

**ISOLASI DNA *Chlorella* sp. DENGAN METODE CTAB DAN
IDENTIFIKASI SIKUEN 18S rDNA**

SKRIPSI

Oleh:
HABIBAH ASKUR LIANA
NIM. 12630064



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017**

**ISOLASI DNA *Chlorella* sp. DENGAN METODE CTAB DAN
IDENTIFIKASI SIKUEN 18S rDNA**

SKRIPSI

Oleh:
HABIBAH ASKUR LIANA
NIM. 12630064

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017**

**ISOLASI DNA *Chlorella* sp. DENGAN METODE CTAB DAN
IDENTIFIKASI SIKUEN 18S rDNA**

SKRIPSI


Oleh:
HABIBAH ASKUR LIANA
NIM. 12630064

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 25 Januari 2017

Pembimbing I


A. Ghanaim Fasya, M. Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Pembimbing II


Ahmad Abtokhi, M. Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**



Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**ISOLASI DNA *Chlorella* sp. DENGAN METODE CTAB DAN
IDENTIFIKASI SIKUEN 18S rDNA**

SKRIPSI

Oleh:
HABIBAH ASKUR LIANA
NIM. 12630064

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 25 Januari 2017

Penguji Utama : Suci Amalia, M. Sc
NIP. 19821104 200901 2 007

Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M. Si
NIDT. 19880711 20160801 2 067

Sekretaris Penguji : A. Ghanaim Fasya, M. Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Anggota Penguji : Ahmad Abtokhi, M. Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamilah Havati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : HABIBAH ASKUR LIANA
NIM : 12630064
Jurusan : KIMIA
Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
Judul Penelitian : ISOLASI DNA *Chlorella* sp. DENGAN METODE CTAB
DAN IDENTIFIKASI SIKUEN 18S rDNA

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 25 Januari 2017

Yang membuat pernyataan,



HABIBAH ASKUR LIANA
NIM. 12630064

MOTTO

Saat ini aku mungkin tengah mengelana

Tapi kelak aku akan menemukan jalanku

Aku akan menemukan impianku

Aku akan ikuti impianku

Melihat semua kemungkinan dan
kesempatan dan membuka pikiranku

Karena aku...

~Aku adalah nahkoda jiwaku~



PERSEMBAHAN



Dipersembahkan untuk

Ibu dan kakakku

Teman-temanku

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis atas terselesaikannya laporan hasil penelitian yang berjudul: **“Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan Metode CTAB dan Identifikasi Sikuen 18S rDNA”**. Shalawat serta salam senantiasa turunkan kepada junjungan Nabi Muhammad Saw yang telah membimbing umat ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai Allah Swt.

Seiring terselesaikannya penyusunan laporan hasil penelitian ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul M. drh, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si selaku dosen pembimbing agama, Bapak Ahmad Abtokhi, M. Pd selaku pembimbing agama Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan dan Ibu Suci Amalia, M. Sc selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga..
5. Seluruh dosen dan laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengalaman wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
6. Ibu, kakak dan seluruh keluarga tercinta yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu.
7. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya angkatan 2012 yang telah memberikan semangat, motivasi dan pengalaman yang tak pernah terlupakan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga laporan hasil penelitian bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya penulis secara pribadi.

Amin Yaa Robbal Alamin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, Januari 2017

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
ABSTRAK	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Penelitian	4
BAB II KAJIAN TEORI	
2.1 Mikroalga	6
2.2 Morfologi dan Fisiologi <i>Chlorella</i> sp.	6
2.2.1 Manfaat <i>Chlorella</i> sp.	8
2.2.2 Fase Perkembangan <i>Chlorella</i> sp.	9
2.3 18S ribosomal DNA	10
2.4 Metode <i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i> (CTAB)	12
2.5 Elektroforesis Gel Agarosa	15
2.6 UV transluminator.....	16
2.7 NanoDrop® ND-1000.....	16
2.8 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	17
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.2.1 Alat.....	20
3.2.2 Bahan	20
3.3 Tahapan Penelitian	21
3.4 Cara Kerja	21
3.4.1 Kultivasi <i>Chlorella</i> sp.	21
3.4.2 Isolasi DNA.....	22
3.4.3 Elektroforesis Gel Agarosa	23
3.4.4 Uji Kuantitatif DNA dengan NanoDrop	23
3.4.5 Amplifikasi Hasil Isolasi DNA dengan PCR	23
3.4.6 Penentuan urutan sikuen 18S rDNA	24
3.4.7 Analisis Bioinformatika	24

BAB IV PEMBAHASAN

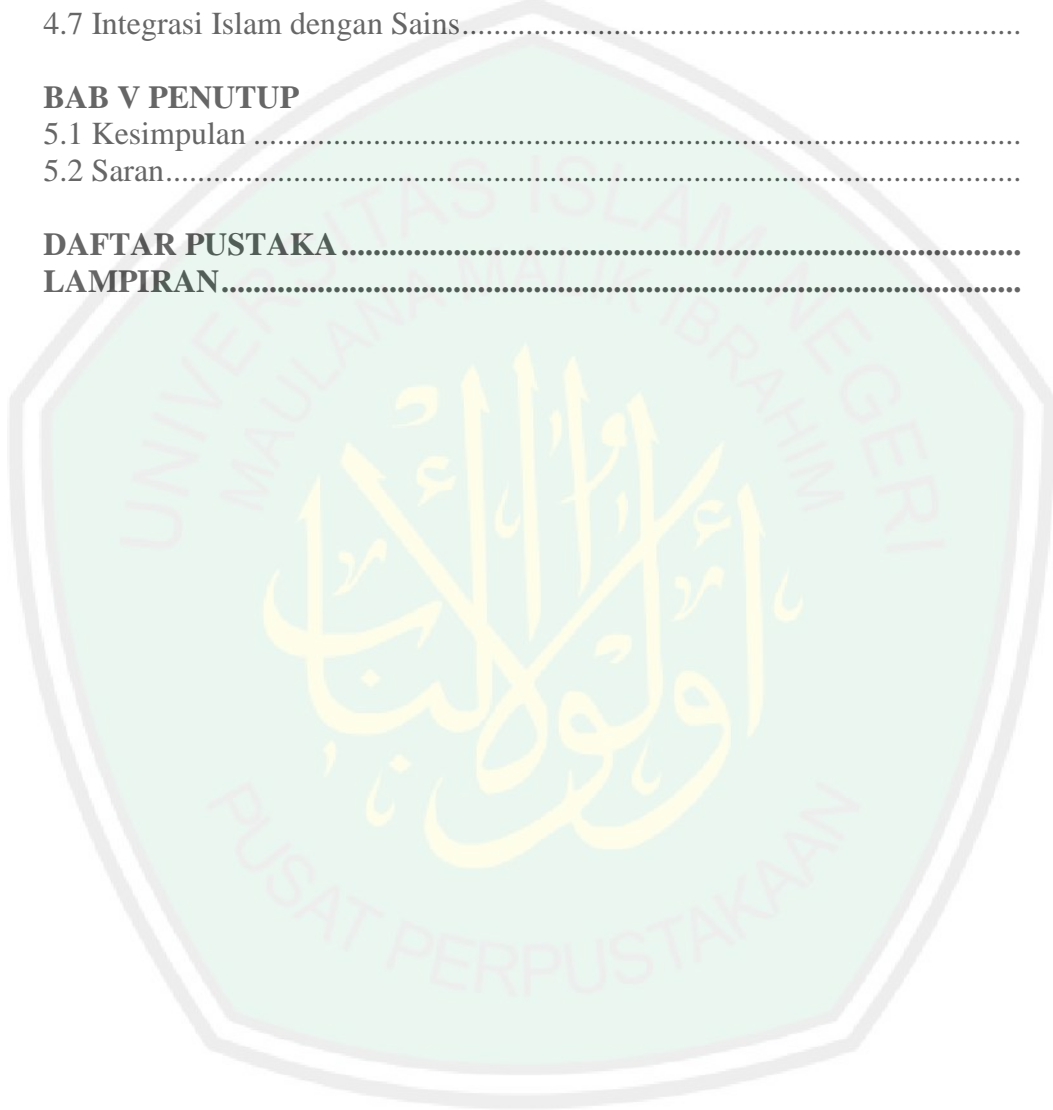
4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	26
4.2 Isolasi DNA Mikroalga <i>Chlorella</i> sp. dengan Metode CTAB.....	27
4.3 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif DNA <i>Chlorella</i> sp.	29
4.4 Amplifikasi DNA dengan PCR.....	30
4.5 Penentuan Urutan sekuens DNA <i>Chlorella</i> sp.	31
4.6 Analisis Bioinformatika	32
4.7 Integrasi Islam dengan Sains.....	36

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran.....	38

DAFTAR PUSTAKA	39
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	44
-----------------------	-----------



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi <i>Chlorella</i> sp.	7
Gambar 2.2	Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella</i> sp. dalam MET	10
Gambar 2.3	Struktur Tersier 18S rRNA	11
Gambar 2.4	UV Transluminator	16
Gambar 2.5	Alat NanoDrop® ND-1000.....	17
Gambar 2.6	Tahapan PCR	19
Gambar 3.1	Arah Pembacaan sikuen CS15 dan CS11	25
Gambar 4.1	Proses Kultivasi <i>Chlorella</i> sp.	27
Gambar 4.2	Campuran Sampel dengan CI.....	28
Gambar 4.3	Elektroferogram DNA <i>Chlorella</i> sp.....	29
Gambar 4.4	Elektroferogram PCR dengan Primer 18S NSF dan Rss3	30
Gambar 4.5	Elektroferogram PCR dengan primer 18S SSF dan SSR.....	31
Gambar 4.6	Sikuen CS15 dan CS11	32
Gambar 4.7	Filogram <i>Chlorella</i> sp. CS15 MEGA6	34
Gambar 4.8	Filogram <i>Chlorella</i> sp. CS15 MEGA6	34
Gambar 4.9	Filogram <i>Chlorella</i> sp. CS11 ClustaW Omega.....	35
Gambar 4.10	Filogram <i>Chlorella</i> sp. CS11 ClustaW Omega.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Fungsi Komposisi Buffer CTAB dalam Proses Lisis	14
Tabel 3.1	Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Primer	24
Tabel 4.1	Hasil BLAST Sikuen CS15	33
Tabel 4.2	Hasil BLAST Sikuen CS11	33



ABSTRAK

Liana, H. A. (2016). **Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan Metode CTAB dan Identifikasi Sikuen 18S rDNA**. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Chlorella sp. merupakan salah satu jenis mikroalga hijau yang banyak ditemukan dalam air laut dan air tawar. Spesies *Chlorella* sp. terdiri dari beberapa macam diantaranya, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella kessleri* dan *Chlorella zofingiensis*. Perbedaan antar spesies *Chlorella* sp. sulit dibedakan karena memiliki bentuk morfologi yang mirip. Metode identifikasi spesies *Chlorella* sp. dapat melalui pendekatan genotip yang didasarkan pada sikuen 18S rDNA. Keberhasilan metode genotip bergantung pada kualitas DNA, sehingga variasi konsentrasi CTAB yang tepat dibutuhkan untuk mengekstrak DNA dengan baik. Pita DNA pada larutan CTAB 1% memiliki kemurnian dan konsentrasi yang cukup tinggi masing-masing 2,02 dan 143,57 ng/ μ L. Amplifikasi sikuen 18S rDNA menggunakan instrumentasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). DNA *Chlorella* sp. berhasil teramplifikasi oleh primer F dan R. Kedua primer menghasilkan dua jenis sikuen masing-masing CS15 dengan panjang 715 bp dan CS11 dengan panjang 873 bp. Kedua sikuen memiliki kemiripan sebesar 99–100% dengan *Parachlorella kessleri*.

Kata kunci: Isolasi DNA, *Chlorella* sp, metode CTAB, sikuen 18S rDNA

ABSTRACT

Liana, H. A. (2016). **Isolation DNA of *Chlorella* sp. Using CTAB Method and Identification 18S rDNA Sequence.** Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Chlorella sp. is one of green microalgae which observed in various aquatic water, including fresh and marine water. The type of *Chlorella* sp. such as *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella kessleri* and *Chlorella zofingiensis* have similarity morphology each other. The molecular method based on 18S rDNA more effective to distinguish species of *Chlorella* sp. The successfully molecular method depend on quality of DNA, so variation concentration of CTAB were needed to get good DNA. Isolation DNA of *Chlorella* sp. using CTAB 1% have high purity is 2,02 and concentration is 143.57 ng/ μ L. Amplification 18S rDNA with primer 18S F and R. The primer 18S F and R produce sequence each other so, there are two sequence. Sequence CS15 with length 715 from primer F and 873 bp from R. The both of primer have similarity 99–100% with *Parachlorella kessleri*.

Keywords : Isolation DNA, *Chlorella* sp, CTAB method, 18S rDNA sequence

مستخلص البحث

ليانا، ح. أ. (٢٠١٦). عزل الحمض النووي كلوربلا بطريقة **CTAB** و تحليل متواليات ١٨س **rDNA**. المشرف ١: غنائم فاشا الماجستير؛ المشرف ٢: أحمد أبطخي الماجستير؛ مستشارة: دوي يولياني الماجستير.

كلوربلا هو أحد الطحالب الخضراء التي وجدت في ماء البحر وماء الصفيقة. كلوربلا يتكون من أنواع متنوعة، منها كلوربلا فولغارس، وكلوربلا سوروكينيانا، وكلوربلا كسليري، وكلوربلا زوفينجينسيس. و كان بين كلوربلا صعبة التفريقها لأن لديها الشكل المتشبهات. و تحليل كلوربلا تمكن فعاهها مع طريق نهج الجيني. طريق نهج الجيني باعتماد على متواليات ١٨س **rDNA**. و كان عزل الحمض النووي كلوربلا بطريقة **CTAB** اختلافات تركيز حل **CTAB**. النتيجة فيها ان الحسنى في تركيز **CTAB** ١% لديها أعلى النقاء هي ٢,٠٢ و لديها ايضا أعلى التركيز هي ١٤٣ ng/μL. و كان توسيع متواليات ١٨س **rDNA** باستخدام أداة **PCR**. منها تعرف ان **DNA** من كلوربلا توسع بأساس **F** و **R**. و يحصل منهما متواليان وهما **CS15** بطوله 715 بـف و **CS11** بطوله 873 بـف. و لديهما التشبه بفاراكلوربلا كسليري من ٩٩ حتى ١٠٠%.

كلمات الأساسية: كلوربلا، طريقة **CTAB**، متواليات ١٨س **rDNA** عزل الحمض النووي

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga merupakan salah satu biota eukariotik bersel satu yang terdapat di perairan Indonesia. Habitat mikroalga dapat ditemukan di air tawar dan air laut. Kelompok mikroalga terbagi menjadi empat kelompok antara lain, diatom (*Bacillariophyceae*), alga hijau (*Chlorophyceae*), alga emas (*Chrysophyceae*) dan alga biru (*Cyanophyceae*) (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). *Chlorella* sp. termasuk golongan mikroalga hijau yang hidup di bumi sejak 2,5 milyar tahun yang lalu (Wirosaputro, 2002).

Chlorella sp. memiliki kandungan protein sebesar 30–55%, lemak 10–25%, karbohidrat 10–30%, mineral 10–40% dan serat 0,2% (Pranayogi, 2003). Berdasarkan kandungan tersebut, *Chlorella* sp. banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, makanan, kecantikan dan biodiesel. Allah SWT berfirman dalam Qur'an surat an Nahl ayat 14.

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى
 الْفُلْكَ مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ﴿١٤﴾

Artinya : “dan Dialah, Allah yang menunundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai dan kamu melihat bahtera yang berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur.” (Qs. an Nahl: 14)

Manfaat *Chlorella* sp. dalam bidang kesehatan memiliki peran sebagai agen antibakteri. *Chlorella pyrenoidosa* merupakan salah satu jenis spesies *Chlorella* sp. yang dapat digunakan untuk antibakteri. Senyawa aktif hasil hidrolisis asam lemak *Chlorella pyrenoidosa* mampu menghambat aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Abedin & Taha, 2008; Fasya, 2013; Kumalasari, 2014)

Keragaman spesies *Chlorella* sp. memperlihatkan karakter yang hampir mirip satu sama lain. Meskipun *Chlorella* sp. telah banyak diidentifikasi secara konvensional, tetapi seiring perkembangan zaman spesies *Chlorella* sp. mengalami perkembangan. *Chlorella* sp. berkembangbiak bergantung pada keadaan lingkungan. Berdasarkan keadaan lingkungan memungkinkan munculnya varietas baru sehingga akan sulit diidentifikasi apabila hanya menggunakan teknik konvensional. Eksplorasi lebih lanjut mengenai spesies menggunakan teknik molekuler *Chlorella* sp. lebih akurat dibanding teknik konvensional (Wu, Hseu, & Lin, 2001)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknik molekuler yang cepat, tepat dan spesifik dapat digunakan untuk mendeteksi keberagaman spesies *Chlorella* sp. Keberhasilan teknik PCR membutuhkan primer yang sesuai dan DNA dengan kualitas serta kuantitas yang baik. Primer yang digunakan harus memenuhi syarat PCR sehingga DNA dapat teramplifikasi. Oleh karena itu, proses amplifikasi digunakan variasi primer untuk mencari primer yang sesuai. Urutan primer tersebut adalah NSF (5'-GTAGTCATATGCTTGGTCTC-3') (Wu dkk., 2001) dan Rss3 (5'-GCAGGTTACCTACGGAAACC-3') (Matsunaga, Matsumoto, Maeda, Sugiyama, Sato, & Tanaka, 2009) dan 18S SSF (5'-

CCTGGTTGATCCTGCCAG-3') dan SSR (5'-TTGATCCTTCTGCAGGTTCA-3') (Yang, Lui, Hao, Shi, & Zhang, 2012).

