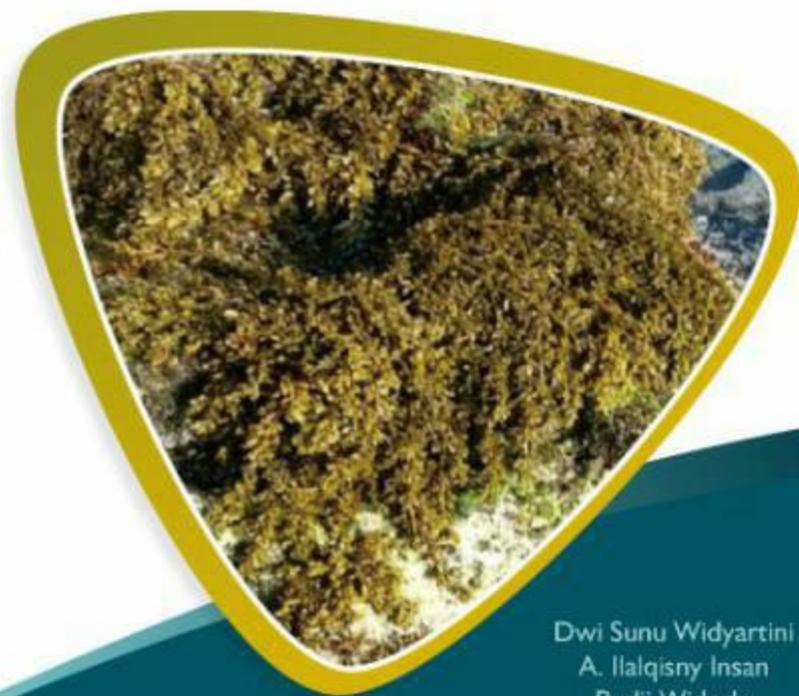




Monograf



Dwi Sunu Widyartini
 A. Ilalqisny Insan
 Pudji Widodo
 A.B. Susanto
 Alice Yuniaty

EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS ALGINAT *Sargassum polycystum*

Monograf ini mengulas tentang hasil-hasil penelitian variasi talus rumput laut *Sargossum* spp., faktor lingkungan tumbuh, anatomi talus, kandungan pigmen dan kandungan alginat, serta ekspresi gen penyandi GDP-Mannosa dehidrogenase sebagai enzim kunci dalam pembentukan alginat. Alginat, bahan yang dibutuhkan dalam berbagai kepentingan industr, tersusun dalam bentuk rantal linier panjang dengan berat molekul tinggi dari polimer murni asam uronat yang membentuk garam larut dalam air panas ataupun dingin, namun mampu membentuk koloid dan mengentalkan larutan atau membentuk gel, sehingga berfungsi sebagai pembentuk gel (*gelling agent*), penstabil (*stabilizer*), pengemulsi (*emulsifier*), suspensi (*suspending agent*), dan pendispersi suatu produk.

Buku ini dilatarbelakangi oleh perlunya pengembangan ilmu dalam upaya pengelolaan perairan Indonesia untuk meningkatkan kualitas bahan baku alginat dari rumput laut *Sargossum* berdasarkan hasil penelitian di lapangan dan laboratorium yang dilakukan sejak tahun 2011 sampai 2017. Ekspresi gen pada bagian talus dengan lokasi tumbuh yang mampu menghasilkan kandungan alginat tertinggi dapat dijadikan data dasar pengelolaan sumber daya alam penghasil alginat yang berkelanjutan, melalui budidaya yang intensif. Sumberdaya alginat berkelanjutan sangat diperlukan, mengingat keberadaan senyawa alginat ini sangat dibutuhkan dalam berbagai industri.

Ekspresi suatu gen secara molekuler dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA). Deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA memerlukan tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang mengekspresikan gen tersebut dan membutuhkan alat yang sensitif. RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik *Real Time PCR* yang paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA. Metode RT-qPCR dapat digunakan untuk menganalisis profil ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada berbagai bentuk talus *S. polycystum* asal perairan pantai berbeda.

Ekspresi relatif dihitung menggunakan metode *comparative Ct* ($[Ct]$), dengan rumus $2^{-\Delta Ct}$, dengan ΔCt adalah $[Ct_{target} - Ct_{house}]$ (Livak & Schmittgen, 2008). Nilai $[Ct]$ merupakan nilai Ct yang telah dinormalisasi. Nilai Ct GDP-mannosa dehidrogenase dinormalisasi dengan nilai Ct β -aktin (*House Keeping Gene*). β -aktin dipilih sebagai gen pembaku karena ekspresinya relatif konstan dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan. Nilai Ct menunjukkan siklus amplifikasi, dengan sinyal *fluorescent* melewati batas ambang (*threshold*) yang ditandai dengan jumlah ampikon yang bertambah.

Ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada *S. polycystum* berkisar 0,0086—6,3206. Dengan nilai median bentuk talus batang 0,0096 (min. 0,0001—maks. 0,0467), pada bentuk talus daun 0,0049 (min. 0,0012—maks. 0,2256) dan pada bentuk talus vesikel 0,0270 (min. 0,0072—maks. 0,0764). Perbedaan ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase antar bentuk talus *S. polycystum*, terjadi peningkatan ekspresi sebesar 1,19 kali pada bentuk talus daun dibandingkan bentuk batang, 1,88 kali pada bentuk talus daun dibandingkan bentuk talus vesikel, dan 1,58 kali pada bentuk talus batang dibandingkan talus vesikel. Bagian talus yang berpotensi menghasilkan alginat paling tinggi berdasarkan ekspresi gen GDP-mannosa dehidrogenase adalah talus batang, diikuti talus daun dan vesikel. Bagian talus batang dari rumput laut *S. polycystum* paling efektif sebagai bahan baku penghasil alginat dengan kandungan lebih tinggi.

Monograf

EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS ALGINAT *Sargassum polycystum*

Dwi Sunu Widyartini, dkk.



UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
 Gd. UNSOED Press
 Jalan Prof. Dr. H.R. Bojaryanto 709 Parungrejo
 Kode Pos 35122 Kontak Pos 113
 Telepon (0261) 624070
 Email: unsoedpress@unsoed.ac.id



EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS ALGINAT
Sargassum polycystum

DWI SUNU WIDYARTINI
A. ILALQISNY INSAN
PUDJI WIDODO
A.B. SUSANTO
ALICE YUNIATY



Penerbit
Universitas Jenderal Soedirman
2021

Monograf

EKSPRESI GEN DALAM BIOSINTESIS ALGINAT
Sargassum polycystum

© 2021 Universitas Jenderal Soedirman
Cetakan Kesatu, Mei 2021

Hak Cipta dilindungi Undang-undang
All Right Reserved

Penulis:

Dwi Sunu Widyartini
A. Ilalqisny Insan
Pudji Widodo
A.B. Susanto
Alice Yuniaty

Editor Isi:

Dr. Daniel Joko Wahyono, M.Biomed

Editor Bahasa:

Imam Suhardi, M.Hum

Diterbitkan oleh:

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)
Telp. (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com



Anggota

Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia

Nomor : 003.027.1.03.2018

vi + 65 hal., 15 x 23 cm

ISBN : 978-623-6783-46-7

*Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit,
sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak,
photoprint, microfilm dan sebagainya.*

KATA PENGANTAR

Penulis memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga buku monograf ini dapat diselesaikan. Monograf disusun berdasarkan hasil penelitian di lapangan dan laboratorium yang dilakukan sejak tahun 2011 sampai 2017. Buku ini mengulas tentang hasil-hasil penelitian variasi talus rumput laut *Sargassum* spp., faktor lingkungan tumbuh, anatomi talus, kandungan pigmen dan kandungan alginat, serta ekspresi gen penyandi GDP-Mannosa dehidrogenase sebagai enzim kunci dalam pembentukan alginat.

Buku monograf ini dilatarbelakangi oleh perlunya pengembangan ilmu dalam upaya pengelolaan perairan Indonesia untuk meningkatkan kualitas bahan baku alginat dari rumput laut *Sargassum*. Ekspresi gen pada bagian talus dengan lokasi tumbuh yang mampu menghasilkan kandungan alginat tertinggi dapat dijadikan data dasar pengelolaan sumber daya alam penghasil alginat yang berkelanjutan, melalui budidaya yang intensif. Sumberdaya alginat berkelanjutan sangat diperlukan, mengingat keberadaan senyawa alginat ini sangat dibutuhkan dalam berbagai industri.

Penelitian-penelitian untuk mendukung terwujudnya bioteknologi yang mampu meningkatkan kualitas alginat juga telah dilakukan dengan berbagai sumber dana dari DRPM RISTEK DIKTI dan BLU Unsoed. Pengetahuan tersebut dikemas dalam suatu buku monograf untuk pengembangan ilmu, khususnya Fikologi, sehingga akan mempermudah dalam proses pemahamannya.

Buku monograf ini tersusun atas kerjasama dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada institusi Universitas Jenderal Soedirman dan Kementerian Ristekdikti yang telah memberikan sumber dana untuk pelaksanaan penelitian-penelitian ini. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan buku monograf ini. Namun, penulis berharap buku ini dapat bermanfaat untuk pengelolaan perairan pantai dalam diversifikasi sumber daya alginat berkelanjutan.

Purwokerto, Januari 2021

Penulis,

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Temuan Kebaruan	5
BAB 2. RUMPUT LAUT <i>Sargassum polycystum</i>	
2.1. Kandungan Alginat	7
2.2. Morfologi Talus <i>S. polycystum</i>	8
2.3. Habitat <i>S. polycystum</i>	10
2.4. Signifikansi Variasi Talus dan Kandungan Alginat	12
BAB 3. BIOSINTESIS ALGINAT <i>Sargassum polycystum</i>	
3.1. Pigmen Fotosintesis <i>Sargassum</i>	15
3.2. Proses Fotosintesis <i>S. polycystum</i>	16
3.3. Biosintesis Alginat <i>S. polycystum</i>	18
3.4. Ekstraksi Alginat	22
BAB 4. PROFIL EKSPRESI mRNA GDP-MANNOSA DEHIDROGENASE PADA <i>Sargassum polycystum</i>	
4.1. Polymerase Chain Reacton (PCR)	25
4.2. Kuantitas Ekspresi Suatu Gen	27
4.3. RT-qPCR (<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)	28
4.4. Perhitungan dengan <i>Real Time PCR</i>	30
BAB 5. EKSPRESI GEN PADA TINGKAT mRNA	
5.1. Ekspresi Gen	33
5.2. Deteksi Ekspresi Gen Pada Tingkat mRNA	34
5.3. Pengukuran ekspresi genetik	36
5.4. Ekspresi mRNA GDP pada <i>S. Polycystum</i>	38
BAB 6. KESIMPULAN	43
DAFTAR PUSTAKA	45
DAFTAR SINGKATAN	59
PROTOKOL KERJA	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Rumput laut <i>Sargassum polycystum</i>	9
Gambar 3.1. Proses Fotosintesis pada tanaman C3.....	17
Gambar 3.2. Biosintesa Alginat..	19
Gambar 3.3. Struktur Alginat	20
Gambar 4.1. Kurva Amplifikasi pada <i>Real Time</i> PCR	29
Gambar 5.1. Deteksi <i>Real Time</i> PCR dengan <i>SYBR Green</i>	35

BAB I.

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sargassum polycystum mengandung alginat, bahan yang dibutuhkan dalam berbagai kepentingan industri. Alginat tersusun dalam bentuk rantai linier panjang dengan berat molekul tinggi dari polimer murni asam uronat yang membentuk garam larut dalam air panas ataupun dingin, namun mampu membentuk koloid dan mengentalkan larutan atau membentuk gel, sehingga berfungsi sebagai pembentuk gel (*gelling agent*), penstabil (*stabilizer*), pengemulsi (*emulsifier*), pensuspensi (*suspending agent*), dan pendispersi suatu produk (Winarno, 2008). Alginat berfungsi sebagai bahan tambahan pembuatan mentega, es krim, dan susu di bidang industri makanan. Alginat berfungsi sebagai pengikat air sehingga mudah menembus jaringan kulit dan terikat dengan sempurna. Di bidang industri tekstil, alginat berfungsi sebagai pengikat air (*pengental*), khususnya pada proses pengecapan pada industri batik.

Biosintesis alginat melibatkan beberapa enzim, di antaranya heksokinase, phosphomannose isomerase, dan D-mannose-1-phosphate guanylyl transferase yang mengkatalis gula nukleotida GDP-D-mannose. Enzim kunci yang berperan dalam proses biosintesis alginat adalah *Guanosine diphosphate mannose dehydrogenase* (Stephen, 1995). Enzim *guanosine diphosphate mannose dehydrogenase* (GDP-Mannose dehydrogenase) memiliki aktivitas dalam mengoksidasi asam GDP-D-mannuronic yang pada akhirnya mengikat asam mannuronat dalam pembentukan suatu alginat (Rasyid, 2003). Prekursor pembentukan alginat adalah asam GDP-D-mannuronic, yang diyakini berasal dari derivat oksidasi empat elektron gula GDP-D-mannose. Enzim GDP-mannosa dehidrogenase berfungsi mengkatalisasi reaksi perubahan dari GDP-D-mannose + 2NAD⁺ menjadi Asam GDP-D-mannuronic + 2 NADH (Tenhaken *et al.*, 2011). Ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase sebagai enzim kunci pembentukan alginat dapat memberikan informasi ilmiah mengenai bentuk dan asal talus yang optimum mengekspresi gen pembentuk alginat pada *S. polycystum*.

Tahapan sintesis protein fungsional atau enzim mengikuti dogma sentralinformasi genetik dari DNA ditranskripsi menjadi RNA dan melalui tahapan translasi RNA diubah menjadi protein (Rochmah *et al.*, 2009). Ekspresi suatu gen secara molekuler dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA). Deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA memerlukan tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang

mengekspresikan gen tersebut dan membutuhkan alat yang sensitif. RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik *Real Time* PCR yang paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (Pardal, 2010).

Metode RT-qPCR dapat digunakan untuk menganalisis profil ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada *S. polycystum* asal perairan pantai berbeda. Profil ekspresi mRNA untuk mengetahui ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada berbagai bentuk talus *S. polycystum* dan mengetahui ada atau tidaknya perbedaan ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase yang signifikan dari bentuk talus *S. polycystum*.

Profil ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase dapat dievaluasi dengan menggunakan metode RT-qPCR. Data dianalisis dengan metode *comparative Ct* dengan rumus $2^{-\Delta Ct}$ untuk mendapatkan nilai ekspresi relatif. Selanjutnya, untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase maka signifikan antar bentuk talus *S. polycystum* dan hasil ekspresi relatif diuji dengan bantuan software SPSS 16.0 *for windows*.

Ekspresi relatif dihitung menggunakan metode *comparative Ct* (ΔCt), dengan rumus $2^{-\Delta Ct}$, dengan ΔCt adalah $[Ct_{(GMD)} - Ct_{(\beta\text{-aktin})}]$ (Livak & Schmittgen, 2008). Nilai ΔCt merupakan nilai Ct yang telah dinormalisasi (Livak & Schmittgen, 2001). Nilai Ct GDP-mannosa dehidrogenase dinormalisasi dengan nilai Ct β -aktin (*House Keeping Gene*). β -aktin dipilih sebagai gen pembaku karena ekspresinya relatif konstan dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Heid *et al.*, 1996; Bustin, 2000).

Nilai Ct menunjukkan siklus amplifikasi, dengan sinyal *fluorescent* melewati batas ambang (*threshold*) yang ditandai dengan jumlah amplikon yang bertambah (Dewi *et al.*, 2015; Rahmaningtyas *et al.*, 2013). Amplifikasi PCR untuk deteksi ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase (GMD) pada *S. polycystum* menggunakan metode RT-qPCR. Hasil reaksi RT-qPCR berupa nilai *cycle threshold* (Ct) pada semua perlakuan talus *S. polycystum* (Budiman *et al.* 2015; Shahib *et al.* 2015; Livak & Schmittgen, 2001).

Nilai Ct digunakan untuk mengategorikan tingkatan ekspresi (Dewi *et al.* 2015; Shahib *et al.* 2015; Budiman *et al.* 2015). Nilai Ct dikategorikan bervariasi, dari 15 sampai 40. Nilai Ct 15 – 20 menunjukkan kategori ekspresi yang sangat tinggi; nilai Ct > 20 – 25 kategori ekspresi tinggi; nilai Ct > 25 – 30 kategori ekspresi sedang; nilai Ct > 30 – 35 kategori ekspresi rendah; dan nilai Ct > 35 – 40 kategori ekspresi sangat rendah (Dewi *et al.*, 2015; Shahib *et al.*, 2015; Budiman *et al.*, 2015).

Nilai median ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada bentuk talus batang dapat berbeda dengan bentuk talus daun dan bentuk talus vesikel. Menurut Widyartini *et al.* (2017), terjadi peningkatan ekspresi sebesar 1,2 kali pada bentuk talus vesikel dibandingkan bentuk talus daun, 1,25 kali pada bentuk talus daun dibandingkan bentuk talus batang, dan 1,5 kali pada bentuk talus vesikel dibandingkan bentuk talus batang. Namun, secara analisis statistik, mungkin tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase yang signifikan antar bentuk talus *S. polycystum*.

Semua bentuk talus rumput laut cokelat mengandung alginat, meskipun jumlahnya tidak sama (Zailanie *et al.*, 2003). Kandungan alginat bervariasi tergantung pada bagian talus yang diekstrak, metode ekstraksi yang digunakan, dan tempat tumbuh rumput laut (Rasyid, 2010). Kandungan alginat *S. polycystum* mencapai 40 % dari total berat kering dan memegang peranan penting dalam mempertahankan struktur jaringan talus (Winarno, 1996).

Peningkatan produksi bahan baku alginat telah diupayakan oleh Widyartini *et al.* (2013) melalui ekstensifikasi sumber daya alginat dan intensifikasi dengan penelitian budidaya rumput laut *Sargassum polycystum* di perairan Tebeng Cilacap. Hasil penelitian budidaya menunjukkan produksi rumput laut tertinggi pada metode apung dengan penanaman menggunakan sistem jaring apit, mencapai 3.098,253 g/m².

Produksi tinggi belum menunjukkan kandungan alginat yang dihasilkan lebih banyak, karena faktor genetik dan lingkungan berpengaruh pada ekspresi gen yang menyandi enzim pembentuk alginat. Selain teknologi aplikatif yang dioptimalkan, pengetahuan dasar juga diperlukan sehingga upaya meningkatkan kualitas dan kuantitas produk dapat berjalan seimbang. Bahan baku rumput laut yang berkualitas akan meningkatkan nilai jual di pasar internasional.

1.2. Perumusan Masalah

Kemampuan talus rumput laut dalam menghasilkan alginat, dipengaruhi oleh aktivitas enzim yang disandi oleh gen dan ekspresinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Kondisi lingkungan akan memengaruhi tahap-tahap reproduksi dan proses pertumbuhan. Penulisan buku monograf ini dapat menunjukkan adanya hubungan sifat morfologi, ekspresi gen, dan faktor lingkungan tumbuh terhadap biosintesis alginat. Biosintesis alginat dipengaruhi aktivitas enzim yang disandi oleh gen dan ekspresinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan.

Metode RT-qPCR dapat digunakan untuk menganalisis profil ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada rumput laut *Sargassum*. Untuk mengetahui ekspresi gen penyandi alginat diisolasi dari bagian dan asal talus berbeda pada *S. polycystum*, sehingga dapat

menginterpretasikan bagian dan asal talus yang menunjukkan ekspresi gen paling tinggi pada *S. polycystum*. Bagian talus yang mampu mengekspresi gen optimum sebagai dasar pengelolaan diversifikasi alginat yang berkelanjutan dibudidayakan di perairan yang sesuai untuk pertumbuhan, sehingga banyak menghasilkan alginat.

