

## Identifikasi Spesies Mikroalga dari BBPBAP Jepara secara Morfologi dan Molekuler menggunakan 18S rDNA

Elke Gildantia<sup>1</sup>, Rejeki Siti Ferniah<sup>2</sup>, Anto Budiharjo<sup>2</sup>, Agung Suprihadi<sup>1</sup>,  
Muhammad Zainuri<sup>3</sup>, Hermin Pancasakti Kusumaningrum<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Program Studi Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

<sup>3</sup>Departemen Oseanografi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

Email: herminpk@live.undip.ac.id

### Abstrak

Mikroalga merupakan organisme eukariot bersel satu yang habitatnya berada di perairan. Suatu spesies mikroalga koleksi kultur BBPBAP Jepara berpotensi menghasilkan astaxantin dalam jumlah tinggi. Namun, spesies ini belum di karakterisasi secara molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh karakter morfologi dan molekuler pada isolat mikroalga dari BBPBAP Jepara menggunakan 18S rDNA guna memastikan spesies untuk pengembangan potensinya. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi kultivasi mikroalga, pengamatan pola pertumbuhan, pengamatan morfologi, isolasi DNA, amplifikasi menggunakan marka 18S rDNA, elektroforesis, analisis data sekuens, dan filogenetik menggunakan aplikasi NJ Plot dan MEGA 7. Hasil karakterisasi secara morfologi sel isolat mikroalga BBPBAP Jepara memperlihatkan bentuk bulat, berwarna hijau dengan ukuran 4,5 µm, tidak memiliki flagela, dan motilitas yang pasif. Hasil karakterisasi molekuler menggunakan 18S rDNA dari isolat mikroalga BBPBAP memperlihatkan kemiripan tertinggi dengan *Chlorella sorokiniana* sebesar 99%.

**Kata kunci :** Mikroalga, 18S rDNA, Karakterisasi, *Chlorella sorokiniana*

### Abstract

#### *Morphological and Molecular Characterization of Microalgae Species from BBPBAP Jepara using 18S rDNA*

*Microalgae are single-celled eukaryotic organisms whose habitat is in the waters. A species of microalgae from the Jepara BBPBAP culture collection was potential to produce high amounts of astaxantin. However, this species has not been detected molecularly previously. This study aimed to obtain the morphological and molecular characters of microalgae isolates from BBPBAP Jepara using 18S rDNA to ascertain the species and its potential development. The stages of the research carried out include; microalgae cultivation, growth pattern observation, morphological observation, DNA isolation, amplification using 18S rDNA markers, electrophoresis, sequence data analysis, and phylogenetic using NJ Plot and MEGA applications 7. Results of morphological characterization of the Jepara BBPBAP showed that cell of microalgae isolates had a round shape, green color with a size of 4.5µm, has no flagella and passive motility. The results of the molecular characterization using 18S rDNA showed that isolate BBPBAP had highest similarity with *Chlorella sorokiniana* about 99%.*

**Keywords :** Microalgae, 18S rDNA, Characterization, *Chlorella sorokiniana*

### PENDAHULUAN

Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara adalah Unit Pelaksana Teknis

(UPT) Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Kementerian Kelautan dan Perikanan mengawali aktivitasnya pada tahun 1971. Meningkatnya peran

dan fungsi dalam pelaksanaan tugas serta beban kerja, maka berdasarkan SK Menteri Kelautan dan Perikanan No. 26C/MEN/2001 menetapkan lembaga ini menjadi Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Pada tahun 2014 berdasarkan SK Menteri Kelautan dan Perikanan No. 6/PERMEN-KP/2014 telah dilaksanakan perubahan nama menjadi Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. BBPBAP Jepara merupakan salah satu laboratorium penyedia bibit mikroalga.

Mikroalga merupakan organisma eukariot bersel satu yang habitatnya berada di perairan dengan ukuran 3-30  $\mu\text{m}$ . Mikroalga berklorofil dapat ditemukan di air tawar maupun air laut. Mikroalga membutuhkan karbon dioksida, nutrisi, dan cahaya untuk melakukan fotosintesis. Mikroalga memiliki sifat yang hampir sama dengan tumbuhan multiseluler, tetapi ia tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati untuk fotosintesis (Hadiyanto *et al.*, 2012). Mikroalga yang sudah dapat dikenali terbagi dalam empat kelompok, yaitu alga hijau (Chlorophyceae), alga emas (Chrysophyceae), alga biru (Cyanophyceae), dan diatom (Bacillariophyceae). Sebagian besar mikroalga dapat menghasilkan produk-produk berupa karotenoid, polimer, asam peptida, asam lemak, antioksidan, enzim, terpenoid, sterol, flavonoid, dan racun (Oktora *et al.*, 2016).

Astaxantin merupakan jenis karotenoid polar yang berfungsi sebagai pelindung dari sinar UV, pelindung dari oksidasi asam lemak esensial tubuh, dan pigmentasi (Pratiwi dan Limantara, 2008). Astaxantin dapat didapatkan dengan teknik bioteknologi oleh beberapa mikroalga dan yang terbaik dalam menghasilkan astaxantin adalah *Haematococcus pluvialis* yang mampu mengakumulasi sebagai respon stres terhadap lingkungan (Wang *et al.*, 2003).

