SINTESIS RNA PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN (PCP) PADA MIKROALGA LAUT Dunaliella salina YANG DIKULTUR SECARA IN VIVO

SKRIPSI PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2016

SINTESIS RNA PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN (PCP) PADA MIKROALGA LAUT Dunaliella salina YANG DIKULTUR 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:

ENI MUJAYANAH NIM. 125080101111027



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2016

BRAWIJAYA

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

SINTESIS RNA PERIDININ CHLOROPHYLL PROTEIN (PCP)
PADA MIKROALGA LAUT Dunaliella salina
YANG DIKULTUR SECARA IN VIVO

Oleh : ENI MUJAYANAH NIM. 125080101111027

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

Dosen Penguji I

(Dr. lr. Mulhammad Musa, MS) NIP.19570507 198602 1 002

Tanggal:

1 6 AUG 2016

Dosen Penguji II

(Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, MSi) NIP. 19730702 20051 2 001

Tanggal:

11 6 AUG 2816

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, MSi) NIP. 19730404 200212 2 001

Tanggal:

1 6 AUG 2016

Dosen Pembimbing II

(<u>Dr. Asus Maizar S.H., S.Pi, MP</u>) NIP. 19520402 198003 2 001

Tanggal:

17 6 AUG 2016

(Dr. ir. Aming Wilujeng Ekawati, MS)

NIP. 19620805198603 2 001

Tanggal:

1 6 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, 4 Juni 2016

Mahasiswi

Eni Mujayanah NIM. 125080101111027

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:

Fiqie Zulfikar Sya'roni

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

Ketua Peneliti,

(Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si) NIP. 19730404 200212 1 001

BRAWIJAYA

UCAPAN TERIMA KASIH

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

- Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan ridho-Nya sehingga penyusunan laporan skripsi ini dapat terselesaikan.
- Ibu Dr. Uun Yanuhar, SPi., MSi., dan Bapak Dr. Asus Maizar S.H., S.Pi., MSi. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan, bimbingan, dan motivasi yang membangun kepada penulis hingga skripsi ini dapat terselesaikan
- 3. Bapak Dr. Ir. Muhammad Musa, MS. dan Ibu Dr. Yuni Kilawati, S.Pi. MSi selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang bermanfaat untuk perbaikan tugas akhir ini.
- 4. Ibu Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS selaku Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan FPIK Universitas Brawijaya.
- 5. Bapak Dr. Ir. Mulyanto, M.Si Ketua Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan FPIK Universitas Brawijaya.
- 6. Staf pengajar dan pegawai Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan segala ilmu, masukan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis
- 7. Kedua orang tua, Bapak Darmun dan Ibu Komariyah tercinta, terima kasih yang tak terhingga atas doa, dukungan, kasih sayang, pengorbanan, dan ketulusannya dalam mendampingi penulis. Adik tercinta Wisnu Sulaiman, serta seluruh keluarga yang telah memberikan doa, dukungan dan kasih sayang.

- 8. Terima kasih untuk sahabat-sahabat tercinta, Zulfa, Mifta, Hima, Dian Rana, Dian Mega, Titin Eka, Yoeshi, Tria dan Yuni Dwi atas waktu dan kebersamaan selama empat tahun ini, juga doa dan dukungan dari kalian semua.
- 9. Teman-teman seperjuangan MSP 2012, terima kasih untuk persahabatan dan kekeluargaan selama empat tahun ini rek. Semoga kita bisa sukses di jalan dan kita masing-masing. See you on top guys ©©©
- 10. Teman-teman kos Slamet Tercinta, Walidung, yogi, miki, unni Linda, susita, Yuliana, dewi, cenul, nikmok, Melinda, mbk indah, tya makasih buat doa, waktu dan dukungan selama ini. Maaf kalau selalu merepotkan, semoga kekeluargaan ini dapat terus terjaga rek. Terima kasih banyak juga buat pinjeman laptopnya rek, sehingga laporan ini dapat selesai.
- 11. Teman-teman Tim Alga, Nico, Vava, Anto, Fiqi, Miftah, Wima dan Anjar terima kasih atas waktu, kerjasama, semangat dan kesabaran kalian gaess buat penelitian ini. Maaf kalau sering meneluh dan merepotkan. Sukses buat kita semua yess.
- 12. Keluarga besar Tim Anak Bu Uun, Tim KHV, VNN, serta Tim Makro dan Mikronuklei terimakasih banyak atas doa, kerjasama, semangat dan dukungannya. Terimakasih untuk waktu satu semester ini gengs. Walaupun kadang banyak salah paham, kekeluargaan ini semga dapat selalu terjaga.
- 13. Bapak Ismail selaku laboran Laboratorium Biomol dan Genetika Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang yang telah membantu dan melayani Tim Alga dalam pelaksanaan penelitian.
- Staff Laboratorium Pakan Alami dan seluruh pegawai Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo.

15. Dan kepada semua pihak yang telah begitu banyak membantu namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmat-Nya bagi kita semua, terima kasih untuk bantuannya selama ini, semoga dapat menjadi amal ibadah di hadapan-Nya.Aamiin.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kesalahan dalam penyusunan skripsi ini, oleh sebab itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan guna perbaikan di kemudian hari.

Akhir kata, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang bioteknologi perikanan.

Malang, 29 Juli 2016

penulis



RINGKASAN

ENI MUJAYANAH. Skripsi mengenai Sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) Pada Mikroalga Laut *Dunaliella salina* yang Dikultur Secara *In Vivo*. (Di bawah bimbingan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si. dan Dr.Asus Maizar S.H., S.Pi, MP)

Dunaliella salina merupakan alga hijau dari family Polyblepharidaceae yang bersifat uniseluler, memiliki dua flagellata, bersifat motil, serta tidak mengandung dinding sel. *D. salina* dapat menghasilkan produk-produk yang penting, yaitu gliserol, β-karoten, xanthofil seperti zeaxanthin, cryptoxanthin, lutein dan lain-lain (Jayappriyan *et. al.*, 2013).

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). (Weis et al., 2002). PCP merupakan salah satu komponen penyusun nutrisi pada mikroalga yang dapat digunakan sebagai anti bakteri dan virus. PCP mempunyai peran penting dalam proses fotosintesis dan mampu dijadikan sebagai antioksidan dan antibodi (Kuntarti, 2014). Dalam mikroalga, PCP berada dalam bentuk RNA. Pada teknik PCR, RNA tidak dapat digunakan sebagai cetakan, oleh karena itu perlu dilakukan proses transkripsi balik terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (complementary DNA). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR (Widowati, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui umur panen *D. salina* yang tepat digunakan untuk isolasi serta untuk mengetahui panjang pita cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) *D. salina* yang keluar melalui teknik RT-PCR. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode deskriptif dan eksploratif dengan teknik pengambilan data primer dan sekunder. Pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi lapangan dan studi pustaka. Teknik pengambilan sampel dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu dimulai dengan kultur laboratorium dan semi massal *D. salina*, isolasi RNA *D. salina*, uji kemurnian RNA, RT-PCR dan amplifikasi cDNA PCP, serta elektroforesis agarosa cDNA yang divisualisasi dengan UV *transluminator*. Data pendukung yang digunakan dalam penelitian ini adalah data kualitas air kultur yang meliputi pH, suhu dan salinitas serta kepadatan sel *D. salina*.

Kepadatan sel *D. salina* pada kultur laboratorium lebih tinggi jika dibandingkan dengan kultur intermediet. Kepadatan tertinggi *D. salina* pada kultur toples yaitu sebesar 1924 sel/liter pada hari ke-6, pada kultur carboy sebesar 1184 sel/liter pada hari ke-7, dan pada skala intermediet sebesar 564 sel/liter pada hari ke-4. Pengukuran kualitas air media kultur diperoleh nilai suhu 22°C pada kultur laboratorium (volume 5 dan 15 liter) dan kisaran suhu 24-26°C pada kultur skala intermediet, nilai pH pada kultur skala laboratorium sebesar 8,1-8,8 dan intermediet sebesar 8,4-8,8, dan salinitas sebesar 35-36 ppt pada skala laboratorium dan 34-35 ppt pada skala intermediet. *D. salina* yang digunakan untuk isolasi berasal dari hasil panen kultur 500 liter saat sel mengalami fase stasioner (mulai mengalami penurunan kepadatan).

Nilai konsentrasi RNA yang diperoleh dari hasil isolasi yaitu sebesar 25,8µg/ml dengan nilai kemurnian sebesar 1,33 (A260/A280). Pada penelitian ini proses amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus, sehingga pada akhir siklus diperoleh amplicon sebesar 1100 x 10⁹ copy molekul DNA. Hasil elektroforesis agarosa cDNA yang divisualisasikan dengan menggunakan UV *Transluminator*

menunjukkan terbentuknya pita DNA. Pita DNA yang terbentuk memiliki ukuran sekitar 310 pb dan pita DNA yang diperoleh cukup tebal. Hal tersebut menunjukkan bahwa amplifikasi cDNA berhasil dilakukan dengan baik.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *D. salina* yang digunakan untuk sintesis RNA pigmen PCP yaitu hasil kultur yang dipanen pada saat sel memasuki fase stasioner dan sintesis RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) *Dunaliella salina* berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR). Hasil visualisasi *UV Transluminator* menunjukkan bahwa cDNA yang berhasil disintesis mempunyai panjang pita sebesar 310 pb (pasang basa).

Saran yang diberikan dari penelitian ini adalah dalam melakukan proses isolasi harus dilakukan dalam keadaan yang benar-benar steril sehingga tidak terjadi kontaminasi dan diperoleh nilai konsentrasi dan kemurnian RNA yang tinggi. Selanjutnya perlu dilakukan pemanfaatan PCP sebagai imunostimulan terhadap ikan, sehingga dapat mengurangi pemakaian bahan kimia yang dapat menurunkan kualitas perairan.



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan skripsi dengan judul Sintesis RNA Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) Pada Mikroalga Laut Dunaliella salina yang Dikultur 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, 12 Juli 2016

penulis

DAFTAR ISI

THE THE PARTY OF T	ıaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	vii
RINGKASAN KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1 3
1.1 Latar Belakang	4 4
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA 2.1 Mikroalga	5
2.2 Dunaileila saiina	ხ
2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi <i>Dunaliella salina</i>	6
2.2.3 Ekologi <i>Dunaliella salina</i>	9
2.2.5 Kandungan dan Manfaat Dunaliella salina	10
2.2.6 Fase Pertumbuhan 2.2.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>Dunaliella salina</i>	a 13
2.3 Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)	
2.5 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	19
2.6 Primer	21
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	

3.3 Metode Penelitian	23
3.3.1 Data Primer	24
3.3.2 Data Sekunder	25
3.4 Prosedur Penelitian	
3.4.1 Kultur Dunaliella salina	25
3.4.2 Penghitungan Kepadatan Sel	
3.4.3 Pengukuran Kualitas Air	30
3.4.4 Pemanenan Dunaliella salina	31
3.4.5 Isolasi RNA Total Dunaliella salina	
3.4.6 Pengukuran Konsentrasi RNA Total	33
3.4.7 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)	34
3.4.8 Elektroforesis Agarosa cDNA	
H-ESTLY	
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Identifikasi Jenis <i>Dunaliella salina</i>	37
4.1 Identifikasi Jenis <i>Dunaliella salina</i>	39
4.3 Pengukuran Kualitas Air	43
4.3.1 Suhu	43
4.3.2 pH	
4.3.3 Salinitas	
4.4 Isolasi RNA	46
4.5 Konsentrasi RNA Total	48
4.6 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)	50
4.7 Elektroforesis Agarosa cDNA	54
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5. KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Kesimpulan	57
5.2 Saran	57
DAFTAR ISTILAH	
DAFTAR PUSTAKA	50
DAFTAK PUSTAKA	59
	C.F.

