

ANALISIS MOLEKULER DNA ALGA MERAH (RHODOPHYTA) *Kappaphycus* sp.

(Molecular Analysis of DNA Red Algae (Rhodophyta) *Kappaphycus* sp.)

Manikmayang Annisaqois^{1*}, Grevo S. Gerung¹, Stenly Wullur¹, Deiske A. Sumilat¹,
Billy T. Wagey¹, Stephanus V. Mandagi²

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.
2. Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

*e-mail : manikmayangannisa@gmail.com

Indonesia reported has 555 species or 6.24% from total species of macroalgae in the world that already identified. Seaweed from red algae class (*Rhodophyceae*) is the most abundance plant in the Indonesia waters or around 452 genera. Seaweed from red algae especially *Kappaphycus* sp. has high level of morphology plasticity so that conventional identification technique using morphology character indicator frequently not optimal on identify macroalgae species. This research is the first stage on molecular analysis of red algae *Kappaphycus* sp. The methods of DNA *Kappaphycus* sp. extraction using modified CTAB methods (Doyle & Doyle, 1987; Allen, 2006; Nugroho *et al.*, 2015). *RbcL* gene amplified using PCR with several primer combination. The success of DNA extraction and gene *rbcL* amplification observe by UV transilluminator after gel electrophoresis. The appearance of band DNA using *rbcL* primer F-7 (*for*) and R-753 (*rev*) visualized around 1400-1600 bp and from *rbcL* primer F-577 (*for*) and R-753 (*rev*) visualized around 900-1400 bp. That become success indicator of gene *rbcL* amplification from red algae *Kappaphycus* sp.

Keywords: *Kappaphycus* sp., Extraction, DNA, CTAB, gene *rbcL*

Indonesia dilaporkan memiliki sebanyak 555 spesies atau sekitar 6.24% dari total jumlah spesies rumput laut dunia yang teridentifikasi saat ini. Rumput laut dari kelas alga merah (*Rhodophyceae*) menempati urutan terbanyak dari jumlah jenis yang tumbuh di perairan laut Indonesia yaitu sekitar 452 jenis. Rumput laut dari kelas alga merah ini terutama dari jenis *Kappaphycus* sp. memiliki tingkat plastisitas morfologi yang tinggi sehingga teknik identifikasi konvensional menggunakan indikator karakter morfologi sering kurang maksimal dalam penelusuran identitas spesies rumput laut. Penelitian ini merupakan tahapan awal dalam rangkaian analisa molekuler rumput laut jenis *Kappaphycus* sp. Dalam penelitian ini, ekstraksi DNA *Kappaphycus* sp. dilakukan dengan metode CTAB (Doyle and Doyle, 1987; Allen, 2006; Nugroho *et al.*, 2015) yang dimodifikasi. Gen *rbcL* diamplifikasi pada PCR menggunakan beberapa pasangan primer. Keberhasilan proses ekstraksi DNA genomik dan amplifikasi gen *rbcL* dari *Kappaphycus* sp. dideteksi melalui UV transilluminator setelah melalui proses elektroforesis gel. Munculnya pita DNA pada penggunaan primer *rbcL* F-7 (*for*) dan R-753 (*rev*) yang menghasilkan panjang pita DNA antara 1400-1600 bp dan primer *rbcL* F-577 (*for*) dan R-753 (*rev*) yang menghasilkan panjang pita DNA antara 900-1400 bp menjadi indikasi keberhasilan amplifikasi gen *rbcL* pada rumput laut *Kappaphycus* sp.

Kata kunci: *Kappaphycus* sp., Ekstraksi, DNA, CTAB, gen *rbcL*

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara kepulauan yang terletak di antara Benua Asia dan Benua Australia serta Samudra Pasifik dan Samudra Hindia. Posisi geografis inilah yang menjadi

salah satu faktor penyebab tingginya keberagaman spesies rumput laut di Indonesia. Sebagaimana dilaporkan, Indonesia yang memiliki sekitar 17.000 pulau, menjadi tempat yang cocok untuk pertumbuhan rumput laut karena

garis pantainya yang panjang (Gerung, 2001). Rumput laut dari kelas alga merah (*Rhodophyceae*) menempati urutan terbanyak dari jumlah jenis yang tumbuh di perairan laut Indonesia yaitu sekitar 452 jenis (Winarno, 1996).