Kultur mikroalga dalam mengembangkan banyaknya jumlah sel mikroalga sesuai dengan kebutuhan harus diperhatikan dengan sangat teliti. Terdapat beberapa faktor yang berpengaruh yaitu pH, suhu, jenis nutrisi yang diberikan, aerasi, dan cahaya. Selain itu, dalam kultur mikroalga terdapat beberapa tipe pengkulturan, seperti : *indoor*, *outdoor*, tertutup, terbuka, dan *batch*. Kultur mikroalga menggunakan sistem terbuka dan *outdoor* memiliki tingkat kontaminasi yang cukup tinggi. Umumnya sistem ini digunakan dalam kultur berskala besar (Noerdjito, 2019).

Karakterisasi pada mikroalga dilakukan guna mengetahui jenis mikroalga dan merupakan

langkah dasar yang dilakukan dalam mengkarakterisasi dan mengidentifikasi mikroalga. Unit karakter yang digunakan dalam mengkarakter dan mengidentifikasi mikroalga secara morfologi yaitu bentuk sel, ukuran sel, dan struktur khusus. Selain itu, karakterisasi secara molekuler perlu dilakukan untuk memperoleh hasil yang lebih akurat. Karakterisasi molekuler dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang cepat dengan hasil yang tepat, spesifik, dan akurat (Yusuf, 2010). Keberhasilan dari teknik PCR sangat bergantung dengan primer yang digunakan untuk mengidentifikasi sampel DNA.

Metode isolasi DNA isolat mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide* (CTAB). Metode CTAB banyak digunakan oleh peneliti untuk isolasi mikroalga (Kusumaningrum, 2009). Metode ini memiliki tingkat keberhasilan dan keakuratan hasil yang tinggi, karena mampu memisahkan senyawa polifenol dan polisakarida yang ada di DNA sampel mikroalga. Gen 18S rDNA adalah komponen subunit kecil ribosomal sel eukariotik yang menjadi salah satu komponen dasar seluruh sel eukariotik. Gen ini dipilih dalam amplifikasi dengan PCR karena memiliki peran sebagai penanda yang sangat dibutuhkan untuk menentukan filogeni suatu spesies dalam sebuah biodiversitas (Meyer *et al.*, 2010).

Karakterisasi morfologi secara umum memungkinkan terjadinya identifikasi spesies yang sama ketika ditemukan kesamaan fenotip antar spesies meskipun belum pasti keduanya memiliki kesamaan secara genetik. Permasalahan ini dapat diatasi dengan melakukan karakterisasi secara lanjut menggunakan karakter molekuler. Karakterisasi isolat mikroalga secara morfologi dan molekuler diperlukan untuk mengetahui spesies mikroalga yang didapatkan dari BBPBAP Jepara dengan melihat posisi mikroalga tersebut berdasarkan filogenetik. Penggunaan fragmen 18S rDNA dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan pada isolat mikroalga yang didapatkan dari BBPBAP dengan spesies lainnya yang berkerabat dekat. Penelitian akan berfokus pada karakterisasi isolat mikroalga secara morfologi dan molekuler menggunakan 18S rDNA beserta analisis filogenetiknya.

## MATERI DAN METODE

Jenis mikroalga yang digunakan dalam penelitian yaitu isolat dari BBPBAP Jepara.

Selanjutnya penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Laboratorium Bakteriologi UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, dan Laboratorium Biologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro, Semarang.

### Kultivasi Mikroalga

Isolat mikroalga dari Balai Besar Budidaya Perikanan Air Payau (BBBPAP) Jepara dikultivasi dengan mengkultur 100 ml isolat dalam 900 ml air tawar steril dan pemberian pupuk Walne sebanyak 1 ml. Kultur mikroalga dilakukan pada suhu berkisar 21°C, suplai cahaya menggunakan lampu TL 40 watt, dan diberi aerasi. Pengamatan kepadatan populasi dilakukan setiap hari selama 11 hari dengan cara mengambil 1 ml sampel yang diteteskan pada *grid counting hemocytometer* dan ditutup dengan cover glass serta diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Kepadatan mikroalga diketahui dengan cara menghitung mikroalga yang terdapat pada kotak yang dipilih secara terstruktur.

### Pengamatan Morfologi Mikroalga

Pengamatan morfologi sampel mikroalga menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX40) dengan menggunakan perbesaran 1000x dan minyak imersi. Selain itu juga menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan *micrometer*, agar lebih jelas hasil morfologi dari isolat mikroalga. Kegunaan dari minyak imersi adalah membantu memperjelas bentuk sel pada saat menggunakan perbesaran 1000x. Karakter yang digunakan sebagai pembanding antara lain : warna sel, bentuk sel, ukuran sel, ada tidaknya flagel, motilitas, dan letak pirenoid. Hasil pengamatan yang didapatkan didokumentasikan dan dilakukan karakterisasi berdasarkan atas Shihira & Krauss (1965) dan website *algabase*.