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Pupuk Walne	26
2. Pengoperasian Program RT-PCR	35
3. Hasil Pengukuran Kualitas Air Kultur	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Dunaliella salina	6
2. Letak PCP Dunaliella salina	16
3. Morfologi Dunaliella.	38
4. Dunaliella salina	39
Kurva Pertumbuhan Sel <i>Dunaliella salina</i> Kultur <i>D. salina</i>	40
6. Kultur D. salina	41
7. Penambahan nitrogen cair	47
8. Proses penambahan RNase-free water	48
9. Hasil Pengukuran Konsentrasi RNA	49
10. Siklus RT-PCR	50
11. Pengoperasian mesin PCR	53
12. Elektroforesis Agarosa cDNA	54
13. Hasil Amplifikasi cDNA PCP	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Alat yang Digunakan dalam Penelitian	65
2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian	67
3. Kepadatan Sel Kultur Dunaliella salina	68
4. Foto Kegiatan Penelitian	69



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tidak dapat dipungkiri bahwa pemanfaatan sumberdaya di darat saat ini sudah berlebih sehingga manusia harus mencari sumber alternatif baru untuk makanan, nutrisi, energi terbarukan dan sebagainya. Lingkungan laut memiliki beragam sumberdaya yang dapat dimanfaatkan untuk menggantikan sumberdaya terrestrial. Dewasa ini mikroalga telah banyak dikembangkan karena komoditi hasil perairan ini memiliki potensi besar untuk dimanfaatkan (Jayappriyan et. al., 2013).

Mikroalga termasuk dalam kelompok Thallophyta karena tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati, akan tetapi memiliki pigmen klorofil. Menurut Rosahdi et. al. (2015), mikroalga merupakan tumbuhan air berukuran mikroskopik, mengandung klorofil dan pigmen yang dapat menyerap cahaya matahari pada saat proses fotosintesis. Kandungan gizi mikroalga sangatlah lengkap. Kandungan karbohidrat ditemukan hingga 60% dari berat kering mikroalga. Kandungan protein mencapai 70% sehingga dijadikan alasan utama sebagai sumber protein.Lemak mikroalga tersusun dari asam lemak jenuh dan tidak jenuh dengan rata-rata prosentase sekitar 2-21% berat kering. Mikroalga juga menyediakan sumber asam lemak tak jenuh, vitamin, antioksidan, dan pigmen (Harwati, 2012).

Seiring dengan perkembangan teknologi, penelitian mengenai mikroalga semakin banyak dikembangkan. Perkembangan penelitian ditujukan untuk menghasilkan produk yang bernilai tinggi. Jenis dan kualitas produk tergantung pada spesies mikroalga, kondisi kultur, dan metode penemuan. Beberapa spesies mikroalga dibudidayakan secara komersial untuk memproduksi karotenoid, asam lemak tak jenuh, polisakarida, pakan ternak, produk kesehatan,

dan *biofuel* (Harwati, 2012; Veyel *et. al.*, 2014). Aplikasi mikroalga saat ini dan yang akan datang semakin banyak dan beragam, yang meliputi pangan dan pakan, kesehatan, industri dan energi, karotenoid, antivirus, dan bahan kecantikan (Cadoret *et. al.*, 2012).

Dunaliella salina merupakan alga hijau dari family Polyblepharidaceae yang bersifat uniseluler, memiliki dua flagellata, bersifat motil, serta tidak mengandung dinding sel. *D. salina* dapat menghasilkan produk-produk yang penting, yaitu gliserol, β-karoten, xanthofil seperti zeaxanthin, cryptoxanthin, lutein dan lain-lain (Jayappriyan *et. al.*, 2013). Kandungan protein *D. salina* sebesar 57%, karbohidrat 32% dan lemak 6% dari berat keringnya (Harwati, 2012). Kandungan protein yang tinggi sehingga dimanfaatkan sebagai makanan kesehatan. Selain itu juga dimanfaatkan sebagai antibakteri, jasad pakan yang cukup baik, sumber gliserol dan β-karoten (Yudha, 2008).

Di Indonesia, penelitian mengenai *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada mikroalga *Dunaliella salina* belum banyak dieksplorasi. Menurut Kuntarti (2014), PCP merupakan salah satu komponen penyusun nutrisi pada mikroalga yang dapat digunakan sebagai anti bakteri dan virus. PCP mempunyai peran penting dalam proses fotosintesis dan mampu dijadikan sebagai antioksidan dan antibodi.

Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) merupakan pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. Terdapat dua bentuk PCP, yaitu modimer (bentuk pendek) dengan masa molekul sekitar 14-16 kDa dan monomer (bentuk panjang) dengan masa molekul sekitar 30-35 kDa (Weis et. al., 2002). Pigmen PCP terdiri atas empat molekul peridinin dan satu molekul klorofil. Peridinin merupakan bagian utama dari PCP (Krueger et. al., 2001).

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

Manfaat *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) yang besar sangat memungkinkan untuk pengembangan produk PCP yang lebih banyak lagi, terutama sebagai antivirus dan antibodi dalam bidang perikanan. Namun permasalahnya, untuk membuat produk tertentu diperlukan jumlah PCP yang banyak, sementara bahan yang ada terbatas.PCP sendiri di dalam mikroalga berbentuk RNA. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai sintesis RNA PCP dari mikroalga *Dunaliella salina* agar menjadi bentuk pita DNA.

Pada teknik PCR, RNA tidak dapat digunakan sebagai cetakan, sehingga perlu dilakukan proses transkripsi balik terhadap molekul mRNA agar diperoleh molekul cDNA (complementary DNA). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR (Widowati, 2013). RT-PCR dalam penelitian ini digunakan untuk mensintesis RNA dan mengamplifikasi komplemen DNA (cDNA) PCP, sehingga dapat menghasilkan PCP dengan jumlah yang besar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, rumusan masalah dari penelitian ini adalah berapakah umur kultur *Dunaliella salina* yang digunakan untuk isolasi RNA PCP dan berapakah panjang pita cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) *D. salina* yang keluar melalui teknik RT-PCR.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang dijelaskan pada subbab sebelumnya, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1. Memproduksi *Dunaliella salina* pada umur yang tepat untuk digunakan sebagai bahan isolasi RNA PCP.
- 2. Mendapatkan komplemen DNA (cDNA) PCP *D. salina* dan mengetahui ukuran panjang pita cDNA.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini secara teoritis adalah diharapkan dapat sebagai informasi mengenai sintesis *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) *Dunaliella salina* dan sebagai referensi terhadap penelitian selanjutnya.

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

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

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan mikroorganisme tingkat sel yang termasuk dalam organisme tingkat rendah. Mikroalga tidak memiliki akar, batang dan daun sejati sehingga termasuk dalam filum Thallophyta. Meskipun demikian, mikroalga memiliki pigmen klorofil sehingga dapat melakukan fotosintesis. Dalam proses fotosintesis, mikroalga membutuhkan air, CO₂ dan sinar matahari serta bahan anorganik dan menghasilkan energi kimiawi dalam bentuk karbohidrat, lemak, protein, dan lain-lain. Energi tersebut dimanfaatkan untuk biosintesis sel, pertumbuhan sel, bergerak dan reproduksi (Kabinawa, 2001).

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 merupakan organisme yang mengandung gizi yang sangat lengkap. Zat tepung, gula, dan polisakarida lain dalam bentuk karbohidrat ditemukan hingga 60% dari berat kering mikroalga. Kandungan protein mencapai 70% berat kering mikroalga sehingga dijadikan alasan utama sebagai sumber protein. Lemak mikroalga tersusun dari asam lemak jenuh dan tidak jenuh dengan rata-rata prosentase sekitar 2-21% berat kering. Mikroalga juga menyediakan sumber asam lemak tak jenuh, vitamin, antioksidan, dan pigmen (Harwati, 2012).

2.2 Dunaliella salina

2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi Dunaliella salina

Dunaliella salina merupakan alga hijau dari family Polyblepharidaceae yang bersifat uniseluler, memiliki dua flagella pendek untuk bergerak perlahan, bersifat motil, serta tidak mengandung dinding sel. Sel berbentuk bulat dengan warna kemerahan atau oranye. Pada saat intensitas cahaya rendah, warna merah akan hilang dan memungkinkan untuk dapat melihat isi kloroplas yang berwarna hijau (Ginzburg, 1988; Jayappriyan et. al., 2013). Morfologi D. salina disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Dunaliella salina (InterClinical Laboratories, 2010)

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 (ratarata 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 (Borowiztka, 2013; Borowiztka, 2007).

Setidaknya terdapat 28 spesies dari genus Dunaliella, salah satunya adalah Dunaliella salina. Bold dan Wynne (1985) menjelaskan klasifikasi D. AS BRAWIUS L salina adalah sebagai berikut.

Phylum : Chlorophyta

Kelas : Chlorophyceae

: Volvocales Ordo

Famili : Polyblepharidaceae

: Dunaliella Genus

Spesies : Dunaliella salina

2.2.2 Bagian Sel Dunaliella salina

Dunaliella salina merupakan organisme eukariotik tingkat sel. Sel ini terdiri dari bagian-bagian (organel) sel yang mempunyai fungsi dan bentuk tertentu. Bagian-bagian sel ini dapat dilihat menggunakan mikroskop elektron. Menurut Ginzburg (1988), organel sel pada Dunaliella adalah sebagai berikut :

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. 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, begitu pula ukurannya juga tidak teratur. Akumulasi lemak pada eyespot dipengaruhi oleh faktor usia mikroalga, dimana jumlah akumulasi akan berlipat pada fase log dan stasioner.

c. 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.

d. Mitokondria

Banyak bagian dari mitokondria yang dapat dilihat, terutama antara nukleus dan kloroplas, tetapi juga terdapat di bagian lain sel. Mitokondria dikelilingi oleh perluasan dari membran kloroplas.

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. 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.

g. 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 Ekologi Dunaliella salina

Dunaliella salina merupakan organisme eukariotik yang sangat toleran terhadap kondisi lingkungannya. Dia dapat hidup pada lingkungan dengan pH 11, 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 (Borowiztka, 1994).

Salah satu karakteristik dari *Dunailella 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%. Alga ini 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. Alga ini dapat tumbuh optimal pada kisaran suhu 20-40°C (Arif, 2014).

2.2.4 Reproduksi Dunaliella salina

Dunaliella salina bereproduksi dengan dua cara, yaitu seksual dan aseksual, reproduksi seksual terjadi dengan cara menghasilkan isogamet dan zigospora (Borowiztka, 2013). 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 (Arif, 2014).

2.2.5 Kandungan dan Manfaat Dunaliella salina

Dunaliella salina mengandung 57% protein, 32% karbohidrat, dan 6% lemak dari berat keringnya (Harwati, 2012). InterClinical Laboratories (2010) menyebutkan bahwa di alam *Dunaliella salina* menyumbangkan keseimbangan vitamin, mineral, dan nutrien. 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, konstraksi 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*.

BRAWIJAYA

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 berberan sebagai antioksidan, antitumor dan antimutagen.

2.2.6 Fase Pertumbuhan

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

2.2.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Dunaliella salina

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

a. 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).

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 nutrien esensial yang sangat penting untuk

BRAWIJAY

proses metabolism mikroalga (ATP, DNA, dan RNA). Fosfor ditemukan dalam bentuk H2PO₄⁻ dan HPO₄²⁻ (Harwati, 2012).

b. Cahaya

Dunaliella salina merupakan plankton yang membutuhkan cahaya untuk proses fotosintesis. Di alam cahaya yang digunakan berasal dar cahaya matahari, sementara dalam kultur cahaya dapat digantikan dengan lampu TL. Cahaya yang digunakan sebagai sumber energi untuk fotosintesis haruslah cukup (Arif, 2014).

Dalam kultur mikroalga, kedalaman kultur dan kepadatan sel organism menjdi faktor yang menetukan kebutuhan cahaya. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan terjadinya fotoinhibisi atau pemanasan. Intensitas cahaya 1000 lux merupakan intensitas yang cocok untuk kultur mikroalga dalam erlenmeyer, sedangkan intensitas 5000-10000 lux, cocok untuk kultur mikroalga dengan volume besar (Kuntari, 2014).

c. Suhu

Suhu berpengaruh terhadap proses fisika, biologi dan kimia di dalam organisme. Secara tidak langsung suhu berpengaruh terhadap metabolisme, daya larut gas-gas, serta berbagai reaksi kimia dalam perairan.Kultur skala laboratorium sebaiknya dilakukan pada suhu antara 21-25°C agar pertumbuhannya tidak terlalu cepat sehingga memperlambat fase kematian (Jusadi, 2003).

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

d. pH

Nilai pH menggambarkan minus logaritma ion hodrogen yang terlepas dalam suatu cairan. pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik (Kordi dan Tancung, 2005). pH air diketahui dapat mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik. Variasi pH dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan fitoplankton dalam beberapa hal, antara lain mempengaruhi ketersediaan nutrien mengubah keseimbangan dari karbon organik, dan dapat mempengaruhi fisiologi sel (Ernest, 2012).

