

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Metode dan Desain Penelitian

Penelitian ini terdiri atas dua tahap, yaitu konfirmasi identitas spesies mikroalga menggunakan pendekatan molekuler berdasarkan gen penyandi *18S rRNA* serta analisis respon pertumbuhan, kandungan lipid, dan ekspresi gen ortolog *LEC1* dan *MYB1* pada cekaman salinitas. Desain percobaan untuk analisis ekspresi gen terdiri dari rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan kontrol dan salinitas sebagai faktor serta dilakukan tiga kali ulangan. Penelitian dilakukan dengan urutan tahapan kultur mikroalga dengan perlakuan salinitas berikut kontrolnya; perhitungan densitas sel mikroalga dan pembuatan kurva tumbuh; pemanenan kultur mikroalga; identifikasi molekuler isolat mikroalga; analisis kandungan lipid; dan ekspresi transkrip gen ortolog.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Militar, Universitas Pertahanan Indonesia pada bulan September 2023 sampai Maret 2024 dengan jadwal penelitian sebagaimana tercantum dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	2023-2024						
		September	Oktober	November	Desember	Januari	Februari	Maret
1	Isolasi dan Kultur Mikroalga							
2	Isolasi DNA							
3	Amplifikasi dan Sekuensing Gen <i>18S rRNA</i>							
4	Analisis Data Sekuens Gen							
5	Pemanenan Kultur							

6	Ekstraksi Lipid							
7	Isolasi RNA							
8	Sintesis cDNA							
9	Analisis Data Ekspresi Gen							
10	Penyusunan Laporan Penelitian							

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat aerator dan selang, lampu TL, autoklaf, freezer, waterbath, microwave, oven, spektrofotometer mikrovolum, seperangkat mesin sentrifugasi, vorteks, shaker, neraca analitik, mikroskop binokuler, mesin elektroforesis, UV transilluminator, pH meter, lux meter, seperangkat mikropipet dan tip, hemositometer, tabung sentrifugasi, strip tubes, serta mesin PCR dan qRT-PCR. Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini adalah UGENE.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur mikroalga *Botryococcus braunii*, pupuk Walne, akuades, nitrogen cair, buffer CTAB, polivinil pirolidon (PVP), β -merkaptotetanol, kloroform, isoamil alkohol, natrium klorida (NaCl), natrium asetat, etanol, metanol, isopropanol, nuclease-free water (ddH₂O), bubuk agarosa, buffer TAE, premix MyTaqTM HS Red Mix, primer untuk PCR DNA, reagen TRIzolTM, 10x buffer reaksi (dengan MgCl₂), DNase I, 50 mM EDTA, Thermo ScientificTM RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, SensiFASTTM SYBR® Lo-ROX Kit, serta primer untuk qRT-PCR.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Kultur Mikroalga dengan Perlakuan Salinitas

Media kultur mikroalga disiapkan dalam botol kaca dengan komposisi 250 μ L Walne dan 250 mL akuades (Trikuti et al., 2016) serta pH yang diatur pada nilai 8 (Nugroho et al., 2020). Salinitas media diatur pada 0,1 M menggunakan garam natrium klorida. Media yang telah tercampur disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Selanjutnya,

50 mL isolat mikroalga dicampurkan dalam campuran media steril. Kondisi lingkungan kultur diatur secara konstan selama 14 hari pada pencahayaan dengan intensitas 10.000 lux (Kojima & Zhang, 1999), penyinaran dengan 22 jam terang dan 2 jam gelap, suhu 25 °C, serta aerasi secara terus-menerus (Lampiran 2).

3.4.2 Perhitungan Densitas Sel Mikroalga dan Pembuatan Kurva Tumbuh

Densitas sel mikroalga dihitung setiap hari selama 14 hari. Perhitungan dilakukan menggunakan hemositometer dan mikroskop binokuler. Hemositometer dan kaca penutup dibersihkan dahulu dengan etanol 70%. Sebanyak 10 µL suspensi mikroalga diambil dengan mikropipet dan ditetaskan ke dalam hemositometer dengan posisi ujung tip diantara gelas objek dan kaca penutup. Bilik hitung hemositometer diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 100x. Perhitungan densitas sel mikroalga dengan persamaan 3.1 (Isnansetyo & Kurniasuty, 1995),

$$X = \left(\frac{N}{n} \times \frac{25 \times 10^4}{n} \right) DF \quad (3.1)$$

Keterangan: X = Densitas sel (sel/mL);

N = Jumlah sel teramati dari 5 kotak kecil;

n = Jumlah kotak yang diamati;

25×10^4 = Konstanta hemositometer;

DF = Faktor pengenceran.

Hasil perhitungan densitas sel diolah menjadi kurva pertumbuhan mikroalga.

