).

3.3 Kualitas Air Spirulina

3.3.1 Suhu

suhu yang terdapat pada kultur *Spirulina* sp. Pada skala laboratorium yaitu $20^{\circ} \text{C} - 25^{\circ} \text{C}$ dan suhu pada skala *intermediate* berkisar antara $26^{\circ} \text{C} - 29^{\circ} \text{C}$. Suhu ini adalah suhu yang optimum untuk pertumbuhan *Spirulina* sp. Karena menurut Hariyati (2008), kisaran suhu yang optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* sp. yaitu berkisar antara $20^{\circ} \text{C} - 30^{\circ} \text{C}$.

3.3.2 Derajat Keasaman (pH)

Berdasarkan nilai pH yang diperoleh pada skala laboratorium yaitu 7, sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 7- 8, ini menunjukkan bahwa *Spirulina* sp. dapat tumbuh dengan maksimal. Sesuai dengan pendapat Bangun et al. (2015), menyatakan bahwa *Spirulina* sp. biasanya dapat hidup dengan baik pada pH netral dan lebih mentolerir kondisi basa dari pada kondisi asam.

3.3.3 Salinitas

Dalam kultur *Spirulina* sp. salinitas yang dipakai pada skala laboratorium berkisar 33 ppt, sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 34 ppt, salinitas ini melewati kisaran optimal *Spirulina* dapat tumbuh dengan baik, tetapi masih dapat ditolerir. Karena menurut Utomo et al. (2005), menyatakan bahwa salinitas yang optimal untuk pertumbuhan *Spirulina* sp. adalah berkisar antara 15 – 30 ppt.

3.4 isolasi RNA *Spirulina* sp.

Isolasi RNA dilakukan menggunakan protokol *Total RNA mini Kit* (Plant) versi 04.24.13. yaitu terdiri dari pemisahan jaringan,

lisis, pengikatan RNA, pencucian dan elusi RNA. Penggunaan kit isolasi RNA ini dilakukan karena akan memberikan hasil isolat RNA yang lebih murni dari kontaminan dan degradasi RNA. Prinsip isolasi RNA adalah memisahkan molekul RNA dari molekul – molekul lain yang tidak diinginkan seperti DNA dan protein. Pada penelitian ini isolasi RNA dilakukan untuk mendapatkan RNA murni dari *Spirulina* sp.

Untuk pemisahan jaringan sel mikroalga ini merupakan tahap awal untuk mengeluarkan isi sel. Pemisahan ini dilakukan dengan cara menggerus sampel menggunakan mortal dan pastle dalam nitrogen cair. Nitrogen cair ini berguna untuk menyerap air yang masih tersisa pada sampel dan memudahkan dalam penggerusan. Dilanjutkan dengan pemecahan dinding sel (*lysis*) menggunakan larutan buffer 500 μ m buffer lysis (RB) untuk membuang sisa kotoran dan 5 μ l β -mercaptoethanol untuk menghilangkan polifenol dalam sel tanaman selanjutnya diinkubasi selama menit dengan suhu 60⁰ C.

Tahapan kedua yaitu pengikatan RNA dilakukan dengan menambahkan ethanol absolut setengah volume sampel ke dalam cairan yang bertujuan untuk mengikat RNA pada membran silika (Boom *et al.*, 1989). Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan 400 μ l buffer W1 yang berguna untuk menghilangkan sisa kotoran.

Tahapan ketiga yaitu pemurnian RNA dengan menambahkan 50 μ l RNase-free water. Menurut Nick (2007), penambahan RNase-free water ini bertujuan untuk mendegradasi RNA ketika lysis untuk menghasilkan RNA yang murni. Supernatan yang mengandung RNA PCP dipisahkan dan selanjutnya akan

digunakan pada proses reserve transkripsi untuk pembuatan cDNA, tetapi terlebih dahulu dilakukan pengukuran kandungan RNA total dan nilai kemurniannya.

3.6 Reverse Transcription PCR (RT – PCR) *Peridinin Chlorophyll Protein*(PCP)

Metode RT – PCR pada penelitian ini menggunakan HyperScriptTM RT-PCR GeneAll[®]. Reverse Transcription PCR (RT – PCR) memiliki 2 tahapan yaitu Sintesis dan amplifikasi *Complementary* DNA (cDNA) dengan PCR. Hal ini dilakukan karena isolat RNA tidak dapat digunakan langsung sebagai cetakan dalam proses PCR, sehingga RNA dari tahap isolasi selanjutnya akan ditranskripsikan menjadi komplemen DNA (cDNA). Sebelum proses PCR, molekul mRNA harus dilakukan *reverse transcription* sehingga akan didapatkan molekul komplemen DNA (cDNA). Molekul cDNA ini yang akan digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR yang digunakan untuk amplifikasi RNA ini disebut Reverse *Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT – PCR) (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).

PCR ini dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik didesain untuk gen *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dari *Spirulina* sp., dimana perancangan primer terdapat pada database GenBank yang mengacu pada data cDNA dari gen *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dengan panjang pita 310 bp. Karena primer yang digunakan spesifik untuk *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dari *Spirulina* sp. Maka identifikasi dapat dilakukan dengan melihat panjang fragmen RNA.

Dalam proses RT – PCR pada penelitian ini, dilakukan PCR sebanyak dua kali pertama menggunakan primer *initiated* dan primer *adapter* produk yang dihasilkan pada primer pertama dijadikan cetakan pada running kedua dengan menggunakan primer *nested* (Weis, 2002). Fungsi dari ketiga primer ini adalah yang pertama primer *initiated* yaitu untuk mengawali proses penempelan primer pada cetakan cDNA dan, kedua yaitu primer *adapter* untuk mengunci cDNA yang berada ditengah dan primer *nested* sebagai pembatas dan menutup ujung dari cDNA.

