

## AMPLIFIKASI DNA ALGA MERAH (*RHODOPHYTA*) *Eucheuma* sp.

Paratiti Dewi Djakatar<sup>1</sup>, Grevo S. Gerung<sup>2</sup>, Elvy L. Ginting<sup>2</sup>,  
Calvyn F.A. Sondak<sup>2</sup>, Natalie D.C. Rumampuk<sup>2</sup>, Desy M.H. Mantiri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>)Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,  
Universitas Sam Ratulangi, Manado.

<sup>2</sup>)Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,  
Universitas Sam Ratulangi, Manado.  
E-mail: dewi.djakatar@gmail.com

### ABSTRAK

Indonesia is a rich source of biodiversity and having a richness species of marine organisms. Indonesia has around 17,000 islands, a suitable place for seaweed growth because of its long coastline. There are around 782 species of seaweed in Indonesia with 196 species of green algae, 134 species of brown algae, and 452 red algae. Any of various seaweeds that potential sources of revenue and mostly can be found around Indonesian waters is *Eucheuma* sp. including in red algae and can produce carrageenan. Algae Morphological characteristics can be influenced by environmental factors among others: water movement, sunlight, temperature, salinity, and degree of acidity (pH). Beside environmental factors, genetic factors can influence differences in production quality and morphological characteristics of algae. To distinguish morphological characteristics can be analyzed molecularly. In molecular analysis, important steps that must be taken are DNA isolation and genomic DNA amplification. Isolation of red algae DNA in this study using the CTAB method which was modified from Doyle and Doyle (1987), Allen (2006) and Nugroho *et al.* (2015). Amplification of red algae genomic DNA (*Eucheuma* sp.) Using COX2 and *rbcL* genes on PCR. The success of the genomic DNA isolation process and the amplification of COX2 and *rbcL* genes from *Eucheuma* sp. detected through UV transilluminator after going through a gel electrophoresis process. Based on this study, several modifications need to be carried out in the DNA isolation stage *Eucheuma* sp. by using the method of Doyle and Doyle (1987) modifications that need to be carried out include adding vitamin C and liquid nitrogen. Furthermore DNA of *Eucheuma* sp. successfully amplified by using F-577 and R-753 primers.

**Keywords :** Seaweed, *Eucheuma* sp., Extraction, DNA, CTAB

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber keanekaragaman hayati dan memiliki kekayaan spesies laut tertinggi. Indonesia memiliki sekitar 17.000 pulau, menjadi tempat yang cocok untuk pertumbuhan rumput laut karena garis pantainya yang panjang. Terdapat sekitar 782 spesies rumput laut di Indonesia dengan 196 spesies alga hijau, 134 spesies alga cokelat, dan 452 alga merah. Salah satu jenis rumput laut yang potensial dan banyak dijumpai di perairan Indonesia adalah *Eucheuma* sp. yang termasuk dalam alga merah dan dapat menghasilkan karaginan. Karakteristik morfologi alga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan antara lain : gerakan air, cahaya matahari, suhu, salinitas dan derajat keasaman (pH). Selain faktor lingkungan, faktor genetik dapat mempengaruhi perbedaan kualitas produksi dan karakteristik morfologi pada alga. Untuk membedakan karakteristik morfologi dapat dianalisis secara molekuler. Dalam analisis molekuler, langkah penting yang harus dilakukan adalah isolasi DNA dan amplifikasi DNA genomik. Isolasi DNA alga merah dalam penelitian ini menggunakan metode CTAB yang di modifikasi dari Doyle dan Doyle, (1987), Allen, (2006) dan Nugroho *dkk.*, (2015). Amplifikasi DNA genomik alga merah (*Eucheuma* sp.) menggunakan gen COX2 dan *rbcL* pada PCR. Keberhasilan proses isolasi DNA genomik dan amplifikasi gen COX2 dan *rbcL* dari *Eucheuma* sp. dideteksi melalui UV transilluminator setelah melalui proses elektroforesis gel. Berdasarkan penelitian ini, beberapa modifikasi perlu dilaksanakan dalam tahap isolasi DNA *Eucheuma* sp. dengan menggunakan metode Doyle dan Doyle, (1987) modifikasi yang perlu dilaksanakan meliputi penambahan vitamin C dan nitrogen cair. Selanjutnya DNA *Eucheuma* sp. berhasil diamplifikasi dengan menggunakan primer F-577 dan R-753.

