

REVIEW OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA  
PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *EcoRI* PADA MIKROALGA LAUT

*Dunaliella salina* YANG DIKULTUR SECARA *IN VIVO*

ARTIKEL SKRIPSI

PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

Oleh:

FIQIE ZULFIKAR SYA'RONI

NIM. 125080101111029



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

REVIEW OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA  
PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *EcoRI* PADA MIKROALGA LAUT

*Dunaliella salina* YANG DIKULTUR SECARA *IN VIVO*

ARTIKEL SKRIPSI

PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

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

Universitas Brawijaya

Oleh:

FIQIE ZULFIKAR SYA'RONI

NIM. 125080101111029



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

ARTIKEL SKRIPSI

**OPTIMALISASI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) RNA PCP  
DENGAN ENZIM RESTRIKSI *EcoRI* PADA MIKROALGA LAUT *Dunaliella  
salina* YANG DIKULTUR SECARA *IN VIVO***

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

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal : 05 Agustus 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Oleh :

**FIQIE ZULFIKAR SYA'RONI  
NIM. 125080101111029**

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

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

**Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS  
NIP. 19570704 198403 2 001**

Tanggal :

16 AUG 2016

Tanggal :

16 AUG 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP  
**(Dr. Ir. Arning Winjeng Ekawati, MS)  
NIP. 19620805 198603 2 001**

Tanggal :

16 AUG 2016



REVIEW OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA PCP  
DENGAN ENZIM RESTRIKSI *EcoRI* PADA MIKROALGA LAUT *Dunaliella salina*  
YANG DIKULTUR SECARA *IN VIVO*

OPTIMIZATION OF *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA PCP TO  
APPLY RESTRICTION ENZYMES *EcoRI* WITH THE MARINE MICROALGAE  
*Dunaliella salina* CULTURED *IN VIVO*

Figie Zulfikar Sya'roni<sup>1</sup>, Uun Yanuhar<sup>2</sup>, Endang Yuli H<sup>2</sup>

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

ABSTRAK

*Dunaliella salina* mempunyai PCP yang dapat berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam fotosintesis. Untuk mendeteksi PCP pada *Dunaliella salina* menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Dalam melakukan teknik PCR sering dihasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal. Berdasarkan hal tersebut dilakukan optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA PCP dan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* pada *Dunaliella salina* untuk mengetahui pengaruh hasil pemotongan RNA PCP yang spesifik pada *Dunaliella salina*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis proses PCR dalam rangka eksplorasi RNA PCP pada *Dunaliella salina* menggunakan Enzim Restriksi *EcoRI*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2016 hingga Mei 2016 dengan menggunakan metode deskriptif eksploratif. Pertumbuhan sel *Dunaliella salina* pada kultur laboratorium (Toples 4 L dan Karboi 8 L) lebih baik daripada kultur intermediet. Hasil pengukuran kualitas air pada kultur laboratorium menunjukkan suhu 22 °C, pH berkisar antara 8.3 - 8.6, salinitas berkisar antara 35 - 36 ppt, sedangkan kultur intermediet menunjukkan suhu berkisar 24 - 26 °C, pH berkisar antara 8.4 - 8.8, salinitas berkisar antara 34 - 35 ppt. Pengukuran RNA total hasil isolasi RNA diperoleh nilai sebesar 25.8 mg/ml. Pada proses PCR didapatkan suhu *annealing* (T<sub>m</sub>) sebesar 52 °C menggunakan 3 primer yaitu *initiated primer*, *adapter primer*, dan *nested primer*. Hasil amplifikasi cDNA yang telah divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel Agarosa menunjukkan panjang pita yang terbentuk memiliki ukuran sekitar 310 *base pair* (bp). Pemotongan hasil amplifikasi cDNA menggunakan enzim restriksi *EcoRI* menunjukkan pemotongan spesifik pada ukuran 185 bp.

