

repository.ub.ac.id

**OPTIMALISASI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) RNA PCP DENGAN  
ENZIM RESTRIKSI *Hind*I PADA MIKROALGA LAUT *Spirulina sp* YANG DI  
KULTUR SECARA *IN VIVO***

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

Oleh :

**MIFTAH ARRAYAN  
NIM. 125080101111074**



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

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

**SKRIPSI**

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

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

**Oleh :**

**MIFTAH ARRAIYAN**

**NIM. 125080101111074**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2016**

SKRIPSI

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

Oleh :  
MIFTAH ARRAIYAN  
NIM. 125080101111074

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal : 8 November 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
SK Dekan No. : \_\_\_\_\_  
Tanggal : \_\_\_\_\_

Dosen Penguji I



(Dr. Asus Maizar S. H., S.Pi, MP)  
NIP. 19720529 200312 1 001  
Tanggal: 06 DEC 2016

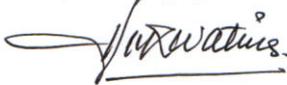
Menyetujui,

Dosen Pembimbing I



(Ir. Kusriani, MP)  
NIP. 19560417 198403 2 001  
Tanggal: 06 DEC 2016

Dosen Penguji II



(Ir. Herwati Umi., MS)  
NIP. 19520402 198003 2 001  
Tanggal: 06 DEC 2016

Dosen Pembimbing II



(Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si)  
NIP. 19730404 200212 2 001  
Tanggal: 06 DEC 2016

Mengetahui,  
Ketua Jurusan

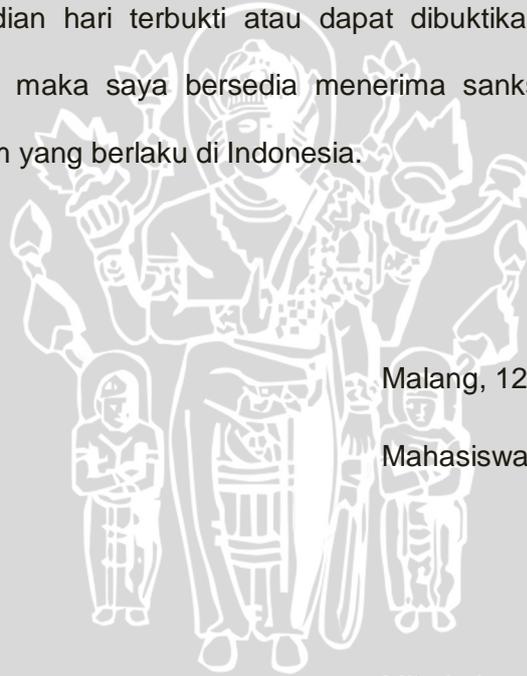


(Dr. Ir. Arning Wiljieng Ekawati, MS)  
NIP. 19620805198603 2 001  
06 DEC 2016

## 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, 12 September 2016

Mahasiswa

Miftah Arraiyan  
NIM. 125080101111074

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam membantu kelancaran hingga penulisan laporan Skripsi ini dapat diselesaikan.

Terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Ibu (Siti Imawati) dan Bapak (M. Syamsuri) yang selalu memberikan dukungan dan semangat serta mendoakan yang terbaik.
2. Ir. Kusriani, MP dan Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si selaku dosen pembimbing dalam membimbing dan menasehati hingga terselesaikan laporan Skripsi.
3. Dr. Agus Maizar S. H., S.Pi, MP dan Ir. Herwati Umi., MS selaku dosen penguji yang memberikan kritik dan saran yang membangun hingga terselesaikan laporan Skripsi ini.
4. Tim riset Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, Msi 2016 yang selama ini telah bekerja sama, berjuang, berkorban bersama atas riset yang telah dilakukan.
5. Bapak Ismail selaku laboran yang membantu proses penelitian di Laboratorium MIPA Biologi UIN Malang.
6. Saudara Hilmy Gauzan, Akhyar Hanif, Alif Idul Adha, dan Fahmi Nadhif serta keluarga besar Abd. Wahab yang telah memberikan semangat dan doa terbaik.
7. Riza Nurfadila yang selalu memberi semangat, dan doa hingga terselesaikan laporan Skripsi.
8. Keluarga besar ARMY12 yang selalu memberikan semangat, serta semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung dan baik sengaja maupun tidak sengaja telah berperan dalam terselesaikannya laporan ini.

## RINGKASAN

**Miftah Arraiyan.** Optimalisasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) RNA PCP dengan Enzim Restriksi *HindI* pada Mikroalga Laut *Spirulina Sp* Yang Di Kultur Secara *in Vivo* (Di bawah bimbingan **Ir. Kusriani, MP** dan **Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si**).

Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar di dunia memiliki laut yang luasnya sekitar 5,8 juta km<sup>2</sup> dan menurut *World Resources Institute* tahun 1998 memiliki garis pantai sepanjang 91.181 km yang di dalamnya terkandung sumber daya perikanan dan kelautan yang mempunyai potensi besar untuk dijadikan tumpuan pembangunan ekonomi berbasis sumber daya alam. Terdapat potensi pengembangan untuk perikanan di perairan umum seluas 54 juta ha dengan potensi produksi 0,9 juta ton/tahun seperti halnya mikroalga untuk pengembangan industri bioteknologi kelautan seperti industri bahan baku untuk makanan, industri bahan pakan alami, benih ikan dan udang, industri bahan pangan.

Kondisi stres pada ikan akan menyebabkan mekanisme pertahanan tubuh ikan menjadi turun dan akhirnya ikan akan mudah terserang oleh penyakit atau mikro organisme patogen. Tindakan pengobatan baru dapat dilakukan setelah jenis penyakit diketahui dengan melihat gejala dan tanda-tanda penyakit. Beberapa cara pengobatan diantaranya adalah pengobatan dengan imunostimulan atau obat alami yang di anjurkan untuk menggantikan penggunaan bahan kimia.

(Polymerase Chain Reaction, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk replikasi DNA. Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, Oligonukleotida primer, Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, dan Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Dalam melakukan metode PCR sering dihasilkan amplifikasi DNA yang belum optimal sehingga tidak terlihat dalam visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis. Untuk mendeteksi *peridinin chlorophyll protein* (PCP) pada mikroalga laut *Spirulina sp* dapat dilakukan dengan metode *polymerase chainreaction* (PCR) pemilihan primer dan konsentrasi antara primer dan DNA yang tepat.

Berdasarkan hal tersebut, maka perlu penelitian terhadap optimalisasi Optimalisasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) RNA PCP dengan enzim restriksi *HindI* pada mikroalga laut *Spirulina Sp* agar mengetahui hasil optimalisasi PCR RNA PCP dengan menggunakan enzim restriksi *HindI*

sehingga diperoleh hasil pemotongan DNA PCP yang spesifik pada mikroalga *Spirulina sp.*

Perhitungan kepadatan sel *Spirulina sp* tertinggi pada kultur Toples adalah sebesar  $6130 \times 10^4$  sel/ml. kepadatan sel *Spirulina sp* tertinggi pada kultur Carboy adalah sebesar  $6740 \times 10^4$  sel/ml. kepadatan sel *Spirulina sp* tertinggi pada kultur Intermediete adalah sebesar  $8130 \times 10^4$  sel/ml. Hasil pengukuran kualitas air pada kultur skala laboratorium diperoleh nilai suhu sebesar  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 8 dan salinitas 33 ppt. Sedangkan pada kultur skala intermediete diperoleh nilai suhu sebesar  $26\text{-}29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 8-8,5 dan salinitas 34-35 ppt. Kualitas air tersebut berada pada kisaran optimal untuk pertumbuhan *Spirulina sp.*

Hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh sebesar 21,0 mg/ml. Hasil tersebut menunjukkan hasil yang baik karena pada saat perlakuan isolasi RNA menggunakan kit yang sesuai. Pita DNA yang terbentuk memiliki ukuran 310 bp, yang berarti amplifikasi DNA berhasil dilakukan. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa perlakuan suhu annealing yang optimal yaitu pada suhu  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sedangkan pemotongan enzim restriksi *HindI* menghasilkan pemotongan DNA spesifik pada 280 bp. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa optimalisasi PCR RNA PCP pada *Spirulina sp* telah berhasil dilakukan dengan perlakuan suhu annealing dan primer yang tepat. Penggunaan enzim restriksi *HindI* menghasilkan pemotongan RNA PCP pada 280 bp sehingga terlihat visualisasi pita dengan jelas.

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian tentang optimalisasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) RNA PCP dengan enzim restriksi *HindI* pada mikroalga laut *Spirulina Sp* yang dikultur secara *in vivo* adalah optimalisasi PCR dihasilkan perlakuan suhu annealing yang optimal pada suhu  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sedangkan penggunaan enzim restriksi *HindI* menghasilkan pemotongan RNA pada 280 bp.

## 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 **Optimalisasi PCR (Polymerase Chain Reaction) RNA PCP dengan Enzim Restriksi *Hind*I pada Mikroalga Laut *Spirulina Sp* Yang Di Kultur Secara *in Vivo***. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat meraih gelar sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

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

Malang, 12 September 2016

penulis

DAFTAR ISI

<b>UCAPAN TERIMAKASIH</b> .....	<b>iv</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Mikroalga .....	5
2.2 <i>Spirulina sp.</i> .....	5
2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi <i>Spirulina sp.</i> .....	6
2.2.2 Reproduksi <i>Spirulina sp.</i> .....	6
2.2.3 Fase Pertumbuhan .....	7
2.2.4 Ekologi <i>Spirulina sp.</i> .....	8
2.2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan <i>Spirulina sp.</i> .....	8
2.3 <i>Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)</i> .....	10
2.4 Isolasi RNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)</i> .....	11
2.5 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	12
2.6 Komponen-Komponen PCR .....	13
2.6.1 DNA Cetakan atau DNA Target .....	13
2.6.2 Primer .....	14
2.7 Enzim Restriksi Endonuklease .....	16
2.7.1 Enzim Restriksi Endonuklease <i>HindI</i> .....	17
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materi Penelitian .....	19
3.2 Alat dan Bahan .....	19
3.3 Metode Penelitian .....	19
3.4 Sumber Data .....	20
3.4.1 Data Primer .....	20
3.4.2 Data Sekunder .....	21
3.5 Prosedur Penelitian .....	22
3.5.1 Kultur <i>Spirulina sp.</i> .....	22
3.5.2 Pemanenan <i>Spirulina sp.</i> .....	24
3.5.3 Ekstraksi RNA <i>Spirulina sp.</i> .....	24
3.5.4 Isolasi RNA <i>Spirulina sp.</i> .....	25
3.5.5 Pengukuran Kadar Protein dengan Nanodrop Spektrofotometri .....	27



3.5.6 Proses <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> .....	29
3.5.7 Amplifikasi Complementary DNA (cDNA).....	31
3.5.8 Elektrofesis.....	31
3.5.9 Enzim Restriksi Endonuklease <i>HindI</i> .....	32
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>36</b>
4.1 Kepadatan <i>Spirulina sp.</i> .....	36
4.2 Analisis Kualitas Air.....	44
4.2.1 Suhu.....	44
4.2.2 Derajat Keasaman (pH).....	44
4.2.3 Salinitas.....	45
4.3 Isolasi RNA <i>Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) Spirulina sp.</i> .....	45
4.4 Kandungan RNA total.....	47
4.5 Reverse Transcription <i>Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i> .....	48
4.6 Optimalisasi <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	49
4.7 Pola Pematangan DNA <i>Spirulina sp</i> dengan Enzim Restriksi <i>HindI</i> .....	52
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>51</b>
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>52</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>57</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gambar <i>Spirulina sp</i> .....	5
2. Kurva Pertumbuhan Mikroalga.....	8
3. Pigmen PCP .....	11
4. Mekanisme pemotongan DNA oleh enzim restriksi.....	17
5. Pemotongan molekul DNA dengan enzim restriksi endonuklease.....	17
6. Hasil Pemotongan dengan Enzim Restriksi.....	18
7. Grafik Pertumbuhan <i>Spirulina Sp</i> skala Erlenmeyer.....	39
8. Grafik Pertumbuhan <i>Spirulina Sp</i> . skala Carboy.....	40
9. Grafik Pertumbuhan <i>Spirulina Sp</i> . skala Intermediate.....	40
10. Kultur Skala Toples dan Kultur Skala Intermediate.....	42
11. Isolasi RNA.....	44
12. Pengukuran hasil total RNA.....	44
13. Visualisasi PCR dengan gel elektroforesis.....	46
14. Pemotongan RNA <i>Spirulina sp</i> dengan Enzim Restriksi <i>Hindl</i> .....	50