Talus rumput laut *Sargassum* sangat polimorfik (Cheang *et al.*, 2008). Polimorfisme yang tinggi terjadi antar individu pada populasi *S. polycystum* (Widyartini, 2016). Variasi bentuk talus terjadi karena polimorfisme genetik dan lingkungan. Menurut Cheang *et al.* (2008), bentuk dan ukuran talus batang, daun, dan vesikel sangat bervariasi antar individu dan spesies dalam suatu populasi. Perbedaan ukuran dan tingkat variasi bersifat temporer dalam individu, antar individu, lingkungan, dan antar variasi lokal. Variasi bentuk terjadi karena polimorfisme genetik dan lingkungan.

Lingkungan di laut sangat tidak stabil. Dinamika di laut menyebabkan sifat fisik dan kimia perairan mudah berubah-ubah. Apriyana (2006) menyatakan bahwa rumput laut akan tumbuh dengan subur pada daerah yang sesuai dengan temperatur di laut. Menurut Luning (1990), secara fisiologis, suhu rendah mengakibatkan aktifitas biokimia dalam tubuh berhenti, sedangkan suhu yang terlalu tinggi mengakibatkan rusaknya enzim dan hancurnya mekanisme biokimiawi. Salinitas yang terlalu tinggi atau terlalu rendah juga akan menyebabkan gangguan pada proses fisiologis. Sebagai adaptasi terhadap fluktuasi salinitas dengan mengatur konsentrasi ion di dalam talusnya seperti K^+ , Na^+ , Cl^- , dan konsentrasi bahan organik untuk menjaga konsentrasi cairan di luar sel dan di dalam sel tetap seimbang.

Hasil penelitian Widyartini *et al.* (2017) menunjukkan secara morfologi talus rumput laut *S. polycystum* asal Pantai Manganti Kebumen dan Pantai Karimunjawa Jepara menunjukkan variasi bentuk dan ukuran pada talus berbentuk batang, daun, dan vesikel. Secara visual, rumput laut *S. polycystum* yang berasal dari Pantai Manganti talus berwarna cokelat kehijauan hingga cokelat gelap dibandingkan rumput laut *S. polycystum* dari Pantai Karimunjawa yang umumnya berwarna cokelat terang. Hasil penelitian juga menunjukkan ada hubungan salinitas dan pH di Pantai Manganti terhadap panjang vesikel rumput laut *S. polycystum* ($p < 0,05$) dengan koefisien korelasi ($r = 0,416$). Sementara itu, suhu air, salinitas, dan pH di Pantai Karimunjawa berhubungan dengan warna vesikel ($r = 0,390$ dan $p = 0,033$); nitrat dan posfat terhadap lebar, permukaan atas dan bawah talus daun; posfat terhadap lebar dan tepi talus daun serta panjang vesikel ($p < 0,05$).

Perairan pantai utara dan selatan Jawa merupakan lingkungan yang terpisah oleh pulau, sehingga keduanya menunjukkan terjadinya dinamika laut yang berbeda yang akan memengaruhi fisiologi dan

penyebaran organisme. Kedua faktor berperan dalam menentukan bentuk dan ukuran talus dan dapat menunjukkan karakteristik yang berbeda terhadap kandungan alginat. Berdasarkan hal tersebut maka dirumuskan permasalahan berikut.

1. Bagaimana profil ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada masing-masing bentuk talus *S. polycystum*?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase yang signifikan dari masing-masing bentuk talus rumput laut *S. polycystum* asal pesisir pantai Karimunjawa dan Manganti?

1.3. Temuan Kebaruan

Ekspresi gen secara molekuler pada rumput laut dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA). Level transkripsi secara kuantitatif suatu gen spesifik selalu menjadi fokus penelitian dalam studi fungsi gen (Zamorano *et al.*, 1996). Studi tentang ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase yang merupakan prekursor pembentukan alginat pada *S. polycystum* menjadi landasan kajian yang menarik.

Ekspresi relatif pada berbagai bentuk talus *S. polycystum* dapat mendukung pemanfaatan sumber daya alginat secara optimal dengan mengetahui profil ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada masing-masing bentuk talus (Tenhaken *et al.*, 2011). Tujuan mengetahui ekspresi gen pada berbagai talus dengan lokasi tumbuh yang berbeda adalah untuk menentukan ekspresi gen penyandi alginat tertinggi sebagai dasar pengelolaan perairan untuk menghasilkan produk alginat yang dapat dikembangkan untuk diversifikasi alginat.

Dari temuan yang ditargetkan dengan mengetahui ekspresi gen penyandi biosintesis alginat pada berbagai bentuk talus *S. polycystum* asal lingkungan tumbuh berbeda, dapat ditentukan bagian talus dan kondisi lingkungan yang berpotensi menghasilkan alginat tertinggi. Bagian talus yang menghasilkan kandungan alginat paling tinggi sebagai teknologi pascapanen yang tepat dalam memanfaatkan sumber daya alginat. Kontribusi terhadap bidang ilmu Fikologi, dapat dipakai sebagai rujukan untuk pengembangan *species indigenous* berkelanjutan melalui budidaya yang intensif.

BAB 2

RUMPUT LAUT *Sargassum polycystum*

Sargassum polycystum memiliki potensi yang cukup tinggi sebagai penghasil alginat karena memiliki pertumbuhan yang cepat, kemampuan menyesuaikan diri terhadap perubahan musim, dan prospek ekonomi yang baik (Husni *et al.*, 2012; Widyartini *et al.*, 2012; Masduqi *et al.*, 2014). Rumput laut *S. polycystum* sebagai sumber utama penghasil alginat di India (Saraswathi *et al.*, 2003).

2.1. Kandungan Alginat

Hasil penelitian Rendemen alginat *Sargassum* yang diambil dari pantai Rancababakan Cilacap berkisar 24—26,47 % (Widyartini *et al.*, 2003). Widyartini *et al.* (2012) menunjukkan kandungan alginat *S. polycystum* yang diambil pada musim kemarau berkisar 51,64—59,81 %. Widyartini *et al.* (2013) menunjukkan kandungan alginat *S. polycystum* yang diambil pada musim penghujan berkisar 40—51,64 %.

King (1983) menyatakan bahwa kandungan alginat *S. polycystum* berkisar 51,64% yang dipengaruhi oleh tempat tumbuh dan metode ekstraksi. Dari hasil penelitian Widyartini & Santosa (2006), kandungan alginat *Sargassum* dari Perairan Rancababakan Cilacap yang diekstraksi dengan metode hidrasi menurut Winarno berkisar 30,32—42,59 %. Dari hasil penelitian Widyartini *et al.* (2012), kandungan alginat *S. polycystum* yang berasal dari perairan pantai selatan Jawa Tengah yang diekstraksi dengan metode Kelco co menurut Rasyid berkisar 11,98—70,11 % selain dipengaruhi oleh tempat tumbuh dan metode ekstraksi, kandungan alginat juga dipengaruhi oleh bentuk talus.

Sargassum memiliki bentuk tubuh yang berupa talus (Anggadiredja 2008). Talus umumnya berwarna pirang gelap hingga pirang kekuningan (Marianingsih *et al.*, 2013). Bentuk talus ada yang menyerupai buah atau berupa gelembung udara yang digunakan sebagai pelampung (Purwanti, 2013). Bentuk talus daun berukuran kecil dengan panjang ± 3 cm dan lebar ± 1 cm, lonjong atau oblong, sessil, dengan tepi daun bergerigi dan ujung runcing. Bentuk talus vesikel berukuran kecil, oval atau *spherical*, jumlah banyak pada talus dewasa, diameter 1,5 - 3 mm (Widyartini *et al.*, 2012).

Talus batang, daun, dan vesikel sangat bervariasi antar individu dan spesies dalam suatu populasi. Perbedaan skala dan tingkat variasi bersifat temporer dalam individu, antar individu, lingkungan, dan antar variasi lokal (Cheang *et al.*, 2008). Walaupun ada perbedaan secara morfologi, akan tetapi bersifat semu, karena talus bentuk akar, batang,

dan daun, memiliki fungsi yang hampir sama. Semua bagian talus dapat melakukan proses fotosintesis, meskipun kemampuan berfotosintesis berbeda, sehingga cadangan makanan yang dihasilkan tidak sama (Atmadja, 1996).

2.2 Morfologi Talus *S. polycystum*

Rumput laut *Sargassum* secara morfologi terdiri atas *holdfast*, satu sampai beberapa batang utama yang bercabang menjadi cabang (*stipe*) dan terdiferensiasi menjadi talus serupa daun (*leaves*), vesikel (*aerocysts*), dan organ reproduksi (*reseptacle*). *Holdfast* merupakan bagian dasar pada kerangka tubuh rumput laut, hanya berfungsi sebagai alat pelekat atau penumpu pada substrat, sehingga tumbuhnya dapat kuat dan menetap. Bagian batang umumnya berbentuk silinder dan bercabang, tetapi lebih sederhana dengan segmen-segmen yang lebih pendek. Cabang primer membentuk dua macam cabang, satu membentuk gelembung udara (*bladder*) yang berbentuk bulat atau biasa disebut vesikel. Vesikel merupakan batang yang menggelembung dan bulat, merupakan modifikasi dari *secondary lateral*, berdiameter 1,5—2 cm yang berfungsi sebagai alat mengapung jika terendam air saat terjadi pasang di daerah intertidal dan sebagai cadangan air saat terempas ke tepi pantai (Sulisetjono, 2009). Pada cabang lain yang membentuk reseptakel (cabang khusus yang fertil untuk reproduksi), terdapat konseptakel yang memuat organ reproduksi dan kristoblas (Dawes, 1987). Reseptakel berbentuk pipih bercabang, bergerigi, atau segitiga. Bagian pangkal poros terdapat talus bentuk daun yang tumbuh secara lateral (Bold & Wynne, 1985).

Sargassum dideskripsikan pertama kali oleh C. Agardh pada tahun 1820, merupakan genus rumput laut yang paling kaya spesiesnya (Yoshida, 1983; Guiry & Guiry, 2010) dan secara morfologi merupakan genera *Phaeophyceae* yang paling kompleks (Noikasar & Ajisaka, 2009). Lebih dari 400 spesies telah dideskripsikan, dengan spesies baru dan didokumentasikan (Lu & Tseng, 2004). Penyebaran spesies sangat luas, terutama di daerah tropis dan subtropis sering membentuk hutan lebat di dasar laut. Ada sekitar 1000 taksa, dan baru 40 % diakui sampai saat ini (Mattio & Payri, 2010).

Sargassum merupakan rumput laut cokelat yang memiliki keanekaragaman paling banyak di Indonesia (Rachmat, 1999). Beberapa *Sargassum* yang tumbuh di perairan Indonesia di antaranya adalah *S. binderi*, *S. asperifolium*, *S. ilicifolium*, *S. polycystum*, *S. cinerum*, *S. duplicatum*, *S. echinocapum*, dan *S. crasifolium* (Atmadja *et al.*, 1996). *S. polycystum* banyak ditemukan tumbuh di perairan dangkal dan sedang, serta melekat pada batu karang (Purwanti, 2013).

Sargassum polycystum secara morfologi memiliki ciri-ciri talus berbentuk silindris atau gepeng dan memiliki percabangan; talus bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, batang utama bulat agak kasar dan memiliki bagian berbentuk cakram yang digunakan untuk melekat pada substrat (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Rumpun rumput laut *Sargassum polycystum*

Keterangan: 1. Talus bentuk daun 2. Talus bentuk vesikel 3. Talus bentuk batang 4. Talus bentuk cabang (Sumber: Widyartini *et al.* 2012)

Sargassum polycystum dalam sistematika menurut Guiry *et al.* (2017) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Chromista

Divisio : Ochrophyta

Classis : Phaeophyceae

Ordo : Fucales

Familia : Sargassaceae

Genus : *Sargassum*

Spesies : *Sargassum polycystum* C. Agardh

Berdasarkan karakter morfologi talus, rumput laut *S. polycystum* C. Agardh dibedakan menjadi *S. polycystum* var. *linearifolium* Y. Chiang, *S. polycystum* f. *crinitum* Reinbold, f. *festivum* Grunow, f. *intercedens* Grunow, f. *proliferum* Grunow. (Guiry & Guiry, 2016). Varietas dicirikan dari pembeda talus daun linear-lanset, panjang 10 cm, lebar 0,5—1,3 mm, ujung runcing atau tumpul, dan bercabang. Cryptostomata tersebar di permukaan dan tepi daun (Yang & Chiang, 1995). Forma merupakan tingkatan terendah di bawah spesies, dicirikan oleh karakter yang tidak penting, misalnya warna.

Masing-masing bagian talus dapat melakukan proses fotosintesis meskipun kemampuannya berbeda, sehingga alginat yang dihasilkan tidak sama. Menurut Atmadja *et al.* (1996), pada talus batang yang panjang dan talus daun yang banyak, proses fotosintesis dapat berjalan dengan lebih baik, sehingga pertumbuhan dan produksi cadangan makanan lebih banyak. Menurut Susanto (2004), pada talus batang yang panjang dan talus daun yang lebar, proses fotosintesis dapat berjalan lebih baik, sehingga pertumbuhan dan produksi cadangan makanan lebih tinggi. Kandungan alginat pada talus bagian pangkal lebih tinggi daripada bagian ujung. Menurut Anggadireja *et al.* (2006) sifat morfologi sangat dipengaruhi oleh toleransi fisiologi rumput laut dalam beradaptasi terhadap lingkungan tumbuh.

2.3. Habitat *S. polycystum*

S. polycystum banyak tumbuh di perairan pantai yang bersubstrat terumbu karang. Karang mati merupakan substrat tumbuh yang disukai oleh *S. polycystum* untuk menempel atau melekat (Arthur, 1972; Leao, 1999; Kadi, 2006). *S. polycystum* sering dijumpai pada daerah tubir dengan pola persebaran berbeda untuk rumpun besar dan rumpun kecil. Rumpun besar kebanyakan tumbuh di daerah pasang surut dan rumpun kecil berada di daerah yang tenang atau daerah subtidal (Atmadja, 1988; Kadi, 2006). Menurut Sulisetjono (2009), *S. polycystum* bereproduksi secara vegetatif, sporik, dan gametik.

Tumbuh optimal pada perairan cukup sinar matahari, arus kuat, salinitas 28—35 ‰, pH air 6—8, suhu 25—32 °C dan kedalaman hingga 4m. *Sargassum* berkembang secara generatif (dengan spora) dan vegetatif (dengan stek talus) yang persebarannya dipengaruhi musim (Saraswathi *et al.*, 2003). Penyebaran *Sargassum* sangat luas, meliputi daerah pantai hingga pulau-pulau karang di daerah litoral dan sublitoral pada kedalaman yang masih ditembus cahaya matahari. *Sargassum* tumbuh sepanjang tahun, bersifat perenial, atau setiap musim barat maupun timur dapat melimpah dijumpai di berbagai perairan (Kadi *et al.*, 2005). *Sargassum* tersebar di seluruh lautan beriklim sedang dan tropis, umumnya menghuni terumbu karang yang dangkal, merupakan spesies bentik yang keberadaannya sering pelagis pada terumbu karang (Boaden, 1995).

Di perairan Indonesia, *Sargassum* banyak tumbuh di perairan pantai yang bersubstrat terumbu karang. *S. polycystum* sering mendominasi perairan pantai dengan ombak besar di daerah tropis. Substrat karang yang stabil merupakan tempat menempel kuat *holdfast* sehingga talus tidak mudah terempas ombak (Kadi, 2005). Database hasil penelitian Widyartini *et al.* (2011) menunjukkan bahwa di perairan Pantai Selatan Jawa Tengah terdapat 9 spesies rumput laut *Sargassum* yang

tersebar di perairan Kebumen dan Cilacap. *Sargassum polycystum* sering mendominasi pantai-pantai di Indonesia. Menurut Saraswathi *et al.* (2003), *S. polycystum* merupakan sumber utama penghasil alginat di India.

Faktor-faktor pembatas lingkungan tumbuh di laut, di antaranya adalah suhu air, pH air, pasang-surut, ombak, dan salinitas air. Menurut Darley (1982), suhu merupakan salah satu faktor yang memengaruhi pertumbuhan rumput laut. Kenaikan suhu perairan akan menyebabkan penurunan kadar oksigen terlarut. Variasi suhu memengaruhi penyebaran rumput laut di suatu perairan. Kisaran suhu normal untuk pertumbuhan rumput laut adalah 25—35 °C. Suhu optimum yang sesuai untuk pertumbuhan rumput laut di perairan laut tropis adalah 25°C. Menurut Luning (1990), secara fisiologis, suhu rendah mengakibatkan aktivitas biokimia dalam tubuh talus terhenti, sedangkan suhu yang terlalu tinggi mengakibatkan rusaknya enzim dan hancurnya mekanisme biokimiawi dalam talus.

Salinitas yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan gangguan pada proses fisiologis. Adaptasi rumput laut terhadap fluktuasi salinitas dengan mengatur konsentrasi ion di dalam talusnya, seperti K^+ , Na^+ , Cl^- , dan konsentrasi bahan organik untuk menjaga konsentrasi cairan di luar sel dan di dalam sel agar tetap seimbang. Salinitas dapat menyebabkan variasi pola koloni dan karakteristik morfologi rumput laut (Atmadja *et al.*, 1996). Kisaran salinitas optimum untuk pertumbuhan rumput laut berkisar antara 33—40 ‰ (Bold & Wyne, 1978).

Derajat keasaman perairan merupakan salah satu faktor yang memengaruhi pertumbuhan rumput laut. Nilai pH menentukan molekul karbon untuk fotosintesis. pH yang sesuai untuk pertumbuhan rumput laut adalah 7. Jika pH perairan < 6 maka molekul karbon berada dalam bentuk karbondioksida terlarut atau asam karbonat H_2CO_3 . Jika pH perairan antara 6—10, maka molekul karbon berada dalam ion bikarbonat HCO_3^- , sedangkan karbon akan berbentuk CO_3^{2-} jika pH > 10 (Graham & Wilcox, 2000).

Kadar nitrat dan fosfat memengaruhi stadia reproduksi. Kandungan nitrat rata-rata di perairan laut sebesar 0,5 ppm dan kandungan fosfat lebih rendah dari 0,5 ppm. Kandungan nitrat perairan yang baik untuk pertumbuhan rumput laut 0,09—3,5 ppm (Effendi, 2003). Keberadaan fosfat dalam laut adalah 70 $\mu g/L$ atau 0,07 ppm, sedangkan fosfat untuk perairan dengan tingkat kesuburan tinggi, berkisar antara 0,201 - 0,1 mg/L (Putinella, 2001).

Pasang surut memengaruhi persebaran rumput laut. *Sargassum* hidup di zona intertidal dan zona sublitoral dengan melekat pada substrat keras menggunakan *holdfast* atau mengapung di permukaan air. Daerah

intertidal adalah daerah yang dipengaruhi oleh pasang-surut air laut. Pasang naik dan turun menyebabkan zonasi daerah intertidal terendam air atau kontak langsung dengan udara terbuka, selama interval waktu yang berbeda pada tiap zonanya.

Zonasi mengakibatkan rumput laut mendapat perbedaan intensitas penyinaran. Zonasi memberikan efek terhadap fotosintesis dan secara tidak langsung berpengaruh terhadap pertumbuhan (Gómez & Huovinen, 2011). Perbedaan besarnya gelombang pada tiap zonasi akan berpengaruh pada sebaran. Rumput laut yang terletak pada zonasi paling jauh dengan garis pantai akan mendapat gelombang yang lebih besar dibandingkan dengan rumput laut yang terletak pada zonasi yang paling dekat dengan garis pantai. Gelombang yang besar membuat penyerapan unsur hara menjadi tidak maksimal. Selain itu, gelombang yang besar juga dapat merusak rumput laut (Mubarak *et al.*, 1990).

