

**SINTESIS RNA *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN* (PCP) PADA  
MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* DENGAN SISTEM KULTUR  
IN VIVO**

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

Oleh :

**NICO RAHMAN CAESAR  
NIM. 125080101111030**



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

**SINTESIS RNA *PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN* (PCP) PADA  
MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata* DENGAN SISTEM KULTUR  
IN VIVO**

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

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

Oleh :  
**NICO RAHMAN CAESAR  
NIM.125080101111030**



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

SKRIPSI

SINTESIS RNA PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN (PCP)  
PADA MIKROALGA LAUT *Nannochloropsis oculata*  
DENGAN SISTEM KULTUR *IN VIVO*

Oleh :  
NICO RAHMAN CAESAR  
NIM. 125080101111030

telah dipertahankan didapan penguji  
pada tanggal : 4 Agustus 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Umi Zakiyah, M.Si)  
NIP. 19610303 198602 2 001  
Tanggal:

16 AUG 2016

Dosen Pembimbing I

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

16 AUG 2016

Dosen Penguji II

(Nanik Retno Buwono, S.Pi., MP)  
NIP. 19840420 201404 2 002  
Tanggal:

Dosen Pembimbing II

(Dr. Agus Maizar S.H., S.Pi, MP)  
NIP. 19720529 200312 1 001  
Tanggal:

16 AUG 2016

16 AUG 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan  
(Dr. Arning Wilujeng Ekawati, MS)  
NIP. 19620805198603 2 001  
Tanggal:

16 AUG 2016

**PERNYATAAN ORISINALITAS**

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

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

Malang, 19 Juli 2016

Mahasiswa



Nico Rahman Caesar  
NIM. 125080101111030

## 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 Masruroh        | 14. Laini Anjarro'ah        |
| 3. Feri Setiawan            | 15. Atik Aprilia Sugiono    |
| 4. Yuliana                  | 16. Anik Purwaningsih       |
| 5. Zulfa Rahmawati          | 17. Suci Purwati Agustini   |
| 6. Dyah Tri Rahayu          | 18. Destine Validia Eldida  |
| 7. Eni Mujayanah            | 19. Icha Sriagusdini        |
| 8. Muhammad Sumsanto        | 20. Dayinta Mega Nurmala    |
| 9. Miftah Arraiyan          | 21. Syech Achmad Iqbal      |
| 10. Aprilieni Daezna        | 22. 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

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam membantu kelancaran hingga penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang sebesar – besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan laporan skripsi ini.
2. Sujud dan terimakasih saya persembahkan kepada Kedua orang tua saya serta kakak atas dorongan yang kuat baik materil maupun immaterial dan doa yang tiada henti.
3. Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si dan Bapak Dr. Asus Maizar S.H, S.Pi., MP selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan wawasan selama penyelesaian skripsi ini.
4. Ibu Dr. Ir. Umi Zakiyah M.Si dan Ibu Nanik Retno Buwono, S.Pi., MP selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan dan wawasan selama penyelesaian skripsi ini.
5. Teman-teman 1 Tim penelitian (Eni, Aini, Feri, Yuli, Yeyen, Diki, Dyah, Destin, Suci, Anik, Atik, Vava, Zulfa, Anto, Fiqi, Anjar, Ima, Dayinta, Dini, Iqbal, Wima, Arrayan), keluarga kontrakan POHARIN (Mas Topan, Feri, Vava, Rio, Novian, Fandi, Nafik, dan Radit), Sahabat sekaligus saudara Cost United (Yudha, Very, Rodi, Obama, Heri, Bagus, Pras, Randika dan Fauziah), dan teman-teman MSP angkatan 2012 yang telah memberikan motivasi dan semangat dalam penyelesaian laporan skripsi ini.

## RINGKASAN

**NICO RAHMAN CAESAR.** Skripsi mengenai Sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) Pada Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* dengan Sistem Kultur *In Vivo*. (Di bawah bimbingan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si. dan Dr. Asus Maizar S.H., S.Pi, MP**)

*Nannochloropsis oculata* merupakan salah satu jenis mikroalga yang juga banyak mengandung nutrisi dengan persentase sebagai berikut: protein 52,11%; karbohidrat 16,00% dan lemak 27,64% yang terdiri dari EPA (*Eicosapentaenoic Acid*) hingga 31,42% dan ARA/AA (*Arachidonic Acid*) 3,94% (Bentley et al., 2008). *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dapat larut dalam air dan merupakan bagian dari protein. Berperan dalam proses fotosintesis. Bentuk rantai ini mempunyai fungsi fisiologis sebagai antioksidan, dimana pirenoid merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya benda asing atau radikal bebas (Weiss, et al, 2002 dalam Kuntari, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proses dan cara pembuatan sintesis cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *N. oculata* dengan teknik RT PCR. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif dan eksploratif. Penelitian deskriptif melakukan analisis hanya sampai pada taraf deskripsi yaitu menganalisis dan menyajikan data secara sistemik, sehingga dapat lebih mudah dipahami dan disimpulkan sedangkan penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala, fakta dan penyakit tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena, dalam penelitian ini tidak dimaksudkan untuk menguji hipotesis tertentu tapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variable, gejala atau keadaan (Arikunto, 2002).

Hasil perhitungan kepadatan sel *N. oculata* tertinggi pada kultur Toples adalah  $728 \times 10^4$  sel/ml. Kepadatan tertinggi pada kultur Carboy adalah  $772 \times 10^4$  sel/ml. Dan kepadatan tertinggi pada kultur Intermediate adalah  $260 \times 10^4$  sel/ml. Hasil pengukuran kualitas air pada kultur skala laboratorium diperoleh nilai suhu sebesar 22°C, pH 8 dan salinitas 33 ppt, sedangkan pada kultur skala intermediet diperoleh nilai suhu sebesar 26-29°C, pH 8-8,5 dan salinitas 34-35 ppt. Kualitas air yang digunakan selama kultur tersebut, berada pada kisaran optimal untuk pertumbuhan *N. oculata*. Berdasarkan hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh hasil mg/ml. Hasil pengukuran menunjukkan hasil yang baik, hal ini dikarenakan penggunaan kit. Untuk menghasilkan sintesis cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) maka dalam penelitian ini menggunakan teknik *Reverse Transcription* PCR (RT – PCR). Hasil visualisasi gel elektroforesis menunjukkan hasil fragmen DNA sepanjang 310 bp, sesuai dengan panjang gen *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) yang dijadikan referensi (GenBank).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *N. oculata* berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik *Reverse Transcription* PCR (RT – PCR). Hasil visualisasi gel elektroforesis menggunakan UV Transluminator menunjukkan bahwa cDNA yang berhasil disintesis memiliki panjang pita sebesar 310 bp.

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan skripsi dengan judul **Sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* Pada Mikroalga Laut *Nannochloropsis oculata* dengan Sistem Kultur *In Vivo***. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat meraih gelar sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran sangat diharapkan oleh penulis demi perbaikan dan kesempurnaan laporan selanjutnya. Akhirnya penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak.



Malang, 19 Juli 2016

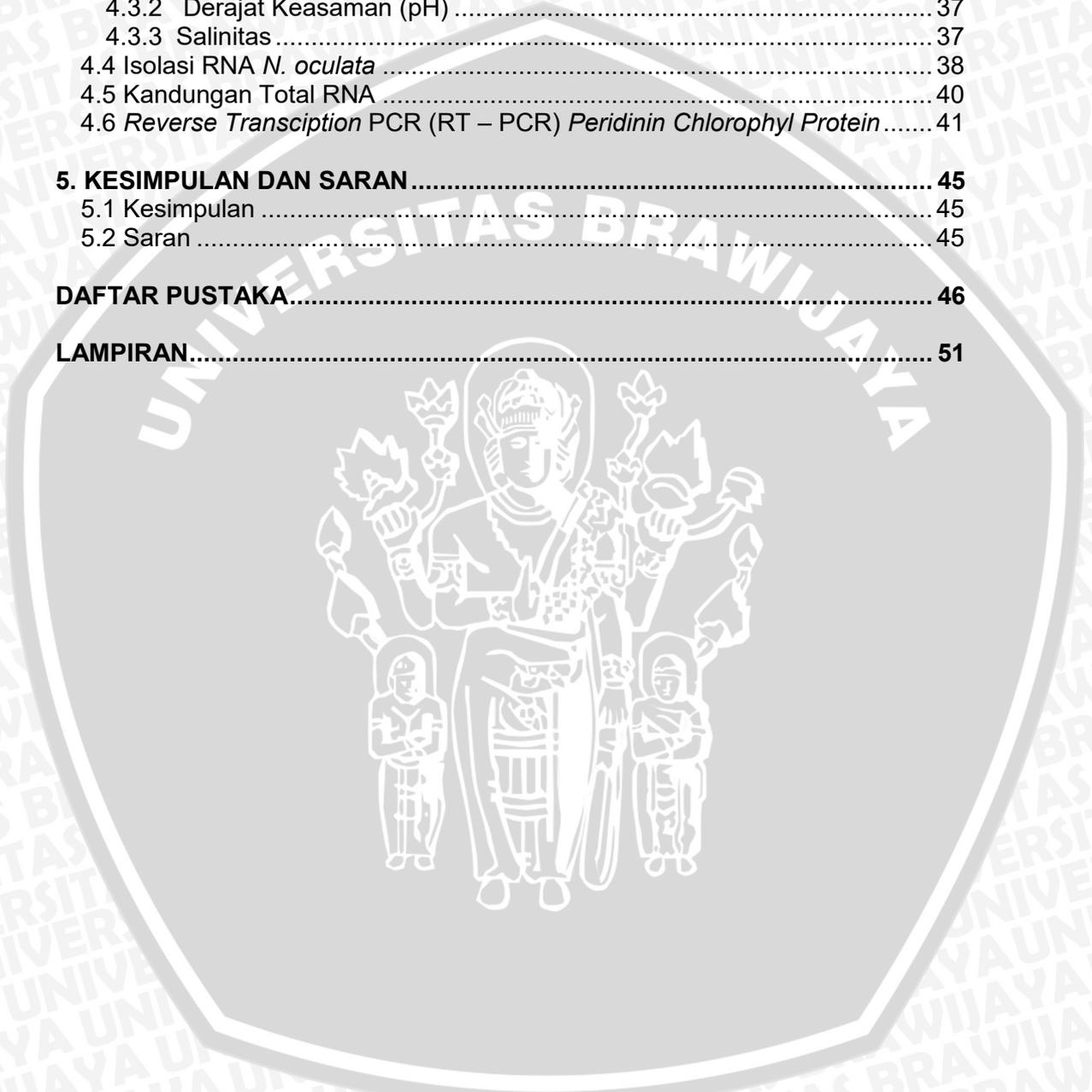
penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Mikroalga <i>N. oculata</i> .....	4
2.1.1 Klasifikasi <i>N. oculata</i> .....	4
2.1.2 Morfologi <i>N. oculata</i> .....	5
2.1.3 Habitat dan Pertumbuhan <i>N. oculata</i> .....	6
2.2 Kandungan <i>Nutrisi N. oculata</i> .....	11
2.3 <i>Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)</i> .....	11
2.4 RNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)</i> .....	13
2.5 Sintesis cDNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)</i> .....	14
2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	15
2.6.1 RT-PCR .....	16
2.6.2 Nested PCR .....	16
2.7 Primer .....	17
<b>3. MATERI DAN METODE</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materi Penelitian .....	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.3 Metode Penelitian.....	19
3.3.1 Data Primer.....	20
3.3.2 Data Sekunder.....	21
3.4 Prosedur Penelitian .....	22
3.4.1 Kultur <i>N. oculata</i> .....	22
3.4.2 Perhitungan Kepadatan Sel .....	23
3.4.3 Pengukuran Kualitas Air .....	24
3.4.4 Isolasi RNA <i>N. oculata</i> .....	25
3.4.5 Pengukuran Kadar Protein dengan Nanodrop.....	27
3.4.6 Sintesis Complementary DNA (cDNA) .....	29
3.4.7 Amplification Complementary DNA (cDNA).....	29



3.4.8 Elektroforesis .....	30
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
4.1 <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	32
4.2 Perhitungan Kepadatan <i>N. oculata</i> .....	33
4.3 Kualitas Air Kultur <i>N. oculata</i> .....	36
4.3.1 Suhu .....	36
4.3.2 Derajat Keasaman (pH) .....	37
4.3.3 Salinitas .....	37
4.4 Isolasi RNA <i>N. oculata</i> .....	38
4.5 Kandungan Total RNA .....	40
4.6 <i>Reverse Transcription PCR (RT – PCR) Peridinin Chlorophyl Protein</i> .....	41
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>45</b>
5.1 Kesimpulan .....	45
5.2 Saran .....	45
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>46</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>51</b>