Pada saat nilai pH rendah (keasaman tinggi), kondisi oksigen terlarut akan menurun, begitu pula sebaliknya pada kondisi basa oksigen terlarut akan meningkat (Kordi dan Tancung, 2007). Secara umum kisaran pH yang optimum pada kultur mikroalga adalah antara 7–9 (Harwati, 2012). Rata-rata pH untuk kultur sebagian besar spesies mikrolga antara 7-9, dengan optimum rata-rata pH berkisar antara 8,2-8,7 (Lavens dan Sorgelos,1996).

e. Salinitas

Salinitas menunjukkan kadar garam yang terlarut dalam satu kilogram air laut. Salinitas merupakan faktor yang dapat mempengaruhi kehidupan organisme perairan dalam mempertahankan tekanan osmotik antara protoplasma organisme dengan air sebagai media hidup mikroalga. Perubahan kadar salinitas secara cepat dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Untuk mengatur salinitas yang terlalu tinggi pada kultur mikroalga dapat dilakukan dengan penambahan air tawar pada media kultur (Kuntari, 2014).

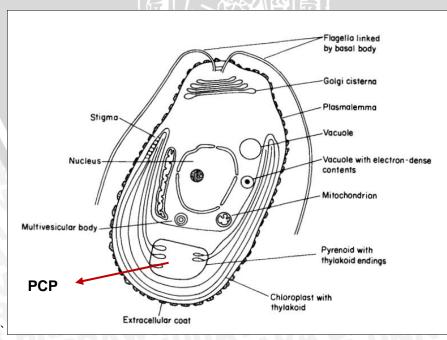
Salah satu karakteristik dari *Dunailella salina* adalah bersifat halopilik, yaitu organisme yang menyukai lingkungan dengan salinitas yang tinggi. Kemampuannya mentolerir salinitas sangat tinggi, dia dapat tumbuh baik pada salinitas normal namun masih dapat bertahan lagi hingga pada kondisi NaCI

BRAWIJAYA

jenuh, yaitu sekitar 31%. Pada umumnya fitoplankton air laut akan tumbuh optimal dengan salinitas diantara 25-40 ppt (Rusyani, 2001).

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 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). Letak PCP pada D. salina disajikan pada gambar 2.



Gambar 2.Letak PCP Dunaliella salina (Ginzburg, 1988)

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). Menurut Wicox (2000) *dalam* Kuntari (2014), PCP merupakan organel yang berada di dalam stroma kloroplas, tidak berikatan dengan membran dan dikelilingi oleh butiran-butiran halus zat pati.

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).

2.4 Isolasi RNA Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)

Asam ribonukleat (RNA) merupakan asam nukleat beruntai tunggal yangberperan utama dalam proses ekspresi gen. Asam ribonukleat (RNA) merupakan salah satu molekul asam nukleat yang terbentuk dari asam deoksiribonukleat (DNA). Fungsi dari RNA adalah mensintesis protein dalam inti sel (Tiara et al., 2014). RNA merupakan polimer yang disebut polinukleotida, dimana setiap polinukleotida tersusun atas monomer-monomer nukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas tiga bagian, yaitu gugus fosfat, basa nitrogen dan gula pentosa. 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. 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. tRNA berfungsi membawa asam amino ke ribosom pada saat translasi (Agustina *et. al.*, 2011).

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 membran sel untuk menampakkan RNA, pemisahan RNA dari zat dan molekul lainnya, seperti DNA, lipid, protein dan karbohidrat, dan terakhir pemulihan RNA dalam bentuk murni (Dale dan Schantz, 2001).

RNA berbeda dengan DNA, RNA berupa untai tunggal dan relatif tidak stabil. Proses isolasi dan penyimpanan RNA harus sangat diperhatikan. Hal ini dilakukan agar RNA tidak terdegradasi oleh enzim RNase yang banyak ditemukan di lingkungan. Selama proses isolasi RNA, sel atau jaringan dihomogenkan dengan larutan yang dapat menghambat kerja RNase, misalnya guanidium isotiosianat. Pada saat pemisahan RNA dari DNA genom, beberapa metode dapat digunakan. Pada tahap akhir prosedur, RNA yang dipurifikasi dipresipitasi dengan etanol. Larutan RNA dalam air harus disimpan dalam keadaan beku (Lyrawati, 2004).

2.5 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif (Gaffar, 2007). Pada teknik PCR, RNA tidak dapat digunakan sebagai cetakan, oleh karena itu perlu dilakukan proses transkripsi balikterhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementary* DNA). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR (Widowati, 2013).

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

Pada metode Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untai mRNA diubah menjadi DNA tunggal dengan bantuan enzim reverse transcriptase dan primer oligo-dT. Primer oligo-dT akan menempel pada ujung 3' poli-A mRNA, selanjutnya enzim reverse transcriptase akan membentuk untai DNA awal dengan cara mensintesis basa-basa nukleotida mRNA dengan basa komplemennya. Apabila untai pertama DNA telah terbentuk, maka cetakan mRNA akan terdegradasi oleh bantuan enzim RNase (Kendall dan Riley, 2000). Untai pertama DNA merupakan untai tunggal sehingga agar menjadi DNA untai ganda dibutuhkan primer forward untuk membuat komplemen untai tunggal

BRAWIJAYA

tersebut. DNA untai ganda yang telah terbentuk kemudian diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR standar (Weaver dan Hedrick, 1997 *dalam* Annisa, 2012).

Proses PCR membutuhkan cetakan atau templat berupa DNA untai ganda. Cetakan ini mengandung DNA target yang akan diamplifikasi untuk pembentukan molekul DNA baru. Selain itu juga dibutuhkan enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida. Pada kondisi tertentu, kedua primer akan mengenali dan berikatan dengan untaian DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat, DNA polimerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templat. DNA polimerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan. Sehingga proses penambahan dNTP yang dikatalisis oleh enzim DNA polimerase ini berlangsung dengan arah 5'→3' dan disebut reaksi polimerisasi. Enzim DNA polimerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA templat. Pada teknik PCR ini melibatkan banyak siklus dimana pada masing-masing siklus terdiri dari tiga tahap yang berurutan, yaitu pembukaanuntai ganda DNA templat (denaturasi), penempelan pasangan primer pada DNA target (annealing) dan pemanjangan primer (extension) atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh enzim DNA polymerase (Gaffar, 2007).

2.6 Primer

Primer merupakan oligonukleotida pendek berantai tunggal yang memiliki urutan komplemen dengan DNA templat yang akan diamplifikasi atau diperbanyak. Primer biasanya memiliki panjang berkisar antara 20-30 pasang basa. Untuk merancang urutan primer, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target (Gaffar, 2007).

Primer adalah suatu oligonukleotida beruntai tunggal yang memiliki 10 hingga 40 pasangan basa yang merupakan komplementer dari DNA target. Primer yang digunakan sangat berpengaruh terhadap proses PCR. Apabila primer yang digunakan tidak sesuai maka reaksi polimerasi antara gen target dengan primer tidak dapat terjadinya (Kusuma, 2010).

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

2.7 Elektroforesis Agarosa

Molekul DNA memiliki muatan listrik negatif, sehingga apabila ditempatkan pada suatu medan listrik muatan ini akan bermigrasi menuju kutub positif. Molekul DNA kebanyakan memiliki bentuk dan muatan listrik yang hampir sama sehingga fragmen-fragmen dengan ukuran yang berbeda tidak dapat dipisahkan oleh proses elektroforesis biasa. Tetapi ukuran molekul DNA

merupakan suatu faktor pemisahan jika elektroforesis dikerjakan dalam suatu gel. Gel yang dibuat dari agarosa, poliakrilamid atau campuran keduanya akan membentuk kerangka pori-pori yangkompleks untuk dilewati molekul DNA menuju elektroda positif. Semakin kecil molekul DNA, maka kecepatan migrasi melewati gel juga semakin cepat, sehingga molekul DNA akan terpisah berdasarkan ukurannya (Kusuma, 2010).

Elektroforesis agarosa merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang didasarkan pada pergerakan mulekul bermuatan dalam media penyangga matriks stabil di bawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan dalam elektroforesis ini adalah gel agarosa poliakrilamid. Perbedaan dari atau elektroforesis gel agarosa poliakrilamidyaitu, elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 pb dan dijalankan secara horizontal, sedangkan elektroforesis poliakrilamid dapat memisahkan 1 pb dan dijalankan secara vertikal. Elektroforesis poliakrilamid biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA (Gaffar, 2007).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah sintesis *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) mikroalga laut *Dunaliella salina* yang dikultur secara *in Vivo*. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan komplemen DNA (cDNA) PCP *D. salina*. Selain itu juga data pendukung selama kultur *D. salina* yang meliputi kepadatan sel dan parameter kualitas air, yaitu pH, suhu dan salinitas.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan diperlukan untuk menunjang keberhasilan penelitian.

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini beserta fungsinya disajikan pada lampiran 1 dan 2.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif eksploratif. Metode deskriptif dalam penelitian ini bertujuan untuk melaporkan hasil sintesis PCP mikroalga *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 sistematik 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 variabel, gejala atau keadaan (Arikunto, 2002 dalam Mabrudy, 2013). Metode eksploratif pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan cDNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) *D. salina*.

3.3.1 Data Primer

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

1. 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).

2. 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).

3. 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.

3.3.2 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.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Kultur Dunaliella salina

Semua alat dan bahan yang akan digunakan untuk kultur *D. salina* harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi merupakan suatu perlakuan yang bertujuan untuk membersihkan alat dan bahan dari mikroorganisme yang tidak diinginkan. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk melakukan sterilisasi alat dan bahan sehingga bebas dari kontaminasi, misalnya dengan menggunakan autoclave, perebusan, penyaringan dan penambahan kaporit.

Peralatan yang terbuat dari gelas seperti *test tube*, erlenmeyer, gelas ukur, dan pipet tetes disterilkan menggunakan stericell. Peralatan tersebut dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun, dibilas dengan air tawar dan ditunggu hingga kering. Setelah kering ditutup rapat menggunakan aluminium foil kemudian disterilkan dengan stericell pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Sterilisasi peralatan lain seperti toples, carboy, selang aerasi dan batu aerasi dilakukan dengan mencuci dan menyikat terlebih dahulu dengan menggunakan detergen, kemudian dibilas dengan air tawar. Untuk carboy dan aerator, setelah dicuci kemudian direndam dengan menggunakan larutan kaporit dengan dosis 10 ppm selama 24 jam. Bak conicel disterilisasi dengan cara dicuci dan disikat dengan detergen sampai kotoran-kotoran yang menempel hilang, kemudian dibilas dengan air tawar. Selanjutnya dinding bak disiram dengan kaporit hingga kaporit kering. Setelah kering, sikat kembali dan bilas dengan air tawar.

Media yang digunakan untuk kultur adalah air laut yang telah disterilkan dan ditambah nutrisi (dipupuk). Air laut disterilkan dengan cara penyaringan, perebusan, dan penambahan larutan kaporit. Jenis pupuk yang digunakan pada kultur ini yaitu pupuk Conwey atau Walne dengan dosis pemakaian 1 ml/L. Pupuk Walne digunakan karena komposisinya sederhana dan tidak mengandung logam berat. Adapun komposisi dari pupuk Walne disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Pupuk Walne

Skala Laboratorium		Skala Intermediet		
Bahan	Dosis	Bahan	Dosis	
Aquades	1 ltr	Air	10 liter	
EDTA	45 gr	KNO ₃	1000 gr	
NaNO ₃	100 gr	Na ₂ HPO ₄	100 gr	
H ₃ BO ₃	33,6 gr	FeCl ₃	13 gr	
NaH₂PO₄	20 gr	EDTA	100 gr	
MnCl	0,36 gr	LAVAL		
FeCl ₃	1,3 gr		HUAUI	

Kultur murni *D. salina* terbagi menjadi dua tahapan. Tahap pertama merupakan tahap kultur laboratorium yang dimulai dengan melakukan kultur volume 3 liter dan 15 liter. Tahap kedua yaitu kultur intermediet yang dilakukan pada bak conicel dengan volume 500-1000 liter. Bibit awal *D. salina* diperoleh dari air laut, kemudian dibiakkan dalam media agar. Koloni *D. salina* yang telah tumbuh banyak kemudian diisolasi dan digunakan sebagai starter. Menurut BPBAP Situbondo (2012), tahap-tahap kultur plankton skala laboratorium adalah sebagai berikut.

