

Deteksi Karakterisasi Dominan Fusan dari Mikroalga *Dunaliella salina* dan *Chlorella vulgaris* menggunakan primer 18SrRNA untuk mengembangkan Produksi Karotenoid

(Detection of Dominant Characterization of Fusant from Microalgae *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* using 18SrRNA primer in Improvement of Carotenoid Production)

Hermin Pancasakti Kusumaningrum ^{a*} dan Muhammad Zainuri ^b,

^a, Lab. of Genetics, Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Diponegoro University, Jl. Prof. Soedarto, SH Tembalang, Semarang – 50275, Indonesia

^b Marine laboratory. Faculty of Fisheries and Marine Science, Diponegoro University, Jl. Prof. Soedarto, SH Tembalang, Semarang – 50275, Indonesia

Abstract

Natural carotenoids production from microalgae are not yet competitive with their synthetic levels. Protoplast fusion was found to be an efficient method in improving carotenoid production and diversification from fusant of carotenogenic microalgae *D. salina* and *C. vulgaris*. Almost all of the fusant obtained increasing of carotenoid production after the process. Dominant characterization need further to identify the dominant parental genome on fusant using 18SrRNA primer from *Dunaliella* and *Chlorella*. The research was carried out by analyzing amplification of the gene encodes for 18SrRNA of fusant obtained from protoplast fusion between *D. salina* and *C. vulgaris* using both parental. The result indicated that the *Chlorella* more dominant in fusant comparing to *Dunaliella* according to 18SrRNA gene amplification result on fusant and parental.

Abstrak

Produksi karotenod alami belum melebihi produksi karotenoid sintetik. Fusi protoplas merupakan metode yang efisien dalam mengembangkan produksi dan diversifikasi karotenoid fusan dari mikroalga karotenogenik *D. salina* dan *C. vulgaris*. Hampir semua fusan memperlihatkan peningkatan produksi karotenoid setelah aplikasi fusi protoplas. Karakterisasi dominansi induk diperlukan untuk mengidentifikasi genome induk yang lebih dominan dalam fusan menggunakan primer 18SrRNA dari *Dunaliella* and *Chlorella*. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan analisis hasil amplifikasi gen 18SrRNA fusan yang diperoleh dari fusi protoplas antara *D. salina* dan *C. vulgaris*. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa *Chlorella* lebih dominan dalam fusan dibanding *Dunaliella* berdasarkan hasil amplifikasi gen 18SrRNA pada fusan dan induk..

Keywords: microalgae; 18SrDNA; carotenoid; *Dunaliella*; *Chlorella*

* *Corresponding author. E-mail address:* herminsakti@gmail.com

Tel.: +62-024-76480923; fax: +62-024-76480923

1. PENDAHULUAN

Bioteknologi mikroalga berkembang sangat pesat dalam dasawarsa terakhir. Pengembangan kemampuan strain alga secara genetik telah dilakukan menggunakan hibridisasi dan fusi somatik. Tidak hanya hibridisasi intraspecies namun juga hibridisasi interspecies^[1,2]. *D. salina* merupakan mikroalga yang kaya akan β -

karoten dan gliserol^[3,4,5]. *C. vulgaris* menghasilkan zeaxantin dan lutein. Keduanya digunakan dalam aplikasi kesehatan, pangan, kosmetik dan suplemen makanan^[6]. Pengembangan produksi metabolit yang berharga dari kedua mikroalga tersebut dapat dilakukan menggunakan fusi protoplas. Teknik tersebut dipilih karena persilangan antara kedua

