

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

SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh :

FIQIE ZULFIKAR SYA'RONI
NIM. 125080101111029



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016

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

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

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

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



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

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

Oleh :
FIQIE ZULFIKAR SYA'RONI
NIM. 125080101111029

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

Menyetujui,

Dosen Penguji I

(Dr. Asus Maizar S. H., S.Pi, MP)
NIP. 19720529 200302 1 001
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

(Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng, D.Sc)
NIP. 19790331 200501 1 003
Tanggal:

16 AUG 2016

Dosen Pembimbing II

(Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS)
NIP. 19570704 198403 2 001
Tanggal:

16 AUG 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan



(Dr. Ir. 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, Juni 2016

Mahasiswa

Figie Zulfikar Sya'roni
NIM. 125080101111029

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. Dikky Ristian Arifullah |
| 11. Wima Arfatus S. | 23. Nurhikmah Aditya |
| 12. Fiqie Zulfikar Sya'roni | |

Ketua Peneliti,

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

NIP. 19730404 200212 1 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih yang tidak terhingga disampaikan Penulis kepada pihak-pihak diantaranya :

1. Allah SWT. yang telah memberikan rahmat dan ridhonya.
2. Dr. Uun Yanuhar, SPsi., MSi., selaku dosen pembimbing I atas waktu dan bimbingan yang telah diberikan.
3. Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS., selaku dosen pembimbing II atas waktu dan bimbingan yang telah diberikan.
4. Kepala Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo dan seluruh pegawai Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo yang telah memfasilitasi dan memberikan izin kepada Penulis untuk melaksanakan penelitian.
5. Kedua orang tua (Sya'roni dan Sukarmi), adik (Moch. Izza Zulfikar Sya'roni), dan seluruh keluarga atas kasih sayang, motivasi dan doanya selama ini.
6. Teman-teman seperjuangan MSP 2012 yang tak henti memberikan saran dan dukungan atas terselesaikannya Laporan skripsi ini.
7. Tim Alga 2016 yang telah bekerja sama dengan baik selama ini.
8. Anak-anak Tidar Villa Estate blok AJ 08 yang telah memberikan semangat dan juga motivasinya.
9. Tim volkadot yang telah menemani sambil minum kopi sampai terselesaikannya laporan ini.
10. Semua pihak yang telah membantu yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Malang, Juni 2016

Penulis

RINGKASAN

FIQIE ZULFIKAR SYA'RONI. Skripsi mengenai optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA PCP Menggunakan Enzim Restriksi *EcoRI* pada Mikroalga Laut *Dunaliella salina* yang di Kultur Secara *In Vivo*. Dibawah bimbingan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si** dan **Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS**

Dunaliella salina merupakan alga hijau dari *family* Polyblepharidaceae yang bersifat uniseluler, memiliki dua flagellata, bersifat motil, serta tidak mengandung dinding sel (Jayappriyan *et. al.*, 2013). *Dunaliella salina* mempunyai beberapa pigmen salah satunya adalah *Peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang dapat berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. Untuk mendeteksi *peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada mikroalga laut *Dunaliella salina* dapat dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Dalam melakukan metode PCR sering dihasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal sehingga tidak terlihat dalam visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian mengenai optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) menggunakan enzim restriksi *EcoRI* pada *Dunaliella salina* untuk mengetahui pengaruh penggunaan enzim restriksi *EcoRI* dalam mengoptimalkan PCR sehingga dapat menghasilkan pemotongan DNA PCP yang spesifik pada mikroalga laut *Dunaliella salina*.

Pada penelitian ini menggunakan metode deskriptif eksploratif, dalam hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan enzim restriksi *EcoRI* dalam mengoptimalkan *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada mikroalga laut *Dunaliella salina*. Langkah awal dalam penelitian yaitu mengkultur mikroalga laut *Dunaliella salina* secara *In vivo* dalam skala laboratorium. Setelah itu dilakukan isolasi RNA *Dunaliella salina* yang bertujuan untuk memisahkan molekul RNA dari molekul-molekul lain yang tidak diinginkan. Hasil isolasi RNA diukur konsentrasinya menggunakan *Nanodrop Spektrofotometri*. Setelah itu dilakukan proses amplifikasi DNA menggunakan PCR. Selanjutnya hasil amplifikasi DNA dielektroforesis untuk mengetahui panjang pasangan basa (*base pair*). Setelah diketahui panjang pasangan basa, maka hasil dari amplifikasi DNA dipotong menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, lalu di elektroforesis kembali menggunakan gel agarosa untuk mengetahui hasil potongan dari RNA PCP *Dunaliella salina* menggunakan enzim restriksi *EcoRI*.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan penggunaan enzim restriksi *EcoRI* menghasilkan pemotongan DNA spesifik pada 185 bp (*base pair*), sehingga hasil visualisasi dari RNA PCP pita terlihat jelas. Dalam penelitian ini optimalisasi PCR dilakukan dengan perlakuan suhu annealing yang tepat dan pemilihan primer PCP yang tepat. 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. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan enzim restriksi *EcoRI* berpengaruh dalam mengoptimalkan *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada mikroalga laut *Dunaliella salina*.

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 **Optimalisasi Polymerase Chain Reaction (PCR) RNA (PCP) Menggunakan Enzim Restriksi EcoRI pada Mikroalga Laut *Dunaliella salina* yang di Kultur Secara *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.

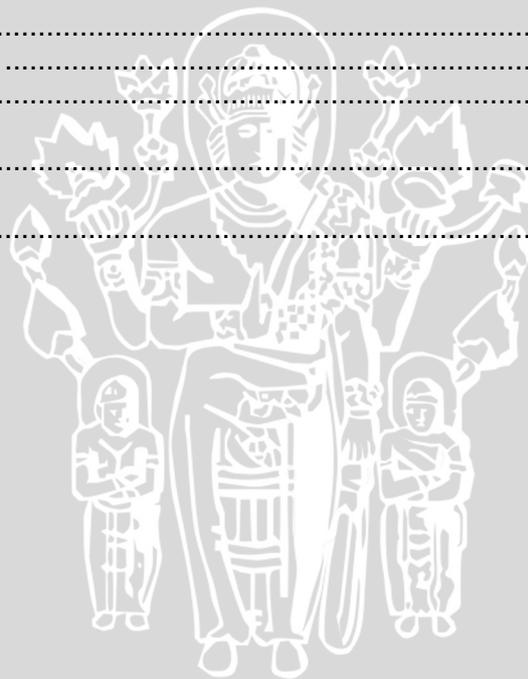
Malang, 5 Agustus 2016

Fiqie Zulfikar Sya'roni

DAFTAR ISI

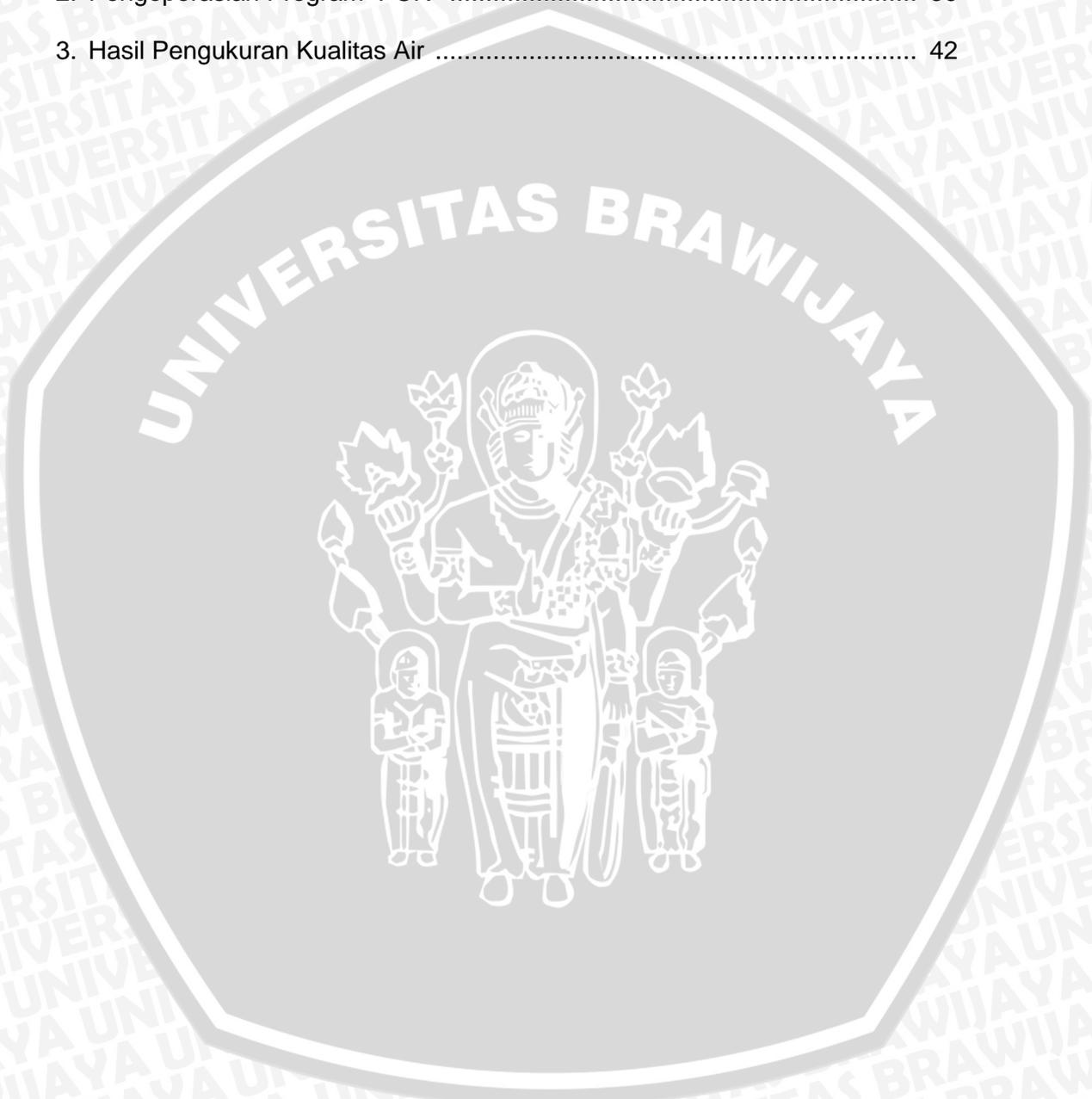
	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mikroalga	6
2.2 <i>Dunaliella salina</i>	7
2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi <i>Dunaliella salina</i>	7
2.2.2 Bagian Sel <i>Dunaliella salina</i>	8
2.2.3 Reproduksi <i>Dunaliella salina</i>	10
2.2.4 Kandungan dan Manfaat <i>Dunaliella salina</i>	11
2.2.5 Fase Pertumbuhan <i>Dunaliella salina</i>	12
2.2.6 Ekologi <i>Dunaliella salina</i>	13
2.2.7 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan	14
2.3 <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> (PCP)	16
2.4 Isolasi RNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>	17
2.5 <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	18
2.6 Komponen-komponen PCR	19
2.6.1 DNA Cetakan atau DNA Target	19
2.6.2 Primer	19
2.7 Enzim Restriksi Endonuklease	22
2.7.1 Enzim Restriksi Endonuklease <i>EcoRI</i>	23
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	24
3.1 Materi Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan	25
3.3 Metode Penelitian	25
3.4 Sumber Data	26
3.4.1 Data Primer	26
3.4.2 Data Sekunder	27
3.5 Prosedur Penelitian	27
3.5.1 Kultur <i>Dunaliella salina</i>	30
3.5.2 Pemanenan <i>Dunaliella salina</i>	31
3.5.3 Perhitungan Kepadatan Sel	31

3.5.4 Pengukuran Kualitas Air	32
3.5.5 Isolasi RNA <i>Dunaliella salina</i>	33
3.5.6 Pengukuran Kadar Protein dengan Nanodrop dan Spektrofometri ..	35
3.5.7 Proses <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>	35
3.5.8 Pemotongan Produk RT-PCR dengan Enzim Restriksi	37
3.5.9 Elektroforesis Gel Agarosa	37
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Pertumbuhan Sel <i>Dunaliella salina</i>	39
4.2 Pengukuran Kualitas Air	41
4.2.1 Suhu	42
4.2.2 pH	43
4.2.3 Salinitas	43
4.3 Isolasi RNA	44
4.4 Kandungan Protein dan RNA Total	45
4.5 <i>Reverse Transcription PCR</i> (RT-PCR)	46
4.6 Elektroforesis Gel Agarosa	48
4.7 Pemotongan Produk RT-PCR menggunakan Enzim <i>EcoRI</i>	49
5. PENUTUP	52
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	58



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Pupuk <i>Walne</i>	27
2. Pengoperasian Program PCR	36
3. Hasil Pengukuran Kualitas Air	42