1. Kultur Volume 5 Liter

Langkah-langkah yang dilakukan pada kultur plankton volume 5 liter adalah sebagai berikut :

- Dibersihkan rak yang akan digunakan untuk meletakkan toples dengan menggunakan alkohol agar tidak ada kontaminasi.
- Disiapkan media kultur yaitu air laut yang telah disterilkan dengan cara direbus dengan volume 2/3 toples
- Dipasang aerasi agar plankton dapat berfotosintesis.
- Ditambahkan nutrisi Walne dan vitamin dengan dosis masing-masing 1 ml/L
- Starter atau bibit dari kultur erlenmeyer dimasukkan dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4
- Ditutup toples dengan mengunakan plastik dan diikat dengan karet gelang.
- Diberi keterangan jenis plankton dan tanggal kultur dengan kertas label
- Diinkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 23°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt
- Dihitung kepadatannya setiap 24 jam sekali dengan haemocytometer di bawah mikroskop. Apabila kepadatan sudah tinggi dan mulai mengalami penurunan, kultur siap dipanen.

2. Kultur Volume 15 Liter

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

- Dibersihkan rak dan meja yang akan digunakan untuk meletakkan carboy dengan menggunakan alkohol sehingga tidak ada kontaminasi.
- Carboy diisi air laut yang telah disterilkan dengan kaporit dan dipasang aerasi.
- Media air laut dinetralkan dengan Na-thiosulfat 5 ppm.
- Setelah 15 menit media kultur dicek kenetralannya dengan menggunakan
 Chlorine test.
- Ditambahkan pupuk Walne dan vitamin dengan masing-masing dosis 1 ml/L.
 Hal ini bertujuan untuk menyediakan nutrisi yang dibutuhkan plankton.
- Starter atau bibit dari kultur pada toples dimasukkan dalam media kultur dengan perbandingan bibit dan media kultur 1:4.
- Ditutup carboy dan diberi label jenis plankton dan tanggal kultur.
- Diinkubasi dalam laboratorium dengan kondisi terkontrol, yaitu suhu 20°C dan pencahayaan dengan lampu TL 40 watt.
- Dihitung 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 Volume 500 Liter

Kultur intermediet dilakukan pada bak conicel yang diletakkan di ruangan semi *outdoor* dengan atap transparan.Bibit plankton yang akan dikultur berasal dari kultur carboy skala laboratorium. Bak conicel 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.

3.4.2 Penghitungan Kepadatan Sel

Penghitungan kepadatan *D. 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. Penghitungan kepadatan ini dilakukan setiap hari sejak penebaran bibit. Pengambilan contoh uji untuk penghitungan kepadatan dilakukan setiap hari menggunakan haemocytometer dan *counting hand* (Susilowati *et al.*, 2010).

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. Apabiala 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. Penentuan jumlah D. salina dapat diketahui dengan caramenghitung jumlah D. salina yang terdapat dalam 4 kotak besar yang dipilih secara acak pada haemacytometer dengan

BRAWIJAYA

bantuan *handtally counter*. Kerapatan sel dalam 1 ml sampel dihitung dengan menggunakan rumus (Prihantini, 2005):

$$k = n x p x 2500$$

diketahui:

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

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

p = tingkat pengenceran yang digunakan.

3.4.3 Pengukuran Kualitas Air

a. pH

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

Prosedur untuk pengukuran pH menggunakan pH meter adalah sebagai berikut:

- Mengkalibrasi pH meter sesuai dengan instruksi kerja, gunakan 2 larutan buffer (dengan pH 7 dan 10) untuk mengkalibrasi.
- Sampel air 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.

BRAWIJAYA

b. Suhu

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

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

c. Salinitas

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

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

3.4.4 Pemanenan Dunaliella salina

Setelah 5-7 hari, *D. salina* yang dikultur pada bak *fiber* siap untuk dilakukan pemanenan. Langkah pertama yang dilakukan dari proses pemanenan ini adalah menambahkan media kultur dengan soda api sebanyak 0,2 gram/L. Tujuan penambahan soda api ini adalah untuk mengendapkan *D. salina*. Setelah 2 jam aerasi dimatikan, dan dibiarkan mengendap selama 24 jam. Jika *D. salina* mengendap, air yang terdapat di atas endapan dibuang dengan menggunakan selang. Pada saat membuang air ini selang tidak boleh menyentuh atau mendekati endapan, karena endapan bisa ikut terbuang.

3.4.5 Isolasi RNA Total Dunaliella salina

Isolasi RNA total dilakukan dengan menggunakan *Geneaid High* RNA purification kit dengan langkah-langkah sesuai prosedur kit sebagai berikut :

A. Tahap Pemecahan

- Menggerus endapan mikroalga kurang lebih 5 gram dengan menambahkan nitrogen cair di dalam mortar hingga diperoleh bubuk halus.
- Memindahkan sampel halus sebanyak 1 gram ke dalam tabung mikrosentrifuse 1,5 ml steril.

B. Tahap Pengikatan RNA

- Menambahkan 500 μl buffer RB dan 5 μl β-mercaptoethanol ke dalam tabung mikrosentrifuse 1,5 ml.
- Menghomogenkan sampel dengan menggunakan vortex selama kurang lebih 10 detik, kemudian menginkubasi campuran pada suhu 60°C selama 5 menit.
- Menempatkan tube ke dalam kolom penyaring (filter column).
- Mensentrifuse selama 1 menit pada 1000rpm kemudian membuang kolom penyaring.
- Memindahkan cairan bening (supernatan) ke tabung mikrosentrifuse 1,5
 mlyang baru.
- Menambahkan absolut ethanol sebanyak ½ volume supernatan kemudian mengocok secara perlahan.
- Menempatkan RB kolom dalam tabung koleksi 2ml, kemudian memindahkan campuran ke kolom RB.
- Melakukan sentifuse pada 14-16.000 x g selama 1 menit.

BRAWIJAYA

 Membuang semua cairan pada tabung koleksi kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml. Cairan dibuang karena RNA sudah terjerap pada RB kolom.

C. Tahap Pencucian

- Menambahkan 400 µl buffer W1 ke dalam RB kolom.
- Mensentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 30 detik.
- Membuang cairan dalam tabung koleksi kemudian menempatkan RB kolom kembali dalamtabung koleksi 2 ml.
- Menambahkan 600 µl *buffer wash* ke dalam RB kolom.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit.
- Membuang cairan pada tabung koleksi, kemudian menempatkan RB kolom kembali pada tabung koleksi 2 ml.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 3 menit hingga matrik kolom kering.

D. Tahap Pemurnian RNA

- Menempatkan RB kolom kering dalam tabung mikrosentrifuse 1,5 ml.
- Menambahkan 50 μl RNase free water ke dalam membran kolom purifikasi RNA.
- Membiarkan selama minimal 2 menit untuk memastikan RNase-free water benar-benar terserap.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan RNA murni.

3.4.6 Pengukuran Konsentrasi RNA Total

Sampel RNA yang telah diisolasi kemudian diukur konsentrasi dan kemurnian RNA dengan menggunakan nanodrop *photometer*. Nanodrop *photometer* dinyalakan dan tekan bagian protein. Pedestal yang digunakan untuk

meletakkan sampel dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan ddH_2O . Dilakukan pengukuran blank dengan menggunakan *RNase-free Water* sebanyak 1 μ I, kemudian klik bagian BLANK pada layar. Setelah selesai pedestal dibersihkan dengan tisu. Selanjutnya larutan isolat RNA sebanyak 1 μ I dimasukkan ke dalam pedestal, kemudian klik *measure* sehingga layar akan menampilkan spektrum dan jumlah konsentrasi protein yang dihitung. Sebelum mesin dimatikan, pedestal dibersihkan kembali menggunakan ddH_2O .

3.4.7 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

RNA total yang diperoleh dari tahap isolasi selanjutnya akan ditranskripsikan menjadi DNA komplemen (cDNA). Proses ini dilakukan dengan menggunakan metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Terdapat dua tahapan dalam metode RT-PCR ini, yaitu sintesis RNA dan amplifikasi cDNA dengan teknik PCR. Dalam sintesis RNA, terlebih dahulu dilakukan pembuatan RNA *mix* dengan komposisi 5 µl oligo(dt) dan 50 µl sampel RNA. Campuran RNA kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C, dan didinginkan dalam es selama 3 menit. Selanjutnya dilakukan pembuatan cDNA *synthesis mix* dengan komposisi 10 µl dNTP 10 mM, 20 µl *buffer-first strand*, dan 10 µl DTT 0,1 M. Berikutnya cDNA *synthesis mix* dicampurkan ke dalam RNA mix secara perlahan dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu 42°C. Campuran ditambahkan 5 µl enzim *reverse transcriptase* dan dihomogenkan. Inkubasi pada suhu 42°C selama 50 menit, kemudian dilakukan inkubasi lanjutan 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 1 µl sampel cDNA dimasukkan ke dalam PCR tube 1,5 ml. Selanjutnya ditambahkan primer

1 yaitu initiated primer (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3') sebanyak 1 µl, dan ditambahkan adapter primer (5'-CTCGTTGCTGGCTTTGATG-3') sebanyak 1 µl. Berikutnya ditambahkan free water sebanyak 17 µl, sehingga total volume sampel sebesar 20 µl. PCR tube kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Pengaturan pengoperasian mesin PCR dilakukan seperti tabel 2.

Tabel 2.Pengoperasian Program RT-PCR

Siklus PCR		Suhu	Waktu
Initial denaturation		94 °C	2 menit
40 siklus	Denaturation	94 °C	20 detik
	Annealing	51 °C	20 detik
	Extension	72 °C	1 menit
Final Extension		72 °C	3 menit

Setelah rangkaian tahapan PCR selesai, PCR tube dalam mesin dikeluarkan. Selanjutnya, hasil PCR ditambahkan 1 µl primer 2 yaitu nested primer (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'). PCR tube dimasukkan ke dalam mesin PCR kembali untuk dilakukan nested PCR. Mesin PCR dioperasikan sama seperti proses PCR yang pertama. Jika mesin PCR telah berhenti beroperasi, sampel kemudian dikeluarkan dan dapat dilakukan running elektroforesis. Sampel juga dapat disimpan dalam freezer jika tidak langsung dilakukan running elektroforesis.

3.4.8 Elektroforesis Agarosa cDNA

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan media gel agarosa. Tahapan proses elektroforesis agarosa adalah sebagai berikut :

- Memasukkan *plate* ke dalam *chamber* elektroforesis.
- Menuangkan TBE buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- Memasukkan gel agarosa 1,5% ke dalam chamber elektroforesis.
- Memasukkan 5 µl DNA marker ke dalam sumur pertama pada gel agarosa.

- Memasukkan 5 µl sampel (produk hasil nested PCR) ke dalam sumur berikutnya.
- Menghubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- Melakukan running elektroforesis dengan tegangan 65 Volt selama kurang lebih 40-50 menit.
- Setelah selesai, tuang *running buffer* dan mengambil gel dari plate.
- Merendam gel ke dalam EtBr selama kurang lebih 10 menit untuk mewarnai cDNA.
- Memasukkangel ke dalam UV transiluminator untuk divisualisasikan.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

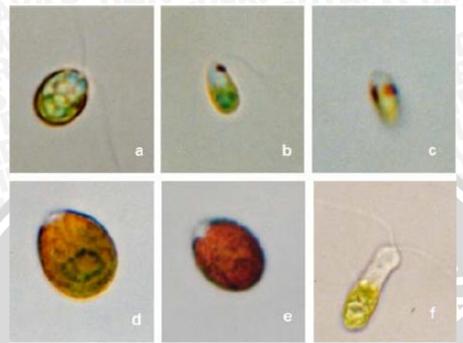
4.1 Identifikasi Jenis Dunaliella salina

Pada penelitian ini menggunakan spesies *Dunaliella salina* sebagai objek utamanya. Penelitian ini menggunakan mikroalga *D. salina* karena mikroalga ini memiliki beberapa kelebihan dalam kulturnya. Menurut Bowitzka (1991), *D. salina* merupakan salah satu organisme eukariotik yang paling toleran terhadap kondisi lingkungan. Alga ini mampu mentolerir berbagai salinitas air laut dan berbagai suhu yaitu berkisar 0-38°C. Pick *et al.* (1986), juga menyatakan bahwa alga uniseluler Dunaliella memiliki kapasitas yang luar biasa untuk tumbuh dan menyesuaikan diri terhadap salinitas media kultur.

