

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

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

Oleh :

**LAINI ANJARRO'AH
NIM. 125080100111014**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

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

**LAINI ANJARRO'AH
NIM. 125080100111014**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh:
LAINI ANJARRO'AH
NIM. 125080100111014

telah dipertahankan di depan penguji pada
tanggal 5 Agustus 2016 dan dinyatakan
telah memenuhi syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I,

Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si

NIP. 19730702 200501 2 001

Tanggal: 16 AUG 2016

Dosen Penguji II,

Dr. Agus Maizar S. H., S.Pi, MP

NIP. 19720529 200312 1 001

Tanggal: 16 AUG 2016

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

(Dr. Ir. Arning Wilueng Ekawati, MS)

NIP. 19620805198603 2 001

Tanggal: 16 AUG 2016

Pernyataan orsinalitas Laporan Skripsi

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam laporan skripsi yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya saya sendiri dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya orang lain yang pernah ditulis atau diterbitkan kecuali yang tertulis dalam daftar pustaka.

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



Malang, 5 Agustus 2016

Mahasiswi

Laini Anjarro'ah
NIM.125080100111014

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 Chloropyll Cell Pigmen* (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 Masrurroh | 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. Dicky 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 1 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis ungkapkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan Karunia-NYA, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak – pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini, diantaranya :

1. Bapak Dr. Ir. Muhammad Musa, MS selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan dan masukan dalam menyelesaikan laporan dengan baik dan sabar
2. Ibu Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si selaku dosen penguji 1 dan Bapak Agus Maizar S.H., S.Pi, MP selaku dosen penguji 2 atas wawasan dan saran yang bermanfaat untuk kesempurnaan laporan ini
3. Ibu Sus, Ibu Wiwi, Ibu Ratna dan Bapak Bagus serta para staf di BPBAP Situbondo yang turut serta membantu dalam penelitian
4. Bapak Mahrus Ismail selaku laboran yang membantu proses penelitian di Labotatorium Genetik dan Biomolekul, UIN Malang
5. Kedua orang tua, Bapak Anis kurlilah dan Ibu supriati yang telah memberikan segenap kasih sayang, motivasi, dukungannya sehingga penulis tidak kekurangan suatu apapun dan untaian doa yang tidak pernah putus. Mas Nanang Waluyo, Mbak Susilowat dan keponakan tercinta Fadhil Yaqdan Nasrulloh yang selalu memberikan motivasi dan semangat untuk penullis menyelesaikan skripsi ini, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih sayang dan dukungan

6. Terima kasih untuk Tim Alga Nico, Eni, Miftah, Fiqie, wima, Vava dan Anto terima kasih atas kerja sama, dukungan, bantuan dan semangat untuk penelitian kita yang akhirnya dapat selesai tepat waktu
7. Keluarga besar Tim Anak Bu Uun, Tim KHV, Tim Vnn serta Tim Makro dan Mikronuklei terima kasih atas kerja sama selama satu semester ini
8. Teman-teman kos sumbersari gang 2 no 79 tersayang, Mbak Dina, Maya, Tishara, Wardah dan Hikmah terima kasih atas dukungan, doa, bantuan dan selalu mengingatkan penulis untuk menyelesaikan skripsi ini
9. Terima kasih untuk Dewi ur, Mbak Mau dan rimba atas waktu, dukungan dan bantuan yang sudah diberikan. Serta Mas Nov terima kasih atas semangat, dukungan, bantuan dan perhatian yang sudah diberikan kepada penulis
10. Teman – teman seperjuangan MSP 2012, terima kasih atas persahabatan dan kekeluargaan selama 4 tahun ini
11. Serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang namanya tidk bisa saya sebutkan satu persatu

Malang, Agustus 2016

Penulis

Ringkasan

LAINI ANJARRO'AH. Sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) Pada Mikroalga Laut *Spirulina* Sp. dengan Sistem Kultur In Vivo (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Muhammad Musa, MS** dan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si**).

Mikroalga masuk kedalam organisme autotrof. Salah satu mikroalga yang terkenal yaitu *Spirulina* sp. yang baik bagi kesehatan manusia dan dapat dijadikan pakan alami ikan. *Spirulina* sp. Memiliki bahan aktif berupa *Peridinin Cell Protein* (PCP) yang merupakan organel, pusat fiksasi karbondioksida dalam kloroplas ganggang. Terletak pada RNA yang merupakan asam ribonukleat yaitu asam nukleat berantai tunggal yang memiliki susunan atas monomer – monomer nukleotida dengan gula ribosa.

Manfaat dari PCP ini yaitu dapat digunakan sebagai bahan imunostimulan yang berfungsi untuk menanggulangi serangan virus, karena mengandung PCP memiliki fungsi utama dalam proses fisiologis yaitu sebagai zat antioksidan yang dapat melindungi sel dari efek bahaya radikal bebas.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Spirulina* sp. Dan mengetahui panjang pita cDNA dengan teknik RT-PCR. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif eksploratif dengan data primer dari observasi, visualisasi, partisipasi aktif dan dokumentasi dan data primer dari studi pustaka. Alur penelitian dimulai dari kultur *Spirulina* sp. dengan diukur kelimpahan sel dan kualitas airnya, pemanenan, diisolasi RNA dengan dilakukan pengukuran konsentrasi RNA total dan Kemurnian, RT-PCR dengan menggunakan primer *initiated* (5' – GCATGAAGCCA CTTGAAAC – 3'), primer *adapter* (5' – CTCGTTGCTGGCTTTGATG – 3'), dan primer *nested* (5' – TAACGCTGGGATGCTTTGAC – 3'). Serta elektrolisis agarosa 1,5% dengan dilakukan visualisasi dengan UV transluminator. Data pendukung yang digunakan dalam penelitian ini adalah data kualitas air kultur meliputi suhu, pH dan salinitas dan data kepadatan sel *Spirulina* sp.

Kualitas air dalam penelitian menunjukkan berupa suhu skala laboratorium yaitu 20^o C – 25^o C dan suhu pada skala *intermediate* berkisar antara 26^o C – 29^o C, pH skala laboratorium yaitu 7, sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 7-8, dan salinitas skala laboratorium berkisar 33 ppt, sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 34 ppt. Untuk pertumbuhan pada skala lab didapatkan hasil fase lag dimulai dari hari pertama sampai hari ke enam yaitu 396 × 10⁴ – 1078 × 10⁴ Sel/ml, fase logaritmik pada hari ketujuh sampai hari kesepuluh yaitu 2160 × 10⁴ – 3600 × 10⁴ sel/ml, untuk fase penurunan laju pertumbuhan dimulai dari hari ke sebelas sampai keempat belas yaitu 5400 × 10⁴ – 6600 × 10⁴ sel/ml, dan untuk fase stasioner terjadi pada hari kelima belas dan enam belas yaitu 6930 × 10⁴ -7150 × 10⁴ 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 × 10⁴ – 1120 × 10⁴ sel/ml, untuk skala log dimulai hari kelima sampai kedua belas yaitu 1920 × 10⁴ – 4980 × 10⁴ 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 ke enam 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.

Berdasarkan hasil pengukuran total RNA hasil isolasi adalah $21,0 \mu\text{g/ml}$ dengan nilai kemurnian 1,193 (A260/A280). Hasil visualisasi gel elektroforesis menunjukkan terbentuknya pita DNA dengan panjang 310 bp, sesuai dengan panjang gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* yang dijadikan referensi (GenBank).

Kesimpulan dari penelitian ini bahwa sintesis RNA peridinin Chlorophyll Protein (PCP) pada *Spirulina sp.* telah berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik Reverse Transcription (RT – PCR). Hasil yang didapat dalam elektroforesis menggunakan UV Transluminator telah menunjukkan bahwa cDNA yang berhasil disintesis memiliki panjang pita sebesar 310 bp.

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.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT, karena berkat rahmat, pertolongan serta hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan Penelitian Skripsi yang berjudul “Sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) Pada Mikroalga Laut *Spirulina* sp. dengan Sistem Kultur In Vivo.” Laporan Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam meraih gelar Sarjana Perikanan (S.Pi) di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Dalam penyusunan Laporan Skripsi ini tentunya tidak sedikit hambatan yang penulis hadapi. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan Skripsi ini berjalan dengan baik atas bantuan, dorongan dan bimbingan dari orang tua, dosen-dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya serta pihak terkait. Semoga Penelitian Skripsi ini dapat diterima dengan baik, khususnya bagi penulis sehingga tujuan yang diharapkan dapat tercapai, Amin.

Malang, 5 Agustus 2016

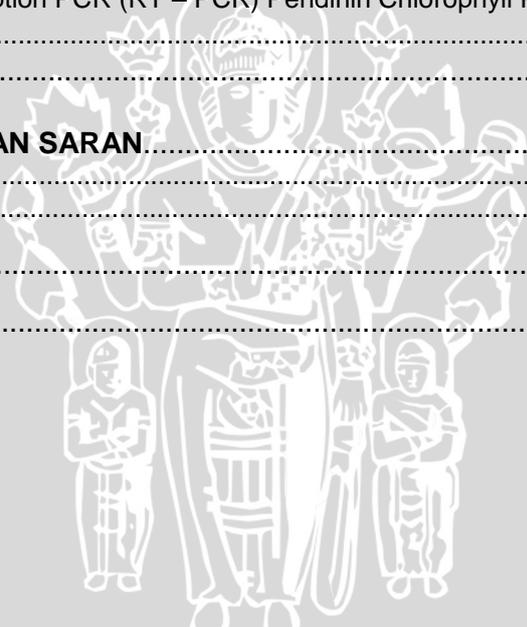
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Mikroalga <i>Spirulina</i> sp.....	5
2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi <i>Spirulina</i> sp.....	5
2.1.2 Ekologi <i>Spirulina</i> sp.....	7
2.1.3 Reproduksi <i>Spirulina</i> sp.....	8
2.1.4 Kandungan dan Manfaat <i>Spirulina</i> sp.....	9
2.1.5 Fase Pertumbuhan.....	10
2.2 <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> (PCP).....	11
2.3 RNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> (PCP).....	12
2.4 <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	13
2.5 <i>Nested PCR</i>	14
2.6 Primer.....	15
2.7 Elektroforesis.....	15
3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Materi Penelitian.....	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.3 Metode Penelitian.....	17
3.3.1 Data Primer.....	18
3.3.2 Data Sekunder.....	19



3.4	Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1	Kultur <i>Spirulina</i> sp.....	20
3.4.2	Perhitungan Kelimpahan Sel.....	25
3.4.3	Prosedur Pengukuran Kualitas Air.....	26
3.4.4	Isolasi RNA <i>Spirulina</i> sp.....	27
3.4.5	Pengukuran RNA Total dengan NanoPhotometer.....	29
3.4.6	RT- PCR	30
3.4.7	Elektroforesis.....	32
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1	Kultur Mikroalga <i>Spirulina</i> sp.....	33
4.2	Kepadatan <i>Spirulina</i> sp.....	34
4.3	Kualitas Air <i>Spirulina</i> sp.....	37
4.3.1	Suhu.....	37
4.3.2	Keasaman (pH).....	37
4.3.3	Salinitas.....	38
4.4	Isolasi RNA <i>Spirulina</i> sp.....	38
4.5	Pengukuran Kandungan RNA Total dan Nilai Kemurnian.....	39
4.6	Reverse Transcription PCR (RT – PCR) Peridinin Chlorophyll Protein (PCP).....	40
4.7	Elektroforesis.....	43
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran.....	45
	DAFTAR PUSTAKA.....	46
	LAMPIRAN.....	50



DAFTAR TABEL

1. Komposisi Pupuk Walne.....	22
2. Pengaturan Operasi Prpgram RT – PCR.....	31
3. Kepadatan Pertumbuhan <i>Spirulina</i> sp.....	35



DAFTAR GAMBAR

1. <i>Spirulina</i> sp.....	6
2. SiklusHidup <i>Spirulina</i> sp.....	8
3. Kurva Pertumbuhan Mikroalga.....	11
4. Organel Sel <i>Spirulina</i> sp.....	12
5. Alur Kerja Penelitian.....	20
6. <i>Spirulina</i> sp.....	34
7. Grafik Pertumbuhan pada Kultur <i>Spirulina</i> sp.....	36
8. Siklus RT – PCR	42
9. Gambar visualisasi elektroforegram cDNA dengan gel agarose 1,5 %.....	43



LAMPIRAN

1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....50
2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian.....52
3. Dokumentasi Penelitian.....53



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 perkembang biakan yang cepat (Djarajah, 1995).

