



## **LAPORAN AKHIR**

### **PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA**

***DNA BARCODES FOR MARINE BIODIVERSITY: DETERMINASI DAN IDENTIFIKASI  
ALGA MERAH (RHODOPHYTA) DI PANTAI CIPATUJAH, TASIKMALAYA  
MELALUI IDENTIFIKASI MOLEKULER DNA *BARCODING****

#### **BIDANG KEGIATAN:**

##### **PKM-Penelitian**

Disusun oleh:

Sri Wahyuningsih Ritonga	C34100011	(2010)
Nurlaila Firdani Fajri	C34100031	(2010)
Arif Yanuar Ridwan	C34100034	(2010)
Anastasia Mensanie Putri	C34110071	(2011)

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

**BOGOR**

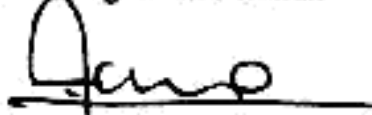
**2014**

## PENGESAHAN PKM-PENELITIAN

1. Judul Kegiatan : **DNA barcodes for marine biodiversity: determinasi dan identifikasi alga merah (Rhodophyta) di pantai Cipatujah, Tasikmalaya melalui identifikasi molekuler DNA barcoding**
2. Bidang Kegiatan : PKM-P
3. Ketua Pelaksana Kegiatan
  - a. Nama Lengkap : Sri Wahyuningsih Ritonga
  - b. NIM : C34100011
  - c. Jurusan : Teknologi Hasil Perairan
  - d. Universitas : Institut Pertanian Bogor
  - e. Alamat rumah dan No.Hp : Perumahan Griya Persada, Jl. Cempaka II Blok K3, Citeureup-Bogor 16810/085694068940
  - f. Alamat email : ningsiheuy@gmail.com
4. Anggota pelaksana kegiatan : 3 orang
5. Dosen pendamping
  - a. Nama lengkap dan gelar : Prof. Dr. Ir. Linawati Hardjito, MS
  - b. NIDN : 0028056208
  - c. Alamat rumah dan No.Hp : Perum. Dramaga Permai, Cibanteng Proyeck, 0811111447
6. Biaya Kegiatan Total :
  - a. DIKTI : Rp9.720.000,00
  - b. Sumber lain : -
7. Jangka waktu pelaksanaan : 4 bulan

Bogor, 25 Juli 2014

Menyetujui  
Ketua Departemen  
Teknologi Hasil Perairan



Prof. Dr. Ir. Joko Santoso, MSi  
NIP. 196709221992031003

Ketua Pelaksana Kegiatan



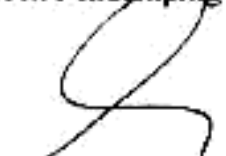
Sri Wahyuningsih Ritonga  
NIM. C34100011

Wakil Rektor Bidang Akademik dan  
Kemahasiswaan IPB

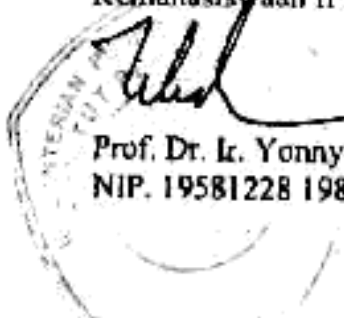


Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS  
NIP. 19581228 198503 1 003

Dosen Pendamping



Prof. Dr. Ir. Linawati Hardjito, MS  
NIP. 19620528 198703 2 003



## RINGKASAN

Keanekaragaman organisme laut sangat melimpah mengingat laut menyelimuti dunia sekitar lebih dari 70% bagian. Salah satu organisme laut yang banyak dimanfaatkan masyarakat adalah makro alga atau biasa dikenal dengan rumput laut. Beberapa jenis rumput laut yang bernilai ekonomis tinggi dan telah diusahakan adalah rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan rumput laut coklat (*Phaeophyceae*). Kapraun (2005) melaporkan bahwa alga merah atau *Rhodophyta* memiliki lebih dari 700 genus dan 6.000 spesies. Keanekaragaman alga merah (*Rhodophyta*) menurut Bouchet (2006) dan *World Register of Marine Species* mencapai 6.200 dan 6.302 spesies.

Banyak penelitian-penelitian yang mengidentifikasi spesies makroalga melalui identifikasi non-molekuler seperti uji morfologi, fisiologi dan biokimia. Akan tetapi identifikasi non-molekuler ini sering menimbulkan masalah dalam aplikasinya karena morfologi dan anatominya yang relatif sederhana, hampir serupa antara satu dengan yang lainnya, dan adanya perubahan-perubahan yang dipengaruhi oleh perubahan lingkungan, serta pengamatannya pun harus memperhatikan umur tanaman, karena perubahan umur mempengaruhi perubahan morfologi. Hal ini menyebabkan perlu adanya identifikasi spesies secara molekuler. Klasifikasi alga merah berdasarkan data molekuler baru terbagi menjadi 2 subkelas: *Bangiophycidae* dengan 3-4 ordo dan *Florideophycidae* dengan 14 ordo.

DNA *barcoding* merupakan sistem baru yang dirancang untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat dengan menggunakan *gene region* pendek dan standar sebagai internal *tag* spesies sehingga DNA *barcoding* dapat menyebabkan sistem taksonomi Linnaeus lebih mudah diakses dengan manfaat terhadap para ekologis, konservasionis dan peneliti-peneliti yang bertanggung jawab terhadap keberagaman hayati. Selain itu, DNA *Barcode* dapat pula mengungkap fenomena *spesies cryptic*, *spesies sibling*, keragaman yang belum terungkap, hubungan filogeni di antara takson yang berdekatan dan dapat digunakan pula untuk memantau asal usul suatu komoditas laut. Informasi hasil DNA *barcode* dapat menjadi sarana mudah dan cepat untuk determinasi spesimen yang belum diketahui jelas taksonominya, eksplorasi diagnosa dari unit konservasi, serta untuk melengkapi sistem identifikasi taksonomi.

Penelitian ini dilakukan untuk mendeterminasi dan mengidentifikasi alga merah di Pantai Cipatujah, Tasikmalaya secara molekuler dengan menggunakan teknologi DNA *barcoding*. Tahapan yang dilakukan meliputi isolasi DNA, *running* isolat DNA, amplifikasi dengan cara PCR, *running* dan purifikasi hasil PCR serta identifikasi dengan teknologi DNA *Barcoding*.

## DAFTAR ISI

BAB 1. PENDAHULUAN .....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	7
BAB 3. METODE PENELITIAN .....	8
BAB 4 PELAKSANAAN PROGRAM .....	14
BAB 5 HASIL YANG DICAPAI.....	17
DAFTAR PUSTAKA .....	23
LAMPIRAN.....	26

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 LATAR BELAKANG**

Keanekaragaman organisme laut sangat melimpah mengingat laut menyelimuti dunia sekitar lebih dari 70% bagian. Salah satu organisme laut yang banyak dimanfaatkan masyarakat adalah makro alga atau biasa dikenal dengan rumput laut. Alga diklasifikasikan menjadi alga hijau (chlorophyta), alga coklat (phaeophyta) dan alga merah (rhodophyta). Beberapa jenis rumput laut yang bernilai ekonomis tinggi dan telah diusahakan adalah rumput laut merah (Rhodophyceae) dan rumput laut coklat (Phaeophyceae) (Suryaningrum 2007). Alga merah sangat beragam macamnya. Kapraun (2005) melaporkan bahwa alga merah atau Rhodophyta memiliki lebih dari 700 genus dan 6.000 spesies. Keanekaragaman alga merah (Rhodophyta) menurut Bouchet (2006) dan *World Register of Marine Species* mencapai 6.200 dan 6.302 spesies.