Metode yang biasa digunakan untuk mengisolasi DNA *Chlorella* sp. adalah menggunakan metode CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*). Banyak penelitian yang menggunakan metode CTAB untuk mengisolasi mikroalga hijau (Alemzadeh, Haddad, Ahmadi, Hosseini, & Moezzi, 2014; Gupta, Sinha, & Bandopadhyay, 2014; Kusumaningrum & Soedarsono, n.d.; Soylu & Gönülol, 2012; Varela-Álvarez dkk., 2006; Yang dkk., 2012). Metode ini memiliki keakuratan yang tinggi karena mampu memisahkan DNA dari polisakarida dan senyawa polifenol (Varela-Álvarez dkk., 2006).

Keberhasilan metode CTAB bergantung pada komposisi bufer CTAB. Larutan CTAB merupakan salah satu komponen bufer. Konsentrasi CTAB memengaruhi kualitas dan kuantitas DNA yang didapat. Variasi konsentrasi CTAB perlu dilakukan untuk menghasilkan isolat DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi. Shisarmini, Ambarwati, Santoso, Utami, & Herman (2001) menggunakan konsentrasi CTAB 1% yang menghasilkan pita DNA yang tidak *smear* dan kemurniannya mencapai 1,9–2,9. Varela-Álvarez dkk., (2006) mengekstraksi DNA mikroalga hijau dan cokelat menggunakan CTAB 2% dan menghasilkan kemurnian DNA sebesar 1,6–1,7. Konsentrasi CTAB 3% pada hasil elektroforegram menunjukkan pita DNA yang konsisten (Nurkamila & Made, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan variasi konsentrasi larutan CTAB dalam bufer lisis ?
2. Bagaimana hasil identifikasi spesies *Chlorella* sp. menggunakan sikuen 18S rDNA ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hasil isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan variasi konsentrasi larutan CTAB dalam bufer lisis.
2. Mengetahui hasil identifikasi spesies *Chlorella* sp. menggunakan sikuen 18S rDNA.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi dalam bidang ilmu molekuler terkait identifikasi keberagaman *Chlorella* sp. dengan teknik PCR.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai spesies *Chlorella* sp. yang bermanfaat dalam bidang industri, farmasi dan kosmetik.

1.5 Batasan Penelitian

1. Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari genus *Chlorella* sp.
2. Metode isolasi DNA menggunakan metode CTAB.
3. Variasi konsentrasi larutan CTAB dalam bufer 1%, 2% dan 3% dengan konsentrasi EDTA 20 mM pH 8.

4. Uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa dan kuantitatif DNA menggunakan spektrofotometer NanoDrop ND-1000.
5. Menggunakan 2 variasi primer 18S rDNA yang terdiri dari NSF-Rss3 dan SSF-SSR.



BAB II

KAJIAN TEORI

2.1 Mikroalga

Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik dengan morfologi sel yang bervariasi, baik uniseluler maupun multiseluler (membentuk koloni kecil). Mikroalga menghasilkan beberapa vitamin penting, seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12, C, E, nikotinamida, biotin, asam folat, dan asam pantotenat. Pigmen yang dihasilkan meliputi klorofil (0,5 sampai 1% dari berat kering), karotenoid (0,1 sampai 14% dari berat kering), dan fikobiliprotein (Becker, 1994). Mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi antara lain, hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka & Lesley, 1988).

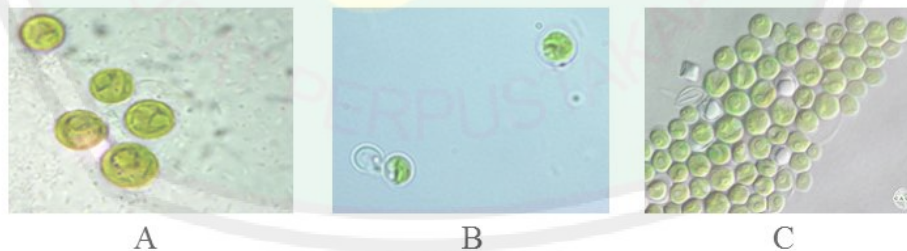
2.2 Morfologi dan Fisiologi *Chlorella* sp.

Salah satu jenis mikroalga dari golongan *Chlorophyta* adalah *Chlorella* sp. *Chlorella* sp. memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif bahan farmasi dan kedokteran. *Chlorella* jenis mikroalga yang pertama kali mempunyai bentuk sel yang berinti sebenarnya. Kelangsungan hidupnya sampai zaman modern merupakan bukti kestabilan sifat genetik untuk mempertahankan pembawaan sifatnya selama miliaran tahun.

Berikut ini taksonomi *Chlorella* sp. (Bold & Wynne, 1985).

Filum : Chlorophyta
 Kelas : Chlorophyceae
 Ordo : Chlorococcales
 Familia : Chlorellaceae
 Genus : *Chlorella*
 Spesies : *Chlorella* sp.

Chlorella sp. tergolong tumbuhan renik air berdasarkan UU RI No. 9 tahun 1985 tentang Perikanan & *Chlorella* sp. termasuk komoditas perikanan. *Chlorella* sp. tergolong tumbuhan tingkat rendah berukuran 3–15 mikron, bersel tunggal (*uniseluler*), berbentuk bulat seperti bola ataupun bulat telur, berwarna hijau karena selnya mengandung klorofil dalam jumlah yang besar daripada karoten dan xantofil. Dinding sel *Chlorella* sp. terdiri dari selulosa dan pektin, tiap-tiap selnya terdapat satu buah inti sel dan satu kloroplas (Wirosaputro, 2002; Isnansetya & Kurniastuty, 1995).



Gambar 2.1 Morfologi *Chlorella* sp. (A) *Chlorella vulgaris*, (B) *Chlorella sorokiniana* (Selvarajan dkk., 2015) dan (C) *Parachlorella kessleri* (www.uniprot.org).

Komposisi struktur dinding sel terbagi menjadi dua bagian yaitu luar dan tengah (lamela). Bagian luar mengandung ultrastruktur yang terdiri dari trilaminar dan struktur algaenan, sedangkan bagian tengah mengandung 80% selulosa

(Rodrigues & Bon, 2011). Trilaminar mengandung lemak yang menyusun membran sel dengan gaya Van der Wals diantara rantai hidrokarbon lemak. Protein yang berada dibawah permukaan membran sel berikatan elektrostatis dengan fosfolipid (Korn, 2014). Struktur *algaenan* terdiri dari biopolimer yang mengandung rantai karbon yang panjang (Kodner, Robin, Roger, Summons, & Andrew, 2009).

2.2.1 Manfaat *Chlorella* sp.

Wenno (2010) menyatakan bahwa kandungan gizi *Chlorella* sp. yang terdiri dari 60,5 % protein, 11 % lemak, 20,1 % karbohidrat, 4,6 % mineral dan serat 0,2 %. Berdasarkan kandungan gizi *Chlorella* sp. banyak dimanfaatkan antara lain:

a. Meningkatkan sistem kekebalan tubuh

Chlorella sp. juga dapat membantu tubuh meningkatkan sistem kekebalan tubuh terhadap gangguan logam berat seperti Hg, Cd dan Pb.

b. Pakan Alami

Chlorella sp. yang mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim dan serat yang tinggi sehingga mampu menghasilkan komponen bioaktif yang sering dimanfaatkan dalam bidang farmasi dan kedokteran (Wirosaputro, 2002; Steenblock, 2000).

c. Pemanfaatan Biodiesel

Menurut Sofyan (2012) komponen asam lemak yang terkandung dalam alga sebesar 14–22%. Komponen asam lemak ini dapat disintesis menjadi biodiesel.

d. Agen Pengobatan

Klorofil dalam alga dapat dimanfaatkan sebagai pewarna alami makanan dan terapi penyakit kanker. Senyawa karoten juga dapat dimanfaatkan sebagai pewarna alami makanan, bahan tambahan kosmetik, obat-obatan, agen antikanker serta antioksidan (Leema, Kirubakaran, Vinithkumar, Dheenan, & Karthikayulu, 2010; Muthukannan, Jayapriyan, & Rengasamy, 2010).

e. Bahan kecantikan

Chlorella sp. yang dijadikan bahan dasar pembuatan sampo dan *body lotion* (Kabinawa, 2011).

2.2.2 Fase Perkembangbiakan *Chlorella* sp.

Chlorella sp. berkembang biak dengan membelah diri membentuk autospora. Proses pembelahan diri *Chlorella* melalui empat fase siklus. Fase lag (fase istirahat) dimulai setelah penambahan inokulum ke dalam media kultur hingga beberapa saat sesudahnya. Fase ini, terjadi peningkatan paling signifikan terlihat pada ukuran sel karena secara fisiologis *Chlorella* sp. menjadi sangat aktif. Proses sintesis baru juga terjadi dalam fase ini. Metabolisme berjalan tetapi pembelahan sel belum terjadi sehingga kepadatan sel belum meningkat karena *Chlorella* sp. masih beradaptasi dengan lingkungan barunya (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Fase logaritmik (fase eksponensial) dimulai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan yang meningkat secara intensif. Bila kondisi kultur optimum maka laju pertumbuhan pada fase ini dapat mencapai nilai maksimal dan pola laju

pertumbuhan dapat digambarkan dengan kurva logaritmik. Menurut Isnansetyo & Kurniastuty (1995), *Chlorella* sp. dapat mencapai fase ini dalam waktu 5–7 hari.

Fase stasioner merupakan fase laju reproduksi dan laju kematian relatif sama. Penambahan dan pengurangan jumlah fitoplankton seimbang sehingga kepadatannya relatif tetap (stasioner) (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). Fase kematian ditandai dengan laju kematian yang lebih besar daripada laju reproduksi sehingga jumlah sel mengalami penurunan geometrik. Penurunan kepadatan sel fitoplankton ditandai dengan perubahan kondisi optimum yang dipengaruhi oleh suhu, cahaya, pH media, ketersediaan hara dan beberapa faktor lain yang saling terkait satu sama lain (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). Secara skematis pola perkembangbiakan dari *Chlorella* sp., dilihat pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan *Chlorella* sp. dalam Media Ekstrak Tauge (Fasya, 2013).

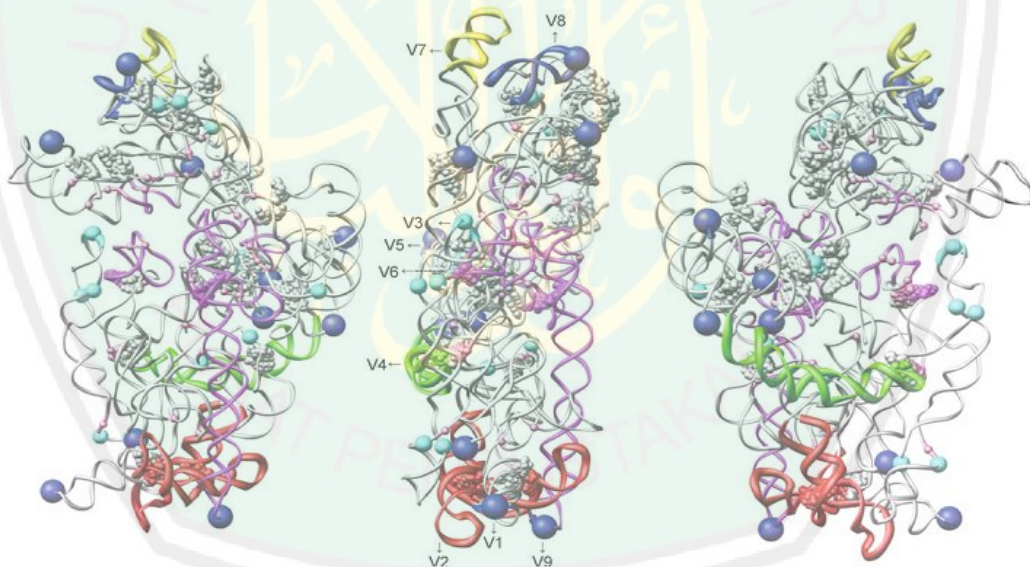
2.3 18S ribosomal DNA

DNA ribosom (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom. Deret rDNA pada eukariotik terletak pada nukleus/inti dan mitokondria. Daerah rDNA dipisahkan oleh suatu pembatas yang disebut *spacer*.

Daerah konservatif rDNA yaitu gen penyandi rRNA berdasarkan nilai koefisien sedimentasi, yaitu 5,8S, 18S dan 28S rDNA. Sikuen 18S rDNA mengalami perkembangan relatif lambat sehingga cocok digunakan dalam analisis keragaman spesies secara molekuler (Mulyatni, Priyatmojo, & Purwantara, 2011).

Sikuen 18S rDNA adalah sikuen yang paling banyak dalam spesies eukariotik. Saat ini dalam *GenBank* terdapat 375.786 *database* 18S dengan panjang basa yang berbeda-beda. Sikuen 18S rDNA yang paling pendek berukuran 1500 bp sedangkan sikuen terpanjang tanpa intron berukuran lebih dari 4500 bp (Xie, Lin, Qin, Zhou, & Bu, 2011). Struktur 18S rDNA dapat dilihat pada

Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur tersier 18S rRNA. Domain translasi fungsional (ungu) dan daerah variabel V1 (biru tua), V2 (merah), V3 (biru muda), V4 (hijau), V5 (biru tua), V6 (biru muda), V7 (kuning), V8 (biru tua), dan V9 (biru muda) ditunjukkan oleh garis berwarna pada gambar (Xie dkk., 2011).

2.4 Metode *Cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB)

Metode *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol. Senyawa CTAB termasuk jenis surfaktan kationik yang digunakan untuk proses lisis dinding sel tanaman. Metode CTAB tidak membutuhkan biaya yang lebih mahal dibandingkan dengan menggunakan kit (Kaidah & Suprpto, 2003; Ardiana, 2009).

Prinsip isolasi DNA menggunakan metode CTAB meliputi proses lisis sel, ekstraksi, presipitasi dan purifikasi. Proses lisis merupakan proses perusakan dinding sel sehingga seluruh isi sel keluar. Keberhasilan proses lisis ditentukan oleh komposisi bufer lisis yang digunakan. Komposisi bufer lisis dalam metode CTAB yaitu, Tris-HCl, surfaktan CTAB, EDTA, NaCl, dan polivinilpirolidon (PVP). Setiap komponen bufer lisis masing-masing memiliki fungsi. Fungsi komponen bufer lisis dapat dilihat pada **Tabel 2.1**

Dinding sel yang telah terdegradasi mengakibatkan DNA beserta seluruh isi sel keluar. DNA yang masih bercampur dengan kontaminan dipisahkan melalui proses ekstraksi. Kontaminan yang bercampur dengan DNA meliputi lemak, polisakarida, fenolik dan protein. Proses ekstraksi DNA biasanya menggunakan pelarut organik seperti kloroform dan isoamil alkohol. Kloroform mendenaturasi protein sedangkan isoamil alkohol untuk menghilangkan busa.

Penambahan larutan organik membuat campuran membentuk 3 lapisan. Lapisan pertama (atas) mengandung DNA dan RNA karena bersifat polar yang disebabkan oleh muatan negatif atom O pada gugus fosfat. Menurut Robert, Switzer, & Garrity (1999), muatan dipol positif air berinteraksi dengan muatan

dipol negatif pada gugus fosfodiester DNA. Interaksi ini akan meningkatkan kelarutan DNA dalam air. Protein yang terdenaturasi akan masuk diantara lapisan organik-air (intermediet) (Clark & Crhistopher, 2000). Lemak dan protein nonpolar mudah larut dalam kloroform sehingga akan terdistribusi pada lapisan organik. Isoamil alkohol berfungsi untuk mengurangi busa selama proses ekstraksi berlangsung (Switzk & Russel, 2001).