Salah satu contoh mikroalga yang terkenal manfaatnya yaitu *Spirulina* sp. karena kegunaannya yang dapat dijadikan makanan yang baik bagi kesehatan manusia dan disajikan dalam bentuk powder, pelet, atau juga dapat dimanfaatkan sebagai pakan tambahan di dalam makanan hewan dan pakan ikan (Indah, 2009). Alga dari kingdom protista memiliki kandungan gizi ini sangat beragam seperti protein yang mencapai 72 %, lipid 8 %, karbohidrat 16 %, vitamin B1, B2, B6, B12, C, niasin, β karoten dan kandungan asam amino yang cukup seimbang. Salah satu asam lemak esensial yaitu asam amino γ -linoleat (GLA) terkandung dalam mikroalga ini merupakan salah satu sumber energi alternatif. Selain itu spirulina juga mudah untuk dikultur dan dapat berkembangbiak dengan cepat (Kabinawa, 2006).

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 menangkalkan radikal bebas dan juga meningkatkan tubuh vertebrata (Hirschberg *et al.*, 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 *et 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).

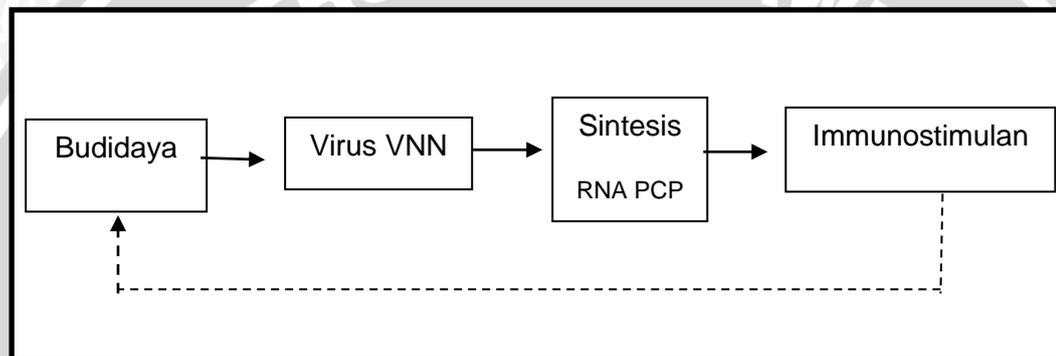
Pemanfaatan PCP dalam budidaya dapat di gunakan sebagai imunostimulan untuk menanggulangi serangan virus. Tetapi untuk membuat produk yang berbahan PCP ini mempunyai kendala yaitu keterbatasan dari jumlah bahan. PCP sendiri didalam mikroalga berbentuk RNA. Sehingga diperlukan penelitian mengenai sintesis 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 Rumusan Masalah

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



Kendala yang dihadapi oleh pembudidaya yaitu serangan berbagai macam agen penyakit seperti bakteri, jamur, dan virus. Contohnya yaitu virus VNN yang keberadaannya sangat berbahaya bagi kehidupan ikan. Serangan VNN dapat menyebabkan kematian 100 %. Upaya penanggulangan yang dapat dilakukan salah satunya adalah menggunakan immunostimulan . Immunostimulan dapat dihasilkan oleh PCP. PCP sendiri didapat dari mensitesis RNA PCP menggunakan metode RT – PCR, untuk mendapatkan cetakan cDNA yang nantinya akan digunakan untuk memproduksi PCP.

Berdasarkan hal tersebut maka diperoleh rumusan masalah, yaitu berapakah panjang pita cDNA *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada mikroalga laut *Spirulina* sp. menggunakan metode RT – PCR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mendapatkan cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Spirulina* sp. dan mengetahui panjang pita cDNA dengan menggunakan teknik RT-PCR.

1.4 Manfaat Penelitian

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

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

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. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Spirulina* sp.

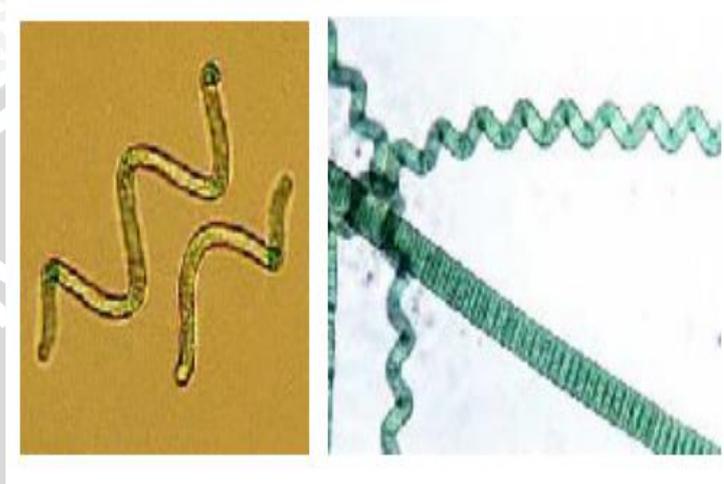
Mikroalga merupakan jenis rumput laut atau alga yang berukuran mikroskopis. Energi matahari dan karbondioksida dimanfaatkan oleh mikroalga untuk keperluan fotosintesis sehingga alga juga disebut produsen primer dengan memiliki waktu pertumbuhan yang cepat yaitu mulai hitungan hari sampai beberapa minggu (Uju dan Wahyuni, 2007). Salah satu contoh mikroalga yaitu *Spirulina* sp.

Spirulina sp. digolongkan ke dalam kelompok tanaman Thallophyta, yaitu tanaman yang tidak memiliki akar, batang dan daun sejati, berbentuk filamen (benang) yang terdiri atas sel – sel silindris (Kabinawa, 2006). Menurut Ciferri (1983) dalam Sedjati *et al.* (2012), *Spirulina* sp. merupakan organisme planktonik yang memiliki sifat autotrof, tidak mempunyai inti sel sejati (prokariotik), uniselular dan berbentuk filamen menyerupai spiral berwarna biru – hijau. Mikroalga ini tergolong dalam Cyanobacteria.

2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi *Spirulina* sp.

Ganggang renik *Spirulina* sp. termasuk multiseluler berbentuk filamen (benang) yang tersusun atas sel-sel berbentuk filamen (benang) yang tersusun atas sel-sel berbentuk silindris tanpa septa (sekat pemisah), tidak bercabang dengan trikhoma (benang) berbentuk helik (berpilin) dan berwarna hijau kebiruan. Panjang trikhoma sekitar 20 mm, sehingga terlihat dengan mata langsung. Diameter pada tipe yang kecil sebesar 1 – 3 μm , sedangkan untuk tipe yang lebih besar yaitu 3 -12 μm (Kabinawa, 2006). Menurut Widayati (2014), ciri -ciri morfologinya yaitu berfilamen yang tersusun dari trikoma multiseluler yang berbentuk spiral dan begabung menjadi satu, memiliki sel berkolom

membentuk filamen terpilin menyerupai spiral, tidak bercabang, autotrof, dan berwarna biru kehijauan. Menurut Tomaselli (1997) dalam widayati (2014), rangkaian sel *spirulina*sp. berbentuk silindris dengan dinding sel yang tipis, berdiameter 1 – 12 μ m. Filamen *Spirulina* sp. hidup berdiri sendiri dan dapat bergerak bebas. Morfologi *Spirulina* sp. disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. *Spirulina* sp. (Vonshak, 2004)

Spirulina sp. merupakan anggota divisi Cyanophyta yang memiliki karakteristik trikrom uniseluler dan berbentuk filamen. Ciri khas dari divisi Cyanophyta adalah kandungan pigmen biru atau C – phycocyanin, glikogen cadangan dan memberi hasil negatif untuk tes iodum (Presscot, 1964 dalam Suwanto, 2009). *Spirulina* sp. termasuk salah satu jenis mikroalga yang banyak dikulturdandijual secara komersil dalam bentuk kering sebagai makanan suplemen. Mikroalga ini memiliki kandungan nutrisi yang tinggi, yaitu kadar protein 55-70%, karbohidrat 15-25%, asam lemak esensial 18% dan sisanya adalah vitamin, mineral dan pigmen, yaitu klorofil, karoten, xantofil dan fikosianin (Sanchez et al.,2003 dalam Prasanna et al., 2010).

Bakal inti sel spirulina tersusun atas partikel-partikel khromatin. Dinding sel *Spirulina*sp. mengandung polisakarida dalam bentuk mukopolisakarida seperti bakteri yang berfungsi sebagai makanan cadangan. *Spirulina*sp. memiliki zat

warna Cyanophysin sehingga dikenal juga dengan nama Cyanobakterium. Kelompok Cyanophyceae dicirikan memiliki zat warna hijau kebiruan (Cyanophysin), tidak berflagel dan bergerak dengan cara meluncur. Secara garis besar spirulina diklasifikasikan sebagai berikut :

Devisi : Cyanophyta
Klas : Cyanophyceae
Ordo : Nostocales
Famili : Oscillatoriaceae
Marga : Spirulina
Jenis : *Spirulina* sp.

2.1.2 Ekologi *Spirulina* sp.

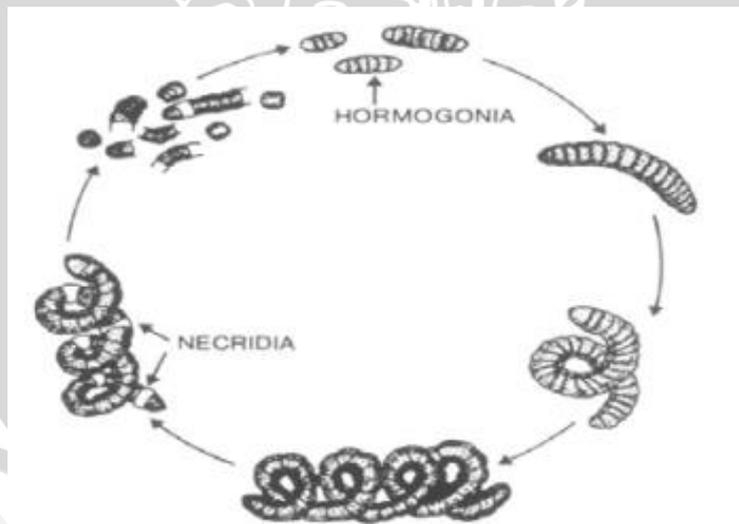
Spirulina sp. adalah mikroalga yang memiliki daya adaptasi tinggi, yang berarti dia dapat tumbuh dalam bermacam-macam kondisi pertumbuhan. Contohnya dapat ditemukan di perairan dengan kondisi basa (Ogawa dan Terui, 1970). Dalam kultur mikroalga faktor pembatas yaitu suhu sangat penting untuk diketahui baik dalam skala laboratorium, semi massal, maupun massal . penurunan suhu pada lingkungan kultur akan dapat menyebabkan penurunan laju fotosintesis dan peningkatan derajat lipid tidak jenuh di dalam sistem membran, sedangkan peningkatan suhu akan merangsang aktivitas molekul sehingga laju difusi meningkat (Borowitzka, 1988).

Spirulina sp. berwarna hijau kebiruan merupakan ganggang renik (mikroalga) yang hidup tersebar luas dalam semua ekosistem, melingkupi ekosistem daratan dan ekosistem perairan baik itu air tawar, air payau, maupun air laut. Spirulina mudah tumbuh pada danau-danau alami dengan keasaman air alkalis (pH 8,5 – 11) sehingga bisa tumbuh monokultur (murni) seperti di danau Chad, Lembah Rift, Texcoco, Togo, Ethiopia, Kenya, dan Peru. Di Indonesia

mikroalga ini tumbuh endemik di Situ Ciburuij, Padalarang dan Ranu Kelakah. *Spirulina* sp. ini dapat tumbuh subur pada kisaran suhu 18 – 40° C dengan intensitas cahaya rendah sampai tinggi (500 – 350.000 lux) (Kabinawa, 2006).