Dari RT-PCR yang pertama didapatkan cDNA yang akan digunakan pada RT-PCR yang kedua. RT-PCR yang kedua yaitu berupa amplifikasi yang bertujuan untuk memperbanyak fragmen cDNA dengan menggunakan primer *nested*. Amplifikasi dengan PCR dilakukan dengan tahapan denaturasi, annealing, dan elongasi sebanyak 35 kali. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 2 menit, tujuan dari denaturasi ini adalah untuk membuka untai ganda cDNA menjadi untai tunggal. Menurut Annisa (2012), tahap awal dari reaksi PCR yaitu denaturasi yang merupakan proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal. Suhu pada proses ini tergantung pada banyaknya basa guanin dan sitosin serta panjang cetakan DNA, jika semakin panjang cetakan dan semakin banyak basa guanin dan sitosin yang dikandung, maka suhu yang diperlukan juga tinggi. Umumnya suhu yang diperlukan pada tahap denaturasi adalah 90 – 96° C. Selanjutnya yaitu tahap annealing atau penempelan dilakukan pada suhu 50° C selama 1 menit, dimana primer *initiated* dan primer

adapter menempel pada untai tunggal cDNA pada masing-masing komplemennya.

Tahap terakhir yaitu extention, pada tahap ini terjadi pemanjangan untai cDNA. Pemanjangan enzim DNA polymerase akan membentuk cDNA baru dari gabungan antar cetakan, primer dan nukleotida. Tahap ini terjadi pada suhu 72°C selama 5 menit dan suhu 4°C untuk suhu penyimpanan (Pramarta, 2014). Selanjutnya dilakukan visualisasi yang menunjukkan bahwa PCP memiliki panjang pita DNA sebesar 310 bp.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa sintesis RNA *Peridinin Chlorobyll Protein* (PCP) pada *Spirulina* sp. Telah berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik Reverse Transcription (RT – PCR). Hasil visualisasi telah menunjukkan bahwa cDNA yang dimiliki PCP yang berhasil disintesis memiliki panjang pita sebesar 310 bp.

4.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu diperluakannya penelitian lebih lanjut mengenai pengembangan PCP yang dapat digunakan sebagai bahan immunostimulan agar meningkatkan daya imun ikan budidaya, sehingga hasil produksinya berkelanjutan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada kedua orang tua serta keluarga dan teman-teman. Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat

Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, dan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang membiayai penelitian ini. Terima kasih juga kepada Dr. Ir. Muhammad Musa, MS dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si

Daftar Pustaka

- Aranda IVR, Dineen S, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM. 2009. **Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range.** *Anal Biochem.* 387(1):122-127. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.003.
- Bloom, J. H. 1998. **Analisa Mutu Air Secara Kimiawidan Fisis. Laporan Pelatihan dan Praktek.** NUFFIC-UNIBRAW : Malang.
- Borowitzka, M.A. 1988. **Alga Growth Media and Sources of culture.** In : **Borowitzka M.A. & Borowitzka L.J. (ads), Microalgae Biotechnology.** Cambride University Press : Cambride. Pp. 456-465
- Djarajah, A. S. 1995. **Pakan Ikan Alami.** Kanisius: Yogyakarta
- Fermentas. 2011. **GeneJet RNA purification kit.** Fermentas Inc. New York : 17 hlm.
- Hariyati, R. 2008. **Pertumbuhan Spirulina sp. dalam Skala Laboratoris.** Universitas Diponegoro. Semarang. *Bioma.* 10 (1) : 19 – 22
- Hewajuli, D.A., Dharmayanti NLPI. 2014. **Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases.** *WARTAZOA* Vol. 24(1) : 16-29.
- Hirschberg, J. et al., 1997. **pathway in plants and algae.** Vol. 69(10), pp.2151–2158.
- Hu H and Gao K. 2003. **Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, Nannochloropsis sp. with enriched carbon sources.** *Biotechnology Letters.* 25(5):421-425
- Isnansetyo, A. dan Kusniastuty. 1995. **Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton.** Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Kendall, L.V., L.K. Riley. 2000. **Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).** *Contemporary Topics* 39 (1) : 42.
- Mabrudy, M. 2013. **Penggunaan Self-Assesment Untuk Mengungkap Pemahaman Siswa yang Berorientasi Pada Teori Marzano dalam Konsep Usaha dan Energi.** *Skripsi.* Universitas Pendidikan Indonesia.
- Pamarta, I. G. R., 2014. **Identifikasi Spesies Potyvirus Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (Capsicum frutescens L.) Melalui Sikuen Nukleotida Gen Coat Protein.** *Tesis.* Univesitas Udayana : Denpasar.
- Setyaningsih, Nurhayati, Nugraha, and Gunawan. 2012. **Comparative evaluation of the antibacterial activity of soft corals collected from the water of Panggang Island, Kepulauan Seribu.** *Pharmacie Globale (IJCP)* 6 (03): 1-3.
- Utomo N. B. P., Winarti dan Erlina A. 2005. **Pertumbuhan Spirulina platensis yang dikultur dengan Pupuk Inorganik (Urea, TSP dan ZA) dan Kotoran Ayam.** *Jurnal Akuakultur.* 4 (1).
- Weis, V.M., E. A. Verde, W.S. Reynolds. 2002. **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. Indonesia. 4 (1).





