### OPTIMALISASI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI HindI PADA MIKROALGA LAUT Spirulina sp YANG DIKULTUR SECARA IN VIVO

#### ARTIKEL SKRIPSI

PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN BRAWINAL

Oleh:

MIFTAH ARRAIYAN

NIM. 125080101111074



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

# OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *HindI* PADA MIKROALGA LAUT *Spirulina sp*YANG DIKULTUR SECARA *IN VIVO*

#### ARTIKEL SKRIPSI

# PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN

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

Universitas Brawijaya

Oleh:

MIFTAH ARRAIYAN

NIM. 125080101111074



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

#### ARTIKEL SKRIPSI

#### OPTIMALISASI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI HindI PADA MIKROALGA LAUT Spirulina sp YANG DIKULTUR SECARA IN VIVO

Oleh:

#### MIFTAH ARRAIYAN 125080101111074

telah dipertahankan didepan penguji pada tanggal 8 November 2016 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui bimbing I,

(Ir. Kusriani, MP

NIP. 19560417 198403 2 001

Tanggal: 0 6 DEC 2016

Dosen Pembimbing II,

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

Tanggal: 0 6 DEC 2016

Menyetujui,

(Dr. Ir. Arning Williams Ekawati, MS) NIP. 19620805 198603 2 001 Tanggal:

# OPTIMALISASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) RNA PCP DENGAN ENZIM RESTRIKSI *HindI* PADA MIKROALGA LAUT *Spirulina sp* YANG DIKULTUR SECARA *IN VIVO*

OPTIMIZATION OF *POLYMERASE CHAIN REACTION* ( PCR ) RNA PCP TO APPLY RESTRICTION ENZYMES *HindI* WITH THE MARINE MICROALGAE *Spirulina sp* CULTURED *IN VIVO* 

Miftah Arraiyan<sup>1</sup>, Kusriani<sup>2</sup>, Uun Yanuhar<sup>3</sup>

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

#### **ABSTRAK**

Spirulina sp berfungsi sebagai penyedia sumber protein, dan detoksifikasi dalam tubuh. Spirulina sp mempunyai gen PCP yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam fotosintesis. Cara mendeteksi PCP pada Spirulina sp menggunakan teknik polymerase chain reaction (PCR). Dalam teknik PCR sering menghasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan optimalisasi polymerase chain reaction (PCR) RNA PCP dan menggunakan enzim restriksi Hindl pada Spirulina sp untuk mengetahui pengaruh hasil pemotongan RNA PCP yang spesifik pada Spirulina sp. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis proses PCR dalam rangka eksplorasi RNA PCP pada Spirulina sp menggunakan Enzim Restriksi Hindl. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2016 hingga Mei 2016 dengan menggunakan metode deskriptif eksperimen. Hasil pengukuran kualitas air pada kultur laboratorium menunjukkan suhu pada kisaran 22 °C, pH berkisar antara 8.3-8.6, salinitas berkisar antara 35–36 ppt, sedangkan pada kultur intermediet menunjukkan suhu berkisar 24 - 26 °C, pH berkisar antara 8.4-8.8, salinitas berkisar antara 34- 35ppt. Pengukuran RNA total hasil isolasi RNA diperoleh nilai sebesar 21.0 mg/ml. Pada proses PCR didapatkan suhu annealing (Tm) sebesar 52 °C dengan menggunakan 3 primer yaitu initiated primer, adapter primer, dan nested primer. Visualisasi hasil amplifikasi cDNA yang dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel Agarosa menunjukkan panjang pita yang terbentuk memiliki ukuran sekitar 310 base pair (bp). Pemotongan hasil amplifikasi cDNA menggunakan enzim restriksi HindI menunjukkan pemotongan spesifik pada ukuran 280 bp.

Kata kunci: PCR, RNA, PCP, Enzim Restriksi, Spirulina sp.