Kata kunci: PCR, RNA, PCP, Enzm Restriksi, *Dunaliella salina*

ABSTRACT

*Dunaliella salina* has a PCP who can serve as light-harvesting in photosynthesis. To detect PCP in *Dunaliella salina* using *polymerase chain reaction* (PCR). In conducting the PCR technique often resulting DNA amplification is not optimal. Based on that do the optimization of *polymerase chain reaction* (PCR) using RNA PCP and restriction enzyme *EcoRI* in *Dunaliella salina* to determine the influence of results PCP cutting of specific RNA in *Dunaliella salina*. This study aims to analyze the process in order to discover RNA PCR PCP on the *Dunaliella salina* using restriction enzymes *EcoRI*. This study was conducted in March 2016 to May 2016 using exploratory descriptive method. cell growth *Dunaliella salina* in cultured laboratory (4 L jars and Karboi 8 L) is better than culture intermediates. Results of water quality measurements in laboratory cultures showed a temperature 22 °C, pH range between 8.3 - 8.6, salinity ranging from 35 - 36 ppt, whereas culture intermediates showed temperatures ranging from 24-26 °C, pH range between 8.4 - 8.8, salinity ranges between 34 - 35 ppt. Measurement of total RNA isolated RNA obtained a value of 25.8 mg / ml. In the process obtained PCR temperature *annealing* (T<sub>m</sub>) of 52 °C using a primer that 3 *initiated* primary, *primary* adapter, and *nested* primers. CDNA amplification product that has been visualized using agarose gel electrophoresis showed long band formed has a size of about 310 *base pairs* (bp). Cutting cDNA amplification product using a restriction enzyme *EcoRI* showed specific cuts in the size of 185 bp.

Keywords: PCR, RNA, PCP, Enzm restriction, *Dunaliella salina*

<sup>1</sup> Mahasiswa Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan

<sup>2</sup> Dosen Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Dunaliella salina* adalah mikroalga alami yang tersebar di sejumlah lokasi di seluruh dunia pada perairan laut. *Dunaliella salina* tampak berwarna hijau, tetapi dalam kondisi salinitas tinggi dan intensitas cahaya, mikroalga ini berubah warna menjadi merah karena produksi karotenoid di pelindung sel. Mikroalga laut *Dunaliella salina* mempunyai pigmen unik yang dapat dimanfaatkan sebagai salah satu pemenuhan kebutuhan bagi manusia, misalnya dimanfaatkan untuk menjadi obat-obatan, kosmetik, suplemen gizi, pakan budidaya dan pewarna makanan selain itu juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan antivirus.

*Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) adalah pigmen protein unik dari fotosintesis dinoflagellata yang bisa menangkap cahaya yang sangat berlimpah. Meskipun penelitian secara ekstensif telah memeriksa protein PCP, hanya empat urutan PCP nukleotida lengkap telah dilaporkan sampai saat ini. PCPs terjadi dalam dua bentuk yang berbeda, bentuk singkat dengan massa molekul 14-16 kDa dan bentuk panjang dengan massa 30-35 kDa, yang diperkirakan telah muncul dengan peristiwa duplikasi gen (Virginia, 2002). Menurut Hirschberg *et al* (1997), pigmen PCP terdiri atas empat molekul peridinin dan satu molekul klorofil. 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.

Untuk mendeteksi PCP pada mikroalga laut *Dunaliella salina* dapat dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified* DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20-40 siklus. Target DNA yang diinginkan akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat (Newton and Graham, 1994).

Dalam melakukan metode PCR sering dihasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal sehingga tidak terlihat dalam visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai optimalisasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) RNA PCP dengan enzim restriksi *EcoRI* untuk menghasilkan pemotongan RNA PCP yang spesifik pada mikroalga laut *Dunaliella salina*.

### 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk menganalisis proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam rangka eksplorasi RNA PCP pada mikroalga laut *Dunaliella salina* menggunakan enzim restriksi *EcoRI*.

### 1.3 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dilakukannya penelitian ini yaitu dalam rangka eksplorasi mikroalga laut *Dunaliella salina* sebagai bahan antivirus untuk mendukung kegiatan perikanan yang ramah lingkungan.

### 1.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2016 hingga Mei 2016 yang berlokasi di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomol dan Genetika Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Pakan Alami, Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo.

## 2. MATERI DAN METODE

### 2.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah optimalisasi identifikasi PCP mikroalga laut *Dunaliella salina* yang dikultur secara *in vivo*. Hal ini dilakukan dengan *mengoptimalkan polymerase chain reaction* (PCR) untuk mengidentifikasi RNA PCP pada *Dunaliella salina*.

### 2.2 Metode Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif. Metode deskriptif dalam penelitian ini bertujuan untuk melaporkan hasil optimalisasi identifikasi RNA PCP dari mikroalga laut *Dunaliella salina*. Metode eksploratif pada penelitian ini bertujuan untuk

mengidentifikasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Dunaliella salina*.