**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Morfologi <i>N. oculata</i> ( Sumber : Schultz, 2013 ).....	6
2. Rumus bangun molekul peridinin.....	12
3. Letak Pirenoid/PCP di dalam sel (Sumber : Fitri, 2012) .....	13
4. Tahapan penelitian .....	22
5. Struktur <i>N. oculata</i> (Hoek et al., 1995).....	32
6. <i>N. oculata</i> . (Yanuhar, 2012).....	33
7. <i>N. oculata</i> (perbesaran 40x).....	33
8. Grafik Pertumbuhan <i>N. oculata</i> .....	34
9. A. Kultur Skala Toples 5 liter. B. Kultur Skala Intermediate 500 liter .....	36
10. Kit RNA yang digunakan.....	38
11. Isolasi RNA.....	39
12. NanoPhotometerTM [Implen].....	40
13. Pengoperasian Mesin PCR.....	41
14. Proses RT PCR ( Sumber : Kendall dan K.Riley, 2000).....	43
15. Visualisasi PCR dengan gel elektroforesis.....	44



## DAFTAR TABEL

Tabel

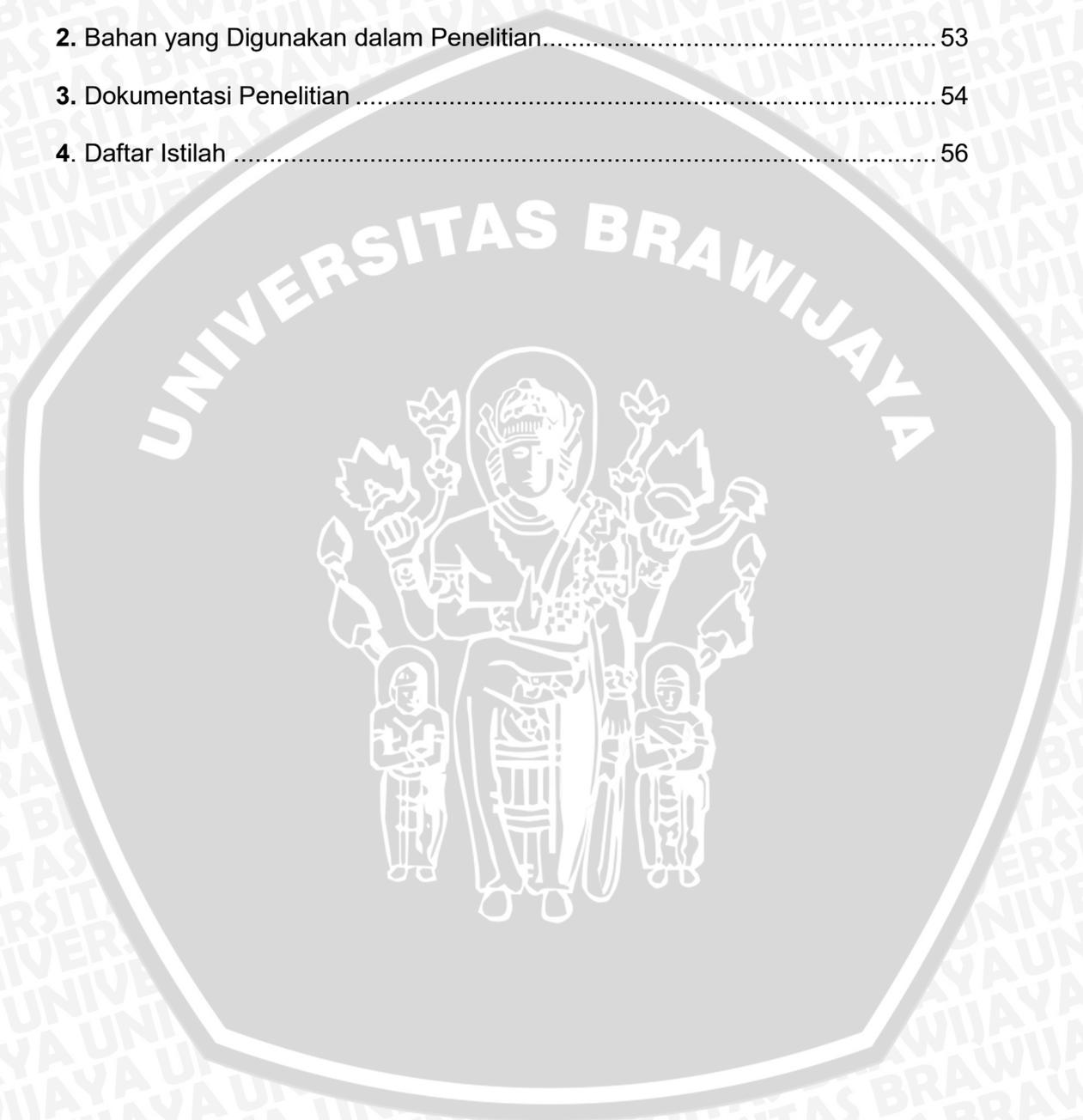
Halaman

1. Bahan Pembuatan Pupuk .....	8
--------------------------------	---



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....	51
2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian.....	53
3. Dokumentasi Penelitian .....	54
4. Daftar Istilah .....	56



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Mikroalga merupakan tumbuhan air yang berukuran mikroskopik, memiliki berbagai potensi yang dapat dikembangkan sebagai sumber pakan, pangan, dan telah dimanfaatkan untuk berbagai macam keperluan mulai dari bidang perikanan sebagai makanan larva ikan, organisme penyaring, industri farmasi, dan makanan suplemen dengan kandungan protein, karbohidrat, lipid, dan berbagai macam mineral (Cresswell *et al.*, 1989; Renaud *et al.*, 1991).

*Nannochloropsis oculata* merupakan salah satu jenis dari mikroalga yang telah banyak dibudidayakan dan digunakan sebagai pakan alami dalam usaha budidaya. *N. oculata* melimpah di sepanjang pantai dan estuari di atas zona fotik dengan konsentrasi 102-104 sel/cm<sup>3</sup> (Hu and Gao, 2003). Pertumbuhan sel *N. oculata* sangat dipengaruhi oleh tiga komponen penting untuk tumbuh yaitu cahaya, karbondioksida dan nutrisi. *N. oculata* adalah salah satu tanaman yang paling efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi cahaya dan CO<sub>2</sub> untuk keperluan fotosintesis (Diharmi, 2001).

*N. oculata* merupakan salah satu jenis mikroalga yang juga banyak mengandung nutrisi dengan persentase sebagai berikut: protein 52,11%; karbohidrat 16,00% dan lemak 27,64% yang terdiri dari EPA (*Eicosapentaenoic Acid*) hingga 31,42% dan ARA/AA (*Arachidonic Acid*) 3,94% (Bentley *et al.*, 2008). EPA itu sendiri merupakan golongan asam lemak omega-3 yang bermanfaat untuk menyembuhkan luka dan infeksi, menyembuhkan penyakit tulang atau persendian, asma, mengurangi risiko depresi setelah melahirkan, meminimalkan kemungkinan melahirkan premature dan mencegah proses penuaan (Manurung, 2009). *N. oculata* termasuk mikroalga

bersel tunggal yang memiliki berbagai macam pigmen yang berpotensi sebagai antibakteri dan antivirus, diantaranya adalah chlorophyll a,  $\beta$ -karoten, violaxanthin, dan vaucherxanthin (Cohen, 1999; Cao *et al.*, 2013)

Pertumbuhan *N. oculata* sangat bergantung pada intensitas cahaya matahari untuk menjalankan proses fotosintesis. Kurangnya cahaya yang dibutuhkan akan menyebabkan proses fotosintesis tidak berlangsung normal sehingga mengganggu metabolisme. *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) merupakan pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. Terdapat dua bentuk PCP, yaitu modimer (bentuk pendek) dengan masa molekul sekitar 14-16 kDa dan monomer (bentuk panjang) dengan masa molekul sekitar 30-35 kDa (Weis *et. al.*, 2002). Pigmen PCP terdiri atas empat molekul peridinin dan satu molekul klorofil. Peridinin merupakan bagian utama dari PCP (Krueger *et. al.*, 2001).

Pada organisme eukariotik, peridinin mempunyai peran yang sangat penting pada saat proses fotosintesis dan terlibat pada proses transfer energi. Peran peridinin yang sangat penting yaitu sebagai zat antioksidan yang melindungi sel dari dampak bahaya radikal bebas. Selain itu, peridinin juga dapat berperan dalam mengurangi resiko kanker jika dikonsumsi dalam bentuk karotenoid (Hirschberg *et al.*, 1997).

Mengingat banyaknya manfaat dari *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) ini, perlu dilakukannya eksplorasi melalui sintesis dari *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dari mikroalga laut *Nannochloropsis oculata* melalui teknik RT PCR. Hal ini dikarenakan PCP itu sendiri berbentuk RNA di dalam sel mikroalga. Pada teknik RT PCR, RNA tidak dapat digunakan sebagai cetakan, sehingga perlu dilakukan proses transkripsi balik terhadap molekul mRNA agar diperoleh molekul cDNA (complementary DNA). Kemudian cDNA tersebut digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR (Widowati, 2013). RT-PCR dalam penelitian ini digunakan untuk

mensintesis RNA dan mengamplifikasi komplemen DNA (cDNA) PCP, sehingga dapat menghasilkan PCP.

### 1.2 Rumusan Masalah

*Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) merupakan bagian dari protein merupakan hasil isolasi dari RNA. Kandungan *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dalam mikroalga seperti *N. oculata* masih belum banyak yang dieksplorasi dalam penelitian. Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana cara pembuatan sintesis cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *N. oculata* melalui teknik RT PCR.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proses dan cara pembuatan sintesis cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *N. oculata* dengan teknik PCR.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Sebagai landasan penelitian lanjutan untuk mengeksplorasi potensi *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *N. oculata* dan sebagai referensi untuk penelitian lebih lanjut.

### 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 *N. oculata*

Mikroalga merupakan tumbuhan air yang berukuran mikroskopik, memiliki berbagai potensi yang dapat dikembangkan sebagai sumber pakan, pangan, dan telah dimanfaatkan untuk berbagai macam keperluan mulai dari bidang perikanan sebagai makanan larva ikan, organisme penyaring, industri farmasi, dan makanan suplemen dengan kandungan protein, karbohidrat, lipid, dan berbagai macam mineral (Cresswell *et al.*, 1989 dalam Hermanto *et al.*, 2011)

*N. oculata* adalah spesies mikroalga laut yang hidup diperairan dengan kelimpahan nutrisi tinggi pada kawasan pesisir dan estuari. *N. oculata* dapat memanfaatkan energi cahaya dan air untuk melakukan proses metabolisme yang mengubah karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ) menjadi senyawa anorganik  $\text{CH}_2\text{O}$ . Selain sebagai sumber nutrisi, mikroalga juga mengandung klorofil yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan, aflatoksin dan proteolitik (Ernest, 2012).

*N. oculata* merupakan sel berwarna kehijauan, tidak motil, dan tidak berflagela. Selnya berbentuk bola berukuran sedang dengan diameter 2-4  $\mu\text{m}$ , tergantung spesiesnya, dengan khloroplas berbentuk cangkir. *N. oculata* melimpah di sepanjang pantai dan estuari di atas zona fotik dengan konsentrasi 102-104 sel/cm<sup>3</sup> (Hu and Gao, 2003)

#### 2.1.1 Klasifikasi *N. oculata*

Mikroalga diartikan berbeda dengan tumbuhan yang biasa dikenal walaupun secara struktur tubuh keduanya memiliki klorofil sehingga dapat melakukan fotosintesis (Bold and Wynne, 1985). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) adalah mikroalga bersel tunggal yang ditemukan di laut dan air tawar (Hibberd, 1981; Karlson *et al.*, 1996), termasuk picoeukaryotes, dengan

diameter 2-5  $\mu\text{m}$  (Hu and Gao, 2003). Ciri-ciri mikroalga jenis ini adalah tidak adanya klorofil b dan pigmen xanthophyll selular (Whittle and Casselton, 1975; Adl et al., 2005; Volkman et al., 1993;). Sebagai plankton, *Nannochloropsis* tersebar luas di lautan di seluruh dunia, memainkan peran penting dalam siklus karbon global dan mineral (Fogg, 1995).