mikroalga tidak dapat terjadi secara alami untuk menghasilkan organisme diploid. Teknik ini memungkinkan adanya kombinasi dan penggabungan genom kedua individu secara utuh maupun sebagian. Selain itu kisaran salinitas pada *D. salina* yang lebih lebar dibandingkan dengan *C. vulgaris* akan mengembangkan kemampuan fusan untuk hidup pada lingkungan yang lebih luas^[7,8,9]. Fusi protoplas telah dilakukan terhadap kedua mikroalga dan memperoleh fusan yang menghasilkan pigmen karotenoid yang lebih tinggi dari kedua induknya^[10]. Selain itu aplikasi fusan sebagai suplemen terhadap larva udang juga telah meningkatkan kelulushidupan dan ketahanan terhadap penyakit^[11,12]. Karakterisasi sifat dari fusan selama ini dilakukan melalui pengamatan secara morfologis, produksi metabolit dan uji kimiawi. Uji tersebut bersifat kualitatif, kurang seragam, dan subyektif. Pengukuran karakter fusan perlu dilakukan secara kuantitatif untuk menghitung pertukaran genetik yang telah terjadi antara induk dan fusan setelah fusi protoplas. Besarnya pewarisan sifat kedua induk secara dominan maupun resesif dapat digunakan untuk lebih memperkirakan kemampuan fusan dalam menghasilkan metabolit sekunder dengan lebih akurat. Karakterisasi mikroalga dan fusan juga telah dilakukan menggunakan pendekatan molekuler seperti 18SrRNA, RFLP, AFLP dan mikrosatelit^[13,14,15,16,17,18,19]. Penggunaan 18SrRNA sejauh ini belum pernah dilakukan pada fusan mikroalga. Amplifikasi gen 18SrRNA menggunakan metode PCR, terhadap fusan yang berasal dari induk yang berbeda spesies membutuhkan desain primer yang dapat digunakan untuk kedua induk untuk memfasilitasi perolehan gen tersebut pada fusan. Kedua primer tersebut meliputi primer hulu dan hilir. Desain primer merupakan tahap yang paling penting untuk memperoleh gen yang sama dari individu yang berbeda. Umumnya peneliti menggunakan primer universal untuk melacak gen 18SrRNA pada prokariot. Namun tidak sedikit yang menggunakan primer degenerate untuk memfasilitasi perubahan basa yang terjadi diantara mikroalga dalam spesies yang sama maupun yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen 18SrRNA fusan menggunakan primer degenerate dan primer universal untuk karakterisasi fusan *D. salina* dan *C. vulgaris* secara genetik. Metode yang

digunakan adalah melakukan amplifikasi gen 18SrRNA pada fusan lalu dibandingkan dengan parental.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. *D. salina* dan *C. vulgaris*

Mikroalga *D. salina* dan *C. vulgaris* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Perairan Air Payau (BBPBAP) Jepara Indonesia. Pertumbuhan dilakukan dalam tangki air yang diaerasi 2-4 ppm dan iluminasi homogen sebesar 1000-2000 lux dan agitasi 200 rpm^[20]. Suhu diatur pada 25-28°C dan salinitas 30-32‰. Tangki air dibersihkan setiap hari. Kultivasi mikroalga diperkaya dengan media Walne.

2.2. Media

Media Walne dibuat dengan komposisi : EDTA 45 g/L, FeCl₃.6H₂O 1.3 mg/L, H₃BO₃ 33.6 g/L, MnCl₂.4H₂O 0.36 g/L, NH₄NO₃ 100 g/L, Na₂PO₄ 20 g/L, B₁₂ vitamin 0.001 ppm, air steril sampai 1 l. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit 15 lb/in² (103 kPa and 120°C). Medium diatur pada pH to 7.6 dengan HCl atau NaOH lalu digunakan dengan menambahkan 5-10 ml medium dalam 1L air laut^[21].

2.3. Ekstraksi DNA

Penyiapan DNA genom dilakukan melalui modifikasi metode CTAB^[22,23]. Penyimpanan DNA hasil ekstraksi dilakukan pada suhu -20 °C atau digunakan secara langsung untuk PCR.

2.4. Amplifikasi fragmen gen 18SrDNA mikroalga

Fragmen 18S rDNA fusan dan induk dilakukan menggunakan beberapa primer. Primer tersebut adalah primer untuk *D. salina*^[24,25], *C. vulgaris*^[26] dan fusan yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen 18SrRNA fusan menggunakan PCR

Primer	Urutan basa (5' to 3')	Target
18S FChlo	CGG AGA RGG MGC MTG AGA	<i>Chlorella</i>
18S RChlo	GGG CGG TGT GTA CAA RGR	<i>Chlorella</i>
18S FDuna	GTAGTCATATGCTTGCT	<i>Dunaliella</i>
18S RDuna	GCTGGCACCASACTTGCCCT	<i>Dunaliella</i>