Bahan yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari hasil monokultur *D. salina* di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo. Kultur *D. salina* dilakukan secara laboratorium dan semi massal di BPAP Situbondo. Pemilihan bahan *D. salina* di BPAP Situbondo dilakukan berdasarkan penelitian Masithah *et al.* (2011), bahwa bibit *D. salina* yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPAP) Situbondo.

Alga Dunaliella ini memiliki banyak spesies, seperti pendapat Ginzburg (1988) genus Dunaliella diantaranya adalah *D. salina*, *D. viridis*, *D. peircei*, *D. parva*, *D. media*, *D. euchlora*, *D. minuta*, *D. tertiolecta*, *D. bioculata*, *D. quartolecta*, dan *D. polymorpha*. Borowitzka dan Siva (2007), dalam kajiannya menyebutkan bahwa genus Dunaliella sp. memiliki 22 spesies antara lain yaitu *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella primolecta*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella bioculata*, *Dunaliella acidophyla*, *Dunaliella parva* dan *Dunaliella media*. Menurut Gonzales *et al.*, (2009) *dalam* Borowiztka (2013), metode yang paling dapat diandalkan untuk mengidentifikasi *D. salina* masih berdasarkan

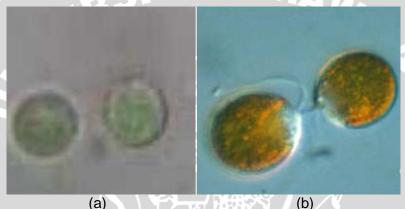
pada karakteristik morfologi dan fisiologinya. Gambar 3 berikut menunjukkan morfologi Dunaliella pada beberapa spesies.



Gambar 3. Morfologi Dunaliella : (a) *D. quartolecta*; (b) *D. primolecta*; (c) *D. bioculata*; (d) *D. salina* yang tumbuh pada salinitas 0,86 M NaCl; (e) *D. salina* yang tumbuh pada 5,17 M NaCl; (f) *Dunaliella* sp.

Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan mikroskop seperti pada gambar 4 (a), jenis Dunaliella ini memiliki ciri-ciri yang menyerupai *D. salina*. Bentuk selnya oval hampir bulat dan berwarna kehijauan. Selain itu, pada Dunaliella ini juga ditemukan sepasang flagella yang tidak terlalu panjang atau kurang dari anjang tubuhnya. Hal ini sesuai dengan pendapat Ginzburg (1988), bahwa sel dari jenis *D. salina* berbentuk bulat dan berwarna kemerahan atau oranye. Memiliki panjang sekitar 10-20 μm. Sel ini bergerak secara perlahan karena memiliki dua flagella pendek. Sementara, sel dari jenis *D. viridis* berbentuk silinder dan berwarna hijau. Memiliki dua flagella yang panjangnya melebihi panjang sel tubuhnya. Ukuran sel sekitar 3-5 μm hingga 6-8 μm.

Dunaliella salina memiliki bentuk oval hampir bulat dan tidak memiliki dinding sel. Panjang sel 5-29 μm (rata-rata 10,9-16,9 μm), dan ketebalan sel 3,8-20,3 μm (rata-rata 7,9-16,9 μm). Memiliki flagella dengan ukuran kurang lebih sama dengan panjang tubuhnya. Selnya memiliki satu kloroplas berbentuk cawan dengan pirenoid yang berbeda, dan dapat berubah warna dari hijau menjadi merah tergantung pada kandungan karotenoidnya. Memiliki stigma (eyespot) yang menyebar sehingga sulit untuk dibedakan (M.A Borowiztka dan C.J. Siva, 2007; M.A Borowiztka, 2013).



Gambar 4. *Dunaliella salina* (a) Dokumentasi pribadi (2016); (b) Borowiztka (2007)

4.2 Pertumbuhan Sel Dunaliella salina

Pertumbuhan merupakan suatu peningkatan jumlah sel yang disertai dengan ukurannya yang menghasilkan struktur yang baru (Becker, 1994). Pertumbuhan sel pada kultur *Dunaliela salina* ini dapat dilihat secara langsung berdasarkan kepadatannya. Menurut Martossudarmo dan Wulani (1990), *dalam* Rizky *et al.* (2012), pertumbuhan fitoplankton secara umum ditandai dengan empat tahap terpisah yaitu tahap adaptasi, tahap eksponensial, tahap stationer, dan tahap kematian. Penghitungan kepadatan *D. salina* dilakukan menggunakan haemocytometer dengan bantuan mikroskop binokuler dan *handtally counter*. Penghitungan kepadatan ini dilakukan setiap hari sejak penebaran bibit sesuai

pendapat Susilowati *et al.*, (2010), pengambilan contoh uji untuk penghitungan kepadatan dilakukan setiap hari menggunakan haemocytometer dan *counting* hand. Kurva pertumbuhan *D. salina* dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan Sel Dunaliella salina

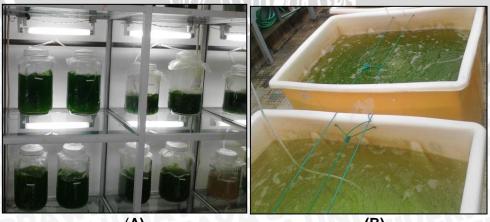
Pada kultur 5 liter, pertumbuhan *D. salina* dari hari ke-0 hingga hari ke-6 terus mengalami kenaikan, namun mulai mengalami penurunan pada hari ke-7. Pada kultur 15 liter, pertumbuhan *D. salina* mengalami kenaikan hingga hari ke-7, dan mulai mengalami penurunan pada hari ke-8. Sementara pada kultur 500 liter, pertumbuhan *D. salina* mengalami kenaikan hingga hari ke-4 dan mulai mengalami penurunan pada hari ke-5.

Berdasarkan gambar 5, fase adaptasi atau fase lag pada pertumbuhan *D. salina* terjadi pada hari ke-1. Fase eksponensial terjadi pada hari ke-2 hingga hari ke-7, dengan puncak kepadatan sel terjadi pada hari ke-6 untuk kultur 5 liter, hari ke-7 untuk kultur 15 liter, dan hari ke-4 untuk kultur 500 liter. Selanjutnya *D. salina* mengalami penurunan laju kepadatan pada hari ke-5 sampai hari ke-8. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fitriyanto dan Tri (2013) yang menyatakan bahwa pertumbuhan *D. 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

BRAWITAY

mengalami penurunan pada hari ke-6 hingga ke-7. Menurut Susilowati dan Amini (2010), penurunan kelimpahan dan laju pertumbuhan sel pada kultur mikroalga terjadi karena konsentrasi nutrien yang menurun pada media pertumbuhan serta pertumbuhan sel yang telah optimal sehingga sudah tidak ada peluang lagi untuk proses pembelahan sel hingga menuju kematian.

Berdasarkan gambar 5, juga dapat dikatakan bahwa kepadatan Dunaliella salina pada kultur laboratorium lebih tinggi jika dibandingkan dengan kultur intermediet. Selain itu, dapat dikatakan juga bahwa usia sel kultur laboratorium D. salina lebih panjang dibandingkan dengan kultur intermediet. Hal tersebut dapat dilihat pada hari ke-4 pada kultur 500 liter D.salina telah mengalami puncak kepadatan dan pada hari ke-5 telah mengalami penurunan, sedangkan pada kultur 5 liter dan 15 liter pertumbuhan D. salina mengalami peningkatan hingga hari ke-6 dan ke-7. Hal ini disebabkan, komposisi pupuk yang ditambahkan pada kultur laboratorium lebih lengkap jika dibandingkan dengan pupuk pada kultur intermediet. Pada pupuk skala laboratorium unsur hara terdiri dari unsur hara mikro dan makro yang lengkap. Unsur hara makro berfungsi sebagai pembentuk jaringan, sementara unsur hara mikro berfungsi sebagai pembentuk enzim. Kultur laboratorium dan intermediet seperti gambar 6.



(A) (B)
Gambar 6.Kultur *D. salina* (A) Laboratorium (B) Intermediet (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Selain faktor nutrisi, faktor lingkungan juga mempengaruhi kepadatan sel kultur. Kultur laboratorium dilakukan dalam ruangan *indoor* sehingga kondisi lingkungan lebih terkontrol dan kemungkinan terjadinya kontaminasi lebih sedikit dibandingkan dengan kultur intermediet. Hal ini sesuai dengan pendapat Susilowati (2010), yang menyatakan bahwa mikroalga yang dipelihara pada sistem *outdoor* kelimpahan selnya lebih rendah dibandingkan dengan pemeliharaan pada sistem *indoor*. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan pada sistem *indoor* lebih dapat dikendalikan dibandingkan sistem *outdoor*. Yudha (2008), juga menyebutkan bahwa ketersediaan nutrien dan lingkungan yang baik akan mendukung pertumbuhan *Dunaliella* sp. yang optimal.

Kultur 500 liter yang telah memasuki fase stasioner selanjutnya dipanen untuk diambil endapannya. Jumlah volume endapan alga yang diperoleh berkisar 25 liter. Fase stasioner ditandai dengan mulai menurunnya kepadatan sel alga. Menurut pendapat Hadi (2012), bahwa fase stasioner merupakan fase dimana pembelahan sel mikroalga mulai berkurang, karena ketersediaan nutrisi yang sudah mulai berkurang dan kondisi lingkungan yang sudah tidak optimal. Fase stasioner pada kultur 500 liter terjadi pada hari ke 5 dengan kepadatan sel sebesar 4.170.000 sel/ml (lampiran 3). Endapan hasil kultur D. salina ini kemudian digunakan untuk tahap isolasi RNA. Fase stasioner dipilih karena pada fase ini produksi pigmen mikroalga termasuk pigmen PCP semakin meningkat. Hal ini sesuai dengan pendapat Kusumaningrum (2008), yang menyatakan bahwa produksi pigmen total pada alga Dunaliella sp. akan mengalami peningkatan sejalan dengan bertambahnya usia sel hingga menuju fase kematian. Peningkatan total pigmen pada fase stasioner terjadi karena pigmen yang dihasilkan oleh mikroalga digunakan untuk pertahan hidup sel saat ketersediaan nutrisi dalam media kultur mulai berkurang.

BRAWIJAYA

4.3 Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air selama kultur *D. salina* digunakan sebagai data pendukung penelitian. Parameter kualitas air yang diukur dalam penelitian ini meliputi pH, suhu, dan salinitas. Parameter tersebut diukur pada awal dan akhir pertumbuhan kultur. Media kultivasi diamati pH, kadar garam, dan suhunya untuk mengetahui kelayakan tumbuhnya sel mikroalga (Amini *et al.*, 2011). Menurut Susilowati *et al.* (2010), kondisi lingkungan yang diamati selama kultur meliputi suhu, salinitas, dan pH. Parameter kualitas air yang diukur pada kultur *D. salina* selama penelitian adalah suhu (°C), pH dan salinitas. Hasil pengukuran kualitas air pada saat kultur *D. salina* seperti pada tabel 3 berikut.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Kualitas Air Kultur

	Laboratorium		Intermediet	
Parameter	Awal Kultur	Akhir Kultur	Awal Kultur	Akhir Kultur
Suhu	22°C	22°C/	26°C	24ºC
рН	8,1	8,8	8,4	8,8
Salinitas	35	36	34	35

4.3.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang sangat berpengaruh bagi pertumbuhan mikroalga. Suhu berpengaruh terhadap sistem metabolisme mikroalga. Setiap mikrolga mempunyai suhu ideal yang berbeda-beda untuk bisa tumbuh dan berkembang dengan baik.

Berdasarkan pengukuran suhu di lapang, diperoleh kisaran suhu sebesar 22°C pada kultur laboratorium (volume 5 dan 15 liter) dan kisaran suhu 24-26°C pada kultur skala intermediet. Pada skala intermediet, nilai suhu lebih besar daripada suhu pada kultur skala laboratorium. Hal ini dikarenakan pada kultur intermediet dipengaruhi oleh faktor lingkungan secara langsung. Pada saat pengukuran suhu, intensitas matahari cukup tinggi sehingga suhunya juga tinggi.

Menurut Kabinawa (2008), suhu diatas 36°C dapat menyebabkan kematian pada jenis mikroalga tertentu, sedangkan suhu kurang dari 16°C dapat menyebabkan pertumbuhan mikroalga menurun. Menurut Arif (2014), suhu yang optimal untuk pertumbuhan mikroalga *D. salina* adalah berkisar antara 20–40°C.Dari pernyataan tersebut, dapat dikatakan bahwa suhu kultur yang digunakan telah sesuai untuk pertumbuhan mikroalga *D. salina*. Suhu pertumbuhan untuk D. salina berkisar antara 0°C hingga 40°C, dengan pertumbuhan optimal pada suhu 21-40°C (Borowiztka, 2007).