#### **ABSTRACT**

Spirulina sp useful as a provider of a source protein and detoxify the body. Spirulina sp has a gene PCP who can serves as a light-harvesting in photosynthesis. To detect PCP in Spirulina sp using polymerase chain reaction (PCR). In conducting the PCR technique often resulting DNA amplification is not optimal. Based on that do the optimization of polymerase chain reaction (PCR) using RNA PCP and restriction enzyme Hindl in Spirulina sp to determine the influence of results PCP cutting of specific RNA in Spirulina sp. this research aims to analyze the process in order to discover RNA PCR PCP in Spirulina sp using restriction enzymes Hindl. The research was held in March 2016 to May 2016 using experiment descriptive method. Results of water quality measurements in laboratory cultures showed a temperature in the range of 22 ° C, pH range between 8.3-8.6, salinity ranges from 35 to 36 ppt, whereas the intermediate culture showed temperatures ranging from 24-26 ° C, pH range between 8.4-8.8, salinity ranges among 34- 35 ppt. Measurement of total RNA isolated RNA obtained a value of 21.0 mg / ml. In the process obtained PCR annealing temperature (Tm) of 52 ° C by using 3 primer that initiated primary, primary adapter, and nested primers. Visualization cDNA amplification product performed by using agarose gel electrophoresis showed long band formed has a size 310 base pairs (bp). Cutting cDNA amplification product using restriction enzymes Hindi indicate specific cuts in 280 bp.

Keywords: PCR, RNA, PCP, Enzm restriction, Spirulina sp.

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

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

<sup>3</sup>Dosen Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan

#### 1. PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar di dunia memiliki laut yang luasnya sekitar 5,8 juta km² yang didalamnya terdapat potensi pengembangan untuk perikanan. Salah satu potensi yaitu pada bioteknologi kelautan mikroalga untuk pengembangan industri bahan baku untuk makanan, industri bahan pakan alami, benih ikan dan udang, industri bahan pangan.

Spirulina sp merupakan makhluk hidup autotrof berwarna kehijauan, kebiruan, dengan sel berkolom membentuk filamen terpilin menyerupai spiral (helix) sehingga disebut juga alga biru hijau berfilamen (cyano bacterium). Bentuk tubuh spirulina sp yang menyerupai benang merupakan rangkaian sel yang berbentuk silindris dengan dinding sel vang tipis, berdiameter 1-12 mikrometer. Filamen spirulina hidup berdiri sendiri dan dapat bergerak bebas (Hariyati, 2008). Spirulina sp merupakan cyanobacteria yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku industri makanan karena mengandung protein 60-71%, lemak 8%, karbohirdrat 16%, dan vitamin serta 1,6% Chlorophyll-a, 18% Phycocyanin, 17% β- Carotene. Spirulina sp banyak dimanfaatkan bagi manusia, misalnya dimanfaatkan untuk menjadi obat-obatan, kosmetik, suplemen gizi, pakan budidaya dan pewarna makanan selain itu juga dapat dimanfatkan sebagai bahan antivirus.

Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) adalah pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. Hanya empat urutan PCP nukleutida lengkap telah dilaporkan peneliti sampai saat ini. PCPs terjadi dalam dua bentuk yang berbeda, bentuk singkat dengan massa molekul 14-16

kDa dan bentuk panjang dengan massa 30-35 kDa, yang diperkirakan telah muncul dengan peristiwa duplikasi gen (Virginia, 2002). 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).

mendeteksi PCP Untuk mikroalga laut Spirulina sp dapat dilakukan dengan metode Polymerase ChainReaction (PCR). Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Dalam melakukan metode PCR sering dihasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal sehingga visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis tidak terlihat. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai optimalisasi Polymerase Chain Reaction (PCR)RNA PCP dengan enzim restriksi HindI untuk menghasilkan pemotongan RNA PCP yang spesifik pada mikroalga laut Spirulina sp.