2.1.3 Reproduksi *Spirulina* sp.

Reproduksi *Spirulina* sp. terjadi dengan cara aseksual ataupun menggunakan spora. Pada spesies yang membentuk koloni atau filamen, reproduksi terjadi dengan memutuskan sel koloni atau filamen membentuk sel menjadi filamen baru (Murtidjo, 2007). Ada tiga tahapan dasar pada reproduksi *Spirulina* sp. yaitu proses fragmentasi trikoma, pembesaran dan pematangan sel hormogonia, serta pemanjangan trikoma yang dapat dilihat pada gambar 2. Selanjutnya trikoma yang sudah dewasa dapat dibagi menjadi filamen atau hormogonia, dan sel – sel di hormogonia akan meningkat melalui pembelahan biner, tumbuh memanjang dan membentuk spiral (Hongmei *et al.*, 2008).



Gambar 2. Siklus Hidup *Spirulina* sp.
(Sumber: Hongmei *et al.*, 2008)

2.1.4 Kandungan dan Manfaat *Spirulina* sp.

Beberapa karakteristik dan kandungan nutrisi yang dimiliki oleh *Spirulina* sp. cocok sebagai makanan fungsional. Kandungan yang dimiliki oleh *Spirulina* sp. berupa protein, asam lemak esensial, vitamin, mineral, dan klorofil serta fikosianin (Christwardana et al., 2013). Dipercaya juga bahwa *Spirulina* sp. dapat dijadikan produk makanan penyembuh atau obat. Kandungan *Spirulina* sp. dijelaskan lebih rinci sebagai berikut:

a. Mineral

Jumlah mineral esensial yang terkandung dalam *Spirulina* sp. hampir sekitar 3 – 7%. Mineral – mineral ini terakumulasi di dalam mikroalga dan berasal dari mineral yang terkandung dalam media pertumbuhan dan juga dipengaruhi oleh suhu, salinitas, dan pH.

b. Protein

Kandungan protein pada *Spirulina* sp. tinggi sekitar 55 – 70%. Protein ini merupakan suatu senyawa kompleks yang kaya akan asam amino esensial, metionin (1,3 – 2,75%), sistin (0,5 – 0,7%), triptofan (1-1,95%), dan lisin (2,6 – 4,63%). Tingginya kadar asam amino baik untuk kesehatan karena merupakan salah satu bahan pembuat protein.

c. Asam Amino Esensial

Spirulina sp. memiliki *Poly Unsaturated fatty Acid* (PUFA) sekitar 1,3 – 15% dari lemak total (6 – 6,5%). Jenis kandungan lemak tertinggi dari *Spirulina* sp. adalah *Gamma Linoleic Acid* (GLA) sekitar 25 – 60% dari total lemak. Senyawa lain yang terdapat di dalam lemak adalah asam palmik (44,6 – 54,1%), asam oleat (1 – 15,5%) dan asam linoleat (10,8- 30,7%). *Spirulina* sp. mengandung kolesterol sekitar 32,5 mg/100g.

d. **Betakarotenoid dan Vitamin**

Karotenoid yang terkandung dalam *Spirulina* sp. sangat tinggi. Karotenoid tertinggi yang ditemukan di *Spirulina* sp. adalah betakaroten yang bisa dikonversi menjadi vitamin A, dan vitamin B. Dengan demikian, 4 mg kandungan gizi pada *Spirulina* sp. sama dengan kandungan gizi yang terdapat pada 100 g sayuran segar.

2.1.5 Fase pertumbuhan

Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), Selama pertumbuhannya mikroalga dapat mengalami beberapa fase pertumbuhan, yaitu:

1. Fase Lag (istirahat)

Pada fase ini peningkatan paling signifikan terlihat pada ukuran sel karena secara fisiologis mikroalga menjadi sangat aktif. Proses sintesis protein baru juga terjadi dalam fase ini. Metabolisme berjalan tetapi pembelahan sel belum terjadi sehingga kepadatan sel belum meningkat karena mikroalga masih beradaptasi dengan lingkungan barunya.

2. Fase Logaritmik (log) atau Ekspensial

Fase ini dimulai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan yang meningkat secara intensif. Pada fase ini merupakan fase terbaik untuk memanen mikroalga untuk keperluan pakan ikan atau industri.

3. Fase Penurunan Laju Pertumbuhan

Pembelahan sel tetap terjadi pada fase ini, namun tidak seintensif fase sebelumnya, sehingga laju pertumbuhan juga mengalami penurunan dibandingkan fase sebelumnya.

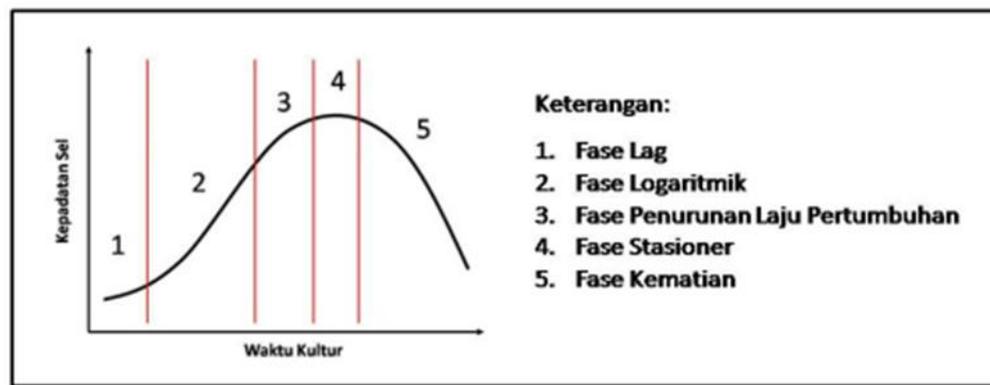


4. Fase Stasioner

Pada fase ini laju reproduksi dan laju kematian relatif sama. Penambahan dan pengurangan jumlah mikroalga seimbang sehingga kepadatannya relatif tetap (stasioner).

5. Fase Kematian

Fase ini ditandai dengan laju kematian yang lebih besar daripada laju reproduksi sehingga jumlah sel mengalami penurunan secara geometrik. Secara skematis pola pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Mikroalga (Sumber: Prabowo, 2009)

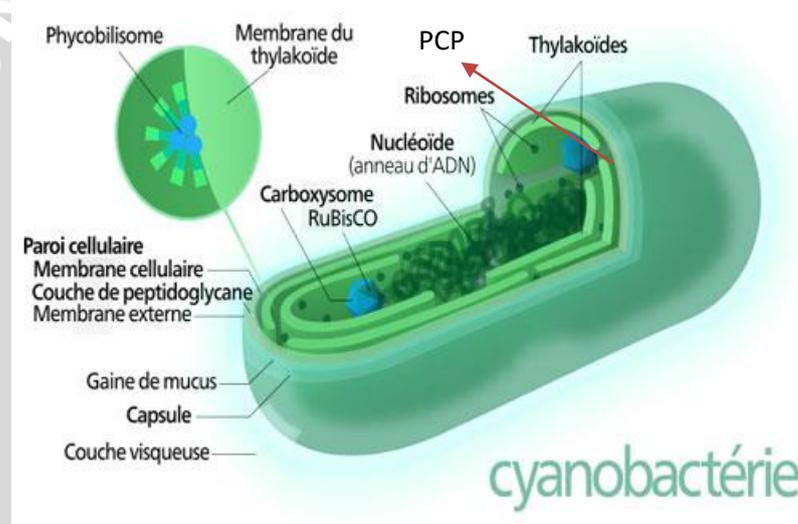
2.2 *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)*

Peridinin chlorophyll protein (PCP) adalah organel sel yang memiliki fungsi penyerap cahaya dalam proses fotosintesis. Panjang gelombang energi matahari yang dapat diserap oleh PCP sebesar 470 – 550 nm (warna hijau-biru). PCP memiliki dua bentuk yaitu modimer (bentuk pendek) dan monomer (bentuk panjang). Masa molekul yang dimiliki bentuk modimer sekitar 14 – 16 kDa, sedangkan masa molekul bentuk monomer sekitar 30 – 35 kDa. Tetapi ada sebagian jenis alga yang hanya memiliki satu jenis pirenoid (Weis et al., 2002).

Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) memiliki ketebalan selubung pati kurang lebih 0,25 μm , dengan ukuran diameter 1 sampai 1,5 μm . Tilakoid tidak melintasi matriks pirenoid, PCP memiliki butiran – butiran lembut yang menutupinya yang

berbentuk seperti cincin tertutup. Butiran – butiran pati yang terdapat dalam stroma dan menutupi pirenoid ini dapat mencapai dimensi yang cukup besar (hingga 0,25 – 0,75 μm) (Stoyneva et al., 2009).

Hirschberg *et al.*, (1997) dalam Fasya (2013), menyatakan bahwa peran penting yang dimiliki pirenoid pada tumbuhan dan algae yaitu sebagai pusat reaksi fotosintesis dan terlibat dalam proses transfer energi. Pirenoid dapat menangkal radikal bebas dan meningkatkan kekebalan tubuh vertebrata secara efisien. Pengkonsumsian dalam jumlah tertentu komponen pirenoid yang sudah berasosiasi dalam bentuk karotenoid mampu mengurangi resiko kanker secara signifikan.



Gambar 4. Organel Sel *Spirulina* sp. (Google 2016)

2.3 RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP)

Asam ribonuklet (RNA) merupakan asam nukleat beruntai tunggal yang berperan utama dalam proses ekspresi gen. RNA merupakan salah satu molekul asam nukleat yang terbentuk dari asam dioksiribonukleat (DNA). Fungsi dari RNA adalah 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 basbasa nitrogen tersebut dapat mengkode informasi genetik (Campbell *et al.*, 2010 dalam Annisa, 2012).

RNA merupakan bahan genetik yang berperan dalam ekspresi genetik. Dalam genetika molekuler, RNA merupakan perantara informasi yang dibawa DNA dan ekspresi fenotip yang diwujudkan dalam bentuk protein. RNA memiliki berbagai wujud yang tersebar di alam. Sebagai bahan genetik, RNA berwujud sepasang pita (dsRNA), sementara dalam genetika molekuler, terdapat tiga tipe RNA yang terlibat dalam sintesis protein, yaitu *messenger*-RNA (mRNA), *ribosomal*-RNA (rRNA), *transfer*-RNA (tRNA). mRNA memiliki fungsi sebagai penyandi urutan asam amino pada polipeptida. rRNA bersama protein ribosomal memiliki fungsi untuk pembentukan ribosom sebagai tempat sintesis protein. tRNA memiliki fungsi pembawa asam amino ke ribosom pada saat translasi (Agustina *et al.*, 2011).

Isolasimerupakan suatu prosedur yang berfungsi sebagai pemisah suatu bagian dari bagian lain dengan tujuan tertentu (Singleton dan Sainsbury, 2006). Isolasi RNA sendiri digunakan untuk pemisahan RNA dari zat-zat lain sehingga dapat diperoleh RNA murni. Secara umum terdapat tiga syarat dalam melakukan isolasi RNA, yaitu lysis membran sel untuk menampakkan RNA, pemisahan RNA dari zat dan molekul lain, seperti DNA, lipid, protein dan karbohidrat dan yang terakhir pemulihan RNA dalam bentuk (Dale dan Schantz, 2001).

2.4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Pada teknik PCR, RNA tidak dapat digunakan sebagai cetakan, oleh karena itu perlu dilakukan proses transkripsi balik terhadap molekul mRNA

sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementary DNA*). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR (Widowati, 2013).

Proses RT-PCR sebenarnya sama dengan proses PCR biasanya, yang membedakan adalah pada proses ini berlangsung satu siklus tambahan. Siklus tambahan tersebut yaitu adanya perubahan RNA menjadi yaitu adanya cDNA (*complementary DNA*) dengan menggunakan bantuan enzim *reverse transcriptase* (Gaffar, 2007). Enzim *reverse transcriptase* merupakan enzim DNA polymerase yang menggunakan molekul RNA sebagai cetakan untuk mensintesis molekul DNA (cDNA) yang berkomplementer dengan molekul RNA tersebut (Sihotang, 2013).