Klasifikasi *Nannochloropsis oculata* ialah sebagai berikut :

Kingdom : Protista  
Sub Kingdom : Eukaryotes  
Phylum : Chromophyta  
Class : Eustigmatophyceae  
Ordo : Eustigmatales  
Family : Monodopsidaceae  
Genus : *Nannochloropsis*  
Spesies : *Nannochloropsis oculata* (Hibberd, 1981)

### 2.1.2 Morfologi *N. oculata*

*N. oculata* lebih sering dikenal dengan nama Chlorella laut. Fitoplankton ini berbentuk bulat menyerupai bola berukuran 2-4 mikron, berwarna hijau dan memiliki dua flagella (heterokontous) (Tjahjo, 2002). Sel *N. oculata* berukuran 2 - 4 mikro, yang terbuat dari komponen selulosa yang kuat dan merupakan karbohidrat kompleks yang bermanfaat untuk mengikat zat – zat toksik sehingga dapat dikeluarkan dari dalam tubuh. Selain itu, sel *N. oculata* juga mempunyai 2 flagel atau yang salah satu flagel berambut tipis sehingga dapat bergerak aktif (Ernest, 2012). Morfologi *N. oculata* dapat dilihat pada (Gambar 1) di bawah ini.



**Gambar 1.** Morfologi *N. oculata* ( Sumber : Schultz, 2013 )

*N. oculata* memiliki kandungan pigmen dan nutrisi seperti protein (52 %), karbohidrat (16%), lemak (27,64%), vitamin (0,85%) dan klorofil A (0,89%). Merupakan fitoplankton yang memiliki warna kehijauan, tidak motil dan tidak berflagel. Ukuran sel kecil dan berbentuk menyerupai bola (Fachrullah, 2011). Menurut Watanabe (1979) menyatakan, *N. oculata* memiliki kloroplas dan nucleus yang dilapisi membran. Kloroplas memiliki stigma (bintik mata) yang bersifat sensitive terhadap cahaya. *N. oculata* dapat berfotosintesis karena memiliki klorofil. Ciri khas *N. oculata* adalah memiliki dinding sel yang terbuat dari komponen selulosa.

### 2.1.3 Habitat dan Pertumbuhan *N. oculata*

Pertumbuhan sel *N. oculata* sangat dipengaruhi oleh tiga komponen penting untuk tumbuh yaitu cahaya, karbondioksida dan nutrisi. *N. oculata* adalah salah satu tanaman yang paling efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi cahaya dan CO<sub>2</sub> untuk keperluan fotosintesis (Diharmi, 2001). *N. oculata* bersifat kosmopolit dengan salinitas optimum untuk pertumbuhannya adalah 25-35 ppt, suhu 25-30°C merupakan kisaran suhu yang optimal (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995). Fitoplankton ini dapat tumbuh baik pada kisaran pH 8-9,5 dan intensitas cahaya 100-10000 lux (Hirata et al, 1981).

Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty, (1995) dalam Prabowo (2009)

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 Eksponensial

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. *Chlorella* sp. dapat mencapai fase ini dalam waktu 4-6 hari.

(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.

### a) Media Pertumbuhan

Perkembang biakan *N. oculata* dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi yang ada pada media tempat *N. oculata* hidup. Apabila asupan nutrisi dari medium tidak cukup, maka laju pertumbuhannya akan lambat. Oleh karena itu, komposisi dari medium itu sendiri harus cukup dan tepat. Pertumbuhan *N. oculata* erat kaitannya dengan ketersediaan unsur makro (N, P, K, S, Na, Si dan Ca) dan unsur mikro (Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca, B, C dan H). Menurut Fay (1983) dalam Handayani (2003) menjelaskan bahwa N merupakan unsur dasar yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan *N. oculata* karena dibutuhkan dalam jumlah paling banyak dibandingkan unsur lainnya. Terdapat beberapa medium yang lazim digunakan untuk perkembangbiakan *N. oculata*, seperti terlihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Bahan Pembuatan Pupuk

Bahan	Benneck (mg/dm <sup>3</sup> )	BG-11 (mg/dm <sup>3</sup> )	F2 Guillard (mg/dm <sup>3</sup> )	Walne (mg/dm <sup>3</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	500	1.5	75	100
Na <sup>2</sup> EDTA	-	0.001	4.56	45
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	2.86	-	33.6
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	-	5	20
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.36
B <sub>1</sub>	-	-	-	0.1
B <sub>12</sub>	-	-	0.5	0.005
MnCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	1.81	1801	-
Citrate	-	0.006	-	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	0.02	-	-
Citric Acid	-	0.006	-	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	10	0.02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	0.009
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	0.0079	-	-
MgSO <sub>4</sub>	100	0.075	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	0.04	-	-

(Sumber : Kawaroe. *et al.*, 2008)

### b) Pencahayaan

Pertumbuhan *N. oculata* sangat dipengaruhi oleh tiga komponen penting untuk tumbuh yaitu cahaya, karbondioksida, dan nutrient. *N. oculata* adalah salah satu tanaman yang paling efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi

cahaya dan CO<sub>2</sub> untuk keperluan fotosintesis (Diharmi, 2001 *dalam* Hermanto, *et al.*, 2011). Intensitas cahaya 1000 lux cocok untuk kultur mikroalga dalam Erlenmeyer, sedangkan intensitas 5000-10000 lux untuk kultur mikroalga dengan volume besar.

#### c) Salinitas

Salinitas merupakan salah satu sifat kimia air yang secara langsung maupun tidak langsung mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme termasuk *N. oculata*. Salinitas dapat dikatakan sebagai total konsentrasi ion – ion terlarut dalam air. Perubahan kadar salinitas secara cepat akan mempengaruhi kehidupan dan menghambat pertumbuhan mikroalga. Untuk mengatur salinitas pada kultur mikroalga dapat dilakukan pada medium yang diperkaya yaitu dengan melakukan pengenceran menggunakan air tawar dengan air laut. *N. oculata* dapat tumbuh pada salinitas 30-35 ppt (Tjahjo, 2002).

Fogg (1987) *dalam* Hermanto, *et al.* (2011) kisaran salinitas yang normal untuk pertumbuhan mikroalga adalah 3.0 – 3.2 ‰. Salinitas merupakan salah satu variable yang mempengaruhi kandungan HUFA (*Highly Unsaturated Fatty Acid*) pada mikroalga. Salinitas yang terlalu tinggi maupun yang terlalu rendah dapat mempengaruhi keberlangsungan hidup mikroalga.

#### d) Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Setiap mikroalga mempunyai suhu ideal yang berbeda-beda untuk bisa tumbuh dan berkembang dengan baik. *N. oculata* dapat tumbuh baik pada kisaran suhu yang optimal 25-30 °C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Secara tidak langsung, suhu akan mempengaruhi metabolisme, daya larut gas – gas termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia dalam perairan ( Ghufuran, *et al.*, 2007 ).

Pertumbuhan sel dalam kultur mikroalga ditandai dengan bertambah besar dan banyaknya ukuran sel. Suhu dalam kultur mempengaruhi keberhasilan fitoplankton. Suhu air yang optimal bagi pertumbuhan fitoplankton adalah sekitar 23-25°C pada skala laboratorium dan 30°C pada skala masal dan semi masal (Sari dan Manan, 2012).

#### e) pH

Seperti halnya suhu, mikroalga memiliki kisaran toleransi pH yang berbeda-beda untuk pertumbuhan yang optimal, pH mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena dapat mempengaruhi kehidupan jasad renik. pH akan mempengaruhi toksisitas semua senyawa kimia. Variasi pH dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan fitoplankton dalam beberapa hal, antara lain mengubah keseimbangan dari karbon organik, mengubah ketersediaan nutrient dan dapat mempengaruhi fisiologi sel (Ernest, 2012).

Perairan yang memiliki kondisi asam akan kurang produktif dan dapat membunuh hewan budidaya. Hermanto, *et al.* (2011) dalam penelitiannya menyatakan bahwa pH yang tergolong sesuai bagi kehidupan *N. oculata* berada pada kisaran 7.0 – 9.5, tetapi fitoplankton ini tumbuh rendah pada pH 10.08. nilai pH dipengaruhi oleh beberapa factor, antara lain aktivitas biologi seperti fotosintesis, suhu, respirasi, dan keberadaan ion – ion dalam perairan tersebut.

#### f) Karbondioksida (CO<sub>2</sub>)

Karbondioksida merupakan senyawa kimia yang terdiri dari dua atom oksigen yang terikat secara kovalen dengan sebuah atom karbon, berbentuk gas pada keadaan suhu dan tekanan standar dan berada di atmosfer bumi, CO<sub>2</sub> adalah gas yang tidak berwarna dan berbau. CO<sub>2</sub> dihasilkan oleh semua hewan, tumbuh-

tumbuhan, fungi dan mikroorganisme pada proses respirasi dan digunakan oleh tumbuhan pada proses fotosintesis (Borowitzka, 1988 dalam Zumarintha, 2011).

Efisiensi dari penyerapan karbondioksida oleh mikroalga tergantung dari pH kultivasi tetapi tidak dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi gas. Bentuk karbondioksida di air bergantung pada pH, suhu dan konsentrasi nutrient (Olaizola, *et al.*, 2004). Oleh karenanya, persediaan CO<sub>2</sub> dalam jumlah yang cukup akan mendukung pertumbuhan mikroalga. Namun, kadar karbondioksida yang dibutuhkan oleh *N. oculata* hanya sekitar 1 – 2% (Hermanto, *et al.*, 2011)

## 2.2 Kandungan Nutrisi *N. oculata*

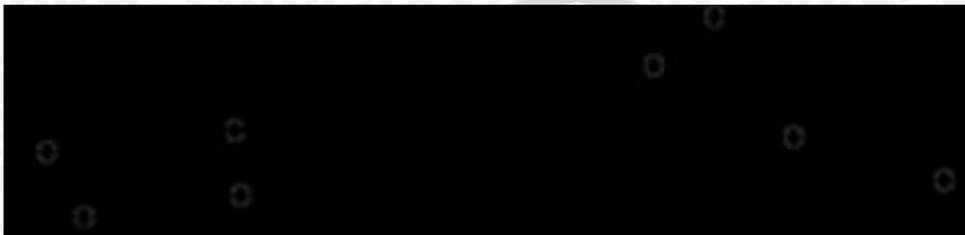
*N. oculata* merupakan spesies mikroalga laut yang hidup diperairan dengan kelimpahan nutrisi tinggi. *N. oculata* dapat memanfaatkan energy cahaya dan air untuk melakukan proses metabolisme yang mengubah karbondioksida (CO<sub>2</sub>) menjadi senyawa anorganik CH<sub>2</sub>O. Selain sebagai sumber nutrisi, mikroalga juga mengandung klorofil yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan, aflatosin, dan anti proteolitik (Ernest, 2012).

Kondisi perkembangan populasi maksimum *N. oculata* mempunyai nilai nutrisi yang tinggi yaitu protein 52,11 %, karbohidrat 12,32 %, lipid/lemak 7,7 %, vitamin C 0,85 %, vitamin A 0,89 %, dan kalori 48,4 (Reef central.com, 2008). Kandungan protein per sel fitoplankton yang dianggap sebagai salah satu faktor yang paling penting untuk menentukan nilai gizi fitoplankton sebagai pakan dalam budidaya ikan. Kandungan protein untuk *Nannochloropsis oculata* dalam berat kering adalah sebesar 2,1 pg/cell dengan presentase 35% (Lavens and Sorgeloos, 1996).