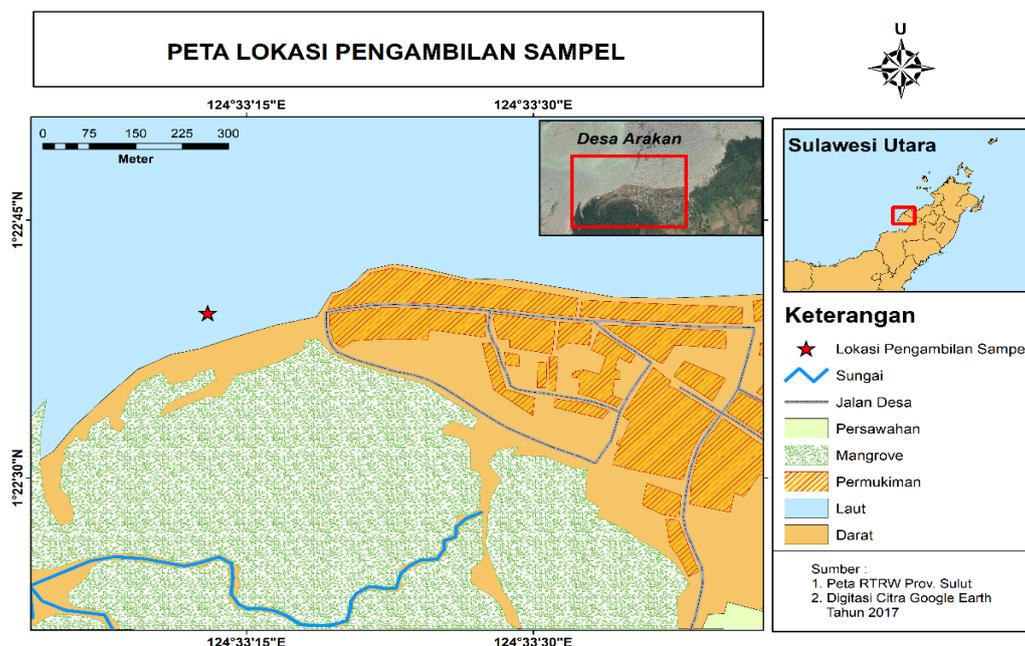
Identifikasi spesies dari kelas alga merah terutama dari jenis *Kappaphycus* yang banyak dilakukan saat ini menggunakan teknik konvensional berbasis karakter morfologi. Teknik konvensional ini sering kurang maksimal digunakan dalam identifikasi spesies, bahkan pada kasus-kasus tertentu banyak menimbulkan kekeliruan sehubungan dengan tingkat plastisitas morfologi yang tinggi dari jenis alga ini (Zuccarello *et al.*, 2006).

Karakter molekuler dapat dimanfaatkan untuk mengetahui variasi gen sehingga perbedaan antar jenis dapat dilihat dengan jelas. Pendekatan molekuler juga memberi peluang untuk menemukan karakter suatu jenis. Jika informasi batasan suatu jenis tersedia maka variasi plasma-nutfah dapat diakses secara lebih efisien dan efektif

baik untuk pemuliaan tanaman maupun kegiatan konservasi. Pada metode lain yang berbeda, pengaplikasian teknik molekuler pada alga masih memiliki banyak kesulitan terutama dalam mendapatkan jumlah dan kualitas DNA maupun hasil amplifikasi gen target yang ideal untuk analisis molekuler selanjutnya (Anggraeni *et al.*, 2008).

