

KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUSAN HASIL FUSI PROTOPLAS ANTARA *Dunaliella salina* DAN *Chlorella pyrenoidosa* DARI BBPBAP JEPARA MENGGUNAKAN 18SrDNA

¹Argianti Wahyu Apsari, ²Budi Raharjo¹Hermin Pancasakti Kusumaningrum dan ³Muhammad Zainuri

¹Laboratorium Genetika

²Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Sains & Matematika, Universitas Diponegoro

³Laboratorium Kelautan

Jurusan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Tembalang, Semarang – 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Email: wahyuapsari@gmail.com

ABSTRACT

Sources of carotenoids are produced by microalgae Chlorophyceae groups, such as *Dunaliella salina* and *Chlorella pyrenoidosa*. *D. salina* that live in sea water is capable of producing carotenoids by 12,6%, mainly β -carotene amounted to 60,4% of total carotenoids. *C. pyrenoidosa* that live in freshwater yield 7 mg of total carotenoids, including 3,5 mg lutein, 0,5 mg α -carotene, 0,6 mg β -carotene and 35 mg chlorophyll. Merging the two microalgae cells with protoplast fusion technique makes it possible to combine the advantages of both microalgae. This study was conducted to determine the results of characterization fusan and relation with other members of Chlorophyta microalgae. Characterization fusan can be seen from the results of homology bases analysis while fusan identification can be seen from the molecular analysis using 18SrDNA. The results showed that the parent fusan DSCP T with *D. salina* has a homology value equal to 79% and fusan DSCP T with the parent *C. pyrenoidosa* homology value of 80%. The identification results are fusan DSCP T 18S *Chlorella* closely with *Chlorella* sp. BUM 11005 which has a similarity value is 96% and fusan DSCP T 18S *Dunaliella* closely with Chlorophyta Uncultured ADEsp 1-7 and *Chlorophyceae* sp. WSH-29 has a similarity value of 81%. Fusan similarity with the parent by 79% -80% indicates that fusan obtained has a combined character of *C. pyrenoidosa* and *D. salina*.

Key Word: Characterization, Moleculer Identificasion, Fusan, Protoplas Fusion, *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella salina*, 18SrDNA

PENDAHULUAN

Sumber karotenoid selain dari tumbuhan adalah dari mikroalga. Mikroalga hijau (Chlorophyta) dapat menghasilkan karotenoid dengan keragaman struktur, sekitar 100 karotenoid yang berbeda telah ditemukan (Britton *et al.*, 1995) dan lebih dari 40 karoten dan xantofil telah diisolasi serta dihasilkan dari karakterisasi mikroalga (Jin *et al.*, 2003). Beberapa jenis Chlorophyta, seperti *Dunaliella salina* mampu mengakumulasi karotenoid sebesar 12,6% dari berat kering, termasuk β -karoten sebesar 60,4% dari karotenoid total, 17,7% astaxantin, 13,4% zeaxantin, 4,6% lutein dan 3,9% kriptoxantin (Abd

El-Baky *et al.*, 2007); (Kusumaningrum dan Zainuri, 2014; Kusumaningrum dan Zainuri 2015a; Kusumaningrum dan Zainuri 2015b; Kusumaningrum dan Zainuri 2015c). *Chlorella pyrenoidosa*, jenis Chlorophyta lainnya, diketahui mampu menghasilkan beberapa jenis karotenoid, setiap gram massa sel kering *C. pyrenoidosa* mengandung karotenoid total 7 mg, meliputi 3,5 mg lutein, 0,5 mg α -karoten, 0,6 mg β -karoten serta 35 mg klorofil (Kusmiati *dkk.*, 2010).

Mikroalga *C. pyrenoidosa* dan *D. salina*, memiliki perbedaan habitat, yaitu habitat *C. pyrenoidosa* di air tawar dan habitat *D. salina* di air laut. Jika kedua mikroalga

tersebut digabungkan dapat meningkatkan keunggulan dari kedua mikroalga tersebut. Salah satu teknik penggabungan yang kerap digunakan yakni fusi protoplas. Fusi protoplas merupakan salah satu teknik rekayasa genetik melalui peleburan antara dua atau lebih protoplas dari spesies yang sama maupun berbeda, sehingga diperoleh organisme hibrida yang memiliki sifat dari kedua parentalnya (Emma, 2007).

Karakterisasi morfologi fusan hasil fusi protoplas dengan membandingkan karakter fusan dengan induk fusan sudah sering dilakukan oleh peneliti lain. Metode karakterisasi tersebut memiliki kemungkinan bahwa mikroalga yang memiliki fenotip sama dapat teridentifikasi menjadi spesies yang sama, padahal secara genetik keduanya belum tentu memiliki kesamaan. Oleh karena itu perlu karakterisasi dan identifikasi lebih lanjut secara molekuler. Karakterisasi dan identifikasi fusan dapat dilakukan dengan membandingkan fusan dengan induk dan mikroalga lain berdasarkan pada urutan basa nukleotida DNA yang menyandinya terutama pada gen 18S rDNA. Penentuan hasil karakterisasi molekuler dilakukan menggunakan primer spesifik yang diamplifikasi dengan PCR sehingga diperoleh sekuen DNA genom.

CARA KERJA

a. Fusi Protoplas

Kultur murni mikroalga berasal dari BBPBAP (Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau) Jepara. Fusi protoplas dilakukan dengan bahan, yaitu 35% PEG 6000 (*Polyethilen Glicol*), enzim Lisozim 20 µg/ml, Glisin 2%, NaCl 3% dan 0,01 M CaCl₂.

