



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH METODE *FREEZING* (-4°C) TERHADAP
KADAR KLOOROFIL DAN PROTEIN PADA STRAIN-STRAIN
Nostoc [Vaucher 1803] Bornet *et* Flauhalt 1886**

SKRIPSI

**QUAMILLA YASMINE
0606070176**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH METODE *FREEZING* (-4°C) TERHADAP
KADAR KLOOROFIL DAN PROTEIN PADA STRAIN-STRAIN
Nostoc [Vaucher 1803] Bornet *et* Flauhalt 1886**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains**

**QUAMILLA YASMINE
0606070176**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Quamilla Yasmine

NPM : 0606070176

Tanda Tangan : 

Tanggal : 15 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Quamilla Yasmine
NPM : 0606070176
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pengaruh metode *freezing* (-4° C) terhadap kadar klorofil dan protein strain-strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flauhalt 1886

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana *Science* pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dian Hendrayanti, S.Si., M.Sc. (.....)

Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. (.....)

Penguji II : Dra. Nining Betawati P., M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 15 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamin, segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayah yang telah diberikanNya sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan. Shalawat dan salam penulis limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW, keluarga, dan sahabat. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dian Hendrayanti, S.Si, M.Sc. selaku dosen pembimbing yang telah bersedia membimbing, mengarahkan, memberi nasihat, dan saran kepada penulis dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas semangat, kesabaran, dan kebaikan hatinya yang luar biasa.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku ketua sidang, Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku dosen penguji, serta Dr. Anom Bowoloaksono, M.Sc. selaku koordinator seminar. Terima kasih karena telah memberikan pengetahuan, koreksi, dan saran-saran yang bermanfaat bagi penulis.
3. Dr. rer. nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, dan Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku sekretaris Departemen Biologi.
4. Dr. Upi Chairun Nisa selaku Penasehat Akademik yang telah memberikan saran-saran, bimbingan, ilmu, dan motivasi selama penulis menimba ilmu di Departemen Biologi.
5. Mega Atria, S.Si, M.Si. selaku Kepala Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Ariyanti Oetari, Ph.D. selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi, dan

Dr. Abinawanto selaku Kepala Laboratorium Genetika FMIPA UI, yang telah bersedia meminjamkan tempat dan fasilitas yang memudahkan penulis dalam melakukan penelitian.

6. Seluruh staf Departemen Biologi FMIPA UI, Pak Pri, Ibu Ros, Ibu Ida, Ibu Sofie, Mbak Asri, Mas Dedi, Pak Taryana, dan Pak Taryono yang telah banyak membantu penulis selama penelitian;
7. Keluarga tercinta, Papa (Usep Fadilah) dan Mama (Lailan Bidasari) yang telah merawat dan mendidik penulis dengan limpahan kasih sayang, serta selalu mendoakan dan memotivasi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Adik-adik (Laili Nafilah, Tharisa Alma Umairah, dan Putri Rahmadina yang telah memberikan dukungan dan semangat dengan canda tawa mereka.
8. Handoko Halim, S.I kom. yang selalu memberikan doa, semangat, dukungan, dan bantuan setulus hati kepada penulis. Sahabat penulis: Steffi M.J., Antonia Patricia, Fitri Maisari, S.Si., Siti Mandarini, S.Si., Addy Prima, S.Kom., Ekklesia Intan Agape, S.E., S.Kom., Siti Zuchria, S.I kom., dan Hanny Dyah Ayu, S.Sos yang sukses membuat penulis iri akan kelulusan kalian, sehingga penulis makin bersemangat mengerjakan penelitian dan penulisan skripsi.
9. Teman-teman seperjuangan: Henny, Betty, Sholia, Evha, Iqbal, Galuh, Fido, Vita, Vinda, Kresna, dan semua teman Felix, serta teman-teman laboratorium taksonomi tumbuhan: Mardlotilah Asma A., Anggi Septiani, Widiastuti, Maulida Oktaviani, dan Tectona Grandis yang telah membantu dan memberikan semangat kepada penulis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini kurang dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis akan senang hati menerima segala kritik dan saran. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu biologi pada khususnya.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Quamilla Yasmine
NPM : 0606070176
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh metode *freezing* (-4° C) terhadap kadar klorofil dan protein strain-strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flauhalt 1886

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 15 Juli 2011

Yang menyatakan



(Quamilla Yasmine)

ABSTRAK

Nama : Quamilla Yasmine
Program studi : S1 Biologi
Judul : Pengaruh metode *freezing* (-4°C) terhadap kadar klorofil dan protein pada strain-strain *Nostoc* (Vaucher 1803) Bornet et Flauhalt 1886

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode *freezing* (-4°C) terhadap kadar klorofil dan protein pada 13 strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI. Protektan DMSO 5% digunakan sebagai medium preservasi pada perlakuan, dan pada kontrol digunakan medium cair BG 11 N-free. Pengaruh metode *freezing* diketahui dengan membandingkan kadar klorofil dan protein pada sebelum dan sesudah preservasi (hari ke-0, hari ke-1, dan hari ke-7). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar klorofil dan protein pada kelompok perlakuan lebih besar daripada kontrol. Tiga dari tiga belas strain (23,08 %) mengalami penurunan kadar klorofil sebesar 7,32% -- 47,02% setelah preservasi, sedangkan lima dari tiga belas strain (38,46%) mengalami penurunan kadar protein sebesar 7,69%--37,5% setelah *freezing*.

Kata Kunci : *Nostoc*, metode *freezing*, klorofil, protein
xii + 48 halaman : 12 gambar, 8 tabel,
Daftar Pustaka : 42 (1983--2009)

ABSTRACT

Name : Quamilla Yasmine
Study Programme : Biology
Title : The effect of freezing method (-4°C) on chlorophyll and protein content of *Nostoc* (Vaucher 1803) Bornet et Flauhalt 1886 strains

The purpose of this study was to assess the effect of freezing method (-4°C) on chlorophyll and protein content of 13 *Nostoc* strains Culture Collection of Plant Taxonomy Laboratory FMIPA UI. The protectan used DMSO 5%, and liquid BG 11 N-free medium was used as control. The effect of freezing was evaluated by comparing the content of chlorophyll and protein of *Nostoc* before and after preservation (day-0, day-1, and day-7). The result showed that the control had lower chlorophyll and protein content than the treatment. The chlorophyll content of three strains (23,08%) decreased about 7,32% -- 47,02% after freezing treatment, while the protein content of five strains (38,46%) decreased about 7,69% -- 37,5%.

Key words : *Nostoc*, freezing method, chlorophyll, protein
xii + 48 pages : 12 pictures, 8 tables.
Bibliography : 42 (1983--2009).

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Nostoc</i> sp.	5
2.2 Metode preservasi	7
2.2.1 Metode subkultur	7
2.2.2 Metode <i>mineral oil storage</i>	8
2.2.3 Metode <i>freeze-drying</i>	9
2.2.4 Metode <i>freezing</i>	9
2.3 Protektan	10
2.4 Kandungan pigmen dan protein pada Cyanobacteria	11
2.5 Pengukuran kadar klorofil	13
2.6 Pengukuran kadar protein	14
3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Lokasi penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	17
3.2.2.1 Strain-strain <i>Nostoc</i>	17
3.2.2.2 Medium	17
3.2.2.3 Bahan Kimia	17
3.3 Cara Kerja	18
3.3.1 Sterilisasi alat dan bahan	18
3.3.2 Pembuatan Medium	19
3.3.1.1 Medium BG 11 <i>n-free</i>	19
3.3.1.2 Protektan untuk metode <i>freezing</i>	20
3.3.3 Perbanyak jumlah koloni, pembuatan <i>stock</i> , <i>working culture</i>	20
3.3.4 Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis <i>Nostoc</i>	21
3.3.5 Pengukuran kadar klorofil sebelum <i>freezing</i>	21
3.3.6 Pengukuran kadar protein sebelum <i>freezing</i>	22
3.3.7 Persiapan suspensi sel untuk preservasi dengan metode <i>freezing</i>	24

3.3.8	Ekuilibrasi dan pembekuan (<i>freezing</i>).....	24
3.3.9	Pencairan (<i>thawing</i>).....	24
3.3.10	Pengamatan strain <i>Nostoc</i> setelah <i>thawing</i>	25
3.3.11	Pentujian suspensi sel pasca preservasi	25
3.3.12	Penanaman kembali strain-strain <i>Nostoc</i> setelah preservasi satu hari (H ₁) dan tujuh hari (H ₇).....	25
3.3.13	Pengukuran kadar klorofil dan protein setelah preservasi.....	26
3.4	Penyusunan dan analisis data.....	26
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1	Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik strain-strain <i>Nostoc</i> koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI	27
4.2	Pengamatan morfologi makroskopik strain-strain <i>Nostoc</i> setelah preservasi selama satu hari (H ₁) dan tujuh hari (H ₇).....	31
4.3	Pengamatan morfologi mikroskopik strain-strain <i>Nostoc</i> setelah preservasi selama satu hari (H ₁) dan tujuh hari (H ₇).....	36
4.4	Pengukuran kadar klorofil strain-strain <i>Nostoc</i> pada saat sebelum preservasi dan sesudah preservasi (H ₁ dan H ₇).....	39
4.5	Pengukuran kadar protein strain-strain <i>Nostoc</i> pada saat sebelum preservasi dan sesudah preservasi (H ₁ dan H ₇).....	42
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	46
	DAFTAR REFERENSI	47
	LAMPIRAN.....	51

DAFTAR GAMBAR

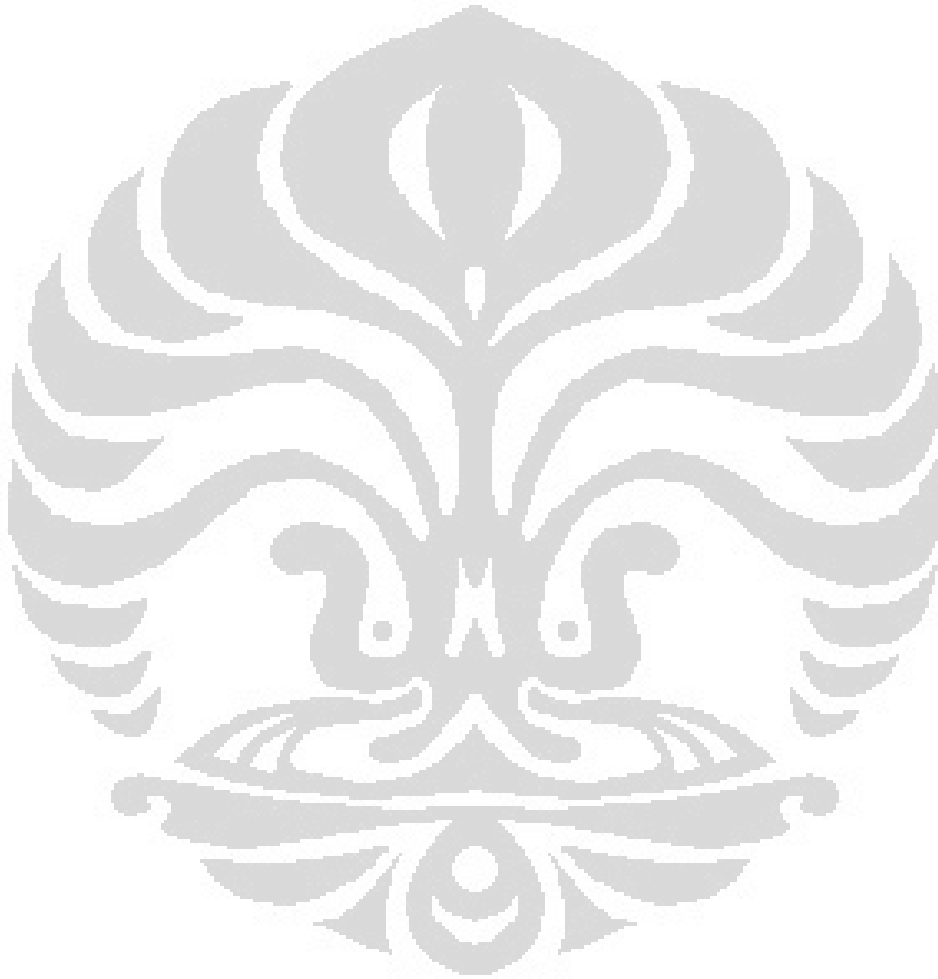
Gambar 2.1. Struktur makroskopis dan mikroskopis <i>Nostoc</i>	6
Gambar 3.1. Cara kerja pengukuran kadar klorofil.....	22
Gambar 3.2. Cara kerja pengukuran kadar protein	23
Gambar 4.1. Hasil pengamatan morfologi makroskopik strain-strain <i>Nostoc</i> umur 15 hari yang memiliki pola pertumbuhan menggunung	28
Gambar 4.2. Hasil pengamatan morfologi makroskopik strain-strain <i>Nostoc</i> umur 15 hari yang memiliki pola pertumbuhan menyebar	28
Gambar 4.3. Hasil pengamatan morfologi mikroskopik 13 strain <i>Nostoc</i> umur 15 hari pada medium pada BG11 N-free	32
Gambar 4.4. Perbandingan morfologi makroskopik strain-strain <i>Nostoc</i> pada H ₁ dan H ₇	33
Gambar 4.5. Perbandingan morfologi makroskopik strain TAB7d dan GIA13a pada H ₁ dan H ₇	31
Gambar 4.6. Hasil pengamatan morfologi mikroskopik sembilan strain <i>Nostoc</i> yang tidak mengalami kerusakan setelah proses <i>thawing</i>	37
Gambar 4.7. Hasil pengamatan morfologi mikroskopik pada empat strain <i>Nostoc</i> yang mengalami kerusakan setelah proses <i>thawing</i>	38
Gambar 4.8. Grafik perbandingan kadar klorofil pada 13 strain <i>Nostoc</i> sebelum preservasi, pada H ₁ dan pada H ₇	40
Gambar 4.9. Grafik perbandingan kadar protein pada 13 strain <i>Nostoc</i> sebelum preservasi, pada H ₁ dan pada H ₇	44

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Daftar strain <i>Nostoc</i> koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian	17
Tabel 3.2.	Komposisi medium BG 11 N-free per liter	18
Tabel 4.1.	Hasil pengamatan morfologi makroskopik 13 strain <i>Nostoc</i> koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI umur 15 hari pada medium pada BG11 N-free	29
Tabel 4.2.	Hasil pengamatan morfologi mikroskopik 13 strain <i>Nostoc</i> koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI umur 15 hari pada medium pada BG11 N-free	30
Tabel 4.3.	Hasil pengukuran diameter dan kecepatan pertumbuhan pada strain <i>Nostoc</i> H ₁	34
Tabel 4.4.	Hasil pengukuran diameter dan kecepatan pertumbuhan pada strain <i>Nostoc</i> H ₇	35
Tabel 4.5.	Rerata kadar klorofil pada strain-strain <i>Nostoc</i> pada H ₀ , H ₁ , dan H ₇ (mg/ml)	40
Tabel 4.6.	Rerata kadar klorofil pada strain-strain <i>Nostoc</i> pada H ₀ , H ₁ , dan H ₇ (Ng/μl)	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian.....	51
Lampiran 2. Panduan warna Castell-Polychromos No.9216.....	52



BAB 1 PENDAHULUAN

Nostoc merupakan Cyanobacteria yang bermanfaat bagi manusia dan sering digunakan dalam berbagai macam industri. *Nostoc* memiliki berbagai macam substansi kimia seperti pigmen, vitamin dan enzim yang bermanfaat bagi manusia. *Nostoc* juga mengandung banyak polisakarida, lipid, dan asam lemak. Beberapa jenis *Nostoc* dapat digunakan sebagai bahan makanan dan suplemen tubuh, karena mengandung komposisi protein yang tinggi dan dapat dicerna dengan baik (Thajuddin & Subramanian 2005: 53). Contoh, *Nostoc commune* dapat digunakan untuk mengurangi peradangan, luka bakar, dapat menurunkan kadar kolesterol, dapat meningkatkan daya tahan tubuh, serta dapat digunakan juga sebagai agen penyubur tanah (*biofertilizer*) (Vaishampayan *dkk.* 2001: 457; Nilsson *dkk.* 2002: 518).