Dalam penelitian ini, telah dilakukan suatu studi awal analisis DNA taksonomi alga merah *Kappaphycus* sp. yang difokuskan pada pengembangan teknik DNA dan amplifikasi gen *rcbL* sebagai gen target untuk identifikasi spesies alga merah ini.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah menentukan keberhasilan ekstraksi DNA rumput laut *Kappaphycus* sp. menggunakan metode CTAB (Doyle and Doyle, 1987; Allen, 2006; Nugroho *et al.*, 2015) yang dimodifikasi dan mengamplifikasi gen *rcbL* sebagai gen target identifikasi spesies *Kappaphycus* sp. dengan menggunakan beberapa kombinasi pasangan primer.



Gambar 1. Peta pengambilan sampel.

METODE PENELITIAN

Lokasi Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Desa Arakan (Gambar 1), selanjutnya ekstraksi DNA rumput laut dan analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado.

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini seperti gunting, ependorf, tube, tip dan mikrotip, disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (sterilisasi basah).

Ekstraksi DNA *Kappaphycus* sp.

1. Reagen dan Extraction Buffer

Proses pembuatan reagen dan extraction buffer yaitu, 1M Tris, 5M NaOH, 0,5M EDTA, 5M NaCl, TE Buffer, 3M NaAc, CTAB, dH₂O, PVP, β-mercaptoetanol, vitamin C.

2. Lisis Sel

Sampel rumput laut terlebih dahulu dibilas menggunakan dH₂O dan dipotong hingga mendapatkan berat sampel sebanyak 0,15 g. Sampel kemudian digerus menggunakan mortar dan pestel steril sambil ditambahkan sebanyak 1 ml *extraction buffer* selama penggerusan. Sampel yang telah digerus selanjutnya pindahkan ke ependorf tube dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit.

3. Ekstraksi DNA

Hasil sentrifugasi didapatkan dalam bentuk lapisan supernatan dan presipitan. Lapisan supernatan dibuang dan ependorf yang berisi lapisan presipitan kembali ditambahkan sebanyak 700 µl *extraction buffer*. Proses ini diulang sebanyak 4 kali dan untuk pengulangan terakhir supernatan tidak dibuang. Selanjutnya sampel diinkubasi 3 jam pada suhu 65°C

dengan interval 15 menit sekali dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Hasil ekstraksi yang telah diinkubasi tersebut lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 g selama 10 menit hingga menghasilkan 3 lapisan dalam tube.

4. Presipitasi DNA

Lapisan supernatan pada bagian paling atas tube selanjutnya dipisahkan pada sebuah tabung ependorf yang baru dan ditambahkan Fenol-Kloroform-Isoamil Alkohol dengan perbandingan 25:24:1 sebanyak 800 µl diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan (±25°C) didalam Laminar Air Flow lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 13.500 g.

Setelah terbentuk tiga lapisan pada tube, lapisan supernatan pada bagian paling atas tube selanjutnya dipisahkan pada sebuah tabung ependorf yang baru dan ditambahkan 2 - propanol dingin sebanyak 800 µl dan dicampurkan dengan menginvert tube. Selanjutnya disimpan di Laminar Air Flow selama 10 menit pada suhu ruangan (±25°C) dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 g selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang. TE Buffer sebanyak 250 µl ditambahkan ke tube ependorf kemudian diinkubasi kembali di Thermo-block selama 30 menit pada suhu 37°C dan 3 M NaAc, sebanyak 25 µl ditambahkan ke tube ependorf kemudian dicampurkan dengan menginvert tube.

5. Purifikasi DNA

Etanol dingin 70% sebanyak 600 µl ditambahkan kedalam tube dan *invert* sebanyak satu kali. Tube kemudian disimpan di Laminar Air Flow selama 10 menit pada suhu ruangan (±25°C) lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.500 g selama 10 menit kemudian supernatan dibuang. Etanol dingin sebanyak 500 µl ditambahkan, kemudian tube di*invert* sebanyak satu kali lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 g selama 10

menit kemudian supernatan dibuang. Presipitan yang didapatkan kemudian dikeringkan di *Laminar Air Flow* dengan cara meletakkan tisu lalu tube dibuka dan kemudian dibalik dan didiamkan selama 2 jam. TE Buffer sebanyak 25 μ l ditambahkan ke dalam tube. Selanjutnya sampel dapat disimpan di kulkas sebelum digunakan untuk proses selanjutnya.