Protoplas *D. salina* dan *C. pyrenoidosa* diperoleh dari pemecahan dinding sel dengan 600 µl enzim lisozim, 30 ml NaCl 3% dan 1 ml CaCl₂ pada masing-masing mikroalga. Protoplas dari sel *D. salina* digabungkan dengan protoplas *C. pyrenoidosa* (DSCP) dan ditambah 18 ml

PEG 35%, 3 ml CaCl₂ dan 1,5 ml Glisin kemudian dihomogenkan. Sampel diinkubasi selama 20 menit dalam suhu ruang (30 °C). Sampel yang telah diinkubasi, disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi yang telah dihilangkan supernatannya, dicuci dengan 15 ml penstabil osmotik kemudian ditambah 600 µl CaCl₂, 1,5 ml Glisin dan didiamkan selama 15 menit dalam suhu ruang. Sampel disentrifuge 6000 rpm selama 5 menit, pelet sel yang diperoleh dicuci dengan 5ml penstabil osmotik.

Hasil fusi protoplas yang selanjutnya disebut fusan ditumbuhkan ke dalam 2 macam medium, yaitu air laut dan air tawar. Setiap medium diberi pupuk Walne sebanyak 30 µl diletakkan di bawah sinar lampu dan diamati beberapa hari menggunakan mikroskop.

b. Pengukuran Kadar β-Karoten

Pengukuran kadar β-karoten menggunakan metode modifikasi dari Hejazi *et al.* (2001). Sampel berupa sel fusan, yakni fusan air tawar yang selanjutnya disebut DSCP T dan fusan air laut yang selanjutnya disebut DSCP L, masing-masing sebanyak 2ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 5 ml isopropanol kemudian divortex selama 1-2 menit. Sampel hasil vortex disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam kuvet untuk dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 436 nm. Pengamatan dilakukan menggunakan cairan blanko isopropanol dan membaca nilai transmitent dari tiap sampel. Nilai absorbansi dan penghitungan kadar β-karoten didapatkan dengan rumus menurut AOAC (Deutsch, 1995):

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

Keterangan:

Abs = nilai absorbansi

T = Transmittent yang didapat

Kadar β -karoten didapat dengan menggunakan rumus:

$$\beta\text{-karoten}_{(\mu\text{g/ml})} = (\text{Abs} \times \lambda) : (196 \times l \times (\text{vol awal} : \text{vol akhir}))$$

Keterangan:

Abs = nilai absorbansi

λ = panjang gelombang yang digunakan (nm)

196 = koefisien ekstingsi β -karoten

l = ukuran cuvet yang digunakan

c. Isolasi DNA Genom

Fusan dengan dua perlakuan, DSCP L dan DSCP T dan kedua induk sel, yakni *D. salina* (DS) dan *C. pyrenoidosa* (CP) masing-masing disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 500 μ l CTAB presipitasi kemudian digerus. Hasil gerusan, ditambah dengan 500 μ l CTAB ekstraksi. Sampel diinkubasi dalam suhu 65°C selama 90 menit dan setiap 10 menit sekali dihomogenkan.

Sampel hasil diinkubasi yang telah didinginkan dalam suhu ruang ditambah 450 μ l CIA dan diemulsikan. Setelah terbentuk emulsi, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit.

Fasa cair hasil sentrifugasi dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambah 600 μ l isopropanol. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan, sedangkan pelet dicuci secara berurutan dengan 800 μ l 76% etanol, 100 μ l Na-asetat dan 100 μ l etanol 70%, sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 0,5 menit. Sisa etanol dibuang dan DNA diresuspensi dalam 50-100 μ l bufer TE, disimpan dalam suhu 4°C.

d. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA

Elektroforesis hasil isolasi DNA dilakukan dengan gel agarose konsentrasi 0,8 μ l yang telah diberi 6 μ l *Good view*.

Marker dibuat dengan cara 1 μ l *loading dye* ditambah 4 μ l marker dan 5 μ l aquades. Sampel sebanyak 2 μ l ditambah 2 μ l *loading dye*. Sampel dimasukkan dalam sumur gel agarosa kemudian dimasukkan ke dalam tanki elektroforesis dan direndam dengan 0,5x Bufer TAE, dirunning 50 V selama 25 menit. Visualisasi hasil isolasi DNA menggunakan UV-*Transilluminator*.

e. Gradient Polymerase Chain Reaction (PCR)

Suspensi campuran *gradient* PCR dibuat dengan campuran 2,5 μ l Bufer PCR 10x dari KAPA, 0,25 μ l dNTP *mix* 10 mM dari KAPA, 0,25 μ l KAPA *Taq EXtra Hotstart DNA polymerase* (0,625 U), 1,5 μ l *Primer Forward 18S Dunaliella* (5'-GTAGTCATATGCTTGTCT-3'), 1,5 μ l *Primer Reverse 18S Dunaliella* (5'-GCTGGCACCASACTTGCCCT-3')

(Kusumaningrum, 2013a.), 2 μ l sampel DNA (40 ng) yang telah *dishort-spin* dan 17 μ l ddH₂O. Perbandingan bahan yang digunakan juga sama untuk *primer 18S Chlorella* (F: 5'-CGGAGARGGMGCMTGAGA-3' dan R: 5'-GGGCGGTGTGTACAARGR-3').

Campuran larutan *dishort spin* kembali menggunakan sentrifuge kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Thermal Cycler*).