3.4.3 Identifikasi Molekuler Isolat Mikroalga

3.4.3.1 Isolasi DNA Mikroalga

Isolasi DNA mikroalga dilakukan dengan metode CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Sebanyak 24 mL isolat mikroalga disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm pada suhu 10 °C selama 3 menit, lalu supernatan dibuang. Hasil sentrifugasi berupa pelet digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi bubuk. Masing-masing 600 µL *buffer* CTAB, 600 µL PVP,

dan 4 μL β -merkaptotanol ditambahkan ke tabung sentrifugasi yang berisi gerusan mikroalga, lalu divorteks. Sampel diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65 °C selama 30 menit, dengan dibolak-balik setiap 5 menit. Kemudian, sampel diinkubasi pada suhu -20 °C selama 5 menit.

Purifikasi dilakukan dengan menambahkan 600 μL larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1, V:V) ditambahkan ke dalam tabung dan dibolak-balik perlahan. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan hasil sentrifugasi berupa supernatan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 mL baru. Langkah ini diulangi sebanyak dua kali.

Presipitasi dilakukan dengan menambahkan dua kali volume etanol 100% dan 0,1 kali volume natrium asetat ke dalam sampel dan diaduk selama 5 menit. Selanjutnya, sampel diinkubasi semalaman pada suhu -20 °C. Pada hari selanjutnya, sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Hasil sentrifugasi berupa pelet dikeringkan, lalu ditambahkan 20 μL *nuclease-free water*.

Pengujian kualitas hasil isolasi DNA menggunakan mesin elektroforesis dengan gel agarosa 1% dan 1x *buffer* TAE pada daya 48 Volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati menggunakan UV *transilluminator*. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer mikrovolume. Konsentrasi DNA diukur dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm, serta kemurnian DNA diukur dengan melihat rasio A_{260}/A_{280} dan A_{260}/A_{230} (Khaw et al., 2020).

3.4.3.2 Amplifikasi dan Sekuensing Gen *18S rRNA*

Amplifikasi gen *18S rRNA* dengan primer ss5_F sebagai primer *forward* dan ss3_R sebagai primer *reverse* (Matsumoto et al., 2010) dengan target ampikon 1.791 bp, sebagaimana tercantum dalam Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Primer untuk Identifikasi Molekuler Isolat Mikroalga

Primer	Sekuens Nukleotida (5'-3')	T _m (°C)
ss5_F	GGTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	65,16
ss3_R	GATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACC	70,03

Reaksi PCR dibuat dengan campuran 5 μ L *premix MyTaqTM HS Red Mix*, 2 μ L primer *forward*, 2 μ L primer *reverse*, 1 μ L DNA cetakan, dan 2 μ L ddH₂O hingga volume keseluruhan mencapai 12 μ L. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR dengan pengaturan 94 °C selama 1 menit, 55 °C selama 2 menit, dan 72 °C selama 3 menit, yang diulang sebanyak 30 siklus (Rowan & Powers, 1992). Pengujian kualitas hasil PCR menggunakan mesin elektroforesis dengan gel agarosa 0,8%.

Amplikon fragmen gen *18S rRNA* dari sampel mikroalga disekuens menggunakan metode Sanger dengan arah *forward* dan *reverse*. Pemeriksaan kualitas hasil sekuensing dilakukan untuk memilih sekuens dengan kualitas baik berdasarkan tinggi puncak kromatogram. Sekuens total tersebut digunakan untuk mengidentifikasi isolat mikroalga dengan membandingkan similaritasnya pada *database* nukleotida non-redundan dari NCBI untuk genus *Botryococcus*.

3.4.4 Pemanenan Kultur Mikroalga

3.4.4.1 Penghitungan Biomassa Mikroalga

Pemanenan kultur untuk penghitungan biomassa dilakukan pada fase kematian sesuai kurva pertumbuhan mikroalga. Pemanenan dilakukan dengan cara sentrifugasi. Sebanyak 50 mL isolat mikroalga disentrifugasi dengan kecepatan 3600 rpm pada suhu 22 °C selama 15 menit. Hasil sentrifugasi berupa pelet dibilas dengan ditambahkan akuades dan dilakukan sentrifugasi kembali dengan pengaturan yang sama. Hasil sentrifugasi akhir berupa pelet merupakan biomassa basah mikroalga. Selanjutnya, kertas timbang yang telah dilabeli ditimbang sebagai bobot

kertas. Lalu, pelet mikroalga dioleskan pada kertas untuk ditimbang menggunakan neraca analitik. Bobot biomassa basah diperoleh dari selisih bobot akhir biomassa basah dengan bobot kertas timbang. Kemudian, biomassa basah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 70 °C selama 3 hari. Biomassa yang sudah kering ditimbang kembali menggunakan neraca analitik. Bobot biomassa kering diperoleh dari selisih bobot akhir biomassa kering dengan bobot kertas timbang.