#### 1.2 Tujuan Penelitian

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

#### 1.3 Kegunaan Penelitian

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

#### 1.4 Waktu dan Tempat Penelitian

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

#### 2. MATERI DAN METODE

#### 2.1 Materi Penelitian

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

#### 2.2 Metode Penelitian

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

penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) pada *Spirulina sp.* 

#### 2.2.1 Kultur Spirulina sp

Kultur Spirulina sp terdiri dari kultur laboratorium dan intermediet yang dilaksanakan di Laboratorium Pakan Alami, BPBAB Situbondo. Kultur laboratorium dilakukan pada volume 5 liter dan 15 liter, sementara kultur intermediet dilakukan pada volume 500 liter Media kultur yang digunakan adalah air laut yang telah disterilkan dan ditambah nutrisi (dipupuk Walne). Semua alat dan bahan yang akan digunakan untuk kultur Spirulina sp harus dalam keadaan steril. Kepadatan sel dihitung setiap hari untuk mengetahui penambahan jumlah sel setiap harinya. Parameter kualitas air yang diamati selama kultur meliputi pH, suhu dan salinitas.

#### 2.2.2 Isolasi RNA Spirulina sp

Spirulina sp yang telah dipanen selanjutnya dilakukan penyaringan diambil endapannya. Jumlah sampel mikroalga yang digunakan untuk isolasi sebesar 1 gram. Lalu dihaluskan menjadi bubuk dengan menggunakan nitrogen cair. Selanjutnya sampel isolasi diekstraksi menggunakan Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit. Terdapat beberapa langkah isolasi RNA sesuai prosedur pabrik RNA Kit.

#### 2.2.3 Pengukuran Konsentrasi RNA

Setelah diekstraksi, sebanyak 4 µl protein yang diperoleh ditambahkan 4 µl buffer ekstraknya yaitu Tris-HCl pH 7,5 untuk untuk melihat kemurniannya dilakukan dikuantifikasi menggunakan nanodrop spektofotometer. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 280/260 nm. Absorpsi sinar pada 280 nm dapat digunakan untuk estimasi konsentrasi protein dalam larutan. Pengukuran absorpsi pada 260 nm perlu dilakukan untuk koreksi terhadap kemungkinan adanya kontaminasi asam nukleat supaya hasilnya lebih teliti. (Fatchiyah et. al., 2011).

# 2.2.4 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Polymerase Chain Reaction dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, proses PCR didahului dengan reverse transcriptase terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul complementary DNA (cDNA). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR untuk mengamplifikasi RNA dikenal dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Terdapat dua tahapan dalam metode RT-PCR ini, yaitu sintesis cDNA dan amplifikasi dengan teknik PCR.

Prosedur PCR dilakukan sesuai dengan Maxime PCR PreMix Kit. Tahapantahapan RT-PCR sesuai protokol kit yang pertama yaitu memasukkan 1 µl sampel cDNA ke dalam PCR tube 1,5 ml. Selanjutnya menambahkan primer 1 yaitu *initiatedprimer* (5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3')

sebanyak 1 μl, dan menambahkan *adapter primer* (5'-CTCGTTGCTGGCTTTGATG-3') sebanyak 1 μl. Berikutnya menambahkan *free water* sebanyak 17 μl, sehingga total volume sampel sebesar 20 μl. Kemudian memasukkan PCR *tube* ke dalam mesin PCR.

Setelah rangkaian tahapan PCR selesai, mengeluarkan PCR tube dalam mesin.

Selanjutnya, menambahkan hasil PCR dengan 1 μl primer 2 yaitu *nested primer* (5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-

3°).Memasukkan PCR tube ke dalam mesin PCR kembali untuk dilakukan nested PCR. Mengoperasikan mesin PCR seperti proses PCR yang pertama. Jika mesin PCR telah berhenti beroperasi, mengeluarkan sampel dan dapat dilakukan running elektroforesis. Sampel juga dapat disimpan dalam freezer jika tidak langsung dilakukan running elektroforesis.