Penggunaan *Nostoc* dalam berbagai macam industri menuntut perlunya dilakukan konservasi. Konservasi merupakan usaha yang dilakukan manusia dalam melindungi, memelihara, dan memanfaatkan sumberdaya alam secara berkelanjutan untuk generasi manusia saat ini dan yang akan datang (Krishnamurthy 2003: 106). Secara umum, konservasi terbagi menjadi dua, yaitu konservasi *in situ* dan *ex situ*. Konservasi *in situ* merupakan usaha pemeliharaan spesies di dalam habitat atau ekosistem aslinya, sebagai contoh pemeliharaan variasi genetik pada habitat atau ekosistem asli alga tersebut. Konservasi *ex situ* merupakan pemeliharaan spesies di luar habitat atau ekosistem aslinya, seperti preservasi sampel alga sebagai koleksi hidup (koleksi biakan) atau preservasi dalam bentuk spora, kista (*cyst*), DNA atau pada kondisi artifisial khusus lainnya (Watanabe 2005: 422--423).

Preservasi merupakan metode penyimpanan yang bertujuan untuk menjaga agar biakan tetap hidup dan ciri-ciri genetiknya tetap stabil. Preservasi perlu dilakukan dalam upaya konservasi biodiversitas, sehingga keberadaannya tetap tersedia ketika diperlukan (Machmud 2001: 24). Preservasi pada mikroorganisme dapat dilakukan dengan berbagai metode, yaitu metode subkultur berkala,

penyimpanan dalam minyak mineral atau parafin cair, pengeringan (*drying*), metode kering beku (*freeze-drying*), pembekuan (*freezing*), dan kriopreservasi (Thakur 2009: 38).

Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI memiliki koleksi *Nostoc indigenus* Indonesia yang berasal dari tanah persawahan beberapa daerah di Indonesia, yaitu daerah Jawa, Bali, dan Sulawesi Selatan. Strain-strain *Nostoc* tersebut dipreservasi secara *ex situ* dengan metode subkultur atau transfer secara berkala. Metode subkultur umumnya digunakan apabila jumlah kultur dipreservasi dalam skala kecil, namun metode subkultur memiliki banyak kelemahan, seperti membutuhkan banyak waktu, tempat, dan biaya apabila dikerjakan dalam skala besar dan jangka waktu yang lama (Day & Brand 2005: 166). Kultur yang dipreservasi dengan metode subkultur juga rentan terhadap resiko kehilangan stabilitas genetik akibat mutasi (Mori *dkk.* 2002: 45). Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan usaha untuk menggunakan metode lain yang lebih efektif dan efisien untuk preservasi strain-strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI.

Metode yang dapat digunakan untuk menggantikan preservasi dengan metode subkultur adalah metode *freezing*. *Freezing* adalah metode penyimpanan sel pada suhu rendah. Prinsip metode *freezing* adalah menurunkan suhu sehingga cairan di dalam sel membeku dan metabolisme sel terhenti. Suhu yang digunakan dalam *freezing* berkisar antara suhu 0°C hingga suhu -196°C (kriopreservasi). *Freezing* memiliki banyak kelebihan dalam hal waktu, biaya, dan tempat penyimpanan dibandingkan dengan metode preservasi lainnya. Kultur yang dipreservasi dengan metode *freezing* juga memiliki resiko yang lebih kecil untuk kehilangan stabilitas genetik akibat mutasi dan seleksi dibandingkan dengan metode subkultur (Day & Brand 2005: 166).

Watanabe dan Sawaguchi (lihat Mori *dkk.* 2002: 46) melaporkan bahwa *freezing* merupakan metode yang paling efektif bagi preservasi *Microcystis aeruginosa*. Hasil penelitiannya menyatakan bahwa $\geq 50\%$ viabilitas dicapai ketika 5 strain *M. aeruginosa* dipreservasi dengan menggunakan DMSO 3% dan disimpan pada suhu -196°C dalam *liquid nitrogen*. Mahakhant *dkk.* (2008: 2--4) melaporkan bahwa metode *freezing* pada suhu -85°C dengan konsentrasi DMSO

5% telah berhasil digunakan untuk preservasi strain Cyanobacteria koleksi Algal Culture Collection (ACC) MIRCEN, Thailand, selama satu (1) hari dan delapan belas (18) bulan. Sebanyak 46 dari 47 strain atau 97,9% strain Cyanobacteria mampu bertahan hidup setelah satu hari preservasi dan 45 dari 47 strain atau 95,7% strain Cyanobacteria mampu bertahan hidup setelah 18 bulan preservasi.

Salah satu kelemahan metode *freezing* adalah membutuhkan peralatan yang mahal, seperti *deep freezer* dan nitrogen cair. Hal tersebut dapat diatasi dengan penggunaan *freezer* konvensional bersuhu -4°C . Penggunaan metode *freezing* dengan menggunakan *freezer* konvensional pada suhu -4°C telah berhasil dilakukan oleh Murjito (2010) dan Nabila (2010) untuk preservasi 20 strain khamir koleksi UICC (*University of Indonesia Culture Collection*) selama 14 hari. Hasil penelitian membuktikan bahwa sebanyak 61% strain khamir yang dipreservasi dengan metode tersebut memiliki daya viabilitas yang tinggi.

Tujuan utama dari preservasi dengan metode *freezing* adalah menyimpan organisme tanpa terjadi perubahan morfologi, fisiologis, biokimia, dan properti genetik (Taylor & Fletcher 1999: 481). Penelitian mengenai pengaruh metode *freezing* terhadap karakter fisiologis mikroalga pernah dilakukan oleh Haystead dkk. pada tahun 1970 (*lihat* Dubois & Kapusta 1983: 773). Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa metode *freezing* yang dilakukan selama 12 jam pada suhu 0°C mampu menurunkan kadar enzim nitrogenase yang terdapat pada *Anabaena cylindrica*. Penurunan enzim nitrogenase terjadi sebanyak 61,7% dibandingkan dengan kontrol yang disimpan dalam suhu 20°C .

Selain nitrogenase, karakter fisiologis lain yang dapat digunakan untuk mengukur keberhasilan preservasi *Nostoc* adalah kadar klorofil dan protein yang terdapat pada isolat pasca *freezing*. Klorofil merupakan pigmen fotosintetik primer yang berperan penting dalam penyerapan energi cahaya pada proses fotosintesis. Sedangkan protein pada *Nostoc* berfungsi sebagai penyusun struktur sel dan enzim (Brock & Madigan 1991: 34).

Hingga saat ini, penelitian mengenai pengaruh metode *freezing* (-4°C) terhadap kadar klorofil dan protein pada strain *Nostoc* di Indonesia belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan metode *freezing* terhadap kadar klorofil dan protein pada strain-strain

Nostoc koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI perlu dilakukan.

Hipotesis pada penelitian adalah preservasi dengan metode *freezing* (-4°C) tidak mempengaruhi kadar klorofil dan kadar protein yang terdapat pada strain-strain *Nostoc*, dan setiap strain memiliki respon yang berbeda terhadap metode *freezing*. Hal tersebut berarti strain-strain *Nostoc* tidak mengalami perubahan kadar klorofil dan kadar protein setelah proses preservasi dengan metode *freezing* pada suhu -4°C menggunakan *freezer* konvensional. Metode *freezing* (-4°C) dengan menggunakan *freezer* konvensional diharapkan dapat diaplikasikan dan dimanfaatkan secara berkelanjutan dalam bidang akademik, industri, kesehatan, dan lain-lain.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet et Flauhalt 1886

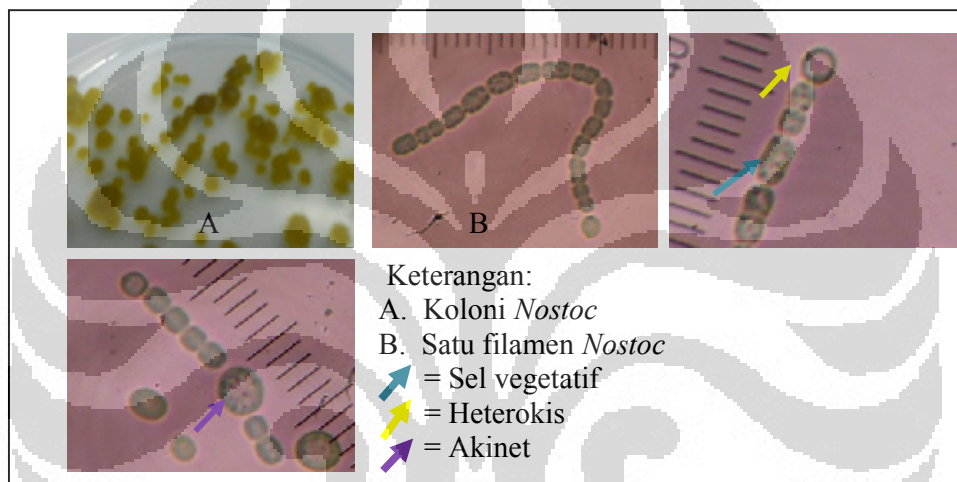
Nostoc merupakan salah satu genus dari filum Cyanobacteria yang termasuk dalam kelas Cyanophyceae, ordo Nostocales dan famili Nostocaceae. Berdasarkan karakter morfologi, filum Cyanobacteria dikelompokkan ke dalam empat ordo, yaitu Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, dan Stigonematales. Ordo Chroococcales terdiri atas Cyanobacteria berbentuk sel tunggal. Ordo Oscillatoriales terdiri atas Cyanobacteria berbentuk filamen, tetapi tidak dapat membentuk sel heterokis. Ordo Nostocales memiliki bentuk filamen lurus dan dapat membentuk sel heterokis. Ordo Stigonematales memiliki bentuk filamen bercabang dan dapat membentuk sel heterokis. (Whitton 2002: 29).

Perbedaan morfologi utama antara *Nostoc* dan beberapa genus lain dalam ordo Nostocales adalah pada bentuk filamen dan letak sel heterokis. *Calothrix*, *Tolypothrix*, dan *Gleotrichia* memiliki filamen dengan percabangan semu dan memiliki sel heterokis yang terletak di bagian bawah (basal) filamen. Beberapa spesies *Scytonema* dan *Calothrix* diketahui pula memiliki sel heterokis yang terletak pada bagian interkalar filamen. Karakter morfologi dari *Cylindrospermum* dan *Cylindrospermopsis* adalah dua sel heterokis yang terletak pada ujung filamen (Whitton 2002: 90--116), sedangkan karakter morfologi yang ditunjukkan oleh *Nostoc* adalah filamen tidak bercabang dengan satu sel heterokis yang umumnya terletak pada bagian ujung filamen (Graham & Wilcox 2000: 128--131).

Karakter morfologi makroskopis suatu organisme yang umumnya diamati adalah selaput lendir, tekstur, warna koloni, profil koloni, dan bentuk koloni. Karakter morfologi mikroskopis yang diamati adalah letak, ukuran dan bentuk sel vegetatif, sel heterokis, serta sel akinet (Robertson *dkk.* 2001: 861). Secara makroskopik karakter yang dimiliki *Nostoc* adalah koloni terlihat seperti jeli yang dapat berbentuk bola atau tidak beraturan. *Nostoc* memiliki tekstur permukaan

yang kasar atau licin dengan kisaran warna dari hijau tua hingga kehitaman dan hijau kekuningan hingga cokelat (Vashista 1978: 47; Potts 2000: 469).

Koloni *Nostoc* terbentuk dari kumpulan filamen yang direkatkan oleh selaput gelatin. Satu filamen *Nostoc* terdiri dari satu trikom yang diselubungi oleh selaput gelatin. Trikom merupakan sederetan sel dari beberapa sel vegetatif yang berbentuk bulat atau oval. Sel vegetatif penyusun trikom dapat berdiferensiasi menjadi struktur sel khusus yang dinamakan heterokis dan akinet. Heterokis pada *Nostoc* umumnya terletak di bagian ujung filamen (terminal) (Vashishta 1999: 38; Whitton 2002: 105).



Gambar 2.1 Gambar struktur makroskopis dan mikroskopis *Nostoc*

Heterokis merupakan sel khusus yang berfungsi untuk fiksasi nitrogen pada lingkungan aerobik (Graham & Wilcox 2000: 117--118). Heterokis dapat dibedakan dari sel vegetatif, karena ukuran heterokis lebih besar. Selain itu, heterokis berwarna hijau pucat sehingga tampak seperti sel kosong. Heterokis dapat terletak di antara sel vegetatif (interkalar) atau pada bagian ujung filamen (terminal). Jumlah heterokis pada satu filamen dapat satu atau lebih (Vashishta 1999: 39).

Selain heterokis, sel vegetatif dapat berdiferensiasi membentuk akinet. Akinet berasal dari sel vegetatif yang membesar dan dipenuhi cadangan makanan (granula cyanophysin). Akinet umumnya dibentuk saat kondisi lingkungan tidak menguntungkan seperti saat terjadi kekeringan (Vashista 1999: 40). Akinet dapat

dibedakan dari sel vegetatif, karena ukuran yang lebih besar, warna lebih gelap, dan dinding sel akinet lebih tebal (Bold & Wynne 1985: 44; Vashishta 1999: 24).

Nostoc dapat melakukan reproduksi dengan pembentukan akinet. Setelah periode dormansi, akinet bergerminasi dan berkembang menjadi sel-sel vegetatif yang membentuk trikoma dan dilapisi selaput gelatin sehingga menjadi filamen baru. Reproduksi *Nostoc* juga dapat terjadi melalui heterokis yang bergerminasi membentuk filamen baru. *Nostoc* juga dapat melakukan reproduksi dengan melakukan fragmentasi filamen. Patahan dari fragmentasi filamen disebut hormogonia. Hormogonia yang terbentuk akan memisah dan membentuk selaput gelatin sehingga terbentuk filamen baru. Sel terminal dari hormogonia kemudian akan berdiferensiasi membentuk heterokis yang akan menjadi filamen baru (Vashishta 1999: 40).

2.2 METODE PRESERVASI

Secara umum, metode preservasi mikroorganisme dapat dibagi menjadi dua macam yaitu, metode preservasi jangka pendek dan metode preservasi jangka panjang. Metode preservasi jangka pendek dapat dilakukan dengan subkultur atau transfer berkala, dan metode *mineral oil storage* atau penyimpanan dalam mineral minyak. Metode tersebut merupakan metode yang mempertahankan metabolisme mikroorganisme dapat tetap aktif. Metode preservasi jangka panjang dapat dilakukan dengan pengeringan (*drying*), metode kering beku (*freeze drying*) atau liofilisasi, *freezing* dan kriopreservasi. Metode tersebut merupakan metode yang membuat metabolisme mikroorganisme menjadi tidak aktif (Thakur 2009: 38).