## 2.3 Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)

PCP merupakan penyusun penting dari mikroalga laut *N. oculata* yang terkait dengan klorofil, sehingga bisa digunakan oleh mikroalga laut untuk

berfotosintesis. PCP adalah organel, pusat fiksasi karbondioksida dalam kloroplas ganggang, tidak terikat oleh membrane, akan tetapi PCP merupakan wilayah khusus di dalam plastid ( Sudarsono, 2013). Di bawah ini merupakan gambar rumus bangun dari peridinin (Gambar 2)

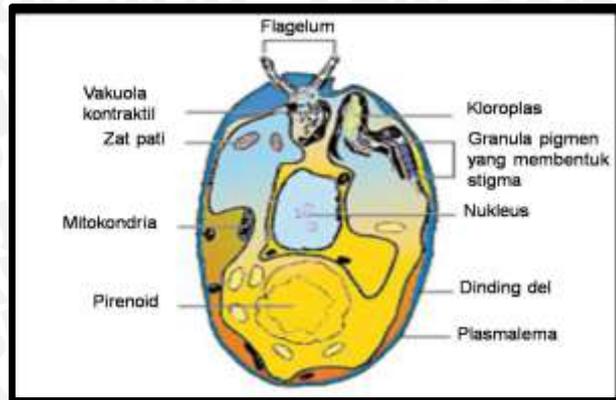


**Gambar 2.** Rumus bangun molekul peridinin

PCP terletak pada bagian belakang kloroplas yang menebal. PCP dikelilingi oleh pasangan tilakoid yang mengarah ke pusat sel dan terdapat pula butiran-butiran zat tepung yang mengelilingi pirenoid tersebut. Tilakoid berujung pada titik akhir posterior sel dan tidak ada tilakoid yang memasuki pirenoid secara jelas. Pada saat intensitas cahaya rendah, PCP tampak longgar dan berbeda, terdapat banyak gelembung-gelembung lemak kecil yang tersebar di seluruh kloroplas. Sementara pada saat intensitas cahaya tinggi, PCP terlihat besar, akan tetapi volumenya tidak padat (Ginzburg, 1988).

Weis, *et al.* (2012), menyatakan bahwa *Pirenoid* terdapat 2 bentuk, satu sebagai *homodimer* ( bentuk pendek ) dengan massa molekul (berat molekul) antara 14-16 kDa dan yang lainnya sebagai bentuk *monomer* (bentuk panjang) dengan berat molekul antara 30-35 kDa. Tetapi pada sebagian jenis alga hanya mempunyai *pirenoid* satu bentuk saja. *Pirenoid* mempunyai fungsi fisiologis sebagai zat antioksidan, dimana peridinin merupakan senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas.

Letak PCP di dalam sel dapat dilihat pada Gambar 2. dibawah ini.



**Gambar 3.** Letak Pirenoid/PCP di dalam sel (Sumber : Fitri, 2012)

#### 2.4 RNA Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)

RNA merupakan bahan genetik yang berperan penting dalam ekspresi genetik. Dalam genetika molekular, RNA merupakan perantara informasi yang dibawa DNA dan ekspresi fenotipik yang diwujudkan dalam bentuk protein. Di alam, RNA terdapat dalam berbagai wujud atau tipe. Sebagai bahan genetik, RNA berwujud sepasang pita (dsRNA), sementara dalam genetika molekular, terdapat tiga tipe RNA yang terlibat dalam proses sintesis protein, yaitu messenger-RNA (mRNA), ribosomal-RNA (rRNA), transfer-RNA (tRNA). mRNA berfungsi sebagai penyandi urutan asam amino pada polipeptida. rRNA bersama protein ribosomal berfungsi untuk membentuk ribosom sebagai tempat sintesis protein. Transfer-RNA (tRNA) berfungsi membawa asam amino ke ribosom pada saat translasi (Agustina et. al., 2011).

RNA adalah senyawa genetik yang berperan utama dalam proses ekspresi gen. Asam ribonukleat (RNA) merupakan salah satu molekul asam nukleat yang terbentuk dari asam dioksiribonukleat (DNA). Fungsi dari RNA adalah mensintesis protein dalam inti sel. Molekul RNA berasal dari gugus ribonukleotida monofosfat yang digabungkan dengan ikatan fosfodiester, berupa polimer panjang yang tidak bercabang (Tiara et al., 2014).

## 2.5 Sintesis cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP)

DNA komplementer (cDNA) merupakan DNA yang disintesis dari RNA (mRNA) Template dalam reaksi dikatalisis oleh enzim reverse transcriptase. cDNA sering digunakan untuk mengkloning gen eukariotik pada prokariota. DNA komplementer juga diproduksi secara alami oleh retrovirus (seperti HIV-1, HIV-2, Simian Immunodeficiency Virus, dll) dan kemudian diintegrasikan ke dalam genom inang di mana ia menciptakan sebuah provirus. 'The cDNA' Istilah ini juga biasanya digunakan dalam konteks bioinformatika, untuk merujuk ke urutan mRNA transkrip yang dinyatakan sebagai basa DNA (GCAT) dari pada basis RNA (GCAU). (Cheng *et al.*, 1997).

Meskipun ada beberapa metode untuk melakukannya, cDNA yang paling sering disintesis dari dewasa (penuh disambung) mRNA menggunakan enzim reverse transcriptase. Enzim ini, yang secara alami terjadi pada retrovirus, beroperasi pada untai tunggal mRNA, menghasilkan DNA komplementer yang didasarkan pada pasangan pasangan basa RNA (A, U, G dan C) untuk melengkapi DNA mereka (T, A, C dan G masing-masing). (Cheng *et al.*, 1997)

Teknik RT-PCR adalah proses polimerisasi yang digunakan untuk mensintesis cDNA (WHO, 2002). Sintesis cDNA dengan metode RT-PCR dilakukan dalam suatu campuran reaksi yang mengandung primer dengan spesifitas tinggi dan nukleotida bebas (dNTP) pada temperatur maksimal 42-50°C selama minimal 60 menit (Javois, 1999). Kelebihan metode RT-PCR adalah memiliki sensitivitas yang tinggi dalam mengamplifikasi template RNA dan sangat spesifik saat menggunakan primer yang spesifik dalam sintesis cDNA. Meskipun demikian, teknik tersebut juga memiliki kelemahan yaitu hanya dapat digunakan untuk amplifikasi DNA, tidak untuk mempelajari fungsional protein (Kendall dan Riley, 2000).

## 2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* adalah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA. Teknik ini menggunakan metode enzimatik yang diperantarai primer. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. Pelipat gandaan ini membutuhkan enzim spesifik yang dikenal dengan polimerase. Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untai molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) dan Guanine (G) (Gibbs 1990). Reaksi amplifikasi ini dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase berikutnya (Yuwono 2006).

Teknik PCR menggandakan jumlah molekul DNA dengan target tertentu melalui sintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan oligonukleotida sebagai primer dan enzim, serta dilakukan di dalam *thermocycler*. Posisi DNA target berada diantara sepasang primer dengan panjang berkisar antara puluhan hingga ribuan nukleotida. Primer yang berada sebelum target disebut primer *forward* dan primer yang berada setelah target disebut primer *reverse* (Muladno, 2002).

### 2.6.1 RT-PCR

Polymerase Chain Reaction yang dulunya hanya sebagai teknologi untuk penelitian, sekarang telah dikembangkan sebagai aplikasi diagnostik rutin di laboratorium mikrobiologi klinik (Cockerill & Smith 2002). Polymerase Chain Reaction dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, proses PCR didahului dengan reverse transcriptase terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul complementary DNA (cDNA). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR untuk mengamplifikasi RNA dikenal dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

RT-PCR menggabungkan sintesis cDNA dari RNA template dengan PCR untuk menyediakan metode cepat, sensitif untuk menganalisis ekspresi gen. RT-PCR digunakan untuk mendeteksi atau mengukur ekspresi mRNA, dari konsentrasi terkecil RNA sasaran. Template untuk RT-PCR dapat berupa RNA total atau poli (A)<sup>+</sup> RNA yang dipilih. Reaksi RT dapat prima dengan random primer, oligo (dT), atau primer gen spesifik (GSP) menggunakan reverse transcriptase. RT-PCR dapat dilakukan baik di dalam format dua langkah atau satu langkah. Dalam dua langkah RT-PCR, masing-masing, langkah ini dilakukan dalam kondisi yang optimal. Sintesis cDNA dilakukan pertama di RT penyangga dan sepersepuluh dari reaksi dihapus untuk PCR. Dalam satu langkah RT-PCR, reverse transkripsi dan PCR berlangsung berurutan dalam satu tabung dalam kondisi dioptimalkan untuk kedua RT dan PCR (Santos, 2004)

### 2.6.2 Nested PCR

Dalam Nested PCR digunakan dua set primer dengan satu set primer yang lebih panjang untuk amplifikasi awal dan satu set primer yang lebih pendek untuk mengamplifikasi kembali amplicon dari amplifikasi oleh primer yang lebih panjang.

Nested PCR digunakan untuk meningkatkan sensitivitas serta spesifitas dari amplifikasi DNA (Newton dan Graham, 1994).

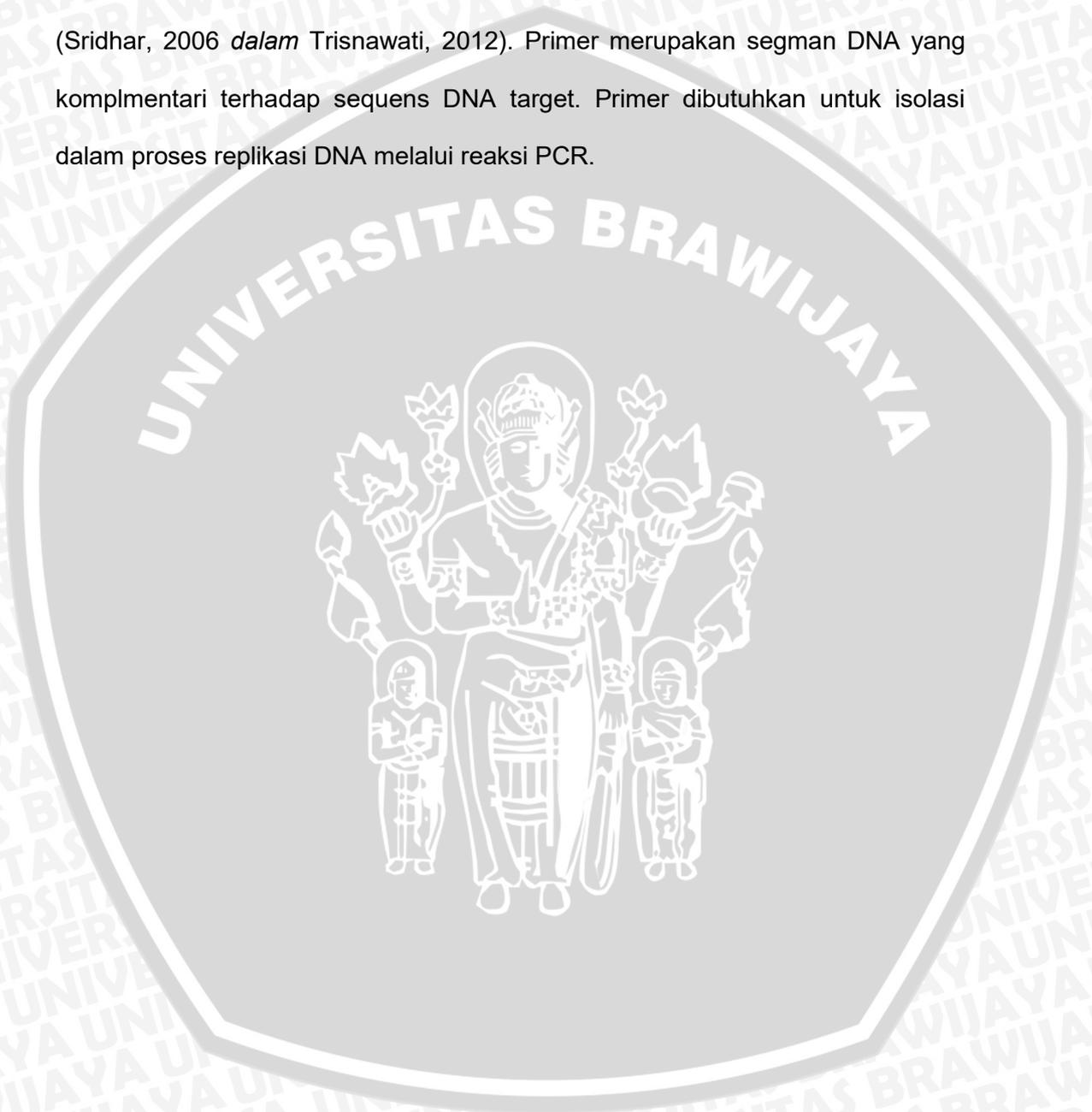
Nested-PCR, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set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

## 2.7 Primer

Merupakan suatu sekuens oligonukleotida pendek yang memiliki 10 – 40 pb (pasangan basa) yang merupakan komplementer dari DNA target. Pemilihan primer harus sesuai, karena jika tidak sesuai reaksi antara gen target dengan primer tidak akan terjadi. Komposisi primer menunjukkan deretan nukleotida primer. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, karena dapat menurunkan spesifisitas primer yang memungkinkan terjadinya mispriming di tempat lain. Kandungan GC (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan GC DNA target. Hal ini dikarenakan primer dengan prosentase GC rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju. Artinya efisiensi proses PCR akan turun. Selain itu, urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C, karena nukleotida A atau

T lebih toleran terhadap mismatch, yang nantinya dapat menurunkan spesifisitas primer (Handoyo dan Ari, 2001)

Primer merupakan fragmen singkat yang komplementer terhadap DNA target, digunakan sebagai inisiator untuk membentuk DNA yang diinginkan (Sridhar, 2006 *dalam* Trisnawati, 2012). Primer merupakan segman DNA yang komplementari terhadap sequens DNA target. Primer dibutuhkan untuk isolasi dalam proses replikasi DNA melalui reaksi PCR.