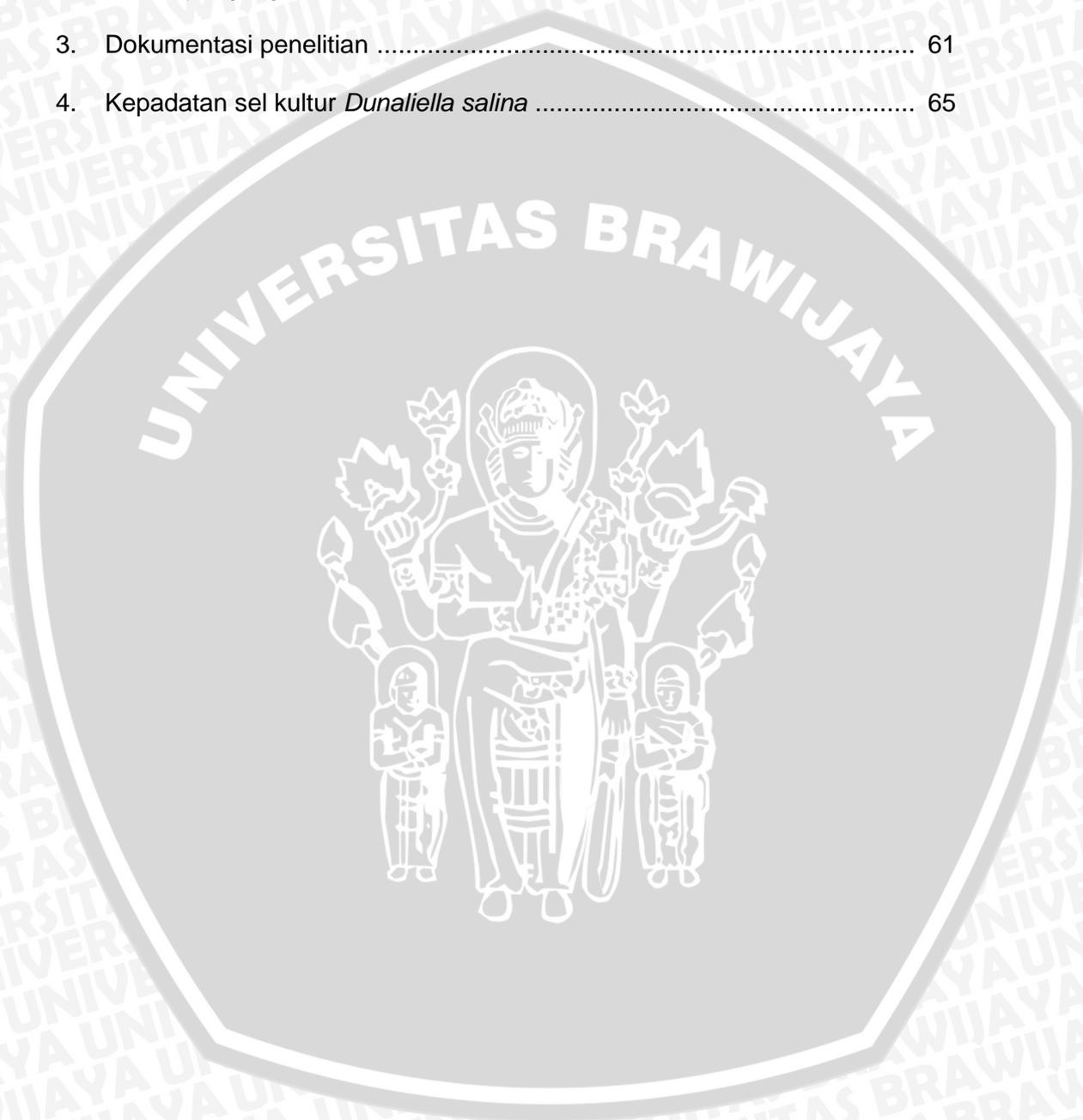
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Dunaliella salina</i>	7
2. Organel Sel <i>Dunaliella salina</i>	9
3. Pigmen PCP	17
4. Mekanisme pemotongan DNA oleh enzim restriksi	22
5. Kurva Pertumbuhan Sel <i>Dunaliella salina</i>	39
6. Hasil konsentrasi Total RNA	45
7. Perhitungan <i>Melting Temperature</i> (T_m)	47
8. Visualisasi Amplifikasi cDNA	49
9. Hasil Pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi <i>EcoRI</i>	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat yang digunakan dalam penelitian	58
2. Bahan yang digunakan dalam penelitian	60
3. Dokumentasi penelitian	61
4. Kepadatan sel kultur <i>Dunaliella salina</i>	65



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga sebagai salah satu komoditi hasil perairan dewasa ini telah menjadi alternatif untuk dikembangkan karena memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan. Mikroalga merupakan mikroorganisme atau jasad renik dengan tingkat organisasi sel termasuk dalam tumbuhan tingkat rendah. Mikroalga dikelompokkan dalam filum Thallophyta karena tidak memiliki akar, batang dan daun sejati, namun memiliki zat pigmen klorofil yang mampu melakukan fotosintesis (Kabinawa, 2001). Selain itu, air dan karbon dioksida dengan adanya energy surya dari matahari dan garam hara dapat menghasilkan senyawa organik seperti karbohidrat. Karena kemampuannya membentuk zat organik dari zat anorganik, maka disebut produsen primer (Nontji, 1993).

Seiring perkembangan bioteknologi mikroalga, sejumlah penelitian mulai ditujukan untuk menghasilkan produk bermanfaat yang bernilai tinggi diantaranya sebagai sumber bahan kimia yang dapat menghasilkan produk seperti gliserol, vitamin, protein, pigmen, enzim, dan bahan-bahan bioaktif lain. Bahan-bahan bioaktif yang telah diketahui dapat dihasilkan dari mikroalga yaitu antioksidan, toksin, bahan obat-obatan, dan zat pengatur pertumbuhan (Kabinawa, 1994).

Aplikasi bioteknologi sumberdaya perairan berperan dalam mengetahui sekaligus menghasilkan bahan aktif termasuk antimikroba sehingga diperoleh bahan aktif yang dapat dimanfaatkan untuk manusia dan lingkungan. Spesies biota laut yang memiliki potensi menghasilkan obat-obatan diperkirakan lebih dari 35.000 dan yang dimanfaatkan baru sekitar 5000 spesies (Dahuri, 2003). Penelitian tentang aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga masih sedikit (Chang *et al*, 1993).

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.

Ribosa Nucleid Acid atau yang disebut RNA merupakan DNA single strand atau single helix (pita tunggal). DNA single strand adalah hasil dari penyalinan DNA. Secara struktural RNA sama dengan DNA, yang membedakan adalah RNA berpita tunggal, gula yang dimiliki adalah ribosa dan tidak memiliki basa Timin. Panjang RNA tidak disebut dalam satuan bp karena biasanya tidak

berpasangan dan terdiri dari utas tunggal (bp = *base pair*, pasangan basa). Dalam biologi molekuler, dua nukleotida dalam RNA atau DNA yang saling komplementer yang terhubung oleh ikatan hidrogen disebut pasangan basa (base pair sering disingkat bp). Pasangan basa (*base pair*) ini yang nantinya akan membentuk DNA (termasuk di dalamnya adalah gen yang merupakan bagian dari DNA) dan kromosom, yang akan membentuk sel dimana sel ini merupakan bagian dari makhluk hidup.

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). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) digunakan dalam penelitian ini untuk mendeteksi PCP pada mikroalga laut *Dunaliella salina* dan juga untuk amplifikasi cDNA.

1.2 Rumusan Masalah

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang memiliki kemampuan untuk menggunakan sinar matahari dan karbondioksida dan sebagai produsen primer di perairan karena mampu berfotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Dalam penelitian ini menggunakan mikroalga laut *Dunaliella salina*, dimana mikroalga jenis ini memiliki salah satu

pigmen di dalam mikroalga yang berperan dalam proses fotosintesis yaitu *peridinin chlorophyll protein* (PCP). PCP merupakan pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis.

Untuk mendeteksi PCP pada mikroalga laut *Dunaliella salina* dapat dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Dalam melakukan metode PCR sering dihasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal sehingga tidak terlihat dalam visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis. Berdasarkan hal tersebut maka diperoleh rumusan masalah, yaitu bagaimana pengaruh penggunaan enzim restriksi *EcoRI* terhadap hasil optimalisasi PCR *polymerase chain reaction* untuk menghasilkan pemotongan RNA PCP yang spesifik pada mikroalga laut *Dunaliella salina*.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya, tujuan penelitian ini yaitu untuk menganalisis proses PCR *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam rangka eksplorasi RNA PCP pada Mikroalga Laut *Dunaliella salina* menggunakan enzim restriksi *EcoRI*.

1.4 Kegunaan Penelitian

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

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya,

Laboratorium Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, dan Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Mei 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan mikroorganisme atau jasad renik dengan tingkat organisasi sel termasuk dalam tumbuhan tingkat rendah. Mikroalga dikelompokkan dalam filum Thallophyta karena tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati, namun memiliki zat pigmen klorofil yang mampu melakukan fotosintesis. Mikroalga memiliki klorofil sehingga mampu melakukan fotosintesis dengan bantuan air, CO_2 , dan sinar matahari, serta menggunakan bahan anorganik seperti NO_3^- , NH_4^- , dan PO_4^- , sehingga menghasilkan energi kimiawi dalam bentuk biomassa seperti karbohidrat, lemak, protein, dan lain-lain. Kemudian energi tersebut digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan penambahan sel, bergerak dan berpindah serta reproduksi (Kanibawa, 2001).

Menurut Harwati (2012), mikroalga dapat ditemukan di air laut, air payau, dan air tawar. Diperkirakan terdapat sekitar 36000 hingga 1 juta spesies mikroalga. Mikroalga dikelompokkan ke dalam enam sepuluh kelompok berdasarkan warnanya, yaitu Cyanobacteria (alga hijau kebiruan), Chlorophyta (alga hijau), Rhodophyta (alga merah), Glaucophyta, Euglenophyta, Haptophyta, Cryptophyta, fotosintetik Straminophiles, Dinophyta, dan Chlorarachniophyta.

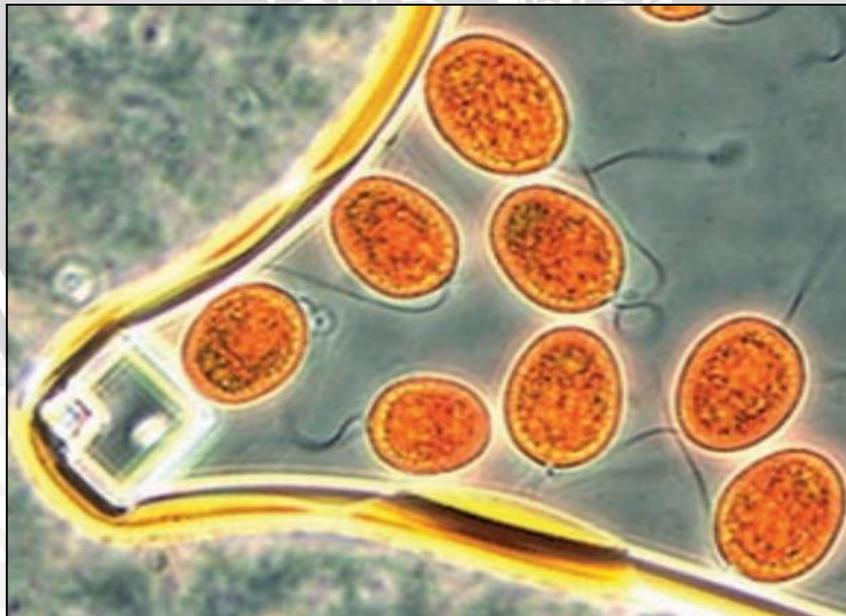
Mikroalga mengandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormone, vitamin, mineral, dan juga senyawa bioaktif. Potensi mikroalga sangat besar sebagai sumber berbagai produk, diantaranya sebagai sumber protein yang dapat diperoleh dari *Chlorella* dan *Dunaliella*, produksi pigmen, sebagai bahan pewarna dari *Spirulina*, *Haematococcus* (Borowitzka dan Borowitzka, 1988). Sebagai pakan larva ikan dan non ikan, diperoleh dari *Tetraselmis* dan *Chaetoceros* (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Serta produksi antimikroba, dihasilkan *Chlorella vulgaris*, *Chaetocheros gracilis*.

2.2 *Dunaliella salina*

Dunaliella salina merupakan organisme eukariotik uniseluler yang dapat hidup di habitat *hypersaline*. Kandungan kimia alga ini cukup tinggi yang terdiri dari protein, karbohidrat dan lemak. Hingga saat ini pemanfaatan *D. salina* pada berbagai bidang terus dikembangkan.

2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi *Dunaliella salina*

Secara morfologi, *Dunaliella salina* merupakan mikroalga yang bersifat uniseluler, mempunyai sepasang flagella yang sama panjangnya, sebuah kloroplas berbentuk cangkir, dan tidak memiliki dinding sel (Borowitzka dan Borowitzka, 1988). *Dunaliella* juga sering disebut flagellata uniseluler hijau (*green unicellulair flagellata*). Bentuk selnya juga tidak stabil dan seragam, dapat berbentuk lonjong, bulat silindris, ellip, dan lain-lain. Hal ini sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, pertumbuhan, dan intensitas sinar matahari (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Gambar morfologi *Dunaliella salina* ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. *Dunaliella salina* (InterClinical Laboratories, 2010)

Menurut Borowitzka (2013), bentuk sel *D. salina* oval hampir bulat, dengan flagella panjang di bagian anterior, biasanya berbentuk simetris radial, tapi pada saat berada di bawah kondisi ekstrim (pada suhu rendah) dapat berubah bentuk menjadi bilateral, dorsiventral atau asimetral. Ukuran panjang sel berkisar antara 5-29 μm (rata-rata 10.9–16.9 μm) dan ketebalan sekitar 3.8-20.3 μm dengan rata-rata ketebalan 7.9–13.2 μm . Sel-selnya memiliki satu kloroplas berbentuk cawan dengan pirenoid yang berbeda, dan dapat berubah warna dari hijau menjadi merah, tergantung pada kandungan karotenoidnya. Terdapat sebuah kloroplas besar yang mengisi sebagian besar volume *Dunaliella* sp.. bentuknya seperti cangkir atau berbentuk seperti lonceng dan berisikan pirenoid.