Proses presipitasi DNA merupakan proses pengendapan DNA. Pengendapan DNA dibantu oleh etanol absolut dan garam ammonium asetat. Etanol absolut dingin akan memekatkan DNA dan menghilangkan residu kloroform. DNA yang bercampur dengan etanol absolut akan menggumpal dan membentuk pelet. Penambahan etanol absolut dingin akan menurunkan aktivitas molekul air (Surzycki, 2000). Etanol/isopropanol menghilangkan H₂O disekitar fosfat. Oleh karena itu, molekul DNA yang mempunyai muatan netral terendapkan menjadi pelet (Kumar & Anandaraj, 2014). Garam ammonium asetat yang ditambahkan akan menetralkan muatan negatif DNA. Muatan DNA yang telah netral akan menurunkan kelarutan DNA dalam air. Lapisan air yang masih mengandung kontaminan RNA dapat dihilangkan oleh enzim RNase. Enzim RNase akan membantu mendenaturasi RNA (Clark & Crhistopher, 2000).

Pemurnian pelet DNA merupakan proses pencucian DNA yang kemungkinan masih terdapat sisa-sisa kontaminan. Etanol 70% biasanya digunakan untuk proses pencucian DNA. Etanol membersihkan DNA dari sisa-sisa garam (Somma, 2006). Pelet DNA yang telah murni dilarutkan dengan bufer TE bertujuan untuk menjaga sampel DNA agar tetap stabil (Atiken, 2012).

Tabel 2.1. Fungsi komponen bufer CTAB dalam proses lisis

Bahan	Fungsi	Interaksi
EDTA	<ul style="list-style-type: none"> Melemahkan kekuatan dinding sel karena dapat mengkelat ion magnesium yang merupakan kofaktor enzim nuklease 	<p>Ion magnesium berfungsi untuk mempertahankan integritas sel dan mempertahankan aktivitas enzim nuklease. EDTA akan mengikat ion magnesium agar aktivitasnya menurun</p>
CTAB	<ul style="list-style-type: none"> Mendenaturasi lemak Mendenaturasi protein Memecah polisakarida menjadi monomer sederhana 	<p>Surfaktan memiliki gugus hidrofobik pada bagian ekor dan gugus hidrofilik pada bagian kepala. Denaturasi membran terjadi pada saat gugus hidrofobik surfaktan berinteraksi dengan lemak. Reaksi ini membentuk misel yang stabil dengan konsentrasi CTAB tertentu (ThermoFisher, 2015).</p> <p>Surfaktan dengan protein akan berinteraksi secara ionik. CTAB merupakan surfaktan kationik, karena bagian kepala bermuatan positif sehingga akan berinteraksi dengan muatan negatif protein (Nyström, Kjønksen. Beheshti, Zhu, & Knudsen, 2009).</p> <p>CTAB berinteraksi dengan polisakarida secara hidrofobik membentuk senyawa kompleks (Nyström dkk., 2009)</p>
NaCl	<ul style="list-style-type: none"> Menghilangkan senyawa polisakarida 	<p>NaCl dengan konsentrasi lebih dari 0,5 M bersamaan dengan CTAB diketahui dapat menghilangkan polisakarida (Sahu, Muthusamy, Thangaraj, & Kathiresan, 2012).</p>

Tabel 2.1 (Lanjutan)

PVP	<ul style="list-style-type: none"> Menghilangkan senyawa fenolik 	Senyawa fenolik yang banyak ditemukan dalam sel <i>Chlorella</i> sp. akan diikat oleh PVP dan dapat dipresipitasi dengan etanol (Chan, Ho, Namasivayam, & Napis, 2007).
Tris HCl	<ul style="list-style-type: none"> menyeimbangkan pH agar dapat mengekstraksi asam nukleat 	Ketika proses perusakan dinding sel, seluruh isi sel akan keluar beserta dengan DNA. DNA yang keluar akan masuk dalam bufer.

2.5 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis gel agarosa merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi, dan purifikasi dari molekul DNA. Prinsip kerja elektroforesis gel dimulai saat makromolekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya (Magdeldin, 2012).

Kecepatan migrasi selama DNA bergerak menembus gel agarosa dipengaruhi oleh beberapa faktor utama (Windiastika, 2011). Ukuran molekul DNA dapat memengaruhi kecepatan migrasi DNA. Fragmen DNA dipengaruhi oleh konsentrasi gel agarosa. DNA dapat dilihat dengan sinar UV karena sebelumnya diwarnai dengan pewarna DNA seperti *Ethidium bromide* (EtBr).

Gel agarosa bisa digunakan untuk mengamati hasil isolasi DNA dan juga dapat mengamati hasil PCR. Perbandingan antara *loading bufer* dan sampel adalah 1:5. Marker yang digunakan memiliki ukuran 1 kb sebanyak 1 μ L (Windiastika, 2011).

2.6 UV-transluminator

UV-transluminator menggunakan radiasi sinar ultraviolet untuk memvisualisasi DNA, RNA, dan protein dalam gel elektroforesis (Khazadeh & Blourchian, 2005). Prinsip kerja UV-transluminator terjadinya proses fluoresensi akibat pewarna EtBr yang berikatan dengan basa nitrogen. Teknik tersebut digunakan oleh peneliti untuk memudahkan melihat ukuran, kemurnian, konsentrasi DNA berdasarkan kualitatif (Ausubel, 1995).

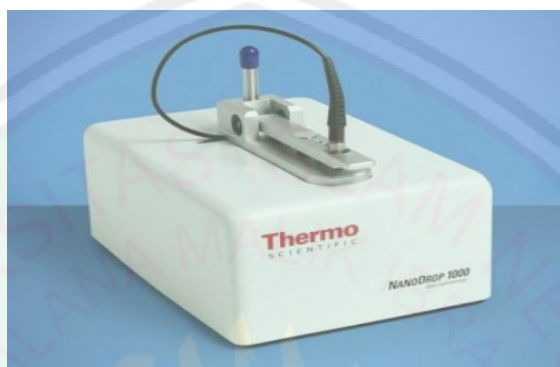


Gambar 2.4 UV Transluminator (BIO-RAD, 2013)

2.7 NanoDrop[®] ND-1000

NanoDrop[®] ND-1000 merupakan salah satu alat spektrofotometer yang biasa digunakan untuk menghitung kuantitas asam nukleat, konsentrasi larutan dalam sel, kemurnian DNA dan protein. Alat ini berbeda dengan alat lainnya karena hanya membutuhkan volume sampel yang sedikit. Prinsip pengoperasian instrumen ini didasarkan pada prinsip umum spektrofotometer berdasarkan hukum Lambert-Beer. Rentang panjang gelombang antara 220–750 nm, sedangkan

absorbansi setiap sampel terukur pada dua panjang yang berbeda (0,2 mm dan 1,0 mm). Rentang absorbansi yang dapat dibaca antara 2–3700 ng/ μ L tanpa pengenceran (Cheng & Zhang, 2010).



Gambar 2.5 Alat NanoDrop[®] ND-1000 (ThermoScientific, 2011).

Kemurnian DNA dan RNA diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Absorbansi pada panjang gelombang tersebut telah digunakan mengukur kemurnian asam nukleat dan protein. Kemurnian $\sim 1,8$ adalah kemurnian DNA, sedangkan $\sim 2,0$ adalah kemurnian RNA. Absorbansi juga dapat dilihat pada panjang 230 nm untuk mengetahui kontaminasi. Oleh karena itu, rasio A_{260}/A_{230} juga sering dianalisis. Kontaminasi bahan kimia dari ekstraksi asam nukleat, memungkinkan menghasilkan konsentrasi asam nukleat yang sangat tinggi yang dapat memengaruhi proses analisis. Panjang gelombang yang biasa digunakan adalah 260/280 menunjukkan sampel terkontaminasi oleh protein atau reagen seperti fenol atau ada kesalahan saat pengukuran ((ThermoScientific, 2011).

2.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Perkembangan teknik PCR banyak digunakan dalam bidang forensik dan

kedokteran, selain itu juga membantu dalam analisis keanekaragaman hayati. Proses analisis dengan teknik PCR mampu mengamplifikasi segmen DNA hingga jutaan kali hanya dalam waktu yang singkat (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Teknik PCR melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Komponen yang diperlukan pada proses PCR meliputi, DNA; sepasang primer; dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*); master mix PCR; MgCl₂ dan enzim polymerase DNA. Berikut tahapan-tahapan proses PCR (Fatchiyah, 2011). Proses PCR ditunjukkan pada **Gambar 2.6**.

A. Denaturasi

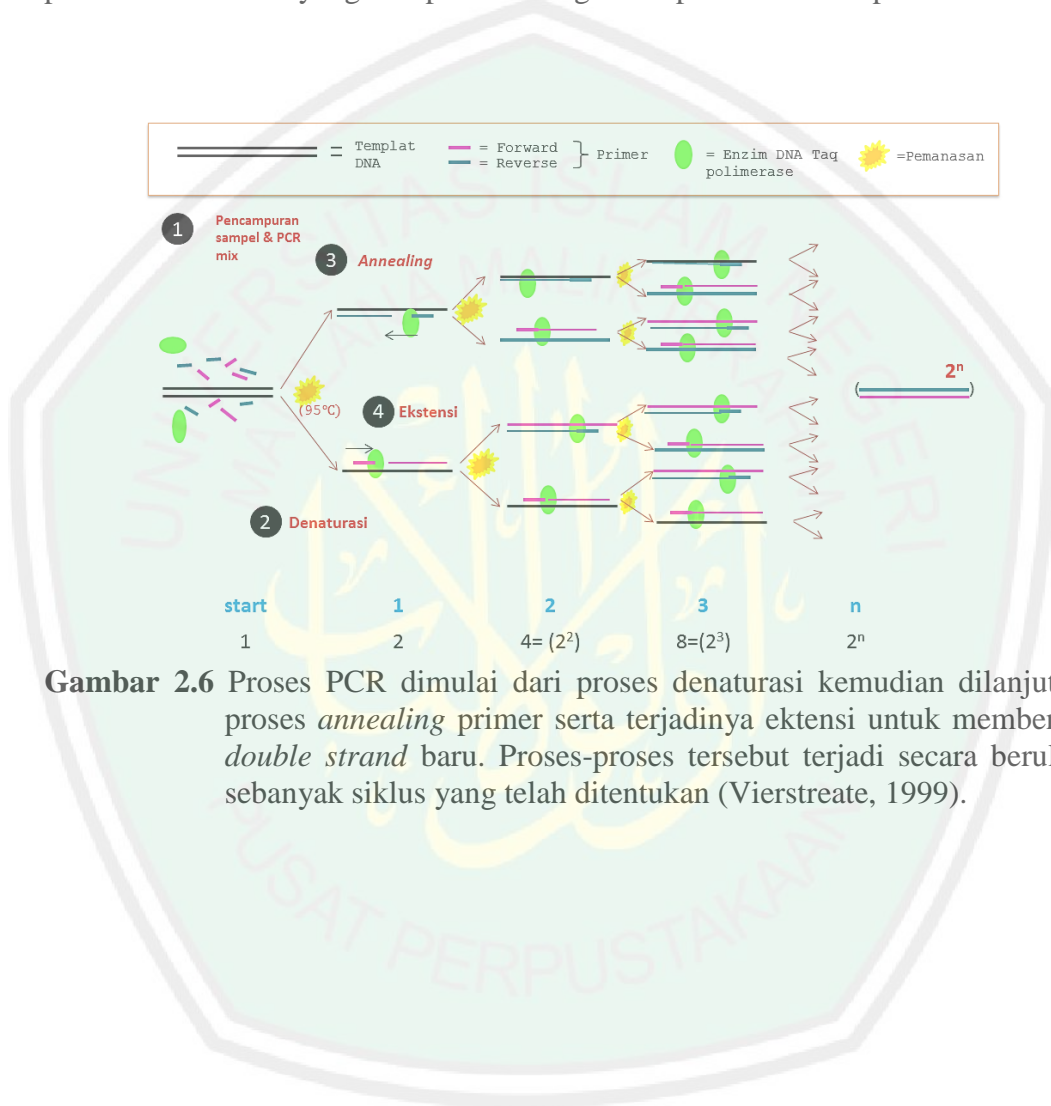
Tahap denaturasi adalah tahap pemisahan untai ganda DNA menjadi untai DNA tunggal. Untai DNA tunggal inilah yang menjadi cetakan bagi untai DNA baru yang akan dibuat. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90–95°C selama 60 detik.

B. *Annealing* (Penempelan)

Tahap *annealing* merupakan tahap penempelan primer pada daerah DNA target. Enzim Taq polimerase dapat memulai pembentukan suatu untai DNA baru jika ada seuntai DNA berukuran pendek (DNA yang mempunyai panjang sekitar 10 sampai 30 pasang basa) yang menempel pada untai DNA target yang telah terpisah. DNA yang pendek ini disebut primer. Agar suatu primer dapat menempel dengan tepat pada target, diperlukan suhu yang rendah sekitar 55°C selama 30–60 detik.

C. Ekstensi (Pemanjangan)

Tahap ekstensi umumnya terjadi pada suhu 72°C selama 60 detik. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase.



Gambar 2.6 Proses PCR dimulai dari proses denaturasi kemudian dilanjutkan proses *annealing* primer serta terjadinya ekstensi untuk membentuk *double strand* baru. Proses-proses tersebut terjadi secara berulang sebanyak siklus yang telah ditentukan (Vierstreat, 1999).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada Juni sampai dengan Oktober 2016 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan di Laboratorium Genetik Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pemanenan biomassa *Chlorella* sp. adalah mesin centrifuga (*memmert*). Proses isolasi DNA dibutuhkan *waterbath* (*memmert*) untuk inkubasi sampel, tabung mikro 2 mL, vortex (Thermolyne Maxi Mix II). Uji kualitatif DNA digunakan elektroforesis (BIO-RAD) dan lampu UV (BIO-RAD), sedangkan untuk uji kauntitatif DNA menggunakan NanoDrop® ND-1000. Analisis genotip menggunakan mesin PCR (BIO-RAD) dan mesin pengurutan sikuen (*Big Dye Applied System model 3730*).

3.2.2 Bahan

Chlorella sp. yang didapat dari Laboratorium Biologi Fisiologi Tumbuhan Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan metode CTAB diperlukan bufer CTAB (CTAB 1%, 2%, 3%); polivinilpirolidon 2%; Tris HCl 100 mM; NaCl 1,4 M dan EDTA 20mM pH 8); kloroform : isoamilalkohol (24:1), bufer TE 1 M, RNase, etanol absolut

dingin, etanol 70%, agarosa, dan bufer TBE. Proses PCR menggunakan kit *vivantis* (Malaysia), *loading* buffer, Master mix PCR (ddH₂O; enzim polimerase; dNTP; MgCl₂; DNA Taq polymerase; bufer Taq polymerase dan primer *forward* serta *reverse*. Dua variasi primer 18S rDNA yaitu NSF-Rss3 dan SSF-SSR. Elektroforesis DNA dibutuhkan gel agarosa dan *loading dye*.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahapan- tahapan berikut.

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp.
2. Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan metode CTAB
3. Analisis kualitatif dan kuantitatif hasil isolasi DNA
4. Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
5. Penentuan urutan sikuen 18S rDNA
6. Analisis hasil

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Kultivasi *Chlorella* sp. (Prihantini, Putri, & Yuniati, 2005)

Isolat sebanyak 150 mL ditumbuhkan dalam Media Ekstrak Tauge (MET) yang berisi ekstrak tauge dan akuades dengan perbandingan 1:5. Pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000–4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 8 hari. Pemanenan kultur *Chlorella* sp. disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Kultur *Chlorella* sp. dipisahkan dari supernatannya.

3.4.2 Isolasi DNA

Metode isolasi DNA tidak semuanya cocok untuk semua jenis tumbuhan, sehingga dilakukan variasi konsentrasi larutan CTAB dalam bufer CTAB. Sampel *Chlorella* sp. disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 1 menit. Pelet *Chlorella* sp. dimasukkan ke dalam tiga tabung mikro (A, B, dan C), tiap tabung berisi 0,2 gram kultur *Chlorella* sp. Setelah itu, tiap tabung mikro ditambah dengan 600 μ L bufer CTAB dengan variasi konsentrasi larutan CTAB berbeda (1,4 M NaCl; 100 M Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8,0; A = 1%, B = 2%, C = 3% CTAB dan 2 % polivinilpirrolidon). Campuran direndam dalam *waterbath* suhu 65°C selama 1 jam, kemudian ditambahkan 1 volume larutan CI (kloroform : isoamil alkohol = 24:1) dan dibolak-balik selama 10 menit. Campuran disentrifugasi selama 30 menit pada 13000 rpm.

Supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru untuk dipurifikasi. Proses purifikasi dilakukan sebanyak 2 kali. Purifikasi tahapan pertama ditambahkan dengan etanol absolut dingin sebanyak 2 kali volume supernatan yang didapatkan. Kemudian, DNA dapat diendapkan dengan menambahkan 0,1 volume ammonium asetat 3 M. Penambahan 4 μ L RNase untuk menghilangkan kontaminan RNA yang bercampur dengan DNA. DNA dipisahkan dengan disentrifugasi pada 10000 rpm selama 30 menit.

Pelet DNA dipurifikasi kembali dengan 400 μ L etanol 70%, kemudian disentrifugasi selama 5 menit 12000 rpm. Pelet dikeringkan dalam suhu ruang hingga etanol menguap seluruhnya. Penyimpanan templat DNA dilarutkan dengan 30 μ L TE (1x) dan disimpan pada suhu -20°C.

3.4.3 Elektroforesis Gel Agarosa (Fatchiyah, 2011)

Gel agarosa 1% dibuat dengan 0,4 gram agarosa dan ditambah 40 mL TBE. Kemudian, dipanaskan dengan *microwave* selama 3 menit. Setelah itu, dituang dalam cetakan sampai gel memadat. Gel yang telah padat dimasukkan dalam bak elektroforesis yang telah berisi bufer TBE sampai gel tenggelam. Selanjutnya, diisi sumur pertama dengan 1 μ L 1kb DNA *ladder*. Sumur yang lain diisi dengan campuran *loading buffer* dan templat DNA hasil isolasi dengan perbandingan 1:3. Gel agarosa di *running* pada 65 volt selama 70 menit. Setelah itu, gel direndam dalam EtBr selama 10 menit dan diamati dibawah lampu ke UV-transluminator.

3.4.4 Uji Kuantitas DNA dengan NanoDrop

Kuantifikasi DNA dilakukan menggunakan NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000. Templat DNA diambil 1 μ L dibaca pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian DNA didapat dari perbandingan absorbansi 260/280. Standar kemurnian DNA memasuki *range* 1,8–2,0.

3.4.5 Amplifikasi Hasil Isolasi DNA dengan PCR

Proses amplifikasi 18S rDNA menggunakan variasi primer 18S. Komposisi PCR 10 μ L PCR mix, 5 μ L DNA templat, 1 μ L primer *forward*, 1 μ L primer *reverse* dan 3 μ L *nuclease free water*. Hasil PCR diuji kualitatif dengan menggunakan elektroforesis agarosa 1%. Penentuan kondisi optimum PCR ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1. Optimasi suhu *annealing* primer

Primer	Urutan	Annealing (°C)	Referensi
18S	NS1 (F) : 5'-	46	(Matsunaga dkk. (2009); Wu dkk. (2001))
	GTAGTCATATGCTTGGTCTC-3'	48	
	ss3 (R) : 5'-TTCACCTACGGAAACC-3'	50	
		55	
18S	F : 5'-CCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	50	Yang dkk., (2012)
	R : 5'-TTGATCCTTCTGCAGGTTCA-3'	55	

Keterangan: pre denaturasi 4 menit pada 94°C, denaturasi 1 menit pada 94°C, *Annealing* 1 menit, ekstensi 2 menit pada 72°C, pra ekstensi 3 menit pada 72°C dan didiamkan pada 4°C selama ∞ (tak hingga). Siklus PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

3.4.6 Penentuan Urutan Sikuen 18S rDNA

Penentuan urutan nukleotida dilakukan menggunakan mesin *sequencer Big Dye Applied System model 3730*, Singapura. Pengiriman sampel dilakukan oleh Lembaga Biologi Molekular Eijkman, Jakarta. Metode yang digunakan metode adalah metode Sanger.

3.4.7 Analisis Bioinformatika

Proses *sequencing* DNA menggunakan 2 primer F (*forward*) dan R (*reverse*). Primer F menghasilkan sikuen CS15 dan R menghasilkan sikuen CS11. Identifikasi sikuen dianalisis menggunakan beberapa program *online* dan *offline*. Sikuen CS15 dan CS11 akan disejajarkan dengan program *online* BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide*). Program tersebut dapat diakses melalui NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dengan alamat *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Hal utama yang harus diperhatikan untuk proses pensejajaran adalah pembacaan sikuen. Sikuen CS15 dibaca dari 5' ke 3' dan sikuen CS11 perlu diketahui komplemennya sehingga pembacaan dimulai dari 3' → 5'. Komplemen sikuen CS11 ditentukan menggunakan program *offline*

BioLign versi 4.0.6.2 dengan cara klik Sequence > Nucleic acid > Reverse complement. Arah pembacaan sikuen CS15 dan CS pada **Gambar 3.1**.

>CS15 (F)

5' -CCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCG...-3'

>CS11(R)

5' -CCTCTAGGTGGGAGGGTTTAAATGAACTTCTCGGCAGCCCAGGG...-3'

Reverse complement

3' -CCCTGGGCTGCCGTGAAGTTCATTAAACCCTCCCACCTAGAGG...-5'

Gambar 3.1 Sikuen CS15 dibaca dari 5' ke 3' sedangkan sikuen CS11 dibaca dari 3' ke 5'. Penjajaran sikuen CS11 merupakan sikuen komplementnya.

Sikuen CS15 dan CS11 disejajarkan dengan sikuen dalam perpustakaan gen NCBI yang saling memiliki kemiripan. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan dua program sebagai pembanding. Program *offline* umum yang biasa digunakan MEGA6, sedangkan program *online* ClustaW Omega melalui www.ebi.ac.uk. Metode konstruksi filogenetik menggunakan *neighbor-joining* untuk menganalisis hubungan kekerabatan.

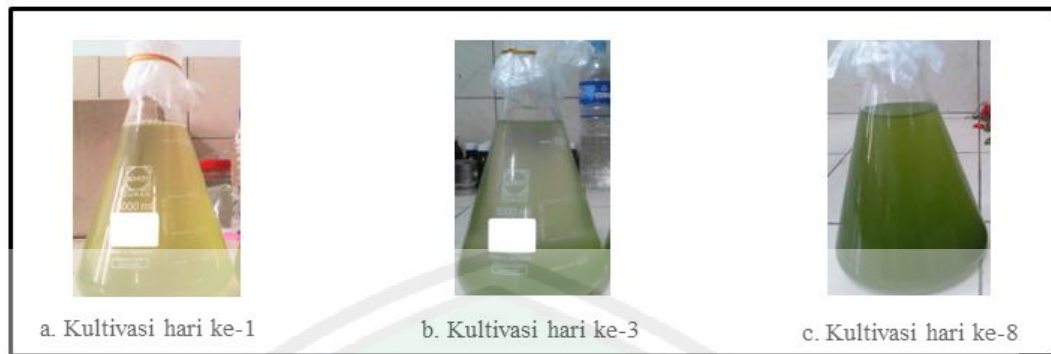
BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp.

Chlorella sp. merupakan salah satu jenis mikroalga hijau yang banyak ditemukan di perairan tawar, payau, tempat lembab dan tanah. Mikroalga ini memiliki tingkat reproduksi yang tinggi sehingga mudah dikembangbiakkan. Media kultivasi yang sering digunakan adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan konsentrasi 4% dibuat dengan cara konvensional. Menurut penelitian Prihantini, Damayanti, & Yuniati (2007) MET sangat cocok untuk kultivasi mikroalga. Media ini banyak mengandung unsur-unsur yang dibutuhkan oleh *Chlorella* sp. seperti nitrogen dan fosfor.

Derajat keasaman (pH) MET memengaruhi perkembangbiakan sel *Chlorella* sp. Prihantini dkk. (2005) menyatakan rerata kerapatan sel tertinggi pada kondisi pH 7, karena sangat baik untuk pertumbuhan *Chlorella* sp. Kondisi pH 7 menyebabkan CO₂ dalam bentuk bebas dapat berdifusi dengan mudah ke dalam sel mikroalga. Proses kultivasi *Chlorella* sp. dilakukan selama 8 hari. Selama proses kultivasi terjadi perubahan warna yang semula berwarna hijau muda menjadi hijau tua. Perubahan warna yang terjadi menunjukkan kerapatan sel *Chlorella* sp. meningkat. Proses kultivasi *Chlorella* sp. ditunjukkan pada **Gambar 4.1**.



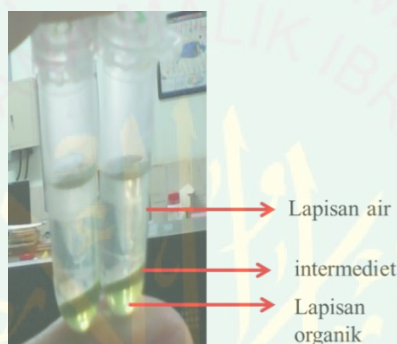
Gambar 4.1 Proses kultivasi *Chlorella* sp. Perubahan terjadi pada warna media, hari pertama bewarna hijau muda. Hari ketiga warna larutan menjadi warna hijau. Kemudian pengamatan pada fasa stasioner hari ke 8 menunjukkan warna hijau pada seluruh larutan.

Pemanenan sel *Chlorella* sp. menggunakan teknik sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Proses sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan *Chlorella* sp. dengan media. Sel yang digunakan untuk proses isolasi DNA sebanyak 0,2 g.

4.2 Isolasi DNA mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode CTAB

Isolasi DNA bertujuan memisahkan DNA dengan komponen lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Metode CTAB menggunakan surfaktan kationik untuk melisis dinding sel. Isolasi DNA dengan metode CTAB menggunakan variasi konsentrasi larutan CTAB 1%, 2% dan 3%. Proses lisis dilakukan dengan penambahan senyawa kimia dan pemanasan. Dinding sel ditambah dengan bufer lisis yang berfungsi untuk mendenaturasi lemak, protein, polisakarida, senyawa fenolik dan senyawa-senyawa lain yang menyusun dinding sel. Pemanasan suhu 65°C akan mengakibatkan terpecahnya dinding sel sehingga seluruh isi sel bercampur dengan bufer lisis.

DNA yang masih tercampur dengan kontaminan diekstraksi menggunakan pelarut organik. DNA akan terpisah dari senyawa kontaminan setelah proses sentrifugasi. DNA terdistribusi pada lapisan air dan senyawa fenol serta protein polar terdistribusi pada lapisan intermediet. Senyawa lemak, protein non polar dan polisakarida terdistribusi pada lapisan organik. Hasil sentrifugasi dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2 Campuran sampel dan kloroform-isoamil alkohol. Lapisan air mengandung DNA, lapisan intermediet mengandung protein dan fenol serta lapisan organik mengandung lemak, protein non polar dan polisakarida.

DNA dalam lapisan air akan dipresipitasi menggunakan etanol absolut dingin dan garam ammonium asetat. Etanol absolut dingin berfungsi untuk menghilangkan residu kloroform. Penambahan garam ammonium asetat yang ditambahkan akan menetralkan muatan negatif DNA. Muatan DNA yang telah netral akan menurunkan kelarutan DNA dalam air. Kontaminan RNA yang masih berada pada lapisan air dapat dihilangkan oleh enzim RNase.

Pemurnian pelet DNA menggunakan etanol 70% untuk memastikan DNA terpisah dari kontaminan. Pelet yang telah dipurifikasi dikeringanginkan dalam suhu ruang untuk menghilangkan residu etanol. Pelet DNA dilarutkan dalam bufer TE dan disimpan pada suhu -20°C .

4.3 Analisis kualitatif dan kuantitatif hasil isolasi DNA

Uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa. Prinsip elektroforesis gel agarosa adalah memisahkan molekul berdasarkan muatannya. Visualisasi DNA dilakukan dengan UV-transluminator dengan pewarna EtBr. Elektroferogram DNA hasil isolasi dengan variasi konsentrasi CTAB menunjukkan bahwa konsentrasi CTAB 1% menghasilkan pita yang lebih tebal dibandingkan CTAB 2% dan 3%. Pita DNA pada CTAB 1% memiliki konsentrasi yang lebih tinggi. Elektroferogram DNA *Chlorella* sp. ditunjukkan pada **Gambar 4.3**.



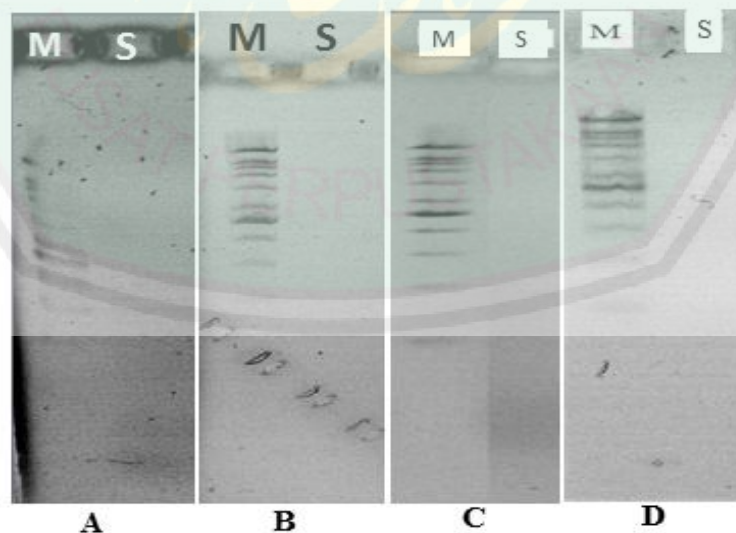
Gambar 4.3 Elektroferogram DNA *Chlorella* sp. hasil isolasi. (A) larutan CTAB 1%; (B) larutan CTAB 2% dan (C) larutan CTAB 3%.

DNA templat dikuantifikasi menggunakan NanoDrop[®] Sphectrophotometer ND-1000. Panjang gelombang DNA diukur pada 260 dan 280 nm untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi. Pengukuran hanya dilakukan pada sampel CTAB 1% yang menghasilkan konsentrasi sebesar 143,57 ng/ μ L dan kemurnian sebesar 2,02. Kemurnian sebesar 2,02 memenuhi *range* kemurnian DNA sehingga templat DNA dapat digunakan untuk proses amplifikasi DNA *Chlorella* sp.

4.4 Amplifikasi DNA *Chlorella* sp. dengan PCR

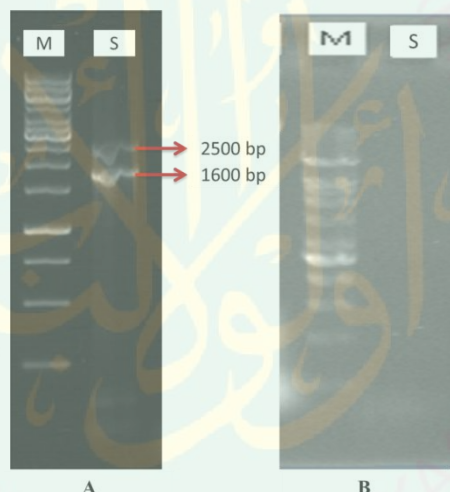
Proses PCR dilakukan untuk mencari sikuen 18S rDNA. Keberhasilan proses amplifikasi sikuen 18S rDNA bergantung pada urutan primer yang digunakan. Dua urutan primer 18S rDNA akan dibandingkan untuk mencari primer yang dapat mengamplifikasi DNA *Chlorella* sp. Kondisi kedua primer berdasarkan syarat untuk proses PCR sesuai untuk amplifikasi DNA *Chlorella* sp.

Primer memiliki kondisi optimal yang berbeda sehingga perlu dilakukan optimasi suhu *annealing*. Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mencari spesifitas dan sensitifitas produk PCR. Berdasarkan hasil elektroforesis, keempat variasi suhu *annealing* tidak menghasilkan pita. Hal tersebut menandakan DNA target tidak teramplifikasi. Kemungkinan ketidakhadiran pita dapat disebabkan oleh primer yang tidak sesuai dengan DNA target. Hasil amplifikasi PCR dengan primer 18S rRNA NS1 dan ss3 ditunjukkan pada **Gambar 4.4**.



Gambar 4.4 Elektroferogram PCR dengan Primer 18S rDNA NSF dan Rss3. Amplifikasi DNA *Chlorella* sp. dengan Primer 18S NSF dan Rss3. Denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* (A) 46°C; (B) 48°C; (C) 50°C; (D) 55°C masing-masing selama 1 menit dan ekstensi 72°C selama 2 menit. (M) marker DNA 1 kb ladder dan (S) sampel DNA *Chlorella* sp.

Hasil amplifikasi PCR sikuen 18S rDNA menggunakan primer SSF dan SSR ditunjukkan pada **Gambar 4.5**. Berdasarkan nilai T_m primer suhu 50°C tepat digunakan untuk proses amplifikasi sehingga DNA dapat teramplifikasi. Pita DNA muncul pada daerah 1600 bp dan 2500 bp. Pita yang dipilih untuk proses *sequencing* adalah daerah 1600 bp karena sesuai dengan dugaan awal penempelan primer yang dapat dilihat pada **Lampiran 3** pada **Gambar 6**. Pita pada daerah 1600 bp lebih tebal sehingga dapat diasumsikan bahwa konsentrasi DNA lebih tinggi.