2.2.1 Metode subkultur

Metode subkultur merupakan metode peremajaan mikroorganisme yang paling sering digunakan pada banyak kultur koleksi. Metode subkultur adalah metode yang paling sederhana, mudah, tidak memerlukan peralatan khusus, murah, dan dapat digunakan secara luas bagi berbagai jenis mikroorganisme. Metode subkultur umum dilakukan apabila jumlah biakan mikroorganisme yang

harus diremajakan tidak terlalu banyak atau dalam skala kecil (Gandjar & Oetari 2006: 171; Day & Brand 2005: 166).

Prinsip utama metode subkultur adalah memindahkan sel mikroorganisme dari sejumlah besar koloni. Kesuksesan metode subkultur dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya jenis medium pertumbuhan yang digunakan, interval transfer, dan suhu inkubasi yang sesuai. Interval transfer berbeda-beda bagi setiap mikroorganisme, mulai hitungan hari hingga tahun (Thakur 2009: 38).

Metode subkultur memiliki beberapa kelemahan, seperti membutuhkan banyak waktu, dan tempat apabila dikerjakan dalam skala besar dan jangka waktu lama. Kultur yang dipreservasi dengan metode subkultur juga rentan terhadap resiko kehilangan stabilitas genetik akibat mutasi dan seleksi (Mori *dkk.* 2000: 45; Day & Brand 2005: 166). Andirisonanti (2009: 43) melaporkan bahwa subkultur yang dilakukan berulang kali diduga menyebabkan perubahan karakter morfologi *Nostoc sp.* BAD036 dan *Pseudanabaena catenata* CIT005 koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Nonvaskular Departemen Biologi FMIPA UI.

2.2.2. Metode *mineral oil storage*

Metode *mineral oil storage* merupakan metode sederhana untuk memelihara biakan mikroorganisme. Metode tersebut dilakukan dengan cara menumbuhkan mikroorganisme dalam tabung agar miring lalu ditutup dengan minyak mineral atau parafin cair steril. Prinsip dasar metode *mineral oil storage* adalah menciptakan lingkungan yang anaerob sehingga dapat meminimalisasi metabolisme mikroorganisme. Metode *mineral oil storage* memiliki keuntungan dan kelemahan yang sama dengan metode subkultur, yaitu ekonomis, mudah, tidak membutuhkan perlengkapan khusus yang mahal, dapat mencegah kerusakan medium akibat terjadinya dehidrasi, serta dapat diaplikasikan pada berbagai jenis mikroorganisme, namun rentan terhadap resiko kontaminasi dan perubahan karakter morfologi, fisiologi, serta genetik (Thakur 2009: 39).

2.2.3. Metode *freeze-drying*

Metode *freeze-drying* dapat digunakan untuk preservasi bakteri, khamir, dan spora fungi (Nagai *dkk.* 2005: 19). Prinsip metode *freeze drying* adalah pengeringan suspensi sel dari fase cair dengan cara sublimasi dengan melalui proses pembekuan terlebih dahulu. Kelemahan metode *freeze-drying* adalah teknik pengerjaan yang kompleks, waktu pengerjaan lama, tidak dapat digunakan untuk mempreservasi mikroorganisme yang sensitif terhadap kondisi lembab dan suhu rendah, serta memerlukan peralatan yang cukup mahal. (Bjerketorp *dkk.* 2006: 2).

2.2.4. Metode *freezing*

Freezing merupakan metode penyimpanan sel pada suhu rendah. Suhu yang digunakan pada *freezing* berkisar antara suhu 0°C hingga suhu -196°C (Bozkurt 2005: 63). Tujuan utama dari preservasi dengan metode *freezing* adalah menyimpan organisme tanpa terjadi perubahan morfologi, fisiologis, biokimia, dan properti genetik (Taylor & Fletcher 1999: 481). Prinsip utama *freezing* adalah mengatur perpindahan atau difusi air yang melewati membran sel melalui proses dehidrasi (keluarnya air dari dalam sel) dan rehidrasi (masuknya air ke dalam sel) (Brockbank *dkk.* 2007: 1).

Simione (1998:1) menyatakan bahwa proses dehidrasi terjadi ketika sampel dibekukan, sedangkan proses rehidrasi terjadi ketika sampel dicairkan (*thawing*). Ketika sampel dibekukan, air di dalam sel akan keluar disebabkan lingkungan luar sel yang bersifat hipertonis akibat penambahan larutan protektan. Air yang keluar tersebut selanjutnya akan berubah menjadi kristal es ekstraselular, kemudian protektan masuk ke dalam sel dan menggantikan cairan intraselular (Simione 1998:1). Proses *thawing* menyebabkan terjadinya pencairan kristal es ekstraselular. Lingkungan luar sel berubah menjadi hipotonis sehingga air akan masuk kembali ke dalam sel dan menggantikan protektan yang keluar dari dalam sel (Simione 1998: 1).

Proses *freezing* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain umur kultur, protektan, dan pencairan (*thawing*) (Day & Brand 2005: 171). Kultur alga yang digunakan umumnya adalah kultur yang berada pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Sel alga yang tumbuh secara eksponensial secara umum lebih tahan terhadap pembekuan dan memiliki daya viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang berada pada fase stasioner atau sel yang tumbuh pada kondisi yang penuh tekanan (Day & Brand 2005: 173). Protektan yang digunakan juga dapat berpengaruh pada keberhasilan *freezing*. Protektan adalah senyawa kimia yang dapat melindungi sel dari pengaruh faktor perusak, terutama pembentukan kristal es intraseluler dan ekstraseluler, selama proses *freezing* (Doneva & Donev 2004: 22). Selain hal tersebut, *thawing* atau proses pencairan kembali sel yang telah dibekukan juga dapat memengaruhi keberhasilan metode *freezing*.

Proses *thawing* dapat dilakukan pada suhu ruangan (37° C) atau pada suhu tertentu pada *water bath* (Simione 1998: 6). Laju pencairan (*thawing rate*) pada proses *thawing* harus disesuaikan dengan laju pembekuan. Apabila laju pembekuan cepat, maka laju pencairan juga harus cepat. Laju pencairan cepat dilakukan untuk mencegah air yang berasal dari proses pencairan kristal es ekstraseluler mengalir cepat ke dalam sel, sehingga sel menggembung kemudian lisis karena tekanan intraseluler yang besar. Laju pencairan cepat juga berguna untuk meminimalisasi pembentukan kembali kristal es (*refreezing*) (Day & Brand 2005: 182).

2.3 PROTEKTAN

Protektan adalah suatu senyawa kimia yang berfungsi untuk menjaga viabilitas, ciri morfologi, biokimia, taksonomi, dan properti genetik sel selama preservasi. Protektan harus memiliki sifat tidak beracun atau *non toxic*. Selain hal tersebut, protektan juga harus memiliki solubilitas air yang baik dan dapat berikatan dengan air membentuk larutan koligatif. Protektan juga harus dapat menstabilisasi ikatan hidrogen pada cairan di dalam maupun luar sel sehingga

mencegah pembentukan kristal es yang semakin besar (Doneva & Donev 2004: 22).

Protektan digolongkan menjadi dua macam berdasarkan kemampuannya dalam menembus membran sel, yaitu protektan intraseluler dan protektan ekstraseluler. Protektan intraseluler, yaitu protektan yang dapat menembus membran sel sehingga keadaan antara cairan di luar sel dan cairan di dalam sel homogen atau seimbang. Contoh protektan intraseluler adalah dimetil sulfoksida (DMSO), gliserol, metanol, dan etilen glikol (Tambunan & Mariska 2003: 14; Day & Brand 2005: 173; Liu 2009: 12). Protektan ekstraseluler adalah zat protektan yang sulit menembus membran sel karena memiliki ukuran molekul yang relatif besar (≥ 340 dalton). Contohnya polivinilpirolidon (PVP), polimer seperti gula, sukrosa, manitol, sorbitol, dan polietilen glikol (PEG) (Tambunan & Mariska 2003: 14; Doneva & Donev 2004: 23; Day & Brand 2005: 174).

Protektan merupakan zat yang memiliki banyak peran selama proses *freezing*. Protektan dapat melindungi sel dari dehidrasi dan mencegah terjadinya kematian sel. Protektan dapat bekerja efektif apabila dapat penetrasi ke dalam sel dan menghambat terjadinya pembekuan intraseluler. DMSO merupakan zat krioprotektan yang umum digunakan dalam metode *freezing* karena DMSO dapat melakukan penetrasi ke dalam sel yang akan dikriopreservasi (Simione 1998: 2).

2.4. KANDUNGAN PIGMEN DAN PROTEIN PADA CYANOBACTERIA

Cyanobacteria dapat berfotosintesis karena memiliki pigmen fotosintetik. Secara umum, terdapat tiga kelompok pigmen fotosintetik yang terdapat pada alga, yaitu klorofil, fikobilin, dan karotenoid. Klorofil alga yang sudah diketahui adalah klorofil a, b, c, dan d. Kelompok Cyanobacteria, termasuk *Nostoc* sp. hanya memiliki klorofil a. Klorofil a pada Cyanobacteria terdapat di permukaan membran tilakoid (Meeks 1974: 161; Graham & Wilcox 2000: 106--108).

Klorofil merupakan pigmen fotosintetik primer yang berperan penting dalam penyerapan energi cahaya pada proses fotosintesis. Hasil fotosintesis adalah glukosa. Proses respirasi akan mengurai glukosa tersebut menjadi energi dalam bentuk Adenosin Tri Phospat (ATP). Energi dari molekul ATP berperan

penting dalam metabolisme sel yang menunjang pertumbuhan dan perbanyakan sel. Hal tersebut disebabkan energi dari ATP digunakan untuk menyintesis senyawa seperti lemak dan asam amino yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perbanyakan sel (Alberts *dkk.* 1994: 96; Clegg & Mackean 2000: 262). Oleh karena itu, klorofil berperan penting untuk pertumbuhan organisme fotosintetik termasuk *Nostoc*.

Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi sintesis klorofil, yaitu faktor genetika, cahaya, nutrisi, dan suhu. Sintesis pigmen termasuk klorofil diatur oleh gen yang terdapat pada Cyanobacteria. Cahaya berpengaruh pada sintesis klorofil karena pada tahap perubahan *protochlorophyllide* menjadi *chlorophyllide a* diperlukan energi cahaya. Nutrien berupa Mg adalah pembentuk struktur klorofil, sedangkan Fe berperan dalam sintesis asam δ -aminolevulinic sehingga keduanya diperlukan untuk sintesis klorofil, sedangkan suhu yang optimum untuk sintesis klorofil adalah 26--30°C (Bildwel 1974: 233; Dwidjoseputro 1983: 16--17).

Selain klorofil, Cyanobacteria memiliki pigmen aksesori sebagai pigmen fotosintetik sekunder (Meeks 1974: 161). Contohnya fikobilin dan karotenoid. Fikobilin dan karotenoid memungkinkan Cyanobacteria dapat menyerap energi cahaya dengan kisaran panjang gelombang yang lebih lebar dan tidak dapat ditangkap oleh klorofil a, kemudian mentransfer energi tersebut ke klorofil a (Graham & Wilcox 2000: 108; Colyer *dkk.* 2005: 560).

Selain pigmen, kandungan yang terdapat pada sel Cyanobacteria adalah protein. Protein disusun dari rangkaian dasar 20 asam amino yang berikatan kovalen dalam urutan tertentu. Berdasarkan fungsinya, protein dibagi menjadi dua kelompok, yaitu protein struktural dan protein fungsional (Brock & Madigan 1991: 34).

Protein struktural adalah protein yang berfungsi menyusun struktur sel. Protein struktural pada Cyanobacteria terdapat pada protein yang menyusun dinding sel dan membran sel. Protein struktural juga membentuk fikobilisom yang terdapat pada permukaan tilakoid. Selain itu, kompleks protein-klorofil a dan karotenoid pada Cyanobacteria dibentuk oleh protein struktural (Colyer *dkk.* 2005: 560).

Selain protein struktural, Cyanobacteria juga memiliki protein fungsional. Protein fungsional adalah protein yang berfungsi sebagai enzim (Brock & Madigan 1991: 34). Contoh enzim yang terdapat pada *Nostoc* adalah enzim DNase, phosphatase, dan protease (Brock & Madigan 1991: 34; Colyer *dkk.* 2005: 566 & 567).

Protein yang terdapat pada Cyanobacteria berasal dari sintesis protein. Sintesis protein secara umum terdiri dari dua tahap, yaitu transkripsi dan translasi. Pada tahap transkripsi terjadi pembentukan *messenger* RNA (mRNA) berdasarkan urutan basa nitrogen yang terdapat pada DNA cetak. Rantai mRNA yang terbentuk dari tahap transkripsi akan berikatan dengan ribosom. Tahap selanjutnya adalah translasi rantai kodon mRNA oleh *transfer* RNA (tRNA) menjadi asam amino yang terjadi di ribosom. Ribosom berfungsi sebagai katalis pada pembentukan ikatan peptida antara asam amino baru dengan ujung karboksil dari polipeptida yang sedang terbentuk. Gabungan polipeptida akan membentuk protein (Campbell *dkk.* 2002: 326--330).

2.5. PENGUKURAN KADAR KLOOROFIL

Pengukuran kadar klorofil pada Cyanobacteria dapat dilakukan dengan cara mengekstraksi klorofil alga tersebut. Klorofil adalah pigmen yang larut dalam lemak sehingga klorofil dapat diekstraksi dari membran tilakoid dengan menggunakan pelarut organik. Contoh pelarut organik adalah aseton dan metanol. Prinsip ekstraksi pigmen adalah dengan mengganggu integritas sel sehingga molekul pigmen dapat keluar dari membran sel. Setelah ekstraksi, pigmen dapat dipisahkan dan diukur dengan menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Thin Layer Chromatography* (TLC), atau metode spektrofotometri (Meeks 1974: 161--162; Jensen *dkk.* 2001: 61).

Metode yang umum untuk mengukur kadar pigmen klorofil adalah metode spektrofotometri. Metode spektrofotometri dilakukan dengan pengukuran kandungan klorofil hasil ekstraksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Kadar klorofil diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi dari hasil spektrofotometri ke rumus Arnon:

Klorofil a (mg/l) = $12,7 D_{663 \text{ nm}} - 2,69 D_{645 \text{ nm}}$
 (Meeks 1974: 161--162).

2.6. PENGUKURAN KADAR PROTEIN

Pengukuran kadar protein pada Cyanobacteria dapat dilakukan dengan metode Biuret atau metode Lowry (Becker 1994: 177). Prinsip metode Biuret adalah reaksi ikatan peptida pada protein dan CuSO_4 alkaline pada reagen yang akan membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Produk senyawa kompleks yang dihasilkan tergantung dari kadar protein yang terdapat dalam sampel yang diukur. Semakin tinggi kadar protein yang terdapat pada sampel semakin banyak produk senyawa kompleks yang dihasilkan. Prinsip kerja metode Lowry hampir sama dengan metode Biuret, namun metode Lowry menggunakan reagen kedua setelah CuSO_4 alkaline, yaitu Folin Ciocalteu. Ikatan peptida protein akan bereaksi dengan ion tembaga (Cu^{2+}) pada suasana alkalin untuk menghasilkan ion Cu^+ yang kemudian akan bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu. Reaksi tersebut menimbulkan perubahan warna menjadi biru yang intensitasnya tergantung dari kandungan protein sampel (Waterborg tth: 1; Boyer 1986: 55 & 57).