### 3. MATERI DAN METODE

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi dari penelitian ini adalah sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) mikroalga laut *N. oculata*. Sebagai data pendukung dalam penelitian ini juga dilakukan pengamatan kepadatan sel dan pengamatan parameter kualitas air kultur *N. oculata*.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan berguna untuk menunjang penelitian ini. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif eksploratif. Penelitian deskriptif melakukan analisis hanya sampai pada taraf deskripsi yaitu menganalisis dan menyajikan data secara sistemik, sehingga dapat lebih mudah dipahami dan disimpulkan sedangkan penelitian eksploratif adalah jenis penelitian yang bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala, fakta dan penyakit tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena, dalam penelitian ini tidak dimaksudkan untuk menguji hipotesis tertentu tapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variable, gejala atau keadaan (Arikunto, 2002).

Fenomena yang digambarkan pada penelitian ini adalah sintesis cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *N. oculata* yang memiliki banyak manfaat sehingga perlu diadakan eksplorasi dan penelitian lebih lanjut.

### 3.3.1 Data Primer

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

#### A. Observasi

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

#### B. Wawancara

Wawancara merupakan cara mengumpulkan data dengan cara tanya jawab sepihak yang dikerjakan secara sistematis dan berlandaskan pada tujuan penelitian. Wawancara memerlukan komunikasi yang baik dan lancar antara peneliti dengan subjek sehingga pada akhirnya bisa didapatkan data yang dapat dipertanggung jawabkan secara keseluruhan (Nazir, 1988).

#### C. Partisipasi Aktif

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

#### D. Dokumentasi

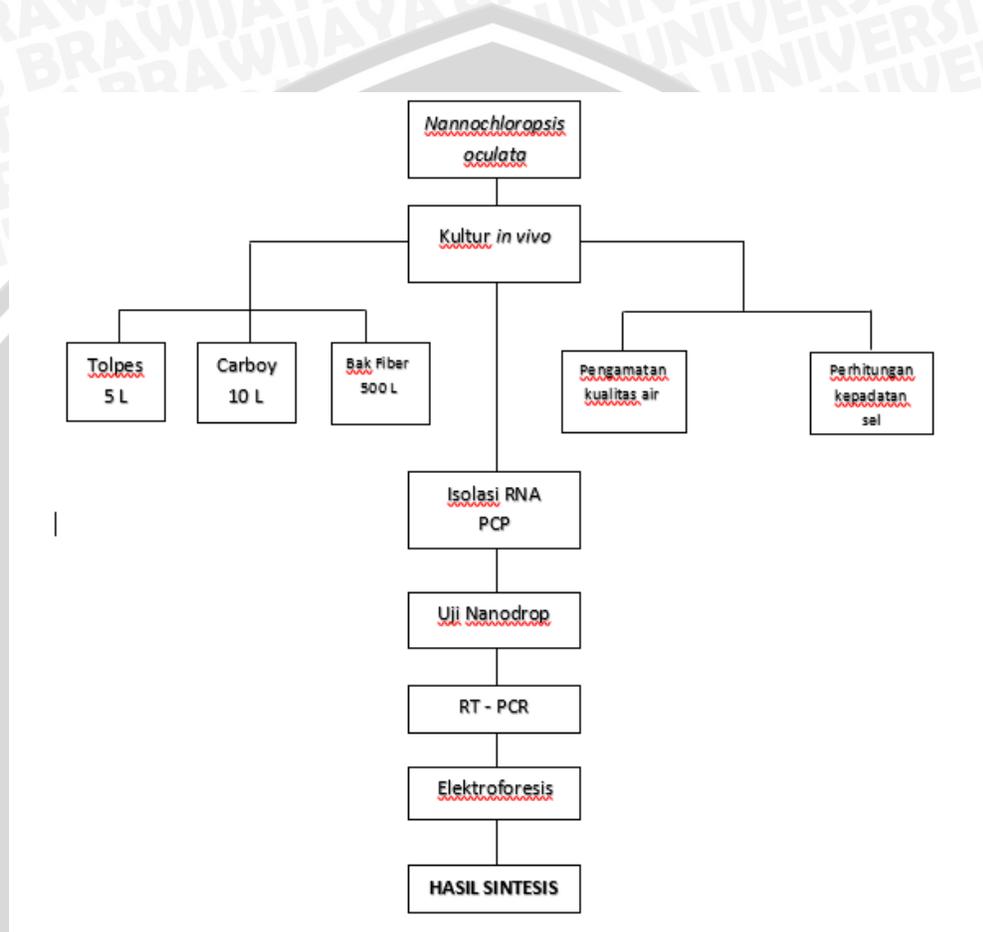
Dokumentasi merupakan cara mengumpulkan data melalui mempelajari, mencatat, menyalin dokumen atau catatan yang bersumber dari peninggalan tertulis seperti arsip, termasuk juga buku tentang teori, pendapat, dalil dan hukum (Widiastuti, 2014). Pada Penelitian ini, dokumentasi dilakukan dengan cara mengambil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

##### 3.3.2 Data Sekunder

Data sekunder adalah data yang telah lebih dulu dikumpulkan dan dilaporkan oleh orang diluar dari penyidik sendiri, walaupun yang dikumpulkan itu sesungguhnya adalah data yang asli (Surakhmad, 2004). Data sekunder dalam Penelitian ini didapatkan dari laporan, jurnal, majalah, dan Skripsi, situs internet serta kepustakaan yang menunjang dari penelitian ini.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Di bawah ini merupakan bagan tahapan penelitian dalam proses mendapatkan sintesis RNA (PCP).



Gambar 4. Tahapan penelitian

#### 3.4.1 Kultur *N. oculata*

##### a. Kultur Toples 5 liter (aerasi)

Sterilisasi media dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat. Setelah dingin dilengkapi peralatan aerasi,

dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7, dipertahankan pada suhu 25 °C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan inkubasi 5-7 hari.

**b. Kultur Carboy 10 liter (aerasi)**

Sterilisasi media menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat  $\leq$  5 ppm Setelah netral dipupuk dengan dosis 1ml/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7, dipertahankan pada suhu 25°C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 watt 2 buah dan inkubasi 5-7 hari.

**c. Kultur Intermediate ( 500-1000 liter )**

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

**3.4.2 Perhitungan Kepadatan Sel**

Perhitungan kelimpahan sel fitoplankton digunakan sebagai salah satu ukuran mengetahui pertumbuhan fitoplankton, mengetahui kelimpahan bibit, kelimpahan pada awal kultur dan kelimpahan pada saat panen. Untuk menghitung jumlah fitoplankton yang dihasilkan dalam skala waktu dapat menggunakan alat haemocytometer.

Menurut Chalid et at. (2006), cara Perhitungan jumlah plankton dengan haemocytometer ini yaitu dengan cara meneteskan kultur sel mikroalga yang akan dianalisa kepadatan selnya sebanyak satu tetes ke masing-masing dua bagian haemocytometer. Tutup dengan menggunakan slide. Haemocytometer ini dilengkapi dengan mikroskop. Haemocytometer yang telah diberikan kultur sel mikroalga diletakkan di bawah lensa objektif dan difokuskan hingga terlihat kisi-kisi tempat perhitungan sel yang terdiri dari lima kisi perhitungan. Selanjutnya jumlah sel plankton dihitung menggunakan rumus berikut:

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

### 3.4.3 Pengukuran Kualitas Air

#### a. 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.
- Sampel air di masukkan 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.

**b. 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.

**c. 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.
- Dilihat nilai salinitasnya yang tertera pada skala refraktometer.

**3.4.4 Isolasi RNA *N. oculata***

Isolasi RNA total dilakukan sesuai protokol Mini KIT Isolasi RNA *Geneaid*, sampel yang digunakan sebanyak 4 sampel sebagai ulangan. Berikut langkah-langkah isolasi RNA total :

**A. Pemisahan Jaringan**

- Mengambil sampel segar atau beku sebanyak 1 gr.
- Membekukan sampel dengan nitrogen cair.
- Menggerus sampel hingga menjadi bubuk kemudian memindahkan ke tabung eppendorf 1.5 ml.

**B. Pemecahan**

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

**C. Pengikatan RNA**

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

**D. Pencucian**

- Menambahkan 400  $\mu$ l buffer W1 ke dalam kolom RB.
- Mensentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 30 detik.

- Membuang cairan dalam tabung kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml.
- Menambahkan 600  $\mu$ l buffer wash ke dalam kolom RB.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit.
- Membuang cairan kemudian menempatkan pada kolom RB kembali pada tabung koleksi 2 ml.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 3 menit hingga matrik kolom kering.

#### E. Pemurnian RNA

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

#### 3.4.5 Pengukuran Kadar Protein dengan Nanodrop

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

1. Sambungkan **kabel** perangkat alat ke **stop kontak**
2. Hidupkan perangkat alat dengan menekan tombol  , tunggu hingga kalibrasi selesai
3. Pilih aplikasi (**1. LabelGuard, 2. Cuvette, 3. Function\***) dengan menekan tombol angka pada perangkat alat
4. 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**
5. 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)

6. Kemudian pilih



OK

atau



Cancel

7. Masukkan **LabelGuard** atau **Cuvette** (sesuai aplikasi yang dipilih) berisi **reference sample** ke **cell holder** pada perangkat alat, kemudian tekan tombol **Blank**
8. Masukkan **LabelGuard** atau **Cuvette** berisi **sampel** ke **cell holder** pada perangkat alat kemudian tekan tombol 
9. Bersihkan **LabelGuard™** Microliter Cell atau **Cuvette**
10. Ulangi hingga semua sampel selesai diukur
11. Tekan **Options** kemudian tekan **Print**
12. Tekan tombol  dan konfirmasi dengan  untuk kembali ke menu awal
13. Matikan perangkat alat dengan menekan tombol 
14. Cabut **kabel** dari **stop kontak**

### 3.4.6 Sintesis Complementary DNA (cDNA)

RNA total yang diperoleh dari tahap isolasi selanjutnya akan ditranskripsikan menjadi DNA komplemen (cDNA). Proses ini menggunakan mesin PCR dengan teknik *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Dalam tahapan RT-PCR dibutuhkan reagen dengan komposisi 3,7 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl Buffer RT 10x, 0,5 µl DTT (*dithiothreitol*) 50 mM, 0,35 µl dNTP (*deoksiribonukleotida triphosphate*) 10 mM, 0,35 µl RNase. Inhibitor, 0,75 µl Oligo dT 10 µM, 0,75 µl Random heksamer, 2 µl template RNA. Dalam satu kali reaksi RT, jumlah seluruh reagen yang digunakan adalah 10 µl. Reaksi RT dilakukan dalam sebuah *Automated Thermal Cycler* (*Gene Amp PCR System 9700 thermocycler, perkin-Elmercrop.*, Norwalk, CT) yang diprogram untuk satu siklus pada suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 60 menit, dan 70°C selama 15 menit. Sampel cDNA yang telah terbentuk dapat disimpan pada suhu -20°C atau digunakan langsung sebagai *template* pada reaksi PCR selanjutnya (Pramarta, 2014).