Banyak penelitian-penelitian yang mengidentifikasi spesies makroalga melalui identifikasi non-molekuler seperti uji morfologi, fisiologi dan biokimia. Akan tetapi identifikasi non-molekuler ini sering menimbulkan masalah dalam aplikasinya. Julisaniah *et al.* (2008) menyampaikan bahwa karakter morfologi suatu organisme seringkali dipengaruhi oleh perubahan lingkungan dan pengamatannya pun harus memperhatikan umur tanaman, karena perubahan umur mempengaruhi perubahan morfologi. Saunders (2005) dalam penelitiannya juga menyampaikan bahwa makroalga laut dapat sangat sulit untuk diidentifikasi secara non-molekuler karena morfologi dan anatominya yang relatif sederhana, hampir serupa antara satu dengan yang lainnya, dan adanya perubahan menjadi generasi yang bersifat heteromorfik. Hal ini menyebabkan perlu adanya identifikasi spesies secara molekuler. Kapraun (2005) melaporkan dalam penelitiannya bahwa klasifikasi alga merah berdasarkan data molekuler baru terbagi menjadi 2 subkelas: Bangiophycidae dengan 3-4 ordo dan Florideophycidae dengan 14 ordo.

Balajee *et al.* (2009) menyampaikan bahwa determinasi spesies secara molekuler merupakan strategi kuat yang dapat mengklasifikasikan suatu genera atau spesies secara akurat. Identifikasi molekuler lebih terjamin keakuratannya karena sifat genetik cenderung stabil terhadap perubahan lingkungan, dan tidak dipengaruhi oleh umur (Julisaniah *et al.* 2008). Ernawati (2008) juga menyampaikan dalam penelitiannya bahwa keakuratan identifikasi molekuler tidak tergantung pada kondisi lingkungan, umur atau sifat fisiologi dari pathogen namun lebih tergantung pada kualitas DNA yang diekstraksi. Ardiana (2009) menyampaikan bahwa perbedaan tanaman secara

genetik (pola pita DNA atau penanda molekuler) berperan penting dalam konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik tanaman.

DNA *barcoding* merupakan sistem baru yang dirancang untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat dengan menggunakan *gene region* pendek dan standar sebagai internal *tag* spesies sehingga DNA *barcoding* dapat menyebabkan sistem taksonomi Linneaus lebih mudah diakses dengan manfaat terhadap para ekologis, konservasionis dan peneliti-peneliti yang bertanggung jawab terhadap keberagaman hayati (Herbert dan Gregory 2005). DNA *barcoding* bukan merupakan akhir dari taksonomi bagi ekologis, melainkan metode ini akan membantu revolusi molekuler alfa-taksonomi yang dengan hebat akan mengubah jumlah dan distribusi spesies yang diakui dalam garis keturunannya (Saunders 2005). Rach *et al.* (2007) menyampaikan dalam penemuannya bahwa informasi hasil DNA *barcode* dapat menjadi sarana mudah dan cepat untuk determinasi spesimen yang belum diketahui jelas taksonominya, eksplorasi diagnosa dari unit konservasi, serta untuk melengkapi sistem identifikasi taksonomi. Penelitian ini dilakukan untuk mendeterminasi dan mengidentifikasi alga merah secara molekuler dengan menggunakan teknologi DNA *barcoding*.

## **1.2 PERUMUSAN MASALAH**

- Tingginya keanekaragaman alga merah di Pantai Cipatujah, Tasikmalaya
- Terdapatnya kendala dan kurang akuratnya identifikasi non-molekuler
- Perlunya identifikasi yang dapat memberikan data akurat dan cepat
- Teknologi identifikasi molekuler yang mudah dan cepat dalam aplikasinya

## **1.3 TUJUAN**

Tujuan umum dari penelitian ini adalah determinasi dan identifikasi alga merah di Pantai Cipatujah, Tasikmalaya melalui identifikasi molekuler DNA *barcoding*. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah mendapatkan DNA genom dari alga merah untuk diidentifikasi, mengamplifikasi DNA alga merah dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan mendapatkan *base sequence* DNA alga merah dengan DNA *barcoding*

## **1.4 LUARAN YANG DIHARAPKAN**

Luaran yang diharapkan setelah dilakukannya penelitian ini adalah didapatkannya karakter molekuler alga merah di Pantai Cipatujah, Tasikmalaya untuk kemudian dapat dianalisis lebih lanjut terhadap pemanfaatan alga merah tersebut di bidang bioteknologi.

## **1.5 MANFAAT**

Ilmu Pengetahuan dan Teknologi

1. Informasi spesies baru beserta sekuens basa yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut di multibidang bioteknologi

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 ISOLASI DNA**

Isolasi DNA merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam rekayasa genetika sebelum melangkah ke proses selanjutnya. Prinsip dasar isolasi total DNA dari jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel jaringan, DNA. Ekstrak sel kemudian dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA total. Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: Isolasi sel, pelisisan dinding dan membran sel, ekstraksi dalam larutan, purifikasi dan presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada 2, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan di dalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm atau 3000 rpm (Faatih 2009).

### **2.2 METODE CTAB**

Metode Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) merupakan metode ekstraksi dan purifikasi DNA yang berasal dari tumbuhan untuk menghilangkan senyawa polisakarida dan polifenol yang dapat mempengaruhi kemurnian dan kualitas DNA. Metode ini sudah banyak diterapkan pada genetika tumbuhan molekuler. Metode CTAB merupakan metode yang efisien untuk menghilangkan molekul kotoran seperti polifenol, polisakarida dan protein dan memisahkan DNA larut air tanpa adanya kontaminasi dari RNA (Wang *et al.* 2012)

### **2.3 DNA BARCODING**

Taksonomi dan identifikasi merupakan salah satu dasar yang sangat penting bagi pelaksanaan konservasi (Devi 2012). DNA *barcoding* merupakan sistem baru yang dirancang untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat dengan menggunakan *gene region* pendek dan standar sebagai internal *tag* spesies sehingga DNA *barcoding* dapat menyebabkan sistem taksonomi Linneaus lebih mudah diakses dengan manfaat terhadap para ekologis, konservasionis

dan peneliti-peneliti yang bertanggung jawab terhadap keberagaman hayati (Herbert dan Gregory 2005). DNA *barcoding* tidak hanya mempunyai kegunaan untuk mengidentifikasi spesies yang sudah dikenal, tetapi juga dapat memastikan suatu spesies baru (Hajibabaei *et al.* 2005). DNA *Barcode* dapat pula mengungkapkan fenomena *spesies cryptic*, *species sibling*, keragaman yang belum terungkap, hubungan filogeni di antara takson yang berdekatan dan dapat digunakan pula untuk memantau asal usul suatu komoditas laut (Syafriana 2011). Victor *et al.* (2007), melaporkan bahwa secara morfologi ikan Gobi *Coryphopterus kuna* sama dengan *Coryphopterus spp*, namun didapatkan perbedaan runutan nukleotida sebesar 25% saat diidentifikasi menggunakan DNA *Barcode*.

### **BAB 3. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 WAKTU DAN TEMPAT**

Penelitian ini dimulai pada bulan Januari – Mei 2014 bertempat di Laboratorium Bioteknologi Hasil Perairan, Program Studi Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor.

#### **3.2 BAHAN DAN ALAT**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah yang berasal dari Karimun Jawa, Jepara, Jawa Timur. Bahan lain yang digunakan dalam isolasi DNA alga merah terdiri dari *buffer* CTAB, kloroform-isoamilalkohol (24:1), sodium asetat, etanol (80% dan absolut), akuades, *loading dye*, *marker* dan TBE, sedangkan bahan yang digunakan dalam pembuatan *buffer* CTAB meliputi Tris-HCl, NaCl, *ethylenediaminetetraacetic* (EDTA), *polybinylpyrrolidone* (PVP), *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB), aquabides dan  $\beta$ -merkaptotanol. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, tabung *eppendorf*, label, pipet mikro, *sentrifuge* dan apparatus elektroforesis.