3.4.4.2 Ekstraksi Lipid

Pemanenan kultur untuk ekstraksi lipid dilakukan pada fase kematian sesuai kurva pertumbuhan mikroalga. Pemanenan dilakukan dengan cara sentrifugasi. Sebanyak 50 mL isolat mikroalga disentrifugasi dengan kecepatan 3600 rpm pada suhu 22 °C selama 15 menit. Hasil sentrifugasi yang digunakan berupa pelet.

Ekstraksi lipid mikroalga menggunakan metode Folch (Folch et al., 1957). Sebanyak 10 mL larutan kloroform:metanol (2:1, V:V) ditambahkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 mL berisi pelet mikroalga, lalu divorteks selama 2 menit. Campuran mikroalga dan pelarut dari setiap tabung tersebut dipindahkan ke dalam 4 tabung sentrifugasi 15 mL baru dengan volume sama rata. Sebanyak 12,5 mL larutan kloroform:metanol (2:1, V:V) ditambahkan kembali ke dalam tabung berisi campuran mikroalga dan pelarut, hingga volume keseluruhan mencapai 15 mL. Selanjutnya, setiap tabung sentrifugasi dibungkus *aluminium foil* untuk dilakukan maserasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 110 rpm selama 3 jam. Hasil maserasi disentrifugasi dengan kecepatan 3600 rpm pada suhu 22 °C selama 15 menit. Hasil sentrifugasi berupa supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru. Sebanyak 8 mL natrium klorida 0,78% ditambahkan ke tabung yang berisi supernatan sehingga perbandingan pelarut kloroform:metanol:natrium klorida mencapai 2:1:0,8; lalu diinkubasi selama 1 jam. Hasil inkubasi berupa fase bawah yang merupakan campuran kloroform dan lipid diambil, kemudian disimpan pada suhu 4 °C.

Tahapan evaporasi pelarut dilakukan dalam suhu ruang. Cawan petri yang telah dilabeli ditimbang sebagai bobot wadah. Lalu, campuran kloroform dan lipid dituang ke cawan petri untuk diuapkan pada suhu ruang. Setelah terbentuk pasta lipid, cawan petri ditimbang kembali menggunakan neraca analitik. Bobot lipid diperoleh dari selisih bobot akhir cawan petri dengan bobot awal cawan petri.

3.4.5 Analisis Tingkat Ekspresi Transkrip Gen Ortolog *LEC1* dan *MYB1*

3.4.5.1 Isolasi RNA Mikroalga

Pemanenan kultur untuk isolasi RNA dilakukan pada fase eksponensial yang sedang menuju fase stasioner (Sari et al., 2013) sesuai kurva pertumbuhan mikroalga. Sebanyak 50 mL isolat mikroalga disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm pada suhu 10 °C selama 3 menit. Hasil sentrifugasi berupa pelet digerus dengan nitrogen cair hingga menjadi bubuk.

Isolasi RNA mikroalga menggunakan metode TRIzol. Sebanyak 1 mL reagen *TRIzol*™ ditambahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berisi gerusan mikroalga, lalu divorteks. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, kemudian 0,2 mL kloroform ditambahkan, lalu sampel dibolak-balik dan diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 5 menit. Kemudian, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 20 menit. Hasil sentrifugasi berupa fase atas diambil dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 mL baru. Sebanyak 0,5 mL isopropanol ditambahkan ke dalam tabung sentrifugasi berisi total RNA dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 10 menit. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit, lalu supernatan dibuang. Hasil sentrifugasi berupa pelet dicuci dengan ditambahkan 1 mL etanol 75%. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Hasil sentrifugasi

berupa pelet dikeringkan, lalu ditambahkan 10–15 μL *nuclease-free water*. Kemudian, sampel diinkubasi pada suhu 55–60 °C selama 10 menit.

Pengujian kualitas hasil isolasi RNA menggunakan mesin elektroforesis dengan gel agarosa 1% dan 1x *buffer* TAE pada daya 48 Volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis diamati menggunakan UV *transilluminator*. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian RNA menggunakan spektrofotometer mikrovolume. Konsentrasi RNA diukur dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm, serta kemurnian RNA diukur dengan melihat rasio A_{260}/A_{280} (Choi et al., 2011).