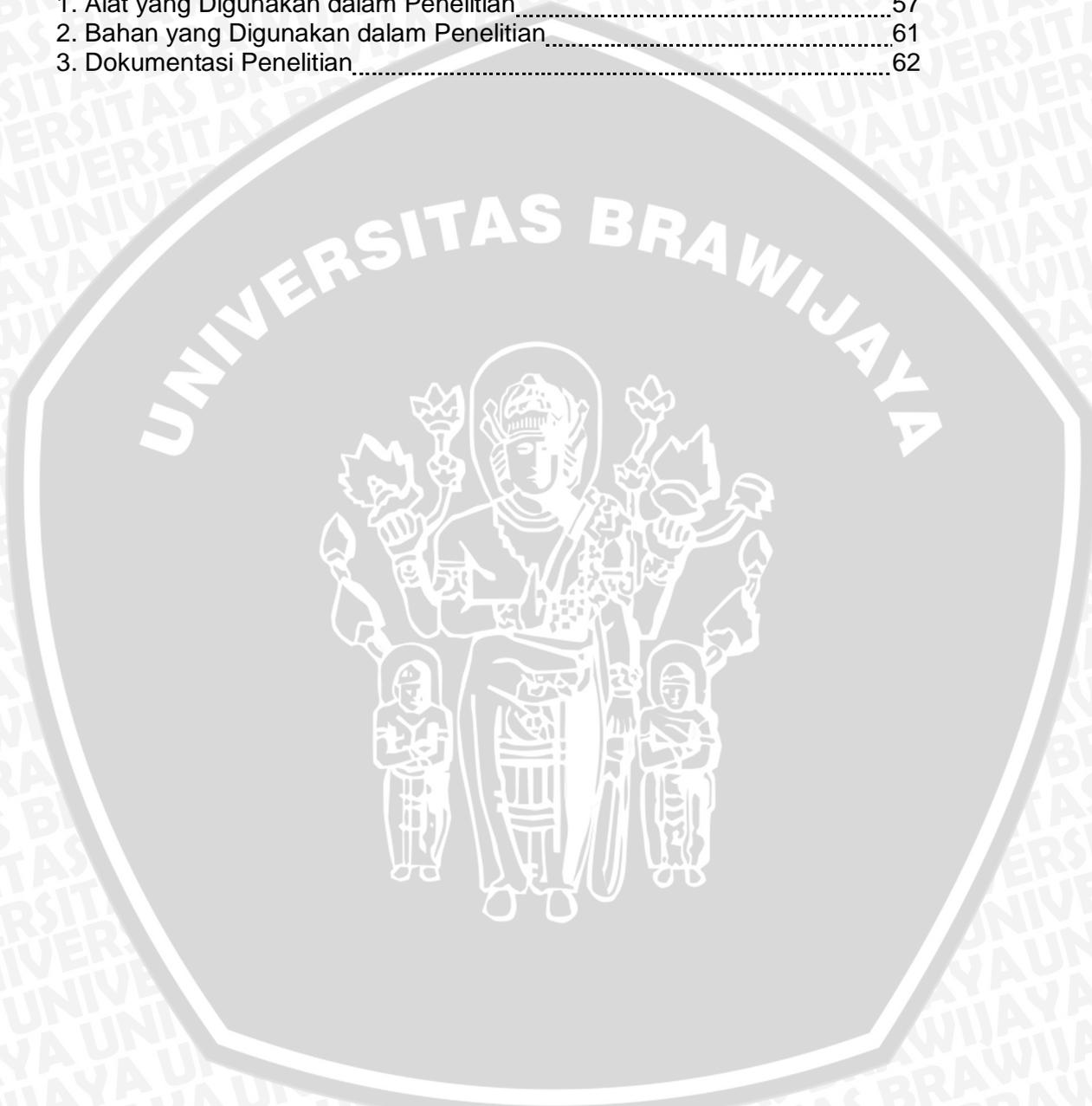
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Pupuk Walne.....	22
2. Tabel Kepadatan Spirulina Sp. yang dikultur.....	38



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....	57
2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian.....	61
3. Dokumentasi Penelitian.....	62



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar di dunia memiliki laut yang luasnya sekitar 5,8 juta km<sup>2</sup> dan menurut *World Resources Institute* tahun 1998 memiliki garis pantai sepanjang 91.181 km yang di dalamnya terkandung sumber daya perikanan dan kelautan yang mempunyai potensi besar untuk dijadikan tumpuan pembangunan ekonomi berbasis sumber daya alam. Terdapat potensi pengembangan untuk perikanan di perairan umum seluas 54 juta ha dengan potensi produksi 0,9 juta ton/tahun, budidaya laut terdiri dari budidaya ikan (antara lain kakap, kerapu, dan gobia), budidaya moluska (kerang-kerangan, mutiara, dan teripang), dan budidaya rumput laut, budidaya air payau (tambak) yang potensi lahan pengembangannya mencapai sekitar 913.000 ha, budidaya air tawar terdiri dari perairan umum (danau, waduk, sungai, dan rawa), kolam air tawar, dan mina padi di sawah, serta bioteknologi kelautan seperti halnya mikroalga untuk pengembangan industri bioteknologi kelautan seperti industri bahan baku untuk makanan, industri bahan pakan alami, benih ikan dan udang, industri bahan pangan.

Kondisi stres pada ikan akan menyebabkan mekanisme pertahanan tubuh ikan menjadi turun dan akhirnya ikan akan mudah terserang oleh penyakit atau mikro organisme patogen, menurut Rachmatun (1983), penyakit ikan merupakan salah satu masalah yang cukup serius dalam usaha budidaya ikan. Ikan yang semula tampak sehat dalam komunitasnya, sesudah beberapa bulan akan tampak beberapa ekor ikan diantaranya yang ternyata menderita suatu penyakit dan akhirnya apabila tidak diambil suatu tindakan akan terjadi kematian pada ikan. Tindakan pengobatan baru dapat dilakukan setelah jenis penyakit diketahui dengan melihat gejala dan tanda-tanda penyakit. Beberapa cara pengobatan

diantaranya adalah pengobatan dengan imunostimulan atau obat alami yang di anjurkan untuk menggantikan penggunaan bahan kimia.

Mikroalga dapat berfungsi sebagai penyedia sumber protein, karbohidrat, dan lemak alami yang bermanfaat dalam penyediaan energi dalam tubuh. Namun lebih jauh lagi, mikroalga juga mampu berfungsi sebagai sumber vitamin, dan bahkan memberikan efek penyembuh dan detoksifikasi dalam tubuh (Azimatun, 2014).

(Polymerase Chain Reaction, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, Oligonukleotida primer, Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, dan Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat yaitu denaturasi, aneling, dan pemanjangan untai DNA. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa (Zuhriana, 2010). Tujuan dilakukan teknik PCR adalah untuk mengidentifikasi RNA PCP pada mikroalga laut *Spirulina sp* dan menjadi langkah awal untuk kloning rekayasa yang ramah lingkungan.

Serangan penyakit adalah masalah dan aspek yang sangat penting, artinya penanggulangan penyakit dan hama juga harus menjadi pengetahuan yang penting bagi siapa saja yang hendak membudidayakan ikan.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana mengoptimalkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mendeteksi RNA PCP pada mikroalga laut *Spirulina sp.* yang dikultur secara in vivo?
2. Bagaimana pengaruh penggunaan enzim restriksi *HindI* dalam mengoptimalkan *polymerase chain reaction* (PCR) pada RNA PCP *Spirulina sp.* yang dikultur secara in vivo?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penggunaan enzim restriksi *HindI* dalam mengoptimalkan PCR *polymerase chain reaction* dan untuk menghasilkan pemotongan RNA PCP yang spesifik pada mikroalga laut *Spirulina sp.*

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai landasan penelitian lanjutan untuk mengetahui penggunaan enzim restriksi *HindI* terhadap optimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) pada mikroalga laut *Spirulina sp.* yang dikultur secara in vivo.

## 1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

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

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mikroalga

Mikroalga atau ganggang adalah organisme perairan yang lebih dikenal dengan fitoplankton (alga laut bersel tunggal). Organisme ini dapat melakukan fotosintesis dan hidup dari nutrisi anorganik serta menghasilkan zat-zat organik dari CO<sub>2</sub> oleh fotosintesis. Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen klorofil yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> dan sinar matahari untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan penambahan sel, bergerak atau berpindah dan 299 reproduksi (Pranayogi, 2003).

Mikroalga merupakan organisme tumbuhan yang paling primitif yang berukuran renik, dan hidup di seluruh wilayah perairan, baik air tawar maupun air laut. Mikroalga memang sudah lama dipergunakan untuk industri farmasi, kesehatan dan sebagainya. Mikroalga diklasifikasikan sebagai tumbuhan karena memiliki klorofil dan mempunyai suatu jaringan sel menyerupai tumbuhan tingkat tinggi. Melalui pendekatan suatu skema klasifikasi, spesies mikroalga dikarakterisasi berdasarkan kesamaan morfologi dan biokimia (Diharmi, 2001).

Mikroalga sebagai sumber protein maupun sebagai sumber pangan telah lama diketahui, dan berdasarkan informasi serta penelitian para ahli, mikroalga yang berbasis pangan tidak memberi efek negatif bagi tubuh meski dikonsumsi secara rutin dalam jangka waktu lama maupun singkat. Beberapa mikroalga bahkan digunakan sebagai sumber obat-obatan, dan dimanfaatkan dalam industri farmasi. Dalam beberapa tahun belakangan, beberapa industri farmasi telah banyak memanfaatkan mikroalga berbasis farmasi untuk keperluan tertentu. (Prakash & Bhimba, 2004).

## 2.2 *Spirulina sp*

*Spirulina sp* merupakan cyanobacteria yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku industri makanan karena mengandung protein 60–71%, lemak 8%, karbohidrat 16%, dan vitamin serta 1,6% Chlorophyll-a, 18% Phycocyanin, 17%  $\beta$ - Carotene. Kandungan nutrisi *Spirulina sp.* yang lengkap terutama protein yang tinggi menyebabkan *Spirulina sp.* memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan sebagai sumber protein (Jongkon, *et. al*, 2008).

### 2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi *Spirulina sp*

Secara morfologi, *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 yang tipis, berdiameter 1-12 mikrometer. Filamen spirulina hidup berdiri sendiri dan dapat bergerak bebas (Hariyati, *et. al*, 2008). Gambar morfologi *Spirulina sp* ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. *Spirulina sp*

Klasifikasi *spirulina* sp. Menurut Bold dan Wyne (1985) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Protista*  
Filum : *Cyanobacteria*  
Divisi : *Cyanophyta*  
Kelas : *Cyanophyceae*  
Ordo : *Nostocales*  
Family : *Oscillatoriaceae*  
Genus : *Spirulina*  
Spesies : *Spirulina* sp

### 2.2.2 Reproduksi *Spirulina* sp

Siklus hidup *Spirulina* sp. yaitu proses reproduksinya disempurnakan dengan fragmentasi dari trikoma yang telah dewasa. Reproduksi *Spirulina* sp. terjadi secara aseksual (pembelahan sel) yaitu dengan memutus filamen menjadi satuan-satuan sel yang membentuk filamen baru. Ada tiga tahap dasar pada reproduksi *Spirulina* sp. yaitu proses fragmentasi trikoma, pembesaran dan pematangan sel hormogonia, serta perpanjangan trikoma. Selanjutnya trikoma dewasa dapat dibagi menjadi filamen atau hormogonia, dan sel-sel di hormogonia akan meningkat melalui pembelahan biner, tumbuh memanjang dan membentuk spiral (Hongmei, 2008).

*Spirulina* sp. bereproduksi dengan fragmentasi. Fragmentasi adalah pemutusan bagian tubuh yang kemudian membentuk individu baru. Pada filamen yang panjang jika salah satu selnya mati maka sel mati itu membagi filamen menjadi 2 bagian atau lebih. Masing-masing bagian disebut hormogonium. Selain itu, fragmentasi juga terjadi pada pemisahan dinding yang berdekatan pada trikoma. Pada proses fragmentasi, filamen yang panjang akan terputus menjadi dua atau lebih benang pendek. Setiap hormogonium akan tumbuh menjadi filamen baru. Tempat pemutusan filamen adalah sel mati yang terdapat

diantara sel penyusun filamen (Khoirul, 2013). Selain bereproduksi dengan fragmentasi, *Spirulina sp.* juga bereproduksi dengan pembelahan biner. Pembelahan biner merupakan pembelahan sel secara langsung yang dapat memperbanyak jumlah filamen. Sel-sel membelah menjadi 2 dan tidak saling terpisah sehingga membentuk filamen yang terdiri atas deretan mata rantai sel yang disebut trikoma.

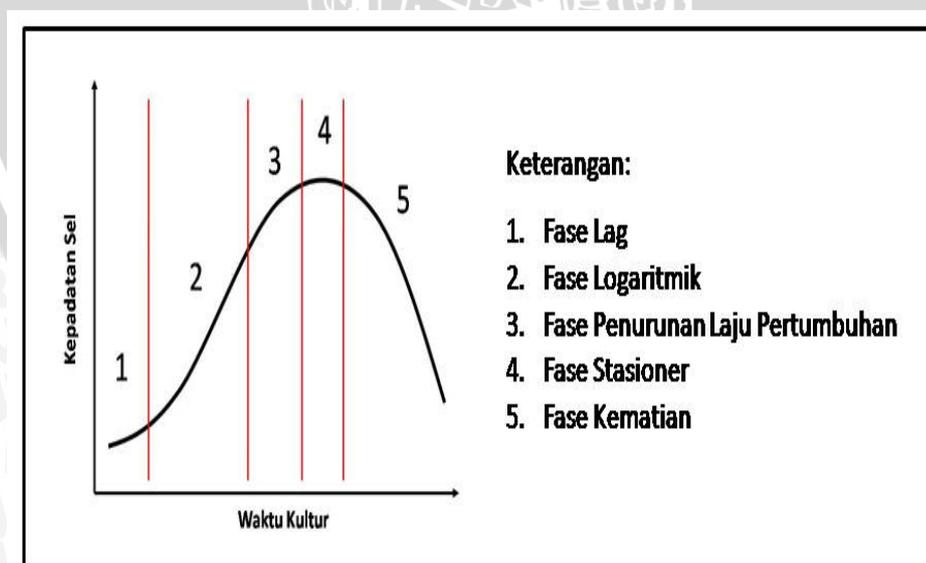
### 2.2.3 Fase Pertumbuhan

Selama masa pertumbuhan, *Spirulina sp* mengalami proses pertumbuhan yang di bagi menjadi 4 fase, yaitu :

- Fase Adaptasi (lag fase) yakni pada fase ini sel melakukan adaptasi terhadap lingkungannya dan mulai melakukan metabolisme namun belum terjadi pertumbuhan sel. Fase lag atau fase adaptasi merupakan fase ketika populasi mikroalga tidak mengalami perubahan, tetapi ukuran sel pada fase tersebut meningkat. Fotosintesis masih aktif berlangsung dan organisme mengalami metabolisme tetapi belum terjadi pembelahan sel sehingga kepadatannya belum meningkat. Fase lag diawali dengan terjadinya penyesuaian sel terhadap lingkungan baru. Pada saat adaptasi, sel mengalami defisiensi enzim atau koenzim, sehingga harus disintesis dahulu guna berlangsungnya aktivitas biokimia sel selanjutnya.
- Fase Logaritmik/eksponensial merupakan fase dimana pertumbuhan fitoplankton terjadi dengan cepat sehingga terjadi pertumbuhan jumlah sel yang sangat signifikan. Waktu penggandaan yang tercepat biasanya tercapai ketika fase eksponensial, yaitu fase pertumbuhan ketika sel-sel membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada fase tersebut pertumbuhan dan aktivitas sel berada dalam keadaan

maksimum, sehingga pada umur tersebut sel berada dalam keadaan aktif dan memiliki waktu adaptasi yang pendek selama proses kultur.