Keberadaan rumput laut pada kedalaman tertentu dipengaruhi oleh intensitas cahaya matahari. Rumput laut cokelat mengandung pigmen fukosantin yang menyerap cahaya hijau (500—550 μm), serta memiliki klorofil-a dan klorofil-c yang menyerap cahaya merah (630—638 μm). Besi dan Magnesium dibutuhkan oleh organisme fotosintetik dalam memenuhi kebutuhan hidupnya. Fe dan Mg berperan dalam pembentukan klorofil. Besi berperan dalam pembentukan protoporfirinogen, sedangkan magnesium berperan sebagai unsur yang mengisi inti atom dari molekul porfirin pada klorofil. Molekul klorofil terdiri dari empat atom nitrogen yang mengikat cincin pirol yang dihubungkan dengan empat rantai metana yang disebut porfirin (Hopkins, 2004).

2.4. Signifikansi variasi talus dan kandungan alginat

Variasi morfologi talus pada rumput laut *Sargassum* dengan kisaran cukup besar, sehingga batasan spesies masih membingungkan dan menyebabkan kesulitan determinasinya. Menurut Cheang *et al.* (2008) untuk mengevaluasi problem variasi morfologi yang sangat polimorfik di alam, peneliti-peneliti mencoba menggunakan morfologi *Sargassum* pada tanaman muda dan dewasa, dan percabangan fertil dalam mendeskripsi spesies, cara ini dapat meminimalkan pengaruh variasi temporer dan musiman. Informasi morfologi dipertahankan dengan cara spesimen-spesimen dikumpulkan pada tahap pertumbuhan yang sama, yaitu sebelum kehilangan daun dan perkembangan struktur reproduksi. Spesimen dikumpulkan terpisah (1—2 m) untuk menghindari pengumpulan individu dari pohon induk yang sama, seperti *germlings* rumput laut *Sargassum* yang diketahui memiliki jarak penyebaran pendek.

Hasil pengamatan variasi talus *S. polycystum* menunjukkan bahwa talus rumput laut *S. polycystum* dari Pantai Karimunjawa lebih bervariasi daripada talus dari Pantai Menganti, terutama pada talus daun dan vesikelnya. Hasil analisis korelasi menunjukkan ada hubungan salinitas dan pH di Pantai Menganti terhadap panjang vesikel rumput laut *S. polycystum*. Sedangkan suhu air, salinitas dan pH di Pantai Karimunjawa berhubungan dengan warna vesikel; nitrat dan posfat terhadap lebar, permukaan atas dan bawah talus daun; posfat terhadap lebar dan tepi talus daun serta panjang vesikel. Suhu air, salinitas, pH, nitrat dan posfat di Pantai Menganti berpengaruh tidak signifikan terhadap variasi talus rumput laut *S. polycystum*, sedangkan suhu, salinitas dan pH di Pantai Karimunjawa berpengaruh signifikan terhadap panjang, lebar, tepi, permukaan atas dan bawah talus daun rumput laut *S. polycystum* (Widyartini *et al.*, 2017).

Hasil analisis kandungan alginat bagian talus batang, daun dan vesikel dari spesies *S. polycystum* menunjukkan tidak ada interaksi lokasi tumbuh dan bagian talus yang diekstrak terhadap kandungan alginat yang dihasilkan, tetapi secara mandiri lokasi tumbuh dan bagian talus yang diekstrak menghasilkan kandungan alginat yang tidak sama. Kandungan alginat talus *S. polycystum* asal Pantai Menganti lebih tinggi dibandingkan kandungan alginat asal Pantai Karimunjawa. Kandungan alginat paling tinggi terdapat pada talus vesikel asal Menganti Kebumen, diikuti talus batang dan terendah pada talus daun. Talus batang dan vesikel pada *S. polycystum* asal Menganti berukuran lebih tebal sehingga memungkinkan alginat tersimpan lebih banyak dibandingkan asal Karimunjawa. Hasil analisis korelasi, ada hubungan antara suhu dan salinitas terhadap kandungan alginat. Sedangkan pH dan kandungan nitrat-fosfat tidak berkorelasi dengan kandungan alginat. Selain itu tidak ada hubungan kuat antara klorofil-a, klorofil-c dan fukosantin terhadap kandungan alginat meskipun kandungan klorofil-a dan klorofil-c talus *S. polycystum* dari Pantai Karimunjawa lebih tinggi dari Pantai Menganti, sebaliknya kandungan fukosantin talus asal Pantai Menganti lebih tinggi dari talus asal Pantai Karimunjawa.

BAB 3

BIOSINTESIS ALGINAT

Alginat merupakan komponen utama dari dinding sel alga cokelat. Polisakarida linear ini terdiri atas dua monosakarida uronic, yaitu asam β -D-manuronat dan asam α -L-guluronic, diatur dalam rantai polisakarida. Polisakarida dihasilkan dari proses fotosintesis. Dalam proses fotosintesis, terjadi proses perubahan energi cahaya menjadi energi kimia sehingga menghasilkan bahan organik, yaitu karbohidrat.

3.1. Pigmen Fotosintesis

Klorofil pada *S. polycystum* merupakan pigmen yang berperan sebagai penangkap cahaya dalam reaksi terang fotosintesis. Klorofil menangkap energi matahari dan diubah menjadi bentuk energi kimia, yaitu ATP dan NADPH. ATP dibentuk dari ADP dan Pi sedangkan NADPH merupakan hasil reduksi NADP^+ yang mendapatkan atom hidrogen dari molekul H_2O . Energi kimia ini dibutuhkan dalam reaksi gelap fotosintesis yang mereduksi CO_2 sehingga dihasilkan glukosa (Ai, 2012).

Klorofil-a merupakan golongan klorofil yang dominan pada rumput laut cokelat, sedangkan fukosantin merupakan karotenoid utama (Nurchayanti & Limantara, 2007). Keberadaan pigmen klorofil-a, klorofil-c, dan neoxantin adalah ciri khas rumput laut dari genus *Sargassum*, namun neoxantin tidak ditemukan pada *S. polycystum* (Indrawati *et al.*, 2010). Hasil penelitian Fatkhuljanah *et al.* (2016) menunjukkan bahwa kandungan klorofil-a lebih besar daripada klorofil-c. Rata-rata jumlah klorofil-a pada talus bentuk vesikel sebesar 16,502 mg/L, talus bentuk daun sebesar 16,818 mg/L, dan talus bentuk batang sebesar 15,432 mg/L, sedangkan rata-rata jumlah klorofil-c pada talus bentuk vesikel sebesar 3,680 mg/L, talus bentuk daun sebesar 5,150 mg/L, dan talus bentuk batang sebesar 1,643 mg/L. Bagian talus yang paling banyak mengandung klorofil-a dan c yaitu talus bentuk daun.

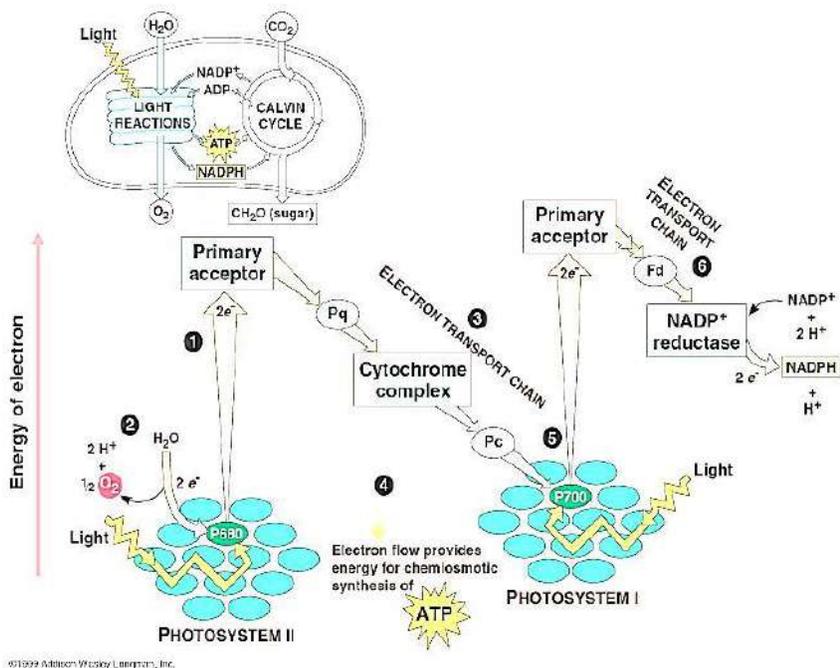
Klorofil-a dan c dibentuk dari senyawa asam glutamat (Reinbothe & Reinbothe, 1996). Klorofil-a ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$) merupakan pigmen utama dalam proses fotosintesis, sedangkan klorofil-c ($\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$ atau $\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$) merupakan pigmen pendukung (Inang, 2011). Menurut Salisbury & Ross (1995) klorofil-a berfungsi dalam pemanenan cahaya, pengubahan energi cahaya menjadi energi kimia, bertindak sebagai penyumbang elektron utama (P680, P700), dan penerima elektron utama. Alfeofitin berasal dari klorofil dengan penggantian Mg dengan H^+

di pusat. Proses fotosintesis juga melibatkan pigmen lain seperti klorofil-c. Klorofil-c hanya terdapat pada rumput laut cokelat. Pigmen ini berfungsi untuk melindungi klorofil-a dari foto-oksidasi. Klorofil-c juga berfungsi dalam pemanenan cahaya (Atmadja *et al.*, 1996; Green & Dunford, 1996; Inang, 2011).

Klorofil-c₁ dan klorofil-c₂ merupakan klorofil yang khas dari rumput laut cokelat. Selain itu, pigmen-pigmen yang terkandung pada rumput laut cokelat adalah fukosantin, fukosntol, flavosantin, diatosantin, dan zeasantin. Fukosantin berperan sebagai pigmen pelengkap pada reaksi fotosintesis. Fukosantin mampu menyerap warna biru hijau sehingga dapat digunakan untuk proses fotosintesis. Aktivitas fukosantin terlihat dengan sifat absorpsi pada panjang gelombang 400—450 nm (Mufti *et al.*, 2013). Kandungan pigmen pada rumput laut dipengaruhi oleh bagian-bagian talus yang diekstrak dan asal lokasi tumbuh. Faktor lingkungan, khususnya tingkat kedalaman atau intensitas cahaya, memengaruhi proses fotosintesis (Heriyanto *et al.*, 2010). Hegazi *et al.* (2002) menyatakan bahwa rumput laut cokelat mengandung pigmen fotosintetik yang khas dengan konsentrasi yang bervariasi, tergantung pada berbagai macam faktor lingkungan, yaitu suhu, musim, tempat tumbuh, intensitas cahaya, dan kedalaman. Pertumbuhan rumput laut pada tempat tumbuh yang lebih dalam umumnya akan meningkatkan pigmen fotosintetiknya, untuk mengimbangi ketersediaan cahaya yang rendah (Ramus *et al.*, 1976). Menurut Malta *et al.* (2003) pada pertumbuhan sel rumput laut di permukaan air yang lebih dalam, kandungan pigmen fotosintetiknya akan meningkat untuk memaksimalkan efisiensi penyerapan cahaya matahari yang berperan penting dalam proses fotosintesis.

3.2. Proses Fotosintesis

Fotosintesis adalah suatu proses perubahan energi cahaya menjadi energi kimia. Hasil fotosintesis pada rumput laut cokelat berupa alginat, sebagian digunakan untuk pertumbuhan dan sebagian lagi disimpan dalam bentuk cadangan makanan. Menurut Megayana *et al.* (2011), cadangan makanan yang berasal dari proses fotosintesis disimpan dalam dinding sel rumput laut cokelat, berupa alginat. Rumput laut sendiri termasuk dalam tanaman C3, sehingga proses fotosintesisnya (Gambar 3.1) terbagi menjadi 2 tahap, yaitu reaksi terang dan reaksi gelap (siklus Calvin).



Gambar 3.1. Proses Fotosintesis pada tanaman C3
(Sumber: Campbell, 2017)

Reaksi terang mengubah energi matahari menjadi energi kimia, dan dalam proses fotosintesisnya, penyerapan energi matahari oleh klorofil terdiri dari dua bagian. Bagian pertama disebut fotosistem I, terjadi penyerapan energi matahari pada panjang gelombang di sekitar 700 nm dan tidak melibatkan proses pelepasan O_2 . Bagian kedua terjadi penyerapan energi matahari pada panjang gelombang 680 nm, disebut fotosistem II, yang melibatkan pembentukan O_2 . Klorofil-a adalah pigmen yang secara langsung berpartisipasi dalam reaksi terang. Pigmen lain menambahkan energi pada klorofil-a. Fotosistem I terjadi pada tilakoid dan bagian dalam grana menggunakan 2 elektron H^+ yang berasal dari pemecahan air yang terjadi pada fotosistem II. Fotosistem II terjadi di bagian luar grana dimana terjadi fotolisis (pemecahan air) yang menghasilkan 2 H^+ dan melepaskan O_2 . Adanya kerjasama antara FS II dan FS I, maka terjadi fotofosforilasi.

Proses fotofosforilasi terdapat dua macam aliran transfer elektron, yaitu:

1. Fosforilasi Non Siklik

Menggunakan fotosistem II dan I. Elektron yang dihasilkan dari fotolisis H_2O ditangkap oleh aseptor primer yang diserahkan pada plastoquinon (PQ) yang menyerupai ubikuinon pada rantai respirasi

mitokondria dan merupakan pembawa elektron pertama. Elektron yang berasal dari plastokuinon selanjutnya diberikan kepada jenis sitokrom lalu ditransfer menuju plastosianin atau PC. Pengangkutan elektron dari plastokuinon menuju sitokrom dirangkaikan dengan pembentukan ATP dari ADP + Pi. Elektron berenergi tinggi yang mengalir menurun dari fotosistem II ke fotosistem I, selanjutnya memperoleh energinya kembali dari kuantum cahaya yang diabsorpsi yang menyebabkan tereksitasinya kembali elektron. Elektron yang telah tereksitasi di fotosistem I ditangkap oleh aseptor primer menuju ferredoksin (Fd) dan mereduksi NADP⁺ menjadi NADPH.

2. Fosforilasi Siklik

Fosforilasi siklik hanya terjadi di fotosistem I. Elektron yang terdapat pada fotosistem I ditangkap oleh acceptor primer menuju Fd, karena energinya tidak mencukupi maka masuk ke cytotkrom dan menghasilkan ATP, kemudian kembali lagi ke fotosistem I.

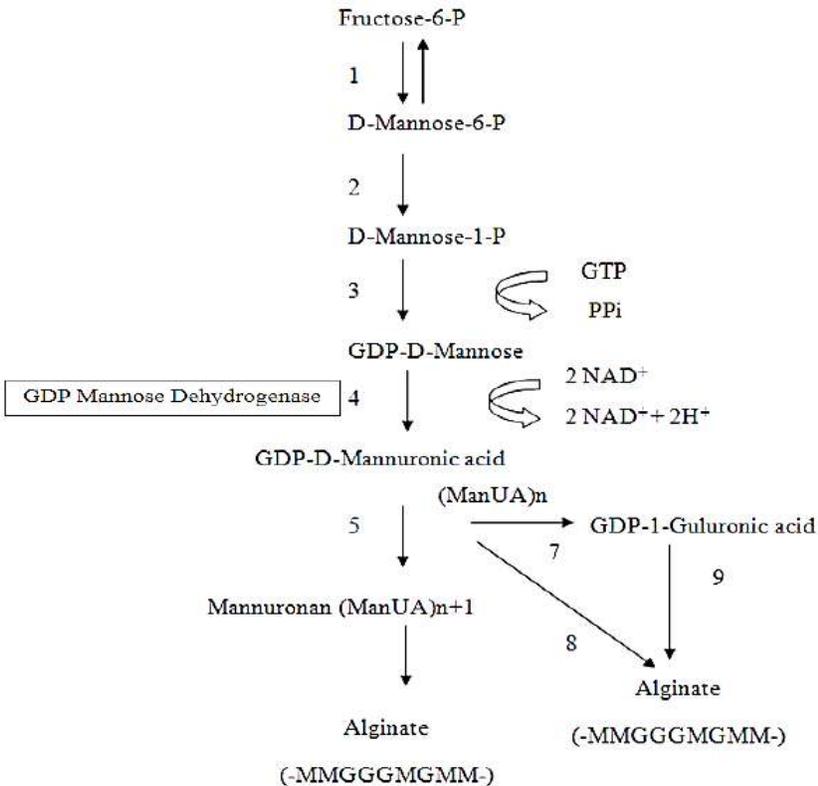
Siklus Calvin biasa disebut reaksi gelap. Reaksi gelap merupakan reaksi lanjutan dari reaksi terang dalam fotosintesis, yang merupakan reaksi pembentukan gula dari bahan dasar CO₂ dari udara bebas dan energi yang berasal dari reaksi terang. Senyawa yang terakumulasi adalah senyawa dengan 5 atom C yakni Ribulosa-1,5-bisfosfat (RuBP). Reaksi antara CO₂ dengan RUBP dipacu oleh enzim ribulosa bisfosfat karboksilase (RUBISCO) yang terjadi di stroma. Rubisco adalah enzim yang berperan penting dalam reaksi gelap. Enzim ini akan menggabungkan molekul ribulosa-1,5-bisfosfat (RuBP, kadang-kadang disebut RuDP) yang memiliki lima atom C dengan CO₂ menjadi enam atom C, untuk diproses menjadi glukosa, sebagai molekul penyimpan energi aktif (Lehninger, 1982). Bahan organik (karbohidrat) pada rumput laut cokelat disimpan sebagai alginat (Rasyid, 2005).

3.3. Biosintesis Alginat

Jalur pembentukan alginat dimulai dari pemecahan glukosa menjadi glukosa 6-fosfat dengan bantuan enzim fosfogluco isomerase. Glukosa 6-fosfat diubah lagi menjadi fruktosa 6-fosfat yang selanjutnya diubah menjadi asam manuronat. Asam manuronat diubah menjadi asam guluronat oleh enzim C-5 epimerase. Asam manuronat maupun asam guluronat mengalami polimerisasi menjadi alginat (Sabra *et al.*, 1999). Asam manuronat dan guluronat tersusun dalam kelompok yang berselang-seling, kelompok yang hanya mengandung asam manuronat atau asam guluronat (Subaryono, 2010). Sifat-sifat alginat sebagian besar bergantung pada tingkat polimerisasi dan perbandingan komposisi *guluronan* dan *mannuronan* dalam molekul (Rasyid, 2005). Menurut Rasyid (2003), biosintesis alginat langkah-langkahnya ditunjukkan pada

Gambar 3.2. Biosintesis alginat ditunjukkan pada langkah proses 1 sampai 3, tidak hanya eksklusif terjadi pada metabolisme alginat, tetapi juga umum terjadi pada semua proses yang membutuhkan aktivasi mannose, misalnya pada protein glikosilasi. Reaksi spesifik pada biosintesa alginat dimulai dari langkah proses 4 sampai 6, diawali dengan konversi GDP mannose menjadi GDP manuronat sampai pada epimerase C5 rantai polimanuronan menjadi asam alginat (Zhang *et al.*, 2016).

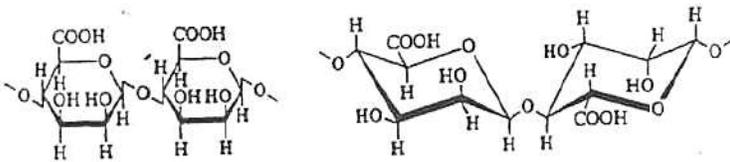
Enzim-enzim yang berperan dalam proses biosintesis alginat terdiri dari hexokinase, phosphomannose isomerase, dan D-mannose-1-phosphate guanylyl transferase yang mengkatalis pembentukan gula nukleotida GDP-D-mannose. *Guanosine diphosphate mannose dehydrogenase* (GDP mannose dehydrogenase) memiliki aktivitas dalam mengoksidasi asam GDP-D-mannuronic yang pada akhirnya mengikat asam manuronat dalam pembentukan suatu alginat (Stephen, 1995; Rasyid, 2005).