### 2.2.1 Kultur *Dunaliella salina*

Kultur *D. salina* terdiri dari kultur laboratorium dan intermediet yang dilaksanakan di Laboratorium Pakan Alami, BPBAB Situbondo. Kultur laboratorium dilakukan pada volume 5 liter dan 15 liter, sementara kultur intermediet dilakukan pada volume 500 liter. Semua peralatan dan bahan yang digunakan untuk kultur harus steril agar tidak terjadi kontaminan. Media kultur yang digunakan berupa air laut dan ditambahkan pupuk Walne untuk memenuhi kebutuhan nutrisi alga. Kepadatan sel dihitung setiap hari untuk mengetahui penambahan jumlah sel setiap harinya. Parameter kualitas air yang diamati selama kultur meliputi pH, suhu dan salinitas.

### 2.2.2 Isolasi RNA *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* yang telah dipanen selanjutnya disaring untuk diambil endapannya. Jumlah mikroalga yang digunakan untuk isolasi sebesar 1 gram setelah dihaluskan menjadi bubuk dengan menggunakan nitrogen cair. Selanjutnya sampel isolasi diekstraksi menggunakan *Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit*. Terdapat beberapa langkah isolasi RNA sesuai prosedur pabrik RNA Kit.

### 2.2.3 Pengukuran Konsentrasi RNA

Setelah diekstraksi, sebanyak 4  $\mu$ l protein yang diperoleh ditambahkan 4  $\mu$ l buffer ekstraknya yaitu Tris-HCl pH 7,5 untuk dinilai kemurniannya dengan cara dikuantifikasi menggunakan nanodrop spektrofotometer. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 280/260 nm Absorpsi sinar pada 280 nm dapat digunakan untuk

estimasi konsentrasi protein dalam larutan. Pengukuran absorpsi pada 260 nm perlu dilakukan untuk koreksi terhadap kemungkinan adanya kontaminasi asam nukleat supaya hasilnya lebih teliti. (Fatchiyah *et. al.*, 2011).

#### 2.2.4 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

RNA total yang diperoleh dari tahap isolasi selanjutnya akan ditranskripsikan menjadi DNA komplemen (cDNA). Proses ini dilakukan dengan menggunakan metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Terdapat dua tahapan dalam metode RT-PCR ini, yaitu sintesis cDNA dan amplifikasi dengan teknik PCR.

Prosedur PCR dilakukan sesuai dengan Maxime PCR PreMix Kit. Tahapan-tahapan RT-PCR sesuai protokol kit yang pertama yaitu memasukkan 1 µl sampel cDNA ke dalam PCR tube 1,5 ml. Selanjutnya menambahkan primer 1 yaitu *initiated primer* (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3') sebanyak 1 µl, dan menambahkan *adapter primer* (5'-CTCGTTGCTGGCTTTGATG-3') sebanyak 1 µl. Berikutnya menambahkan *free water* sebanyak 17 µl, sehingga total volume sampel sebesar 20 µl. Kemudian memasukkan PCR tube ke dalam mesin PCR.

Setelah rangkaian tahapan PCR selesai, mengeluarkan PCR tube dalam mesin. Selanjutnya, menambahkan hasil PCR dengan 1 µl primer 2 yaitu *nested primer* (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3').

Memasukkan PCR tube ke dalam mesin PCR kembali untuk dilakukan *nested* PCR. Mengoperasikan mesin PCR seperti proses

PCR yang pertama. Jika mesin PCR telah berhenti beroperasi, mengeluarkan sampel dan dapat dilakukan *running* elektroforesis. Sampel juga dapat disimpan dalam *freezer* jika tidak langsung dilakukan *running* elektroforesis.

#### 2.2.5 Pemotongan Produk RT-PCR dengan Enzim Restriksi

Setelah amplifikasi fragmen DNA target berhasil selanjutnya memotong hasil amplifikasi menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Pemotongan DNA dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dilakukan sesuai dengan petunjuk yang disarankan oleh pihak yang memproduksi enzim tersebut. Mencampur campuran dari keseluruhan ini menggunakan vortex kemudian di sentrifuge, lalu diinkubasi di dalam suhu 37°C selama 4 jam. Volume total 50 µl terdiri dari 40,75 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl RE 10X buffer, 0,5 µl Acetylated BSA 10 µg/ µl, 2,5 µl DNA 1 µg/ µl, 1,25 µl enzim restriksi *EcoRI* 10U/µl.