### Isolasi DNA Mikroalga

Persiapan dalam melakukan penelitian yaitu perlu dilakukannya sterilisasi alat serta bahan yang akan digunakan. Seluruh alat gelas yang akan digunakan termasuk *microtube* dan tip berbagai ukuran dibungkus plastik tahan panas kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit (Istini, 2020). Selain itu meja kerja disterilkan menggunakan alkohol 70% untuk mengurangi kontaminasi. Mikroalga dari BBBPAP dibiarkan selama dua hari dalam wadah untuk proses

pengendapan. Kemudian sampel disentrifugasi pada kecepatan 8.500 rpm selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan secara berulang untuk mendapatkan sel mikroalga sebanyak kurang lebih 40 mL. Isolasi DNA mikroalga menggunakan metode CTAB (Doyle and Doyle, 1987). Hal ini dilakukan dengan menyiapkan *buffer* CTAB yang diinkubasi terlebih dahulu pada suhu 65°C. Sampel mikroalga diambil sebanyak 40 mL dengan mikropipet lalu di bagi dan dimasukkan ke masing-masing *microtube* berkapasitas 1,5 mL dan ditambahkan 500 µL *buffer* CTAB. Sampel disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 8.000 rpm, setelah itu sampel dipindahkan pada mortar dingin untuk dihaluskan menggunakan pestel. Setelah itu ditambahkan 1.000 µL *buffer* CTAB dan haluskan kembali hingga menjadi bubur yang halus. Sampel yang sudah menjadi bubur halus tersebut dipindahkan ke *microtube* baru dan diinkubasi dalam waterbath dengan suhu 65°C selama 30 menit atau sampai fase padat terpisah dari fase cairnya. Namun, yang perlu diperhatikan pada saat sampel diinkubasi, sampel haruslah dibolak-balik setiap 10 menit sekali. Setelah 30 menit diinkubasi maka *microtube* diangkat dari *waterbath* dan dibiarkan hingga suhu sampel menurun. Setelah suhu menurun, sampel ditambahkan larutan CIA 24 :1 sebanyak 500 µL dan divortex selama kurang lebih 1 menit, lalu dilanjutkan sentrifugasi kembali pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapatkan dipindahkan ke dalam *microtube* baru dan ditambahkan pula 800 µL larutan CIA 24:1, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Langkah ini dapat diulangi sebanyak 2 sampai 3 kali sampai tidak ada lapisan putih yang terbentuk di antara supernatan dengan CIA. Setelah pasti tidak ada lapisan putih, maka supernatan dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan isopropanol dingin sesuai dengan volume supernatan awal. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *vortex* selama kurang lebih 1 menit, lalu sampel dapat disimpan pada suhu -20°C.

Tahapan isolasi selanjutnya dimulai dengan melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 5 menit, dari hasil sentrifugasi ini akan didapatkan supernatan dan natan. Fase cair atau supernatan di buang hingga tersisa pelet mongering (pelet yang melekat pada dasar tabung). Selanjutnya pelet dilarutkan dengan menambahkan 100 µL *buffer* TE dan larutan DNA yang didapatkan ditambahkan etanol 96% atau etanol

absolut sebanyak 500  $\mu\text{L}$ , dilarutkan dengan cara membolak-balikkan *microtube* tersebut secara perlahan. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama kurang lebih 30 menit. Selanjutnya sampel yang berada dalam *microtube* tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 5 menit. Fase cair yang terbentuk dihilangkan dengan cara meletakkan *microtube* secara terbalik diatas tisu sampai pelet DNA pada dasar *microtube* mengering. Pelet DNA dicuci dengan etanol 70% dengan cara menambahkan 500  $\mu\text{L}$  etanol ke dalam *microtube* lalu ditumpahkan dengan hati-hati di atas tisu hingga pelet DNA mengering dan dikeringanginkan selama kurang lebih 5 hingga 10 menit. Perlakuan berikutnya DNA dilarutkan menggunakan 50  $\mu\text{L}$  *buffer* TE pH 8.0 dan dapat disimpan dalam *freezer* pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Uji Kuantitatif Kualitatif DNA dengan NanoDrop 2000

Perhitungan tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA menggunakan *Thermo Scientific™ NanoDrop 2000* dilakukan dengan cara mengaktifkan komputer yang terhubung dengan software NanoDrop 2000, bagian pedestal dibersihkan atau dikalibrasi menggunakan *buffer* TE sebanyak 1  $\mu\text{L}$ , selanjutnya pada *software* pilih set “blank” ditunggu hingga nilai menjadi 0,000 pada semua peubah lalu pedestal dibersihkan dari *buffer* TE yang tersisa. Kemudian pada *software* di pilih menu Nucleic Acid, 1  $\mu\text{L}$  DNA sampel diletakkan pada pedestal kemudian pilih “Measure” untuk melihat hasil konsentrasi dan kemurnian DNA. Menurut pernyataan dari Sambrook *et al.* (1989) bahwa kemurnian DNA dengan nilai tinggi dapat dilakukan identifikasi melalui rasio  $\lambda_{A_{260}} / A_{280}$  dengan hasil yang diharapkan berkisar antara 1,8 - 2,0 dengan konsentrasi DNA cetakan yang dibutuhkan untuk kegiatan PCR berkisar antara 10 - 100 ng/  $\mu\text{L}$ .