# 2.2.5 Pemotongan Produk RT-PCR dengan Enzim Restriksi

Setelah amplifikasi fragmen DNA target berhasil, selanjutnya memotong hasil amplifikasi menggunakan enzim restriksi HindI. DNA Pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi HindI dilakukan sesuai dengan petunjuk yang disarankan oleh pihak yang memproduksi enzim tersebut. Mencampur campuran dari keseluruhan ini menggunakan vortex kemudian di sentrifuge, lalu diinkubasi di dalam suhu 37°C selama 4 jam. Volume total 50 µl terdiri dari 40,75 µl ddH2O, 5 µl RE 10X buffer, 0,5 µl Acetylated BSA 10 µg/ µl, 2,5 µl DNA 1 µg/ µl, 1,25 µl enzim restriksi Hind1 10U/µl.

#### 2.2.6 Elektroforesis Gel Agarosa

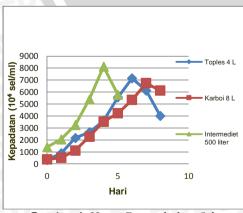
Elektroforesis dilakukan Menggunakan buffer TAE 1X, campurkan loading dye sebanyak 2 µl dengan 4 µl sampel RNA peridinin chlorophyll protein (PCP) Spirulina sp menggunakan micropipet kemudian memasukkan ke dalam sumur gel dengan hatihati. Elektroforesis dijalankan pada 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya, gel direndam dalam larutan ethidium bromida selama 15-20 menit. Kemudian menghidupkan UV

transiluminator dan komputer tunggu 10 menit, lalu masukkan gel agarosa kedalam alat UV transiluminator. Tekan tombol UV pada alat UV transiluminator, lalu dibuka program gel doc pada desktop computer. Pita-pita DNA yang terbentuk diamati dengan UV-transilluminator dari computer. Untuk keperluan dokumentasi gambar dismpan pada computer untuk dilakukan analisis.

#### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Pertumbuhan Sel Spirulina sp

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



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Sel

Kepadatan Spirulina sp pada kultur laboratorium lebih tinggi jika dibandingkan dengan kultur intermediet. Selain itu, usia sel Spirulina sp pada kultur laboratorium lebih dibandingkan dengan kultur panjang intermediet. Hal tersebut dapat dilihat pada pada kultur intermediet Spirulina sp telah mengalami fase kematian pada hari ke-6 sedangkan pada kultur laboratorium belum mengalami fase kematian pada hari ke-7. sel fitoplankton membutuhkan waktu untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan yang baru. Setelah mengalami fase lag, pada hari ke- 4 sampai hari ke-6 diperkirakan memasuki fase eksponensial (periode puncak) dimana perkembangan sel Spirulina Sp mengalami pertumbuhan puncak. Selanjutnya pada hari ke- 8 merupakan fase kematian dimana terjadi penurunan jumlah populasi mikroalga.

#### 3.2 Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air yang digunakan dalam penelitian ini yaitu suhu, pH, dan salinitas.

Kondisi kualitas air selama kultur sesuai untuk pertumbuhan mikroalga *Spirulina sp.* Hal ini sesuai pernyataan Kisaran suhu yang sesuai dan optimum untuk kehidupan fitoplankton adalah 22-30 °C (Sari *et.al*, 2013). Menurut Meiyana *et.al*, (2001), pH air yang optimal untuk pertumbuhan mikroalga adalah 7-8. Kisaran salinitas optimum yang dimiliki *Spirulina sp.* sebesar 33-35 ppt (Utami *et.al*, 2012). Hasil pengukuran kualitas air pada saat kultur *Spirulina sp* seperti pada tabel 1 berikut ini.