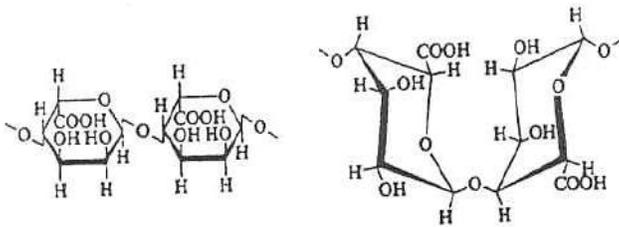
Gambar 3.2. Biosintesis Alginat

Keterangan: GDP mannose dehydrogenase memiliki aktivitas dalam mengoksidasi asam GDP-D-mannuronic yang pada akhirnya mengikat asam manuronat dalam pembentukan suatu alginat. (Sumber: Rasyid, 2003).

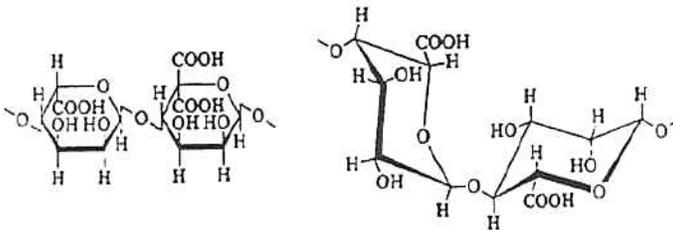
Alginat umumnya membentuk stuktur kopolimer dengan kelompok yang hanya mengandung asam guluronat dan kelompok lain mengandung asam manuronat. Rantai ujung biasanya tersusun oleh manuronat atau guluronat murni dengan beberapa kelompok yang bercampur (Ramsden, 2004). Struktur alginat tersusun atas asam manuronat dan guluronat dalam kelompok yang berselang-seling dan kelompok yang hanya mengandung asam manuronat atau asam guluronat saja (Subaryono, 2010; Basmal *et al.*, 2001^a; Basmal *et al.*, 2001^b). Susunan asam guluronat dan manuronat dengan 3 macam struktur (Gambar 3.3), yaitu homo polisakarida α -1,4-L-guluronat, β -1,4-D-manuronat, dan hetero polisakarida yang merupakan bentuk selang-seling asam α -1,4-L-guluronat dan asam β -1,4-D-manuronat (Donati *et al.*, 2009; Rasyid, 2005).



Bentuk konfigurasi asam D-mannuronat-asam D-mannuronat



Bentuk konfigurasi asam L-guluronat-asam D-guluronat



Bentuk konfigurasi asam D-guluronat-asam L-mannuronat

Gambar 3.3. Struktur Alginat (Sumber: Rasyid, 2005)

Saat ini telah dapat dilakukan isolasi dan identifikasi asam GDP-D-mannuronic dan keberadaan unsur lainnya dari nukleotida gula yang diyakini membentuk asam GDP-L-guluronat. Sifat-sifat alginat bergantung pada tingkat polimerisasi dan perbandingan komposisi *guluronan* dan *mannuronan* dalam molekul.

Alginat merupakan polisakarida tidak bercabang yang diinisiasi sebagai rantai asam β -1,4-D-manuronat (M-alginat). Selanjutnya, polimer tersebut dimodifikasi oleh C-5 epimerase yang mengkonversi residu tunggal atau blok besar dari polimer asam D-mannuronic menjadi asam L-guluronat (G-alginat), blok M, dan blok G dalam alginat bervariasi selama perkembangan alga. Blok G yang kaya akan alginat membentuk kekuatan gel yang tinggi pada kation divalen misalnya Ca^{2+} , sedangkan blok M lebih fleksibel (Tenhaken *et al.*, 2011). Prakursor untuk polimer adalah asam GDP-manuronat, yang diyakini berasal dari oksidasi empat elektron dari GDP-mannosa melalui enzim GDP-Mannosa dehidrogenase (GMD). Gen kandidat pada genom *Ectocarpus siliculosus* dan dinyatakan sebagai protein rekombinan dalam *Escherichia coli*. GMD dari *Ectocarpus* sangat berbeda dari enzim pada bakteri dan jauh berbeda untuk protein bakteri seperti kelompok UDP-glukosa dehidrogenase, karena tidak memiliki C-terminal yang diyakini terlibat dalam katalisis. Enzim GDP mannanosa dehidrogenase mengkatalisis reaksi $\text{GDP-Man} + 2\text{NAD}^+$ menjadi GDP-ManA (asam GDP-D-Mannuronic) + 2NADH . GDP mannanosa dehidrogenase selalu ada pada semua organisme. Enzim ini merupakan bagian dari *super family* UDP-glukosa (Tenhaken *et al.*, 2011). GMD dari ganggang cokelat sangat aktif pada pH basa dan mengandung residu Cys katalitik, sensitif terhadap logam berat (Stephen *et al.*, 2004; Tentahen *et al.*, 2011).

Dinding sel rumput laut cokelat berbeda dari tanaman darat. Polisakarida pada dinding sel utama adalah alginat, yang mengandung hingga 45 % dari berat kering. Fungsi alginat di dinding sel mirip dengan fungsi selulosa dalam dinding sel tanaman darat. Alginat merupakan polisakarida bercabang, awalnya disintesis sebagai rantai asam 1,4-D-manuronat (M-alginat). Polimer ini kemudian dimodifikasi oleh C-5 epimerase, yang mengkonversi residu tunggal atau blok yang lebih besar dari polimer dari asam D-manuronat menjadi asam L-guluronat (G-alginat). Blok-M dan Blok-G dalam alginat bervariasi selama perkembangan rumput laut. G-blok yang kaya alginat akan membentuk gel yang kuat dengan adanya kation alginat (alginat Ca^{2+}). M-blok lebih fleksibel dan terutama ditemukan pada talus daun yang terkena gerakan gelombang. Gen untuk C-5 epimerase mengkonversi M ke G alginat. telah diidentifikasi dalam alga cokelat *Laminaria digitate* yang memiliki enam gen berbeda untuk epimerase tersebut, semua menunjukkan homologi untuk penanda epimerase alginat (AlgG) dari *Pseudomonas*

aeruginosa. Terlepas dari epimerase ini, tidak ada enzim lain dari jalur alginat telah ditandai pada tingkat molekuler. Alginat bakteri memiliki sifat yang mirip dengan alginat alga cokelat, tetapi sering ada tambahan modifikasi oleh kelompok O-asetil pada C₂ atau C₃ (Tenhaken *et al.*, 2011).

3.4. Ekstraksi Alginat

Sifat-sifat alginat tergantung pada tingkat polimerisasi dan perbandingan komposisi guluronat dan mannuronat dalam membentuk molekul asam alginat. Asam alginat tidak larut dalam air, tetapi mengendap pada pH < 3,5. Alginat juga tidak dapat larut dalam pelarut organik, tetapi dapat mengendap dengan pelarut alkohol. Tetapan disosiasi (pK) dari asam mannuronat adalah 3,38 dan asam guluronat adalah 3,65. Asam alginat dengan proporsi guluronan yang tinggi mempunyai pK sebesar 3,74 tetapi jika proporsi mannuronatnya tinggi pK-nya sebesar 3,42. Alginat sangat stabil pada pH antara 5–10. Pada pH yang lebih tinggi viskositas menjadi sangat kecil dikarenakan adanya degradasi β-eliminatif. Ikatan glikosidik antara asam mannuronat dan guluronat kurang stabil terhadap hidrolisis asam dibanding ikatan dua asam mannuronat atau dua asam guluronat (Peteiro, 2017; Hernández-Carmona *et al.*, 2013).

Senyawa alginat dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Tahap ekstraksi meliputi perendaman, penghancuran, pengasaman, pemucatan, pengendapan, pemurnian dan pengeringan. Ekstraksi akan lebih mudah jika talus rumput laut direndam dan dipanaskan. Proses perendaman dilakukan untuk melunakkan talus, dapat dilakukan dengan dua tahap. Perendaman pertama dilakukan menggunakan NaOH 0,5% selama 30 menit. Perendaman kedua dilakukan dengan larutan HCl 0,5% selama 30 menit. Kedua perendaman bertujuan untuk melunakkan dinding sel *Sargassum* sehingga mempermudah dalam proses ekstraksi (Basmal *et al.*, 2002; Laksanawati *et al.*, 2017).

Pada dasarnya semua metode yang digunakan untuk memproduksi alginat berdasarkan pada metode yang dikembangkan oleh Stanford. Metode yang digunakan di Amerika Serikat, untuk memproduksi alginat saat ini merupakan paten dari *Green (Green Cold Process)* yang digunakan oleh Kelco Company di San Diego California. Metode Le Gloahec dan Heter digunakan oleh Marine Colloids Inc. di Rockland, Maine. Sedangkan metode yang digunakan di Inggris, Norwegia, Prancis, dan Jepang semuanya merupakan pengembangan dari metode Stanford (Rasyid 2005).

Proses ekstraksi rumput laut cokelat dilakukan dalam suasana basa, dengan tujuan untuk memisahkan selulosa dari alginat. Bahan pengekstrak yang digunakan adalah Na₂CO₃ dan NaOH. Na₂CO₃

berfungsi untuk mengekstrak alginat yang terkandung di dalam talus. Kecepatan ekstraksi alginat yang ada dalam talus sangat tergantung pada konsentrasi Na_2CO_3 yang diberikan dan suhu serta lama waktu ekstraksi yang digunakan (Basmal *et al.*, 2002). NaOH merupakan senyawa alkali dalam proses ekstraksi dan untuk membentuk natrium alginat dari asam alginat. Selain itu NaOH berfungsi untuk menghilangkan garam-garam dan zat-zat organik yang menempel pada talus. Pada proses ekstraksi alginat juga ditambahkan HCl, berfungsi dalam demineralisasi dan sebagai pembentuk endapan asam alginat. Asam alginik $(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_{10})_n$, yaitu zat yang terkandung dalam dinding sel rumput laut cokelat yang membentuk rantai polisakarida, terdiri atas blok-blok asam manuronik dan asam guluronik yang dihubungkan ikatan glikosidik (Susanto *et al.*, 2001).

Alginat yang biasa digunakan untuk kebutuhan industri (industri makanan, farmasi, kosmetik, tekstil, cat dan beberapa industri lain) meliputi natrium alginat, kalium alginat, amonium alginat, campuran kalsium-amonium alginat, campuran kalsium-natrium alginat yang merupakan garam-garam dari asam alginat dan propilen glikol alginat. Perbedaan sumber bahan baku akan mempengaruhi kadar alginat. Semua spesies rumput laut cokelat mengandung alginat, tetapi hanya beberapa spesies saja yang melimpah. Di perairan pantai Indonesia beberapa spesies rumput laut cokelat tumbuh melimpah dan memiliki potensi sebagai bahan baku pengolahan alginat, yaitu *Sargassum Turbinaria*, *Hormophysa* dan *Padina* (Kadi, 2005; Kadi, 2017).

Menurut Pongarrang *et al.* (2013), alginat terkandung pada dinding sel talus. Bentuk talus dapat mempengaruhi besar kecilnya kandungan alginat. Persentase kandungan alginat pada tunas-tunas muda lebih kecil dibandingkan dengan talus yang sudah tua. Talus batang memiliki dinding sel yang lebih tebal dibandingkan dengan talus daun dan vesikel, sehingga senyawa alginat yang terbentuk akan lebih tinggi. Alginat yang terdapat di dalam dinding sel rumput laut *Sargassum* mencapai 40% dari total berat kering. Alginat juga memegang peranan penting dalam mempertahankan struktur jaringan talus.

BAB 4.

PROFIL EKSPRESI mRNA GDP-MANNOSE DEHIDROGENASE PADA *Sargassum polycystum*

Peran enzim kunci dalam pembentukan alginat telah diteliti pada genom *Ectocarpus siliculosus*. Penggunaan *real time* PCR (RT-qPCR) untuk uji kuantitatif *Z. galactanivorans* menunjukkan bahwa kelompok gen UDP dan GDP merupakan operon yang mengatur alginat sebagai sumber karbon tunggal non glukosa. Pengamatan ini sangat mendukung bahwa gen berpartisipasi dalam sintesis alginat (Michel *et al.*, 2012). Analisis genom rumput laut cokelat *Ectocarpus siliculosus* menunjukkan bahwa untuk memproduksi alginat melalui transfer gen lateral dari *Actinobacteria*. Untuk mengidentifikasi kandidat gen GDP-Mannosa dehidrogenase, dengan urutan genom *Ectocarpus siliculosus* dan perpustakaan Gen Bank EST, digunakan gen UDP-glukosa dehidrogenase dari kacang kedelai sebagai pembanding didapatkan satu kandidat gen dari GDP-Mannosa dehidrogenase diamplifikasi oleh PCR dari cDNA *E. siliculosus* (Stephen, 1995).

Penggunaan gen pada *real time* PCR (RT-qPCR) untuk uji kuantitatif *Z. galactanivorans* menunjukkan bahwa kedua kelompok gen merupakan operon asli dan mengatur alginat sebagai sumber karbon tunggal non glukosa. Pengamatan ini sangat mendukung bahwa gen berpartisipasi untuk deteksi dan sintesis alginat (Michel *et al.*, 2012).

4.1. Polymerase Chain Reacton (PCR)

Polymerase Chain Reacton (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo & Rudiretna, 2000). PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu untuk primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target

RNA reverse ditranskripsi menggunakan enzim RevertAid (Fermentasi, Thermo Scientific), primer yang digunakan primer (*forward*, ATGGATCCATGCCAGGAAAGGAGAACG; dan juga menggunakan *reverse*, TGAAGCTTCCAGCGAGCTCAACGTGT) yang digunakan untuk mengamplifikasi gen GMD dengan *Phusion proofreading*

polimerase. Produk Asam GDP-manuronat dianalisis dengan HPLC dan massa spektroskopi. Km untuk GDP-Mannosa adalah 95 μM , dan 86 μM untuk NAD^+ . Tidak ada substrat selain GDP-Mannosa yang dioksidasi oleh enzim. Dalam percobaan filtrasi gel enzim berperilaku sebagai dimer. GMD *Ectocarpus* dirangsang oleh garam pada konsentrasi molar yang rendah sebagai kemungkinan adaptasi untuk kehidupan laut. Hal ini cepat tidak aktif pada suhu di atas 30 °C (Tenhaken *et al.*, 2011).

Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20–40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier (Newton & Graham, 1994). Jumlah fragmen DNA yang diinginkan (amplikon) dapat meningkat secara eksponensial dalam waktu singkat pada proses PCR (Handoyo & Rudiretna, 2000).

Pada proses PCR terdapat tiga fase utama yaitu eksponensial, linier, dan plateau (datar). Pada fase eksponensial, terjadi penggandaan dari jumlah sesungguhnya DNA atau RNA yang digunakan sebagai cetakan, sehingga perhitungan kuantitas DNA pada fase ini memiliki akurasi 100 %. Pada fase linier sudah terjadi penggunaan bahan reaksi, reaksi penggandaan terjadi pelan, dan produk mulai terdegradasi. Pada fase plateau, tidak terjadi lagi proses penggandaan DNA. Pada fase ini juga terjadi degradasi DNA produk, oleh sebab itu hasil akhir PCR memiliki akurasi yang rendah untuk kepentingan deteksi ekspresi gen (Anonim, 2007).

Kemampuan sel untuk tumbuh, beradaptasi, dan melakukan aktivitas merupakan refleksi dari ekspresi gen. Kemampuan pada tingkat transkripsi secara kuantitatif pada gen spesifik selalu menjadi fokus penelitian terhadap fungsi gen (Zamorano *et al.*, 1996). Ekspresi suatu gen secara molekuler dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA) maupun translasi (protein). Deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA lebih sulit dibandingkan pada tahap protein karena memerlukan tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang mengekspresikan gen tersebut (Pardal, 2010). Terdapat empat metode yang biasa digunakan untuk mengetahui tingkat transkripsi, yaitu *northern blotting*, *in situ hybridization* (Parker & Barnes, 1999), *RNase protection assay* (Hod, 1992; Saccomanno *et al.*, 1992), dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Weis *et al.*, 1992). Melalui analisis *Northern* dapat diketahui ukuran mRNA dan integritas RNA sampel (Bustin, 2000). Untuk mengetahui kuantitas ekspresi dari suatu gen, biasanya digunakan *northern blotting* atau PCR biasa yang menggunakan produk akhir sebagai dasar perhitungan.

4.2. Kuantitas Ekspresi Suatu Gen

Deteksi ekspresi suatu gen secara molekuler dapat dilakukan pada tahap transkripsi (mRNA). Pada metode qPCR, peneliti tidak hanya dapat mendeteksi keberadaan suatu gen tertentu tetapi juga mengetahui kuantitas gen target pada sampel hingga membandingkan ekspresi gen pada sampel. Tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang mengekspresikan gen tersebut diperlukan untuk deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA, sehingga dibutuhkan alat yang sensitif (Michel *et al.*, 2012). Sintesis alginat dalam ganggang cokelat, dapat memberikan petunjuk untuk mempelajari perbedaan fungsional antara gen GMD. GMD *Ectocarpus* dirangsang oleh garam pada konsentrasi molar yang rendah sehingga dapat beradaptasi untuk kehidupan laut. Enzim ini cepat tidak aktif pada suhu di atas 30 °C.

Analisis genom rumput laut cokelat *Ectocarpus siliculosus* menunjukkan bahwa untuk memproduksi alginat melalui transfer gen lateral dari *Actinobacteria*. Untuk mengidentifikasi kandidat gen GDP-mannosa dehidrogenase dapat digunakan urutan genom *Ectocarpus siliculosus* dan berdasarkan perpustakaan Gen Bank. Gen dari GDP-Mannosa dehidrogenase diamplifikasi oleh PCR (Cho *et al.*, 2012).

Ekspresi suatu gen secara molekuler dapat terdeteksi selama tahap transkripsi pada mRNA, maupun translasi pada protein. Ekspresi gen pada tingkat mRNA lebih sulit dideteksi dibandingkan ekspresi gen pada tahap protein. Deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA memerlukan tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang mengekspresikan gen. Menurut Pardal (2010), *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) merupakan teknik *Real Time PCR* yang lebih sensitif untuk mendeteksi kualitas dan mengukur kuantitas mRNA.

Metode untuk mengetahui tingkat transkripsi yang umum digunakan ada empat yaitu *northern blotting*, *in situ hybridization*, *RNase protection assay*, dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Parker & Barnes, 1999; Weis *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 2012). Analisis melalui *northern blotting* dapat diketahui ukuran mRNA dan integritas RNA sampel (Bustin, 2000; Torrano-Silva *et al.*, 2018). Untuk mengetahui kuantitas ekspresi dari suatu gen, biasanya digunakan *northern blotting* atau PCR biasa yang menggunakan produk akhir sebagai dasar perhitungan.

Penggunaan *northern blotting* untuk mengetahui ekspresi gen memerlukan jumlah RNA yang cukup banyak (Hunt, 2006). Selain itu, pengukuran kuantitas ekspresi suatu gen dengan menggunakan hasil akhir dari proses PCR mempunyai kelemahan yaitu presisi yang kurang, tidak sensitif, resolusi rendah, tidak otomatis, diskriminasi hanya dari ukuran saja, dan hasil tidak diekspresikan secara kuantitatif (Anonim, 2007).