- Fase Stasioner (fase pertumbuhan tetap) ialah fase dimana laju reproduksi seimbang dengan laju kematian. Fase ini merupakan puncak pertumbuhan populasi fitoplankton. Pada fase stasioner, komposisi mikroalga berubah secara signifikan karena terbatasnya kandungan nitrat pada media kultur yang mengakibatkan kandungan karbohidrat meningkat hingga dua kali lipat dari kandungan protein (Brown *et al.*, 2009).
- Fase kematian ialah fase dimana laju pertumbuhan lebih kecil dari pada laju kematian, karena disebabkan oleh penurunan kemampuan metabolisme dari fitoplankton. Kematian sel dapat disebabkan oleh mulai berkurangnya nutrisi yang tersedia sehingga tidak mampu mendukung pertumbuhan sel. Fase pertumbuhan dapat dilihat pada gambar 2.



**Gambar 2.** Kurva Pertumbuhan Mikroalga (Prabowo, 2009)

#### 2.2.4 Ekologi *Spirulina sp*

*Spirulina sp* merupakan phytoplankton yang kosmopolit. Dikenal dengan berbagai macam spesies dan berbagai macam habitat mulai dari lingkungan terestrial, air tawar, air payau, air asin hingga danau-danau garam. *Spirulina sp* lebih menyukai perairan yang cenderung alkalin, pH yang baik untuk pertumbuhan berkisar antara 7,2-9,5. Akan tetapi, ada beberapa spesies yang masih dapat bertahan hingga pH 11. Ketahanan terhadap kadar garam juga sangat menakjubkan, karena ada spesies *spirulina sp* yang tahan kadar garam hingga 85 gram/l. Phytoplankton ini akan tumbuh dengan baik pada kisaran suhu antara 25°-35°c (Hongmei, 2008).

#### 2.2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan *Spirulina sp*

Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambahnya jumlah sel. Pertumbuhan ini dapat dilihat dari semakin meningkatnya tingkat kepadatan sel pada kultur. Lingkungan tempat tumbuh harus dapat dikondisikan sehingga memenuhi semua kebutuhan yang diperlukan oleh mikroalga agar dapat tumbuh optimal. Faktor - faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga antara lain adalah sebagai berikut.

Fosfor adalah nutrisi utama lain untuk kultur mikroalga. Bentuk utama dimana mikroalga menyerap fosfor adalah fosfat anorganik seperti  $H_2PO_4^-$  dan  $HPO_4^{2-}$ . Mikroalga dapat memanfaatkan senyawa fosfat organik dan menghidrolisis dengan ekstrasel oleh aksi enzim phosphoesterase atau fosfatase dan kemudian mengambil P anorganik yang dihasilkan (Borowitzka, 1988).

Pertumbuhan *Spirulina sp*. akan dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dalam media pertumbuhannya. Makronutrien dalam media yang dibutuhkan yaitu berupa C, H, O, N, P, K, S, Ca dan unsur mikronutrien yaitu Fe, Cu, Mg, Co, Mn,

B, Zn,. Komponen vitamin yang tersedia dalam media juga dapat mempercepat pertumbuhan terutama kandungan vitamin B12 (Andersen, 2005).

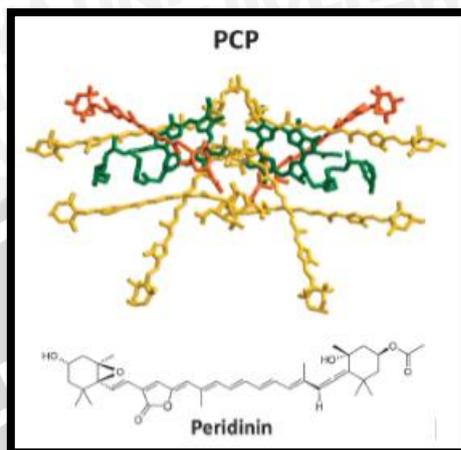
*Spirulina sp.* merupakan mikroalga yang memiliki daya adaptasi tinggi, yang artinya dia mampu tumbuh dalam berbagai kondisi pertumbuhan. Misalnya dapat ditemukan di perairan dengan pH basa. Kondisi pH basa memberikan keuntungan dari sisi budidaya, karena relatif tidak mudah terkontaminasi oleh mikroalga yang lain, yang pada umumnya hidup pada pH yang lebih rendah atau lebih asam. Faktor-faktor lingkungan yang mendukung pertumbuhan *Spirulina sp.* adalah suhu, cahaya, pH, dan agitasi (Kabinawa, 1994).

### **2.3 Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)**

*Peridinin Chlorophyll Protein* (PCP) merupakan pigmen yang berfungsi sebagai pemanen cahaya dalam proses fotosintesis. PCP ini mampu menyerap energi matahari pada panjang gelombang 470-550 nm (warna hijau-biru). Terdapat dua bentuk PCP, yaitu modimer (bentuk pendek) dan monomer (bentuk panjang). Bentuk modimer memiliki masa molekul sekitar 14-16 kDa, sedangkan bentuk monomer memiliki masa molekul sekitar 30-35 kDa. Tetapi pada sebagian jenis alga hanya memiliki satu bentuk pirenoid saja. (Weis *et. al.*, 2001). PCP berisi delapan peridinin dan dua molekul klorofil yang diatur untuk mempromosikan perpindahan energi peridinin-klorofil. PCP kompleks adalah trimer protein dengan alpha solenoid kali lipat protein yang tidak biasa dengan berat molekul 35 kDa.

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

bentuk karotenoid (Hirschberg *et al.* 1997). Pigmen PCP dapat dilihat pada gambar 3.



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

#### 2.4 Isolasi RNA *Peridinin Chlorophyl Protein (PCP)*

RNA merupakan polimer yang disebut polinukleotida, dimana setiap polinukleotida yang tersusun atas monomer-monomer nukleotida. Setiap nukleotida tersusun atas tiga bagian, yaitu gugus fosfat, basa nitrogen dan gula pentose. Basa nitrogen RNA terdiri dari adenin, guanin, sitosin dan urasil.

Asam ribonukleat (RNA) merupakan bahan genetik yang berperan penting dalam ekspresi genetik. Dalam genetika molekular, RNA merupakan perantara informasi yang dibawa DNA dan ekspresi fenotipik yang diwujudkan dalam bentuk protein. Terdapat berbagai wujud atau tipe RNA yang tersebar di alam. Sebagai bahan genetik, RNA berwujud sepasang pita (dsRNA), sementara dalam genetika molekular, terdapat tiga tipe RNA yang terlibat dalam proses sintesis protein, yaitu *messenger-RNA* (mRNA), *ribosomal-RNA* (rRNA), *transfer-RNA* (tRNA). mRNA berfungsi sebagai penyandi urutan asam amino pada polipeptida. rRNA bersama protein ribosomal berfungsi untuk membentuk

ribosom sebagai tempat sintesis protein. *Transfer*-RNA (tRNA) berfungsi membawa asam amino ke ribosom pada saat translasi (Agustina *et. al.*, 2011).

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

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

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) (Hewajuli, 2013). Teknik ini dikembangkan untuk melakukan analisis terhadap molekul RNA hasil transkripsi yang terdapat dalam jumlah sedikit di dalam sel. PCR tidak dapat dilakukan dengan menggunakan RNA sebagai cetakan sehingga terlebih dahulu dilakukan proses transkripsi balik (*reverse transcription*) terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementary DNA*). Selanjutnya molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Teknik RT-PCR berguna untuk amplifikasi RNA sebelum dilakukan cloning dan analisis dan untuk mendeteksi ekspresi gen (Yuwono, 2006).

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

Prinsip kerja PCR adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA PCR dalam reaksi. Reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus. Peningkatan hasil amplifikasi PCR pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi target gen. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Pardal, 2010).

## **2.6 Komponen-Komponen PCR**

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

### **2.6.1 DNA Cetakan atau DNA Target**

DNA cetakan atau biasa disebut DNA Target erupakan fragmen DNA organisme yang akan diperbanyak atau dilipat gandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 105 – 106 molekul. Hal penting yang perlu diperhatikan pada DNA cetakan yaitu kemurnian dan kuantitas DNA.

### 2.6.2 Primer

Primer merupakan suatu sekuen oligonukleotida pendek yang memiliki 10 – 40 pb (pasangan basa) yang merupakan komplementer dari DNA target. Pemilihan primer harus sesuai, karena jika tidak sesuai reaksi antara gen target dengan primer tidak akan terjadi. Menurut Handoyo dan Ari (2001), kriteria-kriteria yang harus dipenuhi dalam melakukan perancangan primer adalah sebagai berikut.

#### a. Panjang Primer

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

#### b. Komposisi Primer

Komposisi primer menunjukkan deretan nukleotida primer. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, karena dapat menurunkan spesifisitas primer yang memungkinkan terjadinya mispriming di tempat lain. Kandungan GC (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan GC DNA target. Hal ini dikarenakan primer dengan prosentase GC rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju. Artinya efisiensi proses PCR akan turun. Selain itu, urutan nukleotida

pada ujung 3' sebaiknya G atau C, karena nukleotida A atau T lebih toleran terhadap mismatch, yang nantinya dapat menurunkan spesifisitas primer.

**c. Melting Temperature (T<sub>m</sub>)**

*Melting temperature* (T<sub>m</sub>) merupakan temperatur dimana 50% untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T<sub>m</sub> suatu primer sangat penting karena T<sub>m</sub> primer akan berpengaruh sekali terhadap pemilihan suhu pada tahapan *annealing* PCR. T<sub>m</sub> berhubungan dengan komposisi primer dan panjang primer. Secara teoritis T<sub>m</sub> primer dapat dihitung dengan menggunakan rumus  $[ 2 (A+T) + 4 (C+G) ]$ . Sebaiknya T<sub>m</sub> primer berkisar antara 50-65°C.

**d. Interaksi Primer-primer**

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

**e. Enzim DNA Polimerase**

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

**f. Deoxyribonukleotide Triphosphates (dNTPs)**

Merupakan suatu nukleotida bebas yang berperan dalam proses perpanjangan primer, yaitu melalui pembentukan pasangan basa dengan

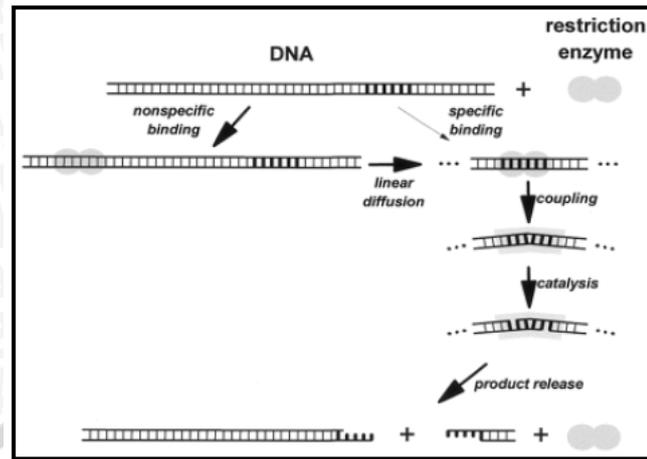
nukleotida dari DNA target. dNTPs mengikat ion  $Mg^{2+}$  yang diperlukan untuk reaksi polimerasi sehingga konsentrasi efektif ion dapat diubah. dNTPs mencakup dATP (nukleotida 17 berbasis *Adenine*), dCTP (nukleotida berbasis *Cytosine*), dGTP (nukleotida berbasis *Guanin*) dan dTTP (nukleotida berbasis *Thymine*).

#### g. Buffer

Komponen pendukung lain yang diperlukan dalam proses PCR adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 (suhu 20°C), 50 mM KCl, 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin), Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%. Selain itu perlu ditambahkan pula 1,5 mM  $MgCl_2$ .

### 2.7 Enzim Restriksi Endonuklease

Enzim ini ditemukan oleh Arber pada tahun 1962, kemudian dipurifikasi dan dikarakterisasi oleh Nathans dan H. Smith pada tahun 1974 (Alberts *et al.*, 1983). Nuklease merupakan enzim yang memotong molekul DNA dengan memutuskan ikatan fosfodiester antara nukleotida satu dengan nukleotida berikutnya. Secara umum enzim nuclease dibedakan menjadi dua yaitu DNase (mendepolimerisasi DNA) dan RNase (mendepolimerisasi RNA). DNase dibedakan menjadi dua macam yaitu eksonuklease yaitu DNase yang memotong DNA dari ujung molekul 5' atau dari ujung 3', dan endonuclease yaitu DNase yang memotong DNA dari bagian dalam untaian DNA. Menurut Yuwono (2006), enzim endonuclease memiliki ciri khas yaitu hanya memotong DNA untai ganda yang mempunyai urutan nukleotida tertentu. Mekanisme pemotongan DNA oleh enzim endonuklease restriksi dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini.

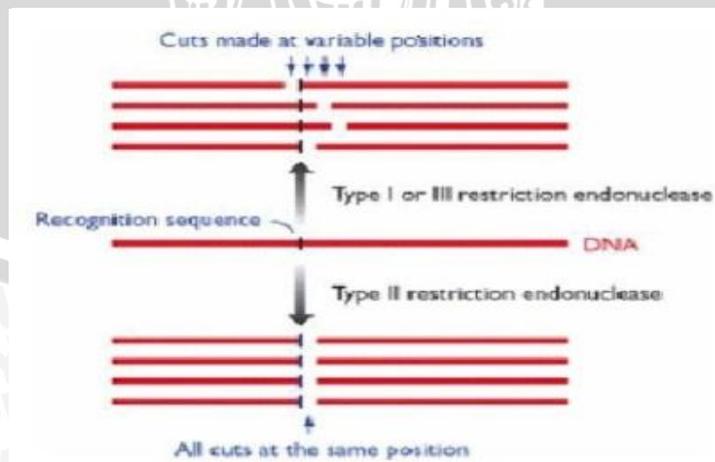


**Gambar 4.** Mekanisme pemotongan DNA oleh enzim restriksi (Pingoud dan Jelstch, 2001)

### 2.7.1 Enzim Restriksi Endonuklease *Hind*I

Enzim restriksi endonuklease restriksi adalah [enzim](#) yang memotong [molekul DNA](#). Enzim ini memotong DNA pada rangka [gula-fosfat](#) tanpa merusak basa. Setiap enzim mempunyai [sekuens](#) pengenalan yang unik pada utas DNA, biasanya sepanjang 4-6 [pasang basa](#).