Metode Biuret memiliki kelebihan utama berupa cara kerja yang praktis dan cepat, namun kadar protein sampel terendah yang dapat diukur oleh metode Biuret hanya berkisar 1 mg. Metode Lowry memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi, karena dapat mendeteksi kadar protein sampai di bawah 5 μg . Oleh karena itu, metode Lowry lebih banyak digunakan (Boyer 1986: 55 & 57).

Metode Bradford diketahui memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dari metode Lowry. Prinsip kerja metode Bradford adalah pewarnaan protein yang berdasarkan pada pengukuran absorbansi. Pengikatan protein oleh *dye commassie* (komponen reagen Bradford) menyebabkan perubahan warna dari pewarna merah *commassie* ke pewarna biru *commassie*. Selama pembentukan kompleks ikatan protein, terjadi pelepasan elektron bebas dari zat warna merah *commassie* yang memengaruhi lapisan hidrofobik protein. Lapisan hidrofobik tersebut mengikat wilayah non-polar dari zat warna melalui gaya *van der Waals* sehingga posisi amina positif tertarik pada ion negatif dari zat pewarna tersebut.

Pengikatan protein juga diperkuat oleh interaksi ionik antar kedua muatan. Pengikatan protein menyebabkan zat pewarna biru *commasie* pada reagen *Bradford* menjadi stabil. Jumlah ikatan protein dan zat pewarna yang terbentuk adalah ukuran untuk menentukan konsentrasi protein dengan membaca absorbansinya (Caprette 1995: 1--2).

Panjang gelombang yang digunakan untuk pengukuran protein dengan metode Bradford adalah 595 nm. Hal tersebut dikarenakan panjang gelombang 595 nm absorbansi sebanding dengan pewarna yang terikat pada protein. Oleh karena itu, kadar protein pun menjadi sebanding dengan absorbansi jika diukur menggunakan kurva standar (Caprette 1995: 1--2).

Kurva larutan standar yang menjadi acuan dalam pernghitungan kadar protein pada sampel dibentuk dari nilai absorbansi pada larutan *Bovine Serum Albumine* (BSA). Larutan BSA merupakan senyawa protein dengan nilai konsentrasi yang telah diketahui. Berdasarkan nilai absorbansi larutan BSA dapat dibentuk kurva kalibrasi standar dengan persamaan $y = a \pm bx$. Nilai y adalah absorbansi dan x adalah kadar protein yang diukur. Nilai a dan b adalah konstanta yang diperoleh dari persamaan kurva kalibrasi standar yang terbentuk. Kadar protein sampel ditentukan berdasarkan nilai absorbansi sampel dibandingkan kurva kalibrasi standar. Berdasarkan rumus, persamaan yang digunakan untuk menentukan kadar protein (mg/ml) pada filtrat adalah $x = (y \pm b)/a$ (Boyer 1986: 296).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Ruang Kultur Alga, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Laboratorium Genetika Departemen Biologi, dan Laboratorium CoE-IBR GS FMIPA UI, Depok selama lima bulan.

3.2 ALAT DAN BAHAN

3.2.1 ALAT

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan yang umum digunakan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan. Sterilisasi medium dan peralatan plastik dilakukan menggunakan autoklaf [Hirayama], sedangkan sterilisasi peralatan gelas menggunakan oven [Heraeus Instruments]. Alat yang digunakan untuk penanaman koloni adalah jarum tanam bulat (ose), jarum tanam tajam, pembakar spiritus, dan korek api. Proses ekstraksi kadar klorofil dan protein menggunakan peralatan berupa timbangan analitik [Shimadzu Libror AEL-200], *aluminium foil* [Bagus], alu dan mortar, tusuk gigi, tabung Eppendorf 1,5 ml, dan mesin sentrifugasi [Labofuge]. Pembuatan suspensi sel menggunakan peralatan berupa jangka sorong digital [Tekimen], vortex [Thermolyne Tipe Maxi Mix II], mikropipet [Bio Rad & Capp], *Pipet tips* [Axygen], *cryotube* [Iwaki], dan *storage box* [Iwaki]. Proses *freezing* dilakukan dengan menggunakan *freezer* konvensional [Sanyo], sedangkan proses *thawing* dilakukan menggunakan *Water Bath*. Spektrofotometer [Optima sp-3000 plus] digunakan untuk mengukur kadar klorofil, dan untuk pengukuran kadar protein digunakan Nanodrop 1000 spektrofotometer [Thermo-scientific]. Mikroskop [Olympus] digunakan untuk pengamatan mikroskopik strain-strain *Nostoc*, dan seluruh dokumentasi difoto menggunakan kamera digital [Canon].

3.2.2 BAHAN

3.2.2.1 Strain *Nostoc*

Strain yang digunakan pada penelitian adalah 13 strain *Nostoc* koleksi kultur alga (*Alga Culture Collection*) Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI yang berasal dari Jawa Barat, Bali, dan Sumatera Selatan, yaitu CPG8, CPG24, CPR31, BAD5-02, CIG10, CIM7, TAB7d, GIA12-02, GIA12-03, GIA13a, BTM6-01, BTM6-02, dan TAK23.

Tabel 3.1. Daftar strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian

No.	Genus	Kode strain	Asal Isolat
1	<i>Nostoc</i> sp.	CPG8	Tanah persawahan, Ciptagelar, Jawa Barat
2	<i>Nostoc</i> sp.	CPG24	Tanah persawahan, Ciptagelar, Jawa Barat
3	<i>Nostoc</i> sp.	CPR31	Tanah persawahan, Ciptarasa, Jawa Barat
4	<i>Nostoc</i> sp.	BAD5-02	Tanah persawahan, Baduy, Jawa Barat
5	<i>Nostoc</i> sp.	CIG10	Tanah persawahan, Cigombong, Jawa Barat
6	<i>Nostoc</i> sp.	CIM7	Tanah persawahan, Cimelati, Jawa Barat
7	<i>Nostoc</i> sp.	TAB7d	Tanah persawahan, Tabanan, Bali
8	<i>Nostoc</i> sp.	GIA12-02	Tanah persawahan, Gianyar, Bali
9	<i>Nostoc</i> sp.	GIA12-03	Tanah persawahan, Gianyar, Bali
10	<i>Nostoc</i> sp.	GIA13a	Tanah persawahan, Gianyar, Bali
11	<i>Nostoc</i> sp.	BTM6-01	Tanah persawahan, Bantimurung, Sulawesi Selatan
12	<i>Nostoc</i> sp.	BTM6-02	Tanah persawahan, Bantimurung, Sulawesi Selatan
13	<i>Nostoc</i> sp.	TAK23	Tanah persawahan, Takallar, Sulawesi Selatan

3.2.2.2 Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian terdiri atas medium *Blue Green* 11 (BG-11) bebas unsur Nitrogen (*N-free*), baik cair maupun padat. Medium cair BG-11 *N-free* digunakan sebagai pelarut bagi larutan krioprotektan, sedangkan medium padat BG-11 *N-free* digunakan untuk medium tumbuh strain *Nostoc*.

3.2.2.3 Bahan kimia

Bahan yang digunakan sebagai protektan strain *Nostoc* pada saat *freezing* adalah DMSO 100% [Merck]. Bahan yang digunakan untuk pengukuran kadar klorofil adalah aseton *pure* GR 85%. Bahan yang digunakan untuk pengukuran

kadar protein adalah *reagent bradford quick assays*, dan larutan Bovine Serum Albumine (BSA) 100 ppm. Bahan habis pakai lain yang menjadi penunjang penelitian adalah akuades steril, alkohol 70%, kapas, kertas Ph 5,2 --7,2 [Merck], label tempel, parafilm [Novix-II], spiritus, dan bahan kimia lain yang digunakan dalam pembuatan medium BG 11 N-free.

Tabel 3.2. Komposisi medium BG 11 N-Free per liter

Zat Kimia	Komposisi (gram)
K ₂ HPO ₄	0,040
MgSO ₄	0,075
CaCL ₂	0,036
Asam sitrat	0,006
Ferric Ammonium Sitrat	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,020
Larutan A ₅ (dalam 100 ml terdiri dari:)	1 ml
H ₃ BO ₃	0,286
MnCL ₂	0,181
ZnSO ₄	0,022
NaMoO ₄	0,039
CuSO ₄	0,0079
Cu(NO ₃) ₂	0,00494
Akuades	
*Agar (medium agar)	20

[Sumber: Kim & Lee 2005: 241]

3.3 CARA KERJA

Skema alur kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan gelas yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Cawan petri, pipet tetes, dan pipet volumetrik dibungkus dengan menggunakan kertas pembungkus. Mulut labu Erlenmeyer, gelas ukur, dan *beaker glass* ditutup rapat dengan menggunakan aluminium foil, lalu dilapisi dengan kertas pembungkus. Peralatan gelas tersebut kemudian disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 110°C selama 2 jam.

Cryotube dimasukkan ke dalam toples gelas (*glass jar*). Mulut toples kemudian ditutup rapat dengan menggunakan aluminium foil, lalu dilapisi dengan kertas pembungkus. *Storage box* dan pipet *tips* dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan ditutup rapat. Peralatan tersebut kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.2 Pembuatan Medium

3.3.2.1 Medium BG 11 bebas unsur nitrogen (BG 11 *N-free*)

Medium cair BG 11 *N-free* dibuat dari sejumlah bahan kimia tanpa unsur nitrogen berdasarkan modifikasi Kim & Lee (2005: 241). Komposisi bahan kimia yang digunakan untuk membuat medium (tabel 3.2) ditimbang menggunakan timbangan analitik lalu dilarutkan dalam sejumlah akuades. Volume akuades kemudian ditambahkan hingga mencapai volume akhir 1.000 ml. pH medium diukur dengan menggunakan kertas indikator pH dengan skala 5,2--7,4. Larutan NaOH 1 M ditambahkan ke dalam medium hingga pH medium mencapai 7,2. Medium diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen, selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium padat BG 11 *N-free* dibuat dengan cara menambahkan 20 g bubuk *bacto agar* ke dalam satu liter medium cair BG 11 *N-free* yang telah dipanaskan (Watanabe 2005: 19). Medium kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen, dan ditunggu hingga sedikit mendidih. Medium lalu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium agar BG 11 *N-free* yang telah steril didinginkan hingga mencapai suhu 50--60°C. Sebanyak 20 ml medium BG 11 *N-free* kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri steril dan medium dibiarkan mengeras (Hoshaw & Rosowski 1979: 58). Setelah mengeras, cawan petri yang telah berisi medium agar dibalik dan medium dapat digunakan.

3.3.2.2 Protektan untuk metode *freezing*

Protektan yang digunakan pada penelitian adalah dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 5%. Sebanyak 5 ml larutan DMSO 100% steril dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer lalu ditambahkan medium cair BG 11 N-*free* steril hingga volume total larutan menjadi sebesar 100 ml. Medium kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen.

3.3.3 Perbanyak koloni, pembuatan *stock*, dan *working culture*

Tujuan perbanyak jumlah koloni adalah mendapatkan jumlah koloni *Nostoc* yang cukup untuk digunakan pada saat pengambilan data. Perbanyak jumlah koloni dilakukan dengan cara menginokulasikan 13 strain *Nostoc* yang sudah murni ke 13 cawan petri yang berbeda (satu koloni *Nostoc* untuk satu cawan petri). Koloni *Nostoc* diambil dengan menggunakan jarum tanam bulat (*ose*) steril, lalu digoreskan pada medium padat BG 11 N-*free*. Sel-sel *Nostoc* akan tumbuh di sepanjang goresan dan tumbuh menjadi koloni tunggal *Nostoc* yang murni.

Sebelum menggores, jarum tanam bulat dibakar terlebih dahulu dan didinginkan sebelum menyentuh biakan. Setelah koloni selesai di-*streak*, cawan petri kemudian ditutup. Nama strain *Nostoc* dan tanggal perbanyak koloni ditulis pada tutup cawan petri dengan menggunakan spidol. Setelah itu, sekeliling cawan petri direkatkan dengan *parafilm*. Koloni *Nostoc* yang tumbuh pada cawan petri dijadikan sebagai *stock culture* dan *working culture*.

Seluruh cawan petri berisi koloni strain *Nostoc* tersebut kemudian diinkubasi selama 15 hari pada rak kultur di Ruang Kultur Alga Departemen Biologi FMIPA UI. Suhu inkubasi yang digunakan adalah 23°C. Pencahayaan berasal dari lampu neon dengan intensitas cahaya 3000 luks ($600 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

3.3.4 Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis strain-strain *Nostoc* sebelum *freezing*

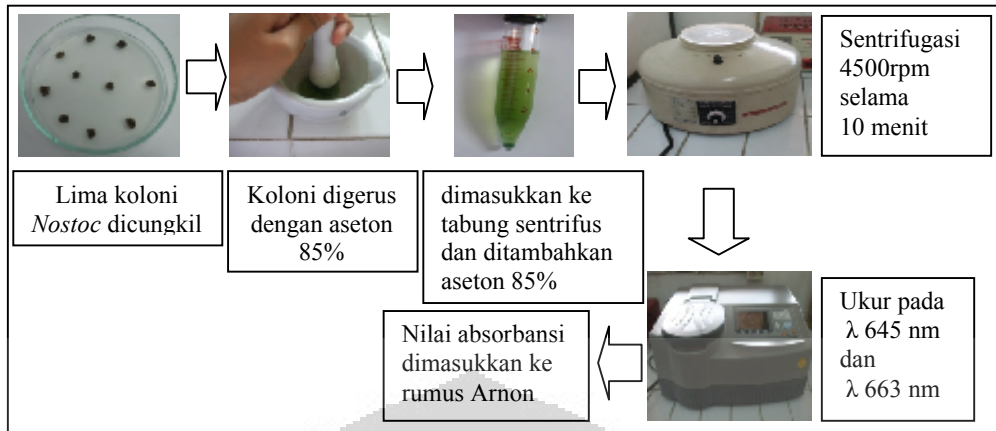
Koloni *Nostoc* yang ditumbuhkan dalam medium padat BG 11 N-free dan telah berumur 15 hari diamati. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati karakter *Nostoc*, antara lain warna koloni, bentuk koloni, tekstur permukaan koloni, dan pola pertumbuhan koloni. Setiap isolat difoto dan dicatat karakter morfologinya.

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati sel vegetatif, sel heterokis, dan sel akinet bila ada. Koloni *Nostoc* yang tumbuh pada medium padat BG 11 N-free dicungkil dengan tusuk gigi steril, dan diletakkan di atas gelas objek (*object glass*). Sebanyak 1--2 tetes akuades diteteskan pada gelas objek. Koloni tersebut kemudian diurai dengan menggunakan tusuk gigi hingga filamen *Nostoc* terpisah-pisah. Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*). Pengamatan morfologi mikroskopis filamen *Nostoc* dilakukan pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya.

3.3.5 Pengukuran kadar klorofil pada strain-strain *Nostoc* sebelum *freezing*

Lima koloni *Nostoc* berumur 15 hari yang akan diukur kadar klorofilnya dicungkil dengan tusuk gigi. Kelima koloni tersebut lalu diletakkan di *aluminium foil* dan ditimbang untuk menyamakan berat pada setiap strain yang digunakan, yaitu 100 mg. Koloni *Nostoc* kemudian dimasukkan ke mortar dan dihancurkan menggunakan alu dengan pelarut aseton *pure* GR 85%. Hasil penggerusan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan aseton ditambahkan sampai volume total larutan dalam tabung sentrifus 6 ml (*lihat* Sinaga 2009: 24--25).