Gambar 4.5 Elektroferogram PCR dengan primer 18S Rdna SSF dan SSR. Denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* (A) 50°C; (B) 55°C masing-masing selama 1 menit dan ekstensi 72°C selama 2 menit. (M) marker DNA 1 kb ladder dan (S) sampel DNA *Chlorella* sp.

4.5 Penentuan urutan sikuen DNA *Chlorella* sp.

Penentuan urutan sikuen DNA menggunakan metode Sanger. Metode Sanger hanya dapat digunakan untuk DNA rantai tunggal. Primer F dan R menghasilkan 2 panjang sikuen yang berbeda, berturut-turut 715 bp dan 873 bp. Primer F ditunjukkan dengan sikuen CS15, sedangkan primer R ditunjukkan oleh sikuen CS11. Panjang kedua sikuen yang dihasilkan kurang dari 1600 bp

dimungkinkan karena adanya sensitivitas puncak basa DNA terlalu kecil sehingga tidak terbaca. Sikuen yang didapat dibandingkan dengan seluruh sikuen *Chlorella* sp. yang terkumpul dalam *GenBank*. Berikut urutan sikuen *Chlorella* sp. ditunjukkan pada **Gambar 4.6**.

>CS15 (F)

```
CCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTA
CCTTACTACCGGATAAACCCTAGTAAATTCAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGATTTTATTAGAT
TTAAGGCCGACCCGGCTCTGCGGGTCTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGGCCGGCGATGTTTC
ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTC
GATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGGCGGCAAAATTACCCAATCCTGACACAGG
GAGGTAGTGACAATAAAATAACAATACCGGCCTTTTCAGGTCTGGTAAATGGAATGAGTACAATCAAACCCCTTACGAGG
ATCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAA
AGCTCGTAGTTGGATTTTCGGGCGGGCCTGCGGTCCCGCTTTTCGGTGTGCACCTGGCAGGGCCCGCTTGTTCGGGGGAC
GGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTA
```

>CS11 (R)

```
CCTCTAGGTGGGAGGGTTAATGAACTTCTCGGCAGCCAGGGCGGAAACCGCCCGGGTTGCCAATCCGAACACTTCACCA
GCACACCCAATCGGTAGGAGCGACGGGCGGTGTGTACAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGTGTGACTTTGGCCTTAC
TAGGCATTCCTCGTTGAAGATTAATAATTGCAATAATCTATCCCATCACGATGCAAGTTTCAAAGATTACCCGGGCTCTCG
GCCAAGGTAGGCTCGTTGATTCATCAGTGTAGCGCGGTGCGGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGC
CTCATGCTTCCATTGGCTAGTCGCCAATAGTCCCTCTAAGAAGTCTGCCGGCCCCGAGGAGGCCGTGACTATTTAGCAGGC
TGAGGTCTCGTTTCGTTACCGGAATCAACCTGACAAGGCAACCCACCACTAAGAAGCGGCATGCACCACCACCCATAGAATC
AAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTCCCGTGTGAGTCAAATTAAGCCGAGG
CTCCACGCCTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGGACCATACTCCCCCGGAACCCAAAAACTTT
GATTTCTCATAAGGTGCCGGCGGAGTCAATCGAAGAAACATCCGCGGATCCCTAGTCGGCATCGTTTATGGTTGAGACTAGGA
CGGTATCTAATCGTCTTCGAGCCCCAACCTTTCGTTCTTGATTAATGAAACATCCTTGGCAATGCTTTCGCATTAGTTTC
TCTTTCGAAAAATCCAAGAATTTACCTCTGACATCCAAATACGAATGCCCCCGA
```

Gambar 4.6 Sikuen CS15 dan CS11. Berdasarkan primer F dan R masing-masing menghasilkan sikuen CS15 dan CS11

4.6 Analisis Bioinformatika

Kedua urutan sikuen CS15 dan CS11 dibandingkan dengan sikuen *Chlorella* sp. yang berada dalam *GenBank* menggunakan BLAST. Hasil perbandingan dan analisis kekerabatan menggunakan pohon filogenetik. Pohon filogenetik dibentuk dengan algoritma *neighbour-joining* (tetangga terdekat). Hasil BLAST sikuen 18S rDNA *Chlorella* sp. sikuen CS15 dan CS11 dapat dilihat dalam **Tabel 4.1** dan **Tabel 4.2**.

Hasil BLAST menunjukkan sikuen CS15 dan CS11 memiliki kesamaan dengan sikuen 18S *Chlorella* sp. dari *GenBank* melalui

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Kesamaan tersebut diukur dengan melihat nilai kemiripan yang mencapai 99–100%. Kemiripan yang mencapai nilai homologi 99–100% mengindikasikan bahwa spesies *Chlorella* sp. masih dalam klade dengan subspecies *Chlorella* sp. Hasil sikuen DNA *Chlorella* sp. dibandingkan dan dianalisis hubungan kekerabatan menggunakan pohon filogenetik.

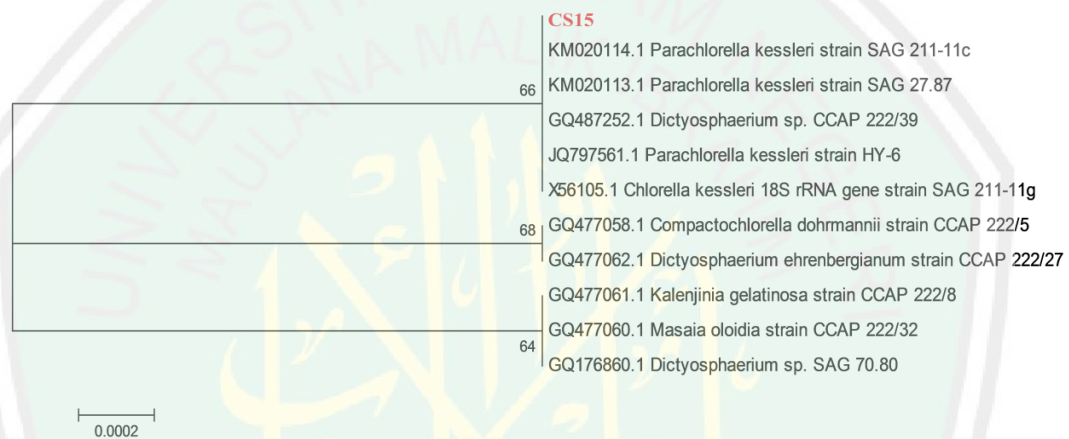
Tabel 4.1 Hasil BLAST Sikuen CS15 *Chlorella* sp.

Spesies	Skor	Kemiripan
	Maksimum	(%)
<i>Parachlorella kessleri</i> strain SAG 211-11c	1321	100
<i>Parachlorella kessleri</i> strain SAG 27-87	1321	100
<i>Dictyosphaerium</i> sp. CCAP 222/39	1321	100
<i>Parachlorella kessleri</i> strain HY-6	1321	100
<i>Chlorella kessleri</i>	1321	100
<i>Kalenjinia gelatinosa</i> strain CCAP 222/8	1310	99
<i>Masaia oloida</i> strain 222/32	1310	99
<i>Compactochlorella dohrmannii</i> strain CCAP 222/5	1310	99
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> strain CCAP 222/27	1310	99
<i>Dictyosphaerium</i> sp. SAG 70.80	1310	99

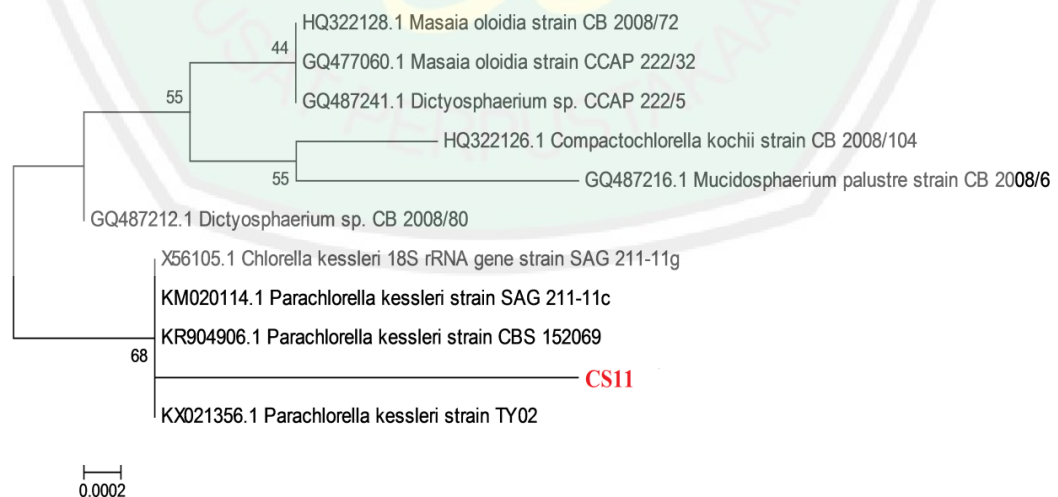
Tabel 4.2 Hasil BLAST Sikuen CS11 *Chlorella* sp.

Spesies	Skor	Kemiripan
	Maksimum	(%)
<i>Parachlorella kessleri</i> strain TY02	1604	99
<i>Parachlorella kessleri</i> strain CBS 152069	1604	99
<i>Parachlorella kessleri</i> strain SAG 211-11c	1604	99
<i>Chlorella kessleri</i> strain 211-11g	1600	99
<i>Dictyosphaerium</i> sp. strain CB 2008/80	1598	99
<i>Dictyosphaerium</i> sp. CCAP 222/5	1592	99
<i>Masaia oloida</i> strain CB 2008/72	1592	99
<i>Masaia oloida</i> strain CCAP 222/32	1592	99
<i>Compactochlorella kochii</i> strain CB 2008/104	1587	99
<i>Mucidosphaerium palustre</i> strain CB 2008/6	1587	99

Analisis filogenetik menggunakan dua program *offline* MEGA6 dan *online* ClustaW Omega. Hasil analisis kedua sikuen berdasarkan program MEGA6 dapat dilihat pada **Gambar 4.7** dan **Gambar 4.8**. Hasil analisis menggunakan program ClustaW Omega dapat dilihat pada **Gambar 4.9** dan **Gambar 4.10**. Berdasarkan kedua program sikuen CS15 dan CS11 memiliki kedekatan dengan spesies *Parachlorella kessleri*.

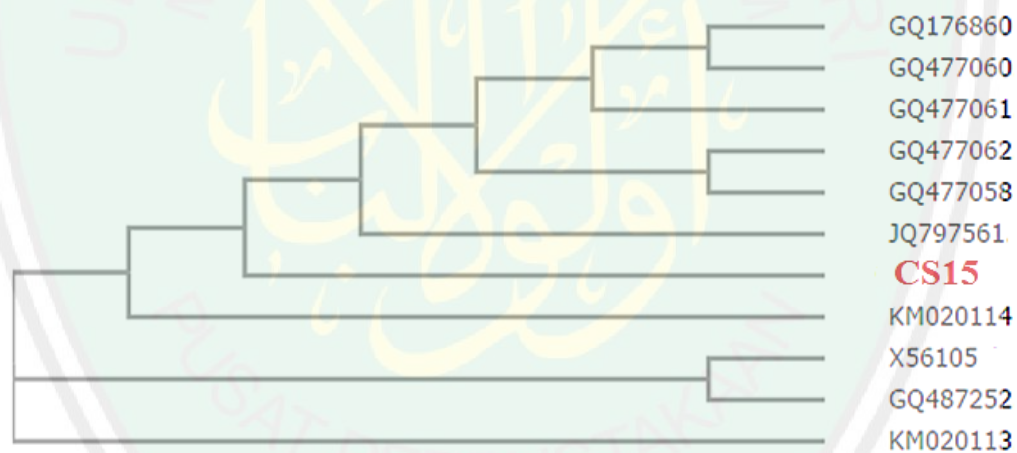


Gambar 4.7 Filogram *Chlorella* sp. sikuen CS15 menggunakan program MEGA6 dengan pengulangan bootstrap 1000x. Sikuen CS15 menunjukkan kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain SAG 211-11.

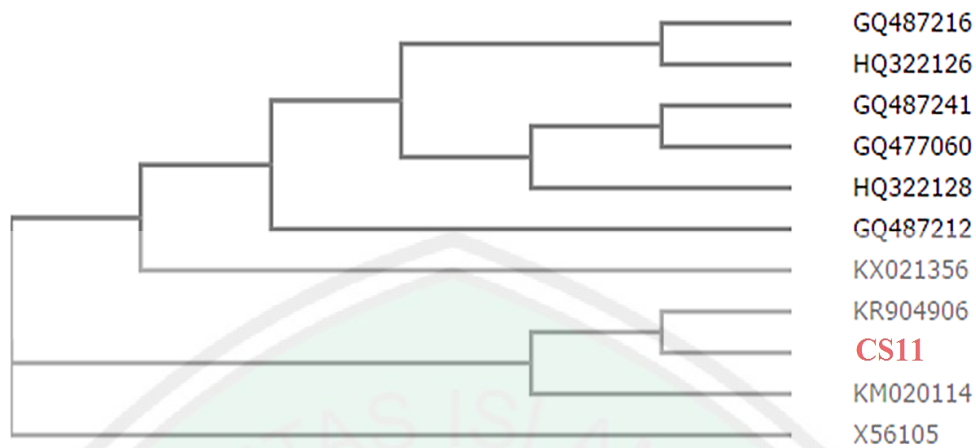


Gambar 4.8 Filogram *Chlorella* sp. sikuen CS11 menggunakan program MEGA6 dengan pengulangan bootstrap 1000x. Sikuen CS11 menunjukkan kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain CBS 152069.

Berdasarkan hasil analisis menggunakan program MEGA6 kedua sikuen memperlihatkan kedekatan dengan spesies *Parachlorella kessleri*. Sikuen CS15 memiliki kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain SAG 211-11g. Tingkat kemiripan sikuen CS15 dengan *Parachlorella kessleri* strain SAG 211-11g mencapai 100%. Sikuen CS11 memiliki kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain CBS 152069 dan memiliki tingkat kemiripan 99%. Tingginya angka kemiripan berarti memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Hal tersebut dikuatkan dengan hasil analisis pohon filogenetik menggunakan program ClustaW Omega.



Gambar 4.9 Filogram *Chlorella* sp. sikuen CS15 menggunakan program CLUSTAW Omega. *Dictyosphaerium* sp. strain SAG 70.80 (GQ176860), *Masaia oloidia* (GQ477060), *Kalenjenia gelatinosa* (GQ477061), *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (GQ477062), *Compactochlorella dohmannii* (GQ477058), *Parachlorella kessleri* strain HY-6 (JQ797561), *Parachlorella kessleri* strain SAG 211-11c (KM020114), *Chlorella kessleri* strain SAG 211-11g (X56105), *Dictyosphaerium* sp. (GQ487252), *Parachlorella kessleri* strain SAG 27.87 (KM020113). Sikuen CS15 menunjukkan kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain HY-6.



Gambar 4.10 Filogram *Chlorella* sp. sikuen CS11 menggunakan program ClustaW Omega. *Parachlorella kessleri* strain TY02 (KX021356), *Parachlorella kessleri* strain CBS 152069 (KR904906), *Parachlorella kessleri* strain SAG 211-11c (KM020114), *Chlorella kessleri* strain 211-11g (X56105), *Dictyosphaerium* sp. strain CB 2008/80 (GQ48712), *Dictyosphaerium* sp. CCAP 222/5 (GQ487241), *Masaia oloida* strain CB 2008/72 (HQ322128), *Masaia oloida* strain CCAP 222/32 (GQ477060), *Compactochlorella kochii* strain CB 2008/104 (HQ322126), *Mucidosphaerium palustre* strain CB 2008/6 (GQ487216). Sikuen CS11 menunjukkan kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain CBS 152069.

Berdasarkan program ClustaW Omega sikuen CS15 dan CS11 juga memiliki kedekatan dengan *Parachlorella kessleri*. Sikuen CS15 memiliki kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain HY-6 dan tingkat kemiripan 100%. Sikuen CS 11 memiliki kedekatan dengan *Parachlorella kessleri* strain CBS 152069 dan tingkat kemiripan 99%.

4.7 Integrasi Islam dengan Sains

Allah SWT telah mengajarkan nabi Adam a.s nama-nama benda, hewan dan segala sesuatu. Allah SWT berfirman dalam surat al Baqarah ayat 31.