Campuran reaksi PCR terdiri atas 50 ng DNA genom, 0,1 bufer PCR (KAPA) 10x, a 10 mM dNTPs (KAPA), 2.5 pmol primer, 0.625 U *Taq* Extra Hotstart DNA Polymerase dan ddH₂O

sampai volume 25 µl. Kondisi PCR dilakukan berdasarkan protokol yang terdapat dalam kit. Reaksi PCR untuk memperbanyak fragmen 18SrDNA dilakukan menggunakan gradien PCR *T-Gradient thermocycler* (Biometra GmbH, Gottingen, Germany). Elektroforesis untuk visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan 1% gel agarose. Kondisi PCR untuk primer *D. salina* menggunakan gradien PCR adalah denaturasi awal 3 menit pada 94°C, denaturasi 25 detik pada 94 °C, *annealing* 15 detik pada 45-63°C, elongasi selama 50 detik pada 72°C, elongasi akhir pada 72°C selama 1 menit, siklus reaksi sebanyak 25x. Kondisi PCR untuk primer *C. vulgaris* menggunakan gradien PCR adalah denaturasi awal 30 detik pada 98°C, denaturasi 10 detik pada 98°C, *annealing* 30 detik pada 45-63°C, elongasi selama 2 menit pada 72°C, elongasi akhir pada 72°C selama 10 menit, siklus reaksi sebanyak 30x.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Desain dan Primer analisis *in silico*

Penelitian ini dilakukan menggunakan dua jenis primer yaitu primer universal dan primer degenerasi. Primer universal yang digunakan adalah primer hilir untuk *C. vulgaris* 1492R 5'-ACCTTGTTACGRCTT-3' [25] sedangkan primer degenerasinya yaitu primer hulu untuk eukariot 360FE 5'-CGGAGARGGMGCMTGAGA-3' [24]. Berdasarkan pasangan primer yang digunakan

untuk *C. vulgaris* maka hasil analisis memberikan akan memberikan kombinasi primer hulu menjadi 8 kombinasi. Primer hilir menghasilkan 4 kombinasi. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer tersebut pada *C. vulgaris* ternyata menghasilkan panjang ampikon yang berbeda-beda yaitu dua fragmen berukuran 365 pb dan 630 pb (Gambar 1).

Primer *D. salina* adalah primer yang digunakan untuk gen 18S ribosomal RNA untuk genus *Dunaliella* [20]. Primer hulu bukan merupakan primer degenerasi sehingga hanya ada satu macam produk sedangkan primer hilir menghasilkan 2 kombinasi. Semua kombinasi primer tersebut diperlihatkan pada Tabel 2. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer tersebut ternyata akan tetap menghasilkan satu ampikon yang berukuran 1962 pb.

Hasil analisis primer *in silico* diikuti dengan pola penempelan primer memperlihatkan bahwa kombinasi primer universal dan primer degenerasi untuk amplifikasi gen 18SrRNA *D. salina* dan *C. vulgaris* dapat menghasilkan ampikon dengan ukuran yang sama maupun berbeda. Primer degenerasi memang merupakan primer dengan kumpulan basa yang dirancang dengan berbagai kemungkinan diantara 2 sampai 4 basa agar dapat menjaring fragmen hasil amplifikasi pada gen yang sama pada spesies yang sama maupun spesies yang berbeda, misalnya R akan menjaring basa A maupun G dan seterusnya.

Tabel 2. Hasil analisis primer *C. vulgaris* dan *D. salina in silico*

Primer	Urutan basa (5' to 3')	Primer	Urutan basa (5' to 3')	primer Degenerasi	Organisma target	Panjang ampikon (pb)
18SFChlo :	CGGAGAR GGM GCMTGAGA	18SRChlo :	GGGCGGTGTGTACA ARGR	R=A/G,M=A/C	<i>Chlorella</i>	
18SFChlo1	CGGAGA AGGAGCA TGAGA	18SRChlo1	GGGCGGTGTGTACA AGA		<i>Chlorella</i>	365
18SFChlo2	CGGAGA AGGCGCA TGAGA	18SRChlo2	GGGCGGTGTGTACA AAGG			365
18SFChlo3	CGGAGA AGGAGCC TGAGA	18SRChlo3	GGGCGGTGTGTACA AGGA			630
18SFChlo4	CGGAGA AGGCGCC TGAGA	18SRChlo4	GGGCGGTGTGTACA AGGG			630
18SFChlo5	CGGAG AGGGCC TGAGA					630
18SFChlo6	CGGAG AGGGCGCA TGAGA					630
18SFChlo7	CGGAG AGGAGCA TGAGA					630
18SFChlo8	CGGAG AGGAGCC TGAGA					630
18SFDuna	GTAGTCATATGCTTGTCT	18SRDuna :	GCTGGCACC S ACTTGCCT	S=C/G	<i>Dunaliella</i>	1962
		18SRduna1	GCTGGCACC C ACTTGCCT	S=C/G	<i>Dunaliella</i>	1962
		18SRDuna2	GCTGGCACC G ACTTGCCT		<i>Dunaliella</i>	1962