Kondisi PCR untuk primer 18S *Dunaliella*, yaitu denaturasi awal 94 °C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 25 detik, suhu *annealing* antara 45-63 °C selama 15 detik, ekstensi 72 °C selama 50 detik, ekstensi akhir 72 °C selama 1 menit dan hold pada suhu 4 °C dengan siklus 25 kali. Kondisi PCR untuk primer 18S *Chlorella* yaitu tahap denaturasi awal 98 °C selama 30 detik, denaturasi 98 °C selama 10 detik, suhu *annealing* diatur antara 45-63 °C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 2 menit, ekstensi akhir 72°C selama 10 menit dan suhu hold 4°C dengan siklus 30 kali. DNA yang telah diamplifikasi kemudian dielektroforesis

dan visualisasi hasil *gradient* PCR menggunakan UV-*Transilluminator*.

f. Sekuensing DNA

Produk PCR sebelum disekuensing dimurnikan dan dikonsentrasikan dahulu menggunakan MicroCon-100. Sekuensing dilakukan oleh *DNA Sequencing Service*, Laboratorium Molekuler Sistemika dan Evolusi, di Singapore, menggunakan *sequencer* DNA ABI otomatis. Hasil dari sekuensing DNA fusan berupa urutan basa nukleotida yang kemudian dianalisis homologinya dengan urutan basa DNA induk menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang tersedia *online* pada *National Center for Biotechnology* (NCBI). Data yang diperoleh kemudian diidentifikasi hubungan kekerabatannya dengan beberapa spesies lain anggota Chlorophyta menggunakan *software* Mega 5.1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

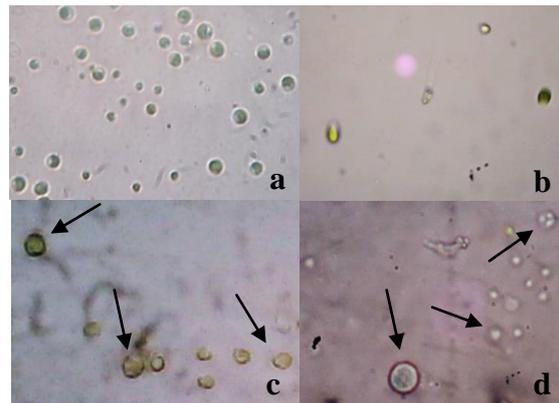
a. Hasil Fusi Protoplas

Fusan yang diperoleh dari proses fusi protoplas dikulturkan dalam dua media berbeda, yaitu media air tawar dan air laut. Pengamatan mikroskopis terhadap sel fusan memperlihatkan nukleus dua protoplas yang berbeda bisa berfusi atau tidak berfusi sama sekali meskipun telah mengalami fusi protoplas. Sutrisno (2008) menjelaskan bahwa fusan yang dihasilkan dapat memiliki kombinasi karakter dari kedua induk ataupun memperlihatkan sifat dominan dari salah satu induk. Sel heterokaryon atau *heterocyte* adalah sel yang binukleat, sel yang nukleusnya terfusi disebut sel *hybrid* dan ketika hanya sitoplasma yang berfusi dan informasi genetik dari salah satu atau kedua induknya hilang dinamakan sel *cybrid* (*cytoplasmis hybrid* atau heteroplas).

Sel fusan rata-rata memiliki dua sampai tiga inti sel dalam satu sel dan ukuran sel fusan relatif lebih besar dibandingkan dengan induk fusan. Penelitian Syahid *dkk*

(2010) memperoleh fusan dengan beberapa sifat yang berbeda. Fusan yang memiliki protoplas dari dua jenis protoplas yang berbeda disebut dengan heterofusi. Fusan yang memiliki protoplas hasil penggabungan dua protoplas yang sejenis disebut homofusi. Fusan yang memiliki lebih dari dua protoplas disebut multifusi.

Fusan yang diperoleh memperlihatkan beberapa sifat yang berbeda dalam hal pertumbuhan pada air tawar dan air laut. Sifat tersebut antara lain adanya fusan dari *D. salina* dan *C. pyrenoidosa* yang mampu tumbuh pada air laut, memiliki bentuk sel seperti induk *D. salina* akan tetapi tidak motil yang selanjutnya disebut DSCP L (Gambar 1). Fusan lain mampu tumbuh pada media air tawar memiliki bentuk sel seperti induk *C. pyrenoidosa* dan motil seperti induk *D. salina* (DSCP T). Fusan berikutnya memiliki morfologi seperti *C. pyrenoidosa* dan dapat hidup di air laut atau sebaliknya fusan memiliki morfologi seperti *D. salina* dan dapat hidup pada air tawar.



Gambar 1. Perbandingan Sel Fusan dengan Sel Induk pada Hari ke-4 Kultur (Perbesaran 400x), a. *C. pyrenoidosa*, b. *D. salina*, c. DSCP T, d. DSCP L

Berdasarkan atas bentuk sel maka proses fusi mendapatkan sel fusan yang sebagian besar memiliki bentuk hampir serupa dengan *C. pyrenoidosa* baik fusan yang ditumbuhkan dalam medium air laut maupun medium air tawar (Gambar 1). Fusan DSCP T memiliki ukuran lebih

besar dibandingkan dengan induk *C. pyrenoidosa* dan *D. salina*, sedangkan Fusan DSCP L memiliki ukuran yang bervariasi. Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa fusi protoplas telah terjadi sesuai dengan pernyataan Fungaro *et al.* (1992), salah satu ciri yang menandai bahwa fusi protoplas berhasil menghasilkan rekombinan baru adalah penampaknya yang secara morfologi berbeda dengan induk yang digunakan untuk fusi.