وَعَلَّمَ آدَمَ الْأَسْمَاءَ كُلَّهَا ثُمَّ عَرَضَهُمْ عَلَى الْمَلَائِكَةِ فَقَالَ أَنْبِئُونِي بِأَسْمَاءِ هَٰؤُلَاءِ

إِنْ كُنْتُمْ صَادِقِينَ ﴿٣١﴾

Artinya: “dan Dia mengajarkan Adam nama-nama (benda-benda) seluruhnya, kemudian mengemukakannya kepada para Malaikat lalu berkata: Sebutkanlah kepada-Ku nama benda-benda itu jika kamu memang orang-orang yang benar!”

Menurut Mujahid, makna ayat ini ialah Allah SWT mengajarkan kepada Adam nama segala sesuatu. Riwayat Sa’id Ibnu Jubair, Qatadah dan kalangan ulama salaf lainnya, juga membenarkan hal tersebut. Menurut pendapat shahih bahwa Allah SWT mengajarkan nama-nama segala sesuatu, yakni semua zat, sifat dan karakternya.

Al’Qur’an surat al Baqarah ayat 31 disebut juga “*Transfer of Knowledge*”. Ayat tersebut menginformasikan bahwa manusia dianugerahi Allah SWT untuk mengetahui nama atau fungsi dan karakteristik benda-benda. Manusia juga dianugerahi potensi untuk berbahasa. Namun hal utama yang diajarkan manusia bukanlah kata kerja melainkan nama-nama. Bukti hubungan antara Al-Baqarah ayat 31 dengan sains, dapat dilihat dari hasil pohon filogenetik pada **Gambar 4.7**. Nama benda yang juga diajarkan oleh Allah SWT kepada Adam a.s, salah satunya adalah nama-nama benda.

Nama yang diberikan pada suatu benda disesuaikan dengan karakter morfologinya. Karakter morfologi akan memberikan nama yang berbeda-beda untuk setiap benda. Jika telah mengetahui karakter morfologinya manusia dapat menyebutkan nama benda tersebut. Suatu benda yang telah memiliki nama juga akan memiliki fungsi tertentu misalnya, pena untuk menulis, mata untuk melihat, kaki untuk berjalan dan sebagainya. Manusia dapat memanfaatkan benda-benda tersebut sesuai dengan fungsinya. Allah SWT menciptakan benda serta mengajarkan pula nama benda tersebut merupakan bukti rahmat dan kasih sayang kepada manusia. Oleh karena itu, manusia ditunjukka sebagai *khalifah* dunia.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan konsentrasi larutan CTAB 1% menghasilkan kemurnian dan kualitas DNA yang tinggi.
2. Berdasarkan sekuens 18S rDNA *Chlorella* sp. menunjukkan kemiripan dengan spesies *Parachlorella kessleri*.

5.2 Saran

Metode yang lebih akurat untuk mengidentifikasi spesies *Chlorella* sp. dapat menggunakan marka mikrosatelit. Marka mikrosatelit *Chlorella* sp. diketahui bahwa adanya pengulangan basa nitrogen (ATT)_n, sehingga dapat membentuk pola tertentu yang dapat membedakan dengan spesies lain. Primer yang digunakan meliputi, mChl-001, mChl-002, mChl-005, mChl-011 dan mChl-012.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedin, R. M. A. & Taha, H. M. (2008). Antibacterial and antifungal activity of *Cyanobacteria* and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 3(1): 22–3.
- Alemzadeh, E., Haddad, R., Ahmadi, A. R., Hosseini, R., & Moezzi, M. (2014). Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(6), 437–442.
- Ardiana, D. W. (2009). Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian*, 14(1), 12–16.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.F., Moore, D.D., Seidmen, J.G., Smith, J.A., & Struhl, K., eds. (1995). *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Becker. (1994). *Microalgae biotechnology and microbiology*. London: Cambridge University Press.
- Bold & Wynne. (1985). *A biology of marine algae*. Hutchinson Education Ltd. London.
- Borowitzka, M. A. & Lesley, J.B. (1988). *Microalgae biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Chan, K.L., Ho, C.L., Namasivayam, P. & Napis, S. (2007). A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides, *Protocol Exchange*. doi: 10.1038/nprot.2007.184.
- Clark W & K. Christopher. (2000). An introduction to DNA spectrophotometry degradation and the “Farangkengel” experiment. 2: 81-99
- Cheng, L. & Zhang, D. Y. (2010). *Molecular genetic pathology*. Springer.
- Fasya, A. G. (2013). Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. hasil kultivasi dalam medium ekstrak tauge (MET) pada tiap fase pertumbuhan. *Alchemy Journal of Chemistry*, 2(3).
- Fatchiyah. (2011). *Biologi Molekuler: Prinsip dasar analisis*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Gupta, P., Sinha, D., & Bandopadhyay, R. (2014). Innovare Academic Sciences Isolation and screening of marine microalgae *Chlorella* sp._ PR1 for anticancer activity. *International journal of pharmacy sciences* 6(10), 10–12.

- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.
- Integrated DNA Technologies. (2013). Designing PCR primers and probes. <http://www.sg.idtdna.com>.
- Isnansetyo, A. & Kurniastuty. (1995). *Teknik kultur phytoplankton & zooplankton, pakan alami untuk pembenihan organisme laut*. Kanisius. Yogyakarta.
- Kabinawa, I.N.K. (2001). *Mikroalga sebagai sumber daya hayati (SDH) perairan dalam perspektif bioteknologi*. Bogor: Puslitbang Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Kaidah & Suprpto. (2003). Penentuan metode isolasi DNA tanaman salak komersial. *Bulletin Penelitian*, 7: 55-56.
- Khanzadeh, A.F. & Blourchian, J.M. (2005). Ultraviolet radiation exposure from uv-transluminators, *PubMed*, 2(10):493-6. doi: 10.1080/15459620500274211.
- Kodner, Robin B., Roger E. Summons & Andrew H. Knoll. (2009). Phylogenetic investigation of the aliphatic, non-hydrolyzable biopolymer algaenan, with focus on green algae. *Organic Geochemistry* 40(8):854-862.doi:10.1016/j.orggeochem.2009.05003.
- Korn, E.D. (2014). Structure and function of the plasma membrane. *The Journal of General Physiology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articles>. Diakses pada tanggal 19 Januari 2017.
- Kumalasari, D. (2014). Uji aktivitas antibakteri asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella* sp., *Alchemy* 3(2), 163–172.
- Kumar, A., & Anandaraj, M. (2006). Method for isolation of soil DNA and PCR based detection of ginger wilt pathogen , *Ralstonia solanacearum*, 59(1701), 154–160.
- Kusumaningrum, P.H. (2009). Konsumsi harian *Cepepoda* terhadap pakan *Chlorella* sp. pada volume media kultivasi yang berbeda, *Ilmu Kelautan UNDIP*, 13(3): 121-126.
- Leema, J. T. M., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenana, P. S., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. India. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Diakses pada tanggal 22 Desember 2016.

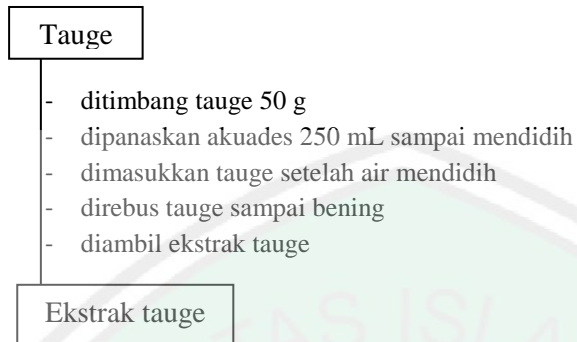
- Liu, S., Huang W., Jin, M.J., Wang, Q. M., Zhang, G. L., Wang, X. M., Shao, S., dan Gao, Z. G. (2014). High gene delivery efficiency of alkylated low-molecule-weight polyethilenimine through Gemini surfactant-like effect. *International Journal of Nanomedicine* 9(1). doi: 10.2147/IJN.S.64554.
- Magdeldin, S. (2012). *Gel nucleic acid*. Bros Scientigic Publishers Ltd.,Oxford.
- Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R., & Tanaka, T. (2009). Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024 toward biofuel production. *Biotechnology Letters*, 31(9), 1367–1372. doi: 10.1007/s10529-009-0029-y.
- Mulyatni, A. S., Priyatmojo, A., & Purwantara, A. (2011). Sequence internal transcribed spacer (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembeding. *Menara Perkebunan*, 79(1), 1–5.
- Muthukannan P, Jayapriyan K, & Rengasamy, R. (2010). In vitro evaluation of β carotene production in two different strains of *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta) . *Biosci. Res.*,1(2):83-87.
- Muzuni, Adi, D. A., dan Syarif, S. 2014. Karakterisasi fragmen gen 18S rRNA pokea (*Batissa violacea celebensis* Martens, 1897) di Sungai Pohara Kecamatan Sampara Kabupaten Konawe. *Biowallacea*. 1(1): 25–38, April 2014. ISSN: 2355–6404.
- Nurkamila, uul S., & Made, P. (2014). DNA extraction from orchid herbarium materials. *Jurnal Simbiosis*, 2(1), 135–146.
- Nyström, B., Kjøniksen, A.L., Beheshti, N., Zhu, K., & Knudsen, K.D. (2009). Rheological and structural aspectson association of hydrphobically modified polysaccharides, *Review article*, 5: 1328-1339.doi: 10.1039/B817349D.
- Pranayogi, D. (2003). *Studi potensi pigmen klorofil dan karetenoid dari mikroalga jenis Chlorophyceae*. Lampung: Universitas Lampung.
- Prihantini, N. B., Putri, B., & Yuniati, R. (2005). Pertumbuhan *Chlorella* spp. dalam medium ekstrak tauge (MET) dengan variasi pH awal. *Makara Sains*, 9(1), 1–6.
- Prihantini, N. B., Damayanti, D., & Yuniati, R. (2007). Pengaruh konsentrasi medium ekstrak tauge (MET) terhadap pertumbuhan *Scenedesmus* sp. isolat Subang. *Makara Sains*, 11(1), 1–9.
- Republik Indonesia. (1985). Undang-undang no. 9 tahun 1985 tentang perikanan. Lembaran Negara RI tahun 1985. Sekretaris Negara. Jakarta.
- Robert, L., Switzer., & Garrity, L.F., (1999). *Experimental biochemistry- theory and exercises in fundamental methods 3rd edition*, W.H Freeman Custom Publishing.

- Rodrigues, M.A. & Bon E. P. da Silva. (2011). Evaluation of *Chlorella* (Chlorophyta) as source of fermentable sugars via cell wall enzymatic hydrolysis. *Enzyme Research*. doi:10.4061/2011/405603.
- Sahu, S.K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K., (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol, *ISRN Molecular Biology*. doi: 10.5402/2012/205049. <http://www.hindawi.com/journals/isrn>. Diakses tanggal 6 Maret 2017.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Selvarajan, R., Felföldi, T., Tauber, T., Sanniyasi, E., Sibanda, T., & Tekere, M. (2015). Screening and evaluation of some green algal strains (*Chlorophyceae*) isolated from freshwater and soda lakes for biofuel production. *Energies*, 8(7), 7502–7521. doi.org/10.3390/en8077502.
- Shisarmini, A., Ambarwati, A. D., Santoso, T. J., Utami, D. W., & Herman. (2001). *Teknik isolasi DNA analisis PCR gen pinII pada genom ubi jalar*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman.
- Sofyan, Putra. (2012). *Panduan membuat sendiri bensin & Solar*. Pustaka Baru Pres. Yogyakarta.
- Somma, M. (2006). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms session 4. Institute for Health and Consumer Protection.
- Soylu, E. N., & Gönülol, A. (2012). Morphological and 18S rRNA analysis of coccoid green algae isolated from lakes of Kızılırmak Delta. *Turkish Journal of Biology*, 36, 247–254. doi:10.3906/biy-1001-19.
- Steenblock, D. (2000). *Makanan Sehat Alami*. PT. Centranusa Insan Cemerlang dan PT. Gramedia. Jakarta.
- Surzycki SJ. (2000). Basic technologies in molecular biology. *Springer-Verlag*. Publisher: New York.
- Suseno, D.,(1976). Ganggang *Chlorella* sebagai bahan pangan di masa mendatang, *Warta Pertanian* VI:40. Departemen Pertanian, Jakarta.
- ThermoScientific. (2011). NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, 1–2. doi:10.7860/JCDR/2015/11821.5896.
- Uclés, R. M. (2012). Identification of algal strains by PCR amplification and evaluation of their fatty acid profiles for biodiesel production. *THESIS*. Louisiana State University.

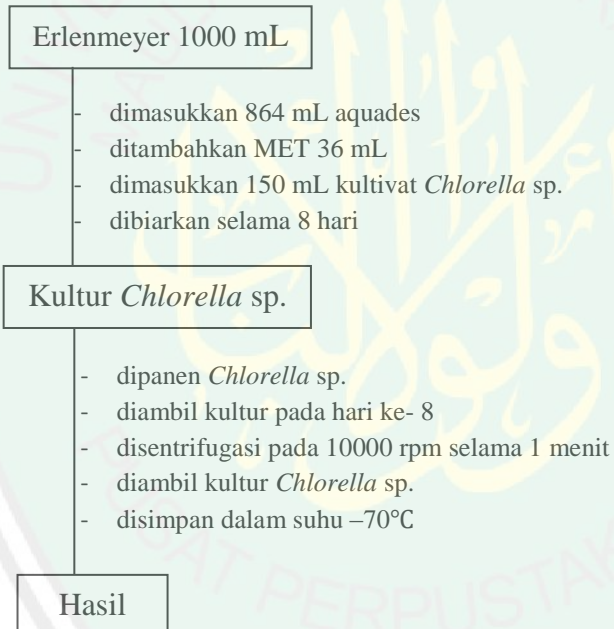
- Varela-Álvarez, E., Andreakis, N., Lago-Lestón, A., Pearson, G. A., Serrão, E. A., Procaccini, G., ... Marbá, N. (2006). Genomic DNA isolation from green and brown algae (Caulerpales and Fucales) for microsatellite library construction. *Journal of Phycology*, 42(3), 741–745. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00218.x.
- Uniprot Consortium. (2002). Taxonomy-*Parachlorella kessleri* (green algae) (*Chlorella kessleri*). www.uniprot.org.
- Vierstreat, A. (1999). Principle of the PCR. University of Ghent. <http://users.urgent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- Wenno, M. R., Purbosari, N., & Thenu, J. L. (2010). Ekstraksi senyawa antibakteri dari *Chlorella* sp . extraction antibakteri compound from *Chlorella* sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan* 10(2), 131–137.
- Windiastrika, G. (2011). Metode uji kualitatif DNA dengan elektroforesis gel agarosa, 1–8.
- Wirosaputro, S. (2002). *Chlorella untuk kesehatan global teknik budidaya dan pengolahan buku II*. Gajah mada universitas press. Yogyakarta.
- Wu, H. L., Hseu, R. S., & Lin, L. P. (2001). Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 115–121.
- Xie, Q., Lin, J., Qin, Y., Zhou, J., & Bu, W. (2011). Structural diversity of eukaryotic 18S rRNA and its impact on alignment and phylogenetic reconstruction, *Protein Cell* 2(2), 161–170. doi: 10.1007/s13238-011-1017-2.
- Yang, X., Lui, P., Hao, Z., Shi, J., & Zhang, S. (2012). Characterization and identification of Freshwater microalgal strains towards biofuel production. *Algae*, 7, 686–695.