Bahan yang digunakan untuk proses PCR adalah pasangan primer ITS1 dengan konsentrasi 0,1-1,0  $\mu$ M, pasangan primer ITS4 dengan konsentrasi 0,1-1,0  $\mu$ M dan data urutan basa nukleotida bersumber dari Ward *et al.* (2005), *PCR master mix* yang terdiri dari 2X DreamTaq Green buffer™, dNTPs dan 4 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), serta *nuclease free water*. Bahan untuk elektroforesis adalah buffer TBE 1X, gel agarosa (Fermentas), 100 bp *DNA ladder* (Vivantis), 6x *loading dye* 13 dan *ethidium bromida* (Fermentas). Bahan yang digunakan untuk analisis DNA *barcoding* adalah bahan yang digunakan untuk proses sekuensi dengan metode Sanger (Sanger 1975), yaitu 10x *Genetic Analyzer Running Buffer*, EDTA, dan akuades.



Proses amplifikasi DNA target (PCR) dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Multi Gene II*, Labnet. Proses elektroforesis dilakukan dengan *Bio Rad Mini-Sub® Cell GT Cell* (elektroda platinum), *UV Transilluminators* (UVP) untuk visualisasi dan kamera digital untuk mendokumentasikan hasil yang diperoleh, pipet mikro, *microwave*, timbangan digital (sensitifitas hingga 1 mg) dan gelas ukur. Pengukuran konsentrasi DNA sampel menggunakan *Gene Quant analyzer* (Applied Biosystem). Analisis *DNA barcoding* dilakukan menggunakan *Applied Biosystem 3730xl Automatic Sequencer* (96-kapiler) dan piranti lunak *Clustal W2* dan *TreeView*.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian determinasi dan identifikasi alga merah (Rhodophyta) meliputi metode isolasi DNA, *running* isolat DNA, amplifikasi dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *running* DNA hasil PCR, *sequencing* DNA, *blasting* dan analisis data.

#### Isolasi dan Ekstraksi DNA Alga Merah

Metode I (CTAB Modifikasi Ardiana 2009)

Sebelum memulai proses isolasi DNA, sampel (50-100mg) dengan memasukkan sampel ke dalam plastik berklip ukuran 10 cm x 7 cm yang berisi 1 ml bufer CTAB (1M Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, 0,02g CTAB, 0,04g PVP dan 1%  $\beta$ -mercaptoetanol). Plastik berisi contoh lalu ditekan menggunakan kedua telapak tangan untuk mengeluarkan udara sehingga seluruh contoh terlindungi oleh bufer dan menempel pada plastik. Plastik berisi contoh lalu diberi label dan disimpan dalam *freezer* bersuhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan siap untuk digunakan.

Metode isolasi DNA yang dilakukan sesuai dengan metode Ardiana (2009) yang telah dimodifikasi. Sampel dikeluarkan dari *freezer* dan digerus hingga halus dalam mortar pestel dengan ditambahkan 1 ml bufer ekstraksi CTAB (*pre-heat*  $65^{\circ}\text{C}$  15 menit). Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam tabung berukuran 1,5 ml.

Proses lisis dinding sel dilakukan dengan menginkubasi tabung berisi contoh ke dalam waterbath suhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit. Tabung kemudian diangkat dari *waterbath* dan dibiarkan beberapa menit sampai suhu contoh menurun. Larutan ditambahkan 12,5 $\mu\text{l}$  RNase (20mg/ml) dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1,5 jam. Tabung berisi sampel yang telah diinkubasi lalu ditambah khloroform: isoamil-alkohol (CIA 24:1) hingga tabung penuh dan di-*invert* (hindari perlakuan *vortex*) selama 10 menit (sampel dan CIA (24:1) tercampur), kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatant dipindahkan ke dalam tabung baru dan

ditambahkan 500µl CIA (24:1), lalu disentrifus lagi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Langkah ini diulang sampai tidak ada lapisan putih antara supernatan dan CIA (24:1).

Supernatan yang sudah bersih dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambah 2 kali volume etanol absolut dingin dan 0,1 volume sodium asetat 3M. Selanjutnya tabung dibolak-balik secara hati-hati untuk melarutkan supernatan dengan etanol absolut dingin dan sodium asetat 3M. Tabung sampel lalu disimpan pada suhu -20°C semalaman kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Fase cair lalu dibuang kemudian *pellet* yang terbentuk dicuci dengan menggunakan etanol 70% dingin dan kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Fase cair lalu dibuang dan *pellet* dikeringkan dengan cara meletakkan tabung dengan posisi terbalik di atas kertas tisu sampai *pellet* DNA mengering.

Proses ini dilakukan dengan hati-hati dan dipastikan pelet DNA masih melekat pada dasar tabung. Setelah cukup kering, *pellet* DNA dilarutkan dengan menambahkan 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O. Jika tidak langsung digunakan, DNA disimpan pada suhu -20°C.

Metode II (CTAB Modifikasi Maeda *et al.* 2013 dan Ardiana 2009)

Sebelum isolasi DNA, polisakarida pada *Rhodymenia* sp. dihilangkan dengan prosedur berikut: Sampel dilarutkan dalam 1ml 0,1% β-mercaptoethanol dan disimpan pada suhu ruang selama 90 menit. Larutan kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit di suhu ruang dan fase cair (supernatan) yang mengandung polisakarida dihilangkan. DNA kemudian diisolasi dengan menggunakan metode I.

Metode III (Modifikasi Tenriulo *et al.* 2001)

Sampel (50 mg) dipreservasi dengan menggunakan 250 µL TNES-Urea *buffer* (Asahida *et al.*, 1996) dalam tabung eppendorf 1,5 mL. Sampel disimpan dalam suhu ruangan sampai dilakukan ekstraksi DNA.

Sampel yang sudah dipreservasi dengan TNES-Urea *buffer* ditambahkan 500µL lysis *buffer* (0,5 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,8 % (v/v) Triton x-100, dan 0,1 M Tris-HCl pH 9,0) kemudian dimasukkan ke tabung eppendorf dan ditambahkan 40 mL SDS 10 % (w/v) dan 20 µL proteinase K (20 mg/mL), diinkubasi pada 55°C selama 3 jam, kemudian ditambahkan 12,5 µL RNase (20mg/mL) dan disimpan pada suhu ruangan selama 30 menit.

Selanjutnya ditambahkan kloroform:isoamyl alkohol (CIA (24:1)) dan di-*invert* secara perlahan sampai homogen selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 8 menit. Bagian lapisan atas cairan dipindahkan ke tabung eppendorf baru volume 1,5 mL. Penambahan CIA (24:1) ini diulangi hingga lapisan interfase antara CIA dan supernatan tidak ada. Larutan sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 4 menit. Lapisan atas dipindahkan lagi ke tabung baru dan ditambahkan 0,1 volume kalium asetat 5 M, 0,25 volume etanol, dan 1 vol CIA (24 : 1) disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 4 menit. Lapisan atas kemudian ditambahkan etanol absolut dingin dan digoyang dengan pembalikan secara perlahan beberapa saat untuk kemudian disimpan semalaman pada suhu -20°C kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit.

Fase cair lalu dibuang kemudian *pellet* yang terbentuk dicuci dengan menggunakan etanol 70% dingin dan kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Fase cair lalu dibuang dan *pellet* dikeringkan dengan cara meletakkan tabung dengan posisi terbalik di atas kertas tisu sampai *pellet* DNA mengering. DNA kemudian ditambahkan 30-50uL ddH<sub>2</sub>O. Isolat DNA disimpan pada suhu -20°C untuk proses selanjutnya.