Tabung lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit. Kandungan klorofil pada supernatan lalu diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Pengambilan data dilakukan dengan satu kali ulangan. Nilai absorbansi dari hasil spektrofotometri lalu dimasukkan ke rumus Arnon: Klorofil a (mg/l) = $12,7 D_{663 \text{ nm}} - 2,69 D_{645 \text{ nm}}$ (Meeks 1974: 161--162; Jensen 1978: 61).



Gambar 3.1 Cara kerja pengukuran kadar klorofil

3.3.6 Pengukuran kadar protein sebelum *freezing*

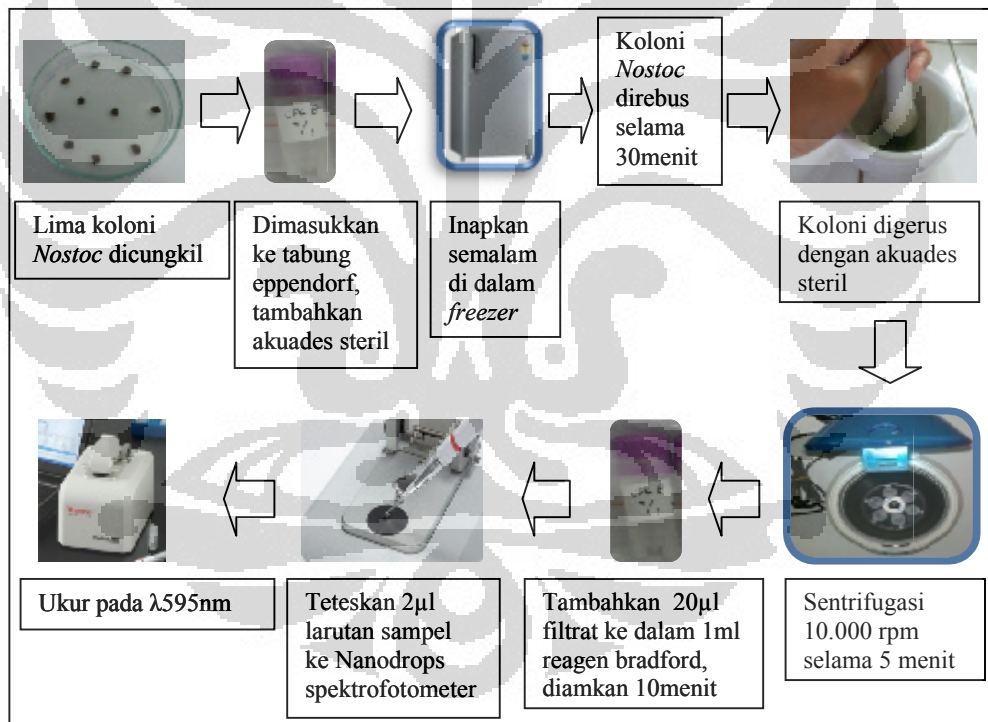
Pengukuran kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode *bradford*. Sebanyak lima koloni *Nostoc* berumur 15 hari yang akan diukur kadar proteinnya dicungkil dengan tusuk gigi. Kelima koloni tersebut lalu ditimbang hingga semua strain memiliki berat yang sama, yaitu 100 mg. Koloni tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan akuades steril hingga volume akuades dalam tabung Eppendorf mencapai 1 ml. Tabung Eppendorf diberi label nama strain lalu diinkubasi selama satu hari dalam *freezer*.

Tabung Eppendorf berisi koloni *Nostoc* yang telah diinapkan kemudian direbus selama 30 menit terhitung sejak air mendidih. Setelah perebusan, biomassa koloni dipindahkan ke mortar dan dihancurkan dengan alu. Pelarut yang digunakan untuk penggerusan adalah akuades steril sebanyak 2 ml. Hasil penggerusan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 20 μ l filtrat dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 7--19. Tabung 1 berisi akuades steril yang digunakan sebagai blanko. Tabung 2--8 adalah tabung yang berisi larutan standar BSA dengan konsentrasi pada masing-masing tabung sebesar 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1 mg, 1,5 mg, dan 2 mg. Nilai absorbansi pada tabung 2--8 digunakan untuk membentuk kurva kalibrasi standar. Volume sampel, larutan BSA, dan reagen Bradford yang ditambahkan adalah sebagai berikut:

Zat	Blanko	Larutan standar					Sampel
Tabung	1	2	3	4	5	6	7--...
Akuades steril (μl)	20	-	-	-	-	-	-
BSA (μl)	-	20	20	20	20	20	-
Filtrat <i>Nostoc</i> (μl)	-	-	-	-	-	-	20
Reagen Bradford (μl)	100	100	100	100	100	100	100
Volume total reaksi	120	120	120	120	120	120	120

Setelah ditambahkan reagen bradford, larutan diaduk sampai homogen lalu didiamkan selama 10 menit. Kandungan protein pada filtrat kemudian diukur dengan spektrofotometer Nanodrop pada panjang gelombang 595 nm (Caprette 1995: 1--2). Pengukuran kadar protein dilakukan sebanyak dua kali.



Gambar 3.2 Cara kerja pengukuran kadar protein

Larutan reagen Bradford dapat diperoleh dengan mencampurkan 100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* dalam 50 ml etanol 95% dan 100 ml 85% (w/v) asam fosfat, lalu ditambahkan dengan akuades steril hingga volumenya mencapai 1 L. Larutan tersebut kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam wadah gelap

lalu disimpan dalam suhu 4° C (Caprette 1995: 1--2). Larutan BSA 100 ppm diperoleh dengan mencampur 45,5 µl BSA 22% dengan akuades hingga volumenya mencapai 100 ml (*lihat Sinaga 2009: 24--25*).

3.3.7 Persiapan suspensi sel untuk preservasi dengan metode *freezing*

Sebanyak sepuluh (10) koloni strain *Nostoc* berumur 15 hari yang tumbuh pada *working culture* diambil dengan menggunakan jarum tanam tajam. Koloni yang diambil tersebut memiliki kisaran diameter yang sama, yaitu 1,10--1,20 mm. Koloni *Nostoc* tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *cryotube* steril berukuran 2 ml yang telah diberi label.

Perlakuan dilakukan dengan menambahkan 0,5 ml medium protektan (DMSO 5%) ke dalam *cryotube* yang telah berisi 10 koloni *Nostoc*, kemudian dihomogenkan dengan vorteks. *Cryotube* yang telah berisi suspensi sel dan protektan ditutup dan direkatkan dengan *parafilm*. Kontrol dibuat menggunakan 0,5 ml medium cair BG 11 N-free tanpa protektan yang dimasukkan ke dalam *cryotube* yang telah berisi 10 koloni *Nostoc*, dan dihomogenkan dengan vorteks. Selanjutnya, *cryotube* diletakkan dalam *storage box*.

3.3.8 Ekuilibrasi dan Pembekuan (*freezing*)

Proses ekuilibrasi dilakukan berdasarkan Mori *dkk.* (2002: 49). Ekuilibrasi dilakukan dengan cara menyimpan *cryotube* pada temperatur ruang selama 15 menit. Proses yang dilakukan setelah ekuilibrasi adalah pembekuan (*freezing*). Proses pembekuan (*freezing*) dilakukan dengan menyimpan *cryotube* pada *freezer* konvensional dengan suhu -4°C selama satu (H₁) dan tujuh hari (H₇).

3.3.9 Pencairan (*thawing*)

Pencairan dilakukan berdasarkan Kuzmina (2004: 3), dengan merendam *cryotube* ke dalam water bath (suhu 37° C) selama 5 menit. Seluruh permukaan

cryotube kemudian dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% untuk meminimalisasi terjadinya kontaminasi (Simione 1998: 6).

3.3.10 Pengamatan morfologi strain *Nostoc* secara mikroskopis setelah pencairan (*thawing*)

Satu koloni *Nostoc* pada *cryotube* dicungkil dengan menggunakan tusuk gigi, dan diletakkan di atas gelas objek (*object glass*). Sebanyak 1--2 tetes akuades diteteskan pada gelas objek. Koloni tersebut kemudian diurai dengan menggunakan tusuk gigi hingga filamen *Nostoc* terpisah-pisah. Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*). Sebanyak sepuluh (10) filamen *Nostoc* yang terpisah dan tidak bertumpuk diamati. Pengamatan mikroskopis *Nostoc* dilakukan pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya. Filamen *Nostoc* yang terlihat diamati, dicatat karakter morfologinya, dan difoto kemudian dibandingkan dengan isolat *Nostoc* sebelum mengalami proses *freezing*.

3.3.11 Penyucian suspensi sel pascapreservasi

Penyucian suspensi sel pascapreservasi bertujuan untuk menghilangkan residu DMSO dan meminimalisasi resiko paparan DMSO terhadap sel (Simione 1998: 6). *Cryotube* yang berisi suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Sebanyak 0,5 ml medium cair BG 11 N-*free* ditambahkan ke dalam tabung yang berisi pelet. Tabung tersebut lalu disentrifugasi kembali. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Pekerjaan tersebut diulangi sebanyak tiga kali.

3.3.12 Penanaman kembali strain *Nostoc* setelah satu hari preservasi (H₁) dan tujuh hari preservasi (H₇)

Evaluasi pertumbuhan strain *Nostoc* pasca preservasi dilakukan dengan menghitung penambahan diameter koloni setelah dikulturkan kembali dengan

metode tanam. Koloni *Nostoc* diambil dari *cryotube* dengan menggunakan jarum tanam tajam steril kemudian ditanam pada cawan petri berisi medium padat BG 11 N-free. Pada setiap cawan petri ditanam masing-masing sepuluh (10) koloni *Nostoc*. Setelah itu, cawan petri ditutup dan pada tutup dituliskan nama strain dan tanggal penanaman strain dengan menggunakan spidol. Sekeliling cawan petri kemudian direkatkan dengan parafilm lalu diinkubasi selama 15 hari pada suhu 23°C.

3.3.13 Pengukuran kadar klorofil dan protein setelah *freezing*

Strain-strain yang digunakan adalah strain-strain *Nostoc* yang berhasil ditumbuhkan kembali setelah preservasi. Tahapan pengerjaan yang dilakukan sama dengan pengerjaan pada pengukuran kadar klorofil dan protein sebelum preservasi.

3.4. PENYUSUNAN DAN ANALISIS DATA

Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel. Analisis data dilakukan dengan analisis deskriptif kualitatif dan deskriptif kuantitatif. Data kualitatif meliputi data pengamatan makroskopik koloni *Nostoc* sebelum preservasi dan setelah *freezing* pada H₁ dan H₇ serta pengamatan mikroskopik strain *Nostoc* sebelum preservasi dan sesudah *thawing*. Data kuantitatif meliputi pengukuran kadar klorofil dan kadar protein yang terdapat pada strain-strain *Nostoc* sebelum preservasi dan sesudah *freezing* pada H₁ dan H₇.

Pengambilan data dilakukan sebanyak dua kali sehingga data yang diperoleh adalah rerata kadar klorofil dan kadar protein pada 13 strain *Nostoc*. Hasil rerata kadar klorofil dan protein pada perlakuan H₁ dan H₇ akan digunakan untuk membandingkan kadar klorofil dan protein pada strain-strain *Nostoc* sebelum preservasi. Berdasarkan data yang diperoleh, dapat diketahui apakah metode *freezing* menggunakan *freezer* konvensional pada suhu -4°C dapat mempengaruhi kadar klorofil dan protein yang terdapat pada strain-strain *Nostoc*.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik strain-strain

Nostoc koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI

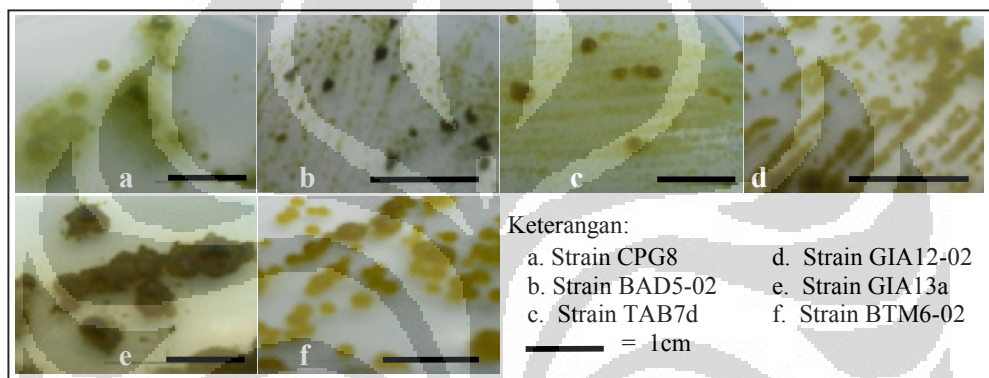
Pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik dilakukan untuk mempelajari karakteristik dari strain-strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian (Tabel 3.1). Karakteristik yang diamati pada pengamatan makroskopik adalah warna koloni, bentuk koloni, tekstur permukaan, dan bentuk pertumbuhan koloni (Robertson *dkk.* 2001: 861). Pengamatan dilakukan pada saat strain *Nostoc* berumur 15 hari pada medium padat BG 11 *N-free* dengan suhu inkubasi 23° C.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi secara makroskopis, strain-strain yang digunakan dalam penelitian memiliki karakter khas yang dimiliki oleh *Nostoc*. Karakter khas tersebut adalah sel-sel pada strain-strain *Nostoc* tergabung menjadi koloni dan diselubungi oleh selaput lendir yang kompak (*firm*). Seluruh strain memiliki bentuk koloni bulat, namun memiliki warna, tekstur permukaan koloni, dan bentuk pertumbuhan koloni yang berbeda-beda (Gambar 4.1, Gambar 4.2, Tabel 4.1). Hasil tersebut menunjukkan kesesuaian dengan literatur yang menyatakan bahwa secara makroskopik, *Nostoc* terlihat seperti koloni berbentuk bola, dan memiliki tekstur permukaan yang kasar atau licin dengan kisaran warna dari hijau tua hingga kehitaman dan hijau kekuningan hingga coklat (Vashishta 1978: 47).

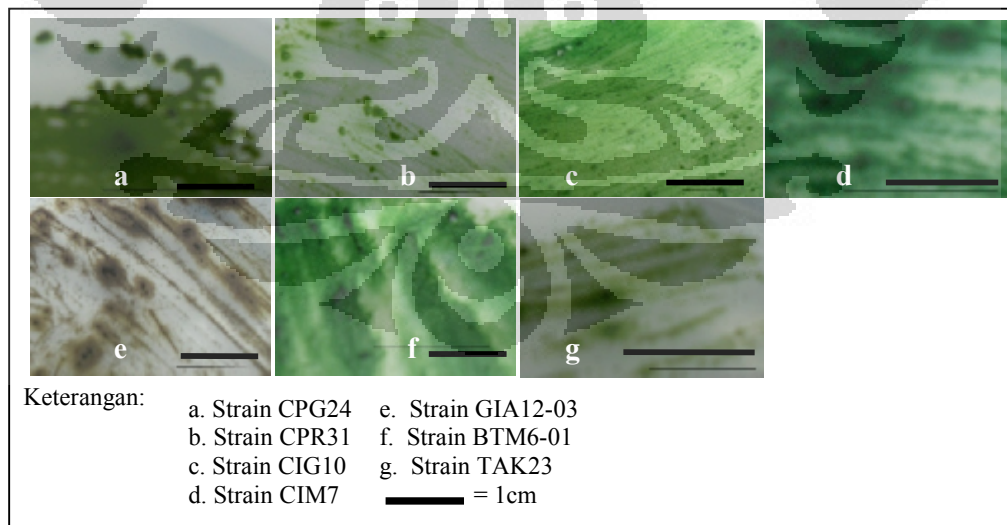
Warna pada strain CPG8, BAD5-02, GIA12-02, GIA12-03, GIA13a, BTM6-02, dan TAB7d adalah hijau zaitun, sedangkan strain CPG24, CPR31, CIG10, CIM7, TAK23, dan BTM6-01 berwarna hijau rumput. Panduan warna yang digunakan untuk menentukan warna pada strain-strain *Nostoc* adalah panduan warna Castell-Polychromos no.9216 (Lampiran 2). Tekstur permukaan koloni yang dimiliki pada strain CPG24, CPR31, CIM7, CIG10, BTM6-01, BTM6-02 dan TAK23 adalah tekstur yang licin dan mengilap. Tekstur

permukaan koloni pada strain CPG8, BAD5-02, GIA12-02, GIA13a, dan TAB7d adalah tekstur yang kasar dan bergranul, sedangkan pada strain GIA12-03 memiliki tekstur permukaan koloni yang kasar, namun tidak bergranul.