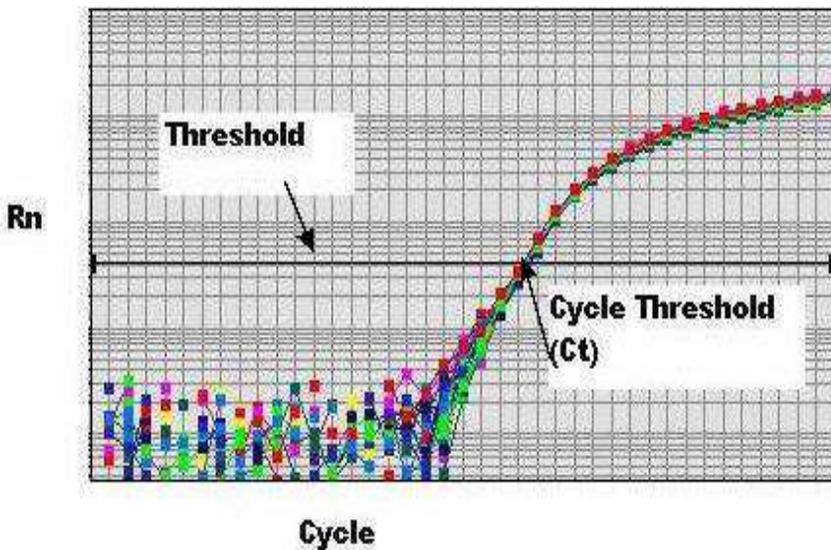
RNase protection assay memungkinkan untuk melakukan pemetaan daerah inisiasi pada transkripsi, daerah terminasi, batas ekson atau intron, dan membedakan mRNA yang memiliki ukuran yang sama, yang akan ditampilkan sebagai satu pita pada analisis *Northern*. *In situ hybridization* merupakan satu-satunya metode yang dapat digunakan untuk menunjukkan transkripsi lokal pada sel spesifik suatu jaringan namun merupakan metode yang sangat rumit (Bustin, 2000). Metode *Nothern blot*, *in situ hybridization*, dan *RNA protection assay* memiliki kekurangan karena sensitivitasnya rendah (Nababa *et al.*, 1984; Cho *et al.*, 2012).

4.3. RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik *Reverse Transcriptase PCR* yang paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (Pardal, 2010). RT-qPCR adalah metode kuantifikasi PCR yang memungkinkan untuk mengamati pertambahan amplicon selama proses amplifikasi (Trisnaningrum, 2009). Teknik ini digunakan untuk menggandakan DNA target dari suatu organisme untuk tujuan mengetahui kuantitas DNA target, melihat kuantitas DNA secara relatif, deteksi keberadaan DNA target, menentukan jenis SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), menentukan kurva *Tm* (*Melting Temperature Curve*), melakukan skrining *High Resolution Melting* (HRM), dan ekspresi gen (kuantifikasi mRNA) (Novel *et al.*, 2013). RT-qPCR lebih unggul karena dapat digunakan untuk mengukur kadar mRNA dalam sampel yang berukuran kecil sehingga hanya memerlukan sedikit sampel tanaman dan hasil dapat diperoleh dengan cepat (Pardal, 2010).

Prinsip kerja RT-qPCR sama seperti *Real Time PCR* yaitu mendeteksi dan mengkuantifikasi sinyal reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR dalam reaksi. Dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus, reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau. Peningkatan produk PCR yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Dorak, 2006; Pardal, 2010). Ada dua macam *fluorescence reporter* yang biasanya digunakan dalam *Real Time PCR*, yaitu *TaqMan probe* dan *SYBR Green*. *SYBR Green* merupakan senyawa kimia yang akan mendeteksi semua utas ganda DNA, biasa digunakan untuk perhitungan kuantitas DNA (Anonim, 2007), merupakan senyawa kimia yang akan mendeteksi semua utas ganda DNA (Bustin *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2012).

Fluorescence reporter akan meningkat sampai pada jumlah yang bisa terdeteksi oleh *Real Time PCR* dan digambarkan dalam bentuk kurva amplifikasi (Gambar 4.1). Kurva amplifikasi mengandung beberapa informasi penting: (1) *threshold* yaitu daerah deteksi yang terjadi pada saat jumlah *fluorescence reporter* bisa dideteksi oleh mesin *Real Time PCR*, agar hasil perhitungan lebih akurat *threshold* berada pada fase eksponensial; (2) *Cycle Threshold (Ct)* yaitu siklus pada proses PCR saat jumlah *fluorescence reporter* berpotongan dengan garis *threshold* yang ditetapkan untuk perhitungan pada *Real Time PCR*; (3) *Rn* yaitu jumlah *fluorescence reporter* yang terdeteksi; dan (4) *Cycle* yaitu jumlah siklus yang digunakan dalam proses PCR (Anonim, 2007). Proses penggandaan DNA target secara *real-time* dapat diamati dari satu siklus PCR ke siklus selanjutnya tanpa perlu melakukan elektroforesis (*agarose*) untuk melihat hasilnya (Bustin *et al.*, 2005; Karuniawati *et al.*, 2012).



Gambar 4.1. Kurva Amplifikasi pada *Real Time PCR*.

Keterangan: *Threshold* adalah daerah deteksi yang digunakan dalam analisis. *Cycle threshold (Ct)* adalah siklus pada saat *fluorescence reporter* berpotongan dengan *threshold*. *Rn* adalah jumlah *fluorescence reporter* yang terdeteksi selama proses PCR.

Cycle adalah banyaknya siklus yang digunakan dalam proses PCR

(Sumber: Anonim, 2007)

Analisis menggunakan *Real Time PCR* memungkinkan untuk dilakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung, keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe (penanda). Pada *Real Time PCR*

pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan tahap elektroforesis, sehingga tidak dibutuhkan gel agarose dan penggunaan *Ethidium Bromide* (EtBr) yang merupakan senyawa karsinogenik (Fatimi, 2010). Kuantifikasi relatif lebih sering digunakan untuk menganalisis perbedaan *fold* pada ekspresi gen tertentu antara kelompok perlakuan yang berbeda. Pada tahapan ini dapat mengetahui adanya perbedaan ekspresi gen yang berperan dalam kelompok. qPCR membutuhkan kontrol endogen atau sering disebut sebagai *reference* atau *housekeeping gene*. Analisis data pada kuantifikasi relatif akan bergantung dari *CT value* yang dihasilkan oleh *reference gene* dan gen target.

4.4. Perhitungan dengan *Real Time PCR*

Terdapat dua macam perhitungan yang bisa dilakukan dengan *Real Time PCR*, yaitu *absolute* dan *Relative quantitation* (Anonim, 2004). Perhitungan *Absolute quantitation* digunakan untuk mengetahui jumlah molekul DNA yang tidak diketahui dengan menggunakan kurva standar yang sudah diketahui jumlah molekul DNA-nya. *Relative quantitation* digunakan untuk mengetahui jumlah molekul DNA yang tidak diketahui dengan membandingkannya dengan sampel DNA yang lain yang digunakan sebagai pembanding (Anonim, 2004).

Relative quantitation banyak digunakan untuk mengetahui tingkat ekspresi suatu gen pada suatu perlakuan dibandingkan dengan ekspresi gen yang sama pada perlakuan yang lain. Untuk mengetahui ekspresi suatu gen maka dibutuhkan HKG (*House Keeping Gene*) sebagai pembanding internal (*endogenous control*) jumlah DNA agar tidak terjadi kesalahan interpretasi akibat jumlah sel yang berbeda. HKG adalah gen yang tidak dipengaruhi oleh lingkungan. HKG yang paling banyak digunakan adalah β -aktin dan Glyceraldehide-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH) (Bustin, 2000). Ada dua metode yang digunakan untuk mengetahui tingkat ekspresi gen dengan menggunakan *relative quantitation*, yaitu metode kurva standar relatif (*relative standard curve method*) dan metode *comparative Ct* (*comparative Ct method* atau ΔCt) (Applied Biosystem, 2004).

Metode ΔCt banyak digunakan untuk menghitung ekspresi gen dari sampel yang banyak. Karena tidak perlu menggunakan kurva standar, metode ini lebih menghemat bahan reaksi PCR dan tidak membutuhkan akurasi dalam pipetasi. Dalam metode ΔCt , dibutuhkan validitas efisiensi reaksi PCR yang biasa dilakukan dengan merancang primer yang menghasilkan amplicon berukuran lebih kecil daripada 150 bp. Pada ukuran amplicon tersebut efisiensi PCR yang terjadi adalah 100 %. Menurut Livak & Schmittgen (2001), metode ΔCt menggunakan rumus aritmatika $2^{-\Delta Ct}$ untuk mengetahui ekspresi gen target yang telah dinormalisasi HKG (*House Keeping Gene*) dan relatif terhadap kalibrator

(Relative Quantification/RQ). Rumus aritmatika tersebut diperoleh dari rumus eksponensial amplifikasi proses PCR yaitu:

$$X_n = X_0 x (1 + E_x)^{CT} = K \quad (2-1)$$

Keterangan :

- X_n : jumlah DNA pada siklus ke-n
- X₀ : jumlah DNA mula-mula
- E_x : efisiensi PCR
- Ct : adalah siklus yang diinginkan atau *Cycle threshold*
- K : konstanta

Jika gen target disimbolkan dengan X dan HKG disimbolkan dengan R, maka rumus tersebut diatas dapat digunakan untuk mencari K_X maupun K_R. Sehingga ekspresi gen X dinormalisasikan dengan HKG R, adalah:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 x (1 + E_x)^{CTX}}{R_0 x (1 + E_R)^{CTR}} = \frac{K_x}{K_R} \quad (2-2)$$

Nilai efisiensi gen X (E_X) dan gen R (E_R) sama, sehingga:

$$\frac{X_0}{R_0} x (1 + E)^{CTX - CTR} = K \quad (2-3)$$

Nilai ekspresi suatu gen yang sesungguhnya adalah jumlah DNA awal yang digunakan sebagai cetakan, sehingga rumus (4) dapat diturunkan menjadi:

$$X_N = K x (1+E)^{-\Delta CT} \quad (2-4)$$

Di mana: $X_N = \frac{X_0}{R_0}$

$$\Delta CT = CTX - CTR$$

Mengetahui ekspresi gen target X pada perlakuan relatif terhadap kalibrator, maka ekspresi gen X pada perlakuan (XNP) dibagi dengan ekspresi gen X pada kalibrator (XNK).

$$\frac{X_{NP}}{X_{NK}} = \frac{K x (1 + E)^{-\Delta CTP}}{K x (1 + E)^{-\Delta CTK}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta CT} \quad (2-5)$$

Apabila amplicon yang dihasilkan berukuran kurang dari 150 bp maka nilai efisiensi PCR adalah 100 % yang nilainya sama dengan 1, sehingga jumlah gen X pada suatu perlakuan yang telah dinormalisasi dengan HKG, dibandingkan dengan kalibrator adalah $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Apabila data *Real Time PCR* ditampilkan sebagai data poin individu maka digunakan rumus $2^{-\Delta C_t}$ untuk mendapatkan hasil ekspresi relatif, dimana nilai $\Delta C_t = (C_t \text{ gen target} - C_t \text{ gen kontrol internal})$ (Livak & Schmittgen, 2008).

BAB 5

EKSPRESI GEN PADA TINGKAT mRNA

Kemampuan sel untuk tumbuh, beradaptasi, dan melakukan aktivitas merupakan refleksi dari ekspresi gen. Kemampuan pada tingkat transkripsi secara kuantitatif pada gen spesifik selalu menjadi fokus penelitian terhadap fungsi gen (Zamorano *et al.*, 1996). Ekspresi suatu gen secara molekuler dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA) maupun translasi (protein). Deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA lebih sulit dibandingkan pada tahap protein karena memerlukan tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang mengekspresikan gen tersebut (Pardal, 2010).

5.1. Ekspresi Gen

Ekspresi gen merupakan rangkaian proses penerjemahan informasi genetik (dalam bentuk urutan basa pada DNA atau RNA) menjadi protein. Informasi yang dibawa bahan genetik tidak bermakna apa pun bagi suatu organisme apabila tidak diekspresikan menjadi fenotipe. Ekspresi genetik beserta dinamika yang memengaruhinya dipelajari dalam genetika molekular. Proses ekspresi genetik mengikuti tahapan yang sama untuk semua bentuk kehidupan, dan disebut dogma inti (*central dogma*) dalam genetika. Ada tiga proses dasar yang tercakup dalam dogma inti.

Terdapat empat metode yang biasanya digunakan untuk mengetahui tingkat transkripsi yaitu *northern blotting*, *in situ hybridization* (Parker & Barnes, 1999), *RNase protection assay* (Hod, 1992; Saccomanno *et al.*, 1992), dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Weis *et al.*, 1992). Melalui analisis *Northern* dapat diketahui ukuran mRNA dan integritas RNA sampel (Bustin, 2000). Untuk mengetahui kuantitas ekspresi dari suatu gen, biasanya digunakan *northern blotting* atau PCR biasa yang menggunakan produk akhir sebagai dasar perhitungan. Penggunaan *northern blotting* untuk mengetahui ekspresi gen memerlukan jumlah RNA yang cukup banyak (Hunt, 2006). Selain itu, pengukuran kuantitas ekspresi suatu gen dengan menggunakan hasil akhir dari proses PCR mempunyai kelemahan yaitu presisi yang kurang, tidak sensitif, resolusi rendah, tidak otomatis, diskriminasi hanya dari ukuran saja, dan hasil tidak diekspresikan secara kuantitatif (Anonim, 2007). *RNase protection assay* memungkinkan untuk melakukan pemetaan daerah inisiasi pada transkripsi, daerah terminasi, batas ekson atau intron, dan membedakan mRNA yang

memiliki ukuran yang sama, yang akan ditampilkan sebagai satu pita pada analisis *Northern*. *In situ hybridization* merupakan satu-satunya metode yang dapat digunakan untuk menunjukkan transkripsi lokal pada sel spesifik suatu jaringan namun merupakan metode yang sangat rumit (Bustin, 2000). Metode Northern blot, *in situ hybridization*, dan *RNA protection assay* memiliki kekurangan karena sensitifitasnya rendah (Nababa *et al.*, 1984).

5.2. Deteksi Ekspresi Gen pada Tingkat mRNA

Deteksi ekspresi gen pada tingkat mRNA memerlukan tahapan isolasi mRNA pada fase atau bagian yang mengekspresikan gen tersebut dan membutuhkan alat yang sensitif. RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik *Real Time PCR* yang paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (Pardal, 2010).

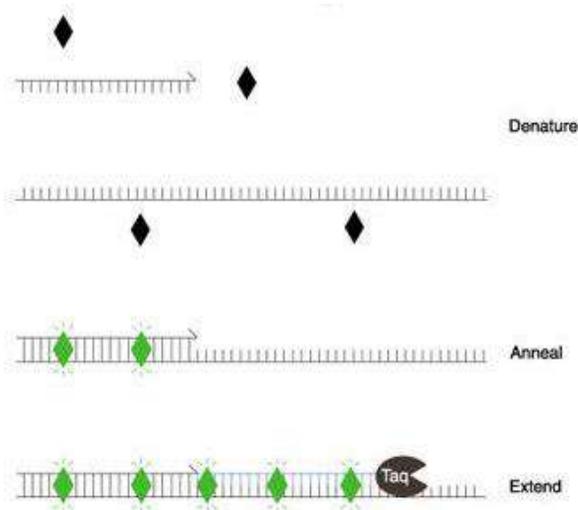
Kemampuan talus rumput laut dalam menghasilkan alginat, dipengaruhi oleh aktivitas enzim yang disandi oleh gen dan ekspresinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Kondisi lingkungan akan memengaruhi tahap-tahap reproduksi dan proses pertumbuhan. Bentuk talus yang berbeda pada *Sargassum polycystum* akan menunjukkan karakteristik yang berbeda terhadap kandungan alginat, ketahanan terhadap faktor lingkungan maupun kemampuan dalam menghasilkan senyawa metabolit sebagai obat. Penelitian pada variasi morfologi dan genetik diharapkan dapat menunjukkan adanya hubungan sifat morfologi, ekspresi gen dan faktor lingkungan tumbuh terhadap kandungan senyawa alginatnya.

Penelitian Widyartini (2016) menunjukkan ada hubungan antara faktor lingkungan (salinitas dan pH) di Pantai Menganti terhadap panjang vesikel rumput laut *S. polycystum* ($p < 0,05$) dengan koefisien korelasi (r) = 0,416. Sedangkan suhu air, salinitas dan pH di Pantai Karimunjawa berhubungan dengan warna vesikel ($r = 0,390$ dan $p = 0,033$); nitrat dan posfat terhadap lebar, permukaan atas dan bawah talus daun; posfat terhadap lebar dan tepi talus daun serta panjang vesikel ($p < 0,05$). Hasil analisis GLM menunjukkan bahwa suhu air, salinitas, pH, nitrat, dan posfat di Pantai Menganti berpengaruh nyata terhadap variasi talus rumput laut *S. polycystum* ($F_{hitung} < F_{tabel}$ dan $p > 0,05$), sedangkan suhu, salinitas, dan pH di Pantai Karimunjawa berpengaruh nyata (signifikan) terhadap panjang, lebar, tepi, permukaan atas dan bawah talus daun rumput laut *S. polycystum* ($F_{hitung} > F_{tabel}$ dan $p < 0,05$).

RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik *Reverse Transcriptase PCR* yang paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (Pardal, 2010). RT-qPCR adalah metode kuantifikasi PCR yang memungkinkan untuk

mengamati pertambahan amplicon selama proses amplifikasi (Trisnaningrum, 2009). Teknik ini digunakan untuk menggandakan DNA target dari suatu organisme untuk tujuan mengetahui kuantitas DNA target, melihat kuantitas DNA secara relatif, deteksi keberadaan DNA target, menentukan jenis SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), menentukan kurva T_m (*Melting Temperature Curve*), melakukan skrining *High Resolution Melting* (HRM), dan ekspresi gen (kuantifikasi mRNA) (Novel *et al.*, 2013).

RT-qPCR lebih unggul karena dapat digunakan untuk mengukur kadar mRNA dalam sampel yang berukuran kecil sehingga hanya memerlukan sedikit sampel tanaman dan hasil dapat diperoleh dengan cepat (Pardal, 2010). Prinsip kerja RT-qPCR sama seperti *Real Time PCR* yaitu mendeteksi dan mengkuantifikasi sinyal reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR dalam reaksi. Dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus, reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau. Peningkatan produk PCR yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Dorak, 2006; Pardal, 2010). Ada dua macam *fluorescence reporter* yang biasanya digunakan dalam *Real Time PCR*, yaitu *TaqMan probe* dan *SYBR Green*. *SYBR Green* merupakan senyawa kimia yang akan mendeteksi semua utas ganda DNA, biasa digunakan untuk perhitungan kuantitas DNA dengan tujuan yang tidak spesifik (Gambar 5.1.) (Anonim, 2007).



Gambar 5.1. Deteksi *Real Time PCR* dengan *SYBR Green*.

Keterangan: *SYBR green* akan terdeteksi apabila terikat pada utas ganda DNA saat fase perpanjangan DNA. Sumber : Dorak, 2006.