#### Metode IV (Wattier *et al.* 2000)

Sampel sebelumnya dibersihkan dengan akuades sebanyak 3 kali dan dikeringkan. Sampel yang telah cukup kering di tambahkan nitrogen cair dan digerus dengan menggunakan *complete extraction buffer* (6,8ml *stock extraction buffer* (100Mm Tris HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 500mM NaCl 5 M), 680ul SDS 20% dan 12,5ul Proteinase-K (20mg/ml)) di dalam mortar dalam keadaan dingin. Larutan sampel dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan diinkubasi di *drybath* pada suhu 37°C selama 30 menit (*invert* tiap 5 menit). Larutan sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13000rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan dan kemudian ditambahkan RNase 10ul (2mg/ml). Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit lalu diinkubasi di es selama 30 menit. Larutan disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Supernatan ditambahkan 700ul isopropanol dingin diinkubasi semalaman dan kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 13000 rpm selama 30 menit. Fase cair lalu dibuang dan *pellet* yang terbentuk dicuci dengan menggunakan etanol 70% dingin dan kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 3000rpm selama 10 menit sebanyak 3 kali. Fase cair lalu dibuang dan *pellet* dikeringkan dengan cara meletakkan tabung dengan posisi terbalik di atas kertas

tisu sampai *pellet* DNA mengering. DNA kemudian ditambahkan 30-50 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Isolat DNA disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk proses selanjutnya.

Metode 5 (Modifikasi Tenriulo *et al.* 2001 dan Hughey *et al.* 2001)

Sampel sebelumnya dibersihkan dengan akuades sebanyak 3 kali dan dikeringkan. Sampel yang telah cukup kering ditambahkan nitrogen cair dan digerus di dalam mortar dengan ditambahkan *lysis buffer* (0,5 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,8 % (v/v) Triton x-100, dan 0,1 M Tris-HCl pH 9,0) kemudian dimasukkan ke tabung eppendorf dan ditambahkan 40 mL SDS 10 % (w/v) dan 20  $\mu$ L proteinase K (20 mg/mL), diinkubasi pada  $55^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam, kemudian ditambahkan 12,5  $\mu$ L RNase (20mg/mL) dan disimpan pada suhu ruangan selama 30 menit. Larutan sampel kemudian ditambahkan 250 $\mu$ l sodium asetat 3M dan diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Larutan sampel disentrifugasi pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit.

Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 500 $\mu$ l kloroform: isoamyl alkohol (CIA (24:1)) dan di-*invert* secara perlahan sampai homogen selama 10 menit. Larutan sampel dan CIA (24:1) disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Penambahan CIA (24:1) dilakukan berulang hingga lapisan interfase antara supernatan dan CIA (24:1) sudah tidak ada.

Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan dua per tiga isopropanol dingin. Larutan diinkubasi semalaman pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan disentrifugasi pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 8000 rpm selama 30 menit. Fase cair lalu dibuang dan *pellet* yang terbentuk dicuci dengan menggunakan etanol 70% dingin dan kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 12000rpm selama 1 menit. Fase cair lalu dibuang dan *pellet* dikeringkan dengan cara meletakkan tabung dengan posisi terbalik di atas kertas tisu sampai *pellet* DNA mengering. DNA kemudian ditambahkan 30-50 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Isolat DNA disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk proses selanjutnya. Metode-metode yang dilakukan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

### **Elektroforesis Isolat DNA Alga Merah pada agarose 1%**

Untuk mengetahui keberhasilan metode ekstraksi yang digunakan, isolat DNA dielektroforesis pada *agarose* 1%. Proses ini diawali dengan pemasukan *agarose* kedalam kotak yang merupakan bagian dari alat apparatus elektroforesis, kemudian larutan TBE 1x dimasukkan kedalam bak yang berisi *agarose* hingga *agarose* terendam. Sampel yang dicampur dengan *loading dye* dimasukkan kedalam *agarose* dengan perbandingan *loading dye* dan isolat DNA 5:2

dan dilanjutkan dengan pemasukan marker sebanyak 2 µl. Elektroforesis apparatus dihidupkan pada voltase 50 volt dan ditunggu selama 55 menit. Setelah itu agarose yang berisi sampel dan marker diangkat dan dilakukan *staining* selama 10 menit dalam eTBr serta *destaining* selama 10 menit dalam akuades. Agarose kemudian diangkat dan dilakukan pengamatan untuk mengetahui ada tidaknya DNA menggunakan sinar UV.

### **Pengukuran Tingkat Kemurnian dan Kuantitas DNA**

Kuantitas dan kemurnian isolat DNA diukur melalui uji spektrofotometri dengan menggunakan alat *nanodrop* 2000 spektrofotometer, ThermoScientific. Isolat DNA dari beberapa metode diukur absorbansinya pada gelombang 230nm, 260nm dan 280nm. Rasio A260/A280 menunjukkan tingkat kontaminasi oleh protein dan A260/A230 menunjukkan adanya kontaminasi polisakarida atau polifenolik.

### **Amplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Amplifikasi DNA berbasis PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer GazR1, serta pasangan primer GazF1 (Saunders 2005) untuk menghasilkan fragmen dengan ukuran 450-700 bp. Reaksi amplifikasi PCR dilakukan dalam volume total reaksi 25 µ L dengan komposisi: 2 µl ekstrak DNA (10 pg–1 µg), 3 µl pasangan primer (primer GazR1 dan primer GazF1), 12,5 µl PCR master mix (Fermentas) dan 7,5 µl air untuk biologi molekular.

### **Sekuensing DNA dan analisis data**

DNA yang telah teramplifikasi disiapkan untuk proses penentuan urutan nukleotida menggunakan DNA *sequencer*. Penentuan urutan nukleotida dilakukan di Singapura dengan cara mengirim sampel DNA hasil PCR. Data hasil penjajaran nukleotida yang diperoleh kemudian dicocokkan pada data yang tersedia pada GenBank di NCBI (National Centre for Biotechnology Information) menggunakan BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.-gov>). Analisis DNA barcoding dilakukan dengan membuat pohon filogeni berdasarkan hasil penjajaran nukleotida yang telah dicocokkan dengan data pada GeneBank. Selain itu, beberapa hasil penjajaran nukleotida dari beberapa spesies yang memiliki kekerabatan yang dekat digunakan untuk mengetahui kedekatannya dengan spesies yang diuji. Pohon filogeni dibuat dan dianalisis dengan menjajarkan terlebih dahulu urutan nukleotida menggunakan piranti lunak Mega 5, lalu dihitung jarak genetik dari setiap sampel dan pembuatan pohon filogeni dengan metode pengkelasan Neighbour-joining (NJ) (Saitou & Nei 1987).



- Rekapitulasi Rancangan dan Realisasi Biaya

Dana yang diajukan dalam usulan PKM-P ini adalah sebesar Rp12.397.000,00 dan dana yang diberikan sebesar Rp9.750.000,00. Dana yang terpakai selama pelaksanaan PKM-P ini adalah sebesar Rp9.327.000,00 sehingga dana yang tidak terpakai adalah sebesar Rp423.000,00. Rekapitulasi rancangan dan realisasi biaya PKM-P ini diperlihatkan pada Tabel 2 dan 3.

