

Karakterisasi Dan Identifikasi Molekuler Fusan Hasil Fusi Protoplas Interspesies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Chlorella vulgaris* Menggunakan 18SrDNA

¹Asih Rismiarti, ¹Hermin Pancasakti Kusumaningrum, ³Muhammad Zainuri
dan ²Sri Pujiyanto

¹Laboratorium Genetika

²Laboratorium Mikrobiologi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang
Jln Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275, Telp: (024)7474754; Fax (024) 76480923

³Laboratorium Kelautan

Departemen Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Tembalang, Semarang – 50275

Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Email : asih.rismiarti@gmail.com

Abstract

Chlorella pyrenoidosa is a unicellular green algae that grows in fresh water with carotenoids consisting of -carotene, -carotene, anthaxanthin, neoxanthin, zeaxanthin and lutein. *C. vulgaris* usually it lives in sea water with carotenoids, chlorophyll, tocopherol, ubiquinone and proteins. The quality of them is improved by protoplast fusion and identified further using molecular analysis. This study aims to find out the characterization and identification of molecular fusan that is obtained from interspecies *C. pyrenoidosa* and *C. vulgaris* protoplast fusion process using 18SrDNA. Both *C. pyrenoidosa* and *C. vulgaris* are combined by protoplast fusion and then they were performed the isolation of DNA with CTAB modification method, followed by PCR gradient using primers 18S *Chlorella* and performed DNA sequencing. The result show that there are different characters between masterplan and fusan based on growth of fresh water and sea water medium. The success frequency of fusan as a result from protoplast fusion in the fresh water media is 21% and 6% for sea water medium. The results of the alignment between fresh water fusan and *C. vulgaris* masterplan from GeneBank shows that the base sequence homology is 93% *C. pyrenoidosa* masterplan from GeneBank is 90%. The result of molecular identification towards the sequence of fresh water fusan bases shows that there is a kinship relationship with the masterplan of *C. pyrenoidosa* 18S *Chlorella* and *Chlorosphaera klebsii* microalgae compared with some other species from Chlorophyta group with similarity value as many as 91%. It shows that the high variety genetic is based on variations of the base sequence and has a kinship with other species in the Chlorophyta group.

Keywords : *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, Protoplast Fusion, DNA Sequencing, 18SrDNA.

INTRODUCTION

Mikroalga adalah tumbuhan tingkat rendah yang memiliki klorofil, dapat digunakan untuk melakukan proses fotosintesis. *Chlorella pyrenoidosa* merupakan mikroalga yang memiliki kandungan protein 60%, karbohidrat dan lemak 20% (Asni, 2000). *C. vulgaris* memiliki kandungan gizi berupa protein 55%, serat 5,8%, lipid 10,2% dan karbohidrat 23,2% (Maruyama, 1997). *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* memiliki karakter yang berbeda-beda. Perbedaan utamanya adalah *C. pyrenoidosa* biasa hidup di air tawar, sedangkan *C. vulgaris* hidup di air laut. Keunggulan dari keduanya dapat

ditingkatkan melalui teknik fusi protoplas. Fusi protoplas merupakan suatu metode untuk menggabungkan dua atau lebih sel sehingga diperoleh kombinasi sel baru dengan bantuan aliran listrik atau zat kimia (Mariska dan Husni, 2002; (Kusumaningrum dan Zainuri, 2014; Kusumaningrum dan Zainuri 2015a; Kusumaningrum dan Zainuri 2015b; Kusumaningrum dan Zainuri 2015c). Karakter morfologi dari gabungan keduanya dibandingkan dengan induk menjadi faktor yang biasa digunakan oleh peneliti lain (Panaiotov *et al.*, 2009). Namun, karakterisasi secara konvensional ini memiliki kemungkinan bahwa mikroalga yang memiliki

fenotip sama teridentifikasi menjadi spesies yang sama, padahal keduanya belum tentu secara genetik memiliki kesamaan. Diperlukan karakterisasi dan identifikasi lebih lanjut menggunakan analisis secara molekuler. Karakteristik molekuler yang digunakan yaitu dengan melakukan analisis homologi basa DNA hasil sekuensing. Analisis homologi merupakan suatu teknik untuk melihat persamaan atau kekerabatan organisme di tingkat basa dan asam amino. Urutan basa juga digunakan untuk melakukan identifikasi atau determinasi terhadap suatu organisme yang belum diketahui atau baru ditemukan. Salah satu data molekuler yang dapat digunakan adalah sekuen DNA untuk gen 18SrDNA. Gen 18SrDNA dapat dipergunakan sebagai penanda molekuler dalam penyusunan klasifikasi filogenetik dan mengandung beberapa daerah yang memiliki sekuen yang terkonservasi dengan baik sehingga dapat digunakan untuk analisis filogenetik dengan membuat pohon filogenetik. Pohon filogenetik akan memperlihatkan hubungan kekerabatan mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris*. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi dan identifikasi molekuler fusan dari proses fusi protoplas interspesies *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* menggunakan 18SrDNA

BAHAN DAN METODE

Fusi Protoplas

Mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Sel kedua induk dalam jumlah yang sama disentrifugasi untuk mendapatkan peletnya. Pelet dicuci dengan larutan penstabil osmotik. Pelet ditambah dengan enzim Lisozim (160 µl), 3% NaCl (8 ml) dan 0,1 M CaCl₂ (800 µl), diinkubasi selama 20 menit pada suhu 35^oC sehingga terbentuk protoplas. Protoplas disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Pelet *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* digabungkan, ditambahkan dengan PEG 6000 (4800 µl), 0,1 M CaCl₂ (800 µl), 2% glisin (400 µl) dan diinkubasi pada suhu 30^oC selama 30 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Pelet dicuci dengan larutan penstabil osmotik. Sel rekombinan

ditumbuhkan dalam air tawar dan air laut, diberi medium Walne. Sel dikultur dengan menggunakan aerasi dan iluminasi sebesar 3000 lux.