Pada hasil penelitian ini, penempelan primer diujicobakan pada *C. vulgaris* pada Gen Bank dengan no akses AY591515 dan *D. salina* dengan nomor akses M84320. Strain tersebut merupakan strain yang memiliki gen 18SrRNA yang utuh dan lengkap (*full length*). Umumnya

gen 18S rRNA dan gen 18SrDNA *C. vulgaris* dan *D. salina* pada GenBank merupakan sebagian atau *partial fragment* dari gen. Bila melihat kombinasi primer dan hasil analisis *in silico* maka terlihat bahwa *C. vulgaris* memiliki urutan basa yang bervariasi pada daerah lestari. Hal ini


```

          *      1040          *      1060          *      1080          *      1100
D. salinaM84320 : AAACGATGCCGACTAGGGATTCACAGGTGTTTCGTTGATGACCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTGGGTCCGG :1099
C. vulgarisAY591515: AAACGATGCCGACTAGGGATTCACAGGTGTTTCGTTGATGACCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTGGGTCCGG :1090
18SRChlo3       : GGGCGGTGTGTACAAGGA
18SRChlo4       : GGGCGGTGTGTACAAGGG
aaacgatgccgactaggat g c g tgtttc t gatgac c gcc gcaacctatgagaaatcaaagtttttgggttccgg

          *      1120          *      1140          *      1160          *      1180
D. salinaM84320 : GGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTTAACTTAGCAGCAAGCTCA :1178
C. vulgarisAY591515: GGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT----- :1150
ggggagtatggtcgcaaggctgaaacttaaggaattgacggaagggcaccaccaggcgt

          *      1200          *      1220          *      1240          *      1260
D. salinaM84320 : GCGCCTCAAAGTCGAAGGAAACCTTTGGCTAGTATCTGGGTGATAGATTTACCTAAGTGCAACACTGTTCAAATTGCG :1257
C. vulgarisAY591515: ----- : -

          *      1280          *      1300          *      1320          *      1340
D. salinaM84320 : GGAAAGCCCTAAAGCTTTGCTAACCAAGCTGTCCTAGAAATGGGATGGTGCCAGGTGAAAGACCTTGGGTACGGTAAA :1336
C. vulgarisAY591515: ----- : -

          *      1360          *      1380          *      1400          *      1420
D. salinaM84320 : ATCAGCAAAGATGCAACAATGGGCAATCCGACGCAAGCTCCTACGGGTGTCAAAGCCTATGGAGAAGGTTACAGAG :1415
C. vulgarisAY591515: ----- : -

          *      1440          *      1460          *      1480          *      1500
D. salinaM84320 : TAAATGGCAGTGGCAAGCATGGCAATGCTTGCTTAAAGATATAGTCCGTCACAGCTGAGAAGCTGCCTATGAGAGGAAT :1494
C. vulgarisAY591515: ----- : -

          *      1520          *      1540          *      1560          *      1580
D. salinaM84320 : GCCGTAAGGCAGGAGAGCTAATAGGAAGTAAAGTGTCTTAACTCAACTTACTTGGATTCCAGCGGAGCCTGCGGCTTAAT :1573
C. vulgarisAY591515: -----GGAGCCTGCGGCTTAAT :1167
ggagcctgcggtttaa

          *      1600          *      1620          *      1640          *      1660
D. salinaM84320 : TTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCAGACACCGGGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCCTGG :1652
C. vulgarisAY591515: TTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCAGACACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCCTATGG :1246
ttgactcaacacgggaaaacttaccaggctccagaca g gaggattgacagattgagagctcttcttgattct tgg

          *      1680          *      1700          *      1720          *      1740
D. salinaM84320 : GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCCTTGTGAGGTTGATTCGGTAACGAAACGAGAACCTCAGCCTGCT :1731
C. vulgarisAY591515: GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCCTTGTGAGGTTGATTCGGTAACGAAACGAGAACCTCAGCCTGCT :1325
gtggtggtgcatggccgttcttagttggtgggtgccttgtcaggttgattccgtaacgaacgagacctcagcctgct

          *      1760          *      1780          *      1800          *      1820
D. salinaM84320 : AAATAGTCACGCTTACCTCGGTAGGCGCCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCCTTAGCCAAATGAAGTGTGAGGCAA :1810
C. vulgarisAY591515: AAATAGTCACGCTTGGCTCGCCAGCGCGGCGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCCTTAGCCAAATGAAAGTGTGAGGCAA :1403
aaatagtcacg t ctcg ag cg c gacttcttagaggactattggcg tagccaatg aag tgaggcaa

          *      1840          *      1860          *      1880          *      1900
D. salinaM84320 : TAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTTAGCCTTGCC :1889
C. vulgarisAY591515: TAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTTAGCCTTGCC :1482
taacaggtctgtgatgcccttagatgttctgggcccacgcgctacactgatgcattcaacgagc ta ccttgccc

          *      1920          *      1940          *      1960          *      1980
D. salinaM84320 : GAGAGCTCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGCTCTTCAACGAGGAATGCC :1968
C. vulgarisAY591515: GAGAGCTCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGCTCTTCAACGAGGAATGCC :1561
gagagg ccgggtaactttgaaactgcacgtgatgggagatattgcaattatta tcttcaacgaggaatgcc

          *      2000          *      2020          *      2040          *      2060
D. salinaM84320 : TAGTAAGCGGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTAAGTCTGCGCTTGTACACACCGCCCGCTCGCTCCTACCGATTGGG :2047
C. vulgarisAY591515: TAGTAAGCGGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTAAGTCTGCGCTTGTACACACCGCCCGCTCGCTCCTACCGATTGGG :1640
18SRDuna1       : -----GCTGGCACACACTTGGCCCT-----
18SRDuna2       : -----GCTGGCACACACTTGGCCCT-----
tagtaagcgc agtcacagct gcGtTGattaCgtcCtTGCCCTttgtacacaccgcccgtcgctcctaccgattggg

          *      2080          *      2100          *      2120          *      2140
D. salinaM84320 : TGTGCTGGTGAAGTGTTCGATCGGTACCAATGGGGGGAAACCTCTCTTGTGCT-ATTGAGAAGCAACATTAAACCCCTCCCA :2125
C. vulgarisAY591515: TGTGCTGGTGAAGTGTTCGATCGGTACCAATGGGGGGAAACCTCTCTTGTGCT-ATTGAGAAGCAACATTAAACCCCTCCCA :1719
tgtgctggtgaagtgtt ggat gg c ggg gg cc ct t gg c gagaag cattaaaccctccca

          *      2160          *      2180          *      2200
D. salinaM84320 : CCTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCAAGAGGATCA : 2182
C. vulgarisAY591515: CCTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCAAGAGGATCA : 1776
cctagaggaaggagaagtcgtaacaaggtttccgtaggtgaacctgc gaaggatca