Klasifikasi *Dunaliella salina* menurut Bold dan Wynne (1985), adalah sebagai berikut.

Phylum	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Volvocales
Famili	: Polyblepharidaceae
Genus	: <i>Dunaliella</i>
Spesies	: <i>Dunaliella salina</i>

2.2.2 Bagian Sel *Dunaliella salina*

Sel *Dunaliella salina* terdiri dari bagian-bagian (organel) sel yang mempunyai fungsi dan bentuk tertentu. Menurut Ginzburg (1988), organel sel pada *Dunaliella* adalah sebagai berikut :

a. Kloroplas

Pada *Dunaliella salina* kloroplas terdiri atas tilakoid yang berbentuk seperti *disc* panjang atau pendek yang memutar ke segala arah. Terkadang kloroplas tersebut bergabung membentuk liku-liku atau berputar seperti benang.

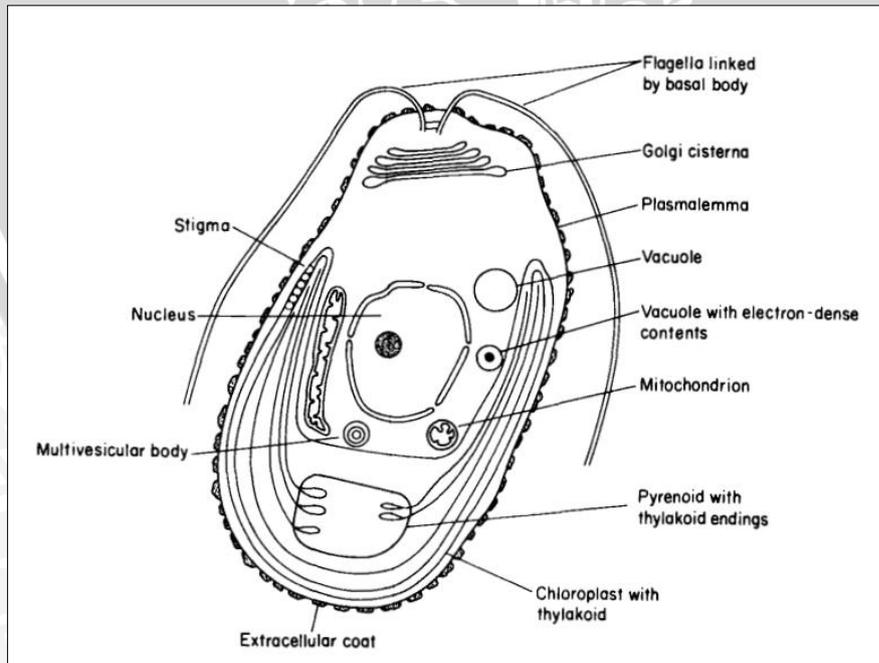
Pirenoid dikelilingi oleh pasangan tilakoid yang mengarah ke pusat sel dan terdapat pula butiran-butiran zat tepung yang mengelilingi pirenoid tersebut.

b. Nukleus

Nukleus atau inti sel menempati sebagian besar anterior sel mikroalga. Nukleus bisa tertutup atau tidak tertutup oleh kloroplas, serta terdiri atas nukleolus dan untaian kromatin. Membran yang mengelilingi nukleus ganda dengan jarak yang tidak teratur antara dua lapisan, dan terdapat pori-pori besar yang melintasi kedua lapisan.

c. Eyespot

Eyespot terdiri atas dua atau satu baris globula lemak dan terletak di ujung anterior kloroplas. Akan tetapi susunan lemak bentuk pada eyespot tidak teratur, begitupula ukurannya juga tidak teratur. Akumulasi lemak pada eyespot dipengaruhi oleh faktor usia mikroalga, dimana jumlah akumulasi akan berlipat pada fase log dan stasioner. Bagian-bagian sel *Dunaliella salina* disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Organel Sel *Dunaliella salina* (Ginzburg, 1988)

d. Vakuola

Semua sel mengandung vakuola, terutama sel pada kultur stasioner. Isi dari vakuola bermacam-macam, ada bentuk kristal yang kemungkinan polifosfat atau kromatin. Namun ada pula beberapa vakuola yang tidak mengandung isi.

e. Badan Golgi

Badan golgi terdiri dari 2-4 diktyosom yang terletak antara nukleus dan titik pangkal flagella. Permukaan dari membrane sisternal mengandung banyak partikel yang berbeda ukurannya. Gelembung kecil muncul sebagai pemutus ujung dictyosom dan tautan terakhir dengan endoplasma.

f. Flagella

Struktur flagella biasanya terdiri dari 9 mikrotubulus perifer dan 2 pusat. Pada *Dunaliella salina*, dua flagella turun ke dalam sel dan masing-masing flagel berhenti di basal tubuh. Kedua basal terhubung satu sama lain dengan satu distal dan dua serat proksimal.

2.2.3 Reproduksi *Dunaliella salina*

Dunaliella salina bereproduksi dengan dua cara, yaitu seksual dan aseksual, reproduksi seksual terjadi dengan cara menghasilkan isogamet dan zigospora (Borowiztka, 2013). Menurut Arif (2014), reproduksi aseksual *D. salina* terjadi dengan cara pembelahan. Pada saat kondisi tertentu, alga ini mengalami perkembangan hingga tahap palmella yang terbungkus sebuah lapisan lendir tipis, atau bisa juga membentuk sebuah aglanospora dengan dinding kasar yang tipis. Reproduksi seksual terjadi dengan cara melakukan isogami melalui proses konjugasi. Nukleus zigot akan membelah secara meiosis. Pembelahan ini terjadi pada saat zigot berwarna hijau atau merah dan dikelilingi oleh dinding sporollenin yang halus dan sangat tipis. Tahap pembelahan terjadi setelah tahap istirahat. Hasil dari tahap pembelahan ini yaitu terbentuknya sel dengan jumlah lebih dari 32 sel yang dibebaskan melalui retakan atau celah pada dinding sel induk.

2.2.4 Kandungan dan Manfaat *Dunaliella salina*

Menurut Harwati (2013), *Dunaliella salina* mengandung 57% protein, 32% karbohidrat, dan 6% lemak dari berat keringnya. InterClinical Laboratories (2010) menyebutkan bahwa di alam *Dunaliella salina* menyumbangkan keseimbangan vitamin, mineral, dan nutrisi. Dia sangat berpotensi sebagai sumber alami antioksidan, karotenoid, vitamin, mineral, asam amino polisakarida, asam lemak esensial, klorofil, dan fitonutrien. Kandungan *D. salina* dijelaskan lebih rinci sebagai berikut.

a. Karotenoid

Terdapat sekitar 600 kelompok karotenoid yang ada di alam dan lebih dari 400 karotenoid ditemukan pada *D. salina*. Mikroalga ini kaya akan antioksidan karotenoid, diantaranya β -karoten, α -karoten, zeaxanthin, cryptoxanthin, lutein, dan astaxanthin. Karotenoid sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia, yaitu dapat melindungi dan memperbaiki kerusakan sel yang berpengaruh terhadap penuaan dini, penyakit jantung, kanker dan penyakit kronis lainnya. Selain itu karotenoid juga bermanfaat sebagai antimutagen dan antioksidan serta penting dalam respon imun, melindungi kulit dari radiasi sinar UV, kontrol pertumbuhan dan komunikasi intraseluler (InterClinical Laboratories 2010; El-Baky et. al., 2007).

b. Mineral

Dunaliella salina juga kaya akan mineral termasuk magnesium, potassium, besi, zink, boron, selenium dan litium. Diantara kandungan tersebut, magnesium merupakan kandungan mineral tertinggi pada alga ini. Mineral dibutuhkan saat proses biokimia, termasuk fungsi enzim, aliran syaraf, kontraksi otot, keseimbangan asam-basa, dan mendukung pembentukan tulang, gigi dan darah.

c. Vitamin

Dunaliella salina mengandung beberapa vitamin, diantaranya vitamin E, kelompok vitamin B, B1, B3, B5, B6, B12, asam folat dan provitamin A.

d. Asam Amino

Asam amino merupakan senyawa pembentuk protein. *Dunaliella salina* merupakan mikroalga sumber protein lengkap yang terdiri dari asam amino esensial. Asam amino merupakan dasar pembentukan kehidupan, dibutuhkan untuk sintesis otot dan kulit, menghubungkan jaringan, hormone, enzim dan saraf.

e. Polisakarida

Polisakarida merupakan karbohidrat kompleks dengan fungsi biologi penting. Peran utama polisakarida yaitu sebagai antivirus, antitumor, dan anti rangsang yang disediakan dalam *D. salina*.

f. Klorofil

Dunaliella salina mengandung sejumlah besar klorofil, yang bermanfaat sebagai pembangun darah dan antibiotik alami yang mampu mengeluarkan logam berat dan racun dari dalam tubuh. Perbedaan utama antara hemoglobin dan klorofil adalah atom metalik pada pusat tiap molekul, molekul klorofil memiliki magnesium sementara hemoglobin memiliki besi. Klorofilin merupakan bahan aktif dalam klorofil berperan sebagai antioksidan, antitumor dan antimutagen.

2.2.5 Fase Pertumbuhan

Menurut Hadi (2012), pertumbuhan mikroalga dalam medium ditunjukkan dengan bertambahnya jumlah sel mikroalga. Pertumbuhan *Dunaliella salina* terdiri dari empat fase pertumbuhan, yaitu sebagai berikut.

a. Fase lag

Fase lag merupakan fase awal pertumbuhan mikroalga, dimana laju pertumbuhan spesifik berada pada sub-maksimum. Pada fase ini terjadi

penyesuaian terhadap lingkungan karena terjadinya perubahan konsentrasi nutrisi dari inokulum sehingga menjadi kultur yang lebih besar.

b. Fase Logaritmik atau Eksponensial

Yaitu periode dimana sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan dan mulai untuk tumbuh dan berkembang mengikuti deret eksponensial atau logaritmik selama masih terdapat nutrisi dan faktor-faktor lain yang menunjang pertumbuhan.

c. Fase Stasioner

Pada fase ini, pembelahan sel mulai berkurang dimana ketersediaan nutrisi sudah mulai berkurang, dan kondisi lingkungan sudah tidak optimal. Pada periode ini terjadi akumulasi zat-zat metabolit sekunder seperti polisakarida, lipid, dan zat bioaktif lainnya.

d. Fase Kematian

Fase ini merupakan periode dimana jumlah sel menurun secara drastis dikarenakan habisnya nutrisi, munculnya kontaminan, dan lingkungan yang sudah tidak mendukung.

2.2.6 Ekologi *Dunaliella salina*

Menurut Borowitzka (1994), *Dunaliella salina* merupakan organisme eukariotik yang sangat toleran terhadap kondisi lingkungannya. Pada lingkungan dengan pH 11 dia masih dapat hidup, namun tumbuh optimal pada pH 9. Tumbuh optimal pada suhu antara 20°C hingga 40°C. *D. salina* dapat mentolerir suhu rendah yang ekstrim, namun pada suhu lebih dari 40°C merupakan suhu lethal.

Dunaliella salina adalah organisme yang bersifat halopilik, yaitu organisme yang menyukai lingkungan dengan salinitas yang tinggi. Kemampuannya mentolerir salinitas sangat tinggi, dia dapat tumbuh baik pada salinitas normal namun masih dapat bertahan lagi hingga pada kondisi NaCl

jenuh, yaitu sekitar 31%. *Dunaliella salina* dapat tumbuh secara optimum pada lingkungan dengan kisaran salinitas antara 18-22 % NaCl, namun agar dapat menghasilkan karotenoid secara optimal membutuhkan media dengan salinitas lebih besar dari 27% NaCl. Selain bersifat bersifat halopilik alga ini juga bersifat eurythermal, yaitu toleran terhadap kisaran suhu yang lebar. *D. salina* dapat bertahan pada suhu rendah hingga di bawah titik beku dan baru bersifat mematikan apabila suhu di atas 40°C. *Dunaliella salina* ini dapat tumbuh optimal pada kisaran suhu 20-40°C (Arif, 2014).

2.2.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan *Dunaliella salina*

Menurut Bold dan Wynne (1985), pertumbuhan *Dunaliella salina* pada saat kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor yang terdiri dari unsur hara atau nutrien, suhu, salinitas, pH dan cahaya.

a. Cahaya

Di alam cahaya yang digunakan berasal dari cahaya matahari, sementara dalam kultur cahaya dapat digantikan dengan lampu TL. Cahaya yang digunakan sebagai sumber energi untuk fotosintesis haruslah cukup. Pada saat kultur, cahaya lampu TL yang digunakan yaitu dengan intensitas sekitar 5.000 – 10.000 lux (Arif, 2014).

b. Suhu

Menurut Kabinawa (2008), pertumbuhan mikroalga akan mencapai pertumbuhan optimum pada suhu air 23 – 25°C. Suhu di atas 36°C dapat menyebabkan kematian pada jenis mikroalga tertentu, sedangkan suhu kurang dari 16°C dapat menyebabkan pertumbuhan mikroalga menurun.

c. pH

Nilai pH menggambarkan minus logaritma ion hidrogen yang terlepas dalam suatu cairan. pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik (Kordi dan Tancung, 2005). Secara umum

kisaran pH yang optimum pada kultur mikroalga adalah antara 7–9 (Harwati, 2013). 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).

d. Salinitas

Salinitas menunjukkan kadar garam yang terlarut dalam satu kilogram air laut. Salah satu karakteristik dari *Dunaliella salina* adalah bersifat halopilik, yaitu organisme yang menyukai lingkungan dengan salinitas yang tinggi. Kemampuannya mentolerir salinitas sangat tinggi, dia dapat tumbuh baik pada salinitas normal namun masih dapat bertahan lagi hingga pada kondisi NaCl jenuh, yaitu sekitar 31%. Pada umumnya fitoplankton air laut akan tumbuh optimal dengan salinitas diantara 25-40 ppt (Rusyani, 2001).

e. Unsur Hara

Dunaliella salina dapat tumbuh optimal jika kebutuhan nutrisinya terpenuhi. Apabila asupan nutrisi dari medium tidak cukup, maka laju pertumbuhannya akan lambat. Medium merupakan tempat hidup *D. salina* selama proses kultivasi. Untuk pertumbuhannya, *D. salina* membutuhkan unsur hara mikro dan makro. Unsur hara mikro merupakan unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit, namun keberadaannya harus tetap ada. Unsur hara makro merupakan unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah banyak. Contoh unsur hara makro adalah N, P, K, Na, S dan Ca. Sementara unsur hara mikro contohnya adalah Fe, Cu, Zn, Mn, dan Mo (Andersen, 2005).