#### Amplifikasi 18S rDNA

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer *forward* 18S rDNA (5'-GTAGTCTATG CTTGTCT-3') dan *reverse* 18S rDNA (5'-GCTGGCACCASACTTGCCCT-3') (Kusumaningrum & Zainuri, 2016; Susanto *et al.*, 2018). Reaksi PCR dibuat dengan menambahkan 25  $\mu\text{L}$  My Taq, 3  $\mu\text{L}$  primer *forward* 10 pmol 18S rDNA, 3  $\mu\text{L}$  primer *reverse* 10 pmol 18S rDNA, 6  $\mu\text{L}$  DNA cetakan 50-100 ng dan ddH<sub>2</sub>O sampai volume total 50  $\mu\text{L}$ . Semua bahan dicampur dan

dimasukkan ke dalam mesin *gradient* PCR untuk mendapat optimasi suhu *annealing*. Tahapan reaksi pada PCR menurut Handra *et al.* (2012) terdiri atas denaturasi awal (*pre*denaturasi) pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit. Selanjutnya adalah denaturasi dengan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, *annealing* pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, serta pemanjangan (*extension*) dengan suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 50 detik, proses ini dilakukan sebanyak 35 siklus. Diakhiri dengan pemanjangan akhir (*post extension*) menggunakan suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit. Setelah selesai proses PCR, maka sampel hasil amplifikasi dapat disimpan dalam lemari pendingin.

#### Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi

Sampel hasil amplifikasi dianalisis menggunakan gel agarosa dengan metoda elektroforesis. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan bubuk agarosa sebanyak 1,2 g pada 100 ml TAE serta menambahkan 1  $\mu\text{L}$  *florosave*. Sampel DNA hasil amplifikasi dimasukkan pada sumuran agarosa sebanyak 2  $\mu\text{L}$ , *marker* yang digunakan yaitu DNA ladder 1 Kb sebanyak 3  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan *Loading Dye* sebagai pemberat sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . *Marker* ditambahkan ke dalam sumuran gel agarosa pada bagian sumuran paling ujung. Larutan TAE ditambahkan ke dalam tangki sampai seluruh gel terendam. Alat elektroforator dinyalakan dengan voltase 100 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis dilihat di bawah sinar UV menggunakan UV *transilluminator* dan pita-pita DNA yang tervisualisasi dapat diamati dan didokumentasikan.

#### Sekuensing dan Analisis Filogenetik 18S rDNA

Hasil sekuensing dianalisis homologi urutan basanya dengan memanfaatkan informasi sekuen DNA yang tersedia di dalam pusat data *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan pembuatan pohon filogeni menggunakan analisis dari aplikasi Clustal X, Neighbor Joining (NJ-Plot), dan *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 7).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakterisasi Morfologi Mikroalga

Pengamatan morfologi isolat mikroalga dari BBPBAP Jepara yang dilakukan menggunakan fotomikrograf dan dapat dikarakterisasi seperti pada Gambar 1. Isolat BBPBAP Jepara memiliki dinding sel berwarna bening dan sangat jelas yang dapat dilihat pada

Gambar 1a. Dinding sel pada mikroalga terdapat warna bening yang disebut *mucilage*. Lapisan ini berlendir dan lengket apabila terkena tangan. Warna hijau yang dihasilkan dari kloroplas yang mengandung pigmen klorofil. Menurut Shihira dan Krauss (1965), sel *C. sorokiniana* pada Gambar 1b. berbentuk bulat atau elipsoidal yang memiliki ukuran 4,5 - 5,5  $\mu\text{M}$  dan memiliki pirenoid di bagian tepi. Apabila ditumbuhkan dalam media yang mengandung gula tinggi, sel akan berbentuk seperti mangkuk berwarna hijau dengan bagian tepi yang mengelilinginya berwarna putih. Mikroalga *C. sorokiniana* tumbuh di habitat air tawar ataupun air laut. Berdasarkan hasil karakterisasi pada Tabel 1. dapat dilihat bahwa isolat 46 BBPBAP Jepara memiliki kemiripan dengan *C. sorokiniana* sebesar 5 karakter yaitu warna, bentuk, ukuran sel, flagel, dan motilitas sel. Berdasarkan karakterisasi tersebut Isolat 46 BBPBAP Jepara merupakan mikroalga *C. sorokiniana* karena memiliki kemiripan sebesar 5/6 karakter.