**Kata kunci:** Rumput Laut, *Eucheuma* sp., Ekstraksi, DNA, CTAB

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber keanekaragaman hayati dan memiliki kekayaan spesies laut tertinggi. Indonesia memiliki sekitar 17.000 pulau, menjadi tempat yang cocok untuk pertumbuhan rumput laut karena garis pantainya yang panjang (Gerung, 2001). Melalui ekspedisi Siboga, terdapat sekitar 782 spesies rumput laut di Indonesia dengan 196 spesies alga hijau, 134 spesies alga cokelat, dan 452 alga merah (Amarangana dan Nasrul, 2017). Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan dirinya pada karang, lumpur pasir, batu, dan benda keras lainnya (Anggadiredja *dkk.*, 2010).

Salah satu jenis rumput laut yang potensial dan banyak dijumpai di perairan Indonesia adalah *Eucheuma* sp. yang termasuk dalam alga merah dan dapat menghasilkan karaginan. Karaginan adalah campuran yang kompleks dari beberapa polisakarida. Ada tiga jenis karaginan, yaitu lambda, kappa dan iota (Hudha *dkk.*, 2012).

Karakteristik morfologi alga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan antara lain: gerakan air, cahaya matahari, suhu, salinitas dan derajat keasaman (pH). Selain faktor lingkungan, faktor genetik juga dapat mempengaruhi perbedaan kualitas produksi dan karakteristik morfologi pada alga. Untuk mengetahui karakteristik genetik dari jenis alga dapat dilakukan dengan analisis molekuler DNA. Perbedaan genetik dari masing-masing jenis alga dapat dijadikan bibit untuk pengembangan budidaya alga selanjutnya (Tenriulo *dkk.*, 2001). Teknik konvensional 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 *dkk.*, 2006). 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).

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah menentukan keberhasilan ekstraksi DNA rumput laut *Eucheuma* sp.

menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi dan mengamplifikasi gen COX2 dan gen *rcbL* sebagai gen target identifikasi rumput laut *Eucheuma* sp. dengan menggunakan beberapa kombinasi pasangan primer.

## METODE PELAKSANAAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2018. Sampel alga yang digunakan yaitu jenis *Eucheuma* sp. yang telah tersimpan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut Universitas Sam Ratulangi Manado.

### Ekstraksi DNA *Eucheuma* sp.

#### 1. Extraction Buffer

Proses pembuatan extraction buffer yaitu, 1M Tris, 5M NaOH, 0,5M EDTA, 5M NaCl, TE Buffer, 3M NaAc, CTAB, dH<sub>2</sub>O, PVP,  $\beta$ -mercaptoetanol, vitamin C.

#### 2. Lisis Sel

Sampel rumput laut dipotong hingga mendapatkan berat sampel sebanyak 0,10 g. Kemudian sampel digerus dengan nitrogen cair menggunakan mortar dan pestel steril. Sampel hasil gerusan kemudian dipindahkan ke tube lalu tambahkan *Extraction buffer* sebanyak 1 ml.

#### 3. Ekstraksi DNA

Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 5 jam. selanjutnya disentrifugasi selama 4 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Proses ini diulang sebanyak 6 kali dan untuk pengulangan terakhir supernatan tidak dibuang.

#### 4. Presipitasi

Lapisan atas dipindahkan ke tube dan ditambahkan Fenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol dengan perbandingan 25:24:1 sebanyak 800  $\mu$ l lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ). Selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 13.500 g. Setelah terbentuk tiga lapisan, lapisan supernatan pada bagian paling atas dipindahkan ke tube dan ditambahkan 2-propanol dingin sebanyak 800  $\mu$ l dan dicampurkan dengan cara membolak-balik tube secara perlahan,

lebih lanjut disimpan di Laminar Air Flow selama 10 menit pada suhu ruangan ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 g selama 10 menit kemudian supernatan dibuang.