Menurut Harwati (2013), setiap unsur hara memiliki fungsi khusus terhadap pertumbuhan dan kepadatan sel. Unsur hara N dan P merupakan unsur utama yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan *D. salina*. Nitrogen diperlukan mikroalga untuk mensintesis asam amino, nukleotida, klorofil, dan phycobilins. Nitrogen didapatkan dari nitrat, ammonia, dan urea. Alga dapat

dapat memanfaatkan nitrat dan ammonium dari kolom air. Nitrogen yang dimanfaatkan alga adalah dalam bentuk nitrat. Fosfor merupakan nutrient esensial yang sangat penting untuk proses metabolisme mikroalga (ATP, DNA, dan RNA). Fosfor ditemukan dalam bentuk H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} .

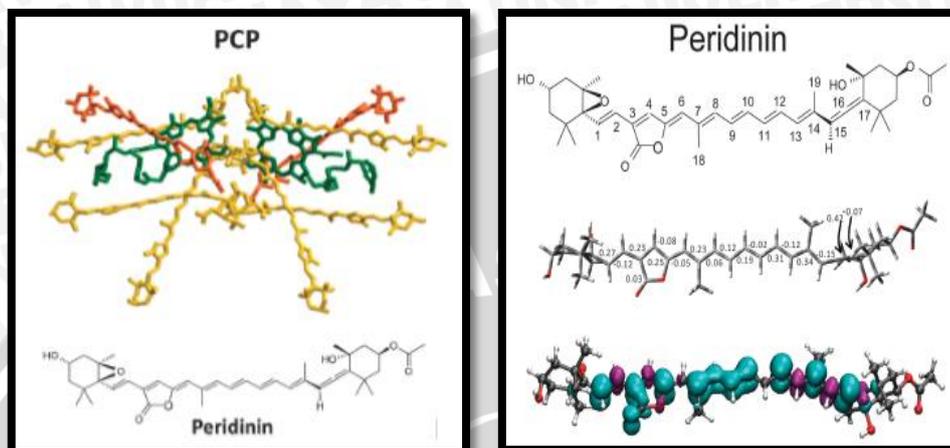
2.3 *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)*

Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) merupakan pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. PCP ini mampu menyerap energi matahari pada panjang gelombang 470-550 nm (warna hijau-biru). Terdapat dua bentuk PCP, yaitu modimer (bentuk pendek) dan monomer (bentuk panjang). Bentuk modimer memiliki masa molekul sekitar 14-16 kDa, sedangkan bentuk monomer memiliki masa molekul sekitar 30-35 kDa. Tetapi pada sebagian jenis alga hanya memiliki satu bentuk pirenoid saja. (Weis *et. al.*, 2002). PCP berbeda dengan kompleks pemanen cahaya lain yang berbasis karotenoid, dan pigmen utamanya adalah peridinin. Struktur kristal PCP menunjukkan kontak erat antar kelompok pigmen. Unit pigmen terkecil PCP terdiri atas empat molekul peridinin yang mengelilingi pusat sebuah klorofil a. (Krueger *et. al.*, 2001).

PCP berada di dalam pirenoid (*peridinin cell pigment*). Pirenoid sendiri terletak pada bagian belakang kloroplas yang menebal. Pada saat intensitas cahaya rendah, peridinin tampak longgar dan berbeda, terdapat banyak gelembung-gelembung lemak kecil yang tersebar di seluruh kloroplas. Sementara pada saat intensitas cahaya tinggi, peridinin terlihat besar (Ginzburg, 1988).

Pada organisme eukariotik, peridinin mempunyai peran yang sangat penting pada saat proses fotosintesis. Selain itu peridinin juga terlibat pada proses transfer energi. Peran peridinin yang sangat penting yaitu sebagai zat antioksidan yang melindungi sel dari bahaya radikal bebas. Selain itu, peridinin

juga dapat berperan dalam mengurangi resiko kanker jika dikonsumsi dalam bentuk karotenoid (Hirschberg et al. 1997). Pigmen PCP dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Pigmen PCP (Salvadori, et.al 2012)

2.4 Isolasi RNA *Peridinin Chlorophyl Protein (PCP)*

RNA merupakan polimer yang disebut polinukleotida, dimana setiap polinukleotida yang tersusun atas monomer-monomer nukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas tiga bagian, yaitu gugus fosfat, basa nitrogen dan gula pentose. Basa nitrogen RNA terdiri dari adenin, guanin, sitosin dan urasil. Urutan basa-basa nitrogen tersebut dapat mengkode informasi genetik (Campbell et al., 2010 dalam Annisa, 2012).

Asam ribonukleat (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. Terdapat berbagai wujud atau tipe RNA yang tersebar di alam. 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).

Menurut Dale dan Schantz (2001), isolasi merupakan suatu prosedur yang berfungsi untuk memisahkan suatu bagian dari bagian lain dengan tujuan tertentu (Singleton dan Sainsbury, 2006). Isolasi RNA digunakan untuk memisahkan RNA dari zat-zat lain sehingga diperoleh RNA murni. Secara umum terdapat tiga syarat dalam melakukan isolasi RNA, yaitu lisis membrane sel untuk menampakkan RNA, pemisahan RNA dari zat dan molekul lainnya, seperti DNA, lipid, protein dan karbohidrat, dan terakhir pemulihan RNA dalam bentuk murni.

2.5 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

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

Menurut Yuwono (2006), enzim yang digunakan dalam proses RT PCR yaitu enzim reverse transcriptase dimana hanya enzim jenis ini yang dapat mensintesis DNA dengan cetakan RNA. Enzim ini merupakan enzim DNA *polymerase* yang menggunakan molekul RNA sebagai cetakan untuk

menyintesis molekul DNA (cDNA) yang komplementer dengan molekul RNA tersebut.

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

2.6 Komponen-Komponen PCR

Materi pokok proses dalam PCR merupakan DNA untai ganda hasil isolasi dari suatu organisme, direaksikan dengan enzim DNA *polimerase*, *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), primer (potongan pendek DNA utas tunggal, yang mengawali sintesis DNA), dan $MgCl_2$. Dalam prosesnya PCR membutuhkan komponen-komponen tertentu. Komponen utama yang diperlukan dalam proses PCR disebutkan Kusuma (2010) adalah sebagai berikut.

2.6.1 DNA Cetakan atau DNA Target

DNA cetakan atau biasa disebut DNA Target merupakan fragmen DNA organisme yang akan diperbanyak atau dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara $10^5 - 10^6$ molekul. Hal penting yang perlu diperhatikan pada DNA cetakan yaitu kemurnian dan kuantitas DNA.

2.6.2 Primer

Primer merupakan suatu sekuen 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. Menurut Handoyo dan Ari (2001), kriteria-

kriteria yang harus dipenuhi dalam melakukan perancangan primer adalah sebagai berikut.

a. Panjang Primer

Panjang primer merupakan kriteria yang perlu diperhatikan dalam perancangan primer. Umumnya panjang primer berkisar antara 18-30 bp. Apabila panjang primer kurang dari 18 bp, maka spesifisitas primer akan rendah. Ukuran primer yang pendek memungkinkan terjadinya penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan. Hal ini menyebabkan berkurangnya spesifisitas primer tersebut, sehingga berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan untuk panjang primer lebih dari 30 bp tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna dan ini menyebabkan biaya yang lebih mahal.

b. Komposisi Primer

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.

c. *Melting Temperature* (T_m)

Melting temperature (T_m) merupakan temperatur dimana 50% untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T_m suatu primer sangat penting karena T_m primer akan berpengaruh sekali terhadap pemilihan suhu pada tahapan *annealing* PCR. T_m berhubungan dengan komposisi primer dan panjang primer.

Secara teoritis T_m primer dapat dihitung dengan menggunakan rumus $[2 (A+T) + 4 (C+G)]$. Sebaiknya T_m primer berkisar antara 50-65°C.

d. Interaksi Primer-primer

Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Begitu puladengan terjadinya mispriming pada daerah lain yang tidak dikehendaki. Hal-hal tersebut dapat menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah serta konsentrasi primer yang digunakan menjadi berkurang selama proses PCR, akibat terjadinya mispriming. Keadaan ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR.

e. Enzim DNA Polimerase

Merupakan enzim yang bersifat stabil dalam proses pemanasan dan melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari Eubacterium *Thermus aquaticus* sehingga disebut Taq DNA polimerase). Enzim ini tetap stabil dalam mengamplifikasi DNA meskipun suhu mendekati titik didih air.

f. Deoxyribonukleotide Triphosphates (dNTPs)

Merupakan suatu nukleotida bebas yang berperan dalam proses perpanjangan primer, yaitu melalui pembentukan pasangan basa dengan nukleotida dari DNA target. dNTPs mengikat ion Mg^{2+} yang diperlukan untuk reaksi polimerasi sehingga konsentrasi efektif ion dapat diubah. dNTPs mencakup dATP (nukleotida 17 berbasa *Adenine*), dCTP (nukleotida berbasa *Cytosine*), dGTP (nukleotida berbasa *Guanin*) dan dTTP (nukleotida berbasa *Thymine*).

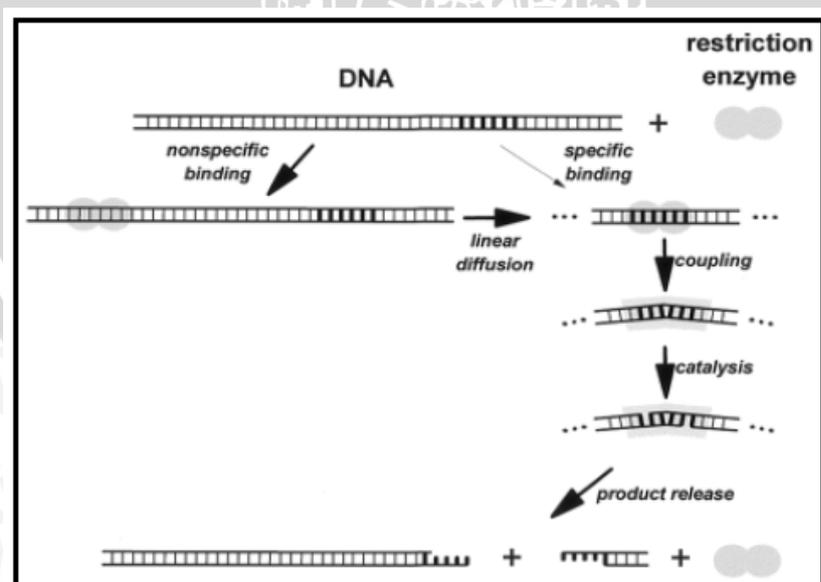
g. Buffer

Komponen pendukung lain yang diperlukan dalam proses PCR adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 (suhu 20°C), 50 mM KCl, 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum

Albumin), Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%. Selain itu perlu ditambahkan pula 1,5 mM MgCl₂.

2.7 Enzim Restriksi Endonuklease

Enzim ini ditemukan oleh Arber pada tahun 1962, kemudian dipurifikasi dan dikarakterisasi oleh Nathans dan H. Smith pada tahun 1974 (Alberts et al., 1983). Nuklease merupakan enzim yang memotong molekul DNA dengan memutuskan ikatan fosfodiester antara nukleotida satu dengan nukleotida berikutnya. Secara umum enzim nuclease dibedakan menjadi dua yaitu DNase (mendepolimerisasi DNA) dan RNase (mendepolimerisasi RNA). DNase dibedakan menjadi dua macam yaitu eksonuklease yaitu DNase yang memotong DNA dari ujung molekul 5' atau dari ujung 3', dan endonuclease yaitu DNase yang memotong DNA dari bagian dalam untai DNA. Menurut Yuwono (2008), enzim endonuclease memiliki ciri khas yaitu hanya memotong DNA untai ganda yang mempunyai urutan nukleotida tertentu. Mekanisme pemotongan DNA oleh enzim endonuclease restriksi dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini.