Fusan DSCP L memiliki frekwensi keberhasilan fusi sebesar 4,52% dan untuk fusan DSCP T sebesar 21,76%. Fungaro *et al.* (1992) menyatakan bahwa frekwensi keberhasilan fusi optimalnya antara 25%-50%, karena diperkirakan fusan yang didapat dari proses fusi dapat mewakili satu setengah dari jumlah induk yang difusikan. Pada penelitian ini frekwensi keberhasilan fusi yang diperoleh lebih rendah dari kadar optimal. Hal ini dapat terjadi karena kemungkinan adanya protoplas yang hilang saat tahap pemecahan dinding sel, saat fusi protoplas atau saat penghitungan protoplas yang kurang efisien untuk menghitung protoplas kecil. Rendahnya frekwensi keberhasilan fusi juga dapat disebabkan oleh fusi protoplas yang dilakukan dari dua induk yang berbeda genusnya sehingga fusan yang diperoleh mengalami penurunan laju akumulasi jumlah sel. Penelitian yang dilakukan Baltz (1978) menunjukkan bahwa selama proses regenerasi sel, terjadi beberapa peristiwa seperti massa rata-rata per protoplas menurun, rata-rata massa sel menurun dan juga jumlah protoplas per sel menurun. Peristiwa tersebut menunjukkan bahwa protoplas sedang dalam periode pembentukan dinding sel.

Kepadatan jumlah sel yang diperoleh dari penghitungan pada hari ke-4 kultur adalah fusan DSCP T memiliki jumlah sel $47,2 \times 10^4$ sel/ml dan fusan DSCP L sebesar $7,8 \times 10^4$ sel/ml. Penghitungan jumlah sel pada

hari ke-4 dilakukan juga untuk induk fusan dengan hasil yaitu jumlah sel induk *D. salina* sebanyak 8×10^4 sel/ml dan *C. pyrenoidosa* 129×10^4 sel/ml. Jumlah sel fusan DSCP L lebih rendah jika dibandingkan dengan jumlah sel kedua induk. Fusan DSCP T memiliki jumlah sel lebih banyak dibandingkan induk *D. salina* dan lebih rendah dibandingkan dengan induk *C. pyrenoidosa*. Perbedaan jumlah sel fusan yang diperoleh dapat disebabkan oleh jumlah awal sel induk yang telah difusikan tidak sama. Induk *D. salina* dengan kepadatan sel awal 8×10^4 sel/ml sebanyak 400 ml dan induk *C. pyrenoidosa* dengan kepadatan sel awal 129×10^4 sel/ml sebanyak 50 ml. Hal ini menyebabkan fusan yang ditumbuhkan di air tawar memiliki kepadatan sel lebih tinggi dibandingkan dengan fusan yang ditumbuhkan di air laut.

Pengukuran kadar β -karoten pada fusan menunjukkan bahwa kedua fusan dapat menghasilkan β -karoten seperti kedua induknya. Kadar β -karoten pada fusan DSCP L sebesar $0,05 \mu\text{g/ml}$ dan fusan DSCP T sebesar $0,59 \mu\text{g/ml}$. Penelitian dari Abd El-Baky *et al.* (2007) tentang *D. salina* yang mampu menghasilkan β -karoten sebesar 60,4% dari karotenoid total, yakni sekitar $76,1 \mu\text{g/ml}$, sementara penelitian dari Kusmiati *dkk.* (2010) menyebutkan bahwa *C. pyrenoidosa* mengandung β -karoten $0,6 \text{ mg } \mu\text{g/ml}$.

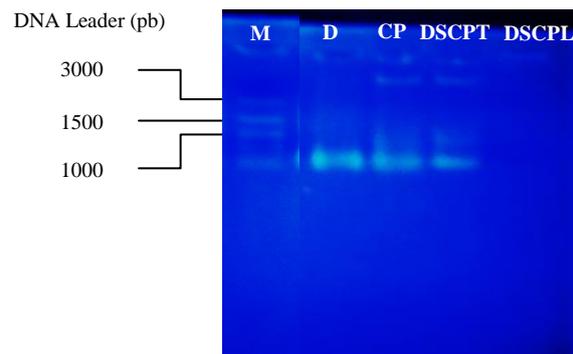
Berdasarkan hasil pengamatan dan hasil membandingkan antara fusan DSCP T dengan DSCP L, fusan yang diperoleh lebih mampu tumbuh pada air tawar dibandingkan air laut. Hal tersebut dapat mempermudah dalam proses budidaya fusan selanjutnya jika fusan akan digunakan sebagai mikroorganisme industri. Fusan dapat dikulturkan pada media air tawar yang mudah didapat sehingga lebih ekonomis, tanpa mengurangi kemampuan fusan untuk menghasilkan β -karoten seperti kedua induk fusan.

b. Hasil Isolasi DNA

Karakter fusan dianalisis lebih lanjut menggunakan marka molekuler seperti DNA ribosom untuk dibandingkan dengan induknya. Ribosomal DNA merupakan bagian dari DNA genom yang berfungsi dalam perangkat sintesis protein. Ribosomal DNA memiliki sebagian daerah homolog yang dapat menunjukkan kesesuaian antara DNA fusan dengan DNA induk fusan.