TE Buffer sebanyak 250  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke tube lalu diinkubasi dalam termoblok selama 30 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya 3 M NaAc sebanyak 25  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke tube kemudian dicampurkan dengan menginvert tube.

## 5. Purifikasi

Etanol dingin 70% sebanyak 600  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam tube dan *invert* sebanyak satu kali. Inkubasi dalam Laminar Air Flow selama 10 menit pada suhu ruangan ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) lalu sentrifugasi dengan kecepatan 13.500 g selama 10 menit kemudian supernatan dibuang. Etanol dingin 90% sebanyak 500  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke tube, kemudian tube disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 g selama 10 menit dan supernatan dibuang. Presipitan yang didapatkan kemudian dikeringkan dalam Laminar Air Flow dengan cara meletakkan tissue. Tube dibuka dan kemudian dibalik dan didiamkan selama 2 jam. TE Buffer sebanyak 25  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam tube. Sampel dapat disimpan dalam kulkas sebelum digunakan untuk digunakan dalam proses selanjutnya.

## Elektroforesis Gel

### 1. Pembuatan Gel Agarose

Gel agarose 1% dibuat dengan melarutkan 0,3 gr bubuk agarose, 30 ml 10x TBE buffer yang dididihkan, selanjutnya di diamkan selama 10 menit dan ditambahkan 0,6  $\mu\text{l}$  cyber green DMSO kemudian 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  $\mu\text{l}$  DNA sampel dengan 1  $\mu\text{l}$  10x Sampel Loading Buffer di atas parafilm, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis. Sebanyak 2  $\mu\text{l}$  100bp ladder DNA marker dimasukkan pula ke dalam sumur gel elektroforesis yang berbeda sebagai penanda berat molekul. Proses

elektroforesis dilakukan menggunakan larutan 1x TBE buffer dengan tegangan listrik 80 volt selama 30 menit.

### 3. Visualisasi dengan UV-Transilluminator

Setelah proses elektroforesis selesai, gel kemudian diangkat dan letakkan 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 *Eucheuma* sp. kemudian didokumentasikan dengan kamera.

### Amplifikasi Gen

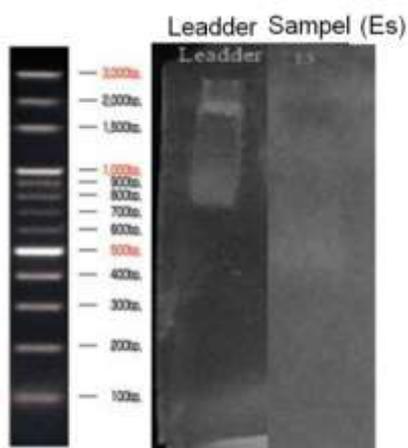
Proses amplifikasi gen dilakukan dengan menggunakan beberapa kombinasi primer COX2 dan *rbcL* sebagai gen target amplifikasi. Tahap amplifikasi gen yang dilakukan pertama adalah membuat campuran reaksi yang diisi dalam tabung reaksi khusus untuk PCR. Tabung reaksi disentrifugasi selama 30 menit kemudian mesin PCR dinyalakan. Masing-masing tabung dimasukkan ke dalam PCR. Program Heater lid diatur pada suhu  $99^{\circ}\text{C}$ . Program siklus yang akan digunakan dengan pengaturan suhu pre-denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 6 menit, denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik (35 siklus), annealing  $52^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, elongasi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, dan post-elongasi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Hasil amplifikasi gen kemudian dielektroforesis untuk mengetahui keberhasilan gen yang diamplifikasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi DNA *Eucheuma* sp.