Tabel 2 Rekapitulasi rancangan biaya penelitian

Peralatan Penunjang				
Material	Justifikasi Pemakaian	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan
Aluminium foil	Pembungkus	1 Pak	30.000	30.000
Microtube 2ml	Tempat Buffer CTAB	500 Unit	230.000	230.000
Tube eppendorf	Media (Wadah uji)	500 Unit	225.000	225.000
Tips 100-1000µl	Alat	1000 Unit	200.000	200.000
Tips 10-100µl	Alat	1000 Unit	200.000	200.000
Tips 0.1-10µl	Alat	1000 Unit	200.000	200.000
Running isolate DNA	Analisis Penelitian	20 Ulangan	20.000	400.000
Running DNA hasil PCR	Analisis Penelitian	20 Ulangan	20.000	400.000
Amplifikasi secara PCR	Analisis Penelitian	20 Ulangan	50.000	1.000.000
Analisis DNA <i>barcoding</i>	Analisis Penelitian	1 Ulangan	2.000.000	2.500.000
SUB TOTAL (Rp)				2.385.000
Bahan Habis Pakai				
Material	Justifikasi Pemakaian	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan
NaCl	Bahan <i>Buffer</i>	100 Gram	1000	100.000
Cloroform	Pembersih DNA	1,0 Liter	300.000	300.000
Isoamylalkohol	Pembersih DNA	250 ml	680.000	680.000
Phenol <i>Crystalline</i>	Pembersih DNA	100 Gram	695.000	695.000
EDTA	Bahan <i>Buffer</i>	250 Gram	698.000	698.000
PVP	Bahan <i>Buffer</i>	250 Gram	874.000	874.000
Agarose	Elektroforesis	100 Gram	900.000	900.000
Sodium Asetat	Bahan DNA	250 Gram	300.000	300.000
Enzim Taq-Polimerase	PCR	500 µ	690.000	690.000
Tris	Bahan TBE	250 Gram	450.000	450.000
Asam Borat	Bahan TBE	250 Gram	600.000	600.000
<i>Loading Dye</i>	Running isolate	1	100.000	100.000
VC 100 BP DNA <i>Ladder</i>	Marker	100 APP	850.000	850.000
Dntp Mix	PCR	0.25 Gram	425.000	425.000
SUB TOTAL (Rp)				7.662.000
Pejalanan				
Material	Justifikasi Perjalanan	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan
Perjalanan ke Cipatujah	Pengambilan Sampel	4 orang	1.000.000	1.000.000

Transportasi belanja peralatan	Pembelian Alat	1 orang	300.000	300.000
SUB TOTAL (Rp)				1.300.000
Lain-Lain				
Material	Justifikasi Pemakaian	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan
Komunikasi	Fasilitas	4 orang	100.000	500.000
Pembuatan poster	Presentasi	1 buah	250.000	250.000
Administrasi	Fasilitas		200.000	200.000
Dokumentasi	Fasilitas		200.000	200.000
SUB TOTAL (Rp)				1.050.000
Total (Keseluruhan)				12.397.000

Tabel 3 Rekapitulasi realisasi penggunaan dana

<b>Peralatan Penunjang</b>				
Material	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan	
Botol Sampel	5 buah	6.000	30.000	
Kotak Styrofoam	1 buah	20.000	20.000	
Lakban	1 buah	11.500	11.500	
Tisu	1 gulung	2.000	2.000	
Botol Larutan	3 buah	4.500	13.500	
Sarung Tangan	10 buah	1.500	15.000	
Blue Tips	1 Pack	216.000	216.000	
Toples	2 buah	4.000	8.000	
Corong	1 buah	5.000	5.000	
Masker	50 buah	1000	50.000	
Uji Kemurnian	15 sampel	15000	225.000	
Amplifikasi PCR	35 ulangan	70000	245.000	
Sewa Laboratorium	6 bulan	150000	900.000	
Subtotal (Rp)				3.946.00
<b>Bahan Habis Pakai</b>				
Material	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan	
Etanol 95% P.A	500 ml	400	200.000	
Es Batu	4 buah	1.000	4.000	
Sampel	3 kg	7000	21.000	
Etanol Teknis	1 Liter	17.000	17.000	
Proteinase K	100 mg	1.530.000	1.530.000	
NaCl	20 gram	3000	60.000	
Water Nuclease Free	100ml	135.000	135.000	
Nitrogen Cair	10 Liter	20000	200.000	
KAPA Readymix Robust Hotstart	1 buah	390.000	390.000	
Primer	4 buah	130000	520.000	
Subtotal (Rp)				3.077.000
<b>Perjalanan</b>				
Justifikasi Perjalanan	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan	
Sewa Mobil	2 hari	300.000	600.000	
Bahan Bakar Mobil		6.500	520.000	
Toilet	6 kali	1000	6000	
Tol			70.500	
Peralatan Mandi			7.000	
Sewa Penginapan	2 hari 1 malam	250000	250000	
Subtotal (Rp)				1.453.500
<b>Lain-Lain</b>				
Material	Kuantitas	Harga Satuan (Rp)	Keterangan	
Komunikasi	4	125000	500.000	
Konsumsi	3	-	250.500	
Dokumentasi			100.000	



Subtotal (Rp)	850.500
<b>Total (Keseluruhan)</b>	9.327.000
<b>Dana yang diberikan</b>	9.750.000
<b>Sisa Dana yang belum terpakai</b>	423.000

## BAB 5 HASIL YANG DICAPAI

DNA *barcoding* merupakan sistem baru yang dirancang untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat dengan menggunakan *gene region* pendek dan standar sebagai internal *tag* spesies sehingga DNA *barcoding* dapat menyebabkan sistem taksonomi Linneaus lebih mudah diakses dengan manfaat terhadap para ekologis, konservasionis dan peneliti-peneliti yang bertanggung jawab terhadap keberagaman hayati (Herbert dan Gregory 2005). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi Alga Merah yang berada di Cipatujah, Tasikmalaya-Jawa Barat melalui teknologi DNA *barcode*. Metode yang dilakukan meliputi isolasi DNA, amplifikasi DNA, *sequencing* DNA, *blasting* dan analisis data.

### - **Isolasi DNA Alga Merah**

Beberapa metode dilakukan untuk mengoptimasi isolasi dan ekstraksi DNA sehingga didapatkan isolat DNA berkualitas tinggi. Isolasi dan ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB modifikasi 1 (Ardiana 2009), metode CTAB modifikasi 2 (Maeda *et al.* 2013), metode TNES-urea *buffer* (Tenriulo *et al.* 2001), metode SDS-Prot K modifikasi 1 (Wattier *et al.* 2000) dan metode SDS-Prot K modifikasi 2 (Tenriulo *et al.* 2001 dan Hughey *et al.* 2001). Hasil elektroforesis isolasi dan ekstraksi DNA dengan berbagai metode diperlihatkan pada Gambar 1 dan 2 sedangkan hasil uji tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA disajikan pada Tabel 1.

Pada metode I, sampel dipreparasi dengan merendam sampel dalam bufer CTAB *overnight*. Perendaman dengan CTAB dimaksudkan sebagai pengganti penggunaan nitrogen cair dalam ekstraksi DNA pada umumnya. Penggerusan dengan bufer CTAB dimaksudkan untuk pelisisan sel dan mengeluarkan DNA dari komponen-komponen makromolekul di dalam alga merah (protein, lemak, polisakarida, polifenol, dan pigmen). Pelisisan sel tumbuhan dilakukan dengan menggunakan deterjen sama dengan lipid (hidrofobik dan hidrofilik) berfungsi mengikat lemak pendiri sel dan membrane nucleus (Somma 2004).

Wang *et al.* (2012) menyatakan bahwa metode CTAB merupakan metode yang efisien untuk menghilangkan molekul kotoran seperti polifenol, polisakarida dan protein dan memisahkan DNA

larut air tanpa adanya kontaminasi dari RNA. Pelisisan dengan bufer CTAB sudah sangat umum dilakukan untuk ekstraksi DNA rumput laut (Phillips *et al.* 2001, Alvarez *et al.* 2006, Tuney dan Sukatar 2010, Maeda *et al.* 2013). Banyaknya penggunaan pelisisan dengan bufer CTAB dapat disebabkan karena komponen-komponen penyusunnya yang sudah kompleks dan mampu mengisolasi DNA dari komponen makromolekul lainnya yang dapat menghambat DNA saat diamplifikasi dengan PCR. Komponen-komponen tersebut diantaranya EDTA, PVP dan  $\beta$ -merkaptoetanol. Chakraborty *et al.* (2008) menyampaikan bahwa EDTA pada bufer ekstraksi dapat memecahkan sel dan mencegah aktivitas degradasi DNA. Penambahan PVP dan  $\beta$ -merkaptoetanol berfungsi untuk penghilangan senyawa fenolik. Kedua senyawa ini akan mengikat senyawa fenolik dan membantu dalam penghilangan senyawa fenol (Angeles *et al.* 2005).