Gambar 4. Mekanisme pemotongan DNA oleh enzim restriksi (Pingoud dan Jelstch, 2001)

2.7.1 Enzim Restriksi Endonuklease EcoRI

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

Endonuklease tipe II mempunyai spesifitas yaitu daerah yang dikenali maupun daerah yang dipotong enzim tersebut bersifat spesifitas dan terletak pada bagian yang sama. Enzim ini akan memotong pada urutan pengenalan dan tidak memotong daerah urutan lainnya. Sebagai contoh enzim endonuclease tipe II ini yaitu enzim *EcoRI* yang diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* RY 13 yang mempunyai daerah pengenalan dan pemotongan DNA berupa urutan 5'-GAATTC-3' (Yuwono, 2008). Jika basa nukleotida komplemen urutan tersebut dibaca dari ujung 5' maka akan dapat memberikan urutan yang sama sebagai berikut:



Enzim *EcoRI* secara spesifik memotong ikatan antara G dan A sehingga menghasilkan potongan molekul DNA dengan ujung yang tidak sama panjang atau sering disebut 'ujung kohesif' atau 'ujung lekat' (*cohesive* atau *sticky end*) (Yuwono, 2008). Contohnya sebagai berikut :



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan diperlukan untuk menunjang keberhasilan penelitian. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3 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*. Menurut Suharsimi (2006), metode deskriptif merupakan metode penelitian yang dimaksudkan untuk mengumpulkan informasi mengenai status suatu gejala yang ada, secara apa adanya pada saat penelitian dilakukan. Pelaksanaan metode deskriptif tidak terbatas pada pengumpulan dan penyusunan data, tetapi juga analisis dan pembahasan tentang data tersebut. Teknik pengambilan data dalam penelitian ini meliputi data primer dan sekunder.

Penelitian deskriptif merupakan penelitian yang melakukan analisis hanya sampai tahap deskripsi, yaitu menganalisis dan menyajikan data secara sistematis sehingga bisa lebih mudah dipahami dan disimpulkan. Penelitian eksploratif merupakan jenis penelitian yang bertujuan untuk

menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala, fakta dan penyakit tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan keadaan suatu fenomena, tidak dimaksudkan untuk menguji hipotesis tertentu tetapi hanya menggambarkan apa adanya suatu variable, gejala atau keadaan (Arikunto, 2002 dalam Mabrudy, 2013). Metode eksploratif pada penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Dunaliella salina*.

3.4 Sumber Data

Data adalah bahan yang akan diolah atau diproses berupa angka, huruf dan kata yang akan menunjukkan situasi yang berdiri sendiri, dimana data merupakan fakta yang sudah ditulis dalam bentuk catatan berupa komponen dasar dari suatu informasi yang akan diproses lebih lanjut untuk menghasilkan informasi yang lebih. Data primer dan data sekunder merupakan pengklasifikasian berdasarkan sumber-sumber data.

3.4.1 Data Primer

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

a. Wawancara (Interview)

Menurut Sugiyono (2012) wawancara dapat dilakukan secara terstruktur (peneliti telah mengetahui dengan pasti tentang informasi apa yang akan diperoleh) maupun tidak terstruktur (peneliti tidak menggunakan pedoman wawancara yang telah tersusun secara sistematis dan lengkap sebagai

pengumpul datanya) dan dapat dilakukan secara langsung (tatap muka) maupun secara tidak langsung (melalui media seperti telepon).

b. Observasi

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

c. Partisipasi Aktif

Partisipasi aktif adalah keterlibatan dalam suatu kegiatan yang dilakukan secara langsung di lapangan (Nazir, 1988). Pada penelitian ini, kegiatan partisipasi aktif yang diikuti secara langsung adalah kultur dan pemanenan *Dunaliella salina* serta pengambilan DNA melalui tahap isolasi .

3.4.2 Data Sekunder

Data sekunder merupakan data yang diperoleh secara tidak langsung, pengumpulannya diperoleh oleh peneliti atau berasal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari Biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Menurut Widi (2010), data sekunder dapat diperoleh melalui beberapa kategori, antara lain: (1) publikasi lembaga pemerintahan atau non pemerintahan seperti: data sensus, data statistik, survey pekerja, laporan kesehatan, informasi ekonomi, informasi demografi. (2) penelitian terdahulu (3) laporan atau catatan pribadi (4) media massa. Hal yang harus diperhatikan dalam pengambilan penggunaan data sekunder yaitu kebenaran data dan valid tidaknya suatu data. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, majalah, internet, buku-buku serta instansi pemerintahan yang terkait guna menunjang keberhasilan penelitian.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Kultur *Dunaliella salina*

Pertama yang dilakukan adalah mempersiapkan media kultur terlebih dahulu. Media kultur menggunakan air laut yang telah disterilkan dan ditambah nutrisi (dipupuk). Semua alat dan bahan yang digunakan untuk kultur *Dunaliella salina* dalam keadaan steril. Hal ini dilakukan agar dalam proses kultur tidak terjadi kontaminasi yang dapat menyebabkan kematian biota kultur. Nutrien yang diberikan meliputi unsur hara makro dan unsur mikro. Unsur hara makro dibutuhkan untuk pertumbuhan sel yang meliputi unsur C, H, O, N, S, P, dan K. Unsur hara mikro dibutuhkan dalam jumlah sedikit, berperan sebagai katalisator dan berfungsi secara khusus dalam regulasi osmotik.

Pupuk yang digunakan untuk memenuhi nutrisi pertumbuhan *D. salina* yaitu pupuk *Conwey atau Walne* dengan pemberian dosis sebesar 1 ml/L atau juga bisa disesuaikan dengan tingkat kebutuhan. Jenis pupuk yang digunakan pada kultur mikroalga *Chloropyceae* adalah pupuk Conwey atau Walne dengan dosis pemakaian 1 ml/L (Martosudarmo dan Sabarudin, 1979). Pupuk Walne digunakan karena komposisinya sederhana dan tidak mengandung logam berat. Adapun komposisi dari pupuk Walne disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Pupuk Walne

Bahan	Dosis
Air	10 liter
KNO ₃	1000 gr
Na ₂ HPO ₄	100 gr
FeCl ₃	13 gr
EDTA	100 gr

Kultur murni *D. salina* terbagi menjadi dua tahapan yaitu tahapan kultur laboratorium dan kultur intermediet. Tahap pertama merupakan tahap kultur

laboratorium yang dimulai dengan melakukan kultur pada toples volume 4 liter, kemudian dipindahkan ke media kultur karboi volume 8 liter. Setelah itu masuk ke tahap kedua yaitu kultur intermediet dengan volume air 500 liter. Tahap pertama dilakukan pada toples yang berbentuk seperti tabung silinder dengan diameter 15 cm dan tinggi toples 30 cm, pada toples tersebut diisi air sebanyak 4 liter ($\frac{3}{4}$ volume toples). Kultur dilakukan dari fase adaptasi sampai fase stasioner. Setelah mencapai fase stasioner, kultur dipindahkan ke media kultur yang lebih besar yaitu pada media kultur karboi. Media kultur karboi berbentuk tabung silinder dengan diameter 30 cm dan tinggi sekitar 35 cm, pada karboi diisi air sebanyak 8 liter ($\frac{3}{4}$ volume karboi). Kultur dilakukan dari fase adaptasi sampai fase stasioner. Setelah mencapai fase stasioner, kultur dipindahkan ke media kultur yang lebih besar yaitu pada media kultur intermediet. Tahap kedua yaitu kultur intermediet yang dilakukan pada bak fiber berbentuk persegi empat dengan panjang sisi sekitar 1 meter dan diisi air sebanyak 500 liter ($\frac{3}{4}$ volume bak fiber). Kultur dilakukan dari fase adaptasi sampai fase stasioner. Setelah mencapai fase stasioner, kultur dilakukan pemanenan. Menurut BPBAP Situbondo (2012), tahap-tahap kultur murni plankton skala laboratorium adalah sebagai berikut.

1. Kultur pada Toples 4 Liter

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

1. Membersihkan rak yang akan digunakan untuk meletakkan toples 4 liter dengan menggunakan alkohol agar tidak ada kontaminasi.
2. Menyiapkan media kultur yaitu air laut yang telah disterilkan dengan cara direbus dengan volume $\frac{2}{3}$ toples
3. Memasang aerasi agar plankton dapat berfotosintesis.
4. Menambahkan nutrisi Walne dan vitamin dengan dosis masing-masing 1 ml/L

5. Memasukkan *starter* atau bibit dari kultur erlenmeyer dimasukkan dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4
6. Menutup toples dengan menggunakan plastik dan diikat dengan karet gelang.
7. Memberi keterangan jenis plankton dan tanggal kultur dengan kertas label
8. Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt
9. Menghitung kepadatannya setiap 24 jam sekali dengan haemocytometer di bawah mikroskop. Apabila kepadatan sudah tinggi dan mulai mengalami penurunan, kultur siap dipanen.

2. Kultur pada Karboi 8 Liter

Langkah-langkah yang dilakukan pada kultur plankton skala karboi 8 Liter adalah sebagai berikut :

1. Membersihkan rak dan meja yang akan digunakan untuk meletakkan karboi dengan menggunakan alkohol sehingga tidak ada kontaminasi.
2. Karboi diisi air laut yang telah disterilkan dengan kaporit dan dipasang aerasi.
3. Media air laut dinetralkan dengan Na-*thiosulfat* 5 ppm.
4. Setelah 15 menit media kultur dicek kenetralannya dengan menggunakan *Chlorine test*.
5. Menambahkan pupuk Walne dan vitamin dengan masing-masing dosis 1 ml/L. Hal ini bertujuan untuk menyediakan nutrisi yang dibutuhkan plankton.
6. *Starter* atau bibit dari kultur pada toples dimasukkan dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4.
7. Menutup karboi dan diberi label jenis plankton dan tanggal kultur.
8. Menginkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 20°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt.

9. Menghitung kepadatannya setiap 24 jam sekali dengan haemocytometer di bawah mikroskop. Apabila kepadatan sudah tinggi dan mulai mengalami penurunan (fase stasioner), kultur siap dipanen.

3. Kultur Intermediet 500 Liter

Kultur intermediet dilakukan pada bak fiber yang diletakkan di ruangan semi *outdoor* dengan atap transparan. Bibit plankton yang akan dikultur berasal dari kultur karboi skala laboratorium. Bak fiber yang telah berisi media air laut netral diberi aerasi, kemudian ditambahkan pupuk Walne dengan dosis 1 ml/L. Starter atau bibit *Dunaliella salina* dimasukkan ke media air laut netral, dimana perbandingan antara bibit dan media air laut adalah 1:4. Kultur dilakukan selama 6 hingga 7 hari tergantung kepadatannya.

3.5.2 Pemanenan *Dunaliella salina*

Pemanenan *Dunaliella salina* dilakukan saat kepadatan sudah cukup tinggi, biasanya pada fase log dan stasioner. Kawaroe *et al.* (2010), menyatakan bahwa mikroalga yang telah berusia 7-10 hari dapat dipanen dengan cara filtrasi (penyaringan) maupun dengan cara flokulasi (pengendapan). Setelah itu, mikroalga bisa dikeringkan dengan sinar matahari.

Metode pemanenan yang digunakan disini adalah metode flokulasi. Cara pengendapan dilakukan dengan penambahan NaOH pada kultur dan didiamkan selama satu malam. Keesokannya dilakukan proses penyaringan biomassa menggunakan kain satin. Jika semua biomassa sudah selesai disaring, endapan kultur kemudian dibilas dengan menggunakan aquades agar pH yang diperoleh netral. Selain itu, pembilasan dengan aquades ini juga bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan residu kimia. Proses pengeringan biomassa dilakukan dalam ruangan dengan suhu ruang. Endapan biomassa pada kain satin dipindahkan ke plastik agar saat biomassa kering tidak menempel pada kain. Pengeringan biomassa dilakukan dengan bantuan hembusan angin.

Proses pengeringan biasanya berlangsung selama 2-3 hari tergantung dari ketebalan endapan biomassa (Rosahdi, 2015).

3.5.3 Perhitungan Kepadatan Sel

Penghitungan kepadatan *Dunaliella salina* dilakukan menggunakan haemocytometer dengan bantuan mikroskop binokuler dan *handtally* counter. Pengamatan menggunakan mikroskop memberikan beberapa keuntungan, diantaranya dapat mengetahui penambahan jumlah sel tiap harinya serta mengetahui adanya kontaminan. Menurut Susilowati *et al* (2010), penghitungan kepadatan ini dilakukan setiap hari sejak penebaran bibit. Pengambilan contoh uji untuk penghitungan kepadatan dilakukan setiap hari menggunakan haemocytometer dan *counting hand*.

Haemocytometer merupakan alat yang terbuat dari gelas yang dibagi menjadi kotak-kotak pada dua tempat bidang pandang. Kotak tersebut berbentuk bujur sangkar dengan sisi-sisi 1 mm² dan tinggi 0,1 mm. Apabila ditutup dengan gelas penutup volume ruangan yang terdapat di atas bidang bergaris adalah 0,1 mm³ atau 10⁻⁴. Kotak bujur sangkar yang mempunyai sisi 1 mm tersebut dibagi lagi menjadi 25 buah kotak bujur sangkar, dimana masing-masing kotak dibagi lagi menjadi 16 kotak bujur sangkar yang lebih kecil.

Cara penghitungan kepadatan sel dengan menggunakan *haemocytometer* yaitu dengan meneteskan kultur sel *Dunaliella salina* sebanyak satu tetes ke dalam dua bidang pandang *haemocytometer*. Tutup bidang pandang *haemocytometer* dengan menggunakan *cover glass*. Letakkan *haemocytometer* dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 10 kali dan difokuskan hingga terlihat kotak-kotak tempat perhitungan sel. Menurut Prihantini (2005), penentuan jumlah *Dunaliella salina* dapat diketahui dengan cara menghitung jumlah *Dunaliella salina* yang terdapat dalam 4 kotak besar yang

dipilih secara acak pada *haemocytometer* dengan bantuan *handtally counter*.

Kerapatan sel dalam 1 ml sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$k = n \times p \times 2500$$

diketahui :

k = kerapatan sel *D. salina* (sel/ml),

n = jumlah total sel *D. salina* pada keempat kotak kamar hitung,

p = tingkat pengenceran yang digunakan.