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dapat diukur menggunakan mesin nanodrop yang ditentukan oleh nilai A_{260} . Nilai A_{260} yang diperoleh tidak selalu menjadikan nilai konsentrasi DNA yang tinggi membuat nilai kemurnian DNA juga tinggi atau sebaliknya karena dalam penentuan konsentrasi DNA dan kemurnian DNA, masing-masing memiliki ketetapan tersendiri. Nilai konsentrasi DNA diperoleh dari nilai $(A_{260}-A_{320}) \times 50$ yang diturunkan dari hukum Beer (Wilfinger *et al.*, 1997). Sementara itu, nilai kemurnian DNA yang baik yaitu 1,8-2,0 $\mu\text{g/ml}$ yang ditentukan oleh rasio $A_{260}/280$ (Sambrook *et al.*, 1989). Kemurnian DNA yang diperoleh memiliki rata-rata yang sudah memenuhi standar, yaitu 1,8-2,0 $\mu\text{g/ml}$. Kemurnian DNA pada fusan DSCP T sebesar 1,945 $\mu\text{g/ml}$ dan fusan DSCP L sebesar 1,73 $\mu\text{g/ml}$ masih berada dalam kisaran kemurnian yang ideal. Nilai kemurnian di bawah 1,8 maka terjadi kontaminasi protein dan fenol pada saat ekstraksi DNA. Fatchiyah *et al* (2011) menjelaskan bahwa nilai kemurnian di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminan berupa protein yang belum sempurna menghilang, residu dari fenol dan garam-garam. Protein pada organisme eukariot lebih banyak dibandingkan dengan pada prokariot, sehingga diperlukan metode denaturasi protein yang berulang yang menyebabkan kemurnian sampel berkurang akibat banyaknya protein dan kotoran terlarut.

Nilai konsentrasi DNA tertinggi pada DNA induk *C. pyrenoidosa* yaitu sebesar 227,5 $\mu\text{g/ml}$, kemudian DNA fusan DSCP T sebesar 247 $\mu\text{g/ml}$, DNA induk *D. salina* sebesar 90,5 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi DNA terendah pada DNA fusan DSCP L sebesar 64 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi DNA yang rendah menurut Sari *dkk* (2014) dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yakni disosiasi jaringan dan presipitasi DNA dari jaringan sel yang kurang maksimal, sehingga menyebabkan ekstraksi DNA dari dalam sel hanya sedikit. Selain itu karena adanya pengikatan DNA yang kurang maksimal saat tahap binding DNA. Konsentrasi DNA fusan telah dianalisa secara kualitatif menggunakan metode elektroforesis (Gambar 2). Elektroforesis adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan dan memurnikan suatu makromolekul khususnya DNA, protein dan asam nukleat berdasarkan perbedaan ukuran (Magdeldin, 2012). Visualisasi hasil isolasi DNA menggunakan UV-*Transilluminator*.



Gambar 2. Visualisasi Hasil elektroforesis DNA Fusan dan Induk dibawah UV-*Transilluminator* (Ket. M: Marker; DS: *D. salina*; CP: *C. pyrenoidosa*; DSCPT: Fusan DSCP Tawar; DSCPL: Fusan DSCP Laut

Visualisasi hasil isolasi menunjukkan bahwa DNA induk *C. pyrenoidosa*, DNA induk *D. salina*, DNA fusan DSCP T dan DNA fusan DSCP L memiliki ukuran DNA lebih dari 3000 pb. Besar kecilnya ukuran DNA yang diperoleh dipengaruhi oleh jumlah sel awal yang diisolasi, teknik

isolasi DNA dan teknik elektroforesis. Brown (1992), menyatakan bahwa faktor-faktor seperti ukuran partikel, komposisi dan konsentrasi gel, densitas muatan, kuat medan listrik dan sebagainya dapat mempengaruhi hasil elektroforesis.

c. Hasil *Gradient* PCR

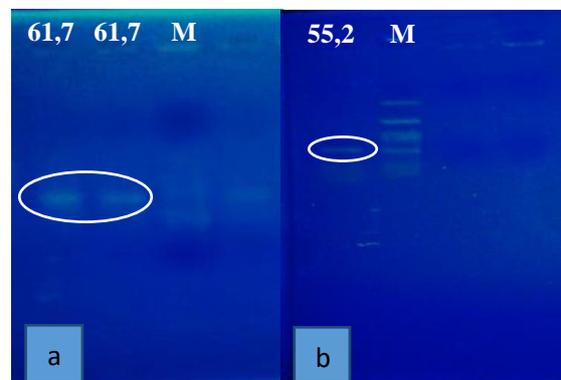
Berdasarkan dari hasil pengukuran kemurnian secara kuantitatif dan kualitatif, DNA fusan DSCP T yang diperoleh memiliki kemurnian lebih tinggi dibandingkan dengan DNA fusan DSCP L sehingga DNA fusan DSCP T digunakan untuk proses amplifikasi DNA. Proses amplifikasi DNA dilakukan menggunakan *Gradient* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk menentukan suhu *annealing* yang optimal. Pada tahap ini, DNA DSCP T diamplifikasi menggunakan dua macam primer yaitu primer 18S *Chlorella* dan primer 18S *Dunaliella* (18SrDNA).

Gradient PCR dilakukan menggunakan suhu *annealing* antara 45°C hingga 63°C. Penentuan kisaran suhu *annealing* didasarkan atas suhu *annealing* optimal yang digunakan untuk masing-masing proses PCR pada DNA induk fusan. PCR pada DNA *C. pyrenoidosa* dengan primer 18S *Chlorella* menggunakan suhu *annealing* 55°C, sedangkan PCR pada DNA *D. salina* dengan primer 18S *Dunaliella* menggunakan suhu *annealing* 61°C. Kisaran suhu *annealing* yang diperoleh adalah 12 suhu *annealing* dan 5 suhu yang digunakan, yakni suhu 55,2°C; 57,2°C; 59,9°C; 61,7°C dan 63°C.