Pengukuran -Karoten

Pengukuran -karoten menggunakan metode modifikasi dari Hejazi *et al.* (2002). Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pelet ditambahkan isopropanol, divortek dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 selama 10 menit. Hasil sentrifugasi pada fase atas (tidak berwarna) diambil lalu diletakkan pada *cuvet* menggunakan *UV-Vis Spektrofotometer*. Pengukuran -karoten dilakukan pada panjang gelombang 436. Pengukuran dilakukan menggunakan blanko isopropanol. Nilai absorbansi dan penghitungan -karoten diketahui menggunakan rumus menurut metode AOAC (1995):

$$\text{Abs} = 2 - \log T$$

Keterangan:

Abs : Nilai absorbansi

T : *Transmitent* yang diperoleh

-karoten (µg/ml) diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\text{-karoten} = (\text{Abs} \times 196) : (196 \times 1 \times \{(\text{volume awal} : \text{volume akhir})\})$$

Keterangan:

Abs : Nilai absorbansi

196 : Panjang gelombang yang digunakan (436 nm)

196 : Koefisien ekstingsi -karoten

1 : Ukuran *cuvet* yang digunakan

Isolasi DNA Metode Modifikasi CTAB

Isolasi DNA menggunakan metode modifikasi CTAB (Roger and Bendich, 1994). Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Pelet ditambahkan dengan *buffer* CTAB ekstraksi dingin (500 µl) sebagai deterjen dan dihancurkan dengan mortar di atas *ice gel* sampai hancur dinding selnya. *Buffer* CTAB ditambahkan kedalam sampel (500 µl) dan diinkubasi pada suhu 65^oC selama 90 menit. Sampel ditambahkan kloroform:isoamil alkohol

(450 µl) dan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan ditambahkan RNase A (5 µl) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Sampel ditambahkan dengan isopropanol dingin (600 µl) dan diinkubasi pada suhu -20°C selama overnight. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5-10 menit dan terbentuk endapan putih. Pelet dicuci dengan 76% etanol (800 µl) dan Sodium Asetat (100 µl), disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Pelet dicuci dengan 70% etanol (100 µl) dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Sisa etanol dibuang dan tersisa endapan putih untuk dikeringanginkan selama overnight. DNA yang terbentuk ditambah dengan *buffer* TE pH 8 (50-100 µl) dan disimpan pada suhu 4°C. Hasil isolasi DNA dilihat dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

Gradient PCR 18SrDNA

Bahan-bahan yang digunakan di *short spin (microcentrifuge)* untuk menurunkan larutan selama. Reaksi PCR dibuat dengan menambahkan *buffer* PCR 10x (2,5 µl), dNTPs (0,25 µl), primer 18S *Chlorella forward* 5' (CGG AGA RGG MGC MTG AGA) 3' (1,5 µl), primer 18S *Chlorella reverse* 5' (GGG CGG TGT GTA CAA RGR) 3' (1,5 µl), *Taq Polymerase* (0,25 µl), ddH₂O (17 µl) dan *template* DNA (2 µl). Semua bahan dicampur dan dimasukkan kedalam mesin *gradient* PCR untuk mendapatkan optimasi suhu *annealing*. Program PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C (3 menit), dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C (25 detik), *annealing* pada suhu 55-63°C (45 detik), ekstensi pada suhu 72°C (50 detik), ekstensi akhir pada suhu 72°C (1 menit) dan *hold* pada suhu 4°C. Sampel kemudian disimpan kedalam *freezer*.

Pendeteksian Hasil Gradient PCR dengan Metode Elektroforesis

Sampel hasil amplifikasi yang diperoleh ditambahkan *loading dye* (2 µl) dan dimasukkan kedalam sumuran gel agarosa. Marker (100 bp DNA *Ladder*) dimasukkan kedalam sumuran gel agarosa dengan komposisi marker yaitu *loading dye* (1 µl), marker (4 µl) dan akuades (5 µl). Marker ditambahkan kedalam gel agarosa pada

bagian sumuran paling ujung. *Buffer* TAE ditambahkan kedalam tangki sampai seluruh gel terendam. Elektroforesis dijalankan (dilakukan *running*) pada 100 Volt selama 20 menit. Setelah selesai *running*, gel agarosa dikeluarkan dan diletakkan di atas UV *transluminator*. UV *transluminator* dinyalakan dan pita-pita DNA yang tervisualisasi diamati.

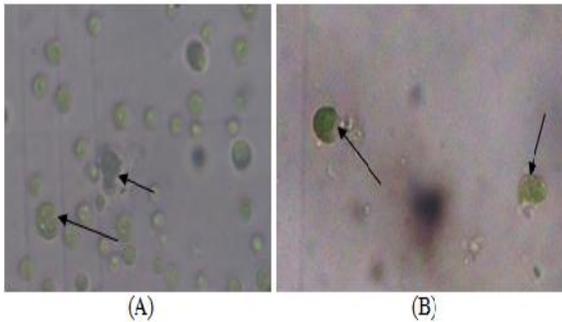
Sekuensing DNA

Fragmen DNA selanjutnya disekuensing untuk melihat urutan basa DNA pada mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* menggunakan mesin sekuensing *ABI PRISM Mode 310 version 3.0*. Hasil sekuensing DNA fusan dianalisis homologi basanya dengan memanfaatkan informasi sekuen DNA yang tersedia di dalam pusat data *Genebank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan (*Basic Local Alignment Search Tool nukleotide*) BLASTn dan hubungan kekerabatan dengan spesies lain diidentifikasi melalui program MEGA 5.2 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) untuk pembuatan pohon filogenetik.