Pada metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untai mRNA diubah menjadi DNA tunggal dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* dan primer oligo-dT. Primer oligo-dT akan menempel pada ujung 3' poli-A mRNA, selanjutnya enzim *reverse transcriptase* akan membentuk untai DNA awal dengan cara mensintesis basa-basa nukleotida mRNA dengan basa komplementernya. Apabila untai pertama DNA telah terbentuk, maka cetakan mRNA akan terdegradasi oleh bantuan enzim RNase H (Kendall dan Riley, 2000). Untai pertama DNA merupakan untai tunggal sehingga agar menjadi DNA untai ganda dibutuhkan primer forward untuk membuat komplemen untai tunggal tersebut. DNA untai ganda yang telah terbentuk kemudian diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR standar (Weaver dan Hedrick, 1997 dalam Annisa, 2012).

2.5 Nested PCR

Metode nested PCR ini menggunakan dua set primer, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. *Primer inner*

yang merupakan sekuens DNA target dari satu primer disimpan diantara sekuens target set kedua dari primer yang disebut outer primer. Pada penggunaannya, 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 menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk pertama (Yusuf, 2010). Kelebihan menggunakan nested PCR ini yaitu jika terdapat fragmen yang salah teramplifikasi maka kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh primer yang kedua sangat rendah, karena itu nested PCR lebih spesifik dalam melakukan amplifikasi (Marjen, 2012).

2.6 Primer

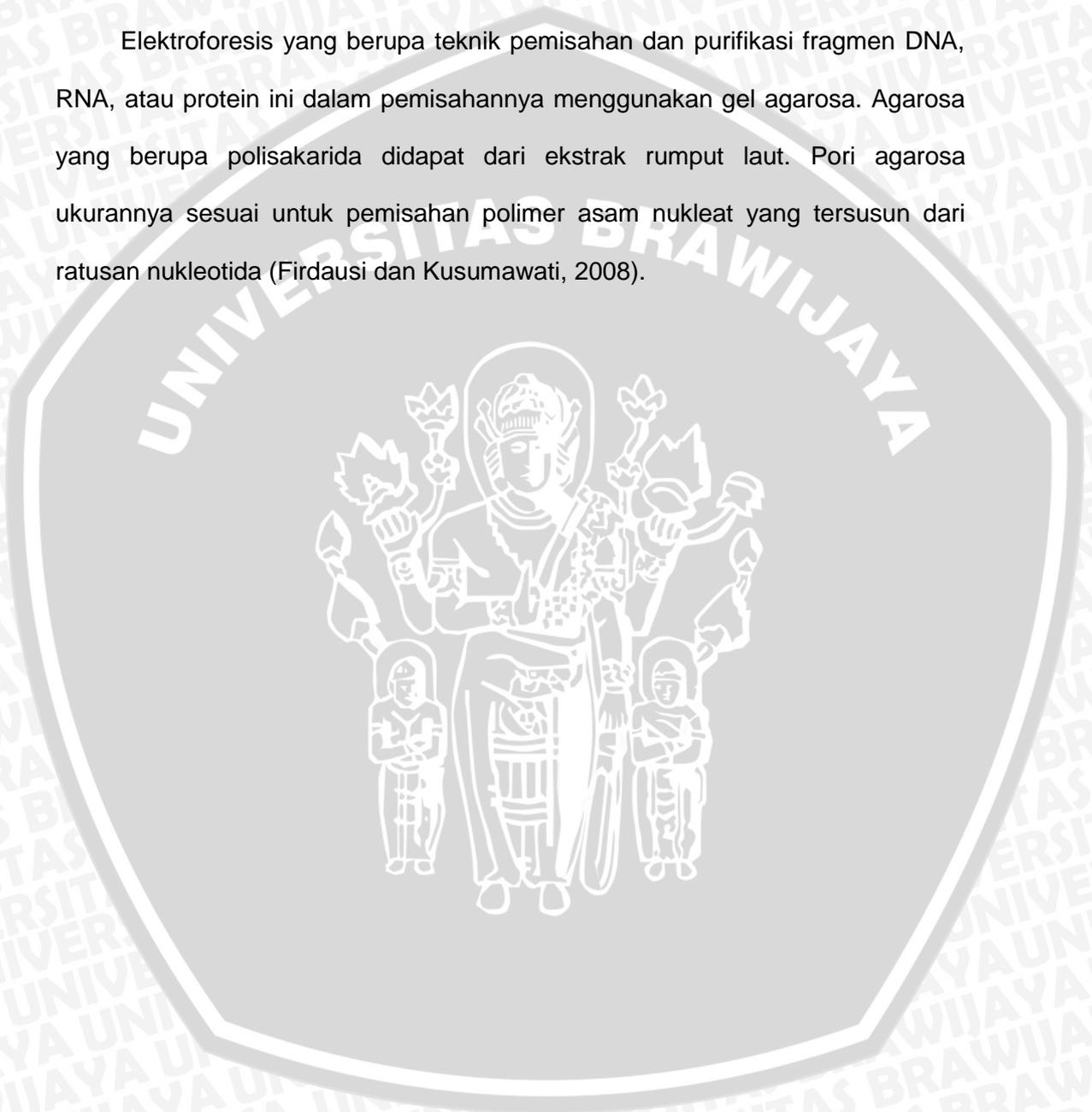
Primer sangat menentukan keberhasilan dari proses PCR. Primer digunakan sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi. Penyusunan primer dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang akan dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui, maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat. Umumnya panjang primer berkisar 18-30 basa (Handoyo dan Ari, 2001).

2.7 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu teknik untuk memisahkan molekul yang bermuatan berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi dalam medan listrik. Prinsip kerja elektroforesis ditujukan terhadap pemisahan molekul-molekul

organik seperti DNA, RNA, atau protein yang berdasarkan ukuran ataupun muatan. Tujuan dari pemisahan molekul-molekul ini adalah untuk mengetahui ukuran atau jumlah basa serta mengetahui ukuran basa nukleotida (Annisa, 2012).

Elektroforesis yang berupa teknik pemisahan dan purifikasi fragmen DNA, RNA, atau protein ini dalam pemisahannya menggunakan gel agarosa. Agarosa yang berupa polisakarida didapat dari ekstrak rumput laut. Pori agarosa ukurannya sesuai untuk pemisahan polimer asam nukleat yang tersusun dari ratusan nukleotida (Firdausi dan Kusumawati, 2008).



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 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*.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan diperlukan untuk menunjang keberhasilan penelitian. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini beserta fungsinya disajikan pada lampiran 1 dan 2.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif eksploratif. Metode deskriptif ini bertujuan untuk melaporkan hasil dari sintesis RNA PCP mikroalga *Spirulina* sp.. Menurut Surakhmad (1998), menyebutkan bahwa metode deskriptif digunakan untuk menggambarkan keadaan atau kejadian di suatu daerah tertentu. Tetapi dalam pelaksanaannya tidak terbatas pada pengumpulan dan penyusunan data saja, tetapi juga meliputi pembahasan dan analisa tentang data tersebut, sehingga diharapkan dapat memberikan data secara umum, sistematis, aktual dan valid mengenai fakta dan sifat – sifat populasi tersebut. Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang melakukan analisis hanya sampai tahap deskripsi yaitu menganalisis dan menyajikan data secara sistematis sehingga bisa lebih mudah dipahami dan disimpulkan. Penelitian eksploratif merupakan jenis penelitian yang bertujuan untuk

menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala, fakta, dan penyakit tertentu. 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.

3.3.1 Data Primer

Data Primer adalah data yang didapat dari sumber pertama, survey dilakukan bila data sudah ada di sasaran penelitian (Mulyanto, 2008). Data primer dalam penelitian ini diperoleh dari hasil observasi, partisipasi aktif dan wawancara dengan pihak terkait.

1. Observasi

Observasi merupakan proses yang kompleks, suatu proses yang tersusun dari berbagai proses biologis dan psikologis (Sugiyono, 2010). Observasi langsung dilakukan dengan pengamatan dan pencatatan secara disengaja dan sistematis tentang keadaan atau kondisi dan gejala-gejala dalam kegiatan. Dalam penelitian ini observasi dilakukan pada saat pengukuran kualitas air dan perhitungan kelimpahan sel selama masa kultur.

2. 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 *Spirulina* sp. serta pengambilan RNA melalui tahap isolasi.

3. Visualisasi

Visualisasi merupakan penggunaan teknologi komputer sebagai pendukung dalam penggambaran data visual yang interaktif dengan tujuan memperkuat pengamatan. Penggunaan teknologi komputer ini akan memperkaya proses penemuan ilmiah sehingga dapat memunculkan pemahaman lebih dalam karena menampilkan dan mempermudah peneliti melihat data yang sulit dengan pemikiran (Mauludi, 2013). Dalam penelitian ini, visualisasi dilakukan untuk menampilkan hasil amplifikasi cDNA melalui RT-PCR.

4. Dokumentasi

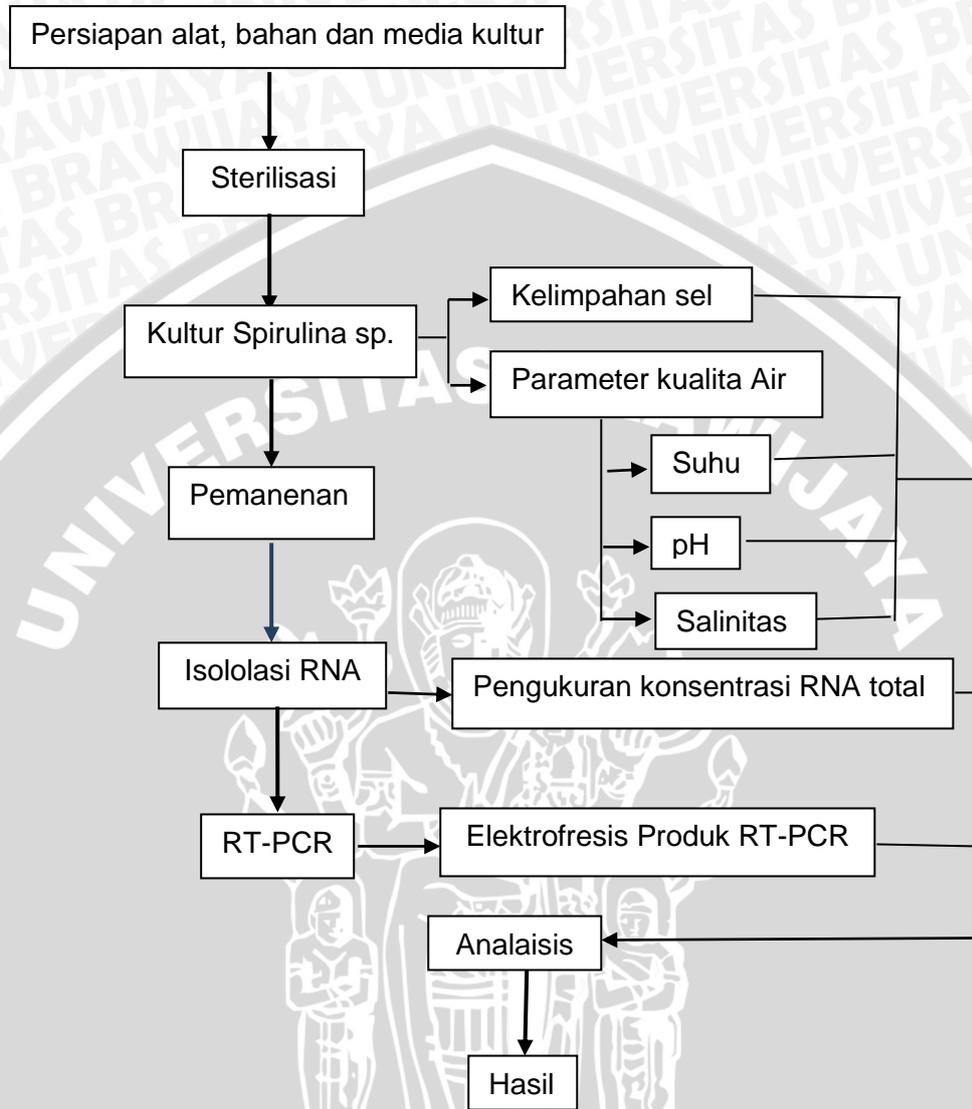
Dokumentasi merupakan cara mengumpulkan data melalui mempelajari, mencatat, menyalin dokumen atau catatan yang bersumber dari peninggalan tertulis seperti arsip, termasuk juga buku tentang teori, pendapat, dalil dan hukum (Widiastuti, 2014). Pada Penelitian ini, dokumentasi dilakukan dengan cara mengambil gambar atau foto dengan menggunakan kamera dan mencatat data dari proses penelitian meliputi, kultur mikroalga, isolasi RNA, RT PCR dan elektroforisis.