	$\Lambda V I I$	Toples 4 L	Karboi 8 L	Intermediet 500 L
	44			
Suhu	Awal	22	22	24
(°C)	Akhir	22	22	26
рН	Awal	8,4	8,3	8,4
	Akhir	8,4	8,6	8,8
Salinitas (ppt)	Awal	36	35	35
	Akhir	36	35	34

Tabel 1. Hasil pengukuran kualitas air

#### 3.3 Isolasi RNA

Pada penelitian ini menggunakan RNA purification kit. Terdapat tiga tahap utama dalam ekstraksi RNA, yaitu lisis atau pemecahan dinding sel, selanjutnya pengikatan RNA, dan pencucian serta pemurnian RNA. isolasi merupakan suatu prosedur yang berfungsi untuk memisahkan suatu bagian dari bagian lain dengan tujuan tertentu. Isolasi RNA digunakan untuk memisahkan RNA dari zat-zat lain sehingga diperoleh RNA murni. Tahap pertama adalah perusakan dinding sel, dalam perusakan dinding sel harus ditambahkan nitrogen cair mempermudah penggerusan tanpa merusak RNA tersebut. Menurut Fermentas (2011), larutan lysis buffer memiliki kandungan zat guanidine tiosianat yang berperan sebagai garam, dimana garam ini dapat memecahkan sampel sekaligus menonaktifkan RNase.

Lalu wash buffer ditambahkan ke dalam RB kolom berfungsi untuk menghilangkan sisa kotoran protein yang terikat pada RNA. Setelah tahap pencucian, kemudian ditambahkan Rnase-free water ke dalam matrik kolom yang berfungsi untuk mengelusi RNA sehingga diperoleh isolat murni RNA. Zat kontaminan yang masih tersisa pada membran kolom dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi

menggunakan larutan wash buffer. Molekul RNA kemudian dielusi dengan menggunakan nuclease-free water (Fermentas, 2011). Untuk mengetahui berapa besaran konsentrasinya, Isolat RNA kemudian diuji dengan nanodrop spektrofotometer.

#### 3.4 Konsentrasi RNA Total

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

Hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh hasil 21,0 mg/ml dengan nilai kemurnian sebesar 1,33 (A260/A280).

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

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

Terdapat dua faktor yang diuji untuk mengoptimalkan produk RT-PCR yaitu suhu penempelan primer dan jenis primer. Dalam penelitian ini primer yang digunakan adalah primer dari produk IDT (integrated DNA technology), yaitu primer P1 (forward) (-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-primer P2

(reverse) (-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-)
dan RNA adapter. Penempelan primer
(annealing) merupakan proses pelekatan primer
pada DNA cetakan. Proses tersebut
memerlukan suhu yang berkisar pada melting
temperature (Tm).

Proses anneling terdapat 3 tahapan, yaitu tahap pertama selama 25° C selama 10 menit, tahap kedua dilanjutkan dengan 50° C selama 60 menit, dan tahap ketiga 85° C selama 5 menit. Dalam RT-PCR, proses anneling berfungsi untuk memasangkan primer dan memperpanjang segmen cDNA. Dalam penelitian ini suhu penempelan primer (annealing) yang optimal yaitu pada suhu 52°C selama 1 menit. Perlakuan suhu penempelan primer (annealing) tepat dapat yang menghasilkan amplifikasi DNA secara optimal, hal ini ditandai dengan hasil visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis yang terlihat jelas. Bila suhu annealing yang digunakan tidak tepat, misalnya terlalu rendah dari suhu optimum, maka akan menyebabkan terjadinya false priming, dan apabila suhu annealing lebih besar dari suhu optimumnya maka primer tidak dapat menempel pada RNA target sehingga proses PCR tidak berhasil (astriani et.al, 2014).

kualitas dan kuantitas DNA cetakan juga dapat mempengaruhi reaksi PCR. Tidak adanya sekuen yang cocok antara primer dengan DNA cetakan juga dapat mempengaruhi reaksi PCR. Pada saat melakukan proses PCR sering ditemukan adanya kontaminan yang mengakibatkan penempelan primer dan amplifikasi tidak sesuai yang diinginkan.