RESULT AND DISCUSSION

Hasil Fusi Protoplas *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris*

Pembentukan protoplas *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* ditandai dengan pecahnya dinding sel akibat pemberian enzim Lisozim. Hasil pengamatan memperlihatkan bentuk protoplas *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* yang utuh serta membulat (sferik). Pemecahan dinding sel dapat dilihat pada Gambar 1 yang diperoleh dari hasil pengamatan secara mikroskopis. Sel yang telah kehilangan dinding selnya akan membentuk protoplas. Gerken *et al.* (2012) menyatakan bahwa enzim Lisozim dapat memecah dinding sel *Chlorella* lebih optimal dibandingkan dengan enzim yang lain dan dapat mendegradasi di permukaan luar dinding sel.

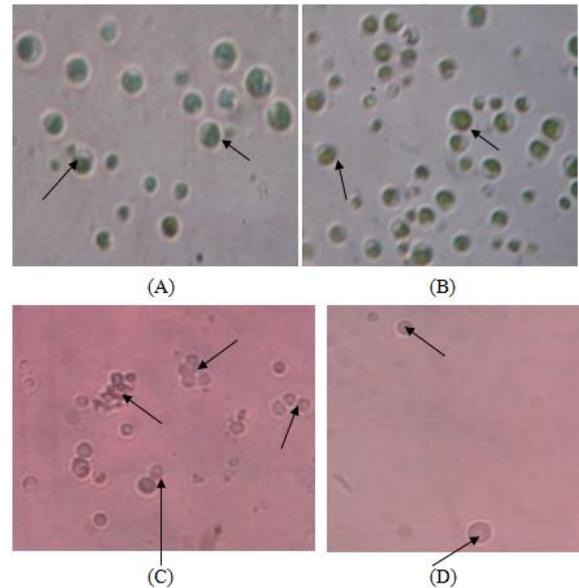


Gambar 1. Pemecahan dinding sel *Chlorella pyrenoidosa* (A) dan *Chlorella vulgaris* (B) (400x).

Hasil isolasi protoplas selanjutnya digunakan untuk fusi melalui penggabungan dua atau lebih sel. Fusi yang terjadi pada kedua protoplas ini dilihat dengan terbentuknya agregat protoplas. Penggabungan beberapa protoplas diperoleh karena adanya penggunaan PEG 6000 yang berperan sebagai penginduksi fusi, karena PEG menjadi jembatan antara dua protoplas atau lebih sehingga akan terjadi agregasi protoplas. Fusan terbentuk di hari keempat setelah dilakukan regenerasi kembali dengan jumlah sel pada media air tawar sebesar $8,4 \times 10^5$ sel/ml dan air laut sebesar 5×10^5 sel/ml. Hal ini menunjukkan terjadinya regenerasi dinding sel protoplas. Kim *et al.* (2009), menyatakan bahwa saat sel mengalami kerusakan secara alami, sel mampu memperbaiki kerusakan tersebut dengan menambahkan protein dan polisakarida untuk mencegah kerusakan sel.

Hasil kultivasi fusan yang telah dikulturkan dengan dua media berbeda yaitu air tawar dan air laut memperlihatkan beberapa karakter yang berbeda dalam jumlah pertumbuhannya. Karakter yang terlihat yaitu bahwa fusan *C. pyrenoidosa* dengan *C. vulgaris* yang dihasilkan lebih banyak hidup di media air tawar, sedangkan fusan yang tumbuh pada media air laut memiliki jumlah sel yang sedikit (Gambar 2). Fusan yang dihasilkan lebih banyak hidup di air tawar, tetapi tidak selalu karakter fusan yang terbentuk lebih dominan *C. pyrenoidosa* karena posisi protoplas walaupun sudah mempunyai dinding sel masih diperlukan aklimatisasi dimana adanya dukungan dari kondisi air laut tersebut. Kondisi pada air tawar ternyata lebih memfasilitasi untuk terjadinya proses aklimatisasi, karena fusan yang lebih

dominan di air laut apabila diletakkan pada air tawar lebih susah beradaptasi dibandingkan dengan fusan yang di air tawar dan diletakkan di air tawar juga.



Gambar 2. Pengamatan mikroskopis induk *C. pyrenoidosa* (A); induk *C. vulgaris* (B) perbesaran 1000x dan fusan hasil fusi protoplas interspesies antara *C. pyrenoidosa* dengan *C. vulgaris* pada air tawar (C); air laut (D) perbesaran 400x.

Hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa adanya perbedaan bentuk antara fusan yang beradaptasi pada air tawar dengan air laut (Gambar 2). Sel fusan pada air tawar berbentuk seperti bulat lonjong dan cenderung bergerombol, sedangkan pada air laut berbentuk bulat telur dan tidak bergerombol. Sel rekombinan yang bergerombol biasanya dikarenakan sel masih beradaptasi terhadap keadaan lingkungan yang jelek atau lingkungan ekstrim, apabila lingkungan sudah mendukung dan mampu beradaptasi maka sel tersebut akan memisah atau menjadi tunggal. Berdasarkan hasil pengamatan, fusan tersusun oleh beberapa protoplas dari *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* yang berkisar antara 3-4 protoplas/fusan dengan ukuran sel yang lebih besar dari kedua induknya. Protoplas yang bergabung dengan kisaran antara dua atau lebih protoplas menjadi suatu individu baru yang mampu bertahan

hidup dan berkembang dinamakan sebagai hasil dari fusi protoplas (Suryowinoto, 2000).