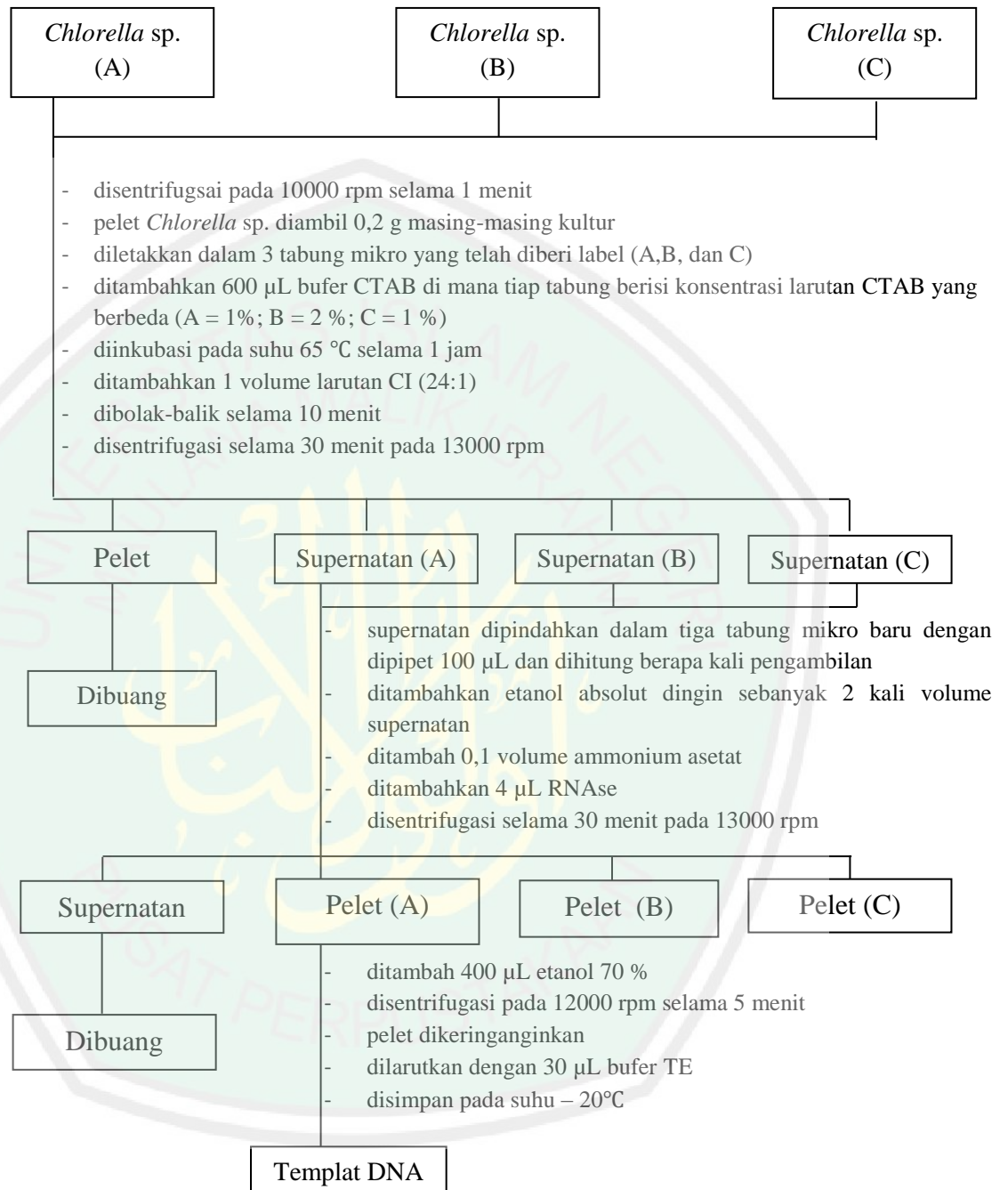
Lampiran 1: Diagram alir

1. Pembuatan Media MET 4 %



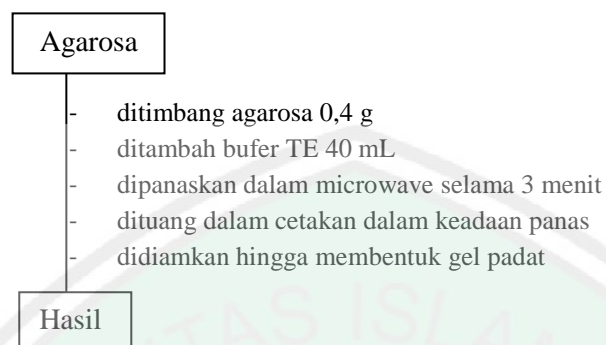
2. Kultivasi *Chlorella sp.*



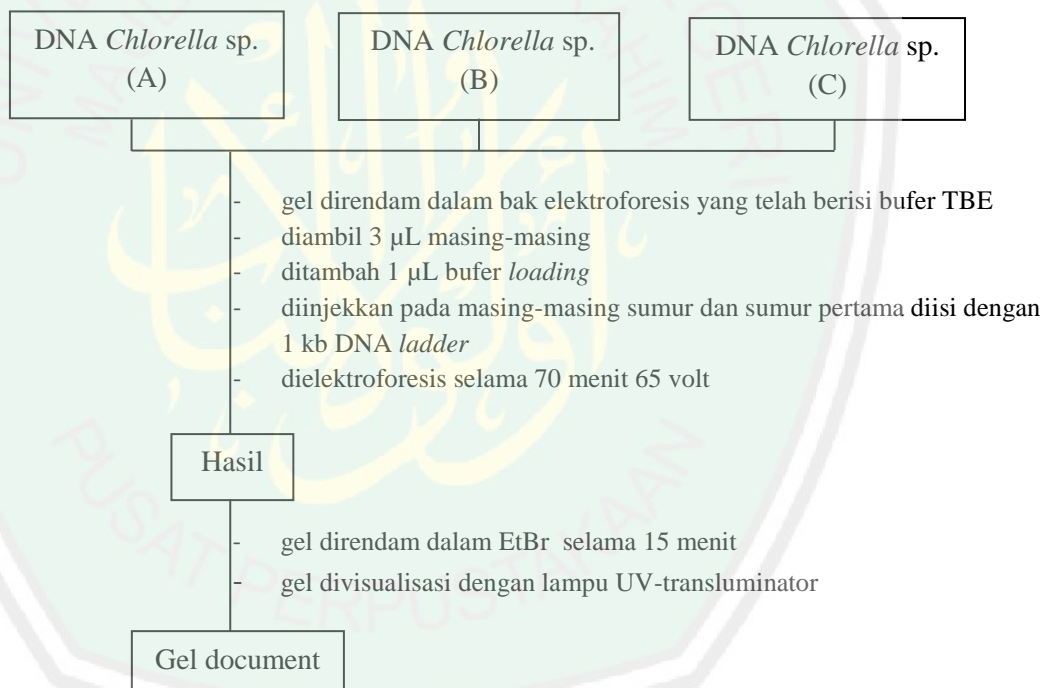
3. Isolasi DNA *Chlorella* sp.

4. Uji kualitatif DNA dengan elektroforesis gel agarosa

a. Pembuatan Agarosa 1 %



b. Tahap Elektroforesis



Lampiran 2: Perhitungan

a. Pembuatan larutan CTAB 1% dalam 100 mL

Padatan CTAB ditimbang sebanyak 1 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan CTAB dituang dalam labu ukur 100 mL dan ditandabatkan hingga volume 100 mL.

b. Pembuatan larutan CTAB 2% dalam 100 mL

Padatan CTAB ditimbang sebanyak 2 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan CTAB dituang dalam labu ukur 100 mL dan ditanda bataskan hingga volume 100 mL.

c. Pembuatan larutan CTAB 3% dalam 100 mL

Padatan CTAB ditimbang sebanyak 3 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan CTAB dituang dalam labu ukur 100 mL dan ditanda bataskan hingga volume 100 mL.

d. Tris HCl 1M pH 8 dalam 100 mL

Padatan Tris HCl ditimbang sebanyak 12,114 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang, dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan diaduk menggunakan stirrer di atas *hotplate*. Larutan ditambahkan HCl hingga pH 8. Larutan ditambah dengan akuades hingga volume larutan menjadi 100 mL. Campuran disterilkan dengan autoklaf.

e. EDTA 0,5 M pH 8 (100 mL)

Padatan NaEDTA ditimbang sebanyak 18,612 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang, dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan ditambah dengan NaOH sampai pH 8 dan EDTA larut sempurna. Larutan ditambah dengan akuades hingga volume larutan menjadi 100 mL. Campuran disterilkan dengan autoklaf.

f. NaCl 2 M (100 mL)

Padatan NaCl ditimbang sebanyak 11,688 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang, dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan ditambah dengan akuades hingga volume larutan menjadi 100 mL. Campuran disterilkan dengan autoklaf.

g. Polivinilpirolidon (PVP) 2%

Padatan CTAB ditimbang sebanyak 2 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan CTAB dituang dalam labu ukur 100 mL dan ditanda bataskan hingga volume 100 mL.

h. Polivinilpirolidon (PVP) 2%

Padatan CTAB ditimbang sebanyak 2 g dalam gelas kimia. Hasil padatan yang telah ditimbang dilarutkan dengan 50 mL akuades. Larutan CTAB dituang dalam labu ukur 100 mL dan ditanda bataskan hingga volume 100 mL.

i. Komposisi Buffer CTAB dalam 2 mL

- | | |
|----------------------|----------------|
| - CTAB 1%, 2% dan 3% | : 40 μ L |
| - NaCl | : 1400 μ L |
| - EDTA 0,5 M pH 8 | : 40 μ L |
| - Tris HCl pH 8 1 M | : 200 μ L |
| - PVP | : 40 μ L |

j. Pembuatan Bufer TAE 1X

Pembuatan stok bufer TAE 50X dengan mencampurkan 24,2 mL Tris, 5,7 mL Asam Asetat Glasial, 10 mL EDTA 5 M, dan 61,1 mL akuades. Semua bahan dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 100 mL diukur menggunakan labu ukur 100 mL. Pembuatan bufer TAE 1X dengan campuran 10 mL Bufer TAE 50X, dan 490 mL akuades kemudian ditandabatkan hingga 500 mL.

k. Pembuatan Bufer TBE 10X

Bahan yang dibutuhkan dengan mencampurkan 10,8 gam Tris, 5,5 g Asam borat, 4 mL EDTA 0,5 M, dan dilarutkan dalam 900 mL akuades. Untuk 1X ditambahkan 900 mL akuades dengan diambil 100 mL dari larutan stok.

l. Pembuatan Bufer TE (Tris-EDTA)

Pembuatan bufer TE merupakan campuran antara 1 M Tris-Cl pH 7,5 dan 0,5 mM EDTA pH 8,0. Ditimbang Tris HCl dengan ditimbang 60,57 g, diatur keasaman sampai pH 7,5 dengan penambahan HCl kemudian dilarutkan dengan ddH₂O sampai volume 500 mL. Larutan 0,5 M EDTA dibuat dengan menimbang EDTA sebanyak 18,6 g dan diatur keasaman sampai pH 8,0 dengan cara menambahkan NaOH, kemudian dilarutkan dengan ddH₂O sampai volume 100 mL. Dibuat larutan stok 1M Tris-Cl dan EDTA dalam 1 L ddH₂O.

m. Komposisi Master Mix PCR

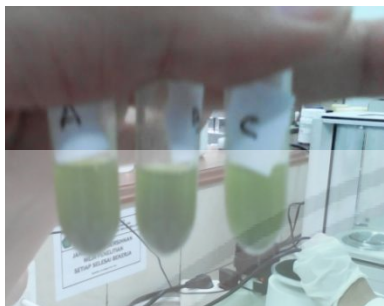
Bahan yang dibutuhkan:

Master mix PCR	= dNTP, <i>Taq Polymerase</i> , Mg ²⁺ , <i>loading dye</i> (10µL)
Primer	= primer foward 1 µL dan primer reverse 1 µL
<i>Nuclease free water</i>	= 6 µL
<i>DNA template</i>	= 2 µL

Total keseluruhan 20 µL untuk 1 reaksi.

Untuk penggunaan 1/2 reaksi Master mix yang dibutuhkan adalah 5 µL, primer masing-masing 1 µL, *DNA template* 2 µL, dan *nuclease free water* 1 µL sehingga total keseluruhan 10 µL.

Lampiran 3 : Dokumentasi



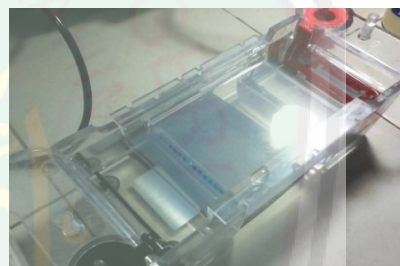
Gambar 1:
 - *Chlorella* sp. A ditambah dengan bufer CTAB 1%
 - *Chlorella* sp. B ditambah dengan bufer CTAB 2%
 - *Chlorella* sp. C ditambah dengan bufer CTAB 3%



Gambar 2:
 Proses ekstraksi DNA dengan penambahan Kloroform dan isomilalkohol terbentuk 3 lapisan setelah proses sentrifugasi



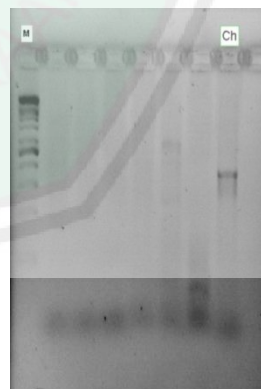
Gambar 3:
 Pelarutan DNA dengan bufer TE sampel A, B, dan C larut sempurna dalam bufer TE



Gambar 4:
 Uji kualitas DNA dengan elektroforesis agarosa 1%



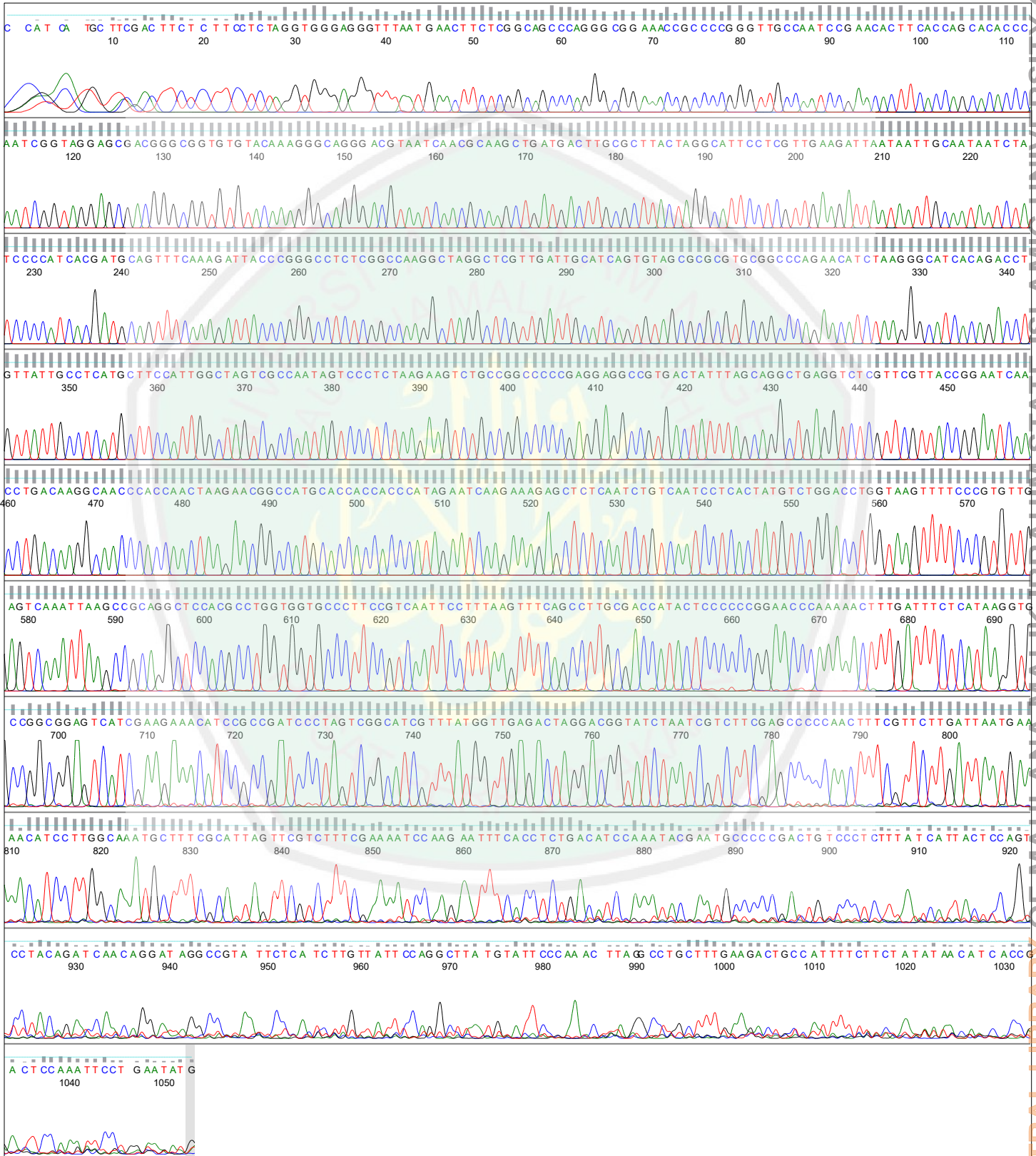
Gambar 5:
 Proses pencampuran master mix PCR dengan template DNA



Gambar 6:
 Pengecekan hasil PCR DNA target muncul pada daerah sekitar 2000 bp

Sample Name: 2445855_C_R
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 15.3832
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 457, C = 556, G = 417, T = 404
Lane/Cap#: 9
Matrix: n/a
Direction: Native