5.3. Pengukuran ekspresi genetik

Pengukuran ekspresi genetik ada beberapa langkah sebagai berikut:

a. Persiapan sampel untuk isolasi RNA

Tiga individu *S. polycystum* yang memenuhi kriteria lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan garam laut dan pasir. Setelah dicuci, sampel dipisahkan berdasarkan bentuk talus, yaitu bentuk talus batang, bentuk talus daun dan bentuk talus vesikel. Sampel ditimbang dengan berat masing-masing 100 mg dengan timbangan digital. Sampel lalu disimpan di kulkas -20 °C. Penyortiran, pembersihan dan penyimpanan sampel dilakukan di hari yang sama untuk menghindari degradasi RNA (Sim *et al.*, 2013).

b. Isolasi RNA *S. polycystum*

1. *Plant RNA lysis solution* diambil sebanyak 500 µl lalu ditambahkan dengan β-merkaptotanol sebanyak 10 µl kedalam *microtubes* 1,5 ml RNase free dan Dnase free.
2. Talus batang, talus daun dan talus vesikel dengan berat 100 mg, masing-masing dihaluskan bersama pasir *zeolith* dengan teknik maserasi. Hasil maserasi dipindahkan ke dalam *microtubes* 1,5 ml RNase free dan Dnase free yang di dalamnya sudah terdapat *Plant RNA lysis solution*.
3. Lysate (b) diinkubasi selama 5 menit pada suhu 56°C, disentrifugasi 7 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan diambil sebanyak 550 µl lalu dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru.
4. Lysate (d) ditambahkan etanol 96% dicampur dengan pipet.
5. Lysate (e) dipindahkan ke *purification tube* yang sudah dimasukkan ke dalam *collection tube*. Disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm). Cairan membrane yang terdapat di dalam *tube* dibuang. Lalu dipasangkan kembali *purification column* ke dalam *collection tube* yang baru.
6. *Wash buffer* 1 yang sebelumnya sudah ditambahkan etanol kemudian ditambahkan sebanyak 700 µl ke dalam *purification column*, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm). Cairan yang berada di dalam *tube* dibuang, kemudian *purification column* dipindahkan ke dalam *collection tube* 2 ml yang baru.
7. *Wash buffer* 2 yang sebelumnya sudah ditambahkan etanol kemudianditambahkan sebanyak 500 µl ke dalam *purification coloumn*. Disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm). Cairan dalam *tube* kemudian dibuang dan *purification column* dipindahkan ke dalam *collection tube* baru.

8. Perlakuan (7) diulang dan kembali disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Cairan dalam *tube* dibuang dan *purification column* dipindahkan ke dalam *Rnase free 1,5 ml collection tube*.
9. Air bebas membran (*water free nuclease*) ditambahkan sebanyak 50 μ l tepat di tengah-tengah membran *purification column* untuk melulusi RNA. Kemudian, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm). *Purification column* dibuang. RNA yang terdapat di dalam *Rnase free 1,5 ml collection tube* disimpan di kulkas pada suhu -80 °C untuk penyimpanan dalam jangka waktu lebih dari satu bulan.

c. Sintesis cDNA

1. *Template* RNA berupa RNA total diambil sebanyak 5 μ l dan dimasukkan ke dalam *microtubes 1,5 ml Rnase free* dan *DNase free*. Oligo (dT₁₈) primer ditambahkan sebanyak 1 μ l. Air bebas nuklease ditambahkan hingga volume mencapai 12 μ l.
2. *Lysate* (c) disentrifugasi 1 menit dengan kecepatan 1.500 rpm. Lalu, diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Dinginkan diatas *gel ice* lalu divortex selama 1 menit.
3. *5x reaction buffer* ditambahkan sebanyak 4 μ l. *Ribolock Rnase inhibitor* (20 U/ μ l) ditambahkan sebanyak 1 μ l. 10 mM *dNTP mix* ditambahkan sebanyak 2 μ l. *RevertAid M-MuLV RT* (200 U/ μ l) ditambahkan sebanyak 1 μ l hingga didapatkan volume total 20 μ l.
4. *Lysate* (h) disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Kemudian diinkubasi pada suhu 42 °C selama 60 menit. Suhu dinaikkan menjadi 70 °C untuk memaksimalkan reaksi terminasi akhir selama 5 menit.
5. cDNA disimpan di dalam kulkas dengan suhu -80 °C untuk penyimpanan dalam jangka waktu yang lebih lama.

d. Pengukuran konsentrasi cDNA dengan Nano Drop Spektrofotometri

1. Mesin nano drop spektrofotometri diatur. Larutan ddH₂O digunakan sebagai blanko.
2. cDNA dari masing-masing sampel diambil sebanyak 2 μ l dan dimasukkan ke dalam mesin nano drop. Hasil pengukuran konsentrasi cDNA akan muncul pada layar mesin kemudian dicatat.

e. Analisis ekspresi mRNA dengan metode RT-qPCR

1. Metode RT-qPCR digunakan untuk mendeteksi ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase (GMD) pada sampel *S. polycystum* asal pesisir Pantai Karimunjawa dan Menganti. Primer sisi kiri (*left*

- forward primer*) (GMD-F) 5'-ATGGATCCATGCCAGGAAAG-GAGAACG-3' dan primer sisi kanan (*reverse primer*) (GMD-R) 5'-TGAAGCTTCCAGCGAGCTCAACGTGT-3' didesain dari gen GMD *Ectocarpus siliculosus* (Tenhaken *et al.*, 2011). *House Keeping Gene* (HKG) atau gen pembaku digunakan untuk normalisasi nilai Ct (*Cycle threshold*). HKG menggunakan gen β -aktin. Primer sisi kiri (GSPAc-F) 5'-AGGCTCTGGTGGTGGACA-3' dan primer sisi kanan (SPAct-R) 5'-TCGGTAAGAAGGACGGGGTGT-3' di desain dari daerah koding atau ekson pada gen aktin (Ac) yang akan menghasilkan amplicon cDNA berukuran 304 bp (Sim *et al.*, 2012). Campuran RT-qPCR (RT-qPCR *mix*) dibuat untuk dua jenis gen, yaitu GMD sebagai gen target dan β -aktin sebagai HKG. Komposisi RT-qPCR *mix* gen target GMD dan HKG terdiri dari 5 μ l 2x *master mix SYBR Green* (*Tbr DNA polymerase*, *SYBR® Green I*, *PCR buffer*, $MgCl_2$, dNTP *mix* termasuk dUTP), 0,5 μ l 10 μ M primer sisi kiri dan primer sisi kanan, 3 μ l dH₂O (*water PCR grade*) dan 1,0 μ l cetakan cDNA 10 ng/ μ l. Total volume RT-qPCR *mix* sebanyak 10 μ l.
2. Proses amplifikasi gen target dan HKG dilakukan dalam satu waktu PCR yang sama. Amplifikasi dilakukan pada mesin *Real Time PCR Bioer* sebanyak 45 siklus dengan kondisi PCR sebagai berikut: *pre denaturation* 95 °C selama 7 menit, *denaturation* 95 °C selama 30 detik, *annealing* dan *extention* 60 °C selama 30 detik, dan *post extention* 30 °C selama 5 menit, dan storage 4 °C.
 3. Ekspresi relatif dihitung berdasarkan metode *comparative Ct* ($2^{-\Delta Ct}$), dengan ΔCt adalah [$Ct_{(GMD)} - Ct_{(\beta\text{-aktin})}$] (Livak & Schmittgen 2008).

5.4. Ekspresi mRNA GDP pada *S. polycystum*

Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian cDNA menggunakan nanodrop spektrofotometer menunjukkan konsentrasi cDNA berkisar 6,5—28 ng/ μ l. Kemurnian cDNA diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 260/280 nm dan (λ) 260/230 nm (Rahmaningtyas *et al.*, 2013). Hasil pengukuran kemurnian cDNA λ 260/280 pada penelitian ini, berkisar antara 0,396-0,972 nm, pada nilai absorbansi λ 260/230 berkisar antara 0,181-0,460 nm.

Rendahnya kemurnian cDNA dapat berasal dari rendahnya kemurnian RNA. *Complementary DNA* (cDNA) adalah DNA yang dibuat berdasarkan sekuen mRNA. Pembuatan cDNA dari templat RNA melalui pemanfaatan enzim *reverse transcriptase* yang mensintesis DNA. Menurut Udvardi *et al.* (2008), cDNA dengan kuantitas baik diperoleh dari kuantitas RNA yang baik untuk melakukan *reverse transcription* yang optimal. Menurut Jun *et al.* (2008) dan Sim *et al.* (2013) isolasi

untuk mendapatkan RNA yang berkualitas tinggi selalu menjadi masalah, karena tingginya kandungan polisakarida dan polifenol yang berada di jaringan talus dari *S. polycystum*.

Polisakarida dan polifenol dapat mengikat asam nukleat selama proses ekstraksi yang selanjutnya mempengaruhi kualitas dan kuantitas asam nukleat yang diisolasi. Penelitian Kalman *et al.* (2012), menunjukkan bahwa rumput laut cokelat *Sargassum* sp. memiliki aktivitas antioksidan polifenol yang lebih tinggi dibandingkan rumput laut merah dan rumput laut hijau. Komponen antioksidan utama yang terdapat pada *Sargassum* sp., yaitu senyawa polifenol. Menurut Matanjun *et al.* (2008), ekstrak metanol *S. polycystum* memiliki kandungan total fenol sebesar 45,16 mg ekuivalen *phloroglucinol/g* ekstrak dengan perolehan rendemen sebesar 4,05 %. Tingginya kandungan polisakarida dan polifenol pada rumput laut *S. polycystum* selama fase pertumbuhan merupakan bentuk respon dari kondisi lingkungan. Budhiyanti *et al.* (2012) menyatakan kandungan total fenol dipengaruhi oleh musim.

Hasil dari RT-qPCR berupa kurva amplifikasi, dari kurva amplifikasi tersebut dapat diperoleh nilai Ct dari masing-masing reaksi. Nilai ΔCt masing-masing perlakuan diperoleh dari normalisasi gen target dengan HKG yaitu dengan cara pengurangan nilai Ct gen GMD sebagai gen target dengan nilai Ct gen aktin sebagai HKG, sehingga rumus untuk mendapatkan ΔCt adalah $[Ct_{(GMD)} - Ct_{(\beta\text{-aktin})}]$ (Livak & Schmittgen, 2008). Nilai ΔCt tersebut digunakan untuk menghitung nilai ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada perlakuan relatif terhadap HKG β -aktin dengan menggunakan rumus aritmatika $2^{-\Delta Ct}$ menurut Livak (2008). Nilai Ct median GDP-mannosa dehidrogenase talus bentuk batang yaitu 36,035. Talus bentuk daun 36,795 dan talus bentuk vesikel 34,375

Nilai Ct 15-20 menunjukkan kategori ekspresi yang sangat tinggi, nilai Ct > 20-25 kategori ekspresi tinggi, nilai Ct > 25-30 kategori ekspresi sedang; nilai Ct > 30-35 kategori ekspresi rendah, dan nilai Ct > 35 kategori ekspresi sangat rendah (Dewi *et al.*, 2015; Shahib *et al.*, 2015; Budiman *et al.*, 2015). Nilai Ct sampel yang tinggi disebabkan oleh sedikitnya transkrip mRNA yang diperoleh dari sampel tersebut. Hasil ini menunjukkan rendahnya ekspresi gen yang diamati pada sampel tersebut. Nilai Ct menunjukkan jumlah siklus amplifikasi dengan sinyal *fluorescent* melewati batas ambang (*threshold*), ditandai dengan penggandaan jumlah salinan DNA hingga mencapai batas yang dapat dideteksi (Dewi *et al.* 2015; Rahmaningtyas *et al.* 2013). Nilai Ct tersebut mencerminkan tingkatan ekspresi gen (Dewi *et al.* 2015; Shahib *et al.* 2015; Budiman *et al.* 2015), dan besarnya bervariasi dari 15 sampai 40.

Hasil analisis *box-plot* menunjukkan nilai median ekspresi relative mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada bentuk talus *S.*

polycystum asal Menganti berbeda dengan Karimunjawa. Nilai median pada bentuk talus batang adalah 0,0096 (min. 0,0001–maks. 0,0467), pada bentuk talus daun 0,0049 (min. 0,0012– maks. 0,2256) dan pada bentuk talus vesikel 0,0270 (min. 0,0072–maks. 0,0764). Bentuk talus batang memiliki nilai median (Q2) sebesar 0,0096, kuartil terendah atau kuartil pertama (Q1) 0,0001 dan kuartil tertinggi atau kuartil ketiga (Q3) 0,0467, bentuk talus daun memiliki nilai median (Q2) sebesar 0,0049, kuartil terendah atau kuartil pertama (Q1) 0,00012 dan kuartil tertinggi (Q3) 0,2256 sedangkan bentuk talus vesikel memiliki nilai median (Q2) sebesar 0,0270, kuartil terendah atau kuartil pertama (Q1) 0,0072 dan kuartil tertinggi atau kuartil ketiga (Q3) 0,0764

Nilai median pada bentuk talus *S. polycystum* tidak simetris. Hal ini terlihat dari jarak median ke kuartil pertama (Q1) dan jarak median ke kuartil 3 (Q3) yang tidak sama panjangnya pada semua box-plot kelompok bentuk talus (bentuk talus batang, bentuk talus daun dan bentuk talus vesikel). Distribusi data pada ketiga kelompok bentuk talus tidak simetris, menurut Dahlan (2014) data dikatakan tidak simetris apabila panjang *whisker* bagian atas dan bagian bawah memiliki panjang yang tidak sama.

Hasil analisis ekspresi gen penyandi alginat rumput laut *S. polycystum* dari bentuk talus berbeda dengan metode RT-qPCR dapat untuk mengetahui profil ekspresi mRNA GDP-Mannosa Dehidrogenase pada *S. polycystum*. Ekspresi gen penyandi alginat yang paling tinggi didapatkan pada bagian talus batang dan vesikel dari pantai Menganti, dengan suhu dan pH sebagai faktor lingkungan yang paling berasosiasi kuat terhadap ekspresi gen. Ekspresi relatif mRNA GDP-Mannosa Dehidrogenase pada *S. polycystum* berkisar 0,0086—6,3206. Dengan nilai median bentuk talus batang 0,0096 (min. 0,0001—maks. 0,0467), pada bentuk talus daun 0,0049 (min. 0,0012—maks. 0,2256) dan pada bentuk talus vesikel 0,0270 (min. 0,0072— maks. 0,0764). Tidak ada perbedaan ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase yang signifikan antar bentuk talus *S. polycystum*, namun terjadi peningkatan ekspresi sebesar 1,19 kali pada talus daun dibandingkan talus batang, 1,88 kali pada talus daun dibandingkan talus vesikel, dan 1,58 kali pada talus batang dibandingkan talus vesikel.

Selanjutnya, untuk mengetahui signifikansi ekspresi mRNA GDP-mannosa dehidrogenase antar talus *S. polycystum*, hasil ekspresi relatif diuji statistik non parametrik Kruskal-Wallis dengan bantuan software SPSS 16.0 for windows. Ekspresi yang paling tinggi, digunakan sebagai numerik internal dalam RTq-PCR (Barber *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008).

Hasil uji Kruskal-Wallis ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada tiap bentuk talus *S. polycystum* didapatkan rerata

rangking bentuk talus batang, bentuk talus daun dan bentuk talus vesikel secara berurutan yaitu 8,33; 7; dan 13,17 dengan jumlah total sampel sebanyak 28,9. Nilai signifikansi $p=0,109$ melebihi batas kritis 0,05 sehingga hasil tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p>0,05$). Walaupun secara statistik tidak terdapat perbedaan ekspresi relatif yang signifikan antar bentuk talus *S. polycystum*, namun sebenarnya terjadi peningkatan ekspresi sebesar 1,88 kali pada talus vesikel ($n=6$; 13,17) dibandingkan dengan talus daun ($n=6$; 7), terjadi peningkatan ekspresi sebesar 0,8 kali pada talus daun ($n=6$; 7) yang dibandingkan dengan talus batang ($n=6$; 8,33), serta terjadi peningkatan ekspresi sebesar 1,58 kali pada talus vesikel ($n=6$; 13,17) yang dibandingkan dengan talus batang ($n=6$; 8,33)

Biosintesis alginat dipengaruhi aktivitas enzim dan bagian talus yang disandi oleh gen dan ekspresinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Hasil analisis korelasi Spearman's rho menunjukkan ada pengaruh antara faktor lingkungan dan pigmen terhadap kandungan alginat dan ekspresi gen GDP-mannosa dehidrogenase. Asosiasi faktor lingkungan dengan kandungan pigmen, ekspresi gen, dan kandungan alginat menggunakan ordinasi CCA menunjukkan bahwa ekspresi gen penyandi alginat yang paling tinggi didapatkan pada bagian talus batang dan vesikel dari Pantai Menganti, dengan suhu dan pH sebagai faktor lingkungan yang paling berasosiasi kuat terhadap ekspresi gen.

BAB 6

KESIMPULAN

Ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase pada *S. polycystum* berkisar 0,0086—6,3206. Dengan nilai median bentuk talus batang 0,0096 (min. 0,0001—maks. 0,0467), pada bentuk talus daun 0,0049 (min. 0,0012—maks. 0,2256) dan pada bentuk talus vesikel 0,0270 (min. 0,0072—maks. 0,0764). Perbedaan ekspresi relatif mRNA GDP-mannosa dehidrogenase antar bentuk talus *S. polycystum*, terjadi peningkatan ekspresi sebesar 1,19 kali pada bentuk talus daun dibandingkan bentuk batang, 1,88 kali pada bentuk talus daun dibandingkan bentuk talus vesikel, dan 1,58 kali pada bentuk talus batang dibandingkan talus vesikel. Bagian talus yang berpotensi menghasilkan alginat paling tinggi berdasarkan ekspresi gen GDP-mannosa dehidrogenase adalah talus batang, diikuti talus daun dan vesikel. Bagian talus batang dari rumput laut *S. polycystum* paling efektif sebagai bahan baku penghasil alginat dengan kandungan lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, S. 2008. *Techniques in Molecular Biology*. Lucknow: International Book Distributing Co.
- Ai, N.S. & Banyo, Y. 2011. Konsentrasi Klorofil Daun sebagai Indikator Kekurangan Air pada Tanaman. *Jurnal Ilmiah Sains*, 11(2): 166–173.
- Ai, N.S. 2012. Evolusi Fotosintesis pada Tumbuhan. *Jurnal Ilmiah Sains*, 12(1): 28–34.
- Anggadiredja, J. T., Zatinika, A., Purwoto, H. & Istiani, S. 2006. *Rumput Laut (Pembudidayaan, Pengolahan, Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial)*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Anggadiredja, J. T. 2008. *Rumput Laut*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Anggraeni, N. H. 2008. Analisa SEM (*Scanning Electron Microscopy*) dalam Pemantauan Proses Oksidasi Magnetite Menjadi Hematite. *Seminar Nasional – VII Rekayasa Aplikasi Teknik Mesin di Industri*. Bandung: Kampus ITENAS, 52–54.
- Anonim, 2004. *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene expression Using Real-Time Quantitative PCR*. Applied Biosystem.
- Anonim, 2007. *Real Time PCR VS Traditional PCR*. Applied Biosystem.
- Anullman's Encyclopedia. 1998. Industrial Organic Chemicals. Wiley, (7): 3993–4002.
- APHA. 2012. Standart Method for The Examination of Water and Wastewater. 22th edition. Washington, 3111 b.
- Aslan, M. L. 1998. *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Atmadja, W. S., Kadi, A., Silistijo & Rachmaniar. 1996. *Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia*. Puslitbang Oseanologi–LIPI, Jakarta.
- Atmadja, W. S. 1996. Kondisi Pertumbuhan *Sargassum* (Alga Cokelat) di Perairan Pulau Pari, Pulau-pulau Seribu. *Prosiding Seminar Biologi XIV dan Kongres Nasional Biologi XI*.
- Arthur, M.R.H. 1972. *Geographycal Ecology Pattern in the Distribution of Species*. pp. 269. New York: Harper & Row Publish.