### 3.4.7 Amplification Complementary DNA (cDNA)

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak fragmen cDNA dari proses RT-PCR dengan primer spesifik. Komponen yang dibutuhkan dalam satu kali reaksi PCR yaitu 12.5 µl Go taq green, 8.5 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl Primer F 10 mM, 1 µl Primer R 10 mM, 2 µl cDNA. Jumlah seluruh reagen yang digunakan dalam satu kali reaksi PCR adalah 25 µl. Primer PCP yang digunakan dalam amplifikasi cDNA mengikuti prosedur Weis *et al.* (2002), yaitu primer 5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3' untuk initial PCR dan primer 5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3' untuk nested PCR dan menggunakan primer RNA Adapter primer, 5' – CTCGTTGCTGGCTTTGATG – 3'. Amplifikasi dengan PCR dilakukan dengan tahapan predenaturasi, denaturasi, annealing, dan

elongasi sebanyak 35 kali. Tahap predenaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 1 menit, tujuan dari denaturasi ini adalah untuk membuka untaian ganda DNA menjadi untaian tunggal. Tahap annealing dilakukan pada suhu 50°C selama 1 menit, dimana primer forward dan primer reverse menempel pada untaian tunggal DNA pada masing-masing komplementnya. Sintesis pemanjangan akhir terjadi pada suhu 72°C selama 5 menit dan suhu 40°C untuk suhu penyimpanan (Pramarta, 2014).

#### 3.4.8 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Sulandri dan Zein, 2003). Prinsip semua metode elektroforesis sama. Pembedanya adalah media yang dipakai. Media dapat berupa selulosa atau gel. Selulosa digunakan untuk molekul yang mempunyai berat molekul rendah seperti asam amino dan karbohidrat. Gel polyacrylamide dan agarose digunakan untuk molekul dengan berat molekul yang lebih besar (Holme dan Peck, 1998).

Tahapan proses elektroforesis agarose adalah sebagai berikut :

- Memasukkan plate ke dalam chamber elektroforesis.
- Menuangkan TBE buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- Memasukkan gel agarose 1,5% ke dalam chamber elektroforesis.
- Memasukkan 5 µl DNA marker ke dalam sumur pertama pada gel agarosa.
- Memasukkan 5 µl sampel (produk hasil nested PCR) ke dalam sumur berikutnya.
- Menghubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- Melakukan running elektroforesis dengan tegangan 65 Volt selama kurang lebih 40-50 menit.

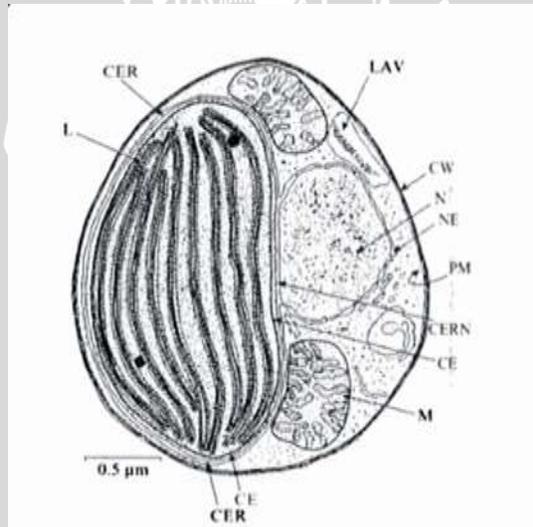
- Setelah selesai, tuang running buffer dan mengambil gel dari plate.
- Merendam gel ke dalam ETBR selama kurang lebih 10 menit untuk mewarnai cDNA.
- Memasukkan gel ke dalam *UV transiluminator* untuk divisualisasikan.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 *Nannochloropsis oculata*

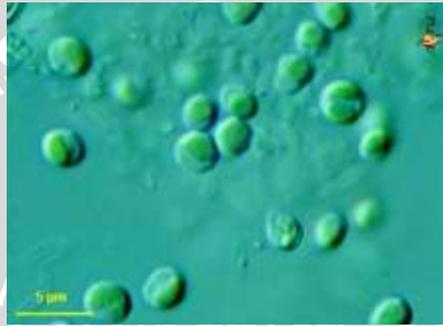
Sel *N. oculata* bersifat non-motil, berbentuk bulat telur, berdiameter 2-4  $\mu\text{m}$ , memiliki pyrenoid dalam kloroplas tunggal dan mengandung klorofil-a (Biondi dan Tredici, 2011). Sedangkan Hoek et.al. (1998) menjelaskan bahwa *N. oculata* merupakan fitoplankton berwarna hijau yang berukuran 2-4  $\mu\text{m}$  dan tidak memiliki flagel (Gambar 3). *N. oculata* Dapat melakukan fotosintesis karena memiliki klorofil-a yang terdapat di kloroplas. Tiap satu sel *N. oculata* hanya memiliki satu kloroplas yang mengandung pyrenoid.



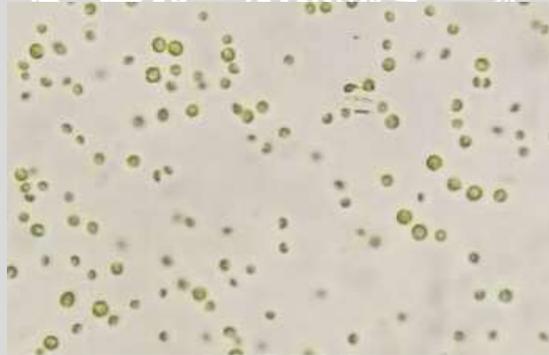
**Gambar 5.** Struktur *N. oculata* CE=chloroplast envelope; CER=chloroplast endoplasmic reticulum; CERN=connection between CER and the nuclear envelope; CW=cell wall; L=lamella, tersusun dari tumpukan tiga tylakoid; LAV=lamellate vesicles; M=mitochondrion; N=nucleus; NE=nuclear envelope; PM=plasma membrane (plasmalemma) (Hoek et al., 1995).

Dinding sel alga eukariotik selalu terbentuk di luar *plasmalemma* dan dalam banyak hal serupa dengan tanaman tingkat tinggi. Hal ini terdapat dalam *Eustigmatophyceae*. Umumnya, dinding sel terdiri dari dua komponen, kerangka

*microfibrillar* tertanam dalam bahan *mucilaginous amorf* terdiri dari polisakarida, lipid, dan protein. Zat seperti silika, kalsium karbonat, atau *sporopollenin* mungkin juga ada. Dalam pembentukan dinding sel alga bahan yang dibutuhkan terutama dikumpulkan ke *Golgi vesicles* yang kemudian menyebarkannya melalui membran plasma, di mana enzim kompleks bertanggung jawab untuk sintesis mikrofibril (Barsanti and Gualtieri, 2006).



**Gambar 6.** *N. oculata*. 1. Bentuk *N. oculata* yaitu bulat pipih dan 2. Warna *N. oculata* terlihat kehijauan (Yanuhar, 2012)

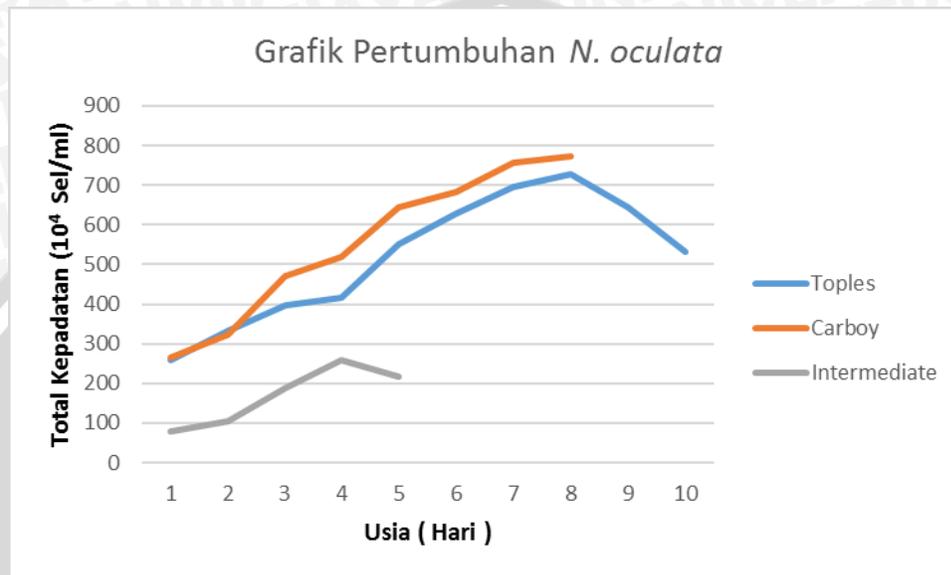


**Gambar 7.** *N. oculata* (perbesaran 40x)

#### 4.2 Perhitungan Kepadatan *N. oculata*

Perhitungan kepadatan *N. oculata* digunakan sebagai salah satu ukuran mengetahui pertumbuhan, mengetahui kelimpahan bibit, kelimpahan pada awal kultur

dan kelimpahan pada saat panen. Untuk menghitung jumlah fitoplankton yang dihasilkan dalam skala waktu dapat menggunakan alat *haemocytometer*.



**Gambar 8.** Grafik Pertumbuhan *N. oculata*

Berdasarkan pengamatan pertambahan kepadatan harian populasi *N. oculata* Gambar 7 di atas menunjukkan bahwa kepadatan populasi *Nannochloropsis oculata* memiliki kepadatan yang baik. Pada awal perhitungan kepadatan *N. oculata* yaitu  $260 \times 10^4$  sel/ml pada skala toples 5 liter, pada skala carboy 10 liter yaitu  $264 \times 10^4$  sel/ml dan pada skala intermediate 500 liter  $80 \times 10^4$  sel/ml. Pada hari ke- 1 sampai hari ke- 3 pertambahan jumlah sel relatif masih kecil, hal ini disebabkan jumlah sel *N. oculata* pada pertumbuhannya masih memerlukan adaptasi dengan lingkungannya yang baru, kemudian berkembang biak sesuai dengan kondisi lingkungan tersebut. Hal ini disebabkan oleh penyesuaian lingkungan yang baru setelah memulai pembiakan (pembelahan sel). Penyesuaian dalam hal ini berarti suatu masa ketika sel-sel kekurangan metabolit dan enzim (Anggraeni, 2009).

Pada hari ke 4 sampai ke 7 kultur, fase pertumbuhan sel *N. oculata* memasuki fase eksponensial. Fase eksponensial terjadi pada hari ke 4 – 7 pada skala toples 5 liter dengan jumlah kepadatan sel  $416 \times 10^4$  sel/ml sampai  $696 \times 10^4$  sel/ml. Pada skala carboy 10 liter mengalami fase eksponensial pada hari ke 3 – 7 dengan jumlah kepadatan sel  $472 \times 10^4$  sel/ml sampai  $756 \times 10^4$  sel/ml. Sedangkan pada skala intermediate 500 liter mengalami fase eksponensial pada hari 2 – 5 adalah  $104 \times 10^4$  sel/ml sampai  $260 \times 10^4$  sel/ml. Selama fase eksponensial sel *N. oculata* membelah dengan cepat, selain itu sel-sel berada dalam keadaan stabil dengan jumlah sel yang bertambah dengan kecepatan konstan, bahan sel baru terbentuk dengan laju tetap akan tetapi bahan-bahan tersebut bersifat katalitik massa bertambah secara eksponensial (Anggraeni, 2009). Kemudian pertumbuhan *N. oculata* akan mengalami fase penurunan setelah melewati fase eksponensial, hal ini dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dalam media. Setelah nutrisi dalam media berkurang atau habis maka sel *N. oculata* memasuki fase penurunan kecepatan tumbuh. Penurunan laju pertumbuhan ini disebabkan karena terjadinya kompetisi antar sel tinggi dalam media hidup dan zat makanan yang tersedia dalam media tidak mencukupi kebutuhan populasi yang bertambah dengan cepat pada fase eksponensial. Akibatnya hanya sebagian dari populasi yang mendapatkan cukup nutrisi untuk tumbuh dan membelah (Anggraeni, 2009). Selain itu Wibowo (2011) mengatakan bahwa saat nutrisi berkurang akan terjadi akumulasi dari beberapa produk metabolisme yang bertindak sebagai inhibitor.



**Gambar 9.** A. Kultur Skala Toples 5 liter. B. Kultur Skala Intermediate 500 liter

#### 4.3 Kualitas Air Kultur *N. oculata*

Seperti halnya organisme lainnya, *N. oculata* membutuhkan beberapa syarat agar dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Salah satu syarat tersebut adalah kualitas air. Parameter yang digunakan untuk mengukur kualitas air antara lain suhu, derajat keasaman, dan salinitas.

##### 4.3.1 Suhu

Pertumbuhan *N. oculata* sangat bergantung pada suhu seperti halnya mikroalga yang lain. Suhu merupakan factor lingkungan yang dapat mempengaruhi tingkat pertumbuhan dan metabolisme mikroalga. Suhu juga mempengaruhi daya larut gas – gas yang diperlukan untuk proses fotosintesis seperti CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>.