4.3.2 pH

Nilai pH menggambarkan minus logaritma ion hodrogen yang terlepas dalam suatu cairan. pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik (Kordi dan Tancung, 2005). pH merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *D. salina* karena berhubungan dengan toksisitas senyawa kimia.

Pengukuran pH pada kultur skala laboratorium diperoleh nilai pH sebesar 8,1 - 8,8 dan intermediet sebesar 8,4 - 8,8. Nilai pH pada kultur intermediet lebih tinggi dibandingkan pada kultur laboratorium. Hal ini dikarenakan pada saat pengukuran pH, suhu lingkungan tinggi sehingga CO₂ tinggi. Apabila CO₂ tinggi maka nilai pH juga tinggi. Menurut Muhammad (2016), pH perairan akan terus bervariasi akibat proses respirasi dan fotosintesis. Pada malam hari, konsentrasi DO menurun karena proses fotosintesis berhenti dan seluruh organisme perairan mengkonsumsi oksigen (respirasi). Pada perairan yang padat tebarnya tinggi, konsentrasi karbondioksida meningkat akibat proses respirasi. CO₂ bebas yang dilepaskan saat respirasi akan bereaksi dengan air, menghasilkan asam karbonat (H₂CO₃), sehingga temperatur dan pH menjadi lebih rendah.

$$H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO^{3-}$$

Kondisi derajat keasaman (pH) air untuk kegiatan kultur *D. salina* telah berada pada kondisi optimal untuk pertumbuhan *D. salina*. Secara umum kisaran pH yang optimum pada kultur mikroalga adalah antara 7–9 (Effendi, 2003). Ratarata pH untuk kultur sebagian besar spesies mikrolga antara 7-9, dengan optimum rata-rata pH berkisar antara 8,2-8,7 (Lavens dan Sorgelos,1996). Fitriyanto dan Soeprobowati (2013) menyatakan bahwa, *D. salina* akan tumbuh optimal pada pH 9, tetapi dia masih dapat bertahan hidup di perairan yang mempunyai nilai pH sebesar 11.

4.3.3 Salinitas

Salinitas merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap organisme air dalam mempertahankan tekanan osmotik. Kisaran salinitas yang berubah-ubah dapat mempengaruhi dan menghambat pertumbuhan mikroalga. Widianingsih (2011), menjelaskan fitoplankton laut sangat ekstrem dalam mentolerir perubahan salinitas.

Pengaturan 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.

Dari hasil pengukuran salinitas pada kultur skala laboratorium diperoleh nilai salinitas sebesar 35-36 ppt dan pada skala intermediet sebesar 34-35 ppt. Menurut Tjahjo *et al.*, 2002, spesies *Dunaliella* sp. dapat tumbuh optimal pada salinitas air 30-35 ppt. Hermanto *et al.*, 2011, juga menyebutkan bahwa salinitas selama kultur fitoplankton berkisar antara 30-35 ppt.

Salah satu karakteristik dari *Dunailella salina* adalah bersifat halopilik, yaitu menyukai lingkungan dengan salinitas yang tinggi. Kemampuannya mentolerir salinitas sangat tinggi, dapat tumbuh baik pada salinitas normal namun masih dapat bertahan lagi hingga pada kondisi NaCl jenuh. Pada umumnya fitoplankton air laut akan tumbuh optimal dengan salinitas diantara 25-40 ppt dan tumbuh optimal pada salinitas 30-35 ppt (Rusyani, 2001). Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dikatakan bahwa salinitas yang digunakan untuk kultur sesuai untuk pertumbuhan *D. salina*.

4.4 Isolasi RNA

Proses isolasi dalam penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan RNA murni dari *Dunaliella salina*. RNA terbungkus di dalam sel sehingga perlu dilakukan isolasi dan purifikasi. Hal ini dilakukan agar RNA yang dihasilkan terpisah dari komponen-komponen lain, seperti DNA dan protein. Dalam proses isolasi RNA ini harus dilakukan dalam keadaan steril. Hal ini dikarenakan RNA sangat rentan terhadap kontaminan. Jika isolat RNA terkena kontaminasi, maka konsentrasi dan nilai kemurnian RNA yang diperoleh akan rendah.

Berdasarkan RNA *purification kit* yang digunakan dalam penelitian, terdapat empat tahap utama dalam proses ekstraksi RNA, yaitu pemecahan dinding sel (lisis), pengikatan RNA, pencucian dan pemurnian RNA. Pada saat penggerusan sampel alga pada mortar, ditambahkan nitrogen cair yang berfungsi untuk mempermudah penggerusan dan menjaga agar RNA tidak mengalami kerusakan. Hal ini sesuai pendapat Ferniah dan Sri (2013), bahwa nitrogen cair berfungsi untuk membekukan jaringan sehingga pengerusan lebih mudah. Menurut Prana dan Hartati (2003), penggunaan nitrogen cair membuat sampel menjadi kering dan mudah untuk dihancurkan. Nitrogen cair juga menjaga agar suhu tetap dingin sehingga RNA tidak rusak. Selain itu, dengan

penambahan nitrogen cair pada proses penggerusan sampel, hasil penggerusan berupa serbuk sehingga mengurangi peluang berkurangnya sampel dibandingkan bila hasilnya berupa ekstrak cair yang mudah lengket pada mortar. Proses penambahan nitrogen cair pada saat penggerusan seperti gambar 7 berikut.



Gambar 7.Penambahan nitrogen cair (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Tahap pertama dari proses isolasi ini adalah pemecahan dinding sel dan pengikatan RNA. Penambahan *lysis buffer* (RB buffer) kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit bertujuan untuk memecah dinding sel mikroalga dan mengikat RNA. Larutan *lysis buffer* memiliki kandungan zat guanidine tiosianat yang berperan sebagai garam, dimana garam ini dapat memecahkan sampel sekaligus menonaktifkan RNase (Fermentas, 2011). Larutan *lysis buffer* mengandung EDTA yang merupakan zat yang berperan dalam mengikat ion magnesium pada dinding sel sehingga proses pemecahan dinding sel menjadi lebih mudah (Sudjadi, 2008).

Selanjutnya penambahan wash buffer ke dalam RB kolom berfungsi untuk menghilangkan sisa kotoran protein yang terikat pada RNA. Setelah tahap pencucian, kemudian ditambahkan RNase-free water ke dalam matrik kolom

yang berfungsi untuk mengelusi RNA sehingga diperoleh isolat murni RNA. Proses penambahan *RNase-free water* ke dalam matrik kolom disajikan dalam gambar 8 berikut.



Gambar 8.Proses penambahan *RNase-free water* (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Zat kontaminan yang masih tersisa pada membran kolom dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi menggunakan larutan *wash buffer*. Molekul RNA kemudian dielusi dengan menggunakan *nuclease-free water* (Fermentas, 2011). Dari seluruh tahapan isolasi RNA tersebut, diperoleh jumlah isolat RNA sekitar 50 µl. Isolat RNA kemudian dianalisis konsentrasi dan kemurniannya dengan nanodrop spektrofotometri.

4.5 Konsentrasi RNA Total

Pengukuran konsentrasi isolat RNA total dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan alat nanodrop photometer. Spektrofotometri digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu asam nukleat dan protein. Metode pengukuran kemurnian asam nukleat dan protein dilakukan dengan menggunakan dua panjang gelombang, yaitu 260 nm dan 280 nm. Rasio

BRAWIJAYA

perbandingan dua panjang gelombang tersebut menunjukkan nilai kemurnian suatu asam nukleat dan protein (Sedman dan Mowery, 2006).

Nilai konsentrasi RNA yang diperoleh sebesar 25,8 µg/ml dengan nilai kemurnian sebesar 1,33 (A260/A280). Nilai konsentrasi RNA yang diperoleh tidak terlalu besar. 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 yang diperoleh juga kurang baik, karena berada dibawah standar kemurnian RNA. Menurut Promega (2009), nilai kemurnian DNA berada pada nilai ≥ 1,8 dan RNA pada nilai 2,0 (A260/A280). Nilai kemurnian dibawah 1,8 menunjukkan bahwa DNA maupun RNA terkontaminasi oleh protein, fenol, dan komponen-komponen lain pada saat proses isolasi. Menurut Seidman dan Mowery, 2006), nilai kemurnian 1,8-2,2 pada rasio perbandingan A260/A280 merupakan rentang suatu asam nukleat yang dianggap murni. Apabila nilai rasio kurang dari 1,8 berarti DNA tersebut terkontaminasi oleh protein dan fenol. Hasil pengukuran konsentrasi RNA dengan nanodrop photometer seperti gambar 9.

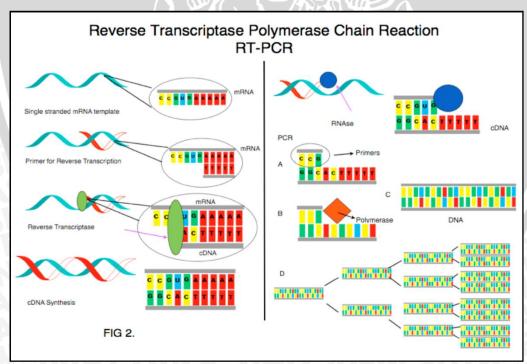


Gambar 9. Hasil Pengukuran Konsentrasi RNA (Dokumentasi Pribadi, 2016)

4.6 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Dalam proses RT-PCR ini terdapat dua tahapan, yaitu sintesis cDNA dan amplifikasi dengan PCR. Hal ini dilakukan karena isolat RNA tidak bisa digunakan langsung sebagai cetakan dalam proses PCR, sehingga RNA harus ditranskripsikan balik menjadi komplemen cDNA. Menurut Hewajuli dan Dharmayanti (2014), menyatakan bahwa teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, sebelum proses PCR, molekul mRNA harus dilakukan proses *reverse transcriptase* sehingga diperoleh molekul *complementary* DNA (cDNA). Molekul cDNA tersebut digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR.

Proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi RNA disebut dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Gambar ilustrasi siklus RT-PCR seperti gambar 10 berikut.



Gambar 10. Siklus RT-PCR (Hossain dan Clara, 2014)

BRAWIJAYA

Komplemen DNA (cDNA) dapat terbentuk karena bantuan dari primer oligo(dT) dan enzim transkriptase balik. Ekor 3' poli-A mRNA dihibridasi oleh primer oligo(dT). Proses inkubasi RNA mix pada suhu 65°C selama 10 menit merupakan proses denaturasi,selanjutnya proses *annealing* terjadi pada suhu 4°C selama 50 menit. Pada saat primer oligo(dT) melekat pada untai RNA, enzim reverse transkriptase mulai mengkonstruksi untai pertama cDNA serta mengubah basa urasil menjadi basa timin. Hasil dari sintesis ini berupa DNA untai tunggal. Setelah DNA untai tunggal terbentuk, DNA polimerase akan mensintesis untai DNA pasangannya sehingga dihasilkan DNA untai ganda.

Komplemen DNA yang terbentuk dari proses reverse transcription selanjutnya akan diamplifikasi dengan teknik PCR. Dalam proses PCR ini dibutuhkan cDNA sebagai cetakan yangkemudian akan dilipatgandakan dan dibutuhkan pula primer sebagai komplementer cDNA. Menurut Munfarida (2012), primer merupakan salah satu komponen yang penting dalam proses PCR sehingga harus dirancang secara spesifik. Dalam tahap ini digunakan 3 primer berbeda yang diacu dari jurnal penelitian Weiss et al. (2002) sebagai target amplifikasi, yaitu initiated primer (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3'), nested primer (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'), dan RNA adapter primer (5'-CTCGTTGCTGGCTTTGATG-3'). Initiated primer berfungsi untuk mengawali proses penempelan primer pada cetakan cDNA, nested primer berfungsi untuk menggandakan cetakan yang di tengah, dan adapter RNA sebagai penutup atau pembatas ujung primer. Initiated primer memiliki panjang 20 nukleotida, nested primer 20 nukleotida, dan RNA adapter 19 nukleotida. Menurut Yusuf (2010), umumnya primer yang biasa digunakan pada proses PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. Menurut Handoyo dan Ari (2001), umumnya panjang primer berkisar antara 18 - 30 basa. Primer yang terlalu pendek (kurang dari 18 basa) dapat menyebabkan terjadinya penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan,

WITAYA

sementara untuk primer yang panjangnya lebih dari 30 basa dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak spesifik. Kusuma (2010) menyatakan bahwa pemilihan primer yang tidak sesuai menyebabkan reaksi polimerasi antara gen target dengan primer tidak dapat terjadi.