Perbedaan lainnya dilihat dari pertumbuhan sel induk dan fusan. Pertumbuhan ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Isnansetyo dan Kurniastuty (1995) memaparkan bahwa laju pertumbuhan adalah pertambahan jumlah sel dalam periode tertentu. Rata-rata jumlah sel *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* sebelum dilakukan fusi protoplas secara berturut-turut yaitu $3,6 \times 10^6$ sel/ml dan $2,6 \times 10^6$ sel/ml. Pertumbuhan fusan mengalami penurunan dibandingkan dengan masing-masing induk dimana jumlah yang dihasilkan dari fusan tidak melebihi induknya. Sel fusan pada air tawar memiliki rata-rata sel sekitar $6,7 \times 10^5$ sel/ml, sedangkan pada air laut hanya memiliki sel sekitar $2,3 \times 10^5$ sel/ml.

Frekuensi keberhasilan hasil fusi protoplas secara interspesies antara *C. pyrenoidosa* dengan *C. vulgaris* yang dibandingkan dengan sel induk pada media air tawar sebesar 21% dan media air laut sebesar 6%. Rendahnya frekuensi keberhasilan hasil fusi dapat dikarenakan dari fusi protoplas yang dilakukan dengan dua spesies yang berbeda. Mariska dan Husni (2002), menyatakan bahwa keberhasilan fusi antara lain ditentukan oleh metode isolasi protoplas, metode yang digunakan untuk fusi, bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi berikutan konsentrasinya, waktu inkubasi atau fusi, media kultur, media pengenceran sel dan media regenerasi. Semakin banyak protoplas yang terisolasi maka semakin tinggi tingkat keberhasilan fusi. Namun keberhasilan tersebut ditentukan oleh bahan yang digunakan untuk isolasi protoplas.

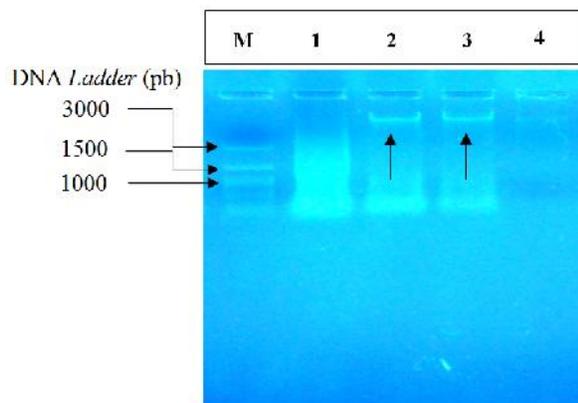
Pertumbuhan sel fusan tidak seperti dengan induknya dikarenakan bahwa fusan terdiri dari penggabungan dua atau lebih sel yang mengakibatkan regenerasi sel berjalan lambat. Proses pertumbuhan fusan dalam air tawar dan air laut, secara bertahap akan menurun jumlah selnya setelah mencapai pertumbuhan yang stabil. Hal ini dikarenakan nutrisi yang menipis dan akumulasi metabolit fusan dapat menghambat pertumbuhan, sehingga pertumbuhannya akan berhenti setelah mencapai waktu tertentu.

Fusan yang telah diperoleh dapat menghasilkan karotenoid seperti pada masing-

masing kedua induknya. Salah satu karotenoid yang terkandung di dalamnya yaitu β -karoten dengan jumlah 0,01 $\mu\text{g/ml}$ untuk fusan air tawar dan 0,04 $\mu\text{g/ml}$ untuk fusan air laut. Hasil β -Karoten menunjukkan bahwa pada induk *C. pyrenoidosa* tidak menghasilkan β -karoten dan induk *C. vulgaris* memiliki β -karoten sebesar 0,61 $\mu\text{g/ml}$. Hasil β -karoten pada fusan air tawar dan air laut lebih didominasi oleh induk *C. vulgaris*, karena pada induk *C. pyrenoidosa* tidak menghasilkan β -karoten. Kandungan β -karoten yang terdapat pada induk *C. vulgaris* lebih tinggi dibandingkan pada fusan. Sesuai dengan hasil penelitian Yunanto *dkk.* (2013), dimana induk *Dunaliella salina* menghasilkan β -karoten lebih besar yaitu 2 $\mu\text{g/ml}$ dan induk *C. pyrenoidosa* sebesar 0,1 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan fusan air laut menghasilkan β -karoten sebesar 0,6 $\mu\text{g/ml}$ dan fusan air tawar sebesar 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Goodwin (1984) menyatakan bahwa produksi β -karoten *Chlorella* terjadi bersamaan dengan sintesis klorofil selama fase pertumbuhan logaritmik, sehingga konsentrasinya menurun ketika jalur karotenogenik diaktifkan. Gouveia *et al.* (1996), menyatakan bahwa apabila jalur karotenogenik diaktifkan, maka terjadinya transformasi oksidatif dari β -karoten menjadi canthaxanthin dan jalur hydroxylative menuju zeaxanthin/lutein.

Hasil Isolasi DNA Fusan dan Induk

Hasil isolasi DNA fusan dan induk dikarakterisasi secara kualitatif dengan divisualisasikan menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode modifikasi CTAB mampu mengisolasi DNA *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* dengan kualitas baik yang ditunjukkan pada hasil elektroforesis dimana adanya pemisahan secara jelas dan ketebalan pita DNA yang beragam (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil pengecekan kualitas DNA genom. Marker DNA *Ladder* 100bp (M); induk *Chlorella vulgaris* (1); induk *Chlorella pyrenoidosa* (2); fusan air tawar (3) dan fusan air laut (4).