3.5.4 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 dimasukkan 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 :

- Mencilupkan 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.

3.5.5 Isolasi RNA *Dunaliella salina*

Total RNA diekstraksi menggunakan *Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit*. Terdapat beberapa langkah isolasi RNA sesuai prosedur pabrik RNA Kit. Langkah-langkah isolasi RNA tersebut meliputi :

a. Pemisahan Jaringan

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

b. Pemecahan

- Menambahkan 500 μ l buffer RB atau PRB dan 5 μ l β -mercaptoethanol dalam sampel halus.

- Mencampur menggunakan vortex kemudian menginkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit.
- Menempatkan kolom penyaring dalam tabung koleksi 2 ml kemudian memindahkan campuran sampel ke dalam kolom.
- Mensentrifuse selama 1 menit pada 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 ½ volume ethanol absolut dalam cairan kemudian mengocok secara perlahan
- Menempatkan kolom RB dalam tabung koleksi volume 2 ml, kemudian memindahkan campuran ke kolom RB
- Melakukan sentifuse pada 14-16.000 x g selama 1 menit (jika campuran tidak dapat mengalir melalui membran kolom RB melalui sentrifugasi, waktu sentrifuse dinaikkan hingga mengalir seluruhnya)
- Membuang semua cairan kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml. Cairan dibuang karena RNA sudah terjerap pada kolom RB.

d. Pencucian

- Menambahkan 400 µl buffer W1 ke dalam kolom RB.
- Mensentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 30 detik.
- Membuang cairan dalam tabung kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml.
- Menambahkan 600 µl buffer wash (pastikan ethanol ditambahkan) ke dalam kolom RB.

- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit.
- Membuang cairan kemudian menempatkan pada kolom RB kembali pada tabung koleksi 2 ml.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 3 menit hingga matrik kolom kering.

e. Pemurnian RNA

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

3.5.6 Pengukuran Kadar Protein dengan Nanodrop Spektrofotometri

Setelah diekstraksi, sebanyak 4 μ l protein yang diperoleh ditambahkan 4 μ 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).

3.5.7 Proses Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (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. Dalam sintesis cDNA, terlebih dahulu membuat RNA *mix* dengan komposisi 5 μ l oligo(dt) dan 50 μ l sampel RNA. Menginkubasi campuran RNA selama 10 menit pada suhu 65°C, dan didinginkan dalam es selama 3 menit. Selanjutnya membuat cDNA synthesis mix dengan komposisi 10 μ l dNTP 10 mM, 20 μ l *buffer-first strand*, dan 10 μ l DTT 0,1 M. Berikutnya cDNA synthesis mix dicampurkan ke dalam RNA mix secara perlahan dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu 42°C. Menambahkan 5 μ l enzim *reverse transcriptase* dan dihomogenkan. Inkubasi pada suhu 42°C selama 50 menit, kemudian menginkubasi pada suhu 70°C selama 15 menit. Selanjutnya sampel cDNA digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR.

Prosedur PCR dilakukan sesuai dengan Maxime PCR PreMix Kit. Tahapan-tahapan RT-PCR sesuai protokol kit yang pertama yaitu memasukkan 1 μ l sampel cDNA ke dalam PCR tube 1,5 ml. Selanjutnya menambahkan primer 1 yaitu *initiated primer* (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3') sebanyak 1 μ l, dan menambahkan *adapter primer* (5'-CTCGTTGCTGGCTTTGATG-3') sebanyak 1 μ l. Berikutnya menambahkan *free water* sebanyak 17 μ l, sehingga total volume sampel sebesar 20 μ l. Kemudian memasukkan PCR *tube* ke dalam mesin PCR. Pengaturan pengoperasian mesin PCR dilakukan seperti tabel 2.

Tabel 2. Pengoperasian Program PCR

Siklus PCR		Suhu	Waktu
<i>Initial denaturation</i>		94 °C	2 menit
40 siklus	<i>Denaturation</i>	94 °C	20 detik
	<i>Annealing</i>	52 °C	20 detik
	<i>Extension</i>	72 °C	1 menit
<i>Final Extension</i>		72 °C	3 menit

Setelah rangkaian tahapan PCR selesai, mengeluarkan PCR *tube* dalam mesin. Selanjutnya, menambahkan hasil PCR dengan 1 μ l 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.

3.5.7 Pemotongan Produk RT-PCR dengan Enzim Restriksi

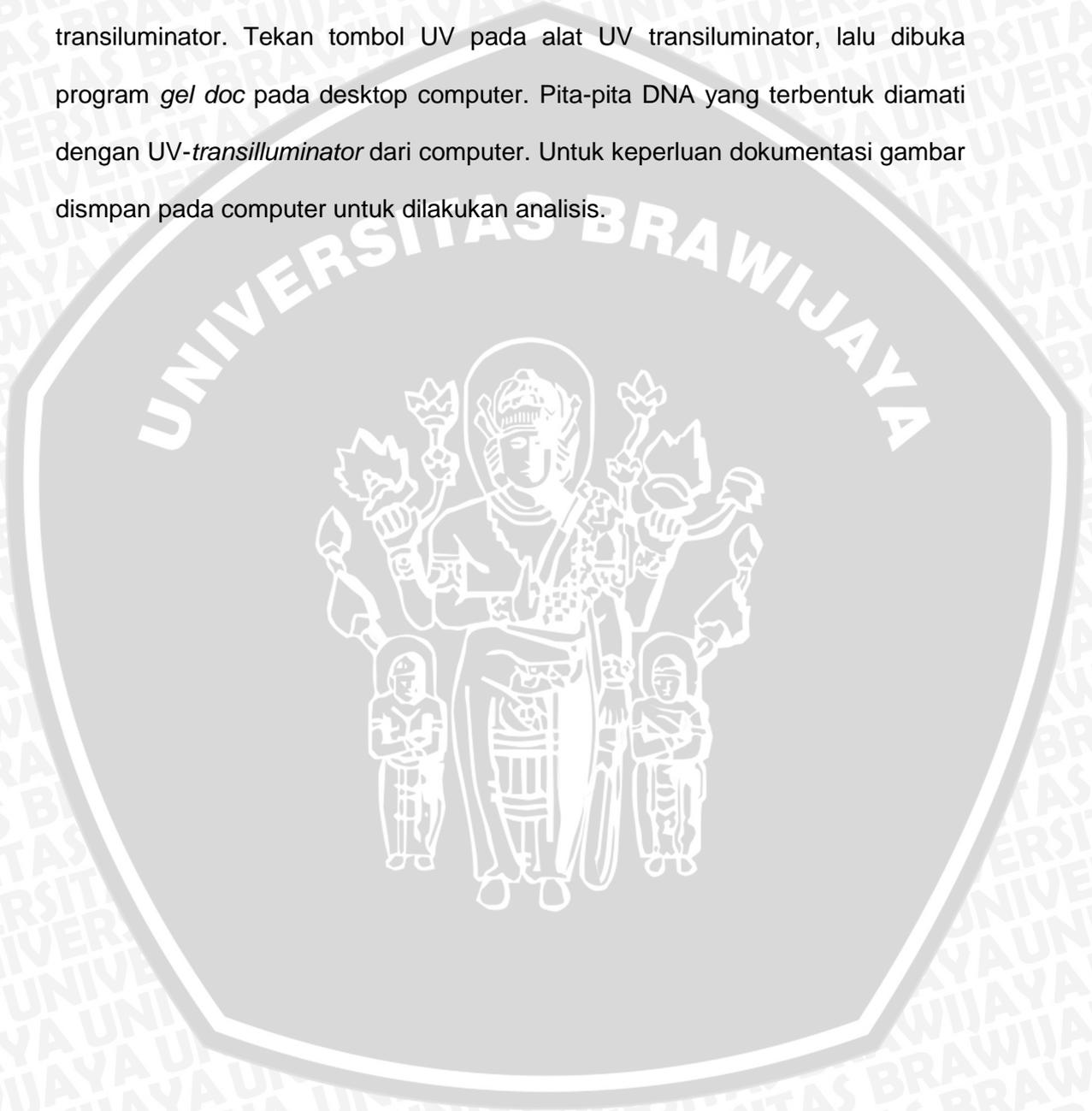
Setelah amplifikasi fragmen DNA target berhasil selanjutnya memotong hasil amplifikasi menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Pemotongan DNA dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dilakukan sesuai dengan petunjuk yang disarankan oleh pihak yang memproduksi enzim tersebut. Mencampur campuran dari keseluruhan 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 ddH₂O, 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.

3.5.8 Elektroforesis Gel Agarosa

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

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

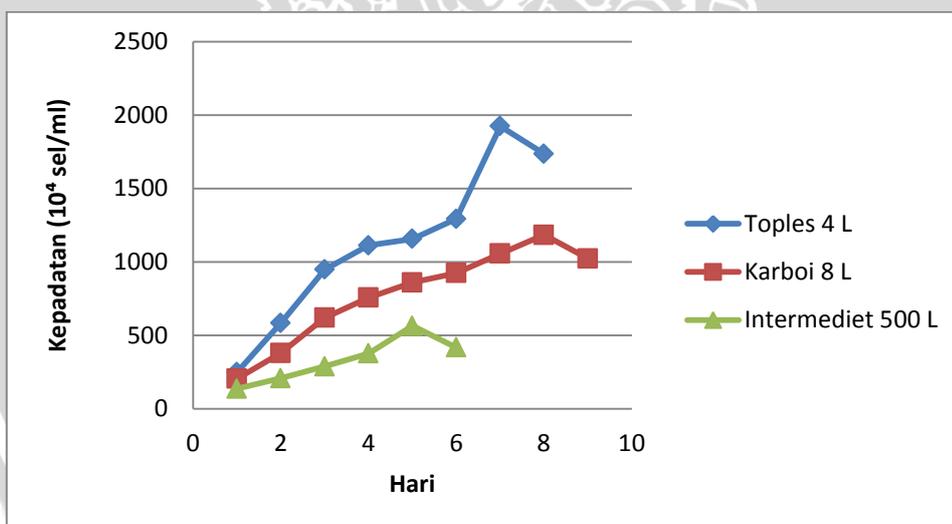
tangan agar terhindar dari kontaminasi yang menyebabkan rusaknya sampel. Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan *ethidium bromida* selama 15-20 menit. Kemudian menghidupkan UV transiluminator dan computer tunggu 10 menit, lalu masukkan gel agarosa kedalam alat UV transiluminator. 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.



4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pertumbuhan Sel *Dunaliella salina*

Menurut Becker (1994), pertumbuhan merupakan suatu peningkatan jumlah sel yang disertai dengan ukurannya yang menghasilkan struktur yang baru. Penghitungan kepadatan *Dunaliella salina* dilakukan menggunakan haemocytometer dengan bantuan mikroskop binokuler dan handtally counter. Penghitungan kepadatan ini dilakukan setiap hari sejak penebaran bibit. Hal ini bertujuan untuk melihat perkembangan pertumbuhan dari *Dunaliella salina*. Pengambilan contoh uji untuk penghitungan kepadatan dilakukan setiap hari menggunakan haemocytometer dan *counting hand* (Susilowati *et al.*, 2010). Kurva pertumbuhan *Dunaliella salina* dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan Sel *Dunaliella salina*

Berdasarkan kurva pertumbuhan sel *Dunaliella salina*, pada kultur toples 4 L pertumbuhan *Dunaliella salina* dari hari ke-1 dengan jumlah kepadatan 248×10^4 sel/ml hingga hari ke-7 dengan jumlah kepadatan 1924×10^4 sel/ml terus mengalami kenaikan, namun mulai mengalami penurunan pada hari ke-8 dengan jumlah kepadatan 1736×10^4 sel/ml. Pada kultur karboi 8 L, pertumbuhan *Dunaliella salina* mengalami kenaikan dari hari ke-1 dengan jumlah kepadatan

204x10⁴ sel/ml hingga hari ke-8 dengan jumlah kepadatan 1184x10⁴ sel/ml, dan mulai mengalami penurunan pada hari ke-9 dengan jumlah kepadatan 1023x10⁴ sel/ml. Sementara pada kultur intermediet 500 L, pertumbuhan *Dunaliella salina* mengalami kenaikan dari hari ke-1 dengan jumlah kepadatan 136x10⁴ sel/ml hingga hari ke-5 dengan jumlah kepadatan 564x10⁴ sel/ml dan mulai mengalami penurunan pada hari ke-6 dengan jumlah kepadatan 417x10⁴ sel/ml.

Fase adaptasi atau fase lag pada *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-1 dengan jumlah kepadatan 248x10⁴ sel/ml hingga hari ke-3 dengan jumlah kepadatan 948x10⁴ sel/ml, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-1 dengan jumlah kepadatan 204x10⁴ sel/ml hingga hari ke-3 dengan jumlah kepadatan 620x10⁴ sel/ml, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-1 dengan jumlah kepadatan 136x10⁴ sel/ml hingga hari ke-3 dengan jumlah kepadatan 208x10⁴ sel/ml. Fase eksponensial *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-4 dengan jumlah kepadatan 1112x10⁴ sel/ml hingga hari ke-7 dengan jumlah kepadatan 1924x10⁴ sel/ml, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-4 dengan jumlah kepadatan 756x10⁴ sel/ml hingga hari ke-8 dengan jumlah kepadatan 1184x10⁴ sel/ml, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-4 dengan jumlah kepadatan 376x10⁴ sel/ml hingga hari ke-5 dengan jumlah kepadatan 564x10⁴ sel/ml. Fase stasioner *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-8 dengan jumlah kepadatan 1736x10⁴ sel/ml, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-9 dengan jumlah kepadatan 1023x10⁴ sel/ml, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-6 dengan jumlah kepadatan 417x10⁴ sel/ml. Puncak kepadatan *Dunaliella salina* pada media kultur toples 4 L terjadi pada hari ke-7 dengan jumlah kepadatan 1924x10⁴ sel/ml, pada media kultur karboi 8 L terjadi pada hari ke-8 dengan jumlah kepadatan 1184x10⁴ sel/ml, dan pada media kultur intermediet 500 L terjadi pada hari ke-5 jumlah

kepadatan 1184×10^4 sel/ml. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fitriyanto dan Tri (2013) yang menyatakan bahwa pertumbuhan *Dunaliella salina* akan mengalami fase lag pada hari ke-1 dan ke-2. Selanjutnya akan mengalami fase eksponensial pada hari ke-3 hingga ke-5, dengan puncak kepadatan terjadi pada hari ke-5, kemudian kepadatan akan mengalami penurunan pada hari ke-6 hingga ke-7.