3.3.2 Data Sekunder

Data sekunder adalah data primer yang diperoleh pihak lain (telah diolah) dan disajikan baik oleh pengumpul maupun pihak lain (Mulyanto, 2008). Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari laporan, jurnal, majalah, Laporan PKL/Skripsi, situs internet serta kepustakaan yang menunjang dari penelitian ini.

3.4 Prosedur Penelitian

Alur kerja penelitian ini secara umum disajikan pada Gambar 8 berikut ini.



Gambar 5. Alur Kerja Penelitian

3.4.1 Kultur *Spirulina* sp.

Kultur mikroalga dilakukan di BPBAP Situbondo. Pertama sebelum melakukan kultur yang harus dilakukan yaitu menyiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan untuk kultur *Spirulina* sp. Dan harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi merupakan suatu perlakuan yang bertujuan untuk membersihkan alat dan bahan dari mikroorganismenya 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.

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.

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 Chloropyceae adalah pupuk Conway atau Walne dengan dosis pemakaian 1 ml/L (Martosudarmo dan Sabarudin, 1979). Pupuk Walne digunakan karena komposisinya sederhana dan tidak mengandung logam berat. Adapun komposisi dari pupuk Walne disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Pupuk Walne

Skala Laboratorium		Skala Intermediet	
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 *Spirulina* sp. 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 *Spirulina* sp. diperoleh dari air laut, kemudian dibiakkan dalam media agar. Koloni *Spirulina* sp. yang telah tumbuh banyak kemudian diisolasi dan digunakan sebagai starter. Menurut BPBAP Situbondo (2012), tahap-tahap kultur murni plankton skala laboratorium adalah sebagai berikut.

1. 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 memasukkan dalam 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
- Memanen kultur plankton setelah 6-7 hari (fase stasioner), untuk digunakan sebagai bibit pada kultur tahap berikutnya.

2. 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 D. salina yang dikultur bisa mati
- Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt
- Memanen kultur plankton setelah 6-7 hari, untuk digunakan sebagai bibit pada kultur tahap berikutnya.

3. Kultur pada Toples

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 ke dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4
- Menutup toples dengan menggunakan plastik dan diikat dengan karet gelang
- Memberikan keterangan jenis plankton dan tanggal kultur dengan kertas label
- Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23⁰ 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.

4. 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 air laut yang telah disterilkan dengan kaporit dan dipasang aerasi
- Menetralkan media air laut dengan Na-thiosulfat 5 ppm

- Mengecek kenetralannya dengan menggunakan Chlorine test setelah 15 menit media kultur dicek
- 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 20⁰ 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.

5. Kultur Intermediate

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

- Menyeterilkan air laut menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat 5 ppm, lama sterilisasi min 24 jam
- Memberikan pupuk TG (Technical Growth) dengan dosis 1 ml/l. Untuk species Chlorophyceae menggunakan pupuk Walne (TG). Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 :7
- Menempatkan kultur pada ruangan semi outdoor dengan atap fiber tembus cahaya matahari
- menginkubasi 5-7 hari

3.4.2 Perhitungan Kelimpahan Sel

Langkah-langkah yang dilakukan untuk menghitung kelimpahan Spirulina sp. Adalah sebagai berikut:

- Mengambil sampel *Spirulina* sp. Diambil dengan menggunakan botol film secukupnya
- Mengambil sampel pada botol film sebanyak 1 tetes dan diletakkan pada *haemocytometer*
- Mengamati sampel pada *haemocytometer* di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali sebanyak 3 kali pengamatan dan dihitung dengan bantuan *hand tally counter*.
- Menghitung kelimpahan *Spirulina* sp., jumlah sel (N) dalam kotak-kotak *haemocytometer* dihitung ke dalam rumus :

$$\text{Kelimpahan Sel } \left(\frac{\text{sel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Jumlah Total Sel}}{\text{Jumlah Kotak yang Dihitung}} \times 16 \times 10^4$$

3.4.3 Prosedur Pengukuran Kualitas Air

1. pH

Menurut Washington State Department of Ecology (2015), pengukuran pH dapat menggunakan 3 metode yaitu pH meter, kertas lakmus dan field kit.

Prosedur untuk pengukuran pH menggunakan pH meter adalah sebagai berikut:

- Mengkalibrasi pH meter sesuai dengan instruksi kerja, gunakan 2 larutan buffer (dengan pH 7 dan 10) untuk mengkalibrasi
- Memasukkan Sampel air ke dalam tabung ukur secukupnya sampai batas ujung pH meter, bilas pH meter dengan air sampel sebelum dimasukkan dalam tabung ukur
- Memasukkan pH meter dalam air sampel dan tunggu sampai angka mencapai nilai seimbang. Ph meter akan seimbang jika sinyal sudah siap hal ini akan membutuhkan waktu yang lama, jika perlu untuk mencapai keseimbangan maka pH meter perlu untuk digoyang-goyangkan.

2. Suhu

Menurut Bloom (1998), prosedur pengukuran suhu adalah sebagai berikut :

- Mencelupkan ujung thermometer raksa (Hg) ke dalam perairan sekitar 10 cm selama 3 menit
- Membiarkan beberapa saat sampai air raksa tidak mengalami perubahan
- Membaca suhu yang ditunjukkan oleh air raksa dalam Thermometer Hg dan mencatat hasilnya.

3. Salinitas

Prosedur pengukuran salinitas menurut Subarijanti (1990) adalah sebagai berikut :

- Membuka penutup refraktometer dan menetesinya dengan akuades serta menstandarkannya agar garis biru berhimpit dengan angka nol
- Membersihkan kaca obyek refraktometer dan menetes air sampel secukupnya
- Menutup prisma refraktometer
- Melihat nilai salinitasnya yang tertera pada skala refraktometer.

3.4.4 Isolasi RNA *Spirulina* sp.

Isolasi RNA total dilakukan sesuai dengan metode Mini KIT (Plant) GeneAid Protocol versi 04.24.13. dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Pemisahan Jaringan

- Mengambil sampel segar atau beku sebanyak 50 hingga 100 mg
- Menggerus sampel menggunakan nitrogen cair hingga menjadi bubuk kemudian memindahkan ke tabung eppendorf 1.5 ml



2. Pemecahan Sel (Lysis)

- Menambahkan 500 μ l buffer RB atau PRB dan 5 μ l β -mercaptoethanol ke dalam sampel halus
- Mencampur sampel menggunakan vortex selama 1 menit kemudian menginkubasi pada suhu 60 °C selama 5 menit
- Meletakkan *Filter Column* ke dalam 2 ml tabung pengumpulan dan pindahkan campuran sampel ke *Filter Column*
- Mensentrifuse selama 1 menit pada 1000 x g kemudian membuang *Filter Column*
- Memindahkan filtrat ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml yang baru.

3. Pengikatan RNA

- Menambahkan ethanol absolut setengah volume sampel dalam cairan kemudian mengocok secara perlahan
- Menempatkan *RB Column* dalam tabung 2 ml, kemudian memindahkan campuran sampel ke *RB Column*
- Melakukan sentrifuse 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 yang telah disaring, kemudian menempatkan *RB Column* kembali dalam tabung koleksi 2 ml. Cairan dibuang karena RNA sudah terjerap pada *RB Column*.

4. Pencucian

- Menambahkan 400 μ l *W1 Buffer* ke dalam *RB Column*
- Mensentrifuse pada 14000-16000 x g selama 30 detik
- Membuang cairan yang telah disaring kemudian menempatkan *RB Column* kembali dalam tabung koleksi 2 ml

- Menambahkan 600 μ l *Wash Buffer* ke dalam kolom *RBColumn*
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 x g selama 1 menit
- Membuang cairan yang telah disaring kemudian menempatkan pada *RB Column* kembali pada tabung koleksi 2 ml
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 x g selama 3 menit hingga *column matrix* kering.

5. Pemurnian RNA

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

3.4.5 Pengukuran RNA Total dengan NanoPhotometer

Pengukuran kadar protein dengan nanodrop dilakukan menggunakan alat Nano Photometer™ (Implen), berikut prosedur penggunaan alat tersebut :

- Sambungkan kabel perangkat ke stop kontak
- Hidupkan alat dengan menekan tombol ON, tunggu hingga kalibrasi selesai
- Pilih aplikasi (1. LabelGuard, 2. Cuvette, 3. Function) dengan menekan tombol angka pada perangkat alat
- Pilih jenis sampel (1. Nucleic Acids, 2. Protein, 3. OD 600) dengan menekan tombol angka pada perangkat alat
- Jika pilih Nucleic Acids, selanjutnya pilih mode 1. dsDNA, 2. ssDNA, 3. RNA, atau 4. Oligo

- Jika pilih Protein, selanjutnya pilih mode 1. Protein UV, 2. Protein dye/BCA, 3. Bradford, 4. Lowry, 5. Biuret
- Pilih Parameters dan tentukan:
 - ✓ Lid Factor (LabelGuard application), Pathlength (Cuvette application) → 5 mm atau 10 mm
 - ✓ Dilution Factor → range 1.00—9999
 - ✓ Background → 320 nm
 - ✓ Units → mg/ml, µg/ml, ng/µl, µg/µl, pmol/µl
 - ✓ Factor → dsDNA (50), ssDNA (37), RNA (40), Oligo (ratio 4 base: range 0—9999 atau extinction factor: range 0.01—9999 untuk ratio = $[1/\text{extinction coefficient} * 10^{-6}]$)
 - ✓ Wavelength: Bradford (595 nm), Lowry (750 nm), Biuret (546 nm), OD 600 (range 200—950 nm)
- Kemudian pilih OK atau Cancel
- Masukkan LabelGuard atau Cuvette (sesuai aplikasi yang dipilih) berisi reference sample ke cell holder pada perangkat alat, kemudian tekan tombol Ok
- Bersihkan LabelGuard™ Microliter Cell atau Cuvette
- Ulangi hingga semua sampel selesai diukur
- Tekan Options kemudian tekan Print
- Tekan tombol Cancel dan konfirmasi dengan tekan tombol OK untuk kembali ke menu awal
- Matikan perangkat alat dengan menekan tombol Off
- Cabut kabel dari stop kontak

3.4.6 RT-PCR

RNA total yang diperoleh dari tahap isolasi selanjutnya akan ditranskripsikan menjadi DNA komplemen (cDNA). Proses ini dilakukan menggunakan mesin PCR dengan metode *Reverse transcription – Polymerase*

Chain Reaction (RT-PCR). Prosedur PCR dilakukan sesuai dengan *Maxime PCR Premix Kit*. Sampel isolat digunakan pengulangan sebanyak 4 kali dan ditandai sebagai S1, S2, S3 dan S4 untuk mengetahui apabila ada perbedaan hasil amplifikasi cDNA dan hasil Pemoongan enzim. Langkah-langkah RT-PCR sesuai protokol kit yaitu :

- Memasukkan 1 µl isolat RNA ke dalam *PCR tube* 1 ml
- Menambahkan primer *initiated* (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3') sebanyak 1 µl dan primer *adapter* (5' – CTCGTTGCTGGCTTTGATG – 3') sebanyak 1 µl
- Menambahkan *free water* sebanyak 17 µl, sehingga total volume sampel 20 µl.
- Memasukkan *PCR tube* kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Mesin PCR diatur pengoperasiannya seperti pada Tabel 2. berikut ini

Tabel 2. Pengaturan Pengoperasian Program RT - PCR

Siklus PCR	Suhu	Waktu
Initial denaturation	94 ⁰ C	2 menit
40 Siklus	Denaturation	94 ⁰ C
	Annealing	2 ⁰ C
	Extention	72 ⁰ C
	Final Extension	72 ⁰ C
		3 menit

- Mengeluarkan *PCR tube* dari mesin PCR setelah rangkaian tahapan PCR selesai.
- Menambahkan primer *nested* (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3') ke dalam hasil PCR sebelumnya sebanyak 1 µl

- Memasukkan kembali *PCR tube* ke dalam mesin PCR atau biasa disebut nested PCR
- Mengeluarkan sampel jika mesin PCR sudah berhenti beroperasi.