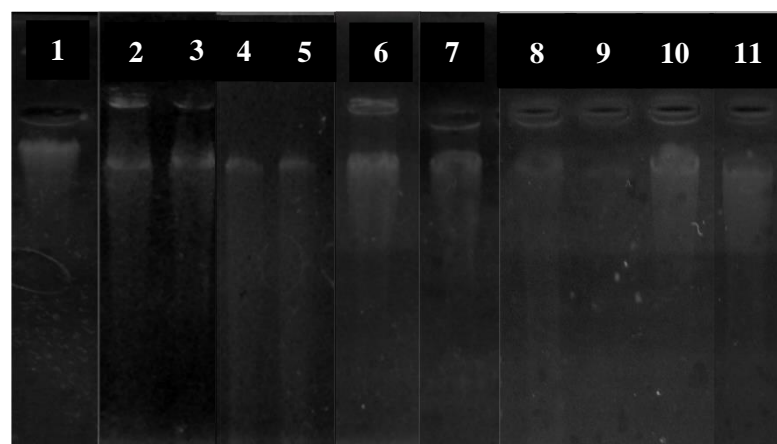
Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan RNase dan kloroform:isoamilalkohol (CIA (24:1)). Enzim RNase digunakan untuk menghancurkan RNA sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Kloroform dan isoamilalkohol (24:1) ditambahkan untuk membersihkan isolat dari komponen pengotor. Azmat *et al.* (2012) menyampaikan bahwa penambahan kloroform dan isoamil-alkohol dimaksudkan untuk membersihkan DNA dari protein, dan senyawa pewarna pada tumbuhan tersebut seperti klorofil dan pigmen warna tumbuhan.

Metode II merupakan modifikasi dari metode I. Metode II menggunakan reagen-reagen isolasi dan ekstraksi DNA yang sama dengan metode I. Perbedaan metode II dengan metode I adalah adanya perendaman sampel dengan larutan 0.1%  $\beta$ -merkaptoetanol sebanyak 1 ml sebelum proses isolasi dan ekstraksi DNA. Perendaman ini dilakukan untuk menghilangkan kandungan polisakarida alga merah di awal sebelum proses isolasi dimulai (Maeda *et al.* 2013).

Dalam metode III, penghancuran sel dilakukan dengan *extraction buffer* yang mengandung ethylenediamine tetraacetic (EDTA), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dan Triton X-100. EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium (ion ini berfungsi untuk mempertahankan aktifitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat). SDS dan Triton X-100 merupakan sejenis deterjen yang berfungsi merusak membran sel dan menyebabkan pecahnya kromosom (Tenriulo *et al.* 2001). Berbeda dengan metode I dan II, metode III menggunakan proteinase-K untuk membersihkan DNA dari protein. Chakraborty *et al.* (2008) menyampaikan bahwa penambahan proteinase-K dimaksudkan untuk memecah protein menjadi asam amino bebas selama inkubasi berlangsung.

Metode IV merupakan metode modifikasi Dellaporta *et al.* (1983) oleh Wattier *et al.* (2000) yang bertujuan untuk mengurangi ikut terisolasinya (*co-isolation*) polisakarida dan untuk memudahkan prosedur ekstraksi dalam jumlah yang besar. Pada metode ini dilakukan penambahan nitrogen cair untuk mempermudah proses penggerusan (Ardiana 2009). Berbeda dengan 4 metode lainnya, dalam metode ini suhu yang digunakan saat inkubasi proses lisis sebesar 37°C. Penggunaan suhu tersebut dimaksudkan untuk mengurangi polisakarida yang ikut terekstrak. Hu *et al.* (2004) menyampaikan bahwa inkubasi lisis pada suhu tinggi (65°C) dapat menyebabkan terekstraksinya polisakarida dalam jumlah yang tinggi, sedangkan inkubasi lisis pada suhu rendah (25°C) dapat menghambat aktivitas endonuklease dan menyebabkan sedikitnya DNA yang terekstraksi saat proses isolasi dan ekstraksi DNA. Perbedaan lain pada metode ini adalah tidak digunakannya CIA (24:1) untuk mengekstraksi DNA dari kontaminasi-kontaminasi protein yang terdapat pada rumput laut.

Metode V merupakan modifikasi metode III (Tenriulo *et al.* 2001) dan Hughey *et al.* (2001). Pada metode ini dilakukan penambahan nitrogen cair dan presipitasi dengan garam dingin (Kalium asetat 5M) sebelum proses pencucian dengan CIA (24:1). Penambahan garam dingin ini merupakan salah satu langkah penting yang digunakan untuk mengeliminasi polisakarida yang terdapat dalam rumput laut (Wattier *et al.* 2000, Hu *et al.* 2004). Pada metode IV dan V dilakukan sentrifugasi dengan suhu 4°C pada tahapan presipitasi protein dan DNA. Hu *et al.* (2004) menyatakan bahwa sentrifugasi pada suhu 4°C merupakan faktor penting untuk mengeliminasi polisakarida.



Gambar 1 Hasil isolasi DNA Alga Merah Cipatujah

Keterangan: Metode I (Garis 1,2,3); Metode II (Garis 4,5); Metode III (Garis 6,7); Metode IV (Garis 8,9), Metode V (10,11)

Gambar 1 merupakan hasil elektroforesis isolat DNA dengan berbagai metode. DNA dengan kualitas baik diperlihatkan dari hasil elektroforesis yang bagus yang memperlihatkan pita DNA yang utuh, tidak *smear* dan bersih dari zat-zat pengotor (protein, polisakarida, polifenol). Alvarez *et al.* (2006) menyampaikan bahwa DNA yang baik diperlihatkan dari tidak adanya DNA yang terdegradasi saat elektroforesis. DNA yang dihasilkan sudah cukup tebal namun masih agak kotor karena pita yang terbentuk memperlihatkan adanya *smear* yang menandakan masih adanya zat pengotor.

Tabel 4 Nilai konsentrasi DNA, rasio A260/A280 dan rasio A260/A230 isolat DNA yang berasal dari Pantai Cipatujah, Tasikmalaya-Jawa Barat

Metode	Konsentrasi DNA (ng/μg)	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230
1.1	82,5	4,02	1,65	0,94	1,76	0,41
1.2	81	3,95	1,62	0,91	1,79	0,41
1.3	97,9	4,36	1,96	1,06	1,85	0,45
2.1	129,7	7,87	3,618	2,3	1,57	0,46
2.2	110	4,68	2,2	1,314	1,67	0,47
2.3	110,5	4,70	2,21	1,321	1,67	0,47
3.1	114,7	4,79	2,3	1,25	1,83	0,48
3.2	120,9	5,04	2,42	1,33	1,82	0,48
3.3	110	2,27	1,11	0,6	1,85	0,49
4.1	107,9	10,79	2,158	1,453	1,49	0,2
4.2	110,9	10,57	2,219	1,497	1,48	0,21
4.3	233,4	17,95	4,667	3,205	1,46	0,26
5.1	122	6,42	2,44	1,648	1,48	0,38
5.2	34,2	2,36	0,683	0,436	1,57	0,29
5.3	35,4	2,36	0,709	0,467	1,52	0,3

Tabel 1 memperlihatkan konsentrasi DNA, rasio A260/A280, dan rasio A260/A230. Rasio A260/A280 dan A260/A230 dilakukan untuk mengevaluasi tingkat protein dan *humic acid impurities* (Zhou *et al.* 1996). DNA berkualitas tinggi adalah DNA yang memiliki nilai A260/280 (kemurnian) dan nilai A260/230 yang tinggi (Chan *et al.* 2004).