Pola pertumbuhan pada strain-strain *Nostoc* terbagi menjadi dua yaitu pola pertumbuhan menggunung dan menyebar. Strain CPG8, BAD5-02, GIA12-02, GIA13a, BTM6-02, dan TAB7d memiliki pola pertumbuhan menggunung. Pola pertumbuhan pada strain CPG24, CPR31, CIM7, CIG10, TAK23, GIA12-03, dan BTM6-01 adalah pola pertumbuhan koloni yang menyebar.



Gambar 4.1 Hasil pengamatan morfologi makroskopik enam strain *Nostoc* umur 15 hari yang memiliki pola pertumbuhan menggunung



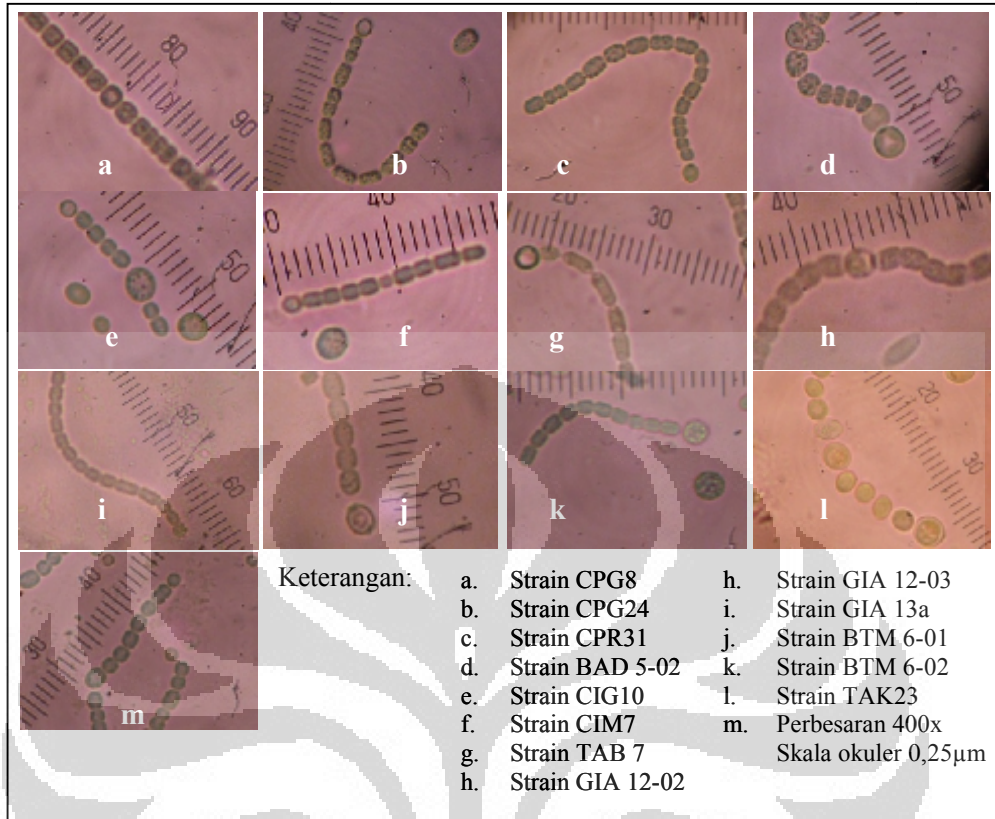
Gambar 4.2 Hasil pengamatan morfologi makroskopik tujuh strain *Nostoc* umur 15 hari yang memiliki pola pertumbuhan menyebar

Tabel 4.1 Hasil pengamatan morfologi makroskopik strain-strain *Nostoc*

No.	Nama strain	Warna koloni	Bentuk Koloni	Tekstur Permukaan Koloni	Bentuk Pertumbuhan Koloni
1	CPG8	Hijau zaitun	Bulat	Kasar dan bergranul	Menggunung
2	CPG24	Hijau rumput	Bulat	Licin dan mengilap	Menyebar
3	CPR31	Hijau rumput	Bulat	Licin dan mengilap	Menyebar
4	BAD5-02	Hijau zaitun	Bulat	Kasar dan bergranul	Menggunung
5	CIG10	Hijau rumput	Bulat	Licin dan mengilap	Menyebar
6	CIM7	Hijau rumput	Bulat	Licin dan mengilap	Menyebar
7	TAB7d	Hijau zaitun	Bulat	Kasar dan bergranul	Menggunung
8	GIA12-02	Hijau zaitun	Bulat	Kasar dan bergranul	Menggunung
9	GIA12-03	Hijau zaitun	Bulat	Kasar	Menyebar
10	GIA13a	Hijau zaitun	Bulat	Kasar dan bergranul	Menggunung
11	BTM6-01	Hijau rumput	Bulat	Licin dan mengilap	Menyebar
12	BTM6-02	Hijau zaitun	Bulat	Licin dan mengilap	Menggunung
13	TAK23	Hijau rumput	Bulat	Licin dan mengilap	Menyebar

Karakteristik yang diamati pada pengamatan mikroskopik adalah bentuk filamen, bentuk sel vegetatif, bentuk dan letak sel heterokis (Robertson *dkk.* 2001: 861). Ciri utama yang dimiliki oleh *Nostoc* adalah bentuk filamen lurus yang tidak bercabang dan memiliki heterokis yang umumnya terletak pada bagian ujung filamen (terminal) (Whitton 2002: 105). Hasil pengamatan (Gambar 4.3, Tabel 4.2) menunjukkan bahwa semua strain memiliki bentuk filamen lurus yang tidak bercabang. Letak heteroki pada hampir semua strain *Nostoc* berada di ujung filamen (terminal), kecuali pada strain CPG8, CIG10, TAK23, GIA12-02, dan GIA12-03, karena sel heterokis dapat terletak di bagian terminal dan interkalar.

Sel vegetatif pada strain CPG24, CIM7, GIA12-02, GIA13a, BTM6-01, TAB7d, dan BTM6-02 berbentuk persegi panjang, sedangkan pada strain CPG8, CPR31, BAD5-02, CIG10, TAK23, dan GIA12-03 berbentuk persegi. Bentuk heterokis yang terdapat pada strain *Nostoc* umumnya bulat, seperti pada strain CPG24, CPR31, BAD5-02, CIM7, TAK23, GIA12-03, dan GIA13a. Bentuk heterokis yang dimiliki oleh strain CPG8, CIG10, GIA12-02, dan TAB7d adalah bulat hingga oval sedangkan bentuk heterokis oval dimiliki oleh strain BTM6-01 dan BTM6-02 (gambar 4.3).



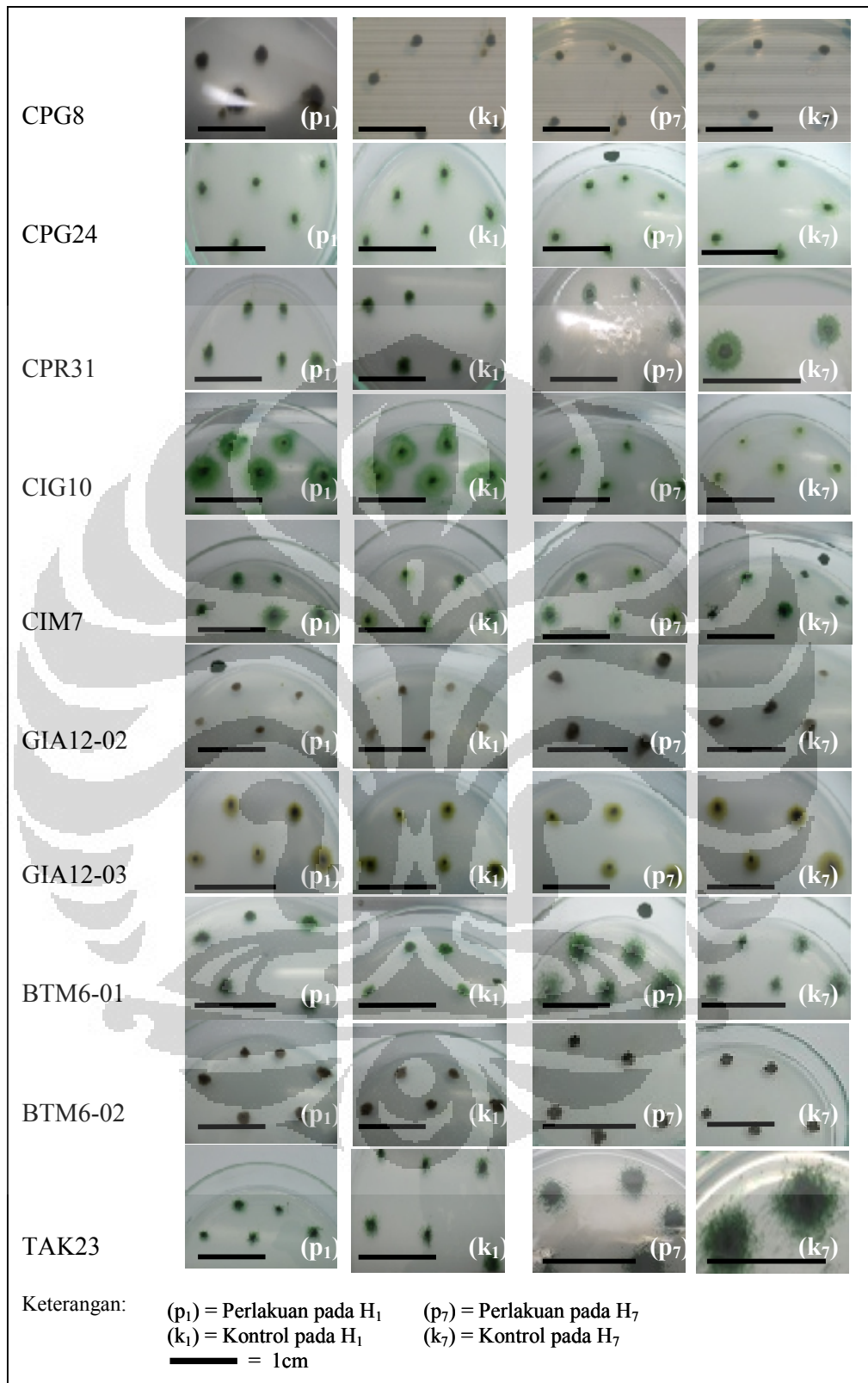
Gambar 4.3 Hasil pengamatan morfologi mikroskopik 13 strain *Nostoc* umur 15 hari pada medium padat BG11 N-free

Tabel 4.2 Hasil pengamatan morfologi mikroskopik strain-strain *Nostoc*

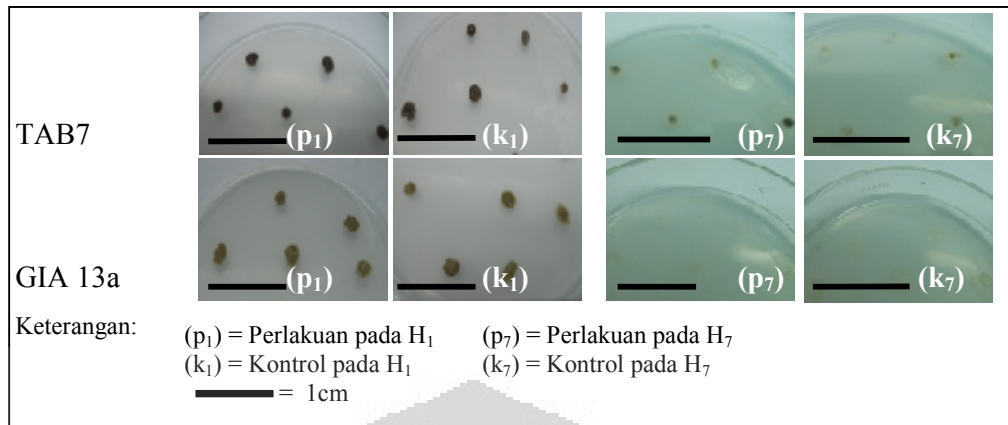
No	Nama strain	Bentuk filamen	Bentuk sel vegetatif	Bentuk heterokist	Letak heterokist
1	CPG8	Tidak bercabang	Persegi	Bulat-oval	Terminal dan interkalar
2	CPG24	Tidak bercabang	Persegi panjang	Bulat	Terminal
3	CPR31	Tidak bercabang	Persegi	Bulat	Terminal
4	BAD5-02	Tidak bercabang	Persegi	Bulat	Terminal
5	CIG10	Tidak bercabang	Persegi	Bulat-oval	Terminal dan interkalar
6	CIM7	Tidak bercabang	Persegi panjang	Bulat	Terminal
7	TAB7d	Tidak bercabang	Persegi panjang	Bulat-oval	Terminal
8	GIA12-02	Tidak bercabang	Persegi panjang	Bulat-oval	Terminal dan interkalar
9	GIA12-03	Tidak bercabang	Persegi	Bulat	Terminal dan interkalar
10	GIA13a	Tidak bercabang	Persegi panjang	Bulat	Terminal
11	BTM6-01	Tidak bercabang	Persegi panjang	Oval	Terminal
12	BTM6-02	Tidak bercabang	Persegi panjang	Oval	Terminal
13	TAK23	Tidak bercabang	Persegi	Bulat	Terminal dan interkalar

4.2 Pengamatan morfologi makroskopik strain-strain *Nostoc* setelah preservasi selama satu hari (H₁) dan tujuh hari (H₇)

Pengamatan makroskopik pada strain-strain *Nostoc* setelah preservasi dilakukan dengan cara mengamati strain *Nostoc* setelah preservasi H₁ dan H₇ yang ditumbuhkan kembali pada medium pada BG11 N-free selama 15 hari pada suhu 23° C. Hasil pengamatan seluruh strain *Nostoc* pada kelompok kontrol dan perlakuan H₁, menunjukkan hasil yang sama dengan karakteristik morfologi pada strain *Nostoc* sebelum preservasi, yaitu tidak terjadi perubahan pada warna koloni, bentuk koloni, dan pola pertumbuhan koloni (Gambar 4.4). Hasil pengamatan strain *Nostoc* pada kelompok kontrol dan perlakuan H₇ menunjukkan sebanyak 11 dari 13 strain (84,6%) memiliki kondisi yang sama dengan kondisi strain *Nostoc* sebelum preservasi, dan 2 dari 13 strain (15,4%) mengalami perubahan kondisi dibandingkan dengan kondisi awal strain sebelum preservasi. Strain-strain tersebut adalah GIA 13a dan TAB7 yang mengalami perubahan warna koloni menjadi pucat hingga bening (Gambar 4.5).