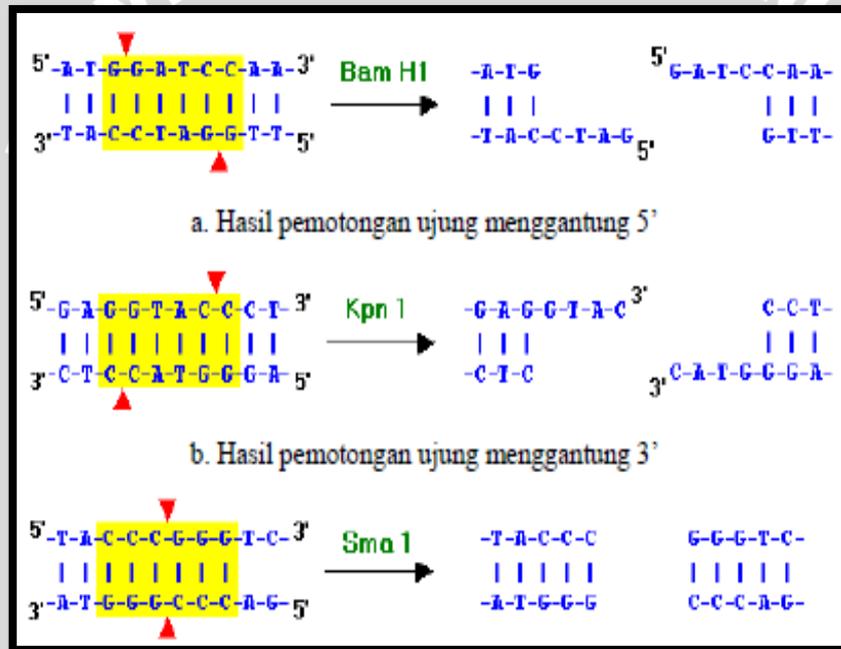
Enzim *Hind*I masuk dalam tipe II yang menghasilkan fragmen-fragmen sesuai dengan yang diinginkan sehingga biasa digunakan untuk analisis DNA dan [kloning gen](#). Enzim ini tergolong kecil dengan sub unit yang memiliki 200-350 [asam amino](#) dan memerlukan  $Mg^{2+}$  sebagai [kofaktor](#).



**Gambar 5.** Pemotongan molekul DNA dengan enzim restriksi endonuklease

Endonuklease tipe II mempunyai spesifitas yaitu daerah yang dikenali maupun daerah yang dipotong enzim tersebut bersifat spesifitas dan terletak pada bagian yang sama. Enzim ini akan memotong pada urutan pengenal dan tidak memotong daerah urutan lainnya. HindI merupakan tipe enzim restriksi yang berasal dari *Haemophilus influenzae* yang membutuhkan adenosine 5'-triphosphate dan 5-adenosyl metionin.

Menurut Owen (1999), contoh hasil pemotongan dengan Enzim Restriksi dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil Pemotongan dengan Enzim Restriksi

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi dalam 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*.

#### 3.2 Alat dan Bahan

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

#### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif eksperimen. Metode deskriptif dalam penelitian ini bertujuan untuk melaporkan hasil optimalisasi identifikasi RNA PCP dari mikroalga laut *Spirulina sp*. Menurut Suharsimi *et.al*, (2006), metode deskriptif merupakan metode penelitian yang dimaksudkan untuk mengumpulkan informasi mengenai status suatu gejala yang ada, secara apa adanya pada saat penelitian dilakukan. Pelaksanaan metode deskriptif tidak terbatas pada pengumpulan dan penyusunan data, tetapi juga analisis dan pembahasan tentang data tersebut. Teknik pengambilan data dalam penelitian ini meliputi data primer dan sekunder.

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

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

### 3.4 Sumber Data

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

#### 3.4.1 Data Primer

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

##### a. Wawancara (Interview)

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

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

b. Observasi

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

c. Partisipasi Aktif

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

### 3.4.2 Data Sekunder

Data sekunder merupakan data yang diperoleh secara tidak langsung, pengumpulannya diperoleh oleh peneliti atau berasal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari Biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Menurut Widi *et.al*, (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.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Kultur *Spirulina sp*

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

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

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

Tabel 1. Komposisi Pupuk Walne

Kultur murni *Spirulina sp* terbagi menjadi dua tahapan. Tahap pertama merupakan tahap kultur laboratorium yang dimulai dengan melakukan kultur pada erlenmeyer dengan volume 1 liter. Setelah umur kultur sekitar 3 hari, biota dipindahkan ke toples dengan volume 3 liter dan dibiakkan selama 3 hari.

Tahap selanjutnya, biota dikultur di luar laboratorium, ruang semi outdoor beratap transparan. Atap berfungsi untuk meminimalisir perubahan suhu dan salinitas secara ekstrim. Wadah kultur berupa akuarium dengan volume 100 liter. Setelah 3-4 hari, biota dipindahkan ke bak kultur yang lebih besar dengan volume 1000 liter. Hasil kultur bak ini kemudian akan digunakan untuk penelitian selanjutnya, yaitu diisolasi PCPnya dan disintesis untuk membuat cDNA *Peridinin Cell Pigment (PCP) Spirulina sp.*

Proses kultur ini dapat optimal dan berhasil apabila kualitas air media kultur mendukung pertumbuhan *Spirulina sp.* Kualitas air yang digunakan dalam kultur harus selalu dipantau agar organisme plankton yang dikultur dapat tumbuh secara optimal (Piranti, 2012). Media kultivasi diamati pH, kadar garam, dan suhunya untuk mengetahui kelayakan tumbuhnya sel mikroalga (Amini *et al.*, 2011).

Pengukuran suhu, salinitas dan pH air media masing-masing menggunakan thermometer Hg, refraktometer, dan pH meter. Pengukuran kualitas air dilakukan dua kali selama proses kultur, yaitu pada awal dan akhir kultur dan masing-masing dilakukan pengukuran dua kali sehari pada pukul 08.00 dan 16.00 WIB. Parameter kualitas air tersebut harus tetap dijaga agar media tetap berada pada kondisi optimum. pH dijaga agar tetap optimal pada kisaran 8-10. Suhu air dipertahankan pada kisaran 28-32°C. salinitas optimum dibuat pada kisaran 32-35 ppm. Apabila kadar salinitas meningkat dapat diantisipasi dengan cara penambahan air tawar, bila salinitas menurun dapat diatasi dengan penambahan air laut (Widiastuti, 2014).

### 3.5.2 Pemanenan *Spirulina sp*

Pemanenan *Spirulina sp* dilakukan saat kepadatan sudah cukup tinggi, biasanya pada fase log dan stasioner. Cahyaningsih (2009), menyatakan bahwa mikroalga yang telah berusia 7-10 hari dapat dipanen dengan cara filtrasi (penyaringan) maupun dengan cara flokulasi (pengendapan). Setelah itu, mikroalga bisa dikeringkan dengan sinar matahari.

Metode pemanenan yang digunakan disini adalah metode flokulasi. Cara pengendapan dilakukan dengan penambahan NaOH pada kultur dan didiamkan selama satu malam. Keesokannya dilakukan proses penyaringan biomassa menggunakan kain satin. Jika semua biomassa sudah selesai disaring, endapan kultur kemudian dibilas dengan menggunakan aquades agar pH yang diperoleh netral. Selain itu, pembilasan dengan aquades ini juga bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan residu kimia. Proses pengeringan biomassa dilakukan dalam ruangan dengan suhu ruang. Endapan biomassa pada kain satin dipindahkan ke plastik agar saat biomassa kering tidak menempel pada kain. Pengeringan biomassa dilakukan dengan bantuan hembusan angin. Proses pengeringan biasanya berlangsung selama 2-3 hari tergantung dari ketebalan endapan biomassa (Rosahdi *et.al*, 2015).

### 3.5.3 Ekstraksi RNA *Spirulina sp*

Berikut adalah prosedur untuk ekstraksi RNA *Spirulina sp* mengacu pada Laporan Penelitian Unggulan PT-BOPTN Yanuhar (2013). Adapun langkah awal sebelum melakukan ekstraksi adalah menyiapkan alat dan bahan. Berikut adalah langkah-langkah dalam ekstraksi *Spirulina sp*:

#### a. Penggerusan Sampel

Berikut adalah langkah-langkah yang digunakan dalam penggerusan sampel:

- Menimbang *Spirulina sp* sebanyak 80 gr

- Menghaluskan sampel dengan mortar dan alu selama 15 menit
- Menambah nitrogen cair  $\pm 5$  ml
- Menghaluskan sampel dengan menggunakan mortar dan alu selama 2 jam
- Menambahkan larutan glisyn dan KCl sebanyak 15 ml sedikit demi sedikit
- Menambahkan glisyn sebanyak 10 ml lalu menghaluskan sampel dengan menggunakan mortar dan alu selama 2 jam
- Hasil

#### b. Sentrifugasi

Berikut adalah langkah-langkah yang dilakukan dalam proses sentrifugasi:

- Menimbang hasil penggerusan sampel sebanyak 2 gram
- Memasukkan ke dalam eppendorf steril
- Mensentrifuge pada  $1.000 \times g$  selama 10 menit dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$
- Mengambil supernatant
- Memasukkan supernatant ke dalam eppendorf steril ukuran 1 ml
- Mensentrifuge pada  $1.000 \times g$  selama 10 menit dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$
- Mengambil supernatant
- Memasukkan ke dalam falcon 50 ml
- Hasil

#### 3.5.4 Isolasi RNA *Spirulina sp*

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

##### a. Pemisahan Jaringan

- Memotong 50 hingga 100 mg jaringan dari sampel segar atau beku.

- Membekukan sampel dengan nitrogen cair.
- Menggerus sampel hingga menjadi bubuk kemudian memindahkan ke tabung eppendorf 1.5 ml (beberapa jaringan dapat digerus tanpa menggunakan nitrogen cair).

#### **b. Pemecahan**

- Menambahkan 500  $\mu$ l buffer RB atau PRB dan 5  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol dalam sampel halus.
- Mencampur menggunakan vortex kemudian menginkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit.
- Menempatkan kolom penyaring dalam tabung koleksi 2 ml kemudian memindahkan campuran sampel ke dalam kolom.
- Mensentrifuse selama 1 menit pada 1000rpm kemudian membuang kolom penyaring.
- Hati-hati dalam memindahkan cairan bening (supernatant) ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml yang baru.

#### **c. Pengikatan RNA**

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

**d. Pencucian**

- Menambahkan 400  $\mu$ l buffer W1 ke dalam kolom RB.
- Mensentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 30 detik.
- Membuang cairan dalam tabung kemudian menempatkan kolom RB kembali dalam tabung koleksi 2 ml.
- Menambahkan 600  $\mu$ l buffer wash (pastikan ethanol ditambahkan) ke dalam kolom RB.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 1 menit.
- Membuang cairan kemudian menempatkan pada kolom RB kembali pada tabung koleksi 2 ml.
- Melakukan sentrifuse pada 14000-16000 rpm selama 3 menit hingga matrik kolom kering.

**e. Pemurnian RNA**

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

**3.5.5 Pengukuran Kadar Protein dengan Nanodrop Spektrofotometri**

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

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

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

1. Sambungkan **kabel** perangkat alat ke **stop kontak**
2. Hidupkan perangkat alat dengan menekan tombol , tunggu hingga kalibrasi selesai
3. Pilih aplikasi (**1. LabelGuard, 2. Cuvette, 3. Function\***) dengan menekan tombol angka pada perangkat alat
4. Pilih jenis sampel (**1. Nucleic Acids, 2. Protein, 3. OD 600**) dengan menekan tombol angka pada perangkat alat
  - ➔ Jika pilih **Nucleic Acids**, selanjutnya pilih mode **1. dsDNA, 2. ssDNA, 3. RNA, atau 4. Oligo**
  - ➔ Jika pilih **Protein**, selanjutnya pilih mode **1. Protein UV, 2. Protein dye/BCA, 3. Bradford, 4. Lowry, 5. Biuret**
5. Pilih **Parameters** dan tentukan:
  - ✓ Lid Factor (LabelGuard application), Pathlength (Cuvette application) → 5 mm atau 10 mm
  - ✓ Dilution Factor → range 1.00—9999
  - ✓ Background → 320 nm
  - ✓ Units → mg/ml, µg/ml, ng/µl, µg/µl, pmol/µl
  - ✓ Factor → dsDNA (50), ssDNA (37), RNA (40), Oligo (ratio 4 base: range 0—9999 atau extinction factor: range 0.01—9999 untuk ratio =  $[1/\text{extinction coefficient} * 10^{-6}]$ )
  - ✓ Wavelength: Bradford (595 nm), Lowry (750 nm), Biuret (546 nm), OD 600 (range 200—950 nm)
6. Kemudian pilih  **OK** atau  **Cancel**
7. Masukkan **LabelGuard** atau **Cuvette** (sesuai aplikasi yang dipilih) berisi **reference sample** ke **cell holder** pada perangkat alat, kemudian tekan tombol **Blank**

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

### 3.5.6 Proses *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Menurut Abnova (2016), terdapat 3 tahapan dalam proses RT-PCR terdiri dari denaturasi sampel RNA, tahap reverse transcription, dan proses PCR. Adapun tahapannya sebagai berikut :

#### a. Denaturasi Sampel RNA

- Menambahkan Primer dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan RNA (10pg-5ug) dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan 10 mM dNTP dalam tabung eppendorf sebanyak 2  $\mu$ l
- Menambahkan DEPC – treated water dalam tabung eppendorf sebanyak 12  $\mu$ l
- Inkubasi larutan yang sudah tercampur di dalam tabung eppendorf pada suhu 65°C selama 5 menit untuk mendenaturasi RNA