Metode I menghasilkan DNA dengan konsentrasi DNA yang berkisar antara 73,6-97,9 ng/μg, dengan A260/280 dan A260/A230 secara berturut-turut sebesar 1,66-1,85 dan 0,41-0,45. Metode II menghasilkan DNA dengan konsentrasi DNA yang berkisar antara 110-136,3 ng/μg, dengan A260/280 dan A260/A230 secara berturut-turut sebesar 1,53-1,67 dan 0,31-0,47. Metode III menghasilkan DNA dengan konsentrasi DNA yang berkisar antara 82,4-120,9 ng/μg, dengan A260/280 dan A260/A230 secara berturut-turut sebesar 1,6-1,83 dan 0,48-0,62.

DNA yang dihasilkan pada beberapa metode isolasi ini masih dibilang belum terlalu bagus karena masih memiliki rasio A260/A230 yang sangat rendah ( $<1,7$ ). DNA yang memiliki rasio A260/A280 dan A260/A230  $<1,7$  dan  $2,0$  belum bisa dikatakan murni (Sambrook and Russell 2001), terutama pada rasio A260/A230. Snirc *et al.* (2010) menyampaikan bahwa absorbansi A260/A230 lebih sensitif dibandingkan dengan absorbansi A260/A280 untuk menginterpretasikan konsentrasi pengotor dalam sebuah isolat DNA. Sehingga rasio A260/A230 lebih informatif karena kontaminan-kontaminan termasuk protein dan polisakarida lainnya lebih kuat terserap pada absorbansi 230 dibandingkan dengan absorbansi 260. Tingginya rasio A260/A280 dari beberapa metode yang telah dilakukan dapat disebabkan karena digunakannya reagen-reagen yang mampu mengeliminasi protein dan RNA seperti proteinase-K dan RNase. Sim *et al.* (2013) menyampaikan bahwa rasio A260/A230 menunjukkan kontaminasi komponen-komponen polisakarida atau polifenolik pada makroalga. Rendahnya rasio A260/A230 dapat disebabkan karena tingginya komponen-komponen pengotor (polisakarida, polifenol, agar, dan lain-lain) pada alga merah yang berasal dari Pantai Cipatujah ini. Komponen polisakarida dan polifenolik sering ikut terpresipitasi dengan DNA selama proses ekstraksi dan hal inilah yang mempengaruhi kualitas dan kuantitas dari isolat DNA (Wang *et al.* 2008).

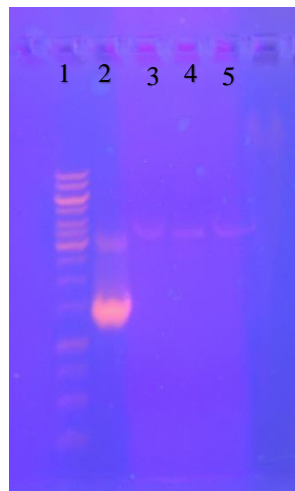
Tingginya polisakarida dan metabolit-metabolit sekunder yang dihasilkan setelah proses lisis menyebabkan isolat DNA yang terbentuk menjadi kental (*viscous*) (Ho *et al.* 1996) dan dapat menyebabkan kualitas isolat DNA kurang bagus (Sim *et al.* 2013). Tingginya zat-zat pengotor ini diduga menjadi penyebab tingginya konsentrasi DNA yang didapatkan. Snirc *et al.* (2010) menyampaikan bahwa tingginya kontaminan yang terabsorpsi pada A230 (RNAs, polisakarida/alginat, polifenol, protein, peptida, karbohidrat, dan garam organik) dapat menyebabkan estimasi berlebih terhadap konsentrasi DNA.

Berdasarkan hasil elektroforesis dan hasil uji kemurnian, metode I dan metode III merupakan metode terbaik dari beberapa metode yang telah dilakukan. Hal ini dikarenakan kedua metode ini memperlihatkan pita DNA yang tebal dan paling bersih dibandingkan metode lainnya. Keemurnian kedua metode (I dan III) yang diperlihatkan oleh nilai A260/A280 dan A260/A230 juga lebih tinggi dibandingkan dengan ketiga metode lainnya.

- Amplifikasi isolat DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* dilakukan untuk mengamplifikasi atau memperbanyak DNA yang telah dihasilkan. Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer GazR1 dan

GazF1 (Saunders 2005). Proses amplifikasi dengan PCR pada penelitian ini juga dilakukan optimalisasi terlebih dahulu. Optimalisasi dilakukan dengan modifikasi suhu *annealing* dan dengan mengubah konsentrasi reagen-reagen PCR seperti MgCl<sub>2</sub>, dNTP, dan primer menurut studi-studi literatur (Hajibabaei *et al.* 2005). Amplifikasi PCR sudah dilakukan berulang kali pada isolat DNA dari metode I dan III hanya saja belum menghasilkan hasil yang diinginkan. Ketidakberhasilan PCR ini diduga karena terdapat senyawa-senyawa *inhibitor* pada isolat DNA yang menginhibisi proses PCR. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji inhibitor isolat DNA secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis di *agarose* 1%. Hasil elektroforesis diperlihatkan pada Gambar 3.



Gambar 3 Hasil elektroforesis uji inhibitor isolat DNA pada reaksi PCR secara kualitatif

Keterangan: 1: Marker, 2: Kontrol Positif, 3,4,5: Kontrol positif+Isolat DNA alga merah Pantai Cipatujah

Gambar 3 memperlihatkan adanya aktivitas inhibitor isolat DNA pada reaksi PCR (Garis 3,4,5). Aktivitas inhibitor ini dapat disebabkan oleh beberapa hal. Hong *et al.* (1997) dalam penelitiannya menemukan ada beberapa spesies yang tidak menghasilkan produk PCR dan hal ini dapat disebabkan adanya inhibitor DNA polimerase. Jin *et al.* (1997) menguji inhibitor PCR dari 70 spesies alga cokelat dan hijau. Spesies seperti *Colpomenia bullosa* (Saunders) Yamada, *Sargassum thunbergii* (Mertens ex. Roth) Kuntze, *Symphyocladia latiuscula* (Harvey) Yamada, and *Ulva sp.* memperlihatkan aktivitas inhibitor yang sangat tinggi dalam reaksi PCR.

Inhibitor-inhibitor PCR diantaranya meliputi komponen fenolik (Koonjul *et al.* 1999), polisakarida (*dextran sulphate*, asam alginat), protein, dan lemak (Demeke dan Jenkins 2010). Holden *et al.* (2003) menyampaikan bahwa polisakarida seperti asam glukoronat, dekstran, dekstran sulfat, pati (*starch*) dan asam alginat merupakan senyawa-senyawa inhibitor PCR.

Tingginya kandungan polisakarida yang ikut terpresipitasi, dan adanya komponen inhibitor seperti polifenol dan metabolit sekunder lainnya juga mempengaruhi reaksi enzimatik baik secara langsung atau tidak langsung termasuk di dalam reaksi amplifikasi PCR (Padmalatha dan Prasad 2006). Inhibitor pada isolat DNA dan mengurangi efisiensi reaksi PCR dan berkontribusi terhadap hasil PCR yang tidak akurat. Inhibitor dapat menghambat amplifikasi PCR dengan mempengaruhi ekstraksi DNA, membentuk kelat dengan  $Mg^{2+}$  (kofaktor untuk semua DNA polimerase termasuk Taq-polimerase) atau dengan berikatan dengan DNA cetakan (DNA *template*) (Demeke dan Jenkins 2010).