Ekstraksi DNA *Eucheuma* sp. yang menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi dari Doyle dan Doyle (1987) dalam penelitian ini menghasilkan hasil ekstraksi DNA yang masih tercampur dengan bahan lain sehingga membentuk gel. Hal ini diduga karena dalam prosedur ini menggunakan PVP dan  $\beta$ -mercaptoetanol berdasarkan metode Doyle dan Doyle (1987). Oleh sebab itu, dilakukan dengan menambahkan Vitamin C 500 gr mengikuti prosedur dari Nugroho dkk., (2015) sehingga hasil ekstraksi DNA

tidak tercampur dengan bahan lain dan tidak membentuk gel. Hasil ekstraksi DNA genomik yang bebas dari kontaminasi seperti protein, polisakarida, polifenol, lemak dan RNA dapat digunakan sebagai DNA template untuk proses analisis selanjutnya seperti amplifikasi dan sekuens DNA (Buckingham dan Flaws, 2007 *dalam* Hengkengbala, 2017). Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen lainnya. Hasil ekstraksi tersebut merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya dan harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi (Tenriulo *dkk.*, 2001).



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA *Eucheuma* sp. yang telah melalui proses modifikasi metode ekstraksi DNA menggunakan teknik CTAB.

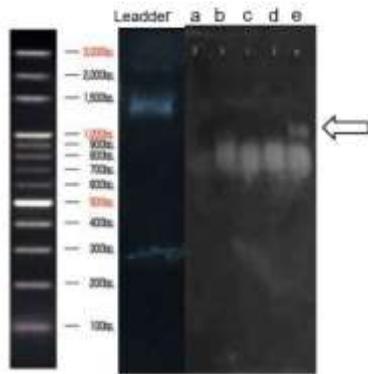
Hasil visualisasi elektroforesis sampel DNA *Eucheuma* sp. dapat dilihat dari gambar 1. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terlihat pita DNA pada lintasan gel dari sampel yang digunakan. Hal ini disebabkan karena kurangnya DNA yang dihasilkan. Kurangnya DNA yang dihasilkan disebabkan oleh ketebalan dinding sel, sehingga sel tidak dapat terlisis dengan sempurna, walaupun dalam penelitian ini telah menggunakan nitrogen cair untuk melisis sel *Eucheuma* sp. Pada beberapa laporan penelitian menunjukkan keberhasilan penggunaan kit-kit komersial untuk mendapatkan ekstraksi genomik DNA biota laut (Sahari *dkk.*, 2017; Wantania *dkk.*, 2016; Wehantouw *dkk.*, 2017 dan Peloa *dkk.*, 2016). Namun penelitian yang dilakukan oleh Hengkengbala (2017) menunjukkan hasil yang berbeda dalam

menggunakan kit komersial. Penggunaan kit tersebut tidak menunjukkan adanya keberhasilan dalam ekstraksi DNA genomik rumput laut jenis *Eucheuma* sp. Annisaqois, (2018) berhasil mengisolasi DNA dari rumput laut jenis *Kappaphycus* sp. dengan menggunakan ekstraksi buffer CTAB, akan tetapi, metode yang sama telah dilakukan dalam penelitian ini namun kurang menunjukkan keberhasilan isolasi DNA pada rumput laut jenis *Eucheuma* sp. Hal ini disebabkan perbedaan kandungan karaginan yang terkandung dalam *Eucheuma* sp. sehingga hasil yang didapatkan dalam penelitian juga berbeda. Sesuai dengan pernyataan Doyle dan Doyle, (1990) *dalam* Hengkengbala, (2017) bahwa prosedur yang berhasil digunakan untuk isolasi DNA pada satu kelompok tumbuhan atau alga seringkali gagal diaplikasikan untuk kelompok yang lainnya.