3.4.5.2 Sintesis cDNA

Jumlah RNA yang digunakan sebagai cetakan dalam sintesis cDNA dihitung dan ditentukan sebanyak 1 μg untuk setiap reaksi. Tahapan sintesis cDNA diawali dengan perlakuan DNase untuk membersihkan sisa DNA dari total RNA. Sebanyak 1 μL 10x *buffer* reaksi (dengan MgCl_2), 1 μL DNase I, dan ddH₂O ditambahkan ke dalam tabung sentrifugasi berisi 1 μg RNA, hingga volume keseluruhan mencapai 10 μL . Total RNA diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya, 1 μL 50 mM EDTA ditambahkan ke dalam total RNA dan diinkubasi kembali pada suhu 65 °C selama 10 menit.

Tahapan utama sintesis cDNA menggunakan *Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* dengan primer Oligo(dT)₁₈ (Lee et al., 2020). Sebanyak 4 μL 5x *buffer* reaksi, 1 μL primer Oligo(dT)₁₈, 2 μL 10 mM dNTP Mix, 0,5 μL RiboLock RNase Inhibitor 40 U/ μL , 1 μL RevertAid M-MuLV RT 200 U/ μL , dan 0,5 μL ddH₂O ditambahkan ke dalam tabung berisi cetakan RNA, hingga volume keseluruhan mencapai 20 μL . Sampel dibolak-balik secara perlahan, kemudian sampel diinkubasi pada suhu 42 °C selama 60 menit dan langsung dilanjutkan terminasi reaksi dengan pemanasan pada suhu 70 °C selama 5 menit. Produk disimpan pada suhu -40 °C.

Pengecekan produk cDNA melalui elektroforesis hasil PCR menggunakan primer gen aktin dan gen target, sebagaimana tercantum dalam Tabel 3.3. Amplifikasi menggunakan mesin PCR dengan pengaturan 94 °C selama 15 detik, 65 °C selama 15 detik, dan 72 °C selama 10 detik untuk program gen *ACT11* dan *LEC1*; serta pengaturan 94 °C selama 15 detik, 64,1 °C selama 15 detik, dan 72 °C selama 10 detik untuk program gen *MYB1*; yang mana keduanya diulang sebanyak 50 siklus.

3.4.5.3 Amplifikasi dan Kuantifikasi Gen Ortolog *LEC1* dan *MYB1*

Tahapan utama qRT-PCR menggunakan *SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX Kit* dengan satu pasang primer spesifik gen aktin dan dua pasang primer spesifik gen target, sebagaimana tercantum dalam Tabel 3.3. Primer gen-gen target dirancang berdasarkan sekuens transkrip setiap gen pada mikroalga *Botryococcus braunii*. Reaksi PCR dibuat dengan campuran 5 µL 2x *SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX mix*, 0,4 µL primer *forward*, 0,4 µL primer *reverse*, 9 µL ddH₂O, dan cetakan RNA ditambahkan ke dalam setiap tabung pada *strip tubes*, hingga volume keseluruhan mencapai 10 µL. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin qRT-PCR dengan pengaturan 94 °C selama 15 detik, 64,1 °C selama 15 detik, dan 72 °C selama 10 detik, yang diulang sebanyak 50 siklus. Reaksi PCR diatur dengan tiga ulangan biologis dan tiga ulangan teknis. Tiga ulangan biologis berupa tiga ulangan dari setiap sampel yang sama dan tiga ulangan teknis berupa tiga sampel berbeda dari setiap kelompok kontrol dan perlakuan, sehingga secara keseluruhan diperoleh 36 data. Selanjutnya, hasil qRT-PCR diperoleh data berupa kurva amplifikasi (Lampiran 5) dan nilai *cycle threshold* (Ct) (Lampiran 6).

Tabel 3.3 Primer untuk Analisis Tingkat Ekspresi Gen

Primer	Sekuens Nukleotida (5'-3')	Tm (°C)
BbACT11_exp_F	ATCAAGGAGCGCTTGGCATA	65,1
BbACT11_exp_R	ACCTGTCCATCAGGCAACTC	65
BbLEC1_exp_F	GGAGTGCGTGTCAGAGTTCA	65
BbLEC1_exp_R	AGCCCAAGGTACTCATTGCC	65,4
BbMYB1_exp_F	AACTGCCAGGACGGATTGG	65,4
BbMYB1_exp_R	TCATCTTCTTCAGCCGTCCA	64,1

3.5 Metode Analisis

Normalisasi jumlah transkrip di setiap sampel dilakukan berdasarkan kelimpahan relatif gen penyandi aktin sebagai referensi kontrol internal. Nilai ekspresi gen dihitung dengan metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) sesuai persamaan 3.2. Dalam penelitian ini digunakan rumus seperti berikut,

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3.2)$$

Keterangan: ΔCt = Selisih Ct gen target dengan Ct gen aktin;

$\Delta\Delta Ct$ = Selisih ΔCt perlakuan dengan ΔCt kontrol.