Pita yang ditunjukkan pada Gambar 3 kolom kedua dan ketiga berukuran di atas 3000 pb menyatakan banyaknya jumlah DNA yang diperoleh, sedangkan pada kolom pertama dan keempat tidak terlihat adanya pita DNA, karena adanya smear disepanjang jalur yang menunjukkan pita DNA terfragmentasi selama proses isolasi. Meskipun demikian, DNA tersebut tergolong masih baik untuk digunakan pada kegiatan analisis selanjutnya.

Tabel 1. Konsentrasi dan Kemurnian DNA.

| Sampel | Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) | Kemurnian | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | (A_{260}/A_{280}) | (A_{260}/A_{230}) |
| Induk <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 277.5 | 1.888 | 1.300 |
| Induk <i>Chlorella vulgaris</i> | 589.5 | 1.803 | 1.510 |
| Fusan Air Tawar | 279.5 | 1.896 | 1.632 |
| Fusan Air Laut | 35 | 1.750 | 0.795 |

Konsentrasi DNA bisa diukur dari nilai absorbansi pada 260 nm, sedangkan kemurniannya diperoleh dengan melihat rasio $A_{260}:A_{280}$ (Tabel 1). Hasil isolasi DNA genom menunjukkan bahwa masing-masing sampel telah murni dan DNA yang didapatkan mempunyai kualitas yang baik. Hasil isolasi DNA yang diperoleh tidak atau sedikit terkontaminasi dengan protein atau RNA, karena ratio $A_{260}/280$ mempunyai nilai 1,8 yang terdapat pada induk *C. vulgaris*,

C. pyrenoidosa dan fusan air tawar, walaupun adanya sedikit perbedaan nilai ratio pada fusan air laut yaitu 1,7. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8-2,0. Kontaminasi protein dan bahan organik lainnya ditandai dengan rendahnya nilai rasio A_{260}/A_{280} ($<1,8$), sebaliknya kontaminasi fenol ditandai dengan tingginya nilai rasio tersebut ($>2,0$) (Sambrook *et al.*, 1989., Linacero *et al.*, 1998). Nilai kemurnian DNA mempengaruhi keberhasilan amplifikasi, karena nilai kemurnian yang baik pada saat dilakukan visualisasi di bawah sinar UV, maka pita DNA yang terbentuk akan terlihat lebih jelas. Menurut Sambrook and Russell (2001), kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler lebih lanjut.

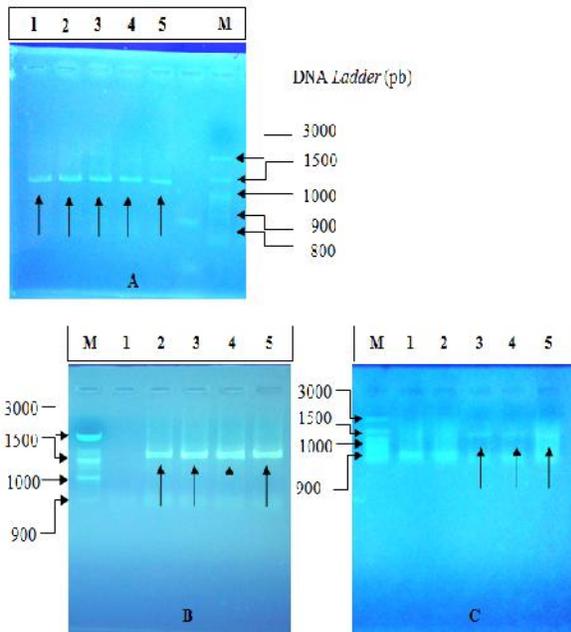
Hasil *Gradient* PCR 18SrDNA Fusan dan Induk

Hasil isolasi DNA yang telah dielektroforesis dan menghasilkan pita DNA yang berkualitas baik dilanjutkan dengan proses PCR. Optimasi PCR dilakukan menggunakan induk *C. pyrenoidosa*, induk *C. vulgaris* dan fusan air tawar. Fusan air laut tidak diikutsertakan dalam optimasi PCR, karena pada saat visualisasi hasil isolasi DNA tidak terlihat adanya pita DNA, sehingga hanya fusan air tawar yang digunakan untuk analisis selanjutnya. Optimasi kondisi PCR menggunakan mesin *gradient* PCR dengan beberapa suhu *annealing* bertujuan untuk memperoleh pita hasil amplifikasi yang baik dan spesifik.

Hasil amplifikasi dengan beberapa suhu *annealing* dapat dilihat pada Gambar 4. Suhu *annealing* yang digunakan pada mesin *gradient* PCR yaitu 55,2°C; 57,2°C; 59,9°C; 61,7°C dan 63°C untuk fusan air tawar dan induk *C. pyrenoidosa*, sedangkan *C. vulgaris* menggunakan suhu *annealing* diantaranya 55°C; 56,5°C; 59,5°C; 61,7°C dan 63°C. Suhu denaturasi yang digunakan ketiga sampel yaitu 94°C dan suhu ekstensi 72°C.

Hasil visualisasi optimasi suhu *annealing* (Gambar 4.a) menunjukkan bahwa pada suhu 59,9°C terbentuk pita DNA yang paling tebal dibandingkan dengan variasi suhu lainnya (55,2°C; 57,2°C; 61,7°C dan 63°C) dan menghasilkan 1 pita fragmen DNA dengan ukuran sekitar ± 1500 pb. Kondisi amplifikasi dengan suhu *annealing* yang

optimal untuk induk *C. pyrenoidosa* (Gambar 4.b) yaitu pada suhu 57,2°C; 59,9°C; 61,7°C dan 63°C dengan ukuran pita DNA sekitar ± 1600 pb, sedangkan suhu *annealing* optimal untuk induk *C. vulgaris* (Gambar 4.c) terdapat pada suhu 59,5°C, suhu 61,6°C dan suhu 63°C dengan masing-masing ukuran pita DNA sekitar ± 1250 pb.