#### b. Tahap Reverse Transcription

- Siapkan campuran reaksi reverse transcription
- Menambahkan cDNA sintesis buffer dalam tabung eppendorf sebanyak 4  $\mu$ l
- Menambahkan RNase dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l

- Menambahkan DEPC – treated water dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan ThermoScript RT dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan hasil denaturasi RNA dan primer dalam tabung eppendorf sebanyak 12  $\mu$ l
- Pindahkan sampel ke dalam thermal cycler pada suhu 25°C selama 10 menit, dilanjutkan 60 menit pada suhu 50°C, dan diakhiri pada suhu 85°C selama 5 menit
- Hasil sintesis cDNA dapat disimpan pada suhu -20°C atau dapat juga langsung digunakan untuk proses PCR

### c. Proses PCR

- Siapkan campuran reaksi PCR
- Menambahkan PCR buffer dalam tabung eppendorf sebanyak 5  $\mu$ l
- Menambahkan 50 mM MgCl<sub>2</sub> dalam tabung eppendorf sebanyak 1,5  $\mu$ l
- Menambahkan 10 mM dNTP dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan 10  $\mu$ M sense primer dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan 10  $\mu$ M anti sense primer dalam tabung eppendorf sebanyak 1  $\mu$ l
- Menambahkan Taq DNA polymerase (5U/ul) dalam tabung eppendorf sebanyak 0,4  $\mu$ l
- Menambahkan cDNA dalam tabung eppendorf sebanyak 2  $\mu$ l
- Menambahkan DEPC-treated water dalam tabung eppendorf sebanyak 38,1  $\mu$ l, sehingga berat total campuran PCR sebanyak 50  $\mu$ l
- Lakukan proses PCR
- Sampel PCR di analisa oleh agarose gel elektroforesis

### 3.5.7 Amplifikasi Complementary DNA (cDNA)

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak fragmen cDNA dari proses RT-PCR dengan primer spesifik. Komponen yang dibutuhkan dalam satu kali reaksi PCR yaitu 12.5  $\mu$ l Go taq green, 8.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l Primer F 10 mM, 1  $\mu$ l Primer R 10 mM, 2  $\mu$ l cDNA. Jumlah seluruh reagen yang digunakan dalam satu kali reaksi PCR adalah 25  $\mu$ l. Primer PCR yang digunakan dalam amplifikasi cDNA mengikuti prosedur Weis *et al.* (2001), yaitu primer P1 (*forward*) 5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3' dan primer P2 (*reverse*) 5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'.

Amplifikasi dengan PCR dilakukan dengan tahapan predenaturasi, denaturasi, *annealing*, dan elongasi sebanyak 35 kali. Tahap predenaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 1 menit, tujuan dari denaturasi ini adalah untuk membuka untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Tahap *annealing* dilakukan pada suhu 50°C selama 1 menit, dimana primer *forward* dan primer *reverse* menempel pada untai tunggal DNA pada masing-masing komplemennya. Sintesis pemanjangan akhir terjadi pada suhu 72°C selama 5 menit dan suhu 4°C untuk suhu penyimpanan (Padmarta, 2014).

### 3.5.8 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Sulandri *et.al*, 2003). Prinsip semua metode

elektroforesis sama. Pembedanya adalah media yang dipakai. Media dapat berupa selulosa atau gel. Selulosa digunakan untuk molekul yang mempunyai berat molekul rendah seperti asam amino dan karbohidrat. Gel polyacrylamide dan agarose digunakan untuk molekul dengan berat molekul yang lebih besar (Holme dan Peck, 1998).

Tahapan proses elektroforesis agarose adalah sebagai berikut :

- Memasukkan plate ke dalam chamber elektroforesis.
- Menuangkan TBE buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- Memasukkan gel agarose 1,5% ke dalam chamber elektroforesis.
- Memasukkan 5 µl DNAMarker ke dalam sumur pertama pada gel agarosa.
- Memasukkan 5 µl sampel (produk hasil nested PCR) ke dalam sumur berikutnya.
- Menghubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- Melakukan running elektroforesis dengan tegangan 65 Volt selama kurang lebih 40-50 menit.
- Setelah selesai, tuang running buffer dan mengambil gel dari plate.
- Merendam gel ke dalam ETBR selama kurang lebih 10 menit untuk mewarnai cDNA.
- Memasukkan gel ke dalam *UV transiluminator* untuk divisualisasikan.

### 3.5.9 Enzim Restriksi Endonuklease *Hind*I

Berikut merupakan proses kerja dari enzim restriksi endonuclease, yaitu sebagai berikut :

#### a. Ekstraksi Enzim Restriksi (Setiawan, 1998)

- Di dalam tabung mikro steril diisikan 255 µl akuabides steril, 45 µl NaCl 2 M, dan 300 µl polimer konsentrat. Tabung mikro yang berisi campuran



tersebut dimasukkan ke dalam wadah yang berisi es agar suhunya menjadi sekitar 4 °C.

- Sebanyak 600 µl supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan ke dalam campuran dan divorteks secara diskontinu, yaitu divorteks selama 1-2 detik sebanyak 10 kali.
- Di antara setiap ulangan, tabung dimasukkan ke dalam es, sehingga suhunya dapat dipertahankan sekitar 4 °C. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit untuk mengendapkan asam nukleat. Enzim restriksi yang diinginkan berada pada bagian supernatan.
- Ekstraksi diulangi lagi dengan cara menambahkan 300 µl polimer konsentrasi ke dalam tabung mikro steril dan dimasukkan ke dalam es. Sebanyak 900 µl cairan supernatan hasil sentrifugasi pada ekstraksi tahap pertama ditambahkan ke dalam tabung mikro tersebut..
- Campuran divorteks secara diskontinu dan disentrifugasi pada kondisi yang sama dengan ekstraksi tahap pertama. Tahap ekstraksi dengan polimer konsentrasi dapat diulangi dengan cara yang sama. Enzim restriksi pada bagian supernatan selanjutnya dapat diuji aktivitasnya.

**b. Isolasi plasmid (Sambrook *et al.*, 1989)**

- Kultur ditumbuhkan selama semalam dalam 50 ml LB yang telah ditambahkan antibiotik yang sesuai.
- Kultur dipelet dalam eppendorf dengan sentrifus mikro berkecepatan 12.000 rpm suhu 4°C. Perlakuan tersebut diulangi hingga kultur habis. Pelet sel diresuspensi dengan 120 µl Larutan 1 (Tris-HCl 25 mM, glukosa 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM) dingin, kemudian divorteks.

- Kemudian ke dalam campuran ditambahkan 200  $\mu$ l Larutan 2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) yang dibuat segar. Eppendorf dibalik-balik 5 kali secara cepat, tidak divorteks, lalu diinkubasi selama 10 menit di atas es. Lisis sel ditandai dengan terbentuknya cairan yang kental dan jernih. Lalu ke dalam campuran ditambahkan 150  $\mu$ l Larutan 3 (KAc/HAc) dingin, dan diinkubasi selama 10 menit di atas es. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4  $^{\circ}$ C, dan bagian supernatannya dipisahkan ke dalam eppendorf lain.
- Supernatan tersebut ditambahkan 400  $\mu$ l PCI (fenol : kloroform : isoamilalkohol – 25:24:1), divorteks selama 10 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4  $^{\circ}$ C. Campuran membentuk dua lapisan dan lapisan atas di pindahkan ke eppendorf steril lain dan dipresipitasi selama 2 menit dengan menambahkan 600  $\mu$ l etanol absolut (suhu ruang). Kemudian campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C. Pelet sel kemudian dikeringkan dengan pengering vakum. Setelah kering, pelet dilarutkan dalam buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) bila ingin disimpan dalam freezer atau dalam akuades bila ingin langsung dipakai.

**c. Elektroforesis Gel Agarosa (Suwanto, 1993)**

- Aktivitas pemotongan oleh enzim restriksi dihentikan dengan cara memindahkan campuran enzim restriksi-substrat-buffer ke dalam *freezer*. Hasil reaksi diuji dengan elektroforesis gel agarosa 1% atau 0,8%. Sebanyak 0,25 g agarosa dicampur dengan 25 ml buffer TAE 1x untuk membuat gel kecil 1% atau 0,4 g agarosa dengan 40 ml buffer TAE 1x untuk membuat gel besar.

- Campuran agarosa dan buffer TAE dipanaskan hingga mendidih dan didinginkan sampai suhu 55-60 °C, kemudian dituang ke dalam cetakan yang telah diberi sisir. Setelah gel membeku, sisirnya diambil dan gel diletakkan dalam wadah elektroforesis. Wadah elektroforesis diisi dengan buffer TAE 1x sampai gel berada sekitar 1 mm di bawah permukaan cairan buffer.
- Sampel yang akan dianalisis ditambah dengan 1,5 µl *blue juice*. Sebanyak 20 µl sampel dimasukkan ke dalam sumur gel. Untuk menentukan ukuran fragmen, sebanyak 3 µl *marker DNA 1 kb* juga dimasukkan ke dalam salah satu sumur gel. Pelindung ditutup dan alat elektroforesis dijalankan pada arus 110 mA, tegangan 50 V selama 75-90 menit untuk gel kecil.
- Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan ethidium bromida selama 15-20 menit untuk proses *staining*. Proses *destaining* dilakukan dengan cara merendam gel dalam akuades selama 10-15 menit. Pita-pita DNA yang terbentuk diamati dengan UV-*transilluminator*. Untuk keperluan dokumentasi, gel difoto dengan kamera digital.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kepadatan *Spirulina sp*

Untuk mengetahui pertumbuhan *Spirulina sp*, maka perlu dilakukan pengamatan. Pengamatan pertumbuhan dapat dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi dari awal penebaran bibit. Namun pengamatan paling baik adalah dengan melakukan perhitungan kepadatan dengan menggunakan alat sedwick-rafter yang diamati dibawah mikroskop. Pada perhitungan *Spirulina sp*, alat yang digunakan untuk perhitungan adalah sedwick-rafter.

*Sedgwick-Rafter Cell* adalah suatu alat yang memiliki ukuran panjang 50 mm, lebar 20 mm, dan tinggi 1 mm. Volume *Sedgwick-Rafter Cell* 1.000 mm<sup>3</sup> atau 1 ml. Nilai kelimpahan fitoplankton dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (APHA,1989).

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

atau juga bisa diukur dengan menggunakan rumus :

$$N = \left(\frac{T}{L}\right) \left(\frac{P}{p}\right) \left(\frac{V}{v}\right) \left(\frac{1}{W}\right)$$

Dimana :

N : Kelimpahan fitoplankton (sel/liter)

L : Jumlah kotak Sedgwick-Rafter Cell perlapang pandang

T : Total kotak Sedgwick-Rafter Cell

P : Jumlah plankton yang teramati

p : Jumlah kotak Sedgwick-Rafter Cell yang teramati

V : Volume contoh plankton dalam botol (ml)

v : Volume contoh plankton dalam Sedgwick-Rafter Cell (ml)

W : Volume air yang disaring dengan plankton net (Liter)

Tahapan yang dilakukan untuk mengetahui dan menghitung kepadatan kepadatan *Spirulina Sp.* adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan untuk pengamatan, antara lain: mikroskop, *Sedgwick-Rafter Cell*, *hand tally counter*, *cover glass*, pipet tetes, *beaker glass* 50 ml, botol film, tissue, aquades dan sampel *Spirulina Sp.*
- Sampel *Spirulina Sp.* diambil dengan menggunakan botol film secukupnya.
- Sampel pada botol film diambil sebanyak 1 tetes diletakkan pada *Sedgwick-Rafter*. Apabila sampel terlalu padat dapat dilakukan pengenceran dengan cara mengambil sampel dari botol film sebanyak 1 ml, diletakkan pada beaker glass 50 ml. Kemudian di tambahkan aquades sebanyak 10- 50 ml tergantung pada kepadatan atau warna sampel. Selanjutnya di homogenkan dan diteteskkan sebanyak 1 tetes pada *Sedgwick-Rafter*, kemudian ditutup dengan *cover glass* tanpa ada gelembung udara.
- Sampel pada *Sedgwick-Rafter* diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 x sebanyak 3 kali pengamatan dan dihitung dengan bantuan *hand tally counter*.

Kepadatan plankton (*Spirulina Sp.*) biasanya dinyatakan dengan satuan sel/ml dan penghitungannya dengan menggunakan alat yang dinamakan *Sedgwick-Rafter*. Kepadatan plankton dihitung dengan cara mengambil setetes air plankton menggunakan pipet dan meletakkannya di atas bidang *Sedgwick-Rafter* dan diamati di bawah mikroskop. sedangkan tinggi airnya sama dengan kedalaman *Sedgwick-Rafter*, yaitu 0,1 mm. Volume air di dalam kotakan adalah

0,1 mm<sup>3</sup> terdapat N plankton. Dengan demikian, 1cm<sup>3</sup> atau 1 ml air jumlah planktonnya adalah 10.000 x N sel (Mudjiman, 2004).

Dari hasil perhitungan kepadatan *Spirulina Sp.* yang dikultur dapat diketahui bahwa pada awal pertumbuhannya peningkatan kepadatan sel berjalan bertahap, hal ini sesuai dengan pendapat Bahua (2015), 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- 7 merupakan fase kematian dimana terjadi penurunan jumlah populasi mikroalga.

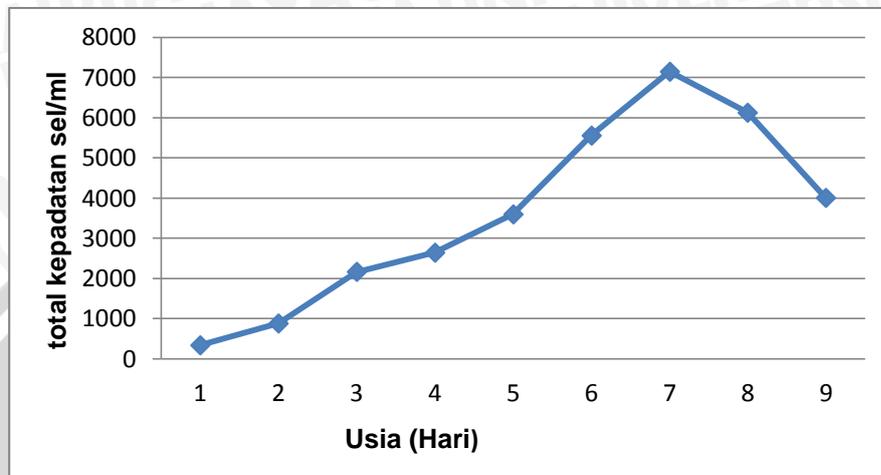
. Pertumbuhan *Spirulina Sp* yang dibudidayakan dapat dilihat hasil perhitungan kepadatan yang tersaji pada Tabel 2.

Usia (Hari)	Kepadatan (10 <sup>4</sup> Sel/ml)		
	Erlenmeyer	Carboy	Bak Fiber
1	340	378	1400
2	880	500	2050
3	2160	1120	3250
4	2640	2880	5400
5	3600	3520	8130
6	5560	4230	5770
7	7150	5340	-
8	6130	5600	
9	4000	6740	
		6120	

Tabel 2. Tabel Kepadatan *Spirulina Sp.* yang dikultur

### a) Kultur *Spirulina Sp.* pada Erlenmeyer dengan Aerasi

Di bawah ini merupakan grafik pertumbuhan kultur *Spirulina Sp.* pada skala Laboratorium yaitu menggunakan Erlenmeyer dengan aerasi.

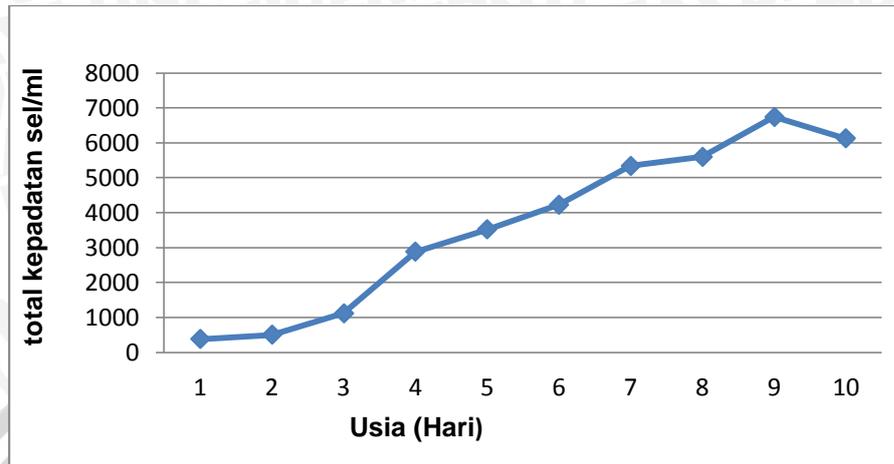


**Gambar 7.** Grafik Pertumbuhan *Spirulina Sp.* skala Erlenmeyer.

Pada kultur *Spirulina Sp.* skala laboratorium kepadatan awal adalah  $340 \times 10^4$  dan mencapai puncaknya pada hari ke-7  $6130 \times 10^4$  sel/ml. Kepadatan *Spirulina Sp.* meningkat pesat pada saat memasuki fase eksponensial. *Spirulina Sp.* yang di kultur mengalami fase puncak pada hari ke-7 yaitu dengan kepadatan  $6130 \times 10^4$  sel/ml.

Menurut Fogg dan Thake (1987), salah satu faktor yang menentukan lamanya fase adaptasi adalah umur kultur yang digunakan sebagai inokulum. Fase adaptasi akan menjadi lebih singkat atau bahkan tidak terlihat apabila sel-sel yang diinokulasikan berasal dari kultur yang berada dalam fase eksponensial. Fase adaptasi tidak terlihat secara jelas pada semua media perlakuan kemungkinan juga disebabkan sel-sel yang diinokulasikan cepat beradaptasi terhadap media kultur yang baru, mampu tumbuh dan membelah dengan cepat.

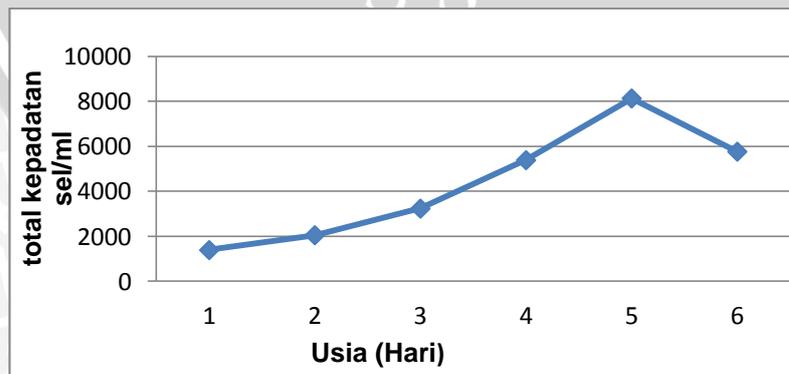
b) Kultur *Spirulina sp* Pada Carboy



**Gambar 8.** Grafik Pertumbuhan *Spirulina Sp.* skala Carboy.

Kepadatan awal kultur *Spirulina Sp.* skala carboy adalah  $378 \times 10^4$  sel/ml. dan mengalami puncaknya atau fase eksponensial pada hari ke-9 yaitu  $6740 \times 10^4$  sel/ml. pada hari ke-10 *Spirulina Sp.* pada carboy dilakukan subkultur pada Bak Fiber 500 Liter. Hal ini sesuai pernyataan Foog dan Thake (1987) bahwa fase adaptasi mikroalga akan menjadi lebih lebih cepat bila sel-sel yang diinokulasikan berasal dari kultur yang berada pada fase eksponensial.

Di bawah ini merupakan grafik pertumbuhan kultur *Spirulina Sp.* pada skala *Intermediate* yaitu menggunakan Bak Fiber/Concel 500 L.



**Gambar 9.** Grafik Pertumbuhan *Spirulina Sp.* skala Intermediate.

Kepadatan awal kultur *Spirulina Sp.* skala *intermediate* adalah  $1400 \times 10^4$  sel/ml. Dan fase puncak pertumbuhan adalah pada hari ke-5  $8130 \times 10^4$  sel/ml. Hal ini didukung oleh Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Sampai saat ini kepadatan sel digunakan secara luas untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga.

#### 4.2 Analisis Kualitas Air

Setiap organisme membutuhkan beberapa syarat agar dalam pertumbuhan dan perkembangannya dapat berlangsung dengan optimal. Seperti halnya organisme lainnya, *Spirulina Sp.* membutuhkan beberapa syarat agar dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Salah satu syarat tersebut adalah kualitas air. Parameter yang digunakan untuk mengukur kualitas air antara lain suhu, derajat keasaman, dan salinitas.

##### 4.2.4 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Setiap mikroalga mempunyai suhu ideal yang berbeda-beda untuk bisa tumbuh dan berkembang dengan baik. Kegiatan kultur *Spirulina sp.* yang ada di BPBAP Situbondo, dengan suhu berkisar antara  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  pada skala laboratorium. Kisaran suhu yang sesuai dan optimum untuk kehidupan fitoplankton adalah  $22\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sari *et.al*, 2013).

##### 4.2.5 Derajat Keasaman (pH)

Seperti halnya suhu, mikroalga memiliki kisaran toleransi pH yang berbeda-beda untuk pertumbuhan yang optimal. Dalam kultur *Spirulina Sp.* yang ada di BPBAP Situbondo, pH yang ada pada skala laboratorium yaitu 8. Meiyana *et.al*, (2001), pH air yang optimal untuk pertumbuhan mikroalga adalah 7-8.

#### 4.2.6 Salinitas

Salinitas merupakan salah satu sifat kimia air yang secara langsung maupun tidak langsung mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme termasuk *Spirulina sp.* Pada saat kultur, biasanya terjadi kenaikan salinitas akibat dari adanya hasil metabolisme dan adanya pengendapan. Dalam kultur *Spirulina sp.* yang ada pada BPBAP Situbondo, salinitas yang dipakai pada skala laboratorium berkisar 33 ppt. Kisaran salinitas optimum yang dimiliki *Spirulina sp.* sebesar 33-35 ppt (Utami *et.al*, 2012).



**Gambar 10.** Kultur Skala Toples dan Kultur Skala Intermediate

#### 4.3 Isolasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP) Spirulina sp*

Pada penelitian ini isolasi RNA dilakukan untuk menghasilkan RNA murni dari *Spirulina sp.*

Isolasi RNA *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* dilakukan menggunakan *RNA mini kit PlantGeneAid*. Berdasarkan RNA kit di atas, ada 3 tahapan isolasi yaitu pemecahan dinding sel (*lysis*), pengikatan RNA, pencucian RNA dan pemurnian RNA. Untuk sel mikroalga pemecahan sel meliputi pemecahan dinding sel dan membran sel. Pemecahan sel umumnya dilakukan dengan cara mekanis menggunakan mortar dan alu dalam larutan nitrogen cair. Nitrogen cair

membuat jaringan dan sel menjadi kering dan rapuh sehingga lebih mudah dihancurkan.

Isolasi RNA *Spirulina sp* menggunakan primer *peridinin chlorophyll protein* (PCP) yang digunakan dalam amplifikasi cDNA mengikuti prosedur Weis *et al.* (2001), yaitu primer P1 (*forward*) 5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3' dan primer P2 (*reverse*) 5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'.

Didalam melakukan isolasi RNA, DNA dan protein dipisahkan untuk memisahkan molekul RNA dari molekul-molekul lain yang tidak diinginkan. Isolasi molekul RNA *peridinin chlorophyll protein* (PCP) *Spirulina sp* langkah pertama kit di atas adalah pemecahan dinding sel dan pengikatan RNA penambahan lysis buffer (RB buffer ) dan  $\beta$ -mercaptoethanol 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). Guanidinium thiocyanate yang merupakan inhibitor kuat RNase dan merupakan denaturan protein (Brown *et. al*, 2009). Tahapan selanjutnya adalah dengan penambahan *wash buffer* ke dalam RB kolom, penambahan ini berfungsi agar dapat menghilangkan sisa kotoran protein yang masih terikat pada RNA. Kemudian tahap pencucian, dengan penambahan *RNAse*-bebas yang berfungsi untuk mengelusi RNA sehingga didapat hasil isolate murni RNA. Untuk membersihkan zat kontaminan yang masih tersisa pada membran kolom dibersihkan dengan serangkaian pencucian dan sentrifugasi menggunakan larutan wash buffer. Molekul RNA kemudian dielusi dengan menggunakan nuclease-free water (Fermentas, 2011).

Terdapat 3 tahap dalam isolasi RNA, yaitu melisiskan membran sel untuk mengekspos RNA, pemisahan RNA dari zat-zat, dan molekul lainnya seperti

DNA, lipid, protein, dan karbohidrat, dan pemulihan RNA dalam bentuk murni (Annisa, 2012).



**Gambar 11.** Isolasi RNA

#### 4.5 Kandungan RNA total

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



**Gambar 12.** Pengukuran hasil total RNA

Berdasarkan hasil pengukuran total RNA hasil isolasi diperoleh hasil 21.0 mg/ml. Hasil pengukuran menunjukkan hasil yang baik, hal ini dikarenakan penggunaan kit komersial dalam proses Isolasi RNA yaitu menggunakan *Total RNA mini kit Plant GeneAid*.

#### 4.5 Reverse Transcription *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

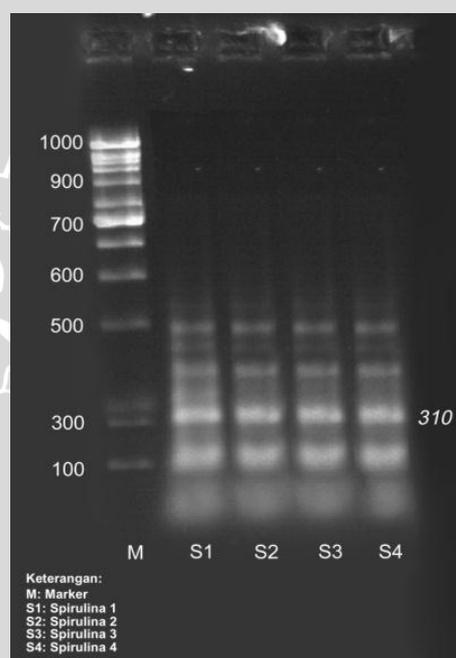
Penelitian menggunakan adalah dari produk Fermentas, sedangkan enzim *reverse transcriptase* yang digunakan untuk melakukan metode RT-PCR menggunakan produk dari Invitrogen. Metode RT-PCR menggunakan modifikasi dari dua kit yaitu *First Strand cDNA Synthesis* dan *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*. metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh reverse transcriptase (mengubah RNA menjadi cDNA) dengan menggunakan PCR (Yusuf, 2010).

Tahapan awal dalam proses RT-PCR ini mempersiapkan campuran reaksi *reverse transcriptase*. Sebanyak 5 µl primer digunakan dan dicampurkan dengan 50 µl total RNA PCP *Spirulina sp* kemudian diinkubasi pada suhu 65° C selama 5-10 menit bertujuan untuk mendenaturasi RNA. Dalam tahapan ini *reverse transcriptase* akan mulai menyintesis untai pertama cDNA dan mengubah basa urasil menjadi timin pada saat primer melekat pada untai DNA.

Selanjutnya sampel yang telah didenaturasi dipindahkan ke mesin PCR *Thermal cycler* untuk dilakukan proses aneling dengan 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 aneling berfungsi untuk memasang primer dan memperpanjang segmen cDNA. Primer tersebut kemudian diperpanjang dengan bantuan enzim DNA polymerase dan akan menghasilkan sebuah untai ganda pada setiap siklusnya dan seterusnya mengikuti amplifikasi logaritmik. Setelah terbentuk segmen cDNA ini, kemudian masuk kedalam proses PCR biasa.

PCR dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik didesain untuk gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* dari *Spirulina Sp*, dimana perancangan

primer dilakukan dengan merujuk pada data cDNA dari gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* yang terdapat pada database GenBank dengan panjang pita 310 bp. Oleh karena itu primer yang digunakan adalah spesifik untuk *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* dari *Spirulina sp* maka identifikasi dilakukan cukup dengan melihat panjang fragmen DNA. RT – PCR ini dikatakan berhasil, karena telah menghasilkan fragmen DNA sepanjang 310 bp (Gambar 13), sesuai dengan panjang gen *Peridinin Chlorophyll Protein (PCP)* yang dijadikan referensi (GenBank).



**Gambar 13.** Visualisasi PCR dengan gel elektroforesis

#### 4.6 Optimalisasi *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

*Polymerase Chain Reaction (PCR)* adalah suatu proses enzimatik dalam mengamplifikasi nukleotida DNA. Keberhasilan proses amplifikasi dalam PCR ditentukan oleh kesesuaian primer yang digunakan serta optimasi dan efisiensi dalam proses PCR. Pada umumnya, keberhasilan dalam memperoleh produk DNA pada metode ini dipengaruhi oleh efisiensi primer, DNA templat dan

optimasi proses PCR yang meliputi suhu dan siklus annealing (Suryanto, 2003). Penggunaan primer yang tidak spesifik dan kurang tepat dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain didalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau tidak terdapat daerah genom yang teramplifikasi. Perlu adanya optimalisasi pada primer dan cetakan DNA yang akan digunakan pada setiap masing-masing PCR.

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA (Handoyo *et.al*, 2000)

Dalam penelitian ini terdapat dua faktor yang diuji untuk mengoptimalkan produk PCR yaitu suhu penempelan primer dan jenis primer. Primer yang digunakan yaitu primer P1 (*forward*) 5'-GCATGAAGCCACTTCGAAAC-3' dan primer P2 (*reverse*) 5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'. Penempelan primer (*annealing*) merupakan proses pelekatan primer pada DNA cetakan. Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR (Yusuf, 2010).

Proses tersebut memerlukan suhu yang berkisar pada *melting temperature* ( $T_m$ ). Menurut Handoyo *et.al*, (2000), Melting temperatur ( $T_m$ ) adalah temperatur di mana 50 % untai ganda DNA terpisah. Pemilihan  $T_m$  suatu primer sangat penting karena  $T_m$  primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu annealing proses PCR.  $T_m$  berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Secara teoritis  $T_m$  primer dapat dihitung dengan

menggunakan rumus  $[2(A+T) + 4(C+G)]$ . Sebaiknya  $T_m$  primer berkisar antara 50 – 65 °C.

Namun dalam penelitian ini menggunakan 6 level suhu yang berbeda yaitu pada suhu 44°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C, dan 58°C. Adanya perlakuan gradient suhu bertujuan untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang maksimal. Pita DNA tampak pada garis ke-1 (suhu 52°C) dengan menggunakan primer P2 (*reverse*) 5'-TAACGCTGGGATGCTTTGAC-3'. Dalam percobaan tersebut, suhu penempelan primer (*annealing*) yang optimal yaitu pada suhu 52°C dari RNA PCP *Spirulina sp.* Perlakuan suhu penempelan primer (*annealing*) yang tepat dapat menghasilkan amplifikasi DNA secara optimal, hal ini ditandai dengan hasil visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis yang terlihat jelas. Perlakuan suhu *annealing* yang terlalu tinggi dan terlalu rendah mengakibatkan primer yang digunakan tidak dapat melekat pada tempat yang spesifik sehingga tidak diperoleh hasil amplifikasi DNA target.

Suhu *annealing* ( $T_a$ ) yang optimum merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan proses PCR. Suhu yang diperlukan untuk primer berhasil menempel pada RNA target tersebut disebut dengan suhu *annealing*. 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).

Pada RNA cetakan hasil amplifikasi primer yang tidak terlihat disebabkan beberapa kemungkinan, yaitu tidak adanya kecocokan sekuen antara primer dengan RNA cetakan yang belum sesuai di dalam reaksi PCR. Selain itu, kualitas dan kuantitas RNA cetakan juga dapat mempengaruhi reaksi PCR. Pada saat melakukan proses PCR sering ditemukan adanya kontaminan yang

mengakibatkan penempelan primer dan amplifikasi tidak sesuai yang diinginkan. Hal ini sesuai dengan pendapat Padmalatha *et.al*, (2006) yang menyatakan bahwa, terdapatnya kandungan polifenol dan metabolit sekunder lain, dapat menghambat penempelan primer dan menurunkan kemurnian RNA. Berdasarkan pada ketebalan pita RNA hasil elektroforesis primer yang paling optimal dalam reaksi RT-PCR pada RNA PCP *Spirulina sp* adalah primer P2 dengan susunan nukleotida TAACGCTGGGATGCTTTGAC. Selanjutnya hasil amplifikasi tersebut dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Hind I* untuk menghasilkan pemotongan RNA PCP yang spesifik pada *Spirulina sp*.

#### **4.7 Pola Pemotongan RNA *Spirulina sp* dengan Enzim Restriksi *HindI***

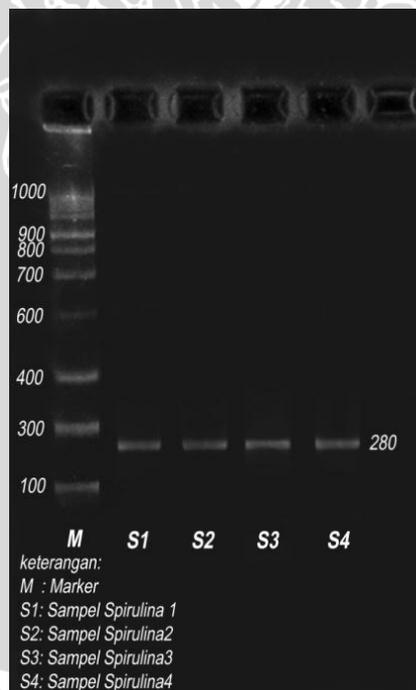
Setiap enzim restriksi mengenal sekuens tertentu dan mampu memotong bagian yang khas pada RNA. Bagian pada RNA yang dikenai aksi pemotongan oleh enzim restriksi ini dinamakan *sekuens pengenal*. Suatu sekuens pengenal sebenarnya adalah sejumlah urutan basa nitrogen tertentu yang oleh enzim restriksi dikenali sebagai tempat atau bagian yang akan dipotongnya.

Enzim restriksi dapat menghasilkan hasil potongan DNA atau RNA yang bervariasi antara spesies yang sama maupun antar spesies yang berbeda. Perbedaan pada urutan nukleotida pada masing-masing spesies atau individu mengakibatkan pola atau hasil pemotongan RNA oleh enzim restriksi yang berbeda juga. Pemotongan enzim restriksi bersifat spesifik untuk urutan basa tertentu, sehingga RNA yang berbeda akan menghasilkan pola pemotongan yang khas. Pola yang khas ini akan diketahui setelah dilakukan elektroforesis gel dan pewarnaan sehingga fragmen RNA yang berbeda-beda ukurannya dapat terlihat (Grompe *et al.*, 1998).

Pada percobaan ini menggunakan enzim restriksi tipe II yaitu enzim restriksi *HindI*. setiap enzim restriksi mengenal urutan spesifik pada molekul RNA

atau RNA yang akan dipotong. Pada enzim restriksi tertentu dapat memotong fragmen DNA atau RNA dalam konsentrasi pH, suhu, dan garam yang sesuai dengan karakter enzim restriksi yang digunakan (*et. al*, 2001).

Hasil pemotongan RNA PCP *Spirulina sp* menggunakan enzim restriksi *HindI* dilihat menggunakan gel agarose 2%. RNA PCP yang teramplifikasi berukuran 280 bp pada sampel *Spirulina sp*. Penggunaan enzim restriksi *HindI* pada penelitian ini berpengaruh dalam mengoptimalisasi *polymerase chain reaction* (PCR) RNA *peridinin chlorophyl protein* (PCP) pada *Spirulina sp*. Hal ini ditunjukkan dari hasil situs pemotongan fragmen RNA PCP *Spirulina sp* menggunakan enzim restriksi *HindI* dihasilkan situs pemotongan RNA yang spesifik.



**Gambar 14.** Pemotongan RNA *Spirulina sp* dengan Enzim Restriksi *HindI*

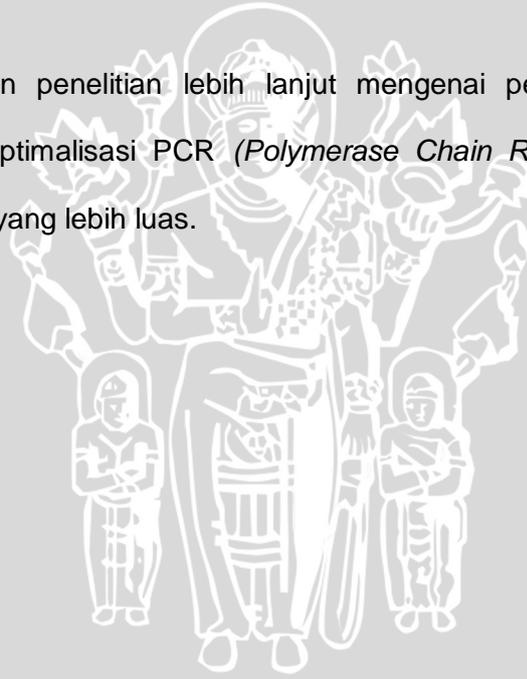
## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian tentang optimalisasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) RNA PCP dengan enzim restriksi *Hind*I pada mikroalga laut *Spirulina Sp* yang dikultur secara *in vivo* adalah optimalisasi PCR dihasilkan perlakuan suhu ennealing yang optimal pada suhu 52 °C. Sedangkan penggunaan enzim restriksi *Hind*I menghasilkan pemotongan RNA pada 280 bp.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan enzim restriksi lain dalam optimalisasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sehingga menambah wawasan yang lebih luas.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abnova. 2016. Video Step Reverse Transcription PCR. <http://www.abnova.com/abvideo/Reverse-Transcription-PCR.html>. Diakses tanggal 10 Juli 2016.
- Aedi, Nur. 2010. Pengolahan dan Analisis Data Hasil Penelitian. *Bahan Belajar Mandiri Metode Penelitian Pendidikan*. Fakultas Ilmu Pendidikan. Universitas Pendidikan Indonesia. Jakarta
- Hariati, R. 2008. Pertumbuhan Spirulina sp. dalam Skala Laboratorium. *Jurnal Biologi* Vol. 10, No, Hal. 19-22.
- 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 dan Syamdi. 2006. Konsentrasi Unsur Hara pada Media dan Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* dengan pupuk anorganik teknik dan analisis. *Jurnal Perikanan*. Vol VIII. No.2. Hal: 201-206.
- Annisa. 2012. Isolasi RNA dan Pengklonan Gen Tripsin Kation dari Pankreas Sapi ke *Echerichia coli* DH5 $\alpha$ . (SKRIPSI). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi Universitas Indonesia. Depok.
- Aranda IVR, Dineen S, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM. 2009. Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range. *Anal Biochem*. 387(1):122-127. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.003.
- Arikunto, Suharsimi. 2002. *Prosedur Penelitian – Suatu Pendekatan Praktek*, Cetakan Kedua Belas (Edisi Revisi V). Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Bahua, H., Y. Hendrawan dan R. Yulianingsih. 2015. Pengaruh Pemberian Auksin Sintetik Asam Naftalena Asetat Terhadap Pertumbuhan Mikroalga (*Nannochloropsis oculata*). *Jurnal Keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*. 3(2) : 179-186.
- BBAP Situbondo. 2012. *Petunjuk Teknis Produksi Pakan Alami*. DKP Jatim.
- Borowitzka, M A dan Borowitzka, LJ. 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Brown S M, Hay J G, Ostrer H. 2009. *Essentials of Medical Genomics*. New Jersey [USA]: Second ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Cahyaningsih, S dan Subyakto, S. 2009. Kultur massal *Scenedesmusl sp.* sebagai upaya penyedia pakan rotifera dalam bentuk alami maupun konsentrat. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 1(2) : 143-147.

- Campbell, N. A., dan J. B. Reece. 2012. Biologi. Terjemahan dari Biologi, Oleh Damaring Tyas Wulandari. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Dahuri, R. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut*. Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Dale, J.W. & M.V.Schantz. From genes to genomes. 2002. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xi + 360.
- Diharmi A. 2001. *Pengaruh Pencahayaan Terhadap Kandungan Pigmen Bioaktif Mikroalga Spirulina platensis Strain Local (Ink)*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Dyah Ayu Hewajuli dan Dharmayanti. 2013. Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases.
- Fatchiyah., Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Erlangga.
- Fermentas. 2011. GeneJet RNA purification kit. Fermentas Inc., New York: 17 hlm.
- Fogg G.E, Thake B. 1987. *Algae Culture and Phytoplankton Ecology* Second edition. The University of Winconsin Press. London.
- Grompe M., Johnson W ., dan Jameson L. 1998. Recombinant DNA and genetic techniques. In *Principles of Molecular Medicine*. Humana press Inc. Totowa, New Jersey.
- 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.
- Hirma, R. D., Hariyati, dan Afrina, Y., 2008. Pemotongan Molekul DNA Menggunakan Enzim Restriksi Endonuklease dan Pengukuran Besarnya Basa dari Fragmen yang Terpotong. Universitas Brawijaya. Malang
- Hirschberg J, Chamovitz D. 1994. "Carotenoids in cyanobacteria." In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Bryant DA, ed. (Dordrecht: Kluwer) pp 559–579.
- Hongmei. G. 2008. Characterization of Photosystem Li In Salt Stressed Cyanobacterial *Spirulina sp* Platens is Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 17 (77) : 488-495.
- Holme, D.J., & Hazel Peck. 1988. Analytical biochemistry 3 rd edition. London : Addison Wesley Longman, 45, 77.
- Isnansetyo, A. dan Kusniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplanton dan Zooplankton. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

- Jongkon P., Siripen T and Richard D. L. 2008. Phytoremediation of Kitchen Wastewater by *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geiteler: Pigment content, Production Variable Cost and Nutritional Value. Maejo International Journal of Science and Technology. 2 (2): 159– 171.
- Kabinawa, INK. 1994. *Kultur Mikroalga: Aspek dan Prospek*. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Mikroalga. Bogor: Puslitbang-Biotek. LIPI.
- Marzuki. 1983. Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. UII Yogyakarta.
- Mudjiman, A. 2004. Makanan Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Meiyana, M., Evalawati, dan Prihaningrum, A. 2001. Biologi Rumput Laut. Teknologi Budidaya Rumput Laut (*Kappaphicus alvarezii*). DIRJENKANBUD BBL. Lampung.
- M.M. Azimatun Nur. 2014. potensi mikroalga sebagai sumber pangan fungsional di indonesia (overview). Eksergi. 11 (2): 1-6
- Nazir, M. 1998. Metodologi Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nindri Yarti, Moh. Muhaemin dan Siti Hudaidah. 2014. PENGARUH SALINITAS DAN NITROGEN TERHADAP KANDUNGAN PROTEIN TOTAL *Nannochloropsis* sp. e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. 2 (2) : 273-278.
- Nontji, A. 1993. *Laut Nusantara*. Edisi ke-2. Jakarta: Djambatan.
- Padmalatha, K., and M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. African J. Biotech. 5(3):230-234.
- Pardal SJ. 2010. Menguji ekspresi gen menggunakan real time PCR. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 32:13-14.
- Putu Lita Astriani., Ketut Ratnayani., dan Sagung Chandra Yowani1. 2014. Optimasi Suhu Annealing Dan Amplifikasi 0,3 KB GEN RPOB DI Hulu Dari RRDR Pada Isolat P16 *Mycobacterium Tuberculosis* Multidrug Resistant Di Bali Dengan Metode Polymerase Chain Reaction. Indonesian E-Journal of Applied Chemistry. 2 (2) : 7-14
- Padmarta, I. G. R., 2014 Identifikasi Spesies *Potyvirus* Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) Melalui Sikuen Nukleotida Gen *Coat Protein*. Tesis. Universitas Udayana : Denpasar.
- Prakash, S., Bhimba, B.V.,2004, Pharmaceutical development of novel microalgae compounds for Mdr *Mycobacterium tuberculosis*. *Natural product radiance*, Vol. 4 (4): 264-269.

- Pranayogi, D. 2003. *Studi Potensi Pigmen Klorofil dan Karotenoid dari Mikroalga Jenis Chlophyceae*. Lampung: Universitas Lampung.
- Rachmatun, S. 1983. Parasit ikon don Cora Pemberantosannya. PT Penebar Swadaya, Jakarta.
- 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.
- Roberts, R. J., and Macelis, D. 2001. REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* 29:268–269.
- Sari IP, Abdul M. 2012. Pola pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada skala laboratorium, intermediet dan masal. *Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* 4(2) : 123-127.
- Surakhmad, W. 2004. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar, Metode dan Teknik (Edisi Revisi). Penerbit Tarsito : Bandung
- Suryanto, D. 2003. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler. USU Library.
- Suharsimi, Arikunto. 2006. Metodologi Penelitian. Jakarta : Rineka Cipta.
- Sulandri, Sri dan M. Syamsul Arifin Zein, 2003, Panduan Praktis Laboratorium DNA Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia: Bogor.
- Singleton, P. & Sainsbury, D. 2006. Dictionary of microbiology and molecular microbiology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xi + 895 hlm.
- Sri Ngabekti., F. Putut Martin H.B., Rahayu Muning Sari . 2013. Keanekaragaman Fitoplankton di Aliran Sumber Air Panas Cendrodinoko Gedongsongo Kabupaten Semarang. *Journal of Life Science.* 2(1) : 9-15
- Utami NF, Yuniarti MS, Kiki H. 2012. Pertumbuhan *Chlorella* sp. Yang dikultur pada perioditas cahaya yang berbeda. *Perikanan dan Kelautan.* 3 (3):237-244.
- Widiastuti, A. 2014. Data, Teknik Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian. *Bahan Ajar Metode Penelitian.* Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Widi, Restu Kartiko. 2010. Asas Metodologi Penelitian. Graha Ilmu. Yogyakarta
- 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.

repository.ub.ac.id

Yusuf K. Zuhriana. 2010. *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)*. Saintek. 5 (6). Jurusan Kesehatan Masyarakat FIKK. Universitas Negeri Gorontalo.

Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polimerase Chain Reaction. Yogyakarta (Indonesia): Penerbit Andi.



## LAMPIRAN

Lampiran 4. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

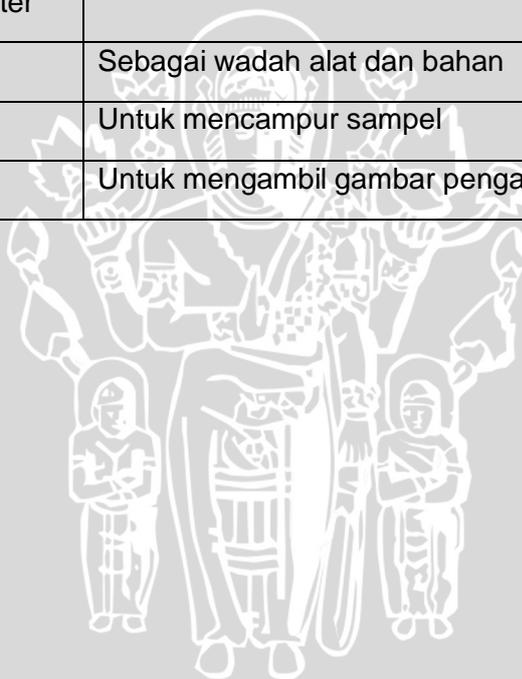
No	Alat	Fungsi
1.	Cawan Petri	Sebagai wadah bibit <i>Spirulina sp</i> pada media agar
2.	Jarum Ose	Untuk inokulasi bibit <i>Spirulina sp</i>
3.	Test Tube	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp</i> kultur laboratorium
4.	Erlenmeyer	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp</i> kultur laboratorium
5.	Toples 3 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp</i> pada kultur laboratorium
6.	Carboy 10 liter	Sebagai wadah kultur bibit <i>Spirulina sp</i> pada kultur laboratorium
7.	AC	Untuk mengatur suhu ruangan
8.	Gelas Ukur	Untuk mengukur larutan dengan skala tertentu
9.	Blower	Sebagai sumber aerasi yang digunakan pada setiap wadah pemeliharaan mikroalga
10.	Batu Aerasi	Untuk membantu penyediaan udara pada wadah kultur <i>Spirulina sp</i>
11.	Selang Aerasi	Untuk membantu menyalurkan udara ke wadah kultur <i>Spirulina sp</i>
12.	Lampu TL	Untuk mengatur cahaya pada kultur skala laboratorium
13.	Bak/Ember Besar	Sebagai wadah air laut untuk kultur skala carboy
14.	Gayung	Untuk membantu memindahkan air laut saat persiapan media kultur skala carboy
15.	Lemari Es	Untuk menyimpan vitamin, pupuk skala lab dan bibit mikroalga yang sudah berkembang biak
16.	Autoclave	Untuk mensterilkan media dan pupuk yang digunakan saat kultur murni laboratorium
17.	Filter/saringan	Untuk menyaring partikel pada air laut
18.	Mikroskop	Untuk mengamati <i>Spirulina sp</i>
19.	Haemocytometer	Untuk menghitung kepadatan <i>Spirulina sp</i>

Lampiran 1 (lanjutan). **Alat yang Digunakan dalam Penelitian**

20.	Coverglass	Untuk menutup permukaan haemocytometer
21.	Pipet Tetes	Untuk mengambil larutan dalam skala kecil
22.	Timbangan	Untuk menimbang komposisi bahan pupuk
23.	Hot plate	Sebagai sumber panas saat pembuatan pupuk
24.	Beaker Glass	Sebagai wadah pupuk dan vitamin
25.	Bola Penghisap	Membantu memasukkan larutan ke pipa kapiler
26.	Pipa Kapiler	Untuk membantu mengambil larutan
27.	Botol Film	Sebagai wadah air sampel yang dihitung kepadatannya
28.	Bak fiber 1 ton	Sebagai wadah kultur skala intermediet
29.	Kain	Untuk membantu menyaring mikroalga yang dipanen
30.	Selang elastis	Untuk menyalurkan air
31.	Pipa	Untuk menyalurkan air dan udara
32.	Filter bag	Untuk menyaring partikel pada air laut
33.	Sikat	Untuk membersihkan bak
34.	Kompor gas	Sebagai sumber panas
35.	Panci	Sebagai wadah pembuatan pupuk intermediet
36.	Jerigen	Sebagai wadah pupuk dan vitamin
37.	Kamera	Untuk mendokumentasikan kegiatan
38.	Stericell	Untuk mensterilkan alat yang terbuat dari kaca
39.	Mortar dan Alu	Untuk menggerus mikroalga <i>Spirulina sp</i>
40.	Mesin PCR	Sebagai alat amplifikasi cDNA
41.	Selofan	Untuk memisahkan protein murni
42.	Sentrifuse	Untuk memisahkan supernatant dan pellet dalam sampel mikroalga
43.	Eppendorf 1,5 dan 2 ml	Sebagai wadah sampel
44.	Falcon	Untuk menyimpan bahan dalam skala tertentu
45.	Freezer	Untuk menyimpan bahan

Lampiran 1 (lanjutan). **Alat yang Digunakan dalam Penelitian**

46.	Refrigerator	Untuk menyimpan bahan
47.	Spuit	Untuk mengambil bahan dalam skala kecil
48.	Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel dengan ketelitian $10^{-2}$
49.	Objek glass	Sebagai tempat pembuatan preparat
50.	Cover glass	Sebagai penutup objek pada preparat
51.	Spatula	Untuk membantu menghomogenkan larutan
52.	Tabung nitrogen cair	Sebagai wadah nitrogen cair
53.	Water bath shaker	Sebagai wadah pembilasan
54.	Nanodrop spektrofotometer	Untuk mengukur kadar protein
55.	Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan
56.	Vortex	Untuk mencampur sampel
57.	Kamera	Untuk mengambil gambar pengamatan



Lampiran 2. **Bahan yang Digunakan dalam Penelitian**

No	Bahan	Fungsi
1.	Bibit <i>Spirulina sp</i>	Sebagai bibit untuk kultur <i>Spirulina sp</i>
2.	Air Laut	Sebagai media pertumbuhan <i>Spirulina sp</i>
3.	Air Tawar	Untuk mencuci alat dan bak yang kotor dan untuk membuat pupuk
4.	Pupuk Walne	Untuk memenuhi nutrisi <i>Spirulina sp</i>
5.	Vitamin B1 & B12	Sebagai vitamin saat kultur <i>Spirulina sp</i>
6.	Alkohol	Untuk mensterilkan tangan sebelum kultur murni
7.	Kaporit	Untuk membunuh bakteri, virus, dan penyakit pada air laut serta untuk sterilisasi carboy, selang dan batu aerasi
8.	Chlorine Test	Untuk mengecek kenetralan media kultur
9.	Aquades	Untuk membersihkan haemocytometer dan coverglass
10.	Na-thiosulfat	Untuk menetralkan klorin dalam air laut
11.	Soda Api	Untuk membantu mengendapkan mikroalga saat pemanenan
12.	Sabun Cuci	Untuk membersihkan alat-alat
13.	Tissue	Untuk mengeringkan alat
14.	Aluminium Foil	Untuk menutup alat yang di autoclave
15.	Plastik	Untuk menutup toples
16.	Karet Gelang	Untuk membantu menutup toples dengan plastic
17.	Nitrogen	Untuk membantu memecah protein <i>Spirulina sp</i>
18.	Buffer RB atau PRB	Untuk menjaga sel agar tidak rusak
19.	Alkohol	Untuk sterilisasi alat yang akan digunakan
20.	Kertas label	Untuk menandai bahan
21.	Masker	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
22.	Sarung tangan	Untuk melindungi bahan dari kontaminasi
23.	Buffer wash	Untuk mencuci kolom purifikasi

Lampiran 2 (lanjutan). **Bahan yang Digunakan dalam Penelitian**

24.	<i>Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit</i>	Untuk isolasi RNA <i>Spirulina sp</i>
25.	<i>Primer</i>	Sebagai komplementer dari DNA target
26.	Akuades	Untuk mensterilkan alat
27.	3,7 $\mu$ l H <sub>2</sub> O, 2 $\mu$ l Buffer RT 10x, 0,5 $\mu$ l DTT ( <i>dithiothreitol</i> ) 50 mM, 0,35 $\mu$ l dNTP ( <i>deoksiribonukleotida triphosphate</i> ) 10 mM, 0,35 $\mu$ l RNase	Sebagai bahan reagen pada RT-PCR



Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian



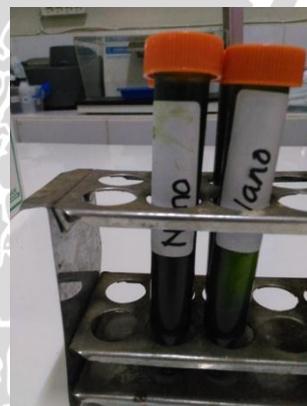
Kultur Skala Toples 5 L



Kultur Skala Carboy 10 L



Proses Penyaringan Sampel



Hasil Penyaringan Sampel



Proses Isolasi RNA Sampel



Penimbangan Sampel Isolasi RNA

Lampiran 3 (lanjutan). Dokumentasi Penelitian



Pengoperasian Mesin PCR



Proses Elektroforesis cDNA



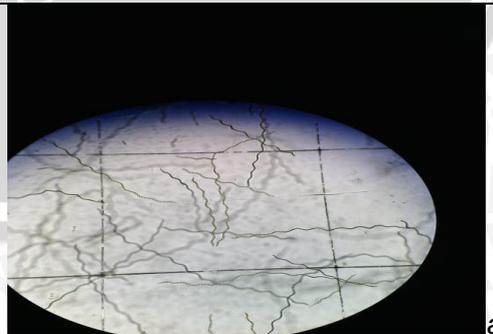
NanoPhotometer™ [Implen]



Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi yang berfungsi sebagai komplemen DNA



Visualisasi cDNA dengan menggunakan UV Transluminator



Gambar *spirulina sp* pada mikroskop