- Barber, R. D., Harmer, D.W., Coleman, R.A. & Clark, B.J. 2005. GAPDH as a Housekeeping Gene: Analysis of Gapdh mRNA Expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 20 September 2011. (doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005).
- Basmal, J., Sekarasih, Y. & Bunasor, T.K. 2001^b. Pengaruh Konsentrasi Bahan Pemucat dan Jenis Bahan Pengendap Terhadap Pembentukan Sodium Alginat dari Rumput Laut Coklat *Sargassum filipendula*. C. Agarth. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 7(4): 74–81.
- Basmal, J., Wikanta, T. & Tazwir. 2001^a. Pengaruh Kombinasi Perlakuan Kalium Hidroksida dan Natrium Karbonat dalam Ekstraksi Natrium Alginat Terhadap Kualitas Produk yang Dihasilkan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 8(6): 45–52.
- Basmal, J., Wikanta, T. & Tazwir. 2002. Pengaruh Kombinasi Perlakuan Kalium Hidroksida dan Natrium Karbonat dalam Ekstraksi Natrium Alginat Terhadap Kualitas Produk Yang dihasilkan. *Penelitian Perikanan Indonesia*, 8(6): 45–52.
- Boaden, P.J.S.1995. *Sargassum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 63: 799–811.
- Bold, H.C. & Wynne, M.J. 1985. *Introduction To The Alga Structure And Reproduction*. Englewood, New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Boyer, R. 2005. *Modern Experimental Biochemistry Third Edition*. India: Pearson Education, Inc.
- Budi, S. 2012. PCR (Polymerase Chain Reaction). (*online*). <http://siska-theanalyst.blogspot.com/2012/06/polymerase-chain-reaction-pcr.html>. Diakses tanggal 13 Desember 2013.
- Budhiyanti, S.A., Raharjo, S., Marseno, D.W. & Lelana, I.Y. 2012. Antioxidant Activity of Brown Algae *Sargassum* Species Extracts from The Coastline of Jawa Island. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 7(3): 337–346.
- Budiman, F., Zoraya, A. & Nurhalim, M. 2015. The Existence of mRNAs and m-RNAs Expression for Mantaining Cell Survival Networks Associated With The Human Transparent and Cataractous Lens. *Journal Ocular Biology*, 3(1): 8–14.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute Quantification of mRNA using Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. Review. *Journal Molecular Endocrin*, 25, pp.169–193.

- Campbell, N.A., Reece, J.B., & Mitchell, L.G. 2017. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Cho, S.M., Lee, S.M., Ko, Y.D., Mattio, L., Boo, S. & Min. 2012. Molecular Systematic Reassessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in Korea using four gene regions. *Botanica Marina*, 55(5): 473–484.
- Cheang, C.C., Chu, K.H., & Ang, P.O., 2008. Morphological and Genetic Variation in The Populations Of *Sargassum hemiphyllum* (Phaeophyceae) in The Northwestern Pacific. *J. Phycol.*, 44: 855–865.
- Czerpak, R., Dobrzyn, P., Krotke, A., & Kicinska, E. 2002. The Effect of Auxin and Salicylic Acid on Chlorophyll and Carotenoid Contents in *Wolfia arrhiza* (L) Wimm. (Lemnaceae) Growing on Media of Various Trophicities. *Polish Journal of Environmental Studies*, 11(1): 231–235.
- Dahlan, M. 2014. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Darley, W.M. 1982. *Algae Biology: A Physiological Approach*. London, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. 2003. A review of The Biochemistry of Heavy Metal Biosorption by Brown Algae. *Water Research*, 37: 4311–4330.
- Dawson, H. B. 1996. Calcium and Vitamin-D Nutritional Needs of Elderly Women. *J Nutr*, 126:165S–1167S.
- Dewi, Y. A., Ahwil, C., & Nurhalim, M. 2015. The Role of Myeloid Derived Suppressor Cells and CXCR4 Genes Expression for Nasopharyngeal Carcinoma Progression. *Journal of Scientific Research and Studies*, 2(8):195–201.
- Dinda, M., Yusuf & Sugianto, D. N. 2012. Karakteristik Arus, Suhu dan Salinitas di Kepulauan Karimunjawa. *Journal of Oceanography*, 1(2):186–196.
- Donati I, & Paoletti S. 2009. *Materials Properties of Alginates*. Dalam: B.H.A Rehm (Ed). *Alginates: Biology and Applications*. Journal Springer-Verlag, Berlin, 1–54.
- Dorak, M.T. 2006. *Real Time PCR*. Advance Method Series. www.dorak.info/genetics/realtime.html. Diakses pada tanggal 20 November 2016.

- Effendi, H. 2003. *Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*. Kanisius, Yogyakarta.
- Fatkuljanah, D., Insan, A. I. & Widyartini, D. S. 2016. Kandungan Klorofil-a dan c pada Berbagai Bentuk Talus *Sargassum polycystum*. *Prodeding Seminar Nasional LPPM*, Unsoed.
- Ferreira, C., Thiemy, V., Maria, Nicole, D., & Seth, A. 2004. Reverse Transcriptase PCR: Principles and Application in Dentistry. *Journal of Applied Oral Science*, 12(1): 1–11.
- Garbary, D.J. & Kwang Y. K. 2005. Anatomical Differentiation and Photosynthetic Adaptation in Brown Algae. *Algae*, 20(3): 233–238.
- Giglio S, Monis P.T. & Saint C.P. 2003. Demonstration of Preferential Binding of SYBR Green I to Specific DNA Fragments in Real-Time Multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, 31: 36.
- Godfrey, B. J., Mayfield, M. B., Brown, J. A., & Gold, M. H., 1990. Characterization of a Gene Encoding a Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 9(3): 119–124.
- Gómez, I. & Huovinen, P. 2011. Morpho-functional Patterns and Zonation of South Chilean Seaweeds: The Importance of Photosynthetic and Bio-Optical Traits. *Marine Ecology Progress Series*, 422: 77–91.
- Graham, L. E. & Wilcox, L.W. 2000. *Algae*. University Of Wisconsin Prentice –Hall Inc. Upper Saddle River, New Jersey.
- Green, B. R. & Dunford, D. G. 1996. The Chlorophyll Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 685–714.
- Guiry, G.M. 2007. *Algae Base*. National University of Ireland Galway. Irelandia.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2010. *AlgaeBase* version 4.2. World-wide Electronic Publication (*On-line*), National University of Ireland, Galway, <http://www.algaebase.org>; searched on 5 February 2010.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. *AlgaeBase*. World-wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 09 April 2016.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Diakses pada tanggal 13 February 2017.

- Handoyo, D. & Rudiretna, A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanan Polymerase Chain Reaction (PCR) General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction. *Unitas*, 9(1): 17–29.
- Hegazi, M.M.I., Ruzafa, A.P., Almela, L. & Candela, M.E. 2002. Separation, Identification, and Quantification of Photosynthetic Pigments from Three Red Sea Seaweeds Using Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography. *Egyptian Journal of Biology*, 4(1):1–6.
- Heid, C., Stevens, K., Livak and Williams, J.K. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Journal of Genome Research*, (6): 986–994.
- Hernández-Carmona, G., Freile-Pelegrín, Y. & Hernández-Garibay, E. 2013. *Conventional and Alternative Technologies For The Extraction of Algal Polysaccharides*.
- Ho, C.L., Phang, S.M., Sinnapah, N.D. & Pang, T. 1996. Molecular Approaches in The Taxonomy of The Red and Brown Seaweeds. In : Chaudary BR and Agrawal SB (Eds.) *Cytology, Genetics And Molecular Biology of Algae*. Amsterdam: SPB Academic Publishing, 351–362.
- Hod, Y. 1992. A Simplified Ribonuclease Protection Assay. *Biotechniques*, 13: 852–854.
- Hopkins, W. G. 2004. *Intoduction to Plant Physiology*. 3rd ed. USA: Huner NPA.
- Hunt, M. 2006. *Real Time PCR*. The Board of Trustees of the University of South Carolina.
- Husni, Amir, Subaryono, Pranoto Y, Tazwir, & Ustadi. 2012. Pengembangan Metode Ekstraksi Alginat dari Rumput Laut *Sargassum* sp. sebagai Bahan Pengental. *Journal Agritech*, 32(1): 1–8.
- Ibrahim, A.M., Subiyanto, & Ruswahyuni. 2014. Hubungan Kerapatan Rumput Laut *Sargassum* sp. dengan Kelimpahan Epifauna di Pantai Barakuda Pulau Kemojan, Kepulauan Karimunjawa, Jepara. *Diponegoro Journal of Maquares*, 3(2): 36–44.
- Inang, A. L. 2011. Chlorophyll: Structure Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Academic Food Journal*, 9(2): 26–32.

- Indrawati, R., Helen, S., Indriatmoko, Retno, D.E.W., & Leenawaty, L. 2010. Encapsulation of Brown Seaweed Pigment by Freeze Drying Characterization and Its Stability During Storage. *Procedia Chemistry*, 14(1): 353–360.
- Indriyawati, N. 2015. Senyawa Fenolik dan Alginat dari Ganggang Coklat *Sargassaceae* Indo-Pasifik: Ekstraksi, Pemurnian, Kuantifikasi, dan Aktivitas Senyawanya. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*, 276–287.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. 1975. New Spectrophotometric Equation for Determining Chlorophyll a, b, c1, c2. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167: 194–204.
- Jun, S.Y., Kang, S.H., & Lee, K.H. 2008. Continous-Exchange Cell-Free Protein Synthesis Using PCR-Generated DNA and an RNase E-deficient Extract. *Journal Biotechniques*, 44: 387–391.
- Junianto. 2006. Rendemen dan Kualitas Algin Hasil Ekstraksi Alga (*Sargassum polycystum*) dari Pantai Selatan Daerah Cidaun Barat. *Bionatura*, 8(2): 152–160.
- Kadi, A. 2005. Beberapa Catatan Kehadiran Marga *Sargassum*. *Oseana*, XXX(4):19–29.
- Kadi, A. 2006. Struktur Komunitas Makroalgae di Pulau Pengelap, Dedap, Abang Besar dan Abang Kecil dan Kepulauan Riau. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 11(4): 234–240.
- Kadi, A. 2017. Interaksi Makroalgae dan Lingkungan Perairan Teluk Carita Pandeglang. *Biosfera*, 34(1): 32–40.
- Kartikaningsih, H. & Kartini, Z.S.D. 2012. Stabilitas Fukosantin dari Rumput Laut Coklat *Padina australis* Terhadap Perubahan Suhu. *Jurnal Fakultas Perikanan dan Kelautan*, 1(1): 366–370.
- Karuniawati, A., Yasmo, A., & Ningsih, I. 2012. Optimizing Real-Time PCR Method to Detect *Leptospira spp.* In Human Blood and Urine Specimens. *Medical Journal Indonesia*, 21(1): 13–17.
- Kholilullah, I., Widyartini, D.S. dan Ariyanto, E.R. 2012. Diversitas dan Sebaran Rumput Laut serta Wilayah Potensial Budidayanya di Perairan Kabupaten Kebumen. *Jurnal Scripta*, 1(1): 1-10.
- Kilar, J.A. 1992. Seasonal and Between-Plant Variability in The Morphology of *Sargassum mathiesonii* sp. nov. (Phaeophyta) from the Gulf of Mexico. *J. Phycol.* 28: 114–126
- King, H. K. 1983. *Brown Seaweed Extract (Alginates)*. In Glieksman M (ed). *Food Hydrocolloids*. CRC Press Inc, Boraraton Florida.

- Kondorik, F., Martanto, M. & Susanto, A.B. 2015. Identifikasi Komposisi Pigmen, Isolasi, dan Aktivitas Antioksidan β Karoten pada Rumput Laut Merah *Gracilaria gigas* Hasil Budidaya. *Jurnal Universitas Diponegoro*, 1(1): 1–10.
- Laksanawati, R., Ustadi & Husni, A. 2017. Pengembangan Metode Ekstraksi Alginat dari Rumput Laut *Turbinaria ornata* Rani. *Jurnal Pengelolaan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(2): 362–369.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 2*. Diterjemahkan oleh Maggy Thenawijaya. 1990. Jakarta: Erlangga.
- Limantara, L. & Rahayu, P. 2008. Sains & Teknologi Pigmen Alami. *Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami*, 2–42.
- Limantara, L. & Heriyanto. 2011. Optimasi Proses Ekstraksi Fukosantin Rumput Laut Coklat *Padina australis* Hauck Menggunakan Pelarut Organik Polar. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 16(2): 86–94. ISSN 0853-7291.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Elsevier Science*, (25): 402–408.
- Livak, K.J. 2008. Analyzing Real-Time PCR Data by THE Comparative CT Method. *Nature Protocols*, 3(6):1101–1108.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Elsevier Science*, (25): 402–408.
- Lu, B.R. & Tseng, C.K. 2004. Studies on four new species of the malacocarpic *Sargassum* (Sargassaceae, Heterokontophyta) in China. *Hydrobiologia*, 512: 193–199.
- Luning, K. 1990. *Seaweeds, Their Environment Biogeography and Ecophysiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Lutifawan, M., Karnan & Japa, L. 2015. Analisis Pertumbuhan *Sargassum* sp. dengan Sistem Budidaya yang Berbeda di Teluk Ekas Lombok Timur sebagai Bahan Pengayaan Mata Kuliah Ekologi Tumbuhan. *Jurnal Biologi Tropis*, 15(2): 135–144.
- Malta, M., Rijstenbil, J.W., Brouwer, P.E.M. & Kromkamp, J.C. 2003. Vertical Heterogeneity in Physiological Characteristics of *Ulva* spp. mats. *Journal of Marine Biology*, 143(1): 1029–1038.
- Marianingsih, P., Amelia, E., & Suroto, T. 2013. *Inventarisasi dan Identifikasi Makroalga di Perairan Pulau Untung Jawa*. Lampung: Prosiding Semirata FMIPA Unila.

- Masduqi, A.F., Izzati, M., & Prihastanti, E. 2014. Efek Metode Pengeringan Terhadap Kandungan Bahan Kimia dalam Rumput Laut *Sargassum polycystum*. *Buletin anatomi dan Fisiologi*, 22(1): 1–9.
- Mattio, L. & Payri, C. 2010. Assessment of Five Markers As Potential Barcodes for Identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum species* (Phaeophyceae, Fucales). *Cryptogamie Algol.*, 31: 467–485.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K., & Ming, C.H. 2008. Antioxidant Activities and Phenolics Content of Eight Species of Seaweeds From North Borneo. *Journal of Applied Phycology*, 20: 367–373.
- Mattio, L. & Payri, C.E., 2011. 190 Years of *Sargassum* Taxonomy, Facing the Advent of DNA Phylogenies. *The Bot. Rev.*, 77(1): 31–70.
- Mayakun, J. & Prathep, A. 2005. *Seasonal Variations In Diversity and Abundance of Macroalgae at Samui Island*, Thailand: Surat Thani Province.
- Megayana, Y., Subekti, S. & Alamsjah, M.A. 2011. Studi Kandungan Alginat dan Klorofil Rumput Laut *Sargassum* sp. pada Umur Panen yang Berbeda. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 1(1): 10–19.
- Michel, G., Labourel, A., Thomas, F., Jam, M., Jeudy, A., Genicot, S., Rebuffet, E., Hehemann, J. H. , Barbeyron, T. & Czjzek, M. 2012. *Treasure Hunting in the Genome of the Marine Bacterium Zobellia galactanivorans: Discovery of Novel Enzymes for the Bioconversion of Algal Polysaccharides*. Marine Plants and Biomolecules, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, Brittany, France.
- Mubarak, H., Ilyas, S., Ismail, W., Wahyuni, I.S., Hartati, S.H., Pratiwi, E., Jangkaru Z., & Arifuddin, R. 1990. *Petunjuk teknis budidaya rumput laut*. Badan Litbang Pertanian, Puslitbang Perikanan. IDRC, Infish. 93 hal.
- Mufti, E.D., Kartini, Z., & Hartati, K. 2013. Stabilitas Fukosantin dari Alga Coklat (*Sargassum cristaefolium*) pada Berbagai pH. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*, 1(1):1–15.
- Nababan, M.G, Munasik, I.Y., Kartawijaya, T., Prasetia, R., Ardiwijaya, R.L., Pardede, S.T., Sulisyati, R., Mulyadi, & Syaifudin, R. 2010. Status Ekosistem di Taman Nasional Karimunjawa. *Wildlife Conservation Indonesia Programme*, 10(1): 78.

- Newton, C.R. & Graham, A. 1994. *PCR*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Noikasar, T. & Ajisaka, T. 2009. Taxonomy and distribution of *Sargassum* (Phaeophyceae) in the Gulf of Thailand. *Nineteenth International Seaweed Symposium Developments in Applied Phycology*, 2: 513–527.
- Nurcahyanti, A.D.R. & Timotius, K.H. 2007. Fucoxanthin sebagai Antiobesitas. *J. Teknol dan Industri Pangan*, 18(2): 134–141.
- Pardal, S.J. 2010. Menguji Ekspresi Gen Menggunakan Real-Time PCR. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 32(6):13–14.
- Parker, R. M. & Barnes, N. M. 1999. mRNA: Detection by *In Situ* and Northern Hybridization. *Methods in Molecular Biology*, 106: 247–283.
- Pertamawati. 2010. Pengaruh Fotosintesis Terhadap Pertumbuhan Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) dalam Lingkungan Fotoautotrof Secara *In Vitro*. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 12(1): 31–37.
- Peteiro, C. 2017. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. *Alginates and Their Biomedical Applications*, 22-66.
- Pettinella, C., Lee, S.H. & Cipollone, F. 2007. Targeted Quantitative Analysis of Fatty Acids in Atherosclerotic Plaques by High Sensitivity Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 850: 168–176.
- Pongarrang, D., Rahman, A. & Iba, W. 2013. Pengaruh Jarak Tanam dan Bobot terhadap Pertumbuhan Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Menggunakan Metode Vertikultural. *Jurnal Mina Laut Indonesia*, 3(12): 94–112.
- Purwanti, A. 2013. Optimasi Kondisi Proses Pengambilan Asam Alginat dari Alga Coklat. *Jurnal Teknologi Technoscientia*, 5(2): 125–133.
- Rachmat, R., Murniasih, T., Rasyid, A. & Untari, F. 1999. Penelitian Produk Alam Laut Uji Antidegeneratif Algae Laut. *Prosiding. Puslitbang Oseanologi LIPI*, Jakarta.
- Rahmaningtyas, V., Kurniawan, N., & Oktavianie, D.A. 2013. *Isolasi dan Kuantifikasi Ekspresi mRNA Feline Tetherin/BST-2 dari Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) yang Diinduksi Interferon-Alpha (IFN- α)*. Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya. Malang.

- Ramsden, I. 2004. *Plant and Algal Gums and Mucillages in Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. CRS Press. 247–248.
- Rasyid, A. 2003. Algae Coklat (Phaeophyta) Sebagai Sumber Alginat. *Oseana*, 28 (1): 33–38.
- Rasyid, A. 2005. Beberapa Catatan tentang Alginat. *Oseana*, XXX(1): 9–14.
- Rasyid, A. 2010. Ekstraksi Natrium Alginat dari Alga Coklat *Sargassum echinocarphum*. *Oceanologi dan Limnologi di Indonesia*, 36(3): 393–400.
- Reinbothe, S. & Reinbothe, C. 1996. The Regulation of Enzymes Involved in Chlorophyll Biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* (237): 323–343.
- Rohmat, N., Ibrahim, R. & Riyadi, P.H. 2014. Pengaruh Perbedaan Suhu dan Lama Penyimpanan Rumput Laut *Sargassum polycystum* Terhadap Stabilitas Ekstrak Kasar Pigmen Klorofil. *Jurnal Pengelolaan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, III(1): 118–26.
- Roeder, V., Collén, J., Rousval, S., Corre, E., Leblanc, C., & Boyen, C. 2005. Identification of Stress Gene Transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyta) Protoplast Cultures by Expressed Sequence Tag Analysis. *Journal Phycology*, 41: 1227–1235.
- Sabra, A., Zeng, P., Lonsdorf, H. & Deckwer, W.D. 2000. Effect of Oxygen on Formation and Structure of Azotobacter Vinelandii Alginate and Its Role in Producing Nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4037–4044.
- Saccomanno, C.F., Bordonaro, M., Chen, J.S. & Nordstrom, J.L. 1992. A Faster Ribonuclease Protection Assay. *Biotechniques*, 13: 846–850.
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 2. ITB Press, Bandung.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraswathi, S.J., Babu, B. & Rengasamy, R. 2003. Seasonal studies on alginate and its composition I: *Sargassum polycystum* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 51: 240–243.
- Schoenwaelder, M. E. A., & Wiencke, C. 2000. Phenolic Compounds in The Embryo Development of Several Northern Hemisphere Fucoids. *Plant Biology*, 24–33.