#### Kurva Pertumbuhan

Hasil kultivasi isolat mikroalga selama 11 hari membentuk kurva seperti pada Gambar 2. Berdasarkan hasil tersebut, fase *Lag* terjadi pada awal kultur (H0) hingga H2 dengan warna kultur bening dan ditunjukkan dengan jumlah sel yang sedikit meningkat. Fase *Log* terjadi pada H3 hingga H7 yang ditandai dengan perubahan warna kultur dari bening menjadi berwarna hijau muda, selanjutnya puncak kepadatan sel tertinggi terjadi pada H9. Perubahan warna tersebut dapat terjadi akibat pembelahan sel yang cepat sehingga mengakibatkan penambahan jumlah sel. Kurva ini juga menunjukkan adanya fase *stasioner* pada H8 hingga H10, sedangkan fase kematian sel terjadi pada H11 yang ditandai dengan menurunnya jumlah sel secara drastis. Fase *stasioner* terjadi karena adanya kompetisi nutrisi yang

mengakibatkan jumlah sel tidak mengalami perubahan secara signifikan. Kompetisi nutrisi sel mikroalga yang terjadi secara terus menerus mengakibatkan laju pertumbuhan mengalami penurunan hingga banyak sel yang tidak mampu untuk bertahan hidup sehingga mengalami kematian. Menurut penelitian yang dijalankan Satriaji *et al.* (2016), bahwa puncak kepadatan sel pada *C. vulgaris* sebesar  $17,29 \times 10^6$  sel/mL.

#### Hasil Isolasi DNA dan Uji Kuantitatif Kualitatif

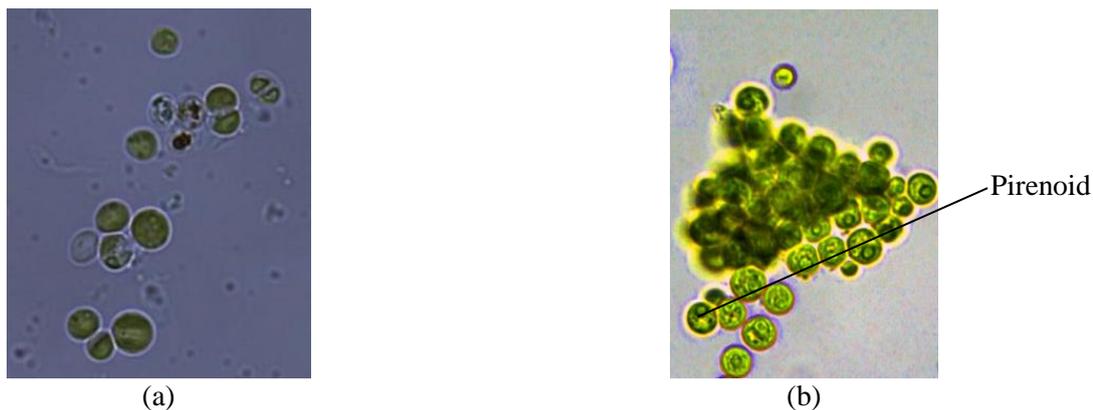
Berdasarkan hasil uji kualitatif dan kuantitatif isolasi DNA pada Tabel 2. memperoleh nilai kemurnian dan konsentrasi yang baik pada hasil isolasi. Apabila suatu sampel memiliki nilai kemurnian di bawah 1,8 dan di atas 2 sudah dapat dipastikan sampel tersebut mengalami kontaminasi baik dari fenol, protein, RNA, dan senyawa lainnya. Hal ini didukung oleh hasil penelitian dari Rismiarti *et al.* (2016) kemurnian yang didapatkan dalam mengisolasi DNA *C. pyrenoidosa* yaitu sebesar 1,88 dengan konsentrasi sebesar 277,5 ng/ $\mu\text{L}$  sedangkan kemurnian pada *C. vulgaris* yaitu 1,803 dengan konsentrasi 589,5 ng/ $\mu\text{L}$ . Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian dari Fawley dan Fawley (2004) bahwa penggunaan metode CTAB untuk isolasi DNA hanya membutuhkan 1,5 - 2 mL kultur alga, menghasilkan garis keturunan yang jelas, beberapa sampel dapat dikerjakan secara bersamaan, dan hanya membutuhkan waktu 20 menit untuk menyelesaikannya.

#### Hasil Amplifikasi dan Uji Kualitatif DNA

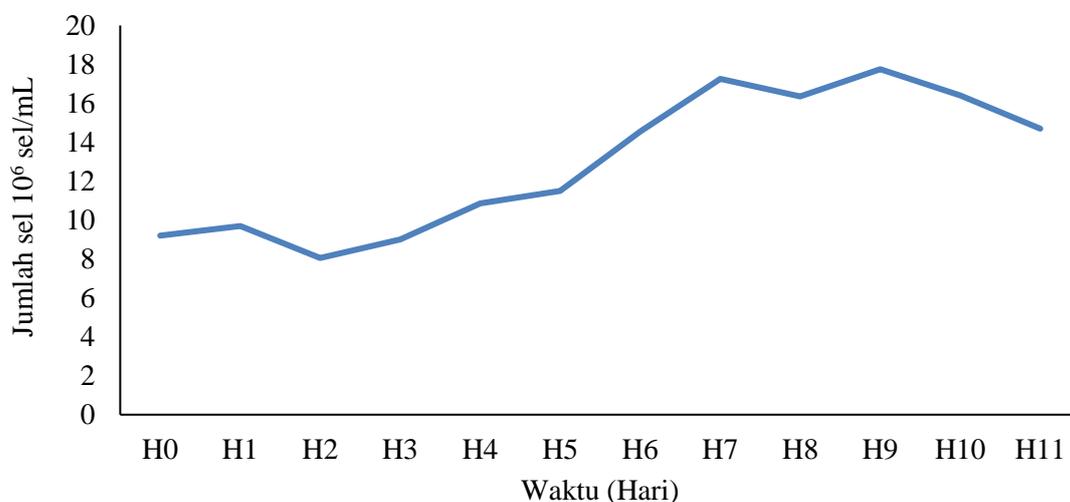
Secara umum, daerah 18S rDNA digunakan untuk organisme eukariot dan memiliki ukuran DNA sekitar 1800 pb. Daerah 18S rDNA banyak digunakan sebagai penanda DNA untuk analisis filogenetik mikroalga eukariot. Hasil yang nampak berupa pita (*band*) yang tebal dan tipis. Hasil visualisasi produk PCR pada Gambar 3.