Gambar 4.4 Perbandingan morfologi makroskopik strain-strain *Nostoc* setelah preservasi H₁ dan H₇



Gambar 4.5 Perbandingan morfologi makroskopik strain TAB7 dan GIA 13a setelah preservasi H₁ dan H₇

Perubahan warna koloni, menjadi putih pucat hingga bening, pada strain GIA13a dan TAB7d setelah preservasi H₇ kemungkinan dapat terjadi karena strain-strain tersebut kehilangan pigmen yang terdapat pada sel. Pigmen yang terdapat pada strain *Nostoc* merupakan pigmen fotosintetik, seperti klorofil a. Klorofil merupakan pigmen fotosintetik primer yang berperan penting dalam penyerapan energi cahaya pada proses fotosintesis yang menghasilkan glukosa. Klorofil berperan penting untuk pertumbuhan *Nostoc*, sehingga perubahan warna yang terjadi akibat kehilangan pigmen fotosintetik pada GIA13a dan TAB7d dapat mengarah kepada kematian sel.

Perubahan warna koloni yang terjadi dapat membuktikan bahwa metode *freezing* (-4°C) pada H₇ tidak dapat dilakukan pada strain TAB7d dan GIA13a. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan metode *freezing*, yaitu umur kultur, protektan, dan proses pencairan (*thawing*) (Day & Brand 2005: 171). Umur strain *Nostoc*, zat protektan, dan proses *thawing* yang digunakan dalam penelitian sama, jadi kemungkinan faktor yang membedakan keberhasilan metode *freezing* (-4°C) dalam penelitian adalah perbedaan ketahanan setiap strain pada proses *freezing*.

Apabila dihubungkan dengan karakteristik morfologi makroskopik, strain TAB7d dan GIA13a merupakan strain yang memiliki tekstur permukaan koloni yang kasar. Perbedaan ketebalan selaput lendir pada strain *Nostoc* dapat didukung oleh tekstur permukaan koloni. Tekstur permukaan koloni yang kasar terlihat lebih kering dibanding dengan tekstur permukaan yang licin, sehingga diduga

memiliki selaput lendir yang tipis. Selaput lendir merupakan bagian yang penting untuk melindungi strain-strain *Nostoc* pada proses *freezing*. *Nostoc* memiliki lapisan selaput lendir yang dapat melindungi dinding dan membran sel *Nostoc* terhadap dehidrasi dan rehidrasi akibat kekeringan dan penurunan suhu (Yoshida & Sakamoto 2009: 135). Lapisan selaput lendir yang dimiliki oleh strain-strain *Nostoc* berbeda-beda ketebalannya sehingga kemampuan strain-strain *Nostoc* untuk bertahan pada proses *freezing* juga berbeda.

Pengamatan yang dilakukan selain pengamatan morfologi makroskopik dan mikroskopik adalah melakukan evaluasi pertumbuhan strain *Nostoc* dengan menghitung penambahan diameter koloni. Pengukuran diameter koloni tersebut dilakukan pada t0 dan t15. Hasil pengukuran (Tabel 4.3, Tabel 4.4) kemudian dapat digunakan untuk mengukur kecepatan pertumbuhan strain *Nostoc*.

Tabel 4.3 Hasil pengukuran diameter dan kecepatan pertumbuhan strain *Nostoc* setelah preservasi H₁ (mm)

No	Nama strain	Kontrol			Perlakuan		
		t0 (mm)	t15 (mm)	Kecepatan pertumbuhan (mm/hari)	t0 (mm)	t15 (mm)	Kecepatan pertumbuhan (mm/hari)
1	CPG8	1,242	4,532	0,219	1,282	5,042	0,251
2	CPG24	1,218	1,742	0,035	1,234	2,492	0,084
3	CPR31	1,186	4,292	0,207	1,188	4,598	0,227
4	BAD5-02	1,252	3,446	0,146	1,268	3,592	0,155
5	CIG10	1,164	3,922	0,184	1,148	4,642	0,233
6	CIM7	1,192	2,876	0,112	1,288	3,038	0,117
7	TAB7d	1,246	3,248	0,133	1,232	3,872	0,176
8	GIA12-02	1,268	2,654	0,092	1,228	3,006	0,119
9	GIA12-03	1,116	2,182	0,071	1,128	2,204	0,072
10	GIA13a	1,222	2,902	0,112	1,226	3,036	0,121
11	BTM6-01	1,238	3,476	0,149	1,216	3,604	0,159
12	BTM6-02	1,254	3,914	0,177	1,212	4,214	0,200
13	TAK23	1,498	4,568	0,205	1,174	4,688	0,234

Tabel 4.4 Hasil pengukuran diameter dan kecepatan pertumbuhan strain *Nostoc* setelah preservasi H₇ (mm)

No	Nama Isolat	Kontrol			Perlakuan		
		t0	t15	Kecepatan pertumbuhan (mm/hari)	t0	t15	Kecepatan pertumbuhan (mm/hari)
1	CPG8	1,218	2,668	0,097	1,206	2,888	0,112
2	CPG24	1,142	2,418	0,085	1,196	2,786	0,106
3	CPR31	1,192	2,828	0,109	1,182	2,904	0,115
4	BAD5-02	1,284	3,132	0,123	1,248	3,402	0,144
5	CIG10	1,158	3,192	0,136	1,244	3,866	0,175
6	CIM7	1,188	3,222	0,136	1,216	3,526	0,154
7	TAB7d	1,258	1,558	0,020	1,218	1,796	0,039
8	GIA12-02	1,296	2,726	0,095	1,268	3,036	0,118
9	GIA12-03	1,142	2,634	0,099	1,156	3,046	0,126
10	GIA13a	1,242	1,988	0,050	1,206	2,266	0,071
11	BTM6-01	1,174	3,912	0,183	1,196	4,056	0,191
12	BTM6-02	1,252	4,302	0,203	1,258	5,104	0,256
13	TAK23	1,192	5,496	0,287	1,212	5,832	0,308

Hasil pengukuran diameter koloni pada perlakuan H₁ dan H₇ menunjukkan sebanyak tujuh strain *Nostoc* memiliki diameter koloni yang lebih besar pada H₁ dibandingkan pada H₇, yaitu strain CPG8, CPR31, BAD5-02, CIG10, TAB7d, GIA12-02, dan GIA13a. Strain *Nostoc* CPG24, CIM7, TAK23, GIA12-03, BTM6-01, dan BTM6-02 memiliki diameter koloni pada H₁ yang lebih kecil dibandingkan dengan pada H₇.

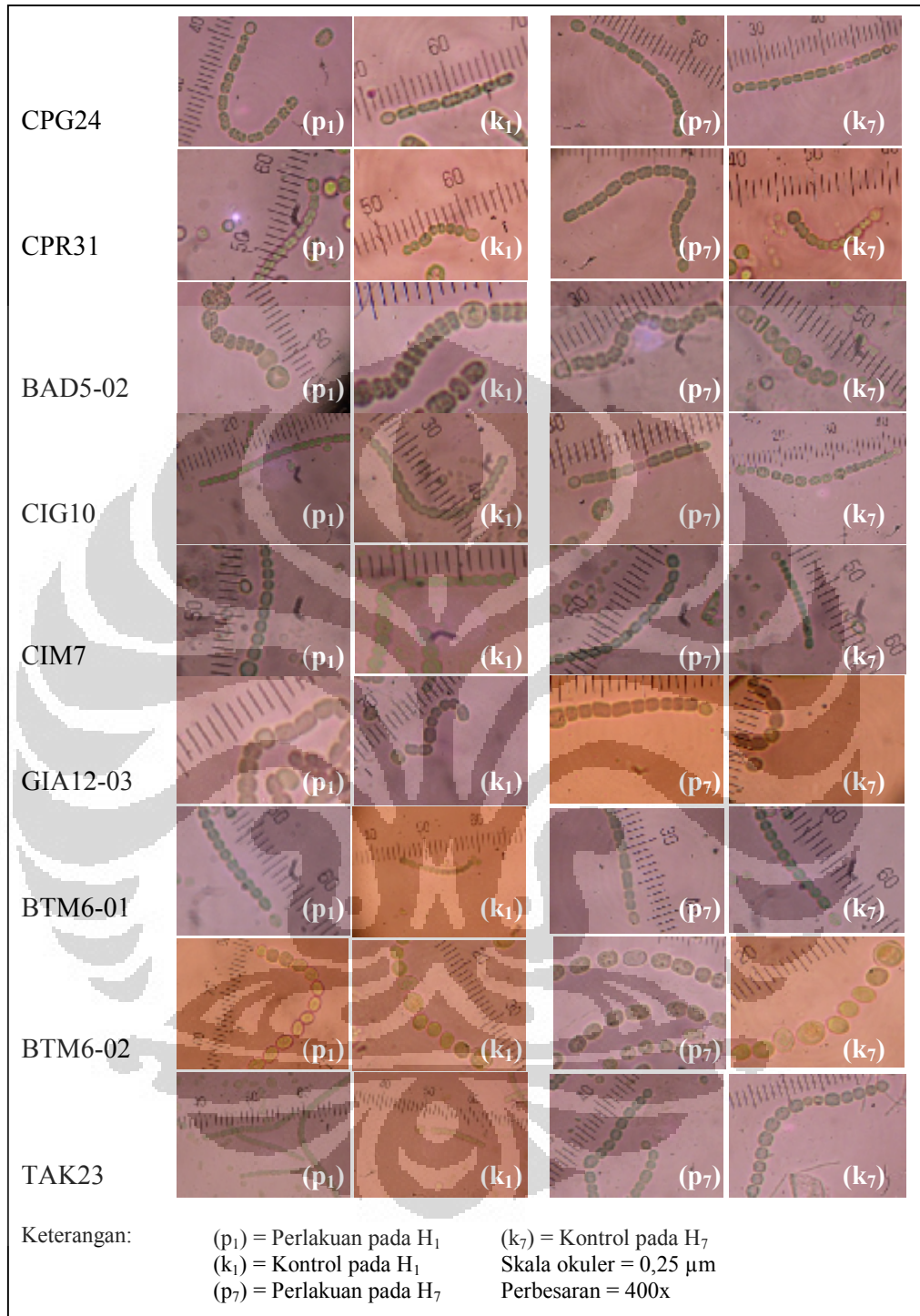
Hasil perbandingan antara kelompok perlakuan dan kontrol menunjukkan bahwa semua strain *Nostoc* pada perlakuan memiliki kecepatan pertumbuhan yang lebih besar dibandingkan pada kontrol. Hasil pengukuran kecepatan pertumbuhan pada strain *Nostoc* kontrol H₁ adalah sebesar 0,035--0,219 mm/hari sedangkan pada perlakuan H₁ adalah sebesar 0,075--0,251 mm/hari. Kisaran kecepatan pertumbuhan pada kontrol H₇ adalah sebesar 0,020—0,287 mm/hari sedangkan pada perlakuan H₇ adalah sebesar 0,038--0,308 mm/hari.

4.3 Pengamatan morfologi mikroskopik strain-strain *Nostoc* setelah preservasi selama satu hari (H₁) dan tujuh hari (H₇)

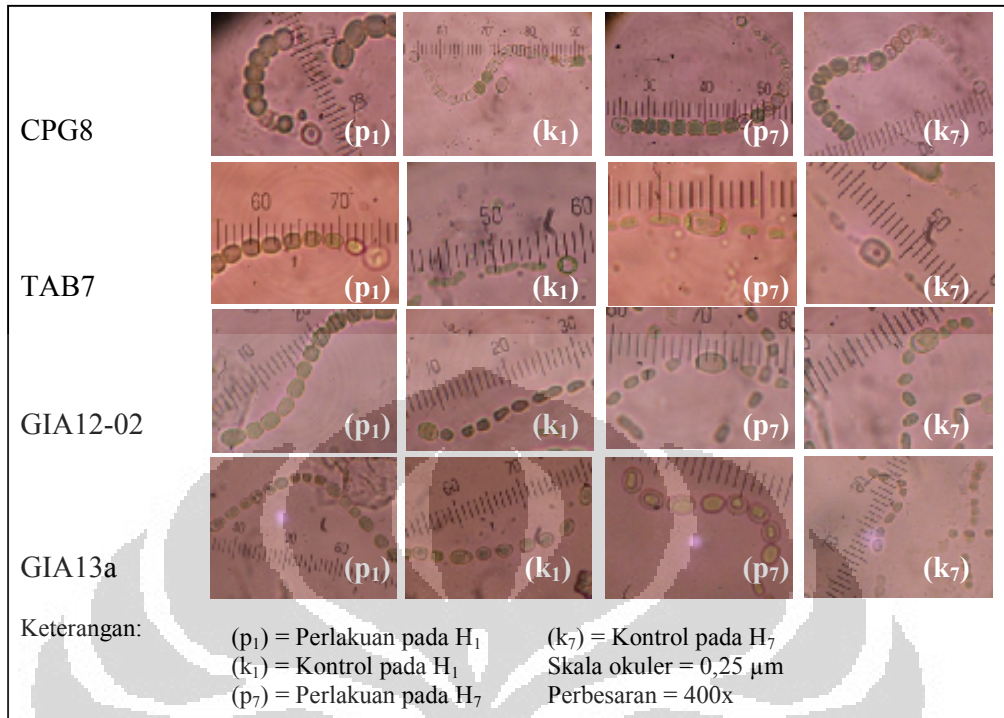
Pengamatan morfologi mikroskopik strain *Nostoc* setelah preservasi dilakukan pada kelompok perlakuan dan kontrol setelah proses pencairan (*thawing*). Pengamatan tersebut dilakukan untuk mengetahui apakah terjadi kerusakan pada sel strain *Nostoc* akibat proses *freezing*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Hasil pengamatan mikroskopik pada strain perlakuan H₁ (Gambar 4.6) menunjukkan bahwa seluruh strain memiliki kondisi yang sama seperti kondisi sel awal sebelum dilakukan preservasi (Gambar 4.3), yaitu tidak terjadi perubahan pada bentuk sel vegetatif, maupun warna sel vegetatif. Hasil pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan H₇ juga umumnya memiliki kondisi yang sama seperti sel awal sebelum dilakukan preservasi. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa umumnya strain-strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian, baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan, mampu bertahan pada proses *freezing* dan *thawing*.

Akan tetapi, hasil pengamatan pada kelompok kontrol H₁ menunjukkan terdapat beberapa strain *Nostoc* yang tidak memiliki kondisi yang sama seperti kondisi sel awal sebelum dilakukan preservasi, yaitu pada strain CPG8, GIA12-02, GIA13a, dan TAB7d (Gambar 4.7). Perubahan yang terjadi pada strain CPG8 berupa perubahan warna menjadi pucat atau bening (*bleaching*). Perubahan pada strain GIA12-02 dan GIA13a berupa perubahan bentuk sel vegetatif menjadi mengembung dan terpisah-pisah, sedangkan strain TAB7d mengalami lisis. Perubahan yang terjadi pada ketiga strain tersebut juga terdapat pada hasil pengamatan pada kelompok perlakuan serta kontrol H₇.