Hasil yang diperoleh dari proses *Gradient* PCR ditandai dengan adanya pita DNA yang ukurannya sesuai dengan target, yaitu kisaran 1800 pb. Suhu *annealing* yang optimal untuk primer 18S *Chlorella* adalah 61,7°C, sedangkan untuk primer 18S *Dunaliella* adalah 55,2°C. Suhu *annealing* saat PCR dipengaruhi oleh *temperature melting* (TM) dari primer yang digunakan. Primer 18S *Chlorella*

memiliki TM 58°C lebih tinggi daripada TM primer 18S *Dunaliella* yaitu 53°C, sehingga suhu *annealing* yang diperoleh untuk primer 18S *Chlorella* lebih tinggi dibandingkan untuk primer 18S *Dunaliella*. Menurut Handoyo dan Rudiretna (2001) penentuan suhu *annealing* dihitung berdasarkan *temperature melting* (TM) primer yang digunakan, yaitu antara (TM-5)°C sampai (TM+5)°C. *Temperature melting* primer sebaiknya antara suhu 50-65°C yang mana dapat diperoleh berdasarkan komposisi dan panjang primer yang digunakan.

Hasil *Gradient* PCR DNA fusan menunjukkan DNA fusan yang diamplifikasi menggunakan primer 18S *Chlorella* memiliki kisaran ukuran DNA 1000-1500 pb, sedangkan dengan primer 18S *Dunaliella* sebesar 700-800 pb (Gambar 3). Hal tersebut mengindikasikan bahwa terdapat variasi panjang fragmen DNA fusan yang ditandai dengan perbedaan ukuran DNA. Menurut Fujita *et al.* (2001) perbedaan ukuran DNA dari hasil PCR menandakan adanya variasi panjang fragmen yang biasa disebut polimorfisme. Polimorfisme ukuran fragmen menandakan adanya keanekaragaman genetik pada spesies yang dapat dibuktikan dengan melakukan sekuensing pada daerah tersebut.



Gambar 3. Visualisasi Hasil *Gradient* PCR Fusan DSCP T dengan Suhu *Annealing* 43°C – 63°C; a. Primer 18S *Chlorella* Suhu *Annealing* 61,7 °C; b. Primer 18S *Dunaliella* Suhu *Annealing* 55,2°C

d. Hasil Karakterisasi Molekuler Fusan

Hasil *Gradient* PCR DNA fusan dilanjutkan dengan proses sekuensing. Karakterisasi molekuler dilakukan dengan membandingkan dan menganalisis hasil sekuensing fusan dengan hasil sekuensing kedua induk fusan. Hasil sekuensing yang diperoleh berupa urutan basa DNA dengan ukuran tertentu. Hasil amplifikasi 18SrDNA fusan DSCP T dengan primer *forward* 18S *Dunaliella* berukuran 523 pb. Hasil amplifikasi 18SrDNA fusan DSCP T dengan primer *forward* 18S *Chlorella* berukuran 435 pb.

Analisis homologi basa hasil sekuensing dengan anggota Chlorophyta menggunakan Program BLAST memperlihatkan homologi 79-80% dengan mikroalga anggota Chlorophyta. Hasil pensejajaran (*alignment*) antara fusan DSCP T dengan induk *C. pyrenoidosa* memperlihatkan homologi sebesar 80% dari 429 basa. Selanjutnya hasil pensejajaran antara fusan DSCP T dengan induk *D. salina* memperlihatkan homologi sebesar 79% dari 494 basa. Homologi fusan sebesar kurang dari 98% dibandingkan induk, menurut Wu *et al.* (2001) pada *Chlorella* dapat dinyatakan tidak termasuk dalam spesies yang sama. Hasil yang diperoleh dari pensejajaran antara DNA fusan dengan DNA kedua induk menunjukkan bahwa fusan DSCP T memiliki tingkat homologi basa sebesar 79%-80%. Berdasarkan hal tersebut, fusan yang diperoleh tidak memperlihatkan dominasi salah satu induk.

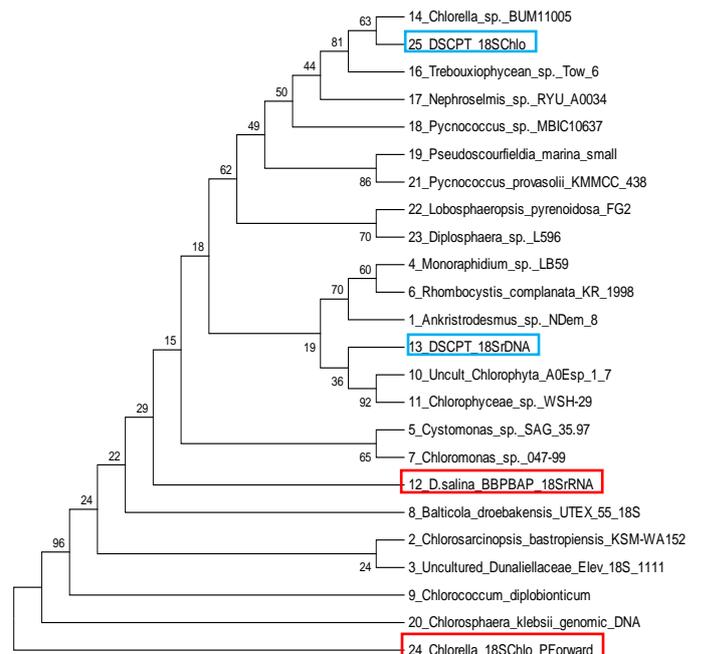
Hasil dari BLAST memperlihatkan adanya *gaps*. *Gaps* adalah garis putus-putus (---) yang berada diantara urutan basa. Nilai rata-rata *gaps* yang memperlihatkan adanya delesi dan insersi yaitu antara 2% sampai 3%. Nei dan Kumar (2000) menyatakan bahwa delesi dan insersi merupakan bagian dari mutasi yang menimbulkan perubahan urutan basa. Mutasi pada basa lainnya yang