Gambar 4. Hasil *gradient* PCR dengan primer 18S *Chlorella*. Fusan air tawar (A) suhu 55,2°C(1); suhu 57,2°C(2); suhu 59,9°C(3); suhu 61,7°C(4); suhu 63°C(5); marker DNA *Ladder* 100bp (M). Induk *Chlorella pyrenoidosa* (B) suhu 55,2°C(1); suhu 57,2°C(2); suhu 59,9°C(3); suhu 61,7°C(4); suhu 63°C(5). Induk *Chlorella vulgaris* (C) suhu 55°C(1); suhu 56,5°C(2); suhu 59,5°C(3); suhu 61,6°C(4); suhu 63°C(5).

Faktor yang perlu diperhatikan saat optimasi PCR selain pada suhu *annealing* adalah primer. Primer yang kurang spesifik dapat mengakibatkan kesalahan amplifikasi DNA target. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* yaitu primer 18S *Chlorella forward* 5' (CGG AGA RGG MGC MTG AGA) 3' dan primer 18S *Chlorella reverse* 5' (GGG CGG TGT GTA CAA RGR) 3'. Keberhasilan isolasi dan amplifikasi DNA dengan

PCR bergantung pada konsentrasi DNA *template* yang cukup, primer dan temperatur *annealing* (Nugroho *dkk.*, 2013).

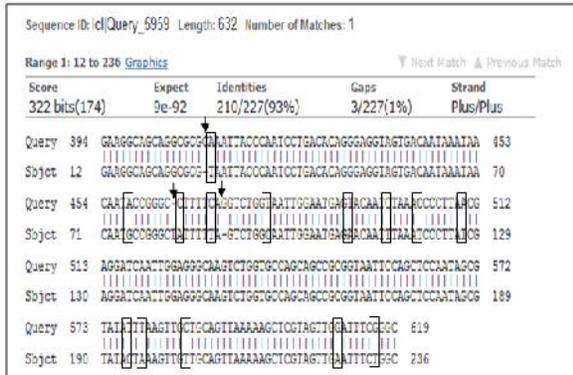
Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan *melting temperature* (Tm) primer yang digunakan. Primer 18S *Chlorella* memiliki TM 58°C. Perhitungan rumus $T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$ (Fatchiyah *et al.*, 2011). Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan (Tm-5)°C sampai dengan (Tm+5)°C. Menurut Sambrook and Russell (2001), menyatakan bahwa suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer sulit untuk menempel pada cetakan, sehingga menjadi kurang optimal, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu rendah menyebabkan primer berlekatan diberbagai tempat, sehingga hasil PCR menjadi tidak spesifik.

Hasil Karakterisasi Molekuler Fusan menggunakan 18SrDNA terhadap Kedua Induk *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris*

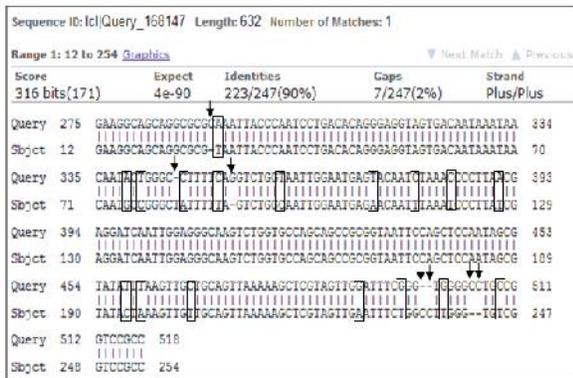
Hasil karakterisasi menggunakan hasil sekuensing basa fusan hasil fusi protoplas antara *C. pyrenoidosa* dengan *C. vulgaris*. Sekuensing DNA mikroalga dilakukan menggunakan primer *Chlorella* 18S *Forward*. Sekuensing DNA menghasilkan sekuen DNA yang berukuran sekitar 632 pb untuk fusan air tawar, sedangkan induk *C. pyrenoidosa* menghasilkan sekuen DNA berukuran 580 pb. Meskipun hasil sekuensing yang diperoleh tidak terlalu panjang dikarenakan keterbatasan oleh mesin sekuensing, namun Hillis and Davis (1988) menyatakan bahwa ukuran pendek dari ribosomal DNA sudah dapat digunakan untuk analisis homologi dan filogenetik. Pembacaan sekuensing oleh mesin yang baik berkisar antara 500 pb.

Hasil analisis homologi urutan basa hasil sekuensing fusan air tawar menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs NCBI memperlihatkan homologi sebesar 93% dari 227 basa (Gambar 5). Berdasarkan hasil tersebut kita dapat melihat perbedaan dan kesamaan urutan basa (*similarity*) fusan air tawar dengan sekuen lain pada pusat data *GeneBank*. Menurut Widayat dan Subositi (2009), BLAST adalah program yang digunakan untuk menentukan similaritas antar sekuen dan membandingkan satu *input* sekuen dengan semua

sekuen yang ditemukan dalam *database*. Hasil pensejajaran (*alignment*) antara fusan air tawar dengan induk *C. vulgaris* dari *GeneBank*, dimana terdapat persamaan 210 basa diantara 227 basa. *Gap* yang ditunjukkan dengan anak panah memperlihatkan adanya insersi basa sebanyak 2 basa pada fusan dan 1 basa pada induk (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil analisis homologi sekuen fusan air tawar dengan induk *Chlorella vulgaris* dari *GeneBank* menggunakan BLASTn.



Gambar 6. Hasil analisis homologi sekuen fusan air tawar dengan induk *Chlorella pyrenoidosa* dari *GeneBank* menggunakan BLASTn.