Elektroforesis Gel

1. Pembuatan Gel Agarose

Gel agarose 1% dibuat dengan melarutkan 0,3 gr bubuk agarose, 30 ml 10x TBE buffer dan 0,6 μ l cyber green DMSO kemudian dipanaskan dan dituangkan ke dalam cetakan *gel tray* dan biarkan selama \pm 30 menit hingga mengeras menjadi gel.

2. Elektroforesis Gel

Proses elektroforesis dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 4 μ l DNA sampel dengan 1 μ l 10x Sampel Loading Buffer diatas parafilm, kemudian dimasukan ke dalam sumur gel elektroforesis. Sebanyak 2 μ l 100bp ladder DNA marker dimasukan pula ke dalam sumur gel elektroforesis yang berbeda sebagai penanda berat molekul. Proses elektroforesis dilakukan menggunakan larutan 1x TBE buffer dengan tegangan listrik 80 volts selama 30 menit.

3. Visualisasi dengan UV-Transilluminator

Setelah proses elektroforesis selesai, gel kemudian diangkat dan letakan di atas *UV-transilluminator* untuk diamati keberadaan pita DNANYa dengan menggunakan kaca mata pelindung saat melakukan ekspos gel pada sinar UV. Hasil elektroforesis DNA ekstrak DNA genom *Kappaphycus* sp. kemudian didokumentasikan dengan kamera.

Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi gen dilakukan dengan menggunakan beberapa kombinasi primer *rbcL* sebagai gen target amplifikasi. Tahap amplifikasi gen yang dilakukan pertama adalah membuat campuran reaksi yang diisi dalam tabung reaksi khusus untuk PCR. Tabung reaksi disentrifugasi selama 30 menit kemudian mesin PCR dinyalakan. Masing-masing tabung dimasukkan ke dalam PCR.

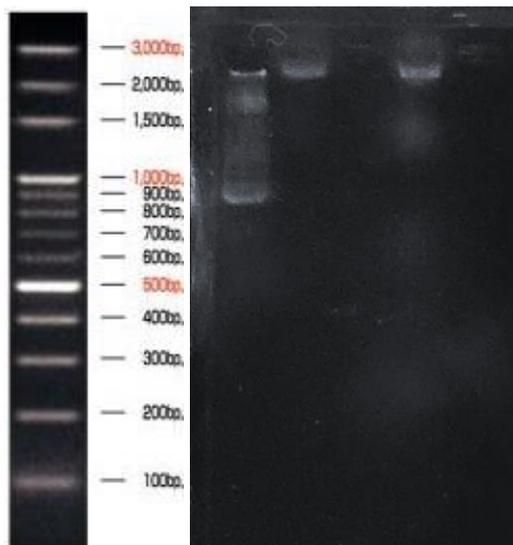
Program Heater lid diatur pada suhu 99°C. Program siklus yang akan digunakan dengan pengaturan suhu pre-denaturasi 95°C selama 6 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik (35 siklus), annealing 52°C selama 30 detik, elongasi 72°C selama 30 detik, dan post-elongasi 72°C selama 10 menit. Tahap amplifikasi gen selesai dan dilanjutkan pada tahap elektroforesis gel untuk melihat keberhasilan dari tahap amplifikasi gen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA *Kappaphycus* sp.