#### 3.6 Elektroforesis Agarosa cDNA

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

Hasil panjang pita dari amplifikasi cDNA yang terbentuk memiliki jumlah basa sekitar 310 bp (*base pair*: Kualitas dan kuantitas produk DNA dapat diketahui secara mudah melalui proses elektroforesis (Sauer *et al.* 1988 *dalam* Pratiwi, 2008. Pita DNA yang tebal dan spesifik menunjukkan bahwa produk PCR telah diamplifikasi dengan baik. Hal tersebut menunjukkan bahwa amplifikasi cDNA berhasil dilakukan.

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

Hasil pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi HindI pada Spirulina sp. menujukkan bahwa enzim tersebut mampu memotong secara spesifik pada ukuran 280 bp (base pair) pada hasil Amplifikasi cDNA. Enzim HindI menghasilkan fragmen-fragmen sesuai dengan yang diinginkan sehingga biasa digunakan untuk analisis DNA dan kloning gen. Enzim ini mempunyai spesifitas yaitu daerah yang dikenali maupun daerah yang dipotong enzim tersebut bersifat spesifitas dan terletak pada bagian yang sama.

berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa pemotongan Amplifikasi cDNA oleh Enzim Restriksi *Hindl* pada mikroalga *Spirulina sp* telah berhasil dilakukan dalam penelitian ini.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

#### 4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian tentang optimalisasi polymerase chain

reaction (PCR) RNAPCP pada Spirulina sp yang dikultur secara in vivo dapat disimpulkan, bahwa pada optimalisasi PCR dihasilkan perlakuan suhu annealing yang optimal yaitu pada suhu 52°C dengan menggunakan 3 primer yaitu initiated primer, nested primer dan adapter primer. Dan enzim Restriksi Hindl berhasil memotong secara spesifik pada hasil amplifikasi cDNA PCP mikroalga laut Spirulina sp pada ukuran 280 bp (base pair).

#### 4.2 Saran

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

#### UCAPAN TERIMA KASIH

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

#### **DAFTAR PUSTAKA**

Aranda IVR, Dineen S, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM. 2009. Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range. Anal Biochem. 387(1):122-127. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.003.

Fatchiyah., Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. Biologi Molekuler

- Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Erlangga.
- Fermentas. 2011. GeneJet RNA perification kit. Fermentas Inc. New York: 17 hlm.
- Hirma, R. D., Hariyati, dan Afrina, Y., 2008. DNA Pemotongan Molekul Restriksi Menggunakan Enzim Endonuklease dan Pengukuran Besarnya Basa dari Fragmen yang Terpotong. Universitas Brawijaya. Malang
- Hirschberg, J. et al., 1997. Pathway in plants and algae. Vol. 69(10), pp.2151–2158.
- Meiyana, M., Evalawati, dan Prihaningrum, A. 2001. Biologi Rumput Laut. Teknologi Budidaya Rumput Laut (Kappaphicus alvarezii). DIRJENKANBUD BBL. Lampung.
- Pratiwi, E.B. 2008. Sintesis dan Pengklonan Fragmen Gen tat (Transaktivator) HIV-1 ke Dalam Vektor Ekspresi Prokariot pQE-80L. *Skripsi*. Universitas Indonesia: Depok.
- Sari IP, Abdul M. 2012. Pola pertumbuhan Nannochloropsis oculata pada skala laboratorium, intermediet dan masal. Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 4(2): 123-127.
- Tjahjo W, Lydia dan S. Hanung, (2002), Biologi Fitoplankton, dalam Seri Budidaya Laut no.9. Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Departemen Kelautan dan Perikanan. Lampung.
- Utami NF, Yuniarti MS, Kiki H. 2012. Pertumbuhan Chlorella sp. Yang dikultur pada perioditas cahaya yang berbeda. Perikanan dan Kelautan. 3 (3):237-244.
- 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 AnthopleuraElegantissima
  (Cnidaria). J. Phycol. 38: 157–163.