#### Amplifikasi DNA *Eucheuma* sp.

Hasil isolasi DNA kemudian diamplifikasi dengan menggunakan COX2 dengan pasangan primer Kcox2\_F71 dan Kcox2\_R671. DNA hasil isolasi juga diamplifikasi menggunakan gen *rbcL* dengan 4 pasangan primer yakni primer F-7 dan R-753, primer F-577 dan R-rbcS, primer F-7 dan R-rbcS, primer F-577 dan R-753.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa DNA gen rumput laut *Eucheuma* sp. berhasil diamplifikasi dengan menggunakan primer F-577 (for) dan R-753 (rev). Hal ini ditunjukkan adanya pita DNA pada lintasan gel (Gambar 2). Pita DNA berada pada posisi 1000-1200 bp. Panjang pita DNA (1000-1200 bp) menunjukkan ukuran DNA dari rumput laut. Sedangkan primer Kcox2\_F71 (for) dan Kcox2\_R671 (rev), primer F-7 (for) dan R-753 (rev), primer F-577 (for) dan R-rbcS (rev), primer F-7 (for) dan R-rbcS (rev), tidak menunjukkan adanya pita DNA pada lintasan gel. Hal ini menunjukkan bahwa primer ini tidak dapat mengamplifikasi DNA rumput laut *Eucheuma* sp. dalam proses amplifikasi DNA rumput laut *Eucheuma* sp.



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen COX2 dan *rbcL*: (a) Kcox2\_F71 dan Kcox2\_R671 (b) primer F-7 dan R-753, (c) primer F-577 dan R-rbcS, (d) primer F-7 dan R-rbcS dan (e) primer F-577 dan R-753.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, maka dapat disimpulkan bahwa, rumput laut jenis *Eucheuma* sp. dapat dideteksi dengan menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi walau belum optimal sehingga tidak terlihat adanya pita DNA pada lintasan gel dan pasangan primer F-577 (forward) dan R-753 (reverse) dan berhasil mengamplifikasi DNA rumput laut *Eucheuma* sp. yang ditunjukkan adanya pita DNA pada lintasan gel dengan panjang basa 1000-1200 bp.

### 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):2320-232
- Anggadiredja, J. T. Zalnika, A. Purwoto, H dan Istini, S. 2010. Rumput Laut: Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Anggraeni, S.R., Sudarsono dan D. Soedharma. 2008. Karakterisasi Genetika Rumput Laut *Eucheuma* sp. Dari Tiga Daerah Di Indonesia. *Jurnal Bionatura*. 10 (3):196-208.

- Annisaqois, M., G. S. Gerung., S. Wullur., D. A. Sumilat., B. T. Wagey dan S. V. Mandagi. 2018. Analisis Molekuler DNA Alga Merah (*RHODOPHYTA*) *Kappaphycus* sp. 1:1.
- Amaranggana. L., dan N. Wathoni. 2017. Manfaat Alga Merah (*Rhodopyta*) sebagai Sumber Obat dari Bahan Alam. *Majalah Farmastika*. 2:1.
- 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. 312 hal.
- Hengkengbala, I. R. 2017. Analisis Molekuler Beberapa Jenis Alga. Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UNSRAT.
- Hudha, M. I., Sepdwiyanti, R., dan Sari, S. D. 2012. Ekstraksi Karaginan Dari Rumput Laut (*Eucheuma spinosum*) Dengan Variasi Suhu Pelarut Dan Waktu Operasi. 6:2.
- Nugroho, K., Terryana, R.T., Lestari, P. 2015. Optimasi Metode Isolasi DNA pada *Jatropha* spp. *Jurnal Agroteknologi*. 5(2):15-22.
- Peloa, A., S. Wullur dan C. A. Sinjal. 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., J. Rimper dan S. Wullur. Identifikasi Molekul Rotifer *Branchionus* sp. Asal Perairan Tumpaan, Minahasa Selatan. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(1): 56-61.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A. dan Rosmita. 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Dengan Metode Fenol Kloroform. Universitas Hasanuddin. Hal 6-10.
- Wantania, L. L., E. Ginting dan S. Wullur. Isolasi Bakteri Simbion Dengan Spons Dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. 3(1) : 57-65.
- Wehantouw, A., E. Ginting dan S. Wullur. Identifikasi Sirip Ikan Hiu Yang Didapat Dari Pengumpul Di Minahasa Tenggara Menggunakan DNA Barcode. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(1): 62-68
- Zuccarello, G.C., A.T. Crichtley, J. Smith, V. Sieber, G.B. Lhonneur dan J.A. West. 2006. Systematic and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (*Solieriaceae*, *Rhodophyta*). *Journal of Applied Phycology*.