Kegiatan kultur *N. oculata* yang ada di BPBAP Situbondo, diketahui suhu berkisar antara 22°C pada skala toples 5 liter dan carboy 10 liter serta suhu pada skala *intermediate* berkisar antara 26<sup>o</sup> – 29°C telah sesuai untuk kebutuhan pertumbuhan *N. oculata*. Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Mikroalga dapat tumbuh optimal pada suhu 20-30°C. Suhu

yang tinggi membuat mikroalga cenderung untuk mempertahankan kelangsungan hidup daripada dengan memperbanyak sel (Schenk *et al*, 2008).

Setiap mikrolga mempunyai suhu ideal yang berbeda-beda untuk bisa tumbuh dan berkembang dengan baik. *N. oculata* dapat tumbuh baik pada kisaran suhu yang optimal 25-30°C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Suhu air sangat berperan dalam kultur mikroalga di laboratorium, karena sangat mempengaruhi aktivitas enzim dalam metabolisme sel (Endrawati, 2013)

#### 4.3.2 Derajat Keasaman (pH)

Seperti halnya suhu, mikroalga memiliki kisaran toleransi pH yang berbeda-beda untuk pertumbuhan yang optimal. Dalam budidaya *N. oculata* yang ada di BPBAP Situbondo, pH yang ada pada skala toples 5 liter dan carboy 10 liter yaitu 8 sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 8 – 8,5. Menurut Tjahjo (2002) dan Cahyaningsih (2009), pH optimal bagi *N. oculata* berkisar 8-8,5.

Berdasarkan data tersebut terutama untuk kultur murni sudah sangat memenuhi syarat untuk dapat tumbuh. PH yang optimal juga dapat menunjang pemanfaatan nitrogen oleh *N. oculata*, hal ini sesuai dengan pendapat (Morel, 1983), pada kisaran pH 7 – 9 terdapat dua kemungkinan pemanfaatan nitrogen dari nutrient dalam medium oleh sel mikroalga, yaitu pemanfaatan nitrogen dalam bentuk nitrat dan ammonium.

#### 4.3.3 Salinitas

Kehidupan berbagai jenis fitoplankton termasuk *N. oculata* tergantung pada salinitas perairan. Faktor salinitas sangat penting karena, berpengaruh langsung terhadap tekanan osmotik tubuh. Produktivitas dan daya adaptasi berbagai jenis alga diduga berkaitan erat dengan tingkat salinitas lingkungannya.

Salinitas merupakan salah satu sifat kimia air yang secara langsung maupun tidak langsung mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme termasuk *N. oculata*. Pada saat kultur, biasanya terjadi kenaikan salinitas akibat dari adanya hasil metabolisme dan adanya pengendapan. Dalam kultur *N. oculata* nilai salinitas pada skala laboratorium berkisar 33 ppt, sedangkan pada skala *intermediate* sebesar 34 ppt. Hal ini sesuai dengan pendapat Tjahjo (2002), *N. oculata* dapat tumbuh pada salinitas 30-35 ppt. Hal ini didukung pula dengan penelitian Fulks dan Main (1991), kisaran salinitas yang optimum alga adalah 25 ppt- 35 ppt. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa air laut yang digunakan dalam kultur *N. oculata* sudah memenuhi syarat untuk dapat mendukung pertumbuhannya.

#### 4.4 Isolasi RNA *N. oculata*

Isolasi RNA merupakan teknik untuk memperoleh RNA yang diharapkan bebas dari kontaminan. Pada penelitian ini isolasi RNA dilakukan untuk menghasilkan RNA murni dari *N. oculata*.



**Gambar 10.** Kit RNA yang digunakan

Isolasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* dilakukan menggunakan RNA mini kit *Plant GeneAid*. Berdasarkan RNA kit di atas, ada 3 tahapan isolasi yaitu pemecahan dinding sel (*lysis*), pengikatan RNA, pencucian RNA dan pemurnian RNA.

Untuk sel mikroalga pemecahan sel meliputi pemecahan dinding sel dan membran sel. Pemecahan sel umumnya dilakukan dengan cara mekanis menggunakan mortar dan alu dalam larutan nitrogen cair. Nitrogen cair membuat jaringan dan sel menjadi kering dan rapuh sehingga lebih mudah dihancurkan.

Tahapan awal dari proses isolasi RNA berdasarkan kit di atas adalah pemecahan dinding sel dan pengikatan RNA penambahan lysis buffer (RB buffer ) dan  $\beta$ -mercaptoethanol kemudian diinkubasi pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit bertujuan untuk memecah dinding sel mikroalga dan mengikat RNA. Larutan *lysis buffer* memiliki kandungan zat guanidine tiosianat yang berperan sebagai garam, dimana garam ini dapat memecahkan sampel sekaligus menonaktifkan RNase (Fermentas, 2011). Guanidinium thiocyanate yang merupakan inhibitor kuat RNase dan merupakan denaturan protein (Brown et al 2009).



**Gambar 11.** Isolasi RNA

Tahapan selanjutnya adalah dengan penambahan *wash buffer* ke dalam RB kolom, penambahan ini berfungsi agar dapat menghilangkan sisa kotoran protein yang masih terikat pada RNA. Kemudian tahap pencucian, dengan penambahan RNase-bebas yang berfungsi untuk melulusi RNA sehingga didapat hasil isolate murni RNA. Untuk membersihkan zat kontaminan yang masih tersisa pada membran

kolom dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi menggunakan larutan wash buffer. Molekul RNA kemudian dielusi dengan menggunakan nuclease-free water (Fermentas, 2011).

#### 4.5 Kandungan Total RNA

Total RNA hasil isolasi diukur kemurnian dan konsentrasinya menggunakan NanoPhotometer™ [Implen] pada panjang gelombang 260, 280 dan 320 nm. Kemurnian RNA diukur pada nisbah A260/A280 karena protein diserap pada panjang gelombang 280 nm (Aranda et al. 2009).



**Gambar 12.** NanoPhotometer™ [Implen]

Berdasarkan hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh hasil 23,6 µg/ml. Ekstraksi RNA dengan kit komersial mengandalkan kerja membran silika untuk mengikat RNA total tanaman dan kemudian mencuci inhibitor-inhibitor melalui membran tersebut sehingga dihasilkan RNA dengan kemurnian yang tinggi (Adiputra et al., 2012).

#### 4.6 Reverse Transcription PCR (RT – PCR) *Peridinin Chlorophyl Protein*

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 bisa digunakan langsung sebagai cetakan dalam proses PCR, sehingga RNA harus ditranskripsikan balik menjadi komplemen cDNA. teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, sebelum proses PCR, molekul mRNA harus dilakukan proses reverse transcriptase sehingga diperoleh molekul *complementary* DNA (cDNA). Molekul cDNA tersebut yang digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi RNA disebut dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).



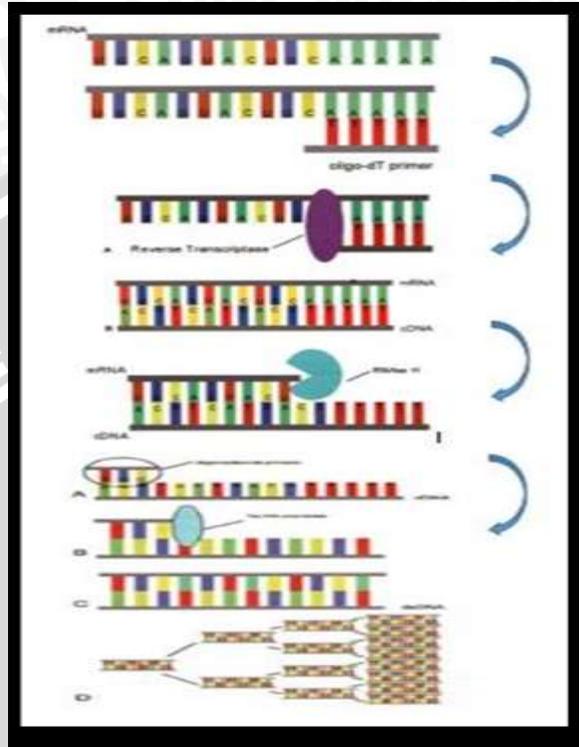
**Gambar 13.** Pengoperasian Mesin PCR

Komplemen DNA yang terbentuk dari proses reverse transcription selanjutnya akan diamplifikasi menggunakan teknik PCR. cDNA digunakan sebagai cetakan dan akan dilipatgandakan. Proses PCR ini diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit dan denaturasi akhir pada suhu 94°C selama 20 detik. Pada tahap ini, molekul cDNA akan dipanaskan pada suhu 94°C sehingga terjadi pemisahan untai ganda cDNA menjadi untai tunggal. Untai tunggal inilah yang akan menjadi cetakan untuk DNA baru yang akan dibuat. Sambrook dan Russell (2001) menyatakan bahwa suhu denaturasi dapat mempengaruhi proses penempelan primer, denaturasi dapat dilakukan pada kisaran suhu 94-95°C. Jika suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer sulit menempel pada cetakan. Sementara suhu yang digunakan terlalu rendah menyebabkan primer berlekatan di berbagai tempat sehingga hasil PCR menjadi tidak spesifik (Rybicki, 2001).

Setelah denaturasi selesai tahap selanjutnya yaitu tahapan annealing atau penempelan. Tahap ini merupakan tahap dimana primer menempel pada sekuen target. Suhu annealing yang digunakan biasanya disesuaikan dengan nilai Temperature melting ( $T_m$ ) dari primer yang digunakan. Menurut Sambrook dan Russel (2001), Suhu annealing yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menjadi berlekatan, sementara jika suhu terlalu tinggi penempelan primer pada cetakan menjadikurang optimal. Pada tahap *annealing* ini waktu yang biasa digunakan berkisar antara 30-60 detik.

Tahap terakhir yaitu *extention*, pada tahap ini terjadi pemanjangan untai DNA. Enzim DNA polymerase akan memanjangkan sekaligus membentuk DNA baru dari gabungan antara cetakan, primer dan nukleotida. Tahap pemanjangan ini dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemanjangan akhir

pada suhu 72°C selama 3 menit. Proses RT-PCR dapat dilihat pada gambar 13 sebagai berikut.

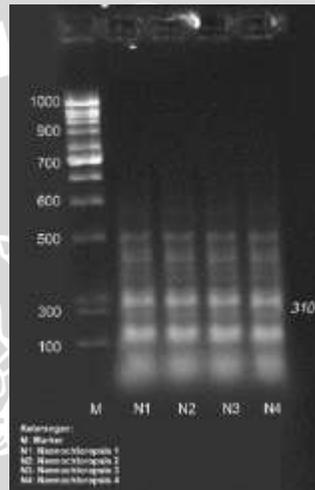


**Gambar 14.** Proses RT PCR ( Sumber : Kendall dan K.Riley, 2000)

Reaksi amplifikasi melalui RT PCR ini dimulai dengan tahapan denaturasi cetakan DNA, yaitu pembukaan rantai ganda menjadi rantai tunggal. Selanjutnya suhu diturunkan sehingga primer akan menempel pada cetakan DNA yang berantai tunggal, tahap ini disebut dengan annealing. Setelah proses annealing, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerase selanjutnya (Yuwono, 2006 dalam Hewajuli, 2014).

RT PCR dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik didesain untuk gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* dari *N. oculata*, dimana perancangan primer dilakukan dengan merujuk pada data cDNA dari gen *Peridinin Chlorophyll Protein*

(PCP) yang terdapat pada database GenBank dengan panjang pita 310 bp. Oleh karena itu primer yang digunakan adalah spesifik untuk *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) dari *N. oculata* maka identifikasi dilakukan cukup dengan melihat panjang fragmen RNA. Dari hasil visualisasi elektroforesis menggunakan UV Transluminator terlihat fragmen RNA sepanjang 310 bp (Gambar 13), sesuai dengan panjang gen *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) yang dijadikan referensi (GenBank).



**Gambar 15.** Visualisasi PCR dengan gel elektroforesis

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

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa sintesi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* pada *N. oculata* berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik *Reverse Transcription PCR (RT – PCR)*. Hasil visualisasi gel elektroforesis menggunakan UV Transluminator menunjukkan bahwa cDNA yang berhasil disintesis memiliki panjang pita sebesar 310 bp.