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. Hal ini disebabkan kultur laboratorium dilakukan dalam ruangan *indoor* sehingga kondisi lingkungan lebih terkontrol dan kemungkinan terjadinya kontaminasi lebih sedikit dibandingkan dengan kultur intermediet. Sesuai dengan pernyataan Susilowati (2010), yang menyatakan bahwa mikroalga yang dipelihara pada sistem *outdoor* kelimpahannya lebih rendah dibandingkan dengan pemeliharaan pada sistem *indoor*. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan pada sistem *indoor* lebih dapat dikendalikan dibandingkan sistem *outdoor*.

4.2 Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air yang digunakan dalam kegiatan kultur *Dunaliella salina* yaitu pH, suhu, dan salinitas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Susilowati *et al.*, (2010) yang menyatakan bahwa kondisi lingkungan yang diamati selama kultur meliputi suhu, salinitas, dan pH. Menurut Amini *et al.*, (2011), parameter tersebut diukur pada awal dan akhir pertumbuhan kultur. Tujuan dari pengamatan kualitas air ini adalah untuk mengetahui pengaruh kultivasi

mikroalga. Media kultivasi diamati pH, kadar garam, dan suhunya untuk mengetahui kelayakan tumbuhnya sel mikroalga.

Hasil dari pengukuran kualitas air dalam kegiatan kultur *Dunaliella salina* yang dilakukan pada media kultur toples 4 L, media kultur karboi 8 L, dan juga pada media kultur intermediet 500 L dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Kualitas Air

		Toples 4 L	Karboi 8 L	Intermediet 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

4.2.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan dalam pertumbuhan mikroalga, karena suhu berpengaruh terhadap sistem metabolisme mikroalga. Setiap mikroalga mempunyai suhu ideal yang berbeda-beda untuk bisa tumbuh dan berkembang dengan baik.

Berdasarkan tabel di atas, diperoleh hasil bahwa pada media kultur toples didapatkan kisaran suhu sebesar 22°C, pada media kultur karboi didapatkan kisaran suhu sebesar 22°C, dan pada media kultur intermediet didapatkan kisaran suhu sebesar 24-26°C. Pada media kultur intermediet, nilai suhu lebih besar daripada suhu pada media kultur toples dan karboi. Hal ini disebabkan pada kultur intermediet dipengaruhi oleh faktor lingkungan secara langsung. Pada saat pengukuran suhu, intensitas matahari cukup tinggi sehingga suhunya

juga tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Arif (2014) yang menyatakan bahwa suhu yang optimal untuk pertumbuhan mikroalga *Dunaliella salina* berkisar antara 20–40°C. Dari pernyataan tersebut, dapat dikatakan bahwa suhu kultur yang digunakan telah sesuai untuk pertumbuhan mikroalga *Dunaliella Salina*.

4.2.2 pH

pH atau derajat keasaman merupakan indikator intensitas asam basa suatu perairan atau jumlah konsentrasi ion hidrogen dalam perairan. pH merupakan salah satu faktor yang berpengaruh secara langsung terhadap produksi dan pertumbuhan fitoplankton. Kecepatan pertumbuhan alga akan menurun pada saat pH melampaui batas optimum (Pescott, 1970).

Berdasarkan tabel di atas, diperoleh hasil bahwa pada media kultur toples didapatkan kisaran pH 8,4. Pada media kultur karboi didapatkan kisaran pH 8,3-8,6 sedangkan pada media kultur intermediet didapatkan kisaran pH sebesar 8,4-8,8. Nilai pH pada media kultur intermediet lebih tinggi dibandingkan pada media kultur toples dan karboi. Hal ini disebabkan pada saat pengukuran pH, suhu lingkungan tinggi sehingga CO₂ juga tinggi. Apabila CO₂ tinggi maka nilai pH juga akan tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fitriyanto dan Soeprbowati (2013) yang menyatakan bahwa, *Dunaliella salina* akan tumbuh optimal pada pH 9, tetapi dia masih dapat bertahan hidup di perairan yang mempunyai nilai pH sebesar 11. Menurut Lavens dan Sorgelos (1996), rata-rata pH untuk kultur sebagian besar spesies mikroalga antara 7-9, dengan optimum rata-rata pH berkisar antara 8,2-8,7.

4.2.3 Salinitas

Untuk mengatur salinitas pada media kultur mikroalga dapat dilakukan dengan cara pengenceran media kultur menggunakan air tawar. Umumnya spesies alga laut dapat tumbuh baik pada salinitas yang lebih rendah dari tempat

asalnya, dimana hal ini dapat dilakukan dengan penambahan air tawar. Naiknya salinitas akan menghambat proses fotosintesis, proses respirasi serta menghambat pembentukan sel anakan.

Berdasarkan tabel di atas, didapatkan hasil pengukuran salinitas yang dilakukan pada media kultur toples diperoleh nilai salinitas sebesar 36 ppt, pada media kultur karboi diperoleh nilai salinitas sebesar 35 ppt. Sedangkan pada media kultur intermediet diperoleh nilai sebesar 34-35 ppt. Hal ini sesuai dengan pernyataan Tjahjo *et al.*, (2002) yang menyatakan bahwa spesies *Dunaliella* sp. dapat tumbuh optimal pada salinitas air 30-35 ppt.

4.3 Isolasi RNA

Isolasi RNA bertujuan untuk mendapatkan hasil RNA murni dari *Dunaliella salina*. Tahapan ini memisahkan molekul RNA dari molekul-molekul lain yang tidak diinginkan seperti lemak, karbohidrat, dan lain-lain. RNA masih terbungkus di dalam sel sehingga perlu dilakukan kegiatan isolasi dan kegiatan *purifikasi* (pemurnian).

Dalam penelitian ini menggunakan RNA purification kit yang terdapat tiga tahap utama dalam ekstraksi RNA, yaitu *lisis* 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 melulusi 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 dilusi dengan menggunakan *nuclease-free water* (Fermentas, 2011). Isolat RNA kemudian diuji dengan nanodrop spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasinya.

4.4 Kandungan Total RNA

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 A_{260}/A_{280} karena protein diserap pada panjang gelombang 280 nm (Aranda et al. 2009). Hasil dari pengujian kadar konsentrasi RNA dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil konsentrasi Total RNA pada Layout alat *NanoPhotometer™ [Implen]*

Berdasarkan gambar di atas, hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh hasil 25,8 mg/ml dengan nilai kemurnian sebesar 1,33 (A260/A280). Menurut Promega (2009), standar konsentrasi DNA rantai ganda sebesar 50 µg/ml, DNA rantai tunggal sebesar 33 µg/ml, dan konsentrasi RNA sebesar 40 µg/ml. Nilai kemurnian DNA berada pada nilai $\geq 1,8$ dan RNA pada nilai 2,0 (A260/A280). Nilai konsentrasi dan kemurnian RNA yang berada dibawah standart menunjukkan bahwa DNA maupun RNA terkontaminasi oleh protein, fenol, dan komponen-komponen lain pada saat proses isolasi.

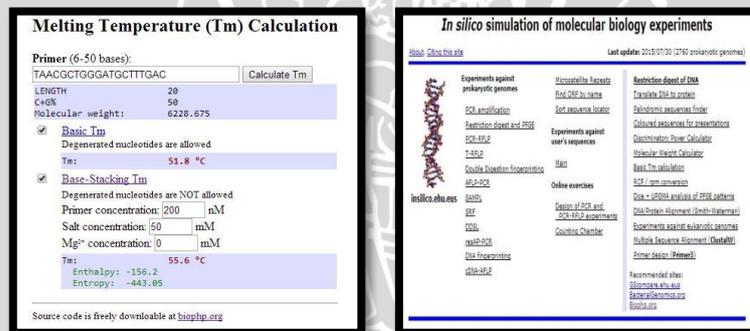
4.5 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

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. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hewajuli dan Dharmayanti (2014) yang menyatakan bahwa, untuk mengamplifikasi DNA atau RNA dapat digunakan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sebelum proses PCR, untuk amplifikasi RNA molekul mRNA harus melalui proses *reverse transcriptase* sehingga diperoleh molekul komplemen DNA (cDNA). Molekul cDNA ini yang selanjutnya digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Sehingga proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi RNA disebut sebagai proses RT-PCR.

Keberhasilan proses amplifikasi dalam PCR ditentukan oleh kesesuaian primer yang digunakan serta optimasi dan efisiensi dalam proses PCR. Penggunaan primer yang tidak spesifik dan kurang tepat dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain didalam *genom* yang tidak dijadikan sasaran atau tidak terdapat daerah *genom* yang teramplifikasi. Maka dari itu, diperlukan

optimasi khusus terutama pada optimasi cetakan DNA dan primer yang akan digunakan dalam masing-masing proses PCR (Grunenwald, 2003).

Dalam penelitian ini terdapat 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* (Tm). Menurut fatchiyah et al., (2011), ntuk mendapatkan *melting temperature* (Tm) yang tepat dapat menggunakan rumus, $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$. Selain itu penentuan *melting temperature* (Tm) pada saat proses *annealing* dapat diketahui melalui situs insilico.ehu.eu dan BioPHPminitools/melting_temperature seperti pada gambar 7.



Gambar 7. Perhitungan *Melting Temperature*

Berdasarkan situs insilico.ehu.eu dan BioPHPminitools/melting_temperature, penentuan *melting temperature* (Tm) yang direkomendasikan yaitu 51,8 °C. Namun dalam penelitian ini dilakukan perlakuan gradient suhu untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang maksimal, dengan

menggunakan 6 level suhu yang berbeda yaitu pada suhu 44°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C, dan 58°C.

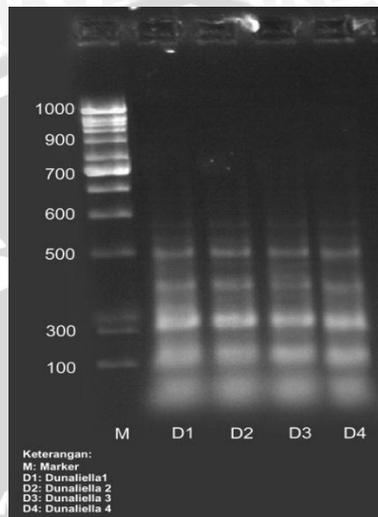
Dalam penelitian ini suhu penempelan primer (*annealing*) yang optimal yaitu pada suhu 52°C selama 1 menit. Perlakuan suhu penempelan primer (*annealing*) yang tepat dapat menghasilkan amplifikasi DNA secara optimal, hal ini ditandai dengan hasil visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis yang terlihat 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.

4.6 Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil amplifikasi cDNA yang divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa menunjukkan terbentuknya pita DNA. Elektroforesis menggunakan gel agarose atau poliakrilamid merupakan metode standart untuk

memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA. Gel agarose dapat digunakan untuk memisahkan molekul yang berukuran lebih dari 100 bp (*base pairs*). Hasil visualisasi dari elektroforesis Gel Agarosa dapat dilihat pada gambar 8.



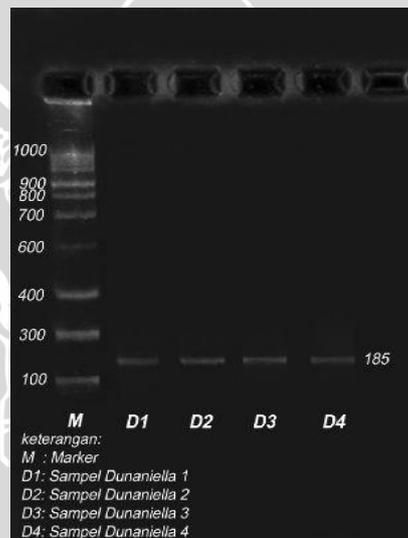
Gambar 8. Visualisasi Amplifikasi cDNA

Berdasarkan gambar di atas, didapatkan 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.

4.7 Pemotongan Produk RT-PCR menggunakan Enzim *EcoRI*

Hasil pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi dapat bervariasi antara spesies yang sama maupun antar spesies yang berbeda. Perbedaan pada urutan nukleotida pada masing-masing spesies atau individu mengakibatkan pola atau hasil pemotongan DNA oleh enzim restriksi yang

berbeda juga. Menurut Campbell (2010), jika pada situs restriksi terdapat perbedaan nukleotida antara dua sepasang gen, maka didalam elektroforesis gel akan dapat menghasilkan campuran fragmen atau bagian yang berbeda dan pola pita masing-masing. Pada penelitian ini menggunakan enzim restriksi tipe II yaitu enzim restriksi *EcoRI*. Enzim restriksi mempunyai ciri utama yaitu setiap enzim mengenal urutan spesifik pada molekul RNA yang akan dipotong. Pada enzim restriksi tertentu dapat memotong fragmen RNA dalam konsentrasi pH, suhu, dan garam yang sesuai dengan karakter enzim restriksi yang digunakan (Roberts dan Macelis 2001). Hasil dari pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi *EcoRI* dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Hasil Pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi *EcoRI*

Berdasarkan gambar diatas, dapat diperoleh hasil pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi *EcoRI* pada mikroalga *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.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 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*).