Dewasa ini telah banyak tersedia produk ekstraksi DNA komersil diantaranya innuprep DNA minikit (AnalytikJena), Qiagen DNAeasy kit dan Innuprep plant DNA kit. Beberapa laporan penelitian sebelumnya, menunjukkan keberhasilan penggunaan kit-kit komersil tersebut untuk mendapatkan ekstrak genomik DNA biota laut (Mopay *et al.*, 2017; Sahari *et al.*, 2017; Wehantouw *et al.*, 2017; Tindi *et al.*, 2017 dan Peloa *et al.*, 2016). Hasil yang berbeda pada penelitian yang dilakukan oleh Hengkengbala (2017) menunjukkan bahwa penggunaan kit komersil tersebut tidak berhasil digunakan dalam proses ekstraksi DNA genomik rumput laut jenis *Kappaphycus* sp.

Dalam penelitian ini telah digunakan teknik ekstraksi DNA genomik *Kappaphycus* sp. menggunakan prosedur CTAB yang telah dimodifikasi dari Doyle and Doyle (1987), Allen (2006), dan Nugroho *et al.* (2015) dengan membuat buffer ekstraksi yang terdiri dari campuran 1 M Tris, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, CTAB, dH₂O, PVP 90, β -mercaptoetanol, Vitamin



Gambar 2. Hasil Elektroforesis DNA *Kappaphycus* sp. yang telah melalui proses modifikasi metode ekstraksi DNA menggunakan teknik CTAB.

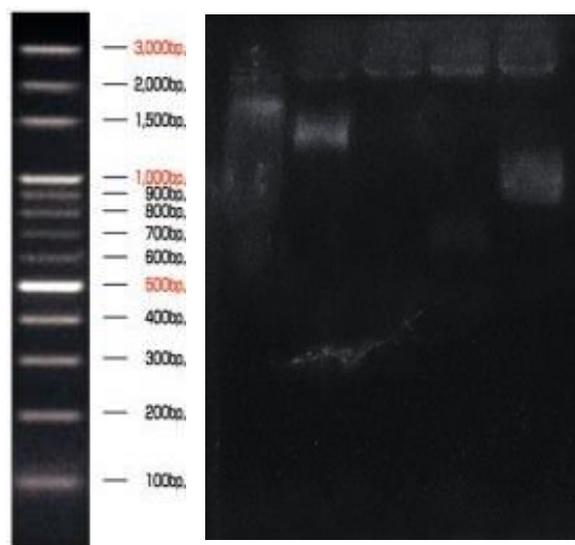
C 500 gr. Penggunaan PVP dan β -mercaptoetanol dalam penelitian ini mengikuti prosedur dari Doyle dan Doyle (1987) akan tetapi, hasil ekstrak DNA genomik *Kappaphycus* sp. masih tercampur dengan bahan lain sehingga membentuk gel.

Penambahan PVP dan β -mercaptoetanol berfungsi untuk penghilangan senyawa fenolik. Kedua senyawa ini akan mengikat senyawa fenolik dan membantu dalam penghilangan senyawa fenol (Angeles *et al.*, 2005). Dalam penelitian ini telah dilakukan pencucian hasil DNA genomik sebanyak 5 kali untuk mendapatkan DNA genomik murni.

Hasil visualisasi DNA genomik *Kappaphycus* sp. menggunakan UV transilluminator setelah melalui beberapa tahapan modifikasi prosedur CTAB ditampilkan pada Gambar 2.

Amplifikasi DNA *Kappaphycus* sp.

Hasil ekstraksi DNA genomik *Kappaphycus* sp. menggunakan prosedur CTAB telah digunakan sebagai DNA template dalam proses amplifikasi gen *rcbL*



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen *rcbL* menggunakan pasangan primer 1) primer F-7 (for) dan R-753 (rev), 2) primer F-577 (for) dan R-*rbcS* (rev), 3) primer F-7 (for) dan R-*rbcS* (rev) dan 4) primer F-577 (for) dan R-753 (rev).

menggunakan kombinasi pasangan primer antara F-7 (for) dan R-753 (rev) menghasilkan pita pada gel elektroforesis yang muncul pada posisi sekitar 1400-1600 bp. Munculnya pita DNA pada gel elektroforesis ditemukan pula pada kombinasi pasangan primer antara F-577 (for) dan R-753 (rev) dengan pita DNA pada pada posisi 900-1400 bp. Sedangkan kombinasi primer antara F-577 (for) dan R-*rbcS* (rev) serta primer F-7 dan R-*rbcS* (rev) tidak teramati munculnya pita DNA pada gel elektroforesis (Gambar 3).