Proses PCR ini diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit dan denaturasi akhir pada suhu 94°C selama 20 detik. Pada tahap ini, molekul cDNA dipanaskan pada suhu 94°C sehingga terjadi pemisahan untai ganda cDNA menjadi untai tunggal. Untai tungal inilah yang akan menjadi cetakan untuk DNA baru yang akan dibuat. Menurut Yusuf (2010), denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi untai tunggal DNA. Proses in biasanya berlangsung sekitar 3 menit. Sambrook dan Russell (2001) menyatakan bahwa suhu denaturasi dapat mempengaruhi proses penempelan primer, denaturasi dapat dilakukan pada kisaran suhu 94-95°C. Jika suhu terlalu tinggi maka dapat menyebabkan primer sulit menempel pada cetakan. Sementara jika suhu yang digunakan terlalu rendah primer berlekatan dapat di berbagai tempat sehingga hasil PCR menjadi tidak spesifik (Rybicki, 2001).

Tahap berikutnya setelah denaturasi yaitu tahapan annealing atau penempelan. Tahap ini merupakan tahap dimana primer menempel pada sekuen target. Suhu annealing yang digunakan biasanya disesuaikan dengan nilai Melting Temperature (Tm) dari primer yang digunakan. Menurut Handoyo dan Ari (2001), Melting temperature (Tm) temperatur padasaat 50% untai ganda DNA terbuka atau terpisah. Melting Temperature (Tm) berhubungan dengan komposisi dan panjang primer. Dalam Life Technologies Corporation (2012) disebutkan bahwa Melting Temperature (Tm) dipengaruhi oleh panjang primer dan komposisi basa GC. Menurut Sambrook dan Russel (2001), suhu annealing yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menjadi berlekatan, sementara jika

suhu terlalu tinggi penempelan primer pada cetakan menjadikurang optimal.

Pengoperasian suhu dan waktu selama proses amplifikasi disajikan pada gambar

10 berikut.



Gambar 11.Pengoperasian mesin PCR (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Tahap yang terakhir yaitu *extention*, dimana pada tahap ini terjadi pemanjangan untai DNA. Enzim DNA polymerase akan memanjangkan sekaligus membentuk DNA baru dari gabunan antara cetakan, primer dan nukleotida. Tahap pemanjangan ini dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 3 menit. Tujuan dari proses pemanjangan akhir ini adalah untuk menyempurnakan proses pemanjangan untai DNA. Menurut Yusuf (2010), selama tahap pemanjangan primer enzim Taq polymerase memulai aktivitasnya untuk memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap pemanjangan primer.

Reaksi amplifikasi melalui PCR ini dimulai dengan tahapan denaturasi cetakan DNA, yaitu pembukaan rantai ganda menjadi rantai tunggal. Selanjutnya suhu diturunkan sehingga primer akan menempel pada cetakan DNA yang berantai tunggal, tahap ini disebut dengan *annealing*. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses

polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerase selanjutnya (Yuwono, 2006 *dalam* Hewajuli, 2014).

Reaksi amplifikasi ini berjalan sebanyak 40 siklus. Setelah akhir siklus amplifikasi selesai, akan diperoleh jumlah molekul DNA yang jumlahnya berbanding lurus secara eksponensial dengan jumlah siklus PCR. Seperti pendapat Gumilar (2006), bahwa jumlah siklus PCR disesuaikan dengan target jumlah *copy* molekul DNA yang ingin dihasilkan. Dalam proses PCR, jumlah molekul DNA yang dihasilkan pada akhir siklus berbanding lurus secara eksponensial dengan jumlah siklus PCR (2ⁿ, n= jumlah siklus). Pada penelitian ini proses PCR dilakukan sebanyak 40 siklus, sehingga pada akhir siklus diperoleh amplicon sebesar 1100 x 10⁹ *copy* molekul DNA.

4.7 Elektroforesis Agarosa cDNA

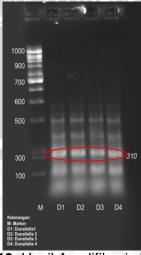
Menurut Fairbanks dan Andersen (1999), elektroforesis merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memisahkan molekul yang bermuatan berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi dalam medan listrik. Tujuan dari pemisahan molekul tersebut adalah untuk mengetahui jumlah atau ukuran basa serta ukuran basa nukleotida. Proses elektroforesis agarosa cDNA disajikan pada gambar 12 berikut.



Gambar 12.Elektroforesis Agarosa cDNA (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Ukuran basa DNA dapat diketahui dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi marka pada gel yang digunakan saat elektroforesis. Menurut Ausubel *et al.* (1990), marka atau molekul DNA penanda digunakan untuk mengetahui ukuran molekul-molekul DNA hasil isolasi, restriksi dan purifikasi. Ukuran molekul DNA dapat diketahui dengan cara membandingkan posisi pita DNA yang terbentuk dengan posisi marka pada gel yang digunakan untuk proses elektroforesis.

Hasil elektroforesis agarosa cDNA yang divisualisasikan dengan menggunakan UV *Transluminator* menunjukkan terbentuknya pita DNA (gambar 13). Pita DNA yang terbentuk memilikiukuran sekitar 310 pb, ini berarti amplifikasi DNA berhasil dilakukan. Hasil visualisasi pita DNA yang diperoleh juga cukup tebal, hal tersebut menunjukkan bahwa amplifikasi cDNA berhasil dilakukan dengan baik. 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. Hasil amplifikasi cDNA PCP disajikan pada gambar 13 berikut.



Gambar 13. Hasil Amplifikasi cDNA PCP (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Berdasarkan hasil visualisasi tersebut, dapat dilihat bahwa pita DNA yang keluar tampak jelas dan muncul dalam jumlah yang banyak. Pada bagian bawah gel agarosa masih terdapat berkas yang keluar. Menurut pendapat Faatih (2009), berkas yang keluar pada bagian bawah gel agarosa kemungkinan disebabkan oleh adanya protein lain atau terdapat bagian-bagian sel yang terikut pada saat isolasi.hal ini juga diperkuat dengan hasil uji konsentrasi RNA, dimana diperoleh nilai kemurnian RNA sebesar 1,33. Nilai RNA tersebut menunjukkan bahwa RNA masih terkontaminasi oleh protein.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian tentang sintesis RNA PCP pada mikroalga *Dunaliella salina* yang dikultur secara *in vivo* dapat disimpulkan bahwa:

- Mikroalga D. salina yang digunakan diperoleh dari hasil kultur volume 500 liter pada saat sel memasuki fase stasioner (kepadatan mulai menurun), yaitu pada kultur hari ke 5.
- Sintesis RNA PCP *D. salina* berhasil dilakukan dengan menggunakan teknik RT-PCR. Hasil visualisasi *UV Transluminator* menunjukkan bahwa cDNA yang berhasil diamplifikasi mempunyai panjang pita sebesar 310 pb (pasang basa).

5.2 Saran

Saran yang diberikan dari penelitian ini adalah proses isolasi harus dilakukan dalam keadaan yang benar-benar steril baik untuk alat dan bahan maupun peneliti, sehingga tidak terjadi kontaminasi yang menyebabkan nilai kemurnian RNA rendah. Selanjutnya perlu dilakukannya pemanfaatan PCP sebagai imunostimulan terhadap ikan, sehingga dapat mengurangi pemakaian bahan kimia yang dapat menurunkan kualitas perairan.

DAFTAR ISTILAH

Istilah	Deskripsi		
Amplicon	Jumlah copy fragmen DNA yang diinginkan		
Amplifikasi	Proses penggandaan untai DNA melalui teknik PCR		
Annealing	Proses penempelan primer pada template DNA dalam		
AS DEGRA	proses PCR		
Complementary DNA	DNA untai tunggal (single-stranded) yang disalin dari		
(cDNA)	untai mRNA menggunakan teknik RT-PCR dengan		
TI I WHY	memanfaatkan enzim reverse transcriptase		
Denaturasi	Proses pembukaan untai ganda DNA menjadi untai		
	tunggal dalam proses PCR		
Deoxyribonucleic	Asam nukleat beruntai ganda yang berperan dalam		
Acid (DNA)	proses ekspresi gen		
Elektroforesis	Teknik pemisahan molekul bermuatan berdasarkan		
	perbedaan kecepatan migrasi dalam medan listrik yang		
5	dialirkan pada medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan		
Elongasi	Proses pemanjangan primer dalam proses PCR		
Isolasi RNA	Proses pemisahan RNA darikomponen-komponen lain seperti DNA dan protein		
Melting Temperature (Tm)	Temperatur dimana 50% untai DNA terbuka atau terpisah saat proses annealing		
Polymerase Chain Reaction (PCR)	Suatu teknik yang digunakan untuk mengamplifikasi atau menggandakan fragmen DNA		
Primer	Oligonukleotida pendek beruntai tunggal yang berfungsi sebagai komplemen DNA target		
Reverse	Enzim yang membalikkan atau memfotocopy urutan		
Transcriptase	balik RNA		
Ribonuclead Acid	Asam nukleat beruntai tunggal yang berperan dalam		
(RNA)	proses ekspresi gen		
Sintesis RNA	Suatu proses untuk menghasilkan molekul RNA yang baru		
Transkripsi balik	Proses penyalinan urutan nukeotida yang terdapat pada molekul RNA		

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- 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 DH5α. *Skripsi*. Universitas Indonesia : Depok.
- Arif, Desilina. 2014. Diktat Teknologi Pakan Ikan Semester TBP. Kementerian Kelautan dan Perikanan : Ambon.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1990. Current protocols in molecular biology. Vol 1. John Wiley & Sons, Inc., New York
- 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. 1991. The mass culture of Dunaliella salina. School of Biological and environtmental sciences, Murdoch University:

 Australia
- Borowitzka, M. A., C. J. Siva. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal App. Phycol.*19: 567-590.
- Borowitzka, Michael A. 2013. *Dunaliella*: Biology, Production, and Markets. *Applied Phycology and Biotechnology*.
- BPBAP Situbondo. 2012. Kultur Pakan Alami. BPBAP: Situbondo.
- Cadoret J.P., M. Garnier, B. S. Jean. 2012. Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. Botanical Research. Vol. 64: 285-341.

- Dale, J.W., M.V. Schantz. 2002. From genes to genomes. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xi + 360.
- El-Baky, H. H. Abd, F. K. El Baz, G.S. El-Baroty. 2007. Production of Carotenoids from Marine Microalgae and its Evaluation as Safe Food Colorant and Lowering Cholesterol Agents. *J. Agriculture & Environment Science*, 2 (6): 792-800.
- Ernest, Prima 2012, Pengaruh Kandungan Ion Nitrat Terhadap Pertumbuhan Nannochloropsis oculata. Skripsi. Universitas Indonesia :Depok.
- Fairbanks, D.J., W.R. Andersen. 1999. Genetics the continuity of life. Brooksdole Publishing Company, New York. xix: 820 hlm.
- Fermentas. 2011. GeneJet RNA purification kit. Fermentas Inc. New York: 17 hlm
- Ferniah, R. S., S. Pujiyanto. 2013. Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan. BIOMA. Vol 156 (1): 14-19.
- Fitriyanto, E.B., T.R. Soeprobowati. 2013. Pemanfaatan Plasma Lucutan Pijar Korona Sebagai Nutrien Alternatif pada Monokultur *Dunaliella salina* (Dunal). *Seminar Nasional Biologi*. Universitas Diponegoro : Semarang.
- Gaffar, Shabarni. 2007. Buku Ajar Bioteknologi Molekul. Universitas Padjajaran : Bandung.
- Ginzburg, M. 1988. Dunaliella : a Green Alga Adapted to Salt. *Botanical Research*.Vol 14.The Hebrew University of Jerusalem : Israel.
- Gumilar, Gun Gun. 2006. Memfotokopi DNA dengan PCR. Artikel Pikiran Rakyat. Universitas Pendidikan Indonesia: Jakarta.
- 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.
- Handoyo, D., A. Rudiretna. 2001. Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles And Implementation Of Polymerase Chain Reaction]. Unitas. Vol 9 (1): 17-29.
- 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. et al., 1997. Pathway in plants and algae. Vol. 69(10), pp.2151–2158.
- Hossain, I., C. Levy. 2014. Investigating *KNOX* Gene Expression in *Aquilegia* Petal Spur Development. Journal Emerging Investigators.
- InterClinical Laboratories. 2010. *Dunaliella salina* Marine Phytoplankton. Practitioner Information.
- Jayappriyan, K.R., R. Rajkumar, V. Venkatakrishnan, S. Nagaraj, R. Rengasamy. 2013. In Vitro Anticancer Activity of Natural β-Carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 Cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. Vol. 3: 99-105.
- Jusadi, Dedi. 2003. Budidaya Pakan Alami Air Tawar. Direktorat Pendidikan Menengah Kejuruan. Departemen Pendidikan Nasional.
- Kabinawa, I.N.K. 2001. Mikroalga Sebagai Sumber Daya Hayati Perairan Dalam Perspektif Bioteknologi. Bogor: Puslitbang-Biotek. LIPI
- Kabinawa, I.N.K. 2008. Biodiesel Energi Terbarukan dari Mikroalga. *Warta Pertamina*. (9): 31–35.
- Kendall, L.V., L.K. Riley. 2000. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Contemporary Topics 39 (1): 42.
- 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 Amphidiniumcarterae Studied by Polarized Transient Absorption and Target Analysis. Biophysical Journal. Vol. 80: 2843–2855.
- Kuntari, A. G. 2014. Fungsi Peridinin Cell Pigment (PCP) Nannochloropsis oculata dalam Menginduksi Sistem Imun Major Histocompatibility Complex (MHC I) Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) pada Organ Insang. Skripsi. Universitas Brawijaya: Malang.
- Kusuma, S.A.G. 2010. PCR. Makalah Sekolah Pascasarjana. Universitas Padjadjaran : Bandung.
- Kusumaningrum. 2008. Karakterisasi Alga Hijau *Dunaliella* sp. dan Isolat Sianobakteria serta Deteksi Gen DXS Penyandi. Disertasi
- Lavens P., P. Sargeloos (eds). 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper.No. 361.Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Life Technologies Corporation. 2012. Real Time PCR Handbook. http://Lifetechnologies.com