```

Gambar 1. Hasil amplifikasi in silico menggunakan pasangan primer universal dan degenerasi pada *D. salina* dan *C. vulgaris*

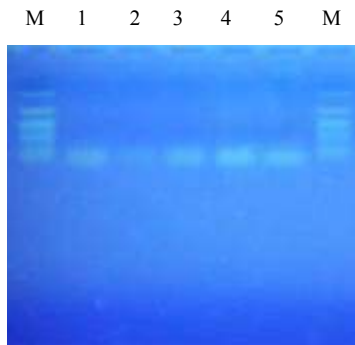
Hasil analisis urutan basa gen 18SrRNA lengkap dari *D. salina* dan *C. vulgaris* memperlihatkan homologi sebesar 77%. Hal ini berarti diantara kedua mikroalga terdapat daerah

lestari lebih dari 75% walaupun keduanya berbeda genus.

3.2. Hasil Amplifikasi menggunakan primer

D. salina dan *C. vulgaris*

Hasil amplifikasi menggunakan kedua pasang primer diperlihatkan pada Gambar 2-4. Amplifikasi terhadap kedua induk dan fusan menggunakan kedua pasang primer menggunakan suhu annealing umum sebesar 50°C ternyata tidak memperlihatkan amplicon target (Gambar 2). Hal ini menunjukkan kedua induk dan fusan selain membutuhkan desain primer yang berbeda juga membutuhkan suhu annealing yang berbeda.

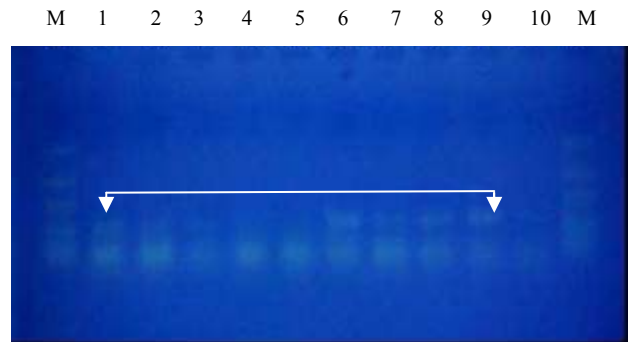


Gambar 2. Hasil amplifikasi fusan dan induk menggunakan primer 18SFDuna dan 18SRDuna.