#### 2.2.6 Elektroforesis Gel Agarosa

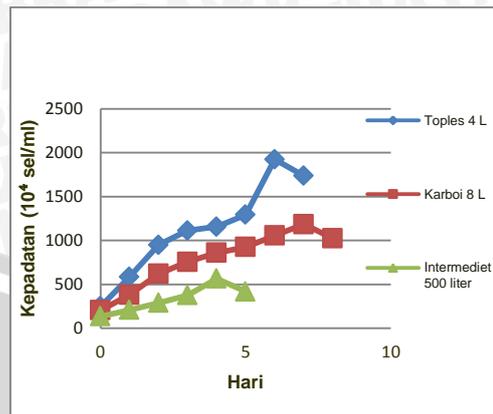
Elektroforesis dilakukan menggunakan buffer TAE 1X, campuran *loading dye* sebanyak 2 µl dengan 4 µl sampel RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) *Dunaliella salina* menggunakan micropipet kemudian memasukkan ke dalam sumur gel dengan hati-hati. Elektroforesis dijalankan pada 100 volt selama 30 menit. Pada saat melakukan proses elektroforesis gunakan masker dan sarung tangan agar terhindar dari kontaminasi yang menyebabkan rusaknya sampel. Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan *ethidium bromida* selama 15-20 menit. Kemudian menghidupkan UV transiluminator dan computer tunggu 10 menit, lalu masukkan gel agarosa kedalam alat UV transiluminator. Tekan tombol UV pada alat UV transiluminator, lalu dibuka program *gel doc*

pada desktop computer. Pita-pita DNA yang terbentuk diamati dengan UV-transilluminator dari computer. Untuk keperluan dokumentasi gambar disimpan pada computer untuk dilakukan analisis.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Pertumbuhan Sel *Dunaliella salina*

Fase adaptasi atau fase lag pada *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-1 hingga hari ke-3, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-1 hingga hari ke-3, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-1 hingga hari ke-3. Fase eksponensial *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-4 hingga hari ke-7, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-4 hingga hari ke-8, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-4 hingga hari ke-5. Fase stasioner *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-8, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-9, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-6. Hasil kepadatan sel *Dunaliella salina* bisa dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Sel *Dunaliella salina*

Dapat dikatakan bahwa kepadatan *Dunaliella salina* pada kultur laboratorium lebih tinggi jika dibandingkan dengan kultur intermediet. Selain itu, usia sel *Dunaliella salina* pada kultur laboratorium lebih panjang dibandingkan dengan kultur intermediet. Hal tersebut dapat dilihat pada hari ke-7 pada kultur intermediet *Dunaliella salina* telah mengalami fase kematian sedangkan pada kultur laboratorium belum mengalami fase kematian pada hari ke-6. Sesuai dengan pernyataan Susilowati (2010), yang menyatakan bahwa mikroalga yang dipelihara pada sistem *outdoor* kelimpahan selnya lebih rendah dibandingkan dengan pemeliharaan pada sistem *indoor*. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan pada sistem *indoor* lebih dapat dikendalikan dibandingkan sistem *outdoor*.

#### 3.2 Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air yang digunakan dalam penelitian ini yaitu suhu, pH, dan salinitas. Hasil pengukuran kualitas air pada saat kultur *Dunaliella salina* seperti pada tabel 1 berikut ini.

**Tabel 1.** Hasil pengukuran kualitas air

		Toples	Karboi	Intermediet
		4 L	8 L	500 L
Suhu (°C)	Awal	22	22	24
	Akhir	22	22	26
pH	Awal	8,4	8,3	8,4
	Akhir	8,4	8,6	8,8
Salinitas (ppt)	Awal	36	35	35
	Akhir	36	35	34

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa kondisi kualitas air selama kultur sesuai untuk pertumbuhan mikroalga *Dunaliella salina*. Hal ini sesuai pernyataan Arif (2014), suhu yang optimal untuk pertumbuhan mikroalga *D. salina* adalah berkisar antara 20–40°C. Rata-rata pH untuk kultur sebagian besar spesies mikroalga antara 7-9, dengan optimum rata-rata pH berkisar antara 8,2-8,7 (Lavens dan Sorgelos, 1996). Menurut Tjahjo *et al.*, (2002), spesies *Dunaliella* sp. dapat tumbuh optimal pada salinitas air 30-35 ppt.