3.4.7 Elektroforesis

Langkah-langkah pembuatan gel agarosa 1, % adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan 0,6 gr agarosa dan dilarutkan ke dalam 40 ml TAE 1X
- Memanaskan di dalam *microwave* selama 3 menit
- Menambahkan EtBr sebanyak 2 μ l ke dalam larutan agarosa dalam kondisi hangat
- Menuangkan larutan agarosa ke dalam cetakan yang telah dilengkapi dengan sisir dan didiamkan sampai gel mengeras

Langkah-langkah proses elektroforesis adalah sebagai berikut :

- Memasukkan *plate* ke dalam sumur elektroforesis
- Menuangkan TBE *buffer* sampai bagian atas dan bawah gel terendam
- Memasukkan gel agarosa 1, % ke dalam sumur elektroforesis
- Memasukkan 6 μ l DNA *marker* ke dalam sumur pertama pada gel agarosa
- Memasukkan 5 μ l sampel (produk hasil *nested PCR*) ke dalam sumur berikutnya
- Menghubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik
- Melakukan elektroforesis dengan tegangan 6 Volt selama kurang lebih 5 menit
- Mengambil gel dari plate dan menuangkan running buffer
- Merendam gel ke dalam EtBr selama kurang lebih 10 menit untuk mewarnai cDNA
- Memasukkan gel kedalam UV transiluminator untuk divisualisasi.

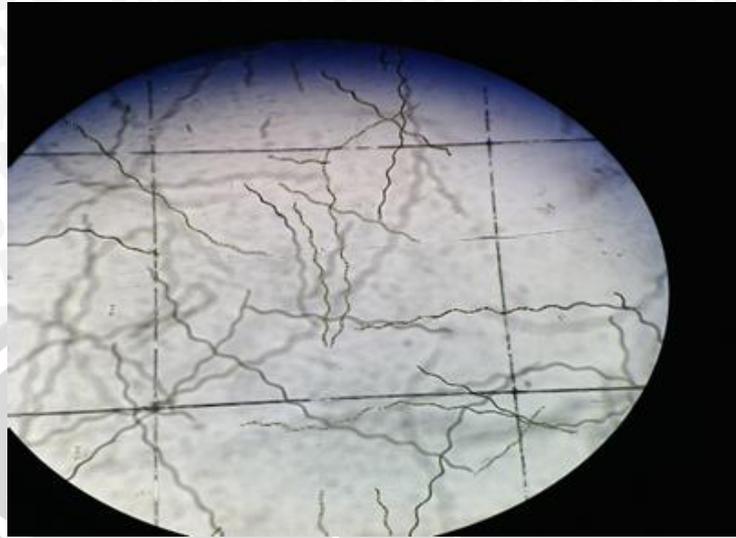
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 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). Tahapan pertama kultur dimulai dengan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses kultur. Kultur *Spirulina* sp. 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.

Untuk melihat kualitas air media kultur dilakukan pengukuran kualitas air yang berfungsi untuk melihat apakah air media kultur masih layak untuk menunjang pertumbuhan mikroalga dan juga dilakukan perhitungan kelimpahan pertumbuhan sel *Spirulina* sp. Terdapat fase pertumbuhan pada kultur mikroalga yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, fase penurunan laju pertumbuhan dan

fase kematian. Foto hasil pengamatan *Spirulina* sp. dibawah mikroskop disajikan pada Gambar 6 di bawah ini.



Gambar 6. *Spirulina* sp. di Lihat dimikroskop

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.

4.2 Kepadatan *Spirulina* sp.

Perhitungan kelimpahan pertumbuhan *Spirulina* menggunakan haemocytometer yang diamati dibawah mikroskop. Pada penelitian ini menggunakan Haemocytometer Neubauer Improved. Dari hasil perhitungan

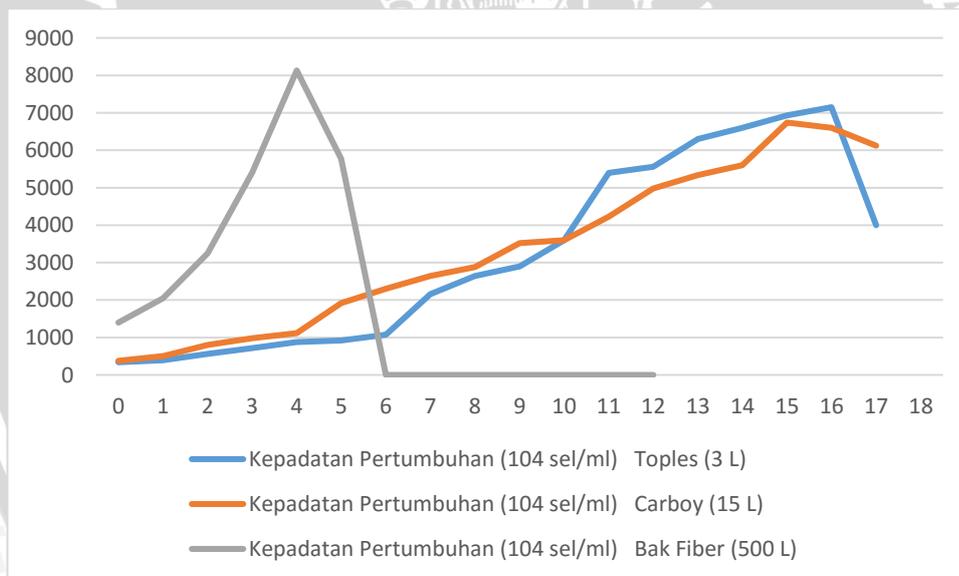
kepadatan *Spirulina* sp. yang telah dihitung di BPBAP Situbondo, didapatkan hasil sesuai dengan Tabel 3.

Tabel 3. Tabel Kepadatan *Spirulina* sp. yang Dikultur
Kepadatan Pertumbuhan (10^4 sel/ml)

Usia (Hari)	Toples (3 L)	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	-
18			

Dapat dilihat diatas kepadatan pertumbuhan *Spirulina* sp. Pada skala lab didapatkan hasil fase lag dimulai dari hari pertama sampai hari ke enam yaitu $396 \times 10^4 - 1078 \times 10^4$ Sel/ml, fase logaritmik pada hari ketujuh sampai hari kesepuluh yaitu $2160 \times 10^4 - 3600 \times 10^4$ sel/ml, untuk fase penurunan laju pertumbuhan dimulai dari hari ke sebelas sampai keempat belas yaitu $5400 \times 10^4 - 6600 \times 10^4$ sel/ml, dan untuk fase stasioner terjadi pada hari kelima belas dan enam belas yaitu $6930 \times 10^4 - 7150 \times 10^4$ 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 500×10^4 – 1120×10^4 sel/ml, untuk skala log dimulai hari kelima sampai kedua belas yaitu 1920×10^4 – 4980×10^4 sel/ml, untuk fase penurunan laju pertumbuhan dimulai hari ketiga belas sampai hari kelima belas yaitu 5340×10^4 – 6740×10^4 sel/ml, untuk fase stasioner pada hari ke enam 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.



Gambar 7. Grafik pertumbuhan pada kultur *Spirulina sp.*

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 selanjutnya 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 : nutrient tidak mencukupi, berkurangnya intensitas cahaya karena pencahayaan sendiri serta kompetisi yang semakin meningkat (Hariyati, 2008).

4.3 Kualitas Air *Spirulina* sp.

Dalam hal pertumbuhan *Spirulina* sp, memiliki syarat agar dapat tumbuh secara optimal. Parameter kualitas air yang diukur dalam kultur *Spirulina* sp. yaitu suhu, pH dan salinitas. Parameter ini diukur pada awal dan akhir kultur.

4.3.1 Suhu

Suhu dapat berpengaruh dalam pertumbuhan dan laju metabolisme. Peningkatan suhu akan seiring dengan laju konsumsi oksigen yang menyebabkan peningkatan konsumsi makanan (Kaligis, 2015). Suhu merupakan faktor penentu pertumbuhan mikroalga.

Berdasarkan pengukuran suhu di lapang, suhu yang terdapat pada budidaya *Spirulina* sp. yang ada pada BPBAP situbondo pada skala laboratorium yaitu 20⁰ C – 25⁰ C dan suhu pada skala *intermediate* berkisar antara 26⁰ C – 29⁰ 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 20⁰ C – 30⁰ C. Namun Poedjiadi (1994) menyatakan bahwa kisaran temperatur optimal untuk pertumbuhan *Spirulina platensis* adalah 25⁰C - 35⁰C

4.3.2 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.

Sedangkan Edhy dan Kurniawan (2003), mengatakan sebagian sel, termasuk fitoplankton sangat peka terhadap derajat keasaman cairan yang mengelilinginya. Derajat keasaman diukur pada skala satuan pH. Nilai pH yang optimal untuk *Spirulina* sp. adalah 7,2 – 9,5 dan maksimal pada pH 11.

4.3.3 Salinitas

Menurut Bangun et al. (2015), salinitas berpengaruh terhadap organisme air dalam mempertahankan tekanan osmotiknya. Fluktuasi salinitas secara langsung menyebabkan perubahan tekanan osmosis dalam sel *Spirulina* sp. 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.

4.4 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.

Ada tiga tahapan isolasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) yang Tahapannya yaitu pemecahan dinding sel (*lysis*); pengikatan RNA dan

pencucian; pemurnian RNA. 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 μm buffer lysis (RB) untuk membuang sisa kotoran dan 5 μl β -mercaptoethanol untuk menghilangkan polifenol dalam sel tanaman selanjutnya diinkubasi selama menit dengan suhu 60° 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 μl buffer W1 yang berguna untuk menghilangkan sisa kotoran.

Tahapan ketiga yaitu pemurnian RNA dengan menambahkan 50 μl 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

4.5 Pengukuran Kandungan RNA Total dan Nilai Kemurnian

Pengukuran RNA total dilakukan untuk mengetahui konsentrasi RNA total yang terdapat pada sampel yang sudah diisolasi dan juga untuk melihat kemurnian isolat RNA. Total RNA hasil isolasi diukur konsentrasinya menggunakan NanoPhotometer™ [Implen] pada panjang gelombang 280/260 nm

karena protein diserap pada panjang gelombang 280 nm (Aranda *et al.* 2009), dan pengukuran pada panjang gelombang 260 nm perlu dilakukan sebagai koreksi terhadap kemungkinan adanya kontaminasi asam nukleat sehingga hasilnya lebih teliti (Fatchiyah *et. al.*, 2011).

Berdasarkan pengukuran total RNA hasil isolasi adalah 21,0 µg/ml dengan nilai kemurnian 1,193 (A260/280). Hal ini menunjukkan bahwa sampel RNA yang telah diisolasi masih memiliki kandungan protein, karena menurut Aranda *et al.* (2009), nilai kemurnian RNA menunjukkan sampel RNA yang diisolasi telah murni dari protein menunjukkan nilai 2,0 dengan nisbah A60/280. Walaupun hasil yang didapat kurang murni, tetapi masih dapat digunakan untuk mensintesis RNA menjadi cDNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* pada tahap selanjutnya.

4.6 Reverse Transcription PCR (RT – PCR) Peridinin Chlorophyll Protein(PCP)

Metode RT – PCR pada penelitian ini menggunakan HyperScript™ 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.

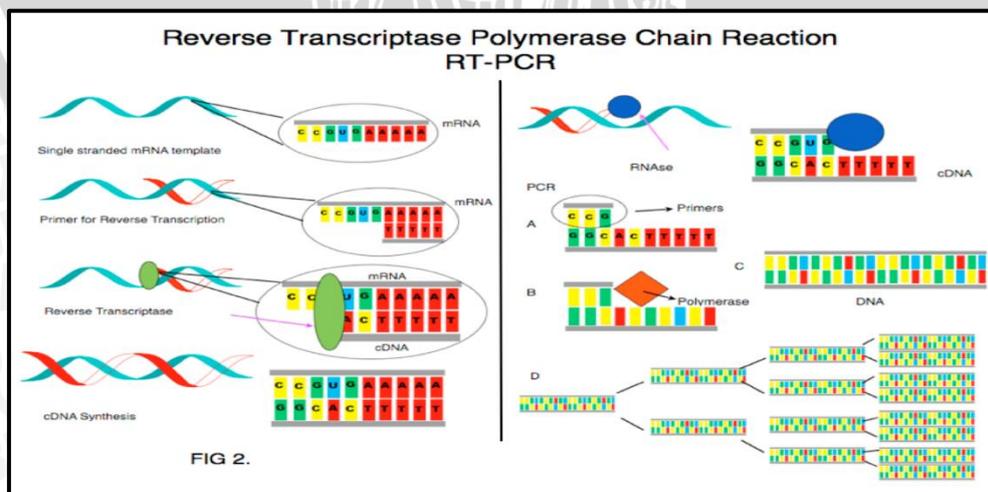
Dalam proses RT – PCR pada penelitian ini, dilakukan PCR sebanyak dua kali pertama menggunakan primer *initiated* 5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3' dan primer *adapter* 5'-CTCGTTGCTGGCTTTGATG-3', produk yang dihasilkan pada primer pertama dijadikan cetakan pada running kedua dengan menggunakan primer *nested* TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3' (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.