Keterangan: M = marker, 1 = DS(*D. salina*), 2=CV(*C. vulgaris*), 3 =CP(*C. pyrenoidosa*), DSCVT= DSCV air tawar, DSCVL = DSCV air laut

Hasil amplifikasi lebih lanjut pada suhu annealing bervariasi menggunakan gradien PCR pada fusan menghasilkan pita target. Hasil amplifikasi gen 18S rRNA pada fusan menggunakan primer 18SrDuna dan primerRDuna hampir memperoleh pita target pada semua suhu annealing yang digunakan seperti diperlihatkan pada Gambar 3-5. Hasil ini memperlihatkan implikasi bahwa karakter *C. vulgaris* lebih dominan pada fusan dibandingkan dengan karakter *D. salina*.

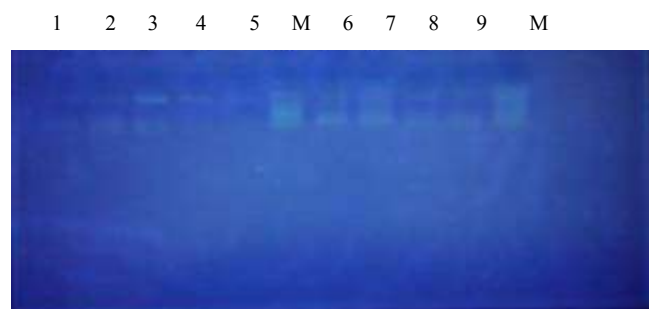
Hasil yang diperoleh ini mendukung hasil analisis *in silico* terhadap pasangan primer yang digunakan. Kombinasi primer tidak akan berpengaruh pada pita DNA target. Primer yang digunakan sebaiknya memperhitungkan ukuran basa, kandungan basa GC, suhu leleh (*melting temperature*) primer [27]. Hasil analisis terhadap kedua pasang primer diperlihatkan pada Tabel 2.



Gambar 3. Amplifikasi gen 18SrDNA fusan menggunakan primer 18SFDuna dan 18SRDuna dengan beberapa suhu annealing menggunakan gradien PCR Keterangan :1=M, 2-10: amplifikasi DSCVL dengan suhu annealing 45°C; 46,6°C; 48,4°C; 50,9°C; 52,9°C; 55,2°C; 57,2°C; 59,9°C; 61,7°C; dan 63°C



Gambar 4. Amplifikasi gen 18SrDNA fusan menggunakan primer 18SFChlo dan 18SRChlo dengan beberapa suhu annealing menggunakan gradien PCR Keterangan :1=M, 2-10: amplifikasi DSCVL dengan suhu annealing 45°C; 45,5°C; 46,6°C; 48,4°C; 50,9°C; 52,9°C; 55,2°C; 57,2°C; 59,9°C; 61,7°C; 62,8°C; dan 63°C



Gambar 5. Amplifikasi gen 18SrDNA fusan menggunakan primer 18SFChlo dan 18SRChlo dengan beberapa suhu annealing menggunakan gradien PCR. Keterangan : DSCVL= fusan *D. salina* dan *C. vulgaris* pada air laut; CVT=*C. vulgaris* pada air tawar ; 1-5 : amplifikasi DSCVL dengan suhu annealing 55°C; 56,5°C; 59,5°C; 61,6°C; 63°C; 6=M; 7-10= CVT dengan suhu annealing 55°C; 56,5°C; 59,5°C; 61,6°C; 63°C

Tabel 2. Hasil analisis primer *D. salina* dan *C. vulgaris*

Primer	Urutan Basa (5'-3')	Tm	% GC	Panjang (pb)
18SFChlo	CGGAGAGGGCTGAGA	51.65	67	15
18SRChlo	GGGCGGTGTGTACAAG	52.05	63	16
18SFDuna	GTAGTCATATGCTTGTCT	40.09	39	18
18SRDuna	GCTGGCACCAACTTGCCCT	64.36	63	19