**Tabel 1.** Perbandingan karakter isolat BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana* (Shihira & Krauss, 1965)

| Karakter   | Isolat 46 BBPBAP Jepara  | <i>C. sorokiniana</i><br>(Shihira & Krauss, 1965) |
|------------|--------------------------|---|
| Warna sel  | Hijau                    | Hijau   |
| Bentuk sel | Bulat                    | Bulat / elips                                     |
| Ukuran sel | 4,5 $\mu\text{M}$        | 4,5 - 5,5 $\mu\text{M}$                           |
| Flagel     | Tidak ada                | Tidak ada   |
| Motilitas  | Pasif                    | Pasif   |
| Pirenoid   | Tidak nampak pada gambar | Tepi  |



**Gambar 1.** Sel isolat BBPBAP Jebara di bawah fotomikrograf (a) dan *Chlorella sorokiniana* (Shihira & Krauss, 1965) (b).



**Gambar 2.** Kepadatan Kultivasi isolat BBPBAP Jebara yang dihitung setiap hari selama 11 hari.

**Tabel 2.** Hasil Uji Kuantitatif Kualitatif DNA isolat mikroalga BBPBAP Jebara

| Sampel ID | Konsentrasi asam nukleat | Unit        | $\lambda_{260/280}$ |
|-----------|--------------------------|-------------|---------------------|
| 4         | 460.0                    | ng/ $\mu$ L | 1.99                |

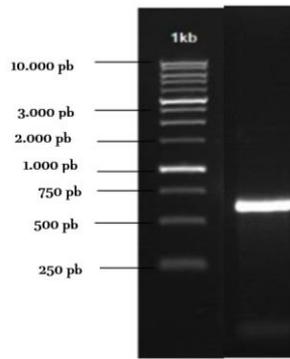
menunjukkan ukuran DNA yang dapat teramplifikasi  $\pm 539$  pb yang terlihat di gel agarosa yang sudah di elektroforesis. Hal ini dapat terjadi karena primer hanya mengamplifikasi daerah 18S rDNA isolat mikroalga BBPBAP Jebara sekitar 539 pb.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terdapat 60 dari 100 sekuen 18S rDNA *C. sorokiniana partial gene* yang terdaftar pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang menunjukkan bahwa peneliti tersebut memperoleh ukuran panjang sekuen sekitar 600 - 700 pb. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Lopez *et al.* (2017) mengenai isolasi DNA *C. sorokiniana*

menggunakan metode CTAB dan didapatkan hasil amplifikasi sebesar 453 - 463 pb. Hasil ini juga didukung oleh Bérard *et al.* (2005), bahwa hasil amplifikasi DNA mikroalga menggunakan primer 18S rDNA didapatkan panjang untai DNA sebesar 400 pb.

**Hasil Sekuensing dan Analisis Filogenetik**

Berdasarkan hasil sekuensing yang didapatkan, isolat 46 BBPBAP Jebara memiliki kemiripan tinggi dengan *C. sorokiniana strain* KT388090.1 dengan presentase homologi sebesar 99% yang artinya sekuen hasil amplifikasi memiliki kesamaan basa



**Gambar 3.** Visualisasi DNA Hasil PCR pada Gel agarosa

*Chlorella sorokiniana* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: [KT388090.1](#) Length: 1804 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 566 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

| Score                     | Expect   | Identities    | Gaps       | Strand    |
|---------------------------|--|---------------|------------|-----------|
| 983 bits (532)            | 0.0  | 537/539 (99%) | 1/539 (0%) | Plus/Plus |
| isolat46BBPBAP 1          | CATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATTAAACTGCTTTATACTGT | 60            |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 29  | CATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTA-TAAACTGCTTTATACTGT | 87            |            |           |
| isolat46BBPBAP 61         | GAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGA  | 120           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 88  | GAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGA  | 147           |            |           |
| isolat46BBPBAP 121        | TACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTAT | 180           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 148 | TACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTAT | 207           |            |           |
| isolat46BBPBAP 181        | TTATTAGATAAAAAGCCGACCGGGCTCTGCCGACTCGCGTGAAATCATGATAACTTCAC  | 240           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 208 | TTATTAGATAAAAAGCCGACCGGGCTCTGCCGACTCGCGTGAAATCATGATAACTTCAC  | 267           |            |           |
| isolat46BBPBAP 241        | GAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGA | 300           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 268 | GAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGA | 327           |            |           |
| isolat46BBPBAP 301        | TGGTAGGATAGAGGCCACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCG  | 360           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 328 | TGGTAGGATAGAGGCCACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCG  | 387           |            |           |
| isolat46BBPBAP 361        | GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGAAATTACC  | 420           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 388 | GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGAAATTACC  | 447           |            |           |
| isolat46BBPBAP 421        | CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGG | 480           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 448 | CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGG | 507           |            |           |
| isolat46BBPBAP 481        | TAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTGTGG   | 539           |            |           |
| <i>C. Sorokiniana</i> 508 | TAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTGTGG   | 566           |            |           |