Pada RT-PCR yang pertama menggunakan primer inisiated dan adapter, primer melekat pada untai RNA, enzim reverse transcriptase akan mulai mensintesis untai cDNA dan mengubah basa urasil menjadi timin (Annisa, 2012). Proses RT- PCR yang pertama terjadi pada suhu 65^o C selama 10 menit yang merupakan proses denaturasi, selanjutnya dilanjutkan proses *annealing* pada suhu 4^o C selama 50 menit. Sampel cDNA yang telah terbentuk dapat disimpan pada suhu -20^oC atau digunakan langsung sebagai template pada reaksi PCR selanjutnya (Pramarta, 2014).

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

primernested. 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.

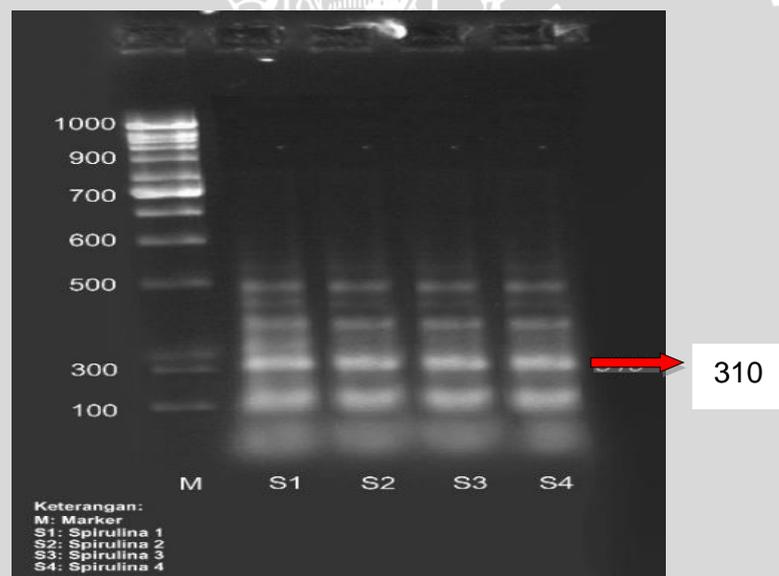
Tahap terakhir yaitu extention, pada tahap ini terjadi pemanjangan untaiancDNA. Pemanjangan enzim DNA polymerase akan membentuk cDNA baru dari gabungan antar cetakan, primer dan nukleotida. Tahap ini terjadi pada suhu 72°C selama 5 menit dan suhu 4°C untuk suhu penyimpanan (Pramarta, 2014).



Gambar 8. Siklus RT – PCR (Hossain dan Clara, 2014)

4.7 Elektroforesis

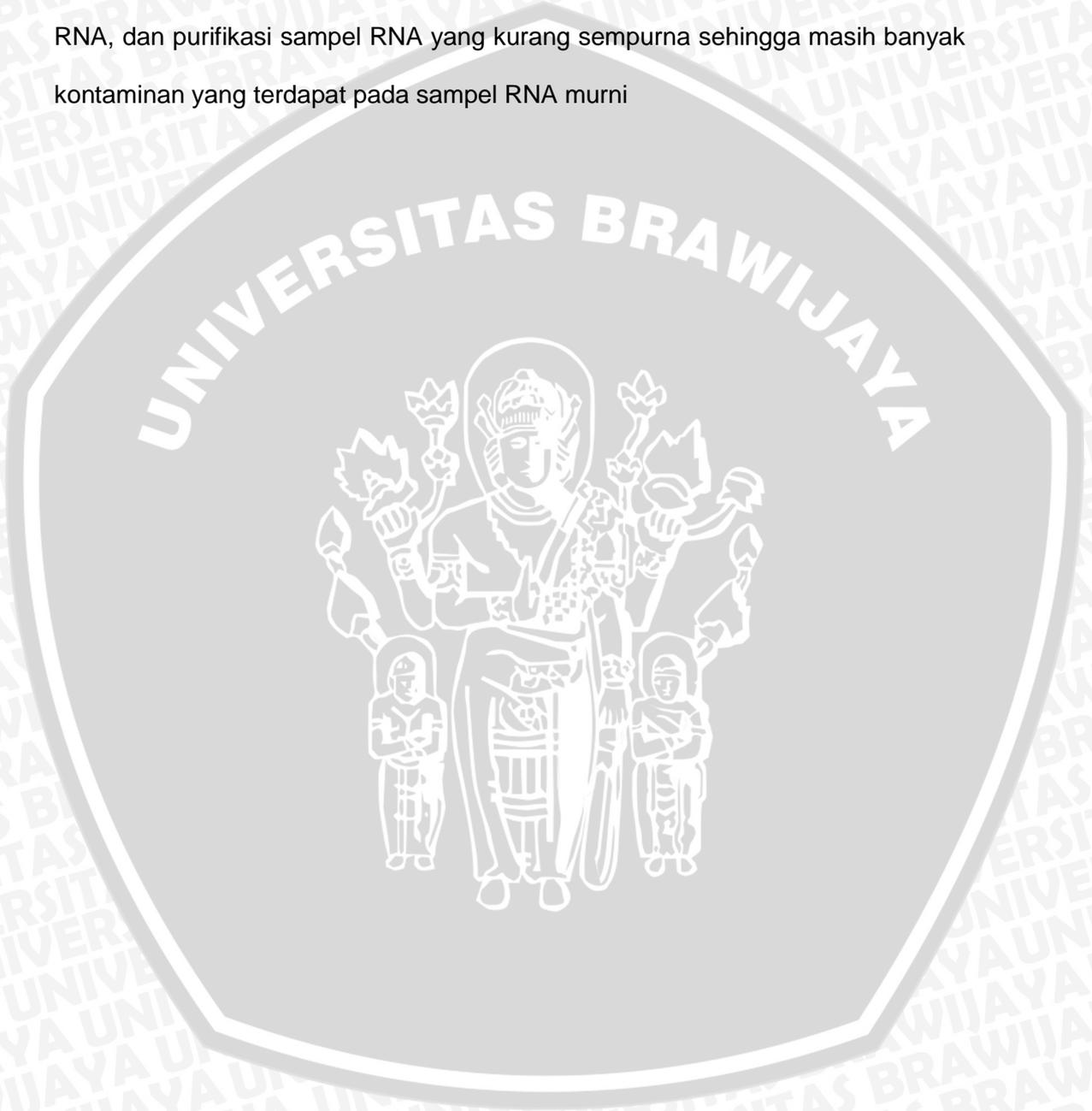
Visualisasi hasil RT-PCR dapat diketahui melalui proses elektroforesis gel agarose 1,5 %. Komposisi dari gel agarosa ini adalah agarosa 0,6 gr, 45 ml air dan 40 ml buffer TBE. Gel agarose diletakkan pada alat elektroforesis. Sebanyak 7 μ l produk hasil PCR dan 10 μ l DNA marker dimasukkan ke dalam sumuran yang telah disiapkan pada gel Agarose. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 65 Volt selama 35 menit, namun jika waktu tersebut warna kuning pada agarose belum sampai ujung maka waktu bisa ditambah. Warna kuning yang berjalan pada agarose menunjukkan bahwa energi listrik berjalan. DNA yang telah dielektroforesis kemudian divisualisasi dengan *UV transiluminator* (Pramarta, 2014).



Gambar 9. Gambar visualisasi elektroforegram cDNA dengan gel agarose 1,5 %

Hasil positif dari RT-PCR menggunakan primer inisiated, nested dan adapter menunjukkan hasil positif bahwa *Spirulina* sp. Mengandung PCP ditandai dengan munculnya pita DNA berukuran 310 bp (Gambar 7). Deteksi menggunakan *RNA mini kit Plant GeneAid* memberikan hasil yang positif tetapi kurang baik karena masih *smear* (kotor), seperti pendapat Santoso (2011), hasil ekstraksi DNA yang baik adalah tebal dan tidak *smear* (kotor) karena menunjukkan DNA yang didapat

utuh. Hal tersebut terjadi karena nilai kemurnian RNA yang rendah yang disebabkan masih terjadi kontaminasi pada saat isolasi RNA. Seperti pendapat Fermentas (2011), kurang baiknya hasil visualisasi pita RNA disebabkan oleh beberapa hal diantaranya degradasi sampel RNA, rendahnya kualitas sampel RNA, dan purifikasi sampel RNA yang kurang sempurna sehingga masih banyak kontaminan yang terdapat pada sampel RNA murni



5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa sintesis RNA peridinin Chlorohyll Protein (PCP) pada *Spirulina* sp. Telah berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik Reverse Transcription (RT – PCR). Hasil yang didapat dalam elektroforesis menggunakan UV Transluminator telah menunjukkan bahwa cDNA yang berhasil disintesis memiliki panjang pita sebesar 310 bp.

5.2 Saran

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

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, D., C.T. Sardjono, B. Setiawan, F. Sandra. 2011. **Peranan RNA interference pada Embryonic Stem Cell**. CDK 186 Vol. 38 (5): 332-335.
- Annisa. 2012. **Isolasi RNA dan Pengklonaan Gen Tripsin Kation dari Pankreas Sapi ke Escherichia coli DH5 α** . *Skripsi*. Universitas Indonesia : Depok.
- 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 Kimiawi dan 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
- BPBAP Situbondo. 2012. **Kultur Pakan Alami**. BPBAP : Situbondo.
- Christwardana, M., dan Hadiyanto M.M.A. Nur. 2012. **Spirulina platensis: Potensinya Sebagai Bahan Pangan Fungsional**. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol 2. UNDIP: Semarang.
- Djarajah, A. S. 1995. **Pakan Ikan Alami**. Kanisius: Yogyakarta
- Edhy, W.A., dan Kurniawan. 2003. **Plankton di Lingkungan PT. CentralPertiwi Bahari. Suatu Pendekatan Biologi dan Manajemen Plankton dalam Budidaya Udang**. Mitra Bahari : Lampung. Hal. 3-29
- Fasha, A. H. 2013. **Efek Inhibitory VNN (Viral Nervous Necrotic) pada Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang diinduksi PCP (Peridinin Chlorophil Protein) *Halimeda* sp. Melalui Ekspresi MHC I**. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Fatciyah, E. L arumingtyas, S. Widyarti dan S. Rahayu. 2011. **Biologi Molekuler**. Erlangga : jakarta
- Fermentas. 2011. **GeneJet RNA purification kit**. Fermentas Inc. New York : 17 hlm.
- Firdausi, I. dan L. Kusumawati. (2008). **Laporan Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler dan Seluler : Analisis Keberabatan pada Berbagai Jenis Tanaman Aglonema Menggunakan RAPD**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.