Gambar 6 juga memperlihatkan homologi sebesar 90% dari 247 basa dengan induk *C. pyrenoidosa*. Hasil pensejajaran antara fusan air tawar dengan induk *C. pyrenoidosa* dari *GeneBank* terdapat persamaan 223 basa diantara 247 basa. *Gap* yang ditunjukkan dengan anak panah memperlihatkan adanya insersi basa sebanyak 4 basa pada fusan dan 3 basa pada induk. *Gap*

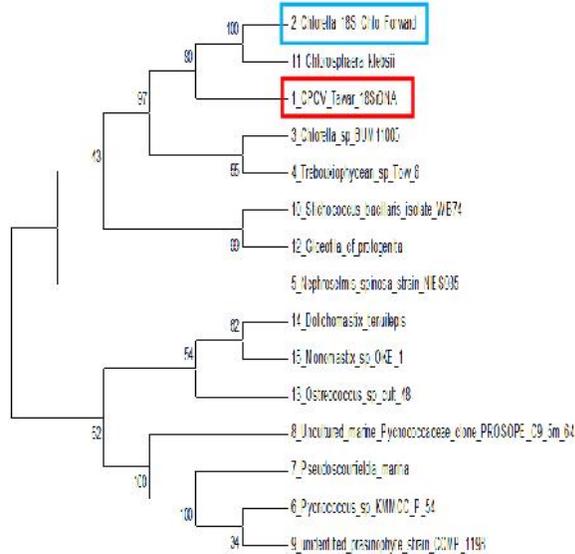
merupakan garis putus-putus (--) yang berada diantara urutan basa. Berdasarkan hasil pensejajaran diketahui bahwa fusan air tawar memiliki kemiripan dengan induk *C. vulgaris* dikarenakan homologi basa fusan dengan induk *C. vulgaris* lebih tinggi yaitu 93%, sedangkan homologi basa fusan dengan induk *C. pyrenoidosa* sebesar 90%.

Hasil yang diperoleh ditemukan adanya substitusi basa antara fusan air tawar dengan kedua induk dari *GeneBank*. Substitusi basa pada fusan dengan induk *C. vulgaris* sebesar 14 basa. Bila A C, A T, C A, C G, T A, T C, G C dan G T, maka proses perubahan basa ini disebut transversi karena purin berubah menjadi pirimidin, sedangkan apabila A G, G A, C T, T C, maka disebut dengan transisi karena purin berubah menjadi purin. Hasil perhitungan substitusi basa menunjukkan bahwa fusan air tawar dengan induk *C. pyrenoidosa* dari *GeneBank* sebanyak 17 basa, terdiri dari 7 tranversi dan 10 transisi. Selain itu, substitusi basa pada fusan air tawar dengan induk *C. vulgaris* dari *GeneBank* terdapat 14 substitusi basa yang terdiri dari 7 tranversi dan 7 transisi. Perhitungan besarnya substitusi basa dilakukan untuk mengetahui kurun waktu terjadinya keragaman genetik yang berkaitan dengan perubahan basa yang terjadi.

Hasil Identifikasi Molekuler Fusan menggunakan 18SrDNA

Hasil identifikasi molekuler fusan dengan anggota Chlorophyta memperlihatkan bahwa fusan air tawar masuk kedalam satu kelompok dengan genus *Chlorella* yang ditunjukkan oleh pohon filogenetik hasil konstruksi dengan metode *neighbor-joining tree* (Gambar 7). Angka bootstrap 100 memperlihatkan bahwa pembentukan pohon evolusi yang diulang selama 100 kali menunjukkan bahwa semua ulangan tersebut memperlihatkan pohon yang sama dengan derajat kepercayaan 100%. Pohon filogenetik yang diperoleh merupakan hasil identifikasi molekuler antara fusan air tawar dengan *C. pyrenoidosa* dan spesies mikroalga fotosintetik lainnya. Pohon filogenetik yang dihasilkan merupakan hasil pemilihan diantara beberapa metode yang diperkirakan paling mewakili

hubungan antara fusan dengan mikroalga lainnya. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan program MEGA 5.2 dan dikonstruksi menggunakan *Neighbor-joining tree*. *Neighbor-joining tree* dianggap mewakili hasil penelitian, karena akan memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen.



Gambar 7. Pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antara fusan air tawar (CPCV T 18SrDNA), induk *Chlorella pyrenoidosa* 18S *Chlorella* dan sekuen lain dari *GeneBank* menggunakan model *Neighbor-Joining*.

Berdasarkan gambar di atas memperlihatkan bahwa fusan air tawar memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan induk *C. pyrenoidosa* 18S *Chlorella* dan *Chlorosphaera klebsii*. Kemiripan antara fusan air tawar dengan *Chlorosphaera klebsii* sebesar 91%. Hubungan kekerabatan antara fusan air tawar dengan spesies lain sebagai pembandingan dikarenakan masih berada dalam satu divisi yang sama yaitu kelompok Chlorophyta. Selain itu, kemiripan fusan air tawar dengan induk *C. pyrenoidosa* 18S *Chlorella* diduga, karena memiliki sifat yang sama berdasarkan habitatnya seperti fusan air tawar dan induk *C. pyrenoidosa* yang dapat hidup pada media air tawar.

Pohon filogenetik yang diperoleh menggambarkan perubahan yang terjadi pada gen penanda tiap spesies. Semakin panjang suatu cabang, semakin banyak perubahan yang terjadi pada gen penanda, akibatnya spesies yang berada pada cabang tersebut dapat dikatakan lebih maju. Panjang masing-masing cabang mewakili jumlah perubahan yang terjadi pada karakter yang digunakan, sehingga karakter yang sangat mirip akan berdekatan dalam percabangan. Pohon filogenetik memberikan informasi tentang pengklasifikasian populasi berdasarkan hubungan evolusionernya, karena pada rekonstruksi pohon filogenetik, data molekul lebih banyak dipakai dan dianggap lebih stabil dalam proses evolusi dibandingkan dengan data morfologi.