dikenal adalah substitusi dan inversi. Pengamatan lebih lanjut dari hasil pensejajaran tersebut ditemukan adanya substitusi antara sekuen DNA DSCP T dengan kedua induk fusan. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh perubahan basa dari bentuk satu ke bentuk basa lain yang biasanya disebut dengan peristiwa transisi dan transversi. Transisi adalah perubahan dari basa purin (Adenin=A dan Guanin=G) menjadi basa purin lain atau dari basa pirimidin (Citosin=C dan Timin=T) menjadi basa pirimidin lain. Transversi merupakan perubahan antara basa purin menjadi basa pirimidin atau sebaliknya. Pensejajaran basa antara DSCP T dengan induk *C. pyrenoidosa* terjadi peristiwa transisi sebanyak 29 kali dan transversi sebanyak 35 kali. Jumlah transversi yang lebih besar dibandingkan dengan transisi memperlihatkan adanya perubahan yang cukup besar pada fusan. Hal ini disebabkan transversi memiliki peluang $\frac{1}{4}$ diantara keempat basa A.C.T.G atau $\frac{1}{140}$ kali, sedangkan transisi hanya $\frac{1}{2}$ atau $\frac{1}{58}$ kali.

Hasil yang cukup berbeda dijumpai pada substitusi basa antara DSCP T dengan induk *D. salina* dengan nilai transisi sebanyak 38 kali atau $\frac{1}{72}$ kali, dan transversi sebanyak 33 kali atau $\frac{1}{132}$ kali. Terjadinya substitusi yang merupakan salah satu jenis peristiwa mutasi pada urutan basa DNA fusan diduga karena hasil proses fusi yang menyebabkan perubahan pada tingkat nukleotida. Hal ini berimplikasi bahwa fusan lebih dekat hubungan kekerabatannya dengan induk *D. salina* dibanding dengan *C. pyrenoidosa*. Perubahan basa tersebut, menurut Nei dan Kumar (2000), pada akhirnya akan menyebabkan evolusi pada organisme.

e. Hasil Identifikasi Molekuler Fusan

Ribosomal DNA juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu organisme yang belum diketahui jenisnya. Hasil identifikasi molekuler fusan dengan mikroalga fotosintetik lainnya dalam kelompok Chlorophyta (Gambar 6) menunjukkan bahwa antara DSCPT 18S *Chlorella* dengan *Chlorella* sp. BUM 11005 memiliki nilai kemiripan sebesar 96% yang didukung dengan hasil uji *bootstrap* sebesar 63, sedangkan antara DSCPT 18S *Dunaliella* dengan Uncultured Chlorophyta ADEsp 1-7 dan *Chlorophyceae* sp. WSH-29 memiliki nilai kemiripan sebesar 81% dengan nilai *bootstrap* sebesar 36. Gambar 4 juga memperlihatkan bahwa fusan DSCP T 18S *Chlorella* memiliki kekerabatan dengan beberapa spesies anggota Chlorophyta lainnya, seperti *Trebouxiophyceae* sp., *Nephroselmis* sp., *Pycnococcus* sp., *P. provasolii* dan *Pseudoscourfieldia marina* homologinya sebesar 92- 96%. Fusan DSCP T 18S *Dunaliella* memiliki homologi tertinggi dengan *Ankistrodesmus* sp sebesar 81%. Sedangkan beberapa anggota Chlorophyta yang lain yaitu *Monoraphidium* sp. *Rhombocystis complanata* dan *Chlorosarcinopsis* juga memiliki homologi dengan fusan sebesar 81%. Berdasarkan hasil analisis hubungan kekerabatan antara fusan, induk fusan dan spesies pembandingan menunjukkan bahwa fusan DSCP T memiliki karakter seperti induk *C. pyrenoidosa* dengan didukung hasil dari rekonstruksi pohon filogenetik yang menunjukkan fusan lebih berkerabat dekat dengan *Chlorella* sp. BUM 11005. Proses fusi yang dilakukan telah memperoleh fusan dengan variasi urutan basa yang berbeda dengan induk dan memiliki homologi dengan spesies lain anggota Chlorophyta. Selain itu, fusan juga memiliki kemampuan yang berbeda dari induknya, berdasarkan pertumbuhan pada air laut dan air tawar.



Gambar 4. Pohon Filogenetik Menunjukkan Hubungan antara sekuen DSCPT 18S rDNA (*Dunaliella*), DSCPT 18S *Chlorella*, *D. salina* BBPBAP, *C. pyrenoidosa* dan sekuen lain yang mirip dari database nukleotida NCBI (Uji *Bootstrap* 100)

KESIMPULAN

Karakterisasi molekuler fusan interspesies *C. pyrenoidosa* dan *D. salina* menggunakan 18SrDNA memperlihatkan homologi urutan basa antara fusan DSCP T dengan induk *D. salina* sebesar 79% dan dengan induk *C. pyrenoidosa* sebesar 80%.