Gambar 4.6 Hasil pengamatan sembilan strain *Nostoc* yang tidak mengalami perubahan morfologi mikroskopik setelah pencairan (*thawing*)



Gambar 4.7 Hasil pengamatan empat strain *Nostoc* yang mengalami perubahan morfologi mikroskopik setelah proses pencairan (*thawing*)

Perubahan morfologi pada strain CPG8, GIA13a, GIA12-02, dan TAB7d dapat terjadi karena beberapa faktor. Faktor pertama adalah kemampuan strain-strain *Nostoc* untuk beradaptasi pada lingkungan bersuhu rendah pada proses *freezing*. Hasil pengamatan morfologi makroskopik menunjukkan bahwa strain CPG8, GIA13a, GIA12-02, dan TAB7d memiliki tekstur permukaan koloni yang kasar dan bergranul. Hal tersebut dapat menunjukkan adanya kemungkinan bahwa strain CPG8, GIA13a, GIA12-02, dan TAB7d memiliki selaput lendir yang tipis sehingga tidak cukup melindungi strain tersebut pada proses *freezing*.

Faktor kedua adalah proses pencairan (*thawing*). Proses *thawing* bertujuan untuk mengeluarkan kristal es ekstraselular yang terbentuk pada proses *freezing* sehingga air dapat masuk kembali ke dalam sel dan menggantikan protektan yang keluar dari dalam sel (Simione 1998: 1). Proses *thawing* pada suhu yang cukup tinggi dapat mengakibatkan kejutan osmotik (*osmotic shock*) yang menyebabkan kematian sel. *Osmotic shock* dapat terjadi karena proses rehidrasi di dalam sel terjadi terlalu cepat sehingga sel menjadi mengembung dan akhirnya pecah (lisis) (Supriyatna & Pasaribu 1992: 133). Fenomena *osmotic shock* tersebut

dapat terlihat pada strain TAB7d, GIA12-02, dan GIA13a pada kelompok kontrol H₁ dan H₇, juga kelompok perlakuan H₇.

Proses *thawing* pada penelitian dilakukan dengan cara merendam *cryotube* ke dalam *waterbath* dengan suhu 37°C selama 5 menit atau hingga kristal es terakhir mencair. Ketahanan strain *Nostoc* pada proses *thawing* yang dilakukan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Pengamatan mikroskopik strain *Nostoc* setelah proses *thawing* menunjukkan bahwa sel vegetatif pada 11 strain *Nostoc* tidak mengalami perubahan. Sedangkan pada strain TAB7d banyak mengalami lisis dan sel vegetatif pada strain GIA13a tampak menggembung dan terpisah-pisah (gambar 4.4). Lisis sel yang terjadi pada strain TAB7d dan perubahan sel vegetatif pada strain GIA13a dapat menjadi penyebab kedua strain tersebut mengalami perubahan yang mengacu ke arah kematian sel pada saat ditumbuhkan kembali setelah preservasi.

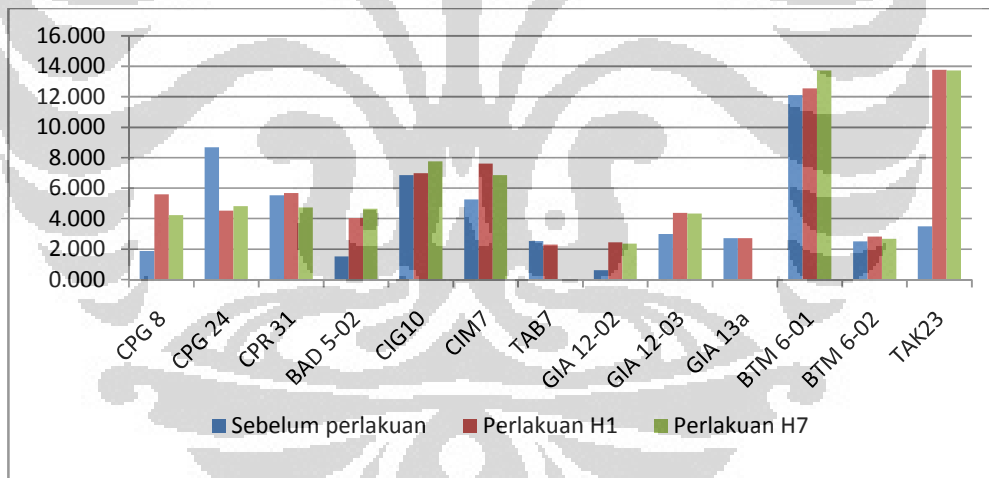
4.4 Pengukuran kadar klorofil strain-strain *Nostoc* sebelum dan sesudah preservasi H₁ dan H₇

Pengukuran kadar klorofil dilakukan dengan mengukur kadar klorofil yang terdapat pada strain *Nostoc* pada saat sebelum preservasi, pada H₁, dan pada H₇ dengan menggunakan metode spektrofotometer. Kadar klorofil strain GIA13a dan TAB7d pada H₇ tidak diukur karena warna koloni pada kedua strain tersebut berubah menjadi putih pucat hingga bening, sehingga kedua strain tersebut tidak digunakan dalam pengukuran kadar klorofil dan kadar protein.

Hasil pengukuran kadar klorofil (Gambar 4.8, Tabel 4.5) menunjukkan bahwa semua strain yang diberi penambahan protektan memiliki kadar klorofil yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar klorofil yang terdapat pada strain kontrol. Kisaran kadar klorofil yang terdapat pada kontrol adalah sebesar 2,150--13,646 mg/ml sedangkan pada perlakuan adalah sebesar 2,289--13,763 mg/ml.

Tabel 4.5 Rerata kadar klorofil pada strain-strain *Nostoc* sebelum preservasi dan setelah preservasi H₁ dan H₇ (mg/g)

No	Nama Isolat	Sebelum preservasi	Preservasi H ₁		Preservasi H ₇	
			Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan
1	CPG8	1,882	5,590	4,563	4,230	4,053
2	CPG24	8,701	4,529	4,260	4,820	4,610
3	CPR31	5,531	5,687	4,493	4,733	4,431
4	BAD5-02	1,523	4,051	3,967	4,640	4,583
5	CIG10	6,846	6,998	6,836	7,765	7,676
6	CIM7	5,251	7,627	7,550	6,861	6,379
7	TAB7d	2,519	2,289	2,280	-	-
8	GIA12-02	0,605	2,4489	2,213	2,363	2,270
9	GIA12-03	2,973	4,380	4,302	4,338	4,292
10	GIA13a	2,732	2,720	2,385	-	-
11	BTM6-01	12,102	12,572	12,269	13,720	13,358
12	BTM6-02	2,506	2,823	2,150	2,669	2,526
13	TAK23	3,505	13,763	13,240	13,734	13,646



Gambar 4.8 Grafik perbandingan kadar klorofil pada 13 strain *Nostoc* sebelum preservasi, pada H₁, dan pada H₇

Perbandingan kadar klorofil pada H₁ dan H₇ dengan kadar klorofil pada strain *Nostoc* sebelum preservasi menunjukkan hasil yang berbeda-beda (gambar 4.8). Sebanyak tiga strain *Nostoc* memiliki kadar klorofil pada H₁ dan H₇ yang lebih rendah dibandingkan dengan kadar klorofil pada sebelum perlakuan. Strain tersebut adalah CPG24, TAB7d, dan GIA13a. Penurunan kadar klorofil yang

terjadi adalah sekitar 0,2--4,4 mg/ml atau 7,32% -- 47,02% dari kadar klorofil awal. Sebanyak 9 strain *Nostoc* memiliki peningkatan kadar klorofil pada H₇ dan H₁ dibandingkan dengan kadar klorofil pada saat sebelum preservasi. Strain-strain tersebut adalah CPG8, BAD5-02, CIG10, CIM7, GIA12-02, GIA12-03, BTM6-01, BTM6-02 dan TAK23. Peningkatan kadar klorofil yang terjadi berkisar antara 0,2--10,3 mg/ml. Kadar klorofil pada strain CPR31 memiliki peningkatan pada H₁ dibandingkan dengan pada saat sebelum preservasi, namun turun kembali pada H₇.

Kenaikan yang terjadi pada kadar klorofil sebelum dan sesudah preservasi kemungkinan dapat terjadi karena proses *freezing* yang terjadi belum cukup maksimal untuk menonaktifkan metabolisme di dalam sel strain-strain *Nostoc*. Hal tersebut menyebabkan sintesis klorofil tetap terjadi selama preservasi, sehingga menyebabkan kenaikan kadar klorofil yang terukur pada strain-strain *Nostoc* sesudah preservasi. Selain itu, *Nostoc* memiliki kemampuan untuk melakukan *freeze-recovery*. Strain *Nostoc* mampu melakukan fotosintesis kembali dengan cepat setelah mengalami desikasi dan *freezing*.

Karakter morfologi pada strain *Nostoc* juga dapat mempengaruhi sintesis klorofil. Strain yang mengalami penurunan kadar klorofil umumnya adalah strain yang memiliki pola pertumbuhan koloni menggunung, yaitu TAB7d dan GIA13a. Luas permukaan pada koloni yang memiliki pola pertumbuhan menggunung lebih kecil dibandingkan dengan yang memiliki pola pertumbuhan menyebar, sehingga pengambilan nutrisi yang terjadi kurang merata. Hasil pengamatan mikroskopik pada strain TAB7d dan GIA13a juga menunjukkan adanya perubahan bentuk pada sel sehingga dapat menyebabkan perubahan pada sintesis klorofil.

Hasil pengukuran kadar klorofil pada strain-strain *Nostoc* menunjukkan perbedaan kadar klorofil yang terdapat pada setiap strain *Nostoc*. Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi sintesis klorofil, yaitu faktor genetik, cahaya, nutrien, dan suhu (Bildwel 1974: 233; Dwidjoseputro 1983: 16--17). Faktor cahaya, nutrien, dan suhu pada saat penelitian dikondisikan sama, sehingga faktor yang dianggap paling berpengaruh terhadap perbedaan kadar klorofil pada strain *Nostoc* dalam penelitian adalah faktor genetik. Jenis strain yang digunakan dalam

penelitian berbeda-beda sehingga masing-masing strain memiliki materi genetik yang berbeda.

Narayan *dkk.* (2006: 948) pernah melakukan pengukuran kadar pigmen, protein terlarut, dan karbohidrat pada 15 strain *Nostoc*. Hasil pengukuran kadar klorofil pada penelitian tersebut berkisar dari 2,9 mg/l sampai 13,8 mg/l. Tiwari *dkk.* juga pernah melakukan pengukuran kadar klorofil pada beberapa strain *Nostoc* yang diisolasi dari daerah di Pokharan, India. Data yang diperoleh juga menunjukkan kadar klorofil yang berbeda pada setiap isolat. Kedua penelitian tersebut menunjukkan perbedaan kadar klorofil menurut jenis strain *Nostoc*.

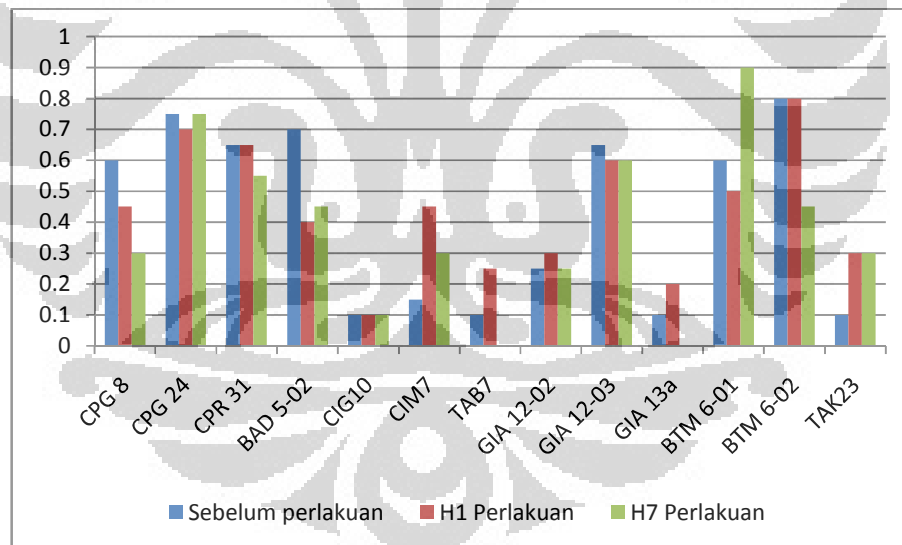
Perbedaan materi genetik mengakibatkan setiap strain memiliki perbedaan metabolisme sintesis klorofil, sehingga kadar klorofil yang terdapat pada setiap strain juga berbeda. Bahan baku sintesis klorofil adalah asam δ -aminolevulinik yang merupakan turunan dari asam amino glutamat. Asam amino glutamat dibentuk dari glutamin (Goodwin & Mercer 1983: 467). Dengan demikian, kadar glutamin berpengaruh pada sintesis klorofil. Glutamin yang terdapat pada sel vegetatif *Nostoc* adalah produk dari fiksasi nitrogen yang berlangsung di heterokis (Kumar 1985: 28--29). Kemampuan isolat *Nostoc* untuk memfiksasi nitrogen berbeda-beda sehingga kadar glutamin yang dihasilkan setiap isolat juga berbeda. Dengan demikian, perbedaan jenis isolat memengaruhi proses sintesis klorofil yang terjadi pada setiap isolat.

4.5 Pengukuran kadar protein strain-strain *Nostoc* sebelum dan sesudah preservasi H₁ dan H₇

Pengukuran kadar protein dilakukan dengan mengukur kadar protein yang terdapat pada strain *Nostoc* pada saat sebelum presevasi, pada H₁, dan pada H₇ dengan menggunakan metode *Bradford*. Strain TAB7d dan GIA13a pada H₇ tidak diukur. Hasil pengukuran kadar protein (Tabel 4.6) menunjukkan bahwa pada semua strain yang diberi penambahan protektan memiliki kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar protein yang terdapat pada strain kontrol. Kisaran kadar protein yang terdapat pada kontrol adalah sebesar 0,1--0,75 ng/ μ l sedangkan pada perlakuan adalah sebesar 0,1--0,9 ng/ μ l.

Tabel 4.6 Rerata kadar protein pada strain-strain *Nostoc* sebelum preservasi, dan sesudah preservasi H₁ dan H₇ (ng/ μ l)

No	Nama Isolat	Sebelum preservasi	Preservasi H ₁		Preservasi H ₇	
			Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan
1	CPG8	0,6	0,45	0,45	0,3	0,3
2	CPG24	0,75	0,55	0,7	0,6	0,75
3	CPR31	0,65	0,6	0,65	0,75	0,55
4	BAD5-02	0,7	0,3	0,4	0,3	0,45
5	CIG10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
6	CIM7	0,15	0,4	0,45	0,2	0,3
7	TAB7d	0,1	0,15	0,25	-	-
8	GIA12-02	0,25	0,2	0,3	0,2	0,25
9	GIA12-03	0,65	0,5	0,6	0,5	0,6
10	GIA13a	0,1	0,15	0,2	-	-
11	BTM6-01	0,6	0,35	0,5	0,7	0,9
12	BTM6-02	0,8	0,75	0,8	0,2	0,45
13	TAK23	0,1	0,1	0,3	0,2	0,3



Gambar 4.9 Grafik perbandingan kadar protein pada strain-strain *Nostoc* sebelum perlakuan, pada perlakuan H₁, dan perlakuan H₇

Hasil perbandingan antara kadar protein pada strain-strain *Nostoc* sebelum preservasi dan sesudah preservasi (Gambar 4.9) menunjukkan bahwa sebanyak lima strain *Nostoc* memiliki penurunan kadar protein setelah preservasi. Strain tersebut adalah CPG8, CPR31, BAD5-02, GIA12-03, dan BTM6-02 dengan