**Gambar 4.** Hasil analisis homologi isolat 46 BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana* strain KT388090.1

nukleotida sebesar 537/539 terhadap data *C. sorokiniana* pada data *GenBank*. Hasil analisis homologi isolat 46 BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana strain* KT388090.1 dapat dilihat pada Gambar 4.

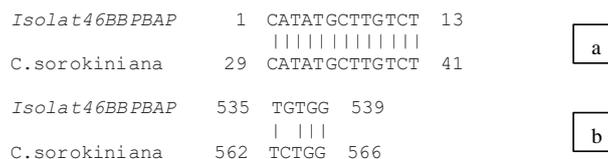
Berdasarkan analisis homologi tersebut, dapat dilihat bahwa terdapat beberapa perubahan basa baik pada penjajaran terhadap *C. sorokiniana* yang ditandai dengan tidak adanya garis vertikal yang menghubungkan antara basa nukleotida *Query* dengan *Subject*. Hasil penjajaran dengan *C. sorokiniana* menunjukkan adanya 1 *gap*. *Gap* ini menunjukkan adanya mutasi genetik seperti insersi ataupun delesi dari satu atau lebih karakter sekuen selama terjadinya evolusi. Hasil yang didapatkan pada Gambar 5. menunjukkan substitusi basa antara isolat 46 BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana* dari *GenBank*. Substitusi isolat 46 BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana* sebesar 1 basa yang termasuk dalam transversi karena basa G → C, karena basa purin berubah menjadi pirimidin.

Hasil penjajaran primer dengan daerah target 18S rDNA *C. sorokiniana* menunjukkan bahwa primer *forward* 18S hanya mampu menempel pada daerah 29 - 41 pb sedangkan primer *reverse* menempel pada daerah 562 - 566 pb. Maka dari itu hasil tersebut membuktikan adanya perbedaan ukuran panjang hasil sekuensing yang didapatkan dengan data sekuen yang terdaftar pada *website* NCBI. Guna mengetahui lebih lanjut mengenai

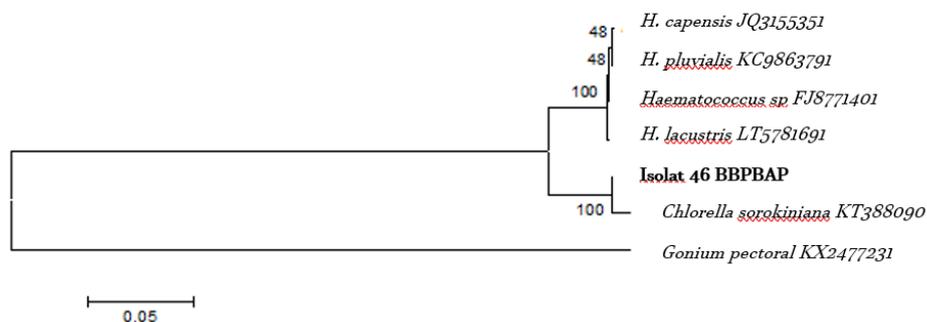
hubungan kekerabatan dari hasil sekuen yang didapatkan, maka dilakukan analisis filogenetik menggunakan pohon filogenetik (Gambar 6.).

Sekuens mikrolaga *Gonium pectorale* digunakan sebagai *outgroup*. Selain itu sekuen *Haematococcus sp*, *H. pluvialis*, *H. lacustris*, *H. capensis* dan *C. sorokiniana* digunakan untuk memperjelas hubungan dengan isolat 46 BBPBAP Jepara. Berdasarkan hasil pohon filogenetik yang diperoleh, bahwa pohon tersebut menunjukkan posisi sampel dengan spesies kerabatnya. Posisi Isolat 46 BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana* terletak pada satu kluster yang sama, sehingga menunjukkan bahwa kedua spesies ini memiliki hubungan yang dekat.

Penelitian ini menggunakan metode *Bootstrap* 1000 x dan skala yang dihasilkan pada pohon filogenetik sebesar 0,05 yang artinya terdapat 5 basa yang berubah setiap 100 basa. Menurut Kress *et al.* (2002), nilai *bootstrap* yang kuat memiliki persentase sebesar >85%, kategori sedang sebesar 70-85%, kategori lemah sebesar 50-69%, dan kategori buruk sebesar <50%. Hal ini sejalan dengan hasil yang didapatkan, nilai *bootstrap* yang didapatkan antara isolat 46 BBPBAP dengan *C. sorokiniana* sebesar 1000 (100%). Metode *Neighbor Joining* dianggap mewakili hasil penelitian ini, karena akan digunakan untuk memilih sekuen yang apabila digabungkan akan memberikan estimasi hasil yang terbaik dari panjang cabang yang paling dekat untuk merefleksikan jarak nyata antar sekuennya.