- Gaffar, Shabarni. 2007. **Buku Ajar Bioteknologi Molekul**. Universitas Padjajaran : Bandung.
- Handoyo, D., A. Rudiretna. 2001. **Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles And Implementation Of Polymerase Chain Reaction]**. Unitas. Vol 9 (1) : 17-29.
- 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.
- 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
- Hirschberg, J. et al., 1997. **pathway in plants and algae**. Vol. 69(10), pp.2151–2158.
- Hongmei, G., Yunlai, T., Jia, W., Xiaogang, W., Lixin, Z., and Congming L., 2008. **Characterization of photosystem II in salt-stressed Spirulina platensis cells**. Biochimica et Biophysica acta 1777, pp. 488- 495.
- Hossain, I., C. Levy. 2014. **Investigating KNOX Gene Expression in Aquilegia Petal Spur Development**. Journal Emerging Investigators.
- Isnansetyo, A. dan Kusniastuty. 1995. **Teknik Kultur Phytoplanton dan Zooplankton**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Kabinawa, I. N. K. 2006. **Spirulina; Ganggang Penggempur Penyakit**. AgroMedia Pustaka: jakarta.
- 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.
- Mauludi, R.Y. 2013. **LKP : Visualisasi Informasi Berbasis Web Untuk Reporting Pada Website E – Rekrutmen PT. Pelabuhan Indonesia III(Persero)**. STIKOM. Surabaya.
- Martosudarmo, B., dan S. Sabarudin. 1979. **Makanan Larva Udang**. Balai Budidaya Air Payau Jepara. Jepara.
- Mulyanto. 2008. **Metode Sampling**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.

- Nazir, M. 1988. **Metodologi Penelitian**. Jakarta : Ghalia Indonesia.
- Ogawa, T., and G. Terui. 1970. **Studies on the growth of *Spirulina platensis*. On the pure culture of *Spirulina platensis***. J. Ferment. Technol. 48:361-367.
- 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. Universitas Udayana : Denpasar.
- Poedjiadi, A. 1994. **Dasar – dasar Biokimia**. Universitas Indonesia. Press. Jakarta.
- Prabowo, Dadang. 2009. **Optimalisasi Pengembangan Media Untuk Pertumbuhan *Chlorella* sp pada Skala Laboratorium**. SKRIPSI. Institut Pertanian Bogor : Bogor. 95 hal.
- Sedjati, E. Yudiati, Suryono. 2012. **Profil Polar dan Nono Polar Mikroalga *Spirulina* sp. dan Potensinya Sebagai pewarna Alami**. Jurusan Ilmu Kelautan. Fakultas perikanan dan Ilmu Kelutan. Universitas Swadaya. Jakarta.
- 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.
- Sihotang, Laurencius. 2013. **Macam-Macam Tipe PCR dan Teknik Pemotongan Protein dengan Metode Edman Sebagai Dasar Kerja Analisis Sekuensing**. Program Studi Magister Pendidikan Biologi : Universitas Negeri Jakarta.
- Singleton, P., Sainsbury, D. 2006. **Dictionary of Microbiology and Molecular Microbiology**. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Stoyneva, M. P, E. Ingolic, G. Gartner dan W. Vyverman. 2009. **The pyrenoid ultrastructure in *Oocystis lacustris* Chodat (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)**. *Fottea*. 9(1) :149-154.
- Subarijanti, U. H. 1990. **Limnology**. Diktat Kuliah. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sugiyono. 2010. **Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif & RND**. Bandung : Alfabeta. Universitas Brawijaya : Malang.
- Surakhmad, W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar Metode Teknik**. Torsito press : Bandung. 139 hal.
- 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.**

- Uju dan Wahyuni, M. 2007 **Pengembangan Maine Biodiesel dari Mikroalga Sebagai Sumber Energi Alternatif Potensi Masa Depan.** Himpunan Mahasiswa Kimia Universitas Brawijaya. Malang.
- 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 Indonesia. 4 (1).
- Vonshak, A., S. Boussiba; A. Abeliovich & A. Richmond. 2004. **Production of Spirulina platensis biomass: Maintenance of monoalgal culture outdoors.** Biotech. and Bioengineering. 25(2):341-349.
- Washington State Department of Ecology. 2015. **Measuring Ph in Lakes and Streams.** www.ecy.wa.gov diakses pada 6 juli 2016 pukul 11:57 WIB.
- 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.
- Widayati, Y. 2014. **Pemanfaatan Kulit Buag Kakao (Theobroma cacao L) Sebagai Sumber Nutrien Dalam Kultur Spirulina sp..** Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Lampung :Bandar Lampung.
- Widowati, E. W. 2013. **Desain Primer Sitokrom B (Cyt B) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (Polymerase Chain Reaction) Untuk Deteksi DNA Babi.** Laporan Penelitian Individual. UIN Sunan Kalijaga : Yogyakarta.
- Yusuf, Z.K. 2010. **POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).** Saintek. 5 (6).

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

No	Alat	Fungsi
1.	Cawan Petri	Sebagai wadah bibit <i>Spirulina sp.</i> pada media agar
2.	Jarum Ose	Untuk inokulasi bibit <i>Spirulina sp.</i>
3.	Test Tube	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp.</i> pada kultur laboratorium
4.	Erlenmeyer	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp.</i> pada kultur laboratorium
5.	Toples 3 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp.</i> pada kultur laboratorium
6.	Carboy 10 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp.</i> pada kultur laboratorium
7.	AC	Untuk mengatur suhu ruangan
8.	Gelas Ukur	Untuk mengukur larutan dengan skala tertentu
9.	Blower	Sebagai sumber aerasi yang digunakan pada setiap wadah pemeliharaan mikroalga
10.	Batu Aerasi	Untuk membantu penyediaan udara pada wadah kultur <i>Spirulina sp.</i>
11.	Selang Aerasi	Untuk membantu menyalurkan udara ke wadah kultur <i>Spirulina sp.</i>
12.	Lampu TL	Untuk mengatur cahaya pada kultur skala laboratorium
13.	Bak/Ember Besar	Sebagai wadah air laut untuk kultur skala carboy
14.	Gayung	Untuk membantu memindahkan air laut saat persiapan media kultur skala carboy
15.	Lemari Es	Untuk menyimpan vitamin, pupuk skala lab dan bibit mikroalga yang sudah berkembang biak
16.	Autoclave	Untuk mensterilkan media dan pupuk yang digunakan saat kultur murni laboratorium
17.	Filter/saringan	Untuk menyaring partikel pada air laut
18.	Mikroskop	Untuk mengamati <i>Spirulina sp.</i>
19.	Haemocytometer	Untuk menghitung kepadatan <i>Spirulina sp.</i>
20.	Coverglass	Untuk menutup permukaan haemocytometer
21.	Pipet Tetes	Untuk mengambil larutan dalam skala kecil
22.	Timbangan	Untuk menimbang komposisi bahan pupuk
23.	Hot plate	Sebagai sumber panas saat pembuatan pupuk
24.	Beaker Glass	Sebagai wadah pupuk dan vitamin
25.	Bola Penghisap	Membantu memasukkan larutan ke pipa kapiler
26.	Pipa Kapiler	Untuk membantu mengambil larutan
27.	Botol Film	Sebagai wadah air sampel yang dihitung kepadatannya
28.	Bak fiber 1 ton	Sebagai wadah kultur skala intermediet
29.	Kain	Untuk membantu menyaring mikroalga yang dipanen
30.	Selang elastis	Untuk menyalurkan air

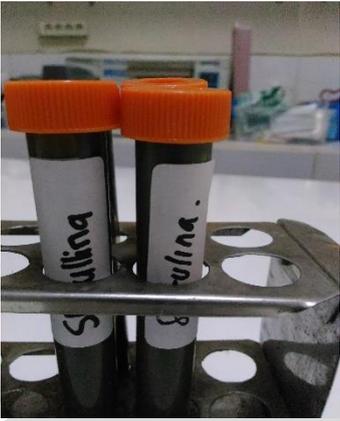
31.	Pipa	Untuk menyalurkan air dan udara
32.	Filter bag	Untuk menyaring partikel pada air laut
33.	Sikat	Untuk membersihkan bak
34.	Kompur gas	Sebagai sumber panas
35.	Panci	Sebagai wadah pembuatan pupuk intermediet
36.	Jerigen	Sebagai wadah pupuk dan vitamin
37.	Kamera	Untuk mendokumentasikan kegiatan
38.	Stericell	Untuk mensterilkan alat yang terbuat dari kaca
39.	Mortar dan Alu	Untuk menggerus mikroalga <i>Spirulina sp.</i>
40.	Mesin PCR	Sebagai alat amplifikasi cDNA
41.	Selofan	Untuk memisahkan protein murni
42.	Sentrifuse	Untuk memisahkan supernatant dan pellet dalam sampel mikroalga
43.	Eppendorf 1,5 dan 2 ml	Sebagai wadah sampel
44.	Falcon	Untuk menyimpan bahan dalam skala tertentu
45.	Freezer	Untuk menyimpan bahan
46.	Refrigerator	Untuk menyimpan bahan
47.	Sput	Untuk mengambil bahan dalam skala kecil
48.	Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel dengan ketelitian 10^{-2}
49.	Objek glass	Sebagai tempat pembuatan preparat
50.	Cover glass	Sebagai penutup objek pada preparat
51.	Spatula	Untuk membantu menghomogenkan larutan
52.	Tabung nitrogen cair	Sebagai wadah nitrogen cair
53.	Water bath shaker	Sebagai wadah pembilasan
54.	Nanodrop spektrofotometer	Untuk mengukur kadar protein
55.	Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan
56.	Vortex	Untuk mencampur sampel
57.	Kamera	Untuk mengambil gambar pengamatan

Lampiran 2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1.	Bibit <i>Spirulina sp.</i>	Sebagai bibit untuk kultur <i>Spirulina sp.</i>
2.	Air Laut	Sebagai media pertumbuhan <i>Spirulina sp.</i>
3.	Air Tawar	Untuk mencuci alat dan bak yang kotor dan untuk membuat pupuk
4.	Pupuk Walne	Untuk memenuhi nutrisi <i>Spirulina sp.</i>
5.	Vitamin B1 & B12	Sebagai vitamin saat kultur <i>Spirulina sp.</i>
6.	Alkohol	Untuk mensterilkan tangan sebelum kultur murni
7.	Kaporit	Untuk membunuh bakteri, virus, dan penyakit pada air laut serta untuk sterilisasi carboy, selang dan batu aerasi
8.	Chlorine Test	Untuk mengecek kenetralan media kultur
9.	Aquades	Untuk membersihkan haemocytometer dan coverglass
10.	Na-thiosulfat	Untuk menetralkan klorin dalam air laut
11.	Soda Api	Untuk membantu mengendapkan mikroalga saat pemanenan
12.	Sabun Cuci	Untuk membersihkan alat-alat
13.	Tissue	Untuk mengeringkan alat
14.	Aluminium Foil	Untuk menutup alat yang diautoclave
15.	Plastik	Untuk menutup toples
16.	Karet Gelang	Untuk membantu menutup toples dengan plastik
17.	Nitrogen	Untuk membantu memecah protein <i>Spirulina sp.</i>
18.	Buffer RB atau PRB	Untuk menjaga sel agar tidak rusak
19.	Alkohol	Untuk sterilisasi alat yang akan digunakan
20.	Kertas label	Untuk menandai bahan
21.	Masker	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
22.	Sarung tangan	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
23.	Buffer wash	Untuk mencuci kolom purifikasi
24.	Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit	Untuk isolasi RNA <i>Spirulina sp.</i>
25.	Primer	Sebagai komplementer dari DNA target
26.	Akuades	Untuk mensterilkan alat
27.	3,7 µl H ₂ O, 2 µl Buffer RT 10x, 0,5µl DTT (<i>dithiothreitol</i>) 50 mM, 0,35 µl dNTP (<i>deoksiribonukleotida triphosphate</i>) 10 mM, 0,35 µl RNase	Sebagai bahan reagen pada RT-PCR

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

No.	Foto Kegiatan	Keterangan
1.		Kultur Spirulina sp. Skala lab pada wadah toples
2.		Kultur Spirulina Sp. skala lab pada wadah carboy
3.		Kultur Spirulina sp. skala intermediet pada bak fiber
4.		Penyaringan sampel Spirulina sp saat isolasi RNA

<p>5.</p>		<p>Hasil penyiangan Spirulina sp</p>
<p>6.</p>		<p>Inkubasi sampel dengan waterbath saat proses isolasi</p>
<p>7.</p>		<p>Sentrifuse sampel saat proses isolasi</p>
<p>8.</p>		<p>Pengukuran kemurnian dan total RNA dengan menggunakan NannoPhotometer</p>

<p>9.</p>		<p>Primer yang digunakan dalam proses RT-PCR</p>
<p>10.</p>		<p>Proses RT-PCR</p>
<p>11.</p>		<p>Proses elektroforesis dengan agarosa 1.5%</p>
<p>12.</p>		<p>Proses visualisasi elektroforesis cDNA dengan menggunakan UV Transluminator</p>