Tabel 5 Tabel pencapaian proses yang telah dilakukan

No.	Tahapan yang dilakukan	Persen Capaian	Capaian keseluruhan
1	Koleksi Sampel	100%	
2	Isolasi DNA	80%	
3	Amplifikasi DNA	40%	55%
4	Sequencing DNA dan analisis data	0%	

## DAFTAR PUSTAKA

- Ardiana DW. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian* 14(1): 12-16.
- Syafrina RA. 2011. Penggunaan DNA *barcode* sebagai alternatif identifikasi spesies udang mantis [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Alvarez VE, Andreakis N, Lago-Leston A, Pearson GA, Serrao EA, Procaccini G, Duarte CM, Marba N. 2006 Genomic DNA isolation from green and brown algae (*Caulerpales* and *Fucales*) for microdatellite library construction. *J. Phycol* 42: 741-745.
- Asahida T, Kabayashi T, Saitoh K, Nakayama I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish store at ambient temperature using buffer containing high concentration of urea. *Fisheries Science* 62(5):727-730.
- Azmat MA, Khan IA, Cheema HMN, Rajwana IA, Khan AS, Khan AA. 2012. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 13(4): 239-243.
- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Estrella MC, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Tudela JLR, Sutton D, Velegraki A, Wickes BL. 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 47(4): 877-884.
- Cann SA, Van Netten JP, Van Netten C. 2000. Hypothesis: Iodine, Selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control* 11:121-7.
- Chakraborty S, Vijayan K, Nair CV, Santra SC, Bhattacharya T. 2008. Isolation and characterization of high quality DNA from marine benthic macroalgae. *J. Environ. Biol.* 29(6): 907-910.

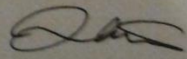
- Chan CX, Teo SS, Ho CL, Othman RY, Phang SM. 2004. Optimisation of RNA extraction from *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 16: 297-301.
- Eitsuka T, Nakagawa K, Igarashi M, Miyazawa T. 2004. Telomerase inhibition by sulfoquinovosyldiacylglycerol from edible purple laver (*Porphyra yezoensis*). *Cancer Lett.* 212:15-20.
- Ernawati NML. 2008. Karakterisasi fenotipik dan molekuler bakteri patogen serta epidemi penyakit hawar daun bakteri pada bibit tanaman *Acacia crassicarpia* [thesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Faatih M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Terbitan Berkala Ilmiah* 10(1): 61-67.
- Hebert PDN, Gregory TR. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54(5): 852-859.
- Ho CL, Phang SM, Sinnappah ND, Pang T. 1996. Molecular approaches in the taxonomy of the red and brown seaweeds. In: Chaudary BR, Agrawal SB (eds) *Cytology. Genetics and Molecular Biology of Algae*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, pp 351-362.
- Hong YK, Sohn CH, Lee KW, Kim HG. 1997. Nucleic acid extraction conditions from seaweed tissues for polymerase chain reaction. *J. Mar. Biotechnol* 5:95-9.
- Hughey JR, Silva PC, Hommersand MH. 2001. Solving taxonomic and nomenclatural problems in pacific Gigartinales (Rhodophyta) using DNA from type material. *J. Phycol.* 37: 1091-1109.
- Jin HH, Kima JH, Sohn CH, De Wreede RE, Choi TJ, Towers GHN, Hudson JB, Hong YK. 1997. Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. *J. Appl. Phycol.*, 9:383-8.
- Julisaniah NI, Sulistyowati L, Sugiharto AN. 2008. Analisis kekerabatan mentimun (*Cucumis sativus* L.) menggunakan metode RAPD-PCR dan isozim. *Biodiversitas* 9(2): 99-102.
- Kapraun DF. 2005. Nuclear DNA content estimates in multicellular green, red and brown algae: phylogenetic considerations. *Annals of Botany* 95: 7-44.
- Kim JH, Hudson JB, Banister K, Jin HJ, Choi TJ, Towers GHN, Hong YK, De Wreede RE. 1997. Biological activity of seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea: I. Antiviral activity. *Can. J. Bot.*, 75:1656-60.
- Phillips N, Smith CM, Morden CW. 2001. An effective DNA extraction protocol for brown algae. *Phycological Research* 49: 97-102.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 2*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press p 11.63.
- Santoso J, Yumiko Y, Takeshi S. 2004. Mineral, Fatty acid and dietary fiber compositions in several Indonesian seaweeds. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia* 11:45-51.
- Saunders GW. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:1879-1888
- Saunders GW. 2008. A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea-Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86:773-789.
- Shivji MS, Rogers SO, Stanhope MJ. 1992. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 197-203.
- Sim MC, Ho CL, Phang SM. 2013. A simple and effective method for RNA isolation and cDNA library construction from the brown seaweed *Sargassum polycystum* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology* in Springer Science and Business Media Dordrecht 2013.

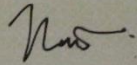


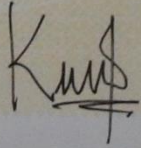
- Siregar IZ, Yunanto T, Pamoengkas P. 2008. Implikasi genetik metode pembiakan tanaman *Shorea johorensis* Foxw pada sistem silvikultur tebang pilih tanam jalur (TPTJ). *Biodiversitas* 9(4): 250-254.
- Snirc A, Silberfeld T, Bonnet J, Tillier A, Tuffet S, Sun JS. 2010. Optimization of DNA extraction from brown algae (Phaeophyceae) based on a commercial kit. *J. Phycol.* 46:616-621.
- Somma M. 2004. Extraction and Purification DNA. World Health Organization Regional Office for Europe: The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms.
- Suryaningrum. 2007. Teknologi penanganan rumput laut. <http://www.bbrrp2b.dkp.go.id> [07 Mei 2013].
- Tenriulo A, Suryati E, Parenrengi A, Rosmiat. 2001. Ekstraksi dna rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dengan metode fenol kloroform. *Marine Chimica Acta*: 6-10.
- Tuney I, Sukatar A. 2010. DNA extraction protocol from brown algae. *Biological Diversity and Conversation* 3(1):51-55.
- Victor BC. 2007. *Coryphopterus kuna*, a new goby (Perciformes: Gobiidae: Gobiinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration. *Zootaxa* 1526: 51-61.
- Wang X, Tian W, Li Y. (2008) Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Mol. Biotechnol.* 38:57-64.
- Wang X, Xiao H, Zhao X, Li C, Ren J, Wang F, Pang L. 2012. Isolation of high-quality DNA from a desert plant *Reaumuria soongorica* in *Genetic Diversity in Plants*. [www.imterchopen.com](http://www.imterchopen.com) [24 September 2013].
- Wattier RA, Prodohl PA, Maggs CA. 2000. DNA isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter* 18:275-281.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Bukti rincian penggunaan dana

No. \_\_\_\_\_  
Telah terima dari Sri Wahyuningsih Ritonga  
Uang sejumlah 200.000  
Untuk pembayaran Lantaran etanol pa 95% 500 ml  
  
Bogor, 24 Januari 2019  
  
Rp. 200.000,- 

No. \_\_\_\_\_  
Telah terima dari Sri Wahyuningsih Ritonga  
Uang sejumlah Dua Ratus tujuh puluh delapan Ribu  
Untuk pembayaran Sewa penginapan, Makan malam,  
Makan siang untuk 3 orang  
  
Bogor, 26 Januari 2019  
  
Rp. 278.000 

No. \_\_\_\_\_  
Telah terima dari Sri Wahyuningsih Ritonga  
Uang sejumlah 600.000,-  
Untuk pembayaran Sewa dan service mobil selama 2 hari  
  
Bogor, 27 Januari 2019  
  
Rp. 600.000 











Lampiran 2 Kegiatan *sampling* di Cipatujah, Tasikmalaya Jawa Barat



Gambar 1 Koleksi sampel alga merah



Gambar 2 Proses pengambilan sampel saat air surut



Gambar 3 Pantai Cipatujah saat menjelang surut