- Shahib, M.N., Budiman, F., & Feranty, Z.A. 2015. Studies on Gene Expressions at The RNA Level Associated with The Senile Lens Changes in Human Lens Cataract. *Donnish Journal of Medicine and Medical Sci.*, 2(3): 011–018.
- Sharma, D. 2016. Notes on *Sargassum* (With Diagram) Algae. Article. Biology Discussion. (<http://www.biologydiscussion.com/algae/life-cycle-algae/notes-on-sargassum-with-diagram-alage/21227> diakses pada 09 Juli 2017 11:19)
- Sim, M.C., Ho, C.L., & Phang, S.M. 2013. A Simple and Effective Method for RNA Isolation and cDNA Library Construction from The Brown Seaweed *Sargassum polycystum* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal Application Phycology*, 10: 1–9.
- Song, J., Clemens, J. & Jameson, P.E. 2008. Quantitative expression analysis of the ABC genes in *Sophora tetraptera*, a woody legume with an unusual sequence of floral organ development. *Journal of Experimental Botany*, 1 -13.
- Stephen, A.M. 1995. *Food and Their Application*. Marcel Deccerline. New York, USA.
- Stephen, E. Lizewski & Michael, J. S. 2004. Identification of AlgR-Regulated Genes in *Pseudomonas aeruginosa* by Use of Microarray Analysis. *Bacteriol.* 186(17): 5672–5684.
- Subaryono. 2010. Modifikasi Alginat dan Pemanfaatan Produknya. *Squalen*, 5(1): 1-7.
- Sulisetjono. 2009. *Bahan Serahan Alga*. UIN Malang, Malang
- Susanto, T., Rakhmadiono, S. & Mujiyanto. 2001. Karakterisasi Ekstrak Alginat dari *Padina* sp. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 2 (2), pp.96-109.
- Tenhaken, R., Voglas, E., Cock, J.M., Neu, V. & Huber, C.G. 2011. Characterization of GDP-mannose Dehydrogenase from the Brown Alga *Ectocarpus siliculosus* Providing the Precursor for the Alginate Polymer. *The Journal of Chemistry*, 286(19):16707–16715.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A. & Rosmiat. 2001. *Ekstraksi DNA Rumput Laut Kappaphycus alvarezii dengan Metode Fenol Kloroform*. Laporan Penelitian. Makassar: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

- Torrano-Silva, B.N., Vieira, B.R., Riosmena-Rodríguez, R., Oliveira, M.C. 2018. Guidelines for DNA barcoding of coralline algae, focusing on Lithophylloideae (Corallinales) from Brazil. *Botanica Marina*, 61(2): 127–140.
- Trisnaningrum, N. 2009. *Analisis Ekspresi Gen Penyandi Metallothionein Tipe II pada Melastoma afficial. Yang Mendapat Cekaman pH Rendah dan Alumunium*. Tesis. Bogor : Program Studi Bioteknologi Sekolah Pasca Sarjana IPB.
- Trono, G.C. & Fortes. 1974. *Euchema Farming in The Phillipine*. Phillipine: National Science Research Center.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T. & Scheible, W.R. 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *the Plant Cell Online*, 20(7): 1736–1737.
- Verma, P., Arun, A., & Sahoo, D. 2015. Brown Algae. *Springer Sciences + Bussiness Media Dordrecht*, 177–204.
- Vijayaraghavan, M. R. & Kaur, I. 1991. Ultrastructure and Histochemistry of Vegetative Thallus in *Sargassum vulgare* C. Agardh and *S. johnstonii* Setchel & Gardner. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* B57(5): 319–328.
- Weis, J.H., Tan, S.S., Martin, B.K., & Wittwer, C.T. 1992. Detection of Rare mRNAs Via Quantitative RT-PCR. *Trends in Genetics*, 8: 263–264.
- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2011. Keanekaragaman Spesies Rumput Laut Coklat (Phaeophyceae) pada Substrat Karang Pantai Menganti Kebumen. *Prosiding Seminar Nasional Hari Lingkungan Hidup*, 88–92.
- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2012^a. Kandungan dan Mutu Alginat Rumput Laut *Sargassum* dari Pantai Tebeng Cilacap. *Prosiding Seminar Nasional "Peran Corporate Social Responsibility (CSR) dan Teknologi Berkelanjutan dalam Pemberdayaan Menuju Masyarakat Madani"*. Pusat Penelitian Pangan, Gizi dan Kesehatan LPPM Unsoed.
- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2012^b. Keanekaragaman Morfologi Rumput Laut *Sargassum* dari Pantai Permisian Cilacap dan Potensi Sumberdaya Alginatnya untuk Industri. *Prosiding Seminar Nasional*, 61–66.
- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2012^c. Meningkatkan Produksi serta Mutu Tepung Agar Rumput Laut *Gracilaria gigas* dengan Modifikasi Sistem Jaring dan Proses Ekstraksinya. *Inovasi* 06(01): 24–35.

- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2013. Pertumbuhan Rumput Laut *Sargassum polycystum* yang Dibudidaya dengan Modifikasi Metode dan Sistem Jaring Berbeda di Perairan Tebeng II Cilacap. *Prosiding*. Seminar nasional Pengembangan sumber daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan III. Pusat Penelitian Gender, Anak dan Pelayanan Masyarakat (PPGAPM), LPPM Unsoed.
- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2013. Diversifikasi Sumberdaya Alginat Melalui Budidaya Rumput Laut *Sargassum* dalam Upaya Pengembangan Bahan Pengental untuk Industri Batik Banyumas. *Laporan Penelitian*. Fakultas Biologi Unsoed, Purwokerto.
- Widyartini, D.S., Insan, A.I. & Sulistyani. 2014. Diversifikasi Sumberdaya Alginat Melalui Budidaya Rumput Laut *Sargassum* dalam Upaya Pengembangan Bahan Pengental untuk Industri Batik Banyumas. *Laporan Penelitian*. Fakultas Biologi Unsoed, Purwokerto.
- Widyartini, D. S., Insan, A.I. & Hidayah, H.A. 2015. Peningkatan Mutu Alginat Rumput Laut *Sargassum* Melalui Proses Fermentasi dan Ekstraksi Berbeda Sebagai Bahan Pengental Pada Industri Batik. *Prosiding*. Seminar Nasional LPPM Unsoed, Purwokerto.
- Widyartini, D. S., Insan, A. I. & Warsinah. 2011. Meningkatkan Pertumbuhan dan Produksi Rumput Laut *Gracilaria gigas* dengan Modifikasi Metode Budidaya dan Sistem Jaring. *Sainteks*, 8(1): 63–75.
- Widyartini, D.S. & Santosa, B.T. 2006. Keanekaragaman Makroalga *Sargassum* Berdasarkan Sifat Morfologi dan Kandungan Alginat pada Berbagai Substrat Dasar di Pantai Rancababakan Cilacap. *Makalah*. Seminar Nasional Peningkatan Peran Serta Masyarakat dalam Pelestarian Lingkungan Hidup Melalui Pendidikan Dini. Lembaga Penelitian, Pusat Penelitian Lingkungan Hidup dan Dinas Pendidikan Nasional Kabupaten Banyumas.
- Widyartini, D. S., Insan, A. I. & Sulistyani. 2015. Diversity of Brown Algae (Phaeophyceae) Species of Pedalen Beach–Kebumen. *Proceeding 5th International Conference on Plant Diversity (ICPD)*. ICPD– Unsoed and LIPI.
- Widyartini, D. S., Insan, A. I. & Sulistyani, 2015. Kandungan Alginat *Sargassum polycystum* pada Metode Budidaya dan Umur Tanam Berbeda. *Biosfera*, 32(2): 119–125.

- Widyartini, D.S., Widodo, P., & Susanto, A.B. 2017. Thallus Variation of *Sargassum poycystum* from Central Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 18(3):1004–1011.
- Winarno, F.G. 1996. *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*. Pustaka Sinar Harapan, Jakarta.
- Winarno, F.G. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. M-BRIO Press, Bogor.
- Yang, H.N. & Chiang, Y.M. 1995. A New Variety *Sargassum* (Phaeophyta) in Taiwan. *Taiwania*, 40(3): 193–197.
- Yoshida, T. 1983. Japanese species of *Sargassum* subgenus *Bactrophycus* (Phaeophyta, Fucales). *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. V (Bot.,)* 13: 2–246.
- Young, A.M., Torres, C., Mack, J.E., & Iantara, C.W. 2002. Morphological and Genetic Evidence for Vicariance and Refugium in Atlantic and Gulf of Mexico Populations of The Hermit Crab *Pagurus longicarpus*. *Mar. Biol.*, 140: 1059–1066.
- Zailanie, K., Susanto, T. & Simon, B.W. 2001. Ekstraksi dan Pemurnian Alginat dari *Sargassum filipendula* Kajian dari Bagian Tanaman, Lama Ekstraksi, dan Konsentrasi Isopropanol. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 2(1): 10–27.
- Zailanie, K., Sutanto, T. & Simon, B. W. 2003. Ekstraksi dan Pemurnian Alginat dari *Sargassum filipendula* Kajian dari Bagian Tanaman, Lama Ekstraksi dan Konsentrasi Isopropanol. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 2: 10–27.
- Zainlanie, K. & Kartikaningsih, H. 2016. Dietary fiber and fatty acids in the thallus of brown alga (*Sargassum duplicatum* J. G. Agardh). *Int. Food Res. J.*, 23(4): 1584–1589.
- Zaelani, K. & Sukoso. 2014. Study on Fucoxanthin Content and Its Identification in Brown Algae from Padika Village Talango District, Madura Islands. *Journal of Live Sciences and Biomedicine*, 4(1): 01–03.
- Zamorano, P.L., Mahesh, V.B., & Brann, D.W. 1996. Quantitative RT-PCR for Neuroendocrine Studies. A minireview. *Neuroendocrinology*, 63: 397–407.
- Zhang, P., Shao, Z., Jin, W., & Duan, D. 2016. Comparative Characterization of Two GDP-Mannose Dehydrogenase Genes from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). *BMC Plant Biology*, 16(62): 2–10.

DAFTAR SINGKATAN

A. Daftar Satuan

Simbol satuan	Satuan	Keterangan (besaran pokok)
ml	Mililiter	Volume (10^{-3} l)
μ l	Mikroliter	Volume (10^{-6} l)
U/ μ l	Unit per mikroliter	Jumlah per volume
C	Celsius	Suhu
g	Gram	Massa/bobot
μ g	Mikrogram	massa/bobot (10^{-6} l)
ng	Nanogram	Berat (10^9)
mg	Miligram	Massa
mg.l-1	Miligram per liter	Bobot/ massa per satuan volume
nM	Nanomolar	Konsentrasi (10^{-9})
mM	Milimolar	Konsentrasi (10^{-3} M)
rpm	Rotation per minute	Kecepatan putaran
cm	Centimeter	Panjang (10^{-2})
m	Meter	Satuan panjang
mm	Milimeter	Panjang (10^{-3} m)
km	Kilometer	Panjang
ppm	<i>Part per million</i>	Massa

B. Daftar Simbol

Simbol	Arti
μ	Mikro = seper sejuta
$^{\circ}$	Derajat, umumnya dalam Celcius
%	Persen (per seratus)
‰	Permil (per seribu)
-	Sampai/hingga
\pm	Kurang lebih
Δ	Selisih
>	Lebih dari
<	Kurang dari
n	Jumlah
p	Signifikansi
λ	Lambda (dipakai untuk panjang gelombang)
β	Alfa
α	Beta

C. Daftar Singkatan

Singkatan	Arti
α -1,4-L-guluronat	<i>Alpha 1,4 Levo Guluronate</i>
β -1,4-D-mannuronat	<i>Beta 1,4 Dextro Mannuronate</i>
ATP	<i>Adenosin trifosfat</i>
bp	<i>Base pair</i>
C	<i>Carbon</i>
Ca	<i>Calcium</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
Cl ⁻	<i>Ion Klorin</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
D-manuronic	<i>Dextro mannuronic</i>
dATP	<i>Deoxyadenosine Triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine Triphosphate</i>
ddH ₂ O	<i>Double-distilled water</i>
dGTP	<i>Deoxyguanosine Triphosphate</i>
dH ₂ O	<i>Distilled water</i>
DNA	<i>Asam Deoksiribonukleat (Deoxyribonucleic Acid)</i>
dNTP	<i>Deoxy Nucleotide Phosphate</i>
dTTP	<i>Deoxythymidine Triphosphate</i>
dUTP	<i>Deoxyuridine Triphosphate</i>
Fe	<i>Ferrum (Besi)</i>
Fe-S	<i>Feredoksin</i>
G	<i>Guluronat</i>
G-alginat	<i>Guluronat alginat</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphatdehydrogenase</i>
GDP	<i>Guanosine Diphosphate</i>
GDP-D-mannose	<i>Guanosine Diphosphate Dextro Mannose</i>
GDP-L-guluronat	<i>Guanosine Diphosphate Levo Guluronat</i>
GDP-ManA	<i>Guanosin Diphosphate Dextro Mannuronic Acid</i>
GMD	<i>GDP Mannose Dehydrogenase</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
H	<i>Hidrogen</i>
HKG	<i>House Keeping Gene</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
K ⁺	<i>Ion Kalium</i>
L-guluronat	<i>Levo guluronat</i>
LS	<i>Lintang Selatan</i>
LSD	<i>Least Significant Different</i>
M-alginat	<i>Mannuronat alginat</i>
M	<i>Mannuronat</i>

Lanjutan	
Singkatan	Arti
Mg	Magnesium
MgCl ₂	<i>Magnesium Chloride</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleid Acid</i>
Na ⁺	Ion Natrium
NAD	Nikotinamida Adenin Dinukleotida
NADH	Nikotinamida Adenosin Dinukleotida
	Hidrogen
P	Posfat
PAST v3	<i>Paleontological Statistic version 3</i>

PROTOKOL ISOLASI RNA
GENEJET PLANT RNA PURIFICATION MINI KIT #K0801
(THERMO SCIENTIFIC)

CARA KERJA :

NO.	DESKRIPSI	CEK
1.	<i>Plant RNA lysis solution</i> diambil sebanyak 500 µl lalu ditambahkan dengan β-merkaptotanol sebanyak 10 µl kedalam <i>microtubes</i> 1,5 ml RNase free dan DNase free.	
2.	Talus <i>Sargassum polycystum</i> berat 100 mg dihaluskan bersama pasir <i>zeolith</i> dengan teknik maserasi. Kemudian pindahkan hasil maserasi kedalam <i>microtubes</i> 1,5 ml RNase free dan DNase free yang didalamnya sudah terdapat <i>Plant RNA lysis solution</i> .	
3.	Lysate (2) diinkubasi selama 5 menit pada suhu 56°C. Lalu, disentrifugasi 7 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.	
4.	Supernatan diambil (biasanya sebanyak 450-550 µl) lalu dipindahkan kedalam tube mikrosentrifugasi yang baru.	
5	Lysate (4) ditambahkan etanol 96% dicampur dengan pipet.	
6.	Lysate (5) dipindahkan ke <i>purification tube</i> yang sudah dimasukkan kedalam <i>collection tube</i> . Disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm).	
7.	Cairan supernatan yang terdapat didalam tube dibuang. Lalu pasang kembali <i>purification column</i> kedalam <i>collection tube</i> yang baru.	
8.	<i>Wash buffer</i> 1 yang sebelumnya sudah ditambahkan etanol kemudian ditambahkan sebanyak 700 µl kedalam <i>purification column</i> . Lalu, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm). Cairan yang terdapat didalam <i>tube</i> dibuang dan <i>purification column</i> dipindahkan kedalam <i>collection tube</i> 2 ml yang baru.	
9.	<i>Wash buffer</i> 2 yang sebelumnya sudah ditambahkan etanol kemudianditambahkan sebanyak 500 µl kedalam <i>purification coloumn</i> . Lalu, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm). Cairan yang terdapat didalam <i>tube</i> dibuang dan <i>purification column</i> dipindahkan kedalam <i>collection tube</i> yang baru.	

Lanjutan

NO.	DESKRIPSI	CEK
10.	Perlakuan (9) diulang kembali sebanyak 1 kali. Kemudian, sentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terdapat didalam <i>tube</i> dibuang dan <i>purification column</i> dipindahkan kedalam RNase free 1,5 ml <i>collection tube</i> .	
11.	Air bebas nuklease ditambahkan sebanyak 50 µl tepat ditengah-tengah membran <i>purification column</i> untuk melulusi RNA. Kemudian, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 x g (11.000 rpm).	
12.	<i>Purification column</i> dibuang. Kemudian, RNA yang terdapat didalam RNase free 1,5 ml <i>collection tube</i> disimpan dikulkas pada suhu -80°C untuk penyimpanan dalam jangka waktu lebih dari satu bulan.	

**PROTOKOL cDNA SYNTHESIS
REVERTAID FIRST STRAND cDNA SYNTHESIS KIT
(THERMO SCIENTIFIC)**

CARA KERJA :

NO.	DESKRIPSI
1.	<i>First strand cDNA synthesis mix in volume 12 µl (plate on ice) / reaction:</i> <ol style="list-style-type: none"> a. Total RNA template : 0,1 – 5 µg b. Primer oligo (dT)₁₈ : 1,0 µl c. Water, nuclease free up to volume : 12,0 µl <i>mix gently</i> dan inkubasi (waterbath): suhu 65°C, 5 menit <i>chill on ice, spin down and vial back on ice</i>
2.	<i>Add first strand cDNA synthesis mix up to volume 20 µl (plate on ice) in order:</i> <ol style="list-style-type: none"> a. 5x reaction buffer : 4,0 µl b. Ribolock RNase inhibitor (20 U/ µl) : 1,0 µl c. 10 mM dNTP mix : 2,0 µl d. revertAID M-Mul V RT (200 U/ µl) : 1,0 µl <i>mix gently and centrifuge briefly 2500 rpm, 2 menit</i>
3.	Inkubasi (waterbath) : suhu 42°C, 60 menit (<i>processing of cDNA synthesis</i>)
4.	Inkubasi (waterbath) : suhu 70°C, 5 menit (terminasi akhir)

RT-QPCR MIX DAN PROTOKOL RT-QPCR MIX

RT-qPCR Mix

	RT-qPCR Mix	Volume (µl)
2x Master Mix		5,0
10µM Forward Primer (0,5 µM final concentration)		0,5
10µM Reverse Primer (0,5 µM final concentration)		0,5
dH ₂ O (water PCR grade)		3,0
cDNA template (10 ng)		1,0
Total volume		10,0

RT-qPCR Condition (45 cycle)

	PRE-DENATURASI	DENATURASI	ANNEALING & EKSTENSI	POST EKSTENSI	STORAGE
Suhu (°C)	95	95	60	30	4
WAKTU	7'	30''	30''	5'	-

**PROTOKOL RT-qPCR DyNamo Flash SYBR *Green* qPCR Kit
(THERMO SCIENTIFIC)**

PCR MIX (plate on ice) :

NO.	BAHAN PCR MIX	1X REAKSI (μ l)	4X REAKSI (μ l)	6X REAKSI (μ l)	8X REAKSI (μ l)
	2x master mix	10,0	40,0	60,0	80,0
	10 μ M Forward Primer (0,5 μ M final concentration)	1,0	4,0	6,0	8,0
	10 μ M Reverse Primer (0,5 μ M final concentration)	1,0	4,0	6,0	8,0
	dH ₂ O (water PCR grade)	6,0	24,0	36,0	48,0
	cDNA template (50 ng)	(a') 2,0	(a') 2,0	(a') 2,0	(a') 2,0
	Total volume	20,0			

	PRE- DENATURASI	DENATURASI	ANNEALING & EKSTENSI	POST EKSTENSI	STORAGE
Suhu (°C)	95	95	60	30	4
WAKTU	7'	30''	30''	5'	-

PCR CONDITION (45 cycle) :