### 3.3 Isolasi RNA

Dalam penelitian ini menggunakan RNA purification kit yang terdapat tiga tahap utama dalam ekstraksi RNA, yaitu *lysis* atau pemecahan dinding sel, selanjutnya pengikatan RNA, dan pencucian serta pemurnian RNA. Tahap pertama adalah perusakan dinding sel, dalam perusakan dinding sel harus ditambahkan nitrogen cair untuk mempermudah penggerusan tanpa merusak

RNA tersebut. Menurut Fermentas (2011), larutan *lysis buffer* memiliki kandungan zat guanidine tiosianat yang berperan sebagai garam, dimana garam ini dapat memecahkan sampel sekaligus menonaktifkan RNase. Larutan *lysis buffer* mengandung EDTA yang merupakan zat yang berperan dalam mengikat ion magnesium pada dinding sel sehingga proses pemecahan dinding sel menjadi lebih mudah (Sudjadi, 2008).

Selanjutnya penambahan *wash buffer* ke dalam RB kolom berfungsi untuk menghilangkan sisa kotoran protein yang terikat pada RNA. Setelah tahap pencucian, kemudian ditambahkan Rnase-free water ke dalam matrik kolom yang berfungsi untuk mengelusi RNA sehingga diperoleh isolat murni RNA. Zat kontaminan yang masih tersisa pada membran kolom dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi menggunakan larutan *wash buffer*. Molekul RNA kemudian dielusi dengan menggunakan *nuclease-free water* (Fermentas, 2011). Isolat RNA kemudian diuji dengan nanodrop spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasinya.

### 3.4 Konsentrasi RNA Total

Total RNA hasil dari isolasi kemudian diukur atau diuji kadar 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).

Hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh hasil 25,8 mg/ml dengan nilai kemurnian sebesar 1,33 (A260/A280).

### 3.5 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Dalam metode RT-PCR ini terdapat dua tahapan utama yaitu sintesis cDNA dari RNA total menggunakan primer dan amplifikasi cDNA dengan teknik PCR. Hal ini dilakukan karena isolat RNA tidak dapat digunakan langsung sebagai cetakan dalam proses PCR, sehingga RNA harus ditranskripsikan balik menjadi komplemen cDNA. Molekul cDNA ini yang selanjutnya digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Sehingga proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi RNA disebut sebagai proses RT-PCR.

Terdapat dua faktor yang diuji untuk mengoptimalkan produk RT-PCR yaitu suhu penempelan primer dan jenis primer. Dalam penelitian ini primer yang digunakan adalah primer dari produk IDT (*integrated DNA technology*), yaitu primer P1 (*forward*) (-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-primer P2 (*reverse*) (-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-) dan RNA *adapter*. Penempelan primer (*annealing*) merupakan proses pelekatan primer pada DNA cetakan. Proses tersebut memerlukan suhu yang berkisar pada *melting temperature* ( $T_m$ ).

Dalam penelitian ini suhu penempelan primer (*annealing*) yang optimal yaitu pada suhu 52°C selama 1 menit. Perlakuan suhu penempelan primer (*annealing*)

yang tepat dapat menghasilkan amplifikasi DNA secara optimal, hal ini ditandai dengan hasil visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis yang terlihat jelas. Perlakuan suhu *annealing* yang terlalu tinggi dan terlalu rendah mengakibatkan primer yang digunakan tidak dapat melekat pada tempat yang spesifik sehingga tidak diperoleh hasil amplifikasi DNA target. Hal ini sesuai dengan pernyataan Roux, (2009) yang menyatakan bahwa, untuk menghasilkan karakter yang diinginkan diperlukan optimalisasi PCR, yaitu dengan melakukan optimasi suhu *annealing* DNA dalam proses PCR.

Pada DNA cetakan hasil amplifikasi primer yang tidak terlihat disebabkan beberapa kemungkinan, yaitu tidak terdapat sekuen yang cocok antara primer dengan DNA cetakan yang belum sesuai di dalam reaksi PCR. Selain itu, kualitas dan kuantitas DNA cetakan juga dapat mempengaruhi reaksi PCR. Pada saat melakukan proses PCR sering ditemukan adanya kontaminan yang mengakibatkan penempelan primer dan amplifikasi tidak sesuai yang diinginkan. Hal ini sesuai dengan pendapat Padmalatha et al., (2006) yang menyatakan bahwa, terdapatnya kandungan polifenol dan metabolit sekunder lain, dapat menghambat penempelan primer dan menurunkan kemurnian DNA. Selanjutnya hasil amplifikasi dielektroforesis untuk divisualisasikan.