Panjang primer yang digunakan dalam penelitian ini masih memenuhi ukuran yang standar. Primer yang baik memiliki persyaratan ukuran basa sebesar 16-30 pb. Primer yang memiliki ukuran 18 pb dan kurang dari 30 pb akan meminimalkan struktur sekunder, primer dimer dan pembentukan hairpin. Suhu leleh primer yang baik memiliki kisaran 50°C~62°C. Perbedaan diantara kedua primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C. Nilai Tm yang digunakan dalam penelitian untuk primer *C. vulgaris* masih baik, sebaliknya nilai Tm primer *D. salina* kurang memenuhi persyaratan Tm yang optimal yaitu 52-58°C. Meskipun demikian hasil amplifikasi yang dihasilkan memperlihatkan perolehan fragmen 18S rRNA *D. salina* yang konsisten satu pita. Primer dengan suhu leleh dibawah 40°C dan diatas 65°C akan menghasilkan amplifikasi yang kurang spesifik. Kandungan basa guanin dan sitosin (GC GC%) dalam penelitian ini berada pada kisaran 39-67% dimana kandungan GC yang baik adalah 40-60% [28, 29, 30, 31].

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa desain penggunaan primer merupakan hal yang penting dalam penting amplifikasi gen 18SrRNA untuk menentukan karakter induk yang dominan dalam fusi protoplas. Meskipun *C. vulgaris* lebih dominan dibanding *D. salina* namun fusan juga memperlihatkan hasil amplifikasi yang konsisten dengan induk *D. salina*. Implikasi hal ini memperlihatkan adanya gabungan sifat dari kedua induk *D. salina* dan *C. vulgaris* alam fusan yang berpotensi dalam perolehan gabungan karotenoid dari kedua induk.

4. KESIMPULAN

Identifikasi dominansi genom induk dalam fusan hasil fusi protoplas *D. salina* dan *C. vulgaris* menggunakan primer 18SrRNA dari *Dunaliella* and *Chlorella* memperlihatkan *C. vulgaris* lebih dominan dalam fusan. Meskipun demikian konsistensi hasil amplifikasi gen 18SrRNA *D. salina* memperlihatkan karakternya juga terdapat dalam jumlah besar. Hasil yang diperoleh

mengimplikasikan gabungan karakter yang hampir sepadan dari kedua induk pada fusan yang berpotensi akan adanya gabungan produksi karotenoid kedua induk.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan pada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (Ditlitabmas) Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Ditjen Dikti) Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Tahun Anggaran 2015, yang telah membiayai penelitian ini melalui Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Nomor DIPA – 023.04.02.1.67345/2015 tanggal 14 November 2014 DIPA revisi 01 tanggal 03 Maret 2015.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Lee Y and H. Tan. 1988. Interphylum Protoplast Fusion and Genetic Recombination of the Algae *Porphyridium cruentum* and *Dunaliella* spp. J. of General Microbiology 134.p 635-641.
- [2] Lu, Y., R. Kong, and L. Hu. 2011. Preparation Protoplasts from *Chlorella protothecoides*. *World J. Microbio. Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-011-0963-4.
- [3] Santiago, C.M.Jr. 1982. Protoplast Fusion, A New Techniques for Genetic Manipulation and Breeding of Industrial Microbiology, Annual Report of ICME, Osaka Univ. Japan.p 435 – 440.
- [4] Pulz O. and W. Gross. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. DOI 10.1007/s00253-004-1647-x. Mini review Appl Microbiol Biotechnol. 65: 635–648.
- [5] Preetha, K., L. John, C. S. Subin and K.K. Vijayan. 2012. Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1), p.27. Available at: Saline Systems.
- [6] Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. 1988. *Dunaliella*. In: *Micro-Algal Biotechnology* (ed. Borowitzka, M.A.) & Borowitzka, L.J, pp. 27-58. Cambridge University Press.
- [7] Guedes, A.C. and F.X. Malcata. 2011. Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. *Aquaculture*. p 60-78
- [8] Guedes, A.C., Amaro, H.M. and F.X. Malcata. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*. 9: 625-644.
- [9] Kusumaningrum H.P and M. Zainuri. 2014. Optimization and Stability of Total Pigments Production of Fusan from Protoplast Fusion of Microalgae *Dunaliella* and *Chlorella in vivo* : Attempts an Production of Sustainable Aquaculture Natural Food. *International Journal of Marine and Aquatic Resource Conservation and Co-existence*, 1 (1) : 1-5.