KESIMPULAN

Karakterisasi molekuler fusan hasil fusi protoplas secara interspesies *C. pyrenoidosa* dan *C. vulgaris* menggunakan 18SrDNA memperlihatkan homologi urutan basa antara fusan air tawar dengan induk *C. pyrenoidosa* sebesar 90% dan induk *C. vulgaris* sebesar 93%. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa fusan air tawar berkerabat dengan induk *C. pyrenoidosa* dan mikroalga *Chlorosphaera klebsii* dengan kemiripan sebesar 91%.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1995. Official Method of Analysis. AOAC, Inc, Washington DC.
- Asni. 2000. Pengaruh Penambahan Serbuk *Chlorella pyrenoidosa* Strain Lokal (INK) terhadap Mutu Organoleptik dan Kimia Minuman Teh. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., dan Rahayu, S. 2011. Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis. Erlangga. Jakarta.
- Gerken, H.G., B. Donohoe and E.P. Knoshaug. 2012. Enzymatic Cell Wall Degradation of *Chlorella vulgaris* and Other Microalgae for Biofuels Production. *J. Planta* 237:239-253.
- Goodwin, T.W. 1984. Biochemistry of Carotenoids, Vol. 2, 2nded. Chapman and Hall. London.

- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., and Empis, J. 1996. Evolution of Pigment Composition in *Chlorella vulgaris*. *J. Biores. Technol* 57:157-163.
- Hejazi, M.A., C. de Lamariere, J.M.S. Rocha, M. Vermue and J. Tramper. 2002. Selective Extraction of Carotenoids from Microalga *Dunaliella salina* with Retention of Viability. *J. Biotechnol and Engineer* 79(1):29-36.
- Hillis, D.M., and S.K. Davis. 1988. Ribosomal DNA: Intraspecific Polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool* 37:63-66.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton. Kanisius. Yogyakarta.
- Kim, G.H., T.A. Klotchkova and Y. Kang. 2009. Life Without a Cell Membrane: Regeneration of Protoplasts from Disintegrated Cells of the Marine Green Alga *Bryopsis plumosa*. *J. of Cell Sci* 114.
- Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2013. Application of rich carotenoid natural food supplement from recombinant interspecies protoplast fusion on *Penaeus monodon* fab. post-larvae. Indonesian Journal of Marine Sciences. ISSN 0853-7291. 18(3):143-149
- Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2014. Optimization and Stability of Total Pigments Production of Fusan from Protoplast Fusion of Microalgae *Dunaliella* and *Chlorella in vivo*: Attempts on Production of Sustainable Aquaculture Natural Food. Int. J. of Marine and Aquatic Resource Conservation and Co-existence (IJMARCC Vol 1(1):1-5, October 2014, ISSN : 2406-9094
- Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2015a. Detection of Bacteria and Fungi Associated with *Penaeus monodon* Postlarvae Mortality. *International Journal Procedia Environmental Sciences*. 23: 329–337.
- Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2015b. Molecular Characterization of *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* Fusant using 18SrDNA Gene. *Journal Teknologi (Science and Engineering)* 75:1 (2015) 1–6 | www.jurnalteknologi.utm.my | eISSN 2180–3722 |
- Kusumaningrum, H. P. dan Zainuri. M. 2015c. Karakterisasi Dominan Fusan dari Mikroalga *Dunaliella salina* dan *Chlorella vulgaris* menggunakan primer 18SrRNA untuk mengembangkan Produksi Karotenoid. Seminar Nasional Biologi. Universitas Diponegoro. Agustus
- Linacero, R., J. Rueda and A.M. Vazquez. 1998. Quantification of DNA. Pages 18-21 in Karp, A., P.G. Isaac, and D.S. Ingram (Eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman and Hall. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Mariska, I. dan A. Husni. 2002. Perbaikan Sifat Genotipe melalui Fusi Protoplas pada Tanaman Lada, Nilam dan Terung. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
- Maruyama, I., et al. 1997. Application of Unicellular Algae *Chlorella vulgaris* for the Mass-Culture of Marine Rotifer *Brachionus*. *J. Hydrobiol* 358:133-138.
- Nugroho, T.T., Rambe, E., Dewi, A., Fitri, R.M., Sepryani, H., Restuhadi, F., dan Haryani, Y. 2013. Optimasi Isolasi dan Amplifikasi ITS DNA Ribosomal Fungi Karbolitik Isolat Zona Inti Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu. *Prosiding Semirata FMIPA Unila* 407-412.
- Panaiotov, S., Evstatieva, Y., Ilieva, S., Levtorova, V., Brankova, N., Nikolova, D., Ivanova, A., Stefanova, V., Tankova, K., and Atev, A. 2009. Quantitative Assessment of the Dominant Genome in Fusant Cultures. *J. Biotechnol. & Biotechnol EQ* 23.
- Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of Total Cellular DNA from Plant, Algae and Fungi. *Molecular Biology Manual*.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold spring Harbor, New York.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Suryowinoto, M. 2000. Pemuliaan Tanaman secara In Vitro. Kanisius, Yogyakarta.

Widayat, T. dan Subositi, D. 2009. Kekeabatan Filogenetik Buah Makasar (*Brucea javanica*) Berdasarkan Gen Ribulosa-1,5-bifosfat Karboksilase/Oksigenase. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan

Litbangkas, Departemen Kesehatan. Jawa Tengah.

Yunanto, Y., Kusumaningrum, H.P., dan Pujiyanto, S. 2013. Fusi Protoplas Interspesies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Dunaliella salina*. *J. Sains dan Matematika* 21(1):25-30.