### 3.6 Elektroforesis Agarosa cDNA

Hasil amplifikasi cDNA yang divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa menunjukkan terbentuknya pita DNA.

Hasil panjang pita dari amplifikasi cDNA yang terbentuk memiliki jumlah basa sekitar 310 bp (*base pair*). Menurut Sauer *et al.* (1988) dalam Pratiwi (2008), menyatakan bahwa kualitas dan kuantitas produk DNA dapat diketahui secara mudah melalui proses elektroforesis. Ketebalan pita DNA yang terbentuk digunakan sebagai parameter untuk menentukan kualitas DNA, pita DNA yang tebal dan spesifik menunjukkan bahwa produk PCR telah diamplifikasi dengan baik. Hal tersebut menunjukkan bahwa amplifikasi cDNA berhasil dilakukan.

### 3.7 Pemotongan Produk RT-PCR menggunakan Enzim *EcoRI*

Hasil pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi *EcoRI* pada *Dunaliella salina*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim *EcoRI* mampu memotong secara spesifik pada ukuran 185 bp (*base pair*) pada hasil Amplifikasi cDNA. Menurut Joung (2000), Enzim *EcoRI* ini memutus/memotong DNA pada bagian urutan basa GAATTC (sekuens pengenalan bagi Enzim *EcoRI* adalah GAATTC). Enzim ini memotong tidak sembarang tempat dengan kata lain memotong secara spesifik. Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat diketahui bahwa hasil visualisasi pita terlihat jelas, berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi *EcoRI* pada mikroalga *Dunaliella salina* telah berhasil dilakukan dalam penelitian ini.

## 4. KESIMPULAN DAN SARAN

### 4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian tentang optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA PCP pada *Dunaliella salina* yang dikultur secara *in vivo* dapat disimpulkan, bahwa pada optimalisasi PCR dihasilkan perlakuan suhu *annealing* yang optimal yaitu pada suhu 52°C dengan menggunakan 3 primer yaitu *initiated primer*, *nested primer* dan *adapter primer*. Dan enzim Restriksi *EcoRI* berhasil memotong secara spesifik pada hasil amplifikasi cDNA PCP mikroalga laut *Dunaliella salina* pada ukuran 185 bp (*base pair*).

### 4.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini adalah adanya penggunaan enzim restriksi lain dalam pemotongan RNA PCP pada mikroalga laut lainnya. Dan juga dapat digunakan sebagai bahan antivirus bagi ikan guna menciptakan kegiatan perikanan yang ramah lingkungan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu dan bapak serta keluarga dan teman-teman. Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi. Terima kasih juga kepada Dr. Uun Yanuhar S.Pi., M.Si dan Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS selaku dosen pembimbing yang telah berperan dalam penelitian ini

### DAFTAR PUSTAKA

Aranda IVR, Dineen S, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM. 2009. Comparison and evaluation of RNA quantification

methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range. *Anal Biochem.* 387(1):122-127. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.003.

Arif, Desilina. 2014. Diktat Teknologi Pakan Ikan Semester TBP. Kementerian Kelautan dan Perikanan : Ambon.

Fatchiyah., Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis.* Jakarta: Erlangga.

Fermentas. 2011. GeneJet RNA purification kit. Fermentas Inc. New York : 17 hlm.

Hirschberg, J. et al., 1997. Pathway in plants and algae. Vol. 69(10), pp.2151–2158.

Joung, J. 2000. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci US.* 13:7382-7387.

Lavens P., P. Sargeloos (eds). 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR. UK: Bios Scientific Publisher.

Padmalatha, K., and M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African J. Biotech.* 5(3):230-234.

Pratiwi, E.B. 2008. Sintesis dan Pengklonan Fragmen Gen tat (Transaktivator) HIV-1 ke Dalam Vektor Ekspresi Prokariot pQE-80L. *Skripsi.* Universitas Indonesia : Depok.

Roux KH. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbour Laboratory Press 4(4): 1-6.

Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kelautan. Kanisius : Yogyakarta.

Susilowati, R. dan Amini, S. 2009. Optimalisasi Media Kultivasi *B. braunii*

Mikroalga Dalam Salinitas yang Berbeda. *Prosiding Seminar Perikanan Indonesia, Yogyakarta.*

Tjahjo W, Lydia dan S. Hanung, (2002), Biologi Fitoplankton, dalam Seri Budidaya Laut no.9. Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Departemen Kelautan dan Perikanan. Lampung.

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