Identifikasi molekuler fusan DSCP T 18S *Chlorella* dengan mikroalga lain pada kelompok Chlorophyta memiliki homologi sebesar 96% berkerabat dekat dengan *Chlorella* sp. BUM 11005. Fusan DSCP T 18S *Dunaliella* memiliki nilai homologi sebesar 81% dengan *Ankistrodesmus* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Abd El-Baky, H.H., F.K. El-Baz and G.S. El-Baroty. 2007. Production of Carotenoids from Marine Microalgae and Its Evaluation as Safe Food Colorant and Lowering Cholesterol

- Agent. *Am- Euras J Agric and Environ Sci.* 2: 792-800.
- [2] Deutsch. 1995. Vitamins and Other Nutrients. AOAC Official Method. Chemical Methods. Carotenes and Xanthophyls. 45: 5-6.
- [3] Emma. 2007. Isolasi dan Fusi Protoplas Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii*. Balai Riset Budidaya Perikanan Air Payau. Maros.
- [4] Fatchiyah, A.E.L., S. Widyarti dan S. Rahayu. 2011. *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. Brawijaya Press. Malang.
- [5] Fujita, K., T. Horie and K. Isono. 2001. Cross-genomic analysis of the translational systems of various organisms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27(3):163-9.
- [6] Fungaro, M.H.P., J. Lucio de Azevedo, A.A. Pizzirani-Kleiner. 1992. Genetic Recombination after Protoplas Fusion in *Candida* sp. *Brazil Journal Genetics.* 15(3): 499-507.
- [7] Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Unitas*, 9 (1): 17-29.
- [8] Hejazi, M.A., C. de Lamariere, J.M.S. Rocha, M. Vermue and J. Tramper. 2001. Selective Extraction of Carotenoids from Microalga *Dunaliella salina* with Retention of Viability. *Biotechnology and Engineering.* 79 (1): 29-36.
- [9] Jin, E. J.E.W. Polle, H.K. Lee, S.M. Hyun and M. Chang. 2003. Xanthophyls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *J Microbiol Biotechnol.* 13: 165-174.
- [10] Kusmiati, N.W.S. Agustini, S.R. Tamat dan M. Irawati. 2010. *Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga Chlorella pyrenoidosa Galur Lokal INK*. Bogor : LIPI.
- [11] Kusumaningrum, H. P.. 2013. GenBank Accession number KC875350 1077 bp DNA linear PLN 25-JUL-2013 *Dunaliella* sp. BBPBAP 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- [12] Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2013. Application of rich carotenoid natural food supplement from recombinant interspecies protoplast fusion on *Penaeus monodon* fab. post-larvae. Indonesian Journal of Marine Sciences. ISSN 0853-7291. 18(3):143-149
- [13] Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2014. Optimization and Stability of Total Pigments Production of Fusan from Protoplast Fusion of Microalgae *Dunaliella* and *Chlorella* *in vivo*: Attempts on Production of Sustainable Aquaculture Natural Food. Int. J. of Marine and Aquatic Resource Conservation and Co-existence (IJMARCC Vol 1(1):1-5, October 2014, ISSN : 2406-9094
- [14] Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2015a. Detection of Bacteria and Fungi Associated with *Penaeus monodon* Postlarvae Mortality. *International Journal Procedia Environmental Sciences.* 23: 329–337.
- [15] Kusumaningrum, H. P. and Zainuri. M. 2015b. Molecular Characterization of *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* Fusant using 18SrDNA Gene *Journal Teknologi (Science and Engineering)* 75:1 (2015) 1–6 | www.jurnalteknologi.utm.my | eISSN 2180–3722 |
- [16] Kusumaningrum, H. P. dan Zainuri. M. 2015c. Karakterisasi Dominan Fusan dari Mikroalga *Dunaliella salina* dan *Chlorella vulgaris* menggunakan primer 18SrRNA untuk mengembangkan Produksi Karotenoid. Seminar Nasional

- Biologi. Universitas Diponegoro. Agustus
- [17] Magdeldin, S. 2012. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech Publisher: Rijeka, Croatia.
- [18] Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. New York.
- [19] Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- [20] Sari, S.K., M.N. Mazieda, D. Lityorini dan E.S. Sulasmi. 2014. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA Pada Daun Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) Menggunakan Genomic DNA mini Kit (Plant) Geneaid. *Semnas XI Pend. Biologi FKIP UNS*. 2 (9): 65-70.
- [21] Sutrisno. 2008. *Perkembangan Penelitian Bioteknologi Pertanian di Indonesia*. <http://free.vlsm.org/v12/sponsor/SponsorPendamping/Prawed a/Biologi/0149%20Bio%203-7a.htm>. Diakses 15 Oktober 2014.
- [22] Syahid, S.F., O. Rostiana, W. Haryudin, S. Aisyah dan D. Surachman. 2010. Perbanyakan Somaklon Jahe Tahan Suspensi *R. Solanacearum* dan Fusi Protoplas Jahe Putih dengan Jahe Merah. *Laporan Teknis Penelitian*. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.
- [23] Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* 22: 474-481.
- [24] Wu, H., R. Hseu and L. Pin. 2001. Identification of *Chlorella* spp. Isolates Using Ribosomal DNA Sequences. *Bot. Bull Acad. Sin.* 42: 115-121.