- [10] Zainuri, M, E. Kusdiyantini, Widjanarko, J. Soedarsono and T. Yuwono. 2003. Preliminary Study on the Use of Yeast *Phaffia rhodozyma* as pigment source on the Growth of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Ilmu Kelautan 8 (1) : 47-52
- [11] Boonyaratpalin M, Thongrod S, Supamattaya K, Britton G & L E Schlipalius. 2001. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. Aquaculture Research. 32 : 182-190.
- [12] Kusumaningrum H.P and M. Zainuri. 2015. Detection of Bacteria and Fungi Associated with *Penaeus monodon* Postlarvae Mortality. International Journal Procedia Environmental Sciences , PROENV2395, Elsevier, 31-JAN-2015. DOI 10.1016/j.proenv. 2015. 01. 048. p. 329-337.
- [13] Panaiotov S., Y. Evstatieva, S. Ilieva, V. Levterova, N. Brankova, D. Nikolova, A. Ivanova, V. Stefanova, K. Tankova and A. Ateva. 2009. Quantitative assessment of the dominant genome in fusant cultures. XI anniversary scientific conference biotechnol. & biotechnol. eq. 23/2009/se 120 years of academic education in biology special edition/on-line 45 years Faculty of Biology. National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Dept. of Microbiol. and Dept. of Biotech., Bio. Fac., Sofia Univ. St. Kliment Ohridski, Sofia, Bulgaria.p. 892-895.
- [14] Olmos J., J. Paniagua R. Contreras. 2000. Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. Letters in Applied Microbiology. 30(1):80-84
- [15] Soylu, E.N. & Gönülol, A., 2012. Morphological and 18S rRNA analysis of coccoid green algae isolated from lakes of Kızılırmak Delta. *Turk J Biol*, 36, pp.247–254.
- [16] Ucles, R.M., 2012. Identification of algal strains by PCR amplification and evaluation of their FA profiles for biodiesel production. , p.88.
- [17] Wilcox, L.W., L.A. Lewis, P.A. Fuerst and G.L. Floyd. 1992. Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Molecular biology and evolution*, 9(6), pp.1103–1118.
- [18] Wu, H.L., R.S. Hseu, and L.P.Lin. 2001. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Bot Bull Acad Sin*, (42), pp.115–121.
- [19] Anon, 2014. Identification of Chlorophyceae based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. , 6(6), pp.437–442.
- [20] McVey J.P and J.R. Moore. 1983. Aquacop.. Algal Food Cultures At The Centre Oceanologique du Pacifique.. CRC Handbook of Mariculture : Vol. I. Crustacean Aquaculture. CRC Press.
- [21] Bidwell, J.P. dan S. Spotte. 1983. Artificial Sea Water Formulas and Methods. Jones & Bartlett. p:324-325.
- [22] Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- [23] Ausubel, F., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 3rd Ed . Wiley & Sons. Inc. USA. 2-10.
- [24] Dawson S.C. and N.R. Pace. 2002. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. PNAS 99:8324–8329
- [25] Gerken H.G., B. Donohoe, E.P. Knoshau. 2012. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. Planta. DOI 10.1007/s00425-012-1765-0. p1-15
- [26] Kusumaningrum, H.P. 2010. Cyanobacteria Isolate and *Dunaliella* sp.: Detection of DXS Gene Supporting by Microbiological, Ecophysiological and Molecular Characterization to Improve Carotenoid Production. Proceeding national conference and ISFA (Indonesian Searca Scholar Fellows Association) Congress Agricultural Education for better farming and better living. Semarang Indonesia. p1-10
- [27] Yang, X., P. Liu, Z. Hao, J. Shi, and S. Zhang. 2012. Characterization and identification of Freshwater microalgal strains towards biofuel production. *Algae*, 7, pp.686–695.
- [28] Tezuka, A., N. Matsushima, Y. Nemoto, H.D. Akashi, M. Kawata and T. Makino. 2012. Comprehensive primer design for analysis of population genetics in non-sequenced organisms. *PLoS ONE*, 7(2).
- [29] Moro, C.V., O. Crouzet, S. Rasconi, A. Thouvenot, G. Coffe, I. Batisson and J. Bohatier. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), pp.5729–5733.
- [30] Rose, T.M., Henikoff, J.G. & Henikoff, S., 2003. CODEHOP (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 31(13), pp.3763–3766
- [31] Yang, C., Y. Cheng, H. Chang and L. Chuang. 2010. Primer Design with Specific PCR Product using Particle Swarm Optimization International Journal of Chemical and Biological Engineering 3(1): 18-23