**Gambar 5.** Penjajaran Primer *Forward* 18S rDNA (a) dan *Reverse* (b) dengan Gen 18S rDNA *C. sorokiniana*



**Gambar 6.** Pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antara isolat 46 BBPBAP Jepara dengan *C. sorokiniana* dan sekuen lain dari *GenBank* menggunakan model *Neighbor-Joining*.

Karakterisasi morfologi dan molekuler terhadap isolat mikroalga dari BBPBAP Jepara perlu diikuti dengan analisis karotenoid. Hal itu

## KESIMPULAN

Berdasarkan analisis karakterisasi secara morfologi, isolat mikroalga yang didapatkan dari BBPBAP Jepara memiliki karakter bentuk bulat, warna sel hijau dengan ukuran sel sebesar 4,5 µM, tidak memiliki flagela, dan motilitas yang pasif. Karakterisasi molekuler menggunakan 18S rDNA dapat dilihat dari hasil pensejajaran isolat 46 BBPBAP dengan *Chlorella sorokiniana* KT388090.1 yang menunjukkan kemiripan 99% dan adanya 1 *gap* serta 1 perubahan basa dalam bentuk transversi. Berdasarkan pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat 46 BBPBAP Jepara memiliki nilai *bootstrap* terhadap *Chlorella sorokiniana* sebesar 100%.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Tim mengucapkan terimakasih kepada Hibah RPP Universitas Diponegoro yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan Surat Penugasan Pelaksanaan Kegiatan no. 185-28/UN7.6.1/PP/2021 tanggal 10 Maret 2021

## DAFTAR PUSTAKA

- Bérard, A., Dorigo, U., Humbert, J.F., & Martin-Laurent, F. 2005. Microalgae community structure analysis based on 18S rDNA amplification from DNA extracted directly from soil as a potential soil bioindicator. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(2): 285-291. doi: 10.1051/agro:2005004
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA Isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19:11-15
- Fawley, M.W. & Fawley, K.P. 2004. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *Journal of Phycology*, 40(1):223-225. doi: 10.1111/j.0022-3646.2004.03-081.x
- Hadiyanto; Widayat & Kumoro, A.C. 2012. Potency of Microalgae as Biodiesel Source in Indonesia. *International Journal of Renewable Energy Development*, 1(1):23-27. doi: 10.14710/ijred. 1.1.23-27
- Istini. 2020. Pemanfaatan Plastik Polipropilen Standing Pouch Sebagai Salah Satu Kemasan Sterilisasi Peralatan Laboratorium. *Indonesian Journal of Laboratory*, 2(3):41-46. doi: 10.22146/ijl.v2i3.57424

diperlukan untuk mengembangkan potensi mikroalga penghasil astaxantin tersebut pada skala industri.

- Kusumaningrum, H.P., & Zainuri, M. 2016. Molecular characterization of *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* fusant using 18S rDNA gene. *Jurnal Teknologi* 78 (4-2) : 61-68. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.8155>
- Kress, W.J., Prince, L.M. & Willianms, K.J. 2002. The Phylogeny and a New Classification of Gingers (*Zingiberaceae*): Evidence from Molecular Data. *American Journal of Botany* 89(10): 1682-1689. doi: 10.3732/ajb.89.10.1682
- Lopez, B.R., Hernandez, J., Bashan, Y., & De-Bashan, L.E. 2017. Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *Journal of Microbiological Methods*, 135: 96-104. doi:10.1016/j.mimet. 2017.02.005
- Meyer A., Todt C., Mikkelsen N.T., & Lieb B., 2010. Fast evolving 18S rDNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology*, 10:10-70. doi: 10.1186/1471-2148-10-70
- Noerdjito, D.R. 2019. Perkembangan, Produksi, dan Peran Kultur Mikroalga Laut dalam Industri. *Oseana*, 42(1): 18-27. doi: 10.14203/oseana. 2017.vol.42no.1.35
- Pratiwi, R. & Limantara, L. 2008. Potensi Astaxantin sebagai Senyawa Antikanker. *Indonesian Journal of Cancer*, 4:149-154.
- Rismiarti, A., Kusumaningrum, H.P., & Zainuri, M. 2016. Karakterisasi Dan Identifikasi Molekuler Fusan Hasil Fusi Protoplas Interspesies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Chlorella vulgaris* menggunakan 18SrDNA. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 18(2):30-40. doi: 10.14710/ bioma.18.2.30-40
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Satriaji, E.D., Zainuri, M., & Widowati, I. 2016. Study of growth and N, P content of microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in different culture media and light intensity. *Jurnal Teknologi*, 78(4-2):27-31. doi: 10.11113/jt.v78.8148

Shihira, I. & Krauss, R.W. 1965. *Chlorella*. *Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. pp. 1-97. Maryland: University of Maryland, College Park.

Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., & Boussiba, S. 2003. Astaxantin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as

an Active Photoprotective Process Under High Irradiance1. *Journal of Phycology*, 39(6): 1116–1124. doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.

Yusuf K.Z. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5(2):5pages