### 5.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai kualitas dari sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* dan mengenai sequencing dan cloning cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* *N. oculata* sehingga selanjutnya dapat dilakukan produksi *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* sebagai imunostimulan yang dapat digunakan sebagai salah satu solusi pencegahan terhadap serangan penyakit pada ikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adiputra, J., Hidayat, S.H. dan Damayanti, T.A. 2012. Evaluasi Tiga Metode Preparasi RNA Total untuk Deteksi *Turnip mosaic potyvirus* dari Benih *Brassica rappa* dengan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. Jurnal Fitopatologi Indonesia. 8(2) : 44 – 49.
- Agustina, D., C.T. Sardjono, B. Setiawan, F. Sandra. 2011. Peranan RNA interference pada Embryonic Stem Cell. *CDK 186 Vol. 38 (5): 332-335*.
- Anggraeni, N. 2009. Penentuan Parameter Pertumbuhan *Chlorella vulgaris*. Disertasi. Fakultas Teknik. ITB.
- 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.
- Arikunto, Suharsimi. 2002. *Prosedur Penelitian – Suatu Pendekatan Praktek*, Cetakan Kedua Belas (Edisi Revisi V). Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. *Algae anatomy, biochemistry and biotechnology*. London : CRC Press Taylor and Francis Group.
- Biondi and Tredici. 2011. *Algae and Aquatic Biomass for a Sustainable Production of 2nd Generation Biofuels*. UNIFI. Page 148 – 150.
- Bold, H.C. and Michael J.W. 1985. *Introduction to The Algae*, Prentice Hall., Inc., New Jersey, USA, 720 pp.
- Bentley, C. D., et al. (2008). Intensive Rotifer Production in a Pilot-scale Continuous Culture Recirculating System Using Nonviable Microalgae and an Ammonia Neutralizer. *Issue Journal of the World Aquaculture Society* 39(5): 625–635.
- Brown S M, Hay J G, Ostrer H. 2009. *Essentials of Medical Genomics*. New Jersey [USA]: Second ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Cao, S., Zhang, X., Fan, X., Qiao, H., Liang, C., Xu, D., Mou, S., Wang, W. & Ye, N. 2013. Phylogeny and characterization of *Nannochloropsis oceanica* var. *sinensis* var. *nov* (Eustigmatophyceae), a new oleaginous alga from China. *Phycologia* 52(6): 573-577.
- Chalid, S. Y., S. Amini dan S. D. Lestari. *Kultivasi Chlorella sp. pada Media Tumbuh yang diperkaya dengan Pupuk Anorganik dan Soil Ekstrak. Laporan Penelitian*. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.

- Cheng K W, Chan Y H, Chen Y D, Yu K L, Chan K M. 1997. Sequence of a cDNA clone encoding a novel somatolactin in goldfish *Carassius auratus*. *Journal Biochem Biophys Res Commun*. 232: 282 – 287.
- Diharmi A. 2001. Pengaruh Pencahayaan Terhadap Kandungan Pigmen Bioaktif Mikroalga *Spirulina platensis* Strain Local (Ink). Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Endrawati, H dan Ita, R. 2013. Kadar lipid total *Nannochloropsis oculata* yang dikultur dengan suhu yang berbeda. *Buletin Oseanografi Marina*. (1) : 25-33
- Ernest, Prima. 2012. Pengaruh kandungan ion nitrat terhadap pertumbuhan *Nannchloropsis oculata*. Fakultas Teknik, Universitas Indonesia. Depok, Jakarta.
- Fachrullah MR. 2011. Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp. yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil Penambangan Timah di Pulau Bangka.[Skripsi] Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fermentas. 2011. GeneJet RNA purification kit. Fermentas Inc. New York : 17 hlm.
- Fogg, G.E. 1995. Algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press, Medison.
- Fulks, W. And K.L. Main. (Eds).1991. *The Design An Operation Of Commercial Scale Live Feed Production Systems In Rotifer And Microalgae System*. The ceanic Institute Makapuu Point. Honolulu Hawaii. P. 3-52.
- Ginzburg, M. 1988. *Dunaliella* : a Green Alga Adapted to Salt. Botanical Research. Vol 14. The Hebrew University of Jerusalem : Israel.
- 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.
- Handayani L. 2003. Pertumbuhan *Spirulina platensis* yang Dikultur dengan Pupuk Komersil dan Kotoran Puyuh. [Skripsi]. Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hermanto, M. B., Sumardi, La Choviya Hawa dan Siti Masithah F. 2011. Perancangan Bioreaktor untuk Pembudidayaan Mikroalga. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 12(3) : 153-162
- 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.

- Hibberd, B. 2000. Systema Nature Classification. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx>
- Hirata, H., A. Ishak, dan S. Yamashaki. 1981. Effect of Salinity and Temperature on The Growth of The Marine Phytoplankton *Chlorella saccharophilla*. Journal of the Kagoshima Univ of Fisheries. Japan. 30(2) : 257-262.
- Hoek, C.V.D., D.G. Mann, H.M. Jahns. 1995. Algae in Introduction to Phycology. New York. Cambridge University Press.
- \_\_\_\_\_. 1998. Algae : An Introduction to Phycology. Cambridge University Press. UK.
- Holme, D.J., & Hazel Peck. 1988. Analytical biochemistry 3 rd edition. London : Addison Wesley Longman, 45, 77.
- 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
- Javois LC. 1999. Immunocytochemical Methods and Protocols. second edition. New Jersey. Humana Press
- Kawaroe M. 2008. *Mikroalga Sumber Potensial Biofuel Bogor*. Pusat Penelitian Surfaktan dan Bioenergi (SRBC), Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Kendall LV, Riley LK. 2000. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The American Association for Laboratory Animal Science. Vol. 39 No. 1.
- Krueger, B. P., S.S. Lampoura, I.H.M.V Stokkum, E. Papagiannakis, J. M. Salverda, C.C. Gradinaru, D. Rutkauskas, R.G. Hiller, R.V. Grondelle. 2001. Energy Transfer in the Peridinin Chlorophyll-a Protein of *Amphidinium carterae* Studied by Polarized Transient Absorption and Target Analysis. Biophysical Journal. Vol. 80 : 2843–2855.
- Kuntari, A. G. 2014. Fungsi Peridinin Cell Pigment (PCP) *Nannochloropsis oculata* dalam Menginduksi Sistem Imun Major Histocompatibility Complex (MHC I) Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) pada Organ Insang. Skripsi. Universitas Brawijaya : Malang.
- Lavens, P. And P. Sorgeloos. 1996. Manual on The Production and Used of Live Food for Aquaculture .FAO Fisheries Technical Paper 361.
- Mahreni dan Suhenry, S. 2011. Kinetika Pertumbuhan sel *Sacharomyces cerevisiae* dalam Media Tepung Kulit Pisang. Prodi Teknik Kimia. Fakultas Teknologi Industri, Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Yogyakarta. Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses, 26 Juli 2011 Issn : 1411-4216.

- Manurung, D. M. 2009. Komposisi kimia, asam lemak dan kolesterol udang ronggeng (*Harpiosquilla raphidea*) akibat perebusan. Departemen Perikanan dan Kelautan. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Morel, T. 1983. Chlorella. In Borowitzka MA, Borowitzka LJ (Eds). Micro-algal Biotechnology. Cambridge Uni. Press. Cambridge
- Muladno. 2002. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR. UK: Bios Scientific Publisher.
- Olaizola, M, T. Bridges, S. Flores, L. Griswold, J. Morency dan T. Nakamura. 2004. Microalgal Removal of CO<sub>2</sub> from Flue Gases : CO<sub>2</sub> Capture from a Coal Combuster, Biotech. Bioproc. Eng. 8: 360-367
- 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. Univesitas Udayana : Denpasar.
- Prabowo, Dadang. 2009. Optimalisasi Pengembangan Media Untuk Pertumbuhan Chlorella sp pada Skala Laboratorium. SKRIPSI. Institut Pertanian Bogor : Bogor. 95 hal.
- Reef central.2008. Algae Instant Info. <http://www.reefcentral.com>. Diakses tanggal 23 Juli 2016.
- Renaud S, Parry D, Thinh L-V, Kuo C Padovan A, and Sammy N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of Isochrysis sp. and Nannochloropsis oculata for use in tropical aquaculture. Journal of Applied Phycology 3(1):43-53
- Sari IP, Abdul M. 2012. Pola pertumbuhan Nannochloropsis oculata pada skala laboratorium, intermediet dan masal. Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 4(2) : 123-127.
- Sudarsono, Afik. 2013. STUDI In vivo TREATMENT CRUDE PYRENOID MIKROALGA LAUT Nannochloropsis oculata TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*). Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang
- Sulandri, Sri dan M. Syamsul Arifin Zein, 2003, Panduan Praktis Laboratorium DNA Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia : Bogor.
- Shcenk, P. M., R. Skye, R. Thomas Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, and Ben Hankamer. 2008. Second Generation Biofuel : High Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenerg. 1 : 20-43.
- Tjahjo, W. L. Erawati dan Hanung, S. 2002. Biologi Fitoplankton dalam Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Balai Budidaya Laut, Direktorat Jendral

Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan. Bandar Lampung.

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.

Trisnawati, I. 2012. Isolasi gen omega-3 desaturase dari *Nannochloropsis* sp. Isolate local. SKRIPSI. Universitas Indonesia

Watanabe, T. 1979. Nutritional Quality of Living Feeds Used in Seed Production of Fish. Proc. Japan-Soviet Joint. Symp Agriculture 7.

Weis, V. M., Verde, E. A, dan Wendy,S.R. 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

Whittle, S.J and Casselton, P.J. 1975. The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. British Phycological Journal. 10 : 179-191

Wibowo, M.S. 2011. "Pertumbuhan Mikroorganisme" Karya ilmiah. School of pharmacy ITB.

World Health Organization (WHO). 2002. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO Global Influenza Programme. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1.

Yanuhar, Uun. 2012. Laporan Eksplorasi Karakter Molekuler Perinidin Chlorophyll Cell Pigmen Alga Laut *Nannochloropsis oculata* dan *Halimeda* sp: Upaya Pengendalian Penyakit Virus Pada Ikan Berbasis Bahan Hayati. Unpublished.

Yusuf, Z.K. 2010. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). *Saintek*. 5 (6).

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

Zumarintha, F. 2011. Pemanfaatan Karbondioksida (CO<sub>2</sub>) untuk Kultivasi Mikroalga *Nannochloropsis* sp. Sebagai Bahan Baku Biofuel. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

No	Alat	Fungsi
1.	Cawan Petri	Sebagai wadah bibit <i>N. oculata</i> pada media agar
2.	Jarum Ose	Untuk inokulasi bibit <i>N. oculata</i>
3.	Test Tube	Sebagai wadah kultur bibit <i>N. oculata</i> pada kultur laboratorium
4.	Erlenmeyer	Sebagai wadah kultur bibit <i>N. oculata</i> pada kultur laboratorium
5.	Toples 3 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>N. oculata</i> pada kultur laboratorium
6.	Carboy 10 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>N. oculata</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>N. Oculata</i>
11.	Selang Aerasi	Untuk membantu menyalurkan udara ke wadah kultur <i>N. Oculata</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>N. oculata</i>
19.	Haemocytometer	Untuk menghitung kepadatan <i>N. oculata</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.	Kompore 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>N. oculata</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>N. oculata</i>	Sebagai bibit untuk kultur <i>N. oculata</i>
2.	Air Laut	Sebagai media pertumbuhan <i>N. oculata</i>
3.	Air Tawar	Untuk mencuci alat dan bak yang kotor dan untuk membuat pupuk
4.	Pupuk Walne	Untuk memenuhi nutrisi <i>N. oculata</i>
5.	Vitamin B1 & B12	Sebagai vitamin saat kultur <i>N. oculata</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>N. oculata</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.	<i>Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit</i>	Untuk isolasi RNA <i>N. oculata</i>
25.	<i>Primer</i>	Sebagai komplementer dari DNA target
26.	Akuades	Untuk mensterilkan alat
27.	3,7 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl Buffer RT 10x, 0,5 µl 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



Kultur Skala Toples 5 L



Kultur Skala Carboy 10 L



Proses Penyaringan Sampel



Hasil Penyaringan Sampel



Proses Isolasi RNA Sampel



Penimbangan Sampel Isolasi RNA



Pengoperasian Mesin PCR



Proses Elektroforesis cDNA



NanoPhotometer™ [Implen]



Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi yang berfungsi sebagai komplemen DNA



Visuilisasi cDNA dengan menggunakan UV Transluminator

## Lampiran 4. Daftar Istilah

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