- Lyrawati, D. 2004. DNA recombination and genetic techniques, transmission of human disease and computer resources for the clinical and molecular geneticist (transl.Indonesian). *Agric. Fac. UnibrawPubl.*, Indonesia (ISBN 979-508-543-3)..
- 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. UII Yogyakarta.
- Masithoh, E. D., N. Choiriyah, Prayogo. 2011. Pemanfaatan Isi Rumen Sapi yang Difermentasikan dengan Bakteri *Bacillus pumilus* terjhadap Kandungan Klorofil pada Kultur *Dunaliella salina*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. Vol. 3 (I): 97-102.
- Muhammad, Fuadi. 2016. Interaksi pH, karbondioksida, Alkalinitas, dan Hardness di Kolam Ikan. Terjemahan Interactions of pH, Carbon Dioxide, Alkalinity and Hardness in Fish Pond by William A. Wurts and Robert M. Durborow in SRAC Publication.
- Munfarida. 2012. Amplifikasi Gen gag p7 (Nukleokapsid) Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Subtipe CRF01_AE Isolat Indonesia.Skripsi. Universitas Indonesia: Depok.
- Nazir, M. 1988. Metodologi Penelitian. Jakarta: Ghalia Indonesia.
- Pick, U., L. Karni, M. Avron. 1986. Determination of ion content and ion Fluxes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol. Vol 81: 92-96.
- Pratiwi, E.B. 2008. Sintesis dan Pengklonan Fragmen Gen tat (Transaktivator)
 HIV-1 ke Dalam Vektor Ekspresi Prokariot pQE-80L. *Skripsi*.
 Universitas Indonesia: Depok.
- 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.
- Rizky, Y.A., I. Raya, S. Dali. 2012. Penentuan Laju Pertumbuhan Sel Fitoplankton Chaetoceros calcitrans, Chlorella vulgaris, Dunaliella salina, dan Porphyridium cruentum. Universitas Hasanuddin : Makassar
- Rybicki, 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.
- 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.
- 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. 3^{erd} ed.
- Seidman, L. dan J. Mowery. 2006. UV spectrophotometry of DNA, RNA, and proteins.

 http://matcmadison.edu/biotech/resources/methods/labManual/unit_4/exercise15.htm Diakses pada 15 Juli 2016, pukul 20.16 WIB.
- Sihotang, Laurencius. 2013. Macam-Macam Tipe PCR dan Teknik Pemotongan Protein dengan Metode Edman Sebagai Dasar Kerja Analisis Sekuensing. Program Studi Magister Pendidikan Biologi: Universitas Negeri Jakarta
- Singleton, P., Sainsbury, D. 2006. Dictionary of Microbiology and Molecular Microbiology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York
- 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. 2010. Kultivasi Mikroalga *Botryococcus braunii* Sebagai Sumber Bahan Energi Alternatif dengan Sistem *Indoor* dan *Outdoor. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur.* Jakarta.
- Tiara, S., A. Arziani, N. Siti, E. Aprilia, S. Retalia, D. Yunus, M. Sapta, A. N. Huda, M. Alkahfi. 2014. Isolasi dan Kuantifikasi RNA pada Organ Usus Ikan Betok (*Anabas testudineus*) dengan Menggunakan Metode Isogen/Genezol. *Laporan Praktikum Bioteknologi Akuakultur*. IPB: Bandung.
- Veyel D., A. Erban, I. Fehrle, J. Kopka, M. Schroda. 2014. Rationales and Approaches for Studying Metabolism in Eukaryotic Microalgae. *Metabolites*. Vol. 4: 184-217.
- 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.

Widowati, E. W. 2013. Desain Primer Sitokrom B (*Cyt B*) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Untuk Deteksi DNA Babi. *Laporan Penelitian Individual*. UIN Sunan Kalijaga : Yogyakarta.

Yudha, A.P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella* Sp. pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi*. IPB: Bogor.

Yusuf, Z.K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). Saintek. Vol 5 (6).



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

No	Alat	Fungsi		
1.	Toples 5 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>D. salina</i> pada kultur laboratorium		
2.	Carboy 15 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>D. salina</i> pada kultur laboratorium		
3.	AC	Untuk mengatur suhu ruangan		
4.	Gelas Ukur	Untuk mengukur larutan dengan skala tertentu		
5.	Blower	Sebagai sumber aerasi yang digunakan pada setiap wadah pemeliharaan mikroalga		
6.	Batu Aerasi	Untuk membantu penyediaan udara pada wadah kultur <i>D. salina</i>		
7.	Selang Aerasi	Untuk membantu menyalurkan udara ke wadah kultur <i>D. salina</i>		
8.	Lampu TL	Untuk mengatur cahaya pada kultur skala laboratorium		
9.	Bak/Ember Besar	Sebagai wadah air laut untuk kultur skala carboy		
10.	Gayung	Untuk membantu memindahkan air laut saat persiapan media kultur skala carboy		
11.	Lemari Es	Untuk menyimpan vitamin, pupuk skala lab dan bibit mikroalga yang sudah berkembang biak		
12.	Autoclave	Untuk mensterilkan media dan pupuk yang digunakan saat kultur murni laboratorium		
13.	Filter/saringan	Untuk menyaring partikel pada air laut		
14.	Mikroskop	Untuk mengamati kepadatan D. salina		
15.	Haemocytometer	Untuk menghitung kepadatan <i>D. salina</i>		
16.	Coverglass	Untuk menutup permukaan haemocytometer		
17.	Pipet Tetes	Untuk mengambil larutan dalam skala kecil		
18.	Timbangan	Untuk menimbang komposisi bahan pupuk		
19.	Bola Penghisap	Membantu memasukkan larutan ke pipa kapiler		
20.	Pipa Kapiler	Untuk membantu mengambil larutan		
21.	Botol Film	Sebagai wadah air sampel yang dihitung kepadatannya		
22.	Bak fiber 1 ton	Sebagai wadah kultur skala intermediet		
23.	Kain	Untuk membantu menyaring mikroalga yang dipanen		
24.	Selang elastis	Untuk menyalurkan air		
25.	Pipa	Untuk menyalurkan air dan udara		
26.	Filter bag	Untuk menyaring partikel pada air laut		
27.	Sikat	Untuk membersihkan bak		
28.	Kamera	Untuk mendokumentasikan kegiatan		
29.	Mortar dan Alu	Untuk menggerus sampel <i>D. salina</i>		
30.	Mesin PCR	Untuk mengamplifikasi cDNA		
31.	Elektrofotometer	Untuk mengelektroforesis cDNA		
32.	Sentrifuse	Untuk memisahkan supernatan dan pellet		
33.	Tabung	Sebagai wadah sampel saat isolasi		

	mikrosentrifuse 1,5 dan 2 ml	SSITAL AS BRERAWILLI		
34.	Falcon	Untuk menyimpan sampel mikroalga		
35.	Freezer	Untuk menyimpan bahan		
36.	Refrigerator	Untuk menyimpan bahan		
37.	Mikropipet	Untuk mengambil bahan dalam skala kecil		
38.	Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel dengan ketelitian 10 ⁻²		
39.	UV Transluminator	Untukmemvisualisasi hasil cDNA		
40.	Inkubator	Untuk menginkubasi sampel saat isolasi		
41.	Spatula	Untuk membantu menghomogenkan larutan		
42.	Tabung nitrogen cair	Sebagai wadah nitrogen cair		
43.	RB kolom	Sebagai wadah sampel saat isolasi		
44.	Nanodrop spektrofotometer	Untuk mengukur kadar protein		
45.	Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan		
46.	Vortex	Untuk mencampur sampel		
47.	Coolbox	Untuk membawa sampel agar suhu tetap rendah		



No	Bahan	Fungsi		
1.	Bibit <i>D. salina</i>	Sebagai bibit untuk kultur D. salina		
2.	Air Laut	Sebagai media pertumbuhan <i>D. salina</i>		
3.	Air Tawar	Untuk mencuci alat dan bak yang kotor dan untuk membuat pupuk		
4.	Pupuk Walne	Untuk memenuhi nutrisi D. salina		
5.	Vitamin B1 & B12	Sebagai vitamin saat kultur D. salina		
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.	Sabun Cuci	Untuk membersihkan alat-alat		
12.	Tissue	Untuk mengeringkan alat		
13.	Plastik	Untuk menutup toples		
14.	Karet Gelang	Untuk membantu menutup toples dengan plastik		
15.	Nitrogen cair	Untuk membantu memecah protein <i>D. salina</i>		
16.	Buffer RB	Untuk memecah RNA Dunaliella salina		
17.	Alkohol	Untuk sterilisasi alat yang akan digunakan		
18.	Kertas label	Untuk menandai bahan		
19.	Masker	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi		
20.	Sarung tangan	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi		
21.	Buffer wash	Untuk mencuci kolom purifikasi		
22.	Geneaid RNA Purification Mini Kit			
23.	Primer	Sebagai komplementer dari DNA target		
24.	Akuades	Untuk mensterilkan alat		
25.	Oligo(dT), dNTP 10 mM, buffer first- strand, DTT 0,1 M			
26.	Merchaptoethanol	Untuk membantu memecah RNA		
27.	RNase free-water	Untuk pemurian isolat RNA		
28.	Gel agarosa	Sebagai media elektroforesis		
29.	TBE Buffer	Untuk mengisi chamber saat elektroforesis		
30.	DNA Marker	Sebagai marka hasil visualisasi cDNA		
31.	Etidium Bromida (EtBr)	Untuk mewarnai cDNA saat visualisasi		
32.	ddH ₂ O	Untuk membersihkan pedestal nanodrop photometer		
33.	Tisu	Untuk mengeringkan alat		
34.	Blue ice	Untuk menjaga suhu agar tetap rendah saat sampel dimasukkan <i>coolbox</i>		

Lampiran 3.Kepadatan Sel Kultur Dunaliella salina

Hari Ke-	Toples (10 ⁴ sel/ml)	Carboy (10 ⁴ sel/ml)	Intermediet (10 ⁴ sel/ml)
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	BD.
8	78	1023	41



Lampiran 4. Foto Kegiatan Penelitian

No.	Foto Kegiatan	Keterangan
1. 3.W 3.R 5.11 5.11		Kultur <i>Dunaliella salina</i> skala laboratorium pada wadah toples
2.		Kultur <i>Dunaliella salina</i> skala laboratorium pada wadah carboy
3.		Kultur <i>Dunaliella salina</i> skala intermediet pada bak <i>conicel</i>