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini adalah adanya menggunakan 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.

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.
- Aedi, Nur. 2010. Pengolahan dan Analisis Data Hasil Penelitian. Bahan Belajar Mandiri Metode Penelitian Pendidikan. Jakarta : Universitas Pendidikan Indonesia.
- Agustina, D., C.T. Sardjono, B. Setiawan, F. Sandra. 2011. Peranan RNA *interference* pada *Embryonic Stem Cell*. CDK 186 Vol. 38 (5): 332-335.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Publishing.
- Amini, S., Sugiyono, E. Saadudin. 2011. Kandungan Minyak *B. braunii*, *Nannochloropsis* sp., dan *Spirulina platensis* pada Umur yang Berbeda. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol. 6 No. 1 : 39-44.
- Andersen, R.A. (Eds). 2005. *Algal culturing techniques*. UK: Elsevier Academic.
- Annisa. 2012. Isolasi RNA dan Pengklonaan Gen Tripsin Kation dari Pankreas Sapi ke *Escherichia coli* DH5 α . *Skripsi*. Universitas Indonesia : Depok.
- Aranda IVR, Dineen S, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM. 2009. Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range. *Anal Biochem*. 387(1):122-127. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.003.
- Arif, Desilina. 2014. Diktat Teknologi Pakan Ikan Semester TBP. Kementerian Kelautan dan Perikanan : Ambon.
- Becker, E. W. (1994), *Microalgae Biotechnology and Microbiology*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Bloom, J. H. 1998. Analisa Mutu Air Secara Kimiawi dan Fisis. Laporan Pelatihan dan Praktek. NUFFIC-UNIBRAW : Malang
- Bold, H. C., M. J. Wynne. 1985. *Introduction to the Algae : Structure and Reproduction*. Prentice-Hall : New Jersey.
- Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka. 1998. *Dunaliella*. Pages 27-58 in M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, end. *Microalga Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 58.
- _____, Michael A. 2013. *Dunaliella : Biology, Production, and Markets. Applied Phycology and Biotechnology*.

- BPBAP Situbondo. 2012. Kultur Pakan Alami. BPBAP : Situbondo.
- Campbell, N. A., dan J. B. Reece. 2012. Biologi. Terjemahan dari Biologi, Oleh Damaring Tyas Wulandari. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Chang, T., Ohta, S., Ikegami, N., Miyata, H., Kashimoto, T., Kondo, M. 1993. *Antibiotic Substance Produces by a Marine Green Alga, Dunaliella primolecta*. *Bioresources Technology*. 44: 149-153.
- Dahuri, R. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut*. Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Dale, J.W., M.V. Schantz. 2002. From genes to genomes. John Wiley & Sons, Inc., Canada : xi + 360.
- Fairbanks, D.J., W.R. Andersen. 1999. Genetics the continuity of life. Brooks/cole Publishing Company, New York. xix: 820 hlm.
- 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.
- Fitriyanto, E.B., T.R. Soeprbowati. 2013. Pemanfaatan Plasma Lucutan Pijar Korona Sebagai Nutrien Alternatif pada Monokultur Dunaliella salina (Dunal). *Seminar Nasional Biologi*. Universitas Diponegoro : Semarang.
- Ginzburg, M. 1988. Dunaliella : a Green Alga Adapted to Salt. *Botanical Research*. Vol 14. The Hebrew University of Jerusalem : Israel.
- Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. Di Dalam: JMS Bartlett and D Stirling (Eds). 2003. *Methods in Molecular Biology: PCR Protocol second edition*. Totowa: Humana press. 89-99
- Hadi, K. 2012. Kandungan DHA, EPA dan AA dalam Mikroalga Laut Spesies *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella aureus* dan *Porphyridium cruentum* yang Dikultivasi Secara Heterotrof. *Skripsi*. Depok : Universitas Indonesia.
- Harwati, T.U., Willke, T. Vorlop, K.D. 2012. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresources Technology*. Vol. 121 : 54-60.
- Hewajuli, D.A., Dharmayanti NLPI. 2014. Perkembangan Teknologi *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* dalam Mengidentifikasi Genom *Avian Influenza* dan *Newcastle Diseases*. *WARTAZOA* Vol. 24(1) : 16-29.
- Hirschberg J, Chamovitz D. 1994. "Carotenoids in cyanobacteria." In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Bryant DA, ed. (Dordrecht: Kluwer) pp 559-579

Hofmann, B. Harder T., Starick, E. Depner, K., Werner, O., Beer, M. 2009. Rapid and Highly Sensitive Pathotyping of Avian Influenza A H5N1 Virus by Using Real-Time Reverse Transcription PCR. *J Clin Microbiol.* Vol 4 (3):250-254.

InterClinical Laboratories. 2010. *Dunaliella salina* – Marine Phytoplankton. Practitioner Information.

Isnansetyo A, Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton. Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Yogyakarta: Kanisius.

Jayappriyan, K.R., R. Rajkumar, V. Venkatakrishnan, S. Nagaraj, R. Rengasamy. 2013. In Vitro Anticancer Activity of Natural β -Carotene from *Dunaliella*

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

Kabinawa, I. N. K. 1994. *Kultur Mikroalga: Aspek dan Prospek*. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Mikroalga. Bogor: Puslitbang-Biotek. LIPI.

Kabinawa, I. N. K. 2001. *Mikroalga sebagai Sumberdaya Hayati Perairan dalam Perspektif Bioteknologi*. Bogor: Puslitbang-Biotek. LIPI.

Kabinawa, I. N. K. 2008. Biodiesel Energi Terbarukan dari Mikroalga. *Warta Pertamina.* (9): 31–35.

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

Kordi, M.G.H. dan Tancung, A. B. 2005. Pengelolaan Kualitas Air. Jakarta : Rineka Cipta.

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.

Kusuma, Galih Arif, 2014. Uji Daya Hambat dari Ekstrak Tanaman Pacar Air (*Impatiens balsamica* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Ilmiah.* PS. Agrobisnis Perikanan UNSRAT, Manado. Vol 2, No1(2014).

Laven, P. and Sorgeloos, P. 1996. *Manual On The Production and Use of Life Food for Aquaculture*. FAO Fish. Tech. Pap. 361:7-42.

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

- Martosudarmo, B. dan S. Sabarudin. 1979. Makanan Larva Udang. Jepara : Balai Budidaya Air Payau Jepara.
- Marzuki. 1983. Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. Ull Yogyakarta.
- Nazir, M. 1988. Metodologi Penelitian. Jakarta : Ghalia Indonesia.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR. UK: Bios Scientific Publisher.
- Nontji, A. 1993. *Laut Nusantara*. Edisi ke-2. Jakarta: Djambatan.
- 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.
- 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.
- Pingoud, A., Jeltsch, A. 2001. Structure and Function of Type II Restriction Endonuclease. *Nucleic Acids Res* 29(18):3705-27.
- Pingoud, A., J. Alves & R. Greiger. 1993. *Restriction Enzymes*. New Jersey: Press Inc.
- Pratiwi, E.B. 2008. Sintesis dan Pengklonan Fragmen Gen tat (Transaktivator) HIV-1 ke Dalam Vektor Ekspresi Prokariot pQE-80L. *Skripsi*. Universitas Indonesia : Depok.
- Prescott G.W. 1970. How to Know the Freshwater Algae In Aerobic Culture. Applied and Environmental Microbiology.
- Prihantini, N.B., B. Putri, dan R. Yuniati, 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. Universitas Indonesia. *Bulletin Penelitian Perikanan Darat*. volume 9 no.1.
- Promega. 2009. Calculating Nucleid Acid or Protein Concentration. Protocol For Quantitating Protein Using The Glomaxulti+ Microplate. Madison, USA.
- Riybicki, E.P. 2001. Molecular biology techniques manual : PCR primer design and reaction optimization. <http://bric.postech.ac.kr/myboard/read.php?id=1843&Board=protocol>, diakses tanggal 30 Juni 2016.
- Roberts, R. J., and Macelis, D. 2001. REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* 29:268–269.
- Rosahdi, T.D., Y. Susanti, D. Suhendar. 2015. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Biopigmen pada Fraksi Aseton dari Mikroalga *Chlorella Vulgaris*. Edisi Juni 2015 Volume IX No. 1.

- Roux KH. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbour Laboratory Press 4(4): 1-6.
- Rusyani, Emy. 2001. Pengaruh Dosis Zeolit yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Isochrysis galbana* klon Tahiti Skala Laboratorium Dalam Media Komersial. IPB : Bogor.
- Sambrook, J., D.W. Russel. 2001. Molecular cloning : A laboratory manual.Vol 2. 3erd ed.
- _____, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Singleton, P., Sainsbury, D. 2006. Dictionary of Microbiology and Molecular Microbiology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Subarijanti. 1990. Pemupukan dan Kesuburan Perairan. Universitas Brawijaya : Malang.
- Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kelautan. Kanisius : Yogyakarta.
- Suharsimi, Arikunto. 2006. Metodologi Penelitian. Jakarta : Rineka Cipta.
- Surakhmad, W. 2004. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar, Metode dan Teknik (Edisi Revisi). Bandung : Penerbit Tarsito.
- 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
- Washington State Department of Ecology. 2015. *Measuring Ph in Lakes and Streams*.www.ecy.wa.gov diakses pada 6 mei 2015 pukul 11:57 WIB
- Weis, V.M., E. A. Verde, W.S. Reynolds. 2001. Characterization of a Short Form Peridinin-Chlorophyll-Protein (PCP) cDNA and Protein from The Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium Muscatinei* (Dinophyceae) From The Sea Anemone *Anthopleura Elegantissima* (Cnidaria). *J. Phycol.*38 : 157–163.
- Widi, Restu Kartiko. 2010. Asas Metodologi Penelitian. Graha Ilmu. Yogyakarta
- Yudha, A.P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella* Sp. pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi*. IPB : Bogor.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polimerase Chain Reaction. Yogyakarta (Indonesia): Penerbit Andi.

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

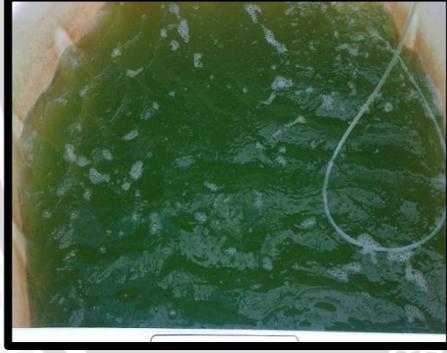
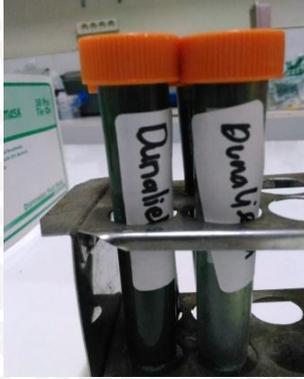
33.	Sikat	Untuk membersihkan bak
34.	Kompore gas	Sebagai sumber panas
35.	Panci	Sebagai wadah pembuatan pupuk intermediet
36.	Jerigen	Sebagai wadah pupuk dan vitamin
37.	Kamera	Untuk mendokumentasikan kegiatan
38.	Stericell	Untuk mensterilkan alat yang terbuat dari kaca
39.	Mortar dan Alu	Untuk menggerus 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

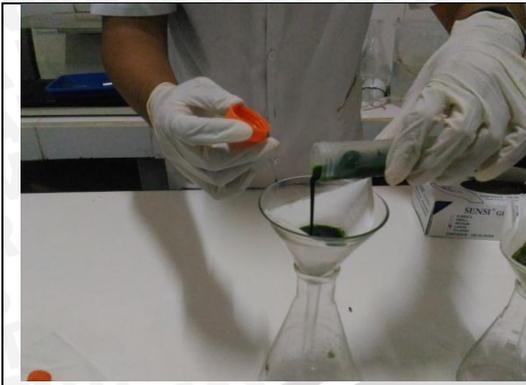


Lampiran 2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

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.	Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit	Untuk isolasi RNA <i>N. oculata</i>
25.	Primer	Sebagai komplementer dari DNA target
26.	Akuades	Untuk mensterilkan alat
27.	3,7 µl H ₂ O, 2 µl Buffer RT 10x, 0,5 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

Foto Kegiatan	Keterangan
	Kultur <i>Dunaliella salina</i> toples 4 liter
	Kultur <i>Dunaliella salina</i> karboi 8 liter
	Kultur <i>Dunaliella salina</i> pada bak fiber 500 liter
	Sampel <i>Dunaliella salina</i>



Penyaringan sampel *Dunaliella salina*



Proses isolasi sampel *Dunaliella salina*



Inkubasi sampel *Dunaliella salina*



Proses sentrifuse Sampel *Dunaliella salina*





Penimbangan sampel *Dunaliella salina*



Melakukan prosedur PCR



Prose Elektroforesis Gel Agarosa



Visualisasi cDNA dengan menggunakan UV Transluminator



Proses Elektroforesis cDNA



Pengoperasian Mesin PCR



Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi yang berfungsi sebagai komplemen DNA



Lampiran 4. Kepadatan Sel Kultur *Dunaliella salina*

Hari Ke-	Toples	Carboy	Intermediet
0	248	204	136
1	584	380	208
2	948	620	288
3	1112	756	376
4	1156	860	564
5	1292	924	417
6	1924	1056	-
7	1736	1184	-
8	-	1023	-