Hasil amplifikasi tersebut diatas mendukung apa yang ditulis oleh Rychlik *et al.* (1990) dalam Hengkengbala (2017) yang menyatakan bahwa pemilihan primer yang cocok merupakan salah satu parameter yang mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi menggunakan PCR.

KESIMPULAN

Ekstraksi DNA merupakan tahapan paling penting dalam analisis molekuler karena menjadi penentu dalam mendapatkan kualitas DNA yang baik.

Proses ekstraksi DNA dibagi menjadi 4 tahapan, yaitu: lisis, ekstraksi, presipitasi dan purifikasi.

Penggunaan primer reverse R-753 dengan forward F-7 dan primer reverse R-753 dengan forward F-577 dalam penelitian ini merupakan salah satu pasangan primer yang bisa digunakan untuk mengamplifikasi alga jenis *Kappaphycus* sp. karena penampakan pita hasil visualisasi dapat terlihat dengan jelas. Walaupun dari hasil amplifikasi yang didapatkan menunjukkan bahwa tidak semua pasangan primer *rbcL* untuk mengamplifikasi DNA *Kappaphycus* sp. berhasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, G.C., Flores-Vergara, M.A., Krasynanski, S., Kumar, S., Thompson, W.S. 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, 1(5):2320-2325
- Anggraeni, S.R., Sudarsono, Soedharma, D. 2008. Karakterisasi Genetika Rumput Laut *Eucaema* spp. dari Tiga Daerah Di Indonesia. *Jurnal Bionatura*. 10(3):196-208.
- Doyle dan Doyle, 1987. CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol.
- Gerung, G.S. 2001. *Study on Indonesian Gracilariaceae*. Ph.D. Tesis. Hokkaido University, Graduate School of Fisheries Science. Hokkaido, Japan. p 312..
- Hengkengbala, I.R. 2017. Analisis Molekuler Beberapa Jenis Alga. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UNSRAT.
- Mopay, M., Wullur, S., Kaligis, E. 2017. Identifikasi Molekuler Sirip Ikan Hiu yang Didapat dari Pengepul Sirip Di Minahasa. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*.1(2):1-7.
- Nugroho, K., Terryana, R.T., Lestari, P. 2015. Optimasi Metode Isolasi DNA pada *Jatropha* spp. *Jurnal Agroteknologi*. 5(2):15-22.
- Peloa, A., Wullur, S., Sinjal, C.A. 2015. Amplifikasi Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) dari Sampel Sirip Ikan Hiu dengan Menggunakan Beberapa Pasangan Primer. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*.1(1):37-42.
- Sahari, J., Rimper, J., Wullur, S. 2017. Identifikasi Molekul Rotifera *Brachionus* sp. Asal Perairan Tumpaan, Minahasa Selatan. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(1):56-61.
- Tindi, M., Mamangkey, N.G.F., Wullur, S. 2017. DNA Barcode dan Analisis Filogenik Molekuler Beberapa Jenis Bivalvia Asal Perairan Sulawesi Utara Berdasarkan Gen COI. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(2): 32-38.
- Wehantouw, A., Ginting, E.L., Wullur, S. 2017. Identifikasi Sirip Ikan Hiu Yang Didapat dari Pengumpul di Minahasa Tenggara Menggunakan DNA Barcode. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(1):62-68.
- Winarno, F.G. 1996. *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta. 107 hal.
- Zuccarello, G.C., Crichtley, A.T., Smith, J., Sieber, V., Lhonneur, G.B., West, J.A. 2006. Systematic and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucaema* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. 18(3-5):643-651.