Lampiran 7. Daerah Konservatif Sikuen CS15 dan CS11

a. Hasil penjabaran sikuen CS15 berdasarkan *Parachlorella kessleri* starin SAG 211-11c (KM020114.1)

```

.....| .....| .....| .....| .....|
          10      20      30      40      50
KM020114.1 GTAGTCATAT GCTGTGCTCA AAGATTAAGC CATGCATGTC TAAGTATAAA
CS15 (F) -----C CATGCATGTC TAAGTATAAA
          60      70      80      90     100
KM020114.1 CTGCTTTATA CTGTGAAACT GCGAATGGCT CATTAAATCA GTTATAGTTT
CS15 (F) CTGCTTTATA CTGTGAAACT GCGAATGGCT CATTAAATCA GTTATAGTTT
          110     120     130     140     150
KM020114.1 ATTTGATGGT ACCTTACTAC CGGATAACCG TAGTAATCT AGAGCTAATA
CS15 (F) ATTTGATGGT ACCTTACTAC CGGATAACCG TAGTAATCT AGAGCTAATA
          160     170     180     190     200
KM020114.1 CGTGCGTAAA TCCCGACTTC TGGAAAGGAC GTATTTATTA GATTTAAGGC
CS15 (F) CGTGCGTAAA TCCCGACTTC TGGAAAGGAC GTATTTATTA GATTTAAGGC
          210     220     230     240     250
KM020114.1 CGACCCGGCT CTGCCGGTCT CGCGGTGAAT CATGATAACT TCACGAATCG
CS15 (F) CGACCCGGCT CTGCCGGTCT CGCGGTGAAT CATGATAACT TCACGAATCG
          260     270     280     290     300
KM020114.1 CATGGCCTTG CGCCGGCGAT GTTTCATTCA AATTCTGCC CTATCAACTT
CS15 (F) CATGGCCTTG CGCCGGCGAT GTTTCATTCA AATTCTGCC CTATCAACTT
          310     320     330     340     350
KM020114.1 TCGATGGTAG GATAGAGGCC TACCATGGTG GTAACGGGTG ACGGAGGATT
CS15 (F) TCGATGGTAG GATAGAGGCC TACCATGGTG GTAACGGGTG ACGGAGGATT
          360     370     380     390     400
KM020114.1 AGGGTTCGAT TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA AACGGCTACC ACATCCAAGG
CS15 (F) AGGGTTCGAT TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA AACGGCTACC ACATCCAAGG
          410     420     430     440     450
KM020114.1 AAGGCAGCAG GCGCGCAAAT TACCCAATCC TGACACAGGG AGGTAGTGAC
CS15 (F) AAGGCAGCAG GCGCGCAAAT TACCCAATCC TGACACAGGG AGGTAGTGAC
          460     470     480     490     500
KM020114.1 AATAAATAAC AATACCGGGC CTTTTCAGGT CTGGTAATTG GAATGAGTAC
CS15 (F) AATAAATAAC AATACCGGGC CTTTTCAGGT CTGGTAATTG GAATGAGTAC
          510     520     530     540     550
KM020114.1 AATCTAAACC CCTTAACGAG GATCAATTGG AGGGCAAGTC TGGTGCCAGC
CS15 (F) AATCTAAACC CCTTAACGAG GATCAATTGG AGGGCAAGTC TGGTGCCAGC
          560     570     580     590     600
KM020114.1 AGCCGCGGTA ATTCCAGCTC CAATAGCGTA TATTTAAGTT GCTGCAGTTA
CS15 (F) AGCCGCGGTA ATTCCAGCTC CAATAGCGTA TATTTAAGTT GCTGCAGTTA
          610     620     630     640     650
KM020114.1 AAAAGCTCGT AGTTGGATTT CGGGCGGGGC CTGCCGGTCC GCCGTTTCGG
CS15 (F) AAAAGCTCGT AGTTGGATTT CGGGCGGGGC CTGCCGGTCC GCCGTTTCGG
          660     670     680     690     700
KM020114.1 TGTGCACTGG CAGGGCCC GC CTTGTTGCCG GGGACGGGCT CCTGGGCTTC
CS15 (F) TGTGCACTGG CAGGGCCC GC CTTGTTGCCG GGGACGGGCT CCTGGGCTTC
          710     720     730     740     750
KM020114.1 ACTGTCGGGG ACTCGGAGTC GCGCTGTTA CTTTGAGTAA ATTAGAGTGT
CS15 (F) ACTGTCGGGG ACTCGGAGTC GCGCTGTTA CTTTGAGTAA ATTAGAGTGT
          760     770     780     790     800
KM020114.1 TCAAAGCAGG CCTACGCTCT GAATACATTA GCATGGAATA ACACGATAGG
CS15 (F) -----
          810     820     830     840     850
KM020114.1 ACTCTGGCCT ATCCTGTTGG TCTGTAGGAC CGGAGTAATG ATTAAGAGGG
CS15 (F) -----
          860     870     880     890     900
KM020114.1 ACAGTCGGGG GCATTGCTAT TTCGATGTCA GAGGTGAAAT TCTTGATTT
CS15 (F) -----

```

```

.....| .....| .....| .....| .....| .....|
          910      920      930      940      950
KM020114.1 TCGAAAGACG AACTACTGCG AAAGCATTG CCAAGGATGT TTTCATTAAT
CS15 (F) -----
          960      970      980      990      1000
KM020114.1 CAAGAACGAA AGTTGGGGGC TCGAAGACGA TTAGATACCG TCCTAGTCTC
CS15 (F) -----
          1010     1020     1030     1040     1050
KM020114.1 AACCATAAAC GATGCCGACT AGGGATCGGC GGATGTTTCT TCGATGACTC
CS15 (F) -----
          1060     1070     1080     1090     1100
KM020114.1 CGCCGGCACC TTATGAGAAA TCAAAGTTT TGGGTTCGGG GGGGAGTATG
CS15 (F) -----
          1110     1120     1130     1140     1150
KM020114.1 GTCGCAAGGC TGAAACTTAA AGGAATTGAC GGAAGGGCAC CACCAGGCGT
CS15 (F) -----
          1160     1170     1180     1190     1200
KM020114.1 GGAGCCTGCG GCTTAATTG ACTCAACACG GAAAACCTTA CCAGGTCCAG
CS15 (F) -----
          1210     1220     1230     1240     1250
KM020114.1 ACATAGTGAG GATTGACAGA TTGAGAGCTC TTCTTGATT CTATGGGTGG
CS15 (F) -----
          1260     1270     1280     1290     1300
KM020114.1 TGGTGCATGG CCGTTCTTAG TTGGTGGGTT CCCTTGTCAG GTTGATTCCG
CS15 (F) -----
          1310     1320     1330     1340     1350
KM020114.1 GTAACGAACG AGACCTCAGC CTGCTAAATA GTCACGGCCT CCTCGGGGGC
CS15 (F) -----
          1360     1370     1380     1390     1400
KM020114.1 CGGCAGACTT CTAGAGGGA CTATTGGCGA CTAGCCAATG GAAGCATGAG
CS15 (F) -----
          1410     1420     1430     1440     1450
KM020114.1 GCAATAACAG GTCTGTGATG CCCTTAGATG TTCTGGGCCG CACGCGCGCT
CS15 (F) -----
          1460     1470     1480     1490     1500
KM020114.1 ACACTGATGC AATCAACGAG CCTAGCCTTG GCCGAGAGGC CCGGGTAATC
CS15 (F) -----
          1510     1520     1530     1540     1550
KM020114.1 TTTGAAACTG CATCGTGATG GGGATAGATT ATTGCAATTA TTAATCTTCA
CS15 (F) -----
          1560     1570     1580     1590     1600
KM020114.1 ACGAGGAATG CCTAGTAAG GCAAGTCATC AGCTTGC GTTACGTCC
CS15 (F) -----
          1610     1620     1630     1640     1650
KM020114.1 CTGCCCTTTG TACACACCGC CCGTCGCTCC TACCGATTGG GTGTGCTGGT
CS15 (F) -----
          1660     1670     1680     1690     1700
KM020114.1 GAAGTGTTCG GATTGGCAAC CCGGGGCGGT TTCCGCCCTG GGCTGCCGAG
CS15 (F) -----
          1710     1720     1730     1740     1750
KM020114.1 AAGTTCATTA AACCTCCCA CCTAGAGGAA GGAGAAGTCG TAACAAGGTT
CS15 (F) -----
          1760     1770
KM020114.1 TCCGTAGGTG AACCTGCAGA AGGATCA
CS15 (F) -----

```

Kesamaan sikuen antara CS15 dan *Parachlorella kessleri* strain SAG 211-11c dimulai pada basa ke 30 hingga basa ke 744. Kedua sikuen tidak terdapat basa nitrogen yang berbeda sehingga nilai kemiripan mencapai 100%.

b. Hasil penjarangan sikuen CS11 berdasarkan sikuen Prachlorella kessleri strain CBS 152069 (KR904906)

```

.....| .....| .....| .....| .....|
      10      20      30      40      50
KR904906.1 TCGGAGAGGG AGCATGAGAA ACGGCTACCA CATCCAAGGA AGGCAGCAGG
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
      60      70      80      90     100
KR904906.1 CGCGCAAATT ACCCAATCCT GACACAGGGA GGTAGTGACA ATAAATAACA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     110     120     130     140     150
KR904906.1 ATACCGGGCC TTTTCAGGTC TGGTAATTGG AATGAGTACA ATCTAAACCC
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     160     170     180     190     200
KR904906.1 CTTAACGAGG ATCAATTGGA GGGCAAGTCT GGTGCCAGCA GCCGCGGTAA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     210     220     230     240     250
KR904906.1 TTCCAGCTCC AATAGCGTAT ATTTAAGTTG CTGCAGTAA AAAGCTCGTA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     260     270     280     290     300
KR904906.1 GTTGGATTTC GGGCGGGGCC TGCCGGTCCG CCGTTTCGGT GTGCACTGGC
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     310     320     330     340     350
KR904906.1 AGGGCCCGCC TTGTTGCCGG GGACGGGCTC CTGGGCTTCA CTGTCCGGGA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     360     370     380     390     400
KR904906.1 CTCGGAGTCG GCGCTGTTAC TTTGAGTAAA TTAGAGTGTT CAAAGCAGGC
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     410     420     430     440     450
KR904906.1 CTACGCTCTG AATACATTAG CATGGAATAA CACGATAGGA CTCTGGCCTA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     460     470     480     490     500
KR904906.1 TCCTGTTGGT CTGTAGGACC GGAGTAATGA TTAAGAGGGA CAGTCGGGGG
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     510     520     530     540     550
KR904906.1 CATTTCGTAAT TCGATGTCAG AGGTGAAATT CTTGGATTTT CGAAAGACGA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     560     570     580     590     600
KR904906.1 ACTTACGCGA AAGCATTTCG CAAGGATGTT TTCATTAATC AAGAACGAAA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     610     620     630     640     650
KR904906.1 GTTGGGGGCT CGAAGACGAT TAGATACCGT CCTAGTCTCA ACCATAAACG
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     660     670     680     690     700
KR904906.1 ATCCCGACTA GGGATCGGCG GATGTTTCTT CGATGACTCC GCCGGCACCT
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     710     720     730     740     750
KR904906.1 TATGAGAAAT CAAAGTTTTT GGGTCCGGG GGGAGTATGG TCGCAAGGCT
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     760     770     780     790     800
KR904906.1 GAAACTTAAA GGAATTGACG GAAGGGCACC ACCAGGCGTG GAGCCTGCGG
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     810     820     830     840     850
KR904906.1 CTTAATTGTA CTCAACACGG GAAACTTAC CAGGTCCAGA CATAGTGAGG
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     860     870     880     890     900
KR904906.1 ATTGACAGAT TGAGAGCTCT TTCTTGATTC TATGGGTGGT GGTGCATGGC
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     910     920     930     940     950
KR904906.1 CGTTCCTTAGT TGGTGGGTTG CCTTGTGAGG TTGATTCGGG TAACGAACGA
CS11
.....| .....| .....| .....| .....|
     960     970     980     990    1000
KR904906.1 GACCTCAGCC TGCTAAATAG TCACGGCCTC CTCGGGGGCC GGCAGACTTC
CS11
GACCTCAGCC TGCTAAATAG TCACGGCCTC CTCGGGGGCC GGCAGACTTC

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1010      1020      1030      1040      1050
KR904906.1 TTAGAGGGAC TATTGGCGAC TAGCCAATGG AAGCATGAGG CAATAACAGG
CS11         TTAGAGGGAC TATTGGCGAC TAGCCAATGG AAGCATGAGG CAATAACAGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1060      1070      1080      1090      1100
KR904906.1 TCTGTGATGC CCTTAGATGT TCTGGGCCGC ACGCGCGCTA CACTGATGCA
CS11         TCTGTGATGC CCTTAGATGT TCTGGGCCGC ACGCGCGCTA CACTGATGCA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1110      1120      1130      1140      1150
KR904906.1 ATCAACGAGC CTAGCCTTGG CCGAGAGGCC CGGGTAATCT TTGAAACTGC
CS11         ATCAACGAGC CTAGCCTTGG CCGAGAGGCC CGGGTAATCT TTGAAACTGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1160      1170      1180      1190      1200
KR904906.1 ATCGTGATGG GGATAGATTA TTGCAATTAT TAATCTTCAA CGAGGAATGC
CS11         ATCGTGATGG GGATAGATTA TTGCAATTAT TAATCTTCAA CGAGGAATGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1210      1220      1230      1240      1250
KR904906.1 CTAGTAAGCG CAAGTCATCA GCTTGCGTTG ATTACGTCCC TGCCCTTTGT
CS11         CTAGTAAGCG CAAGTCATCA GCTTGCGTTG ATTACGTCCC TGCCCTTTGT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1260      1270      1280      1290      1300
KR904906.1 ACACACCGCC CGTCGCTCCT ACCGATTGGG TGTGCTGGTG AAGTGTTCCG
CS11         ACACACCGCC CGTCGCTCCT ACCGATTGGG TGTGCTGGTG AAGTGTTCCG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1310      1320      1330      1340      1350
KR904906.1 ATTGGCAACC CGGGGCGGTT TCCGCCCTGG GCTGCCGAGA AGTTCATTAA
CS11         ATTGGCAACC CGGGGCGGTT TCCGCCCTGG GCTGCCGAGA AGTTCATTAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1360      1370      1380      1390      1400
KR904906.1 ACCCTCCCAC CTAGAGGAAG GAGAAGTCGT AACAAAGGTTT CCGTAGGTGA
CS11         ACCCTCCCAC CTAGAGGAAG GAGAAGTCGT AACAAAGGTTT CCGTAGGTGA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1410
KR904906.1 ACCTGCGGAA GGATCATTG
CS11         -----

```

Sikuen CS11 memiliki nilai kemiripan dengan *Parachlorella kessleri* strain CBS 1502069 sebesar 99%. Kemiripan sikuen dimulai pada basa ke-494 sampai dengan basa ke- 1367 namun terdapat 2 pasang basa yang berbeda yaitu pada basa ke-512 dan 555. Perbedaan terdapat pada sikuen CS11 yaitu G dan A yang bertanda merah.



**KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA**

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info_uin@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : Habibah Askur Liana
NIM : 12630064
Judul Skripsi : Isolasi DNA *Chlorella* sp dengan Metode CTAB Tanpa - Nektarin dan Identifikasi Sirkon 18S rDNA
Pembimbing Utama : A. Ghansyam Fasya, M. Si
Pembimbing Agama :
Konsultansi : Dewa Yulianti, M. Si

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Catatan (ditulis tangan)	Tanda tangan (Pembimbing)
1.	15 Des 2015	Judul Penelitian	Kurang komunikatif	
2.	18 Des 2015	BAB I Latar belakang	Alur belum nyambung	
3.	29 Des 2015	BAB I	typo, bahasa kurang komunikatif	
4.	30 Des 2015	BAB I	antar paragraf terdapat kontradiksi	
5.	4 Jan 2016	BAB I Tujuan Penelitian	tidak relevan dengan judul	
6.	5 Jan 2016	BAB II Kajian teori	Dipersingkat	
7.	19 Jan 2016	BAB II	Kesalahan sitasi	
8.	22 Jan 2016	BAB II	typo / kesalahan penulisan	
9.	27 Jan 2016	BAB III	Tahapan penelitian	
10.	29 Januari 2016	BAB III Metode Penelitian	mempertegas teknik PCR	
11.	1 Feb 2016	BAB III Metode Penelitian	mempertegas teknik nanodrop	
12.	4 Feb 2016	BAB III Metode Isolasi DNA	perubahan metode mpd variasi konsultasi	
13.	9 Feb 2016	BAB III Metode PCR	Sirkon PCR harus diganti	
14.	10 Feb 2016	BAB III Metode sekuening	menggunakan metode Sanger	
15.	15 Feb 2016	Diskusi materi	Isolasi DNA (prinsip, metode)	
16.	19 Feb 2016	Daftar Pustaka	tidak alfabetis	
17.	22 Feb 2016	Daftar Pustaka	kesalahan mensitasi	
18.	25 Feb 2016	Diskusi	elektroforemi dan nanodrop	
19.	4 Mar 2016	Pelatihan presentasi	ppt belum bagus	
20.	2 Mar 2016	Diskusi	Pendahuluan materi PCR	



Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlak, Keluasan Ilmu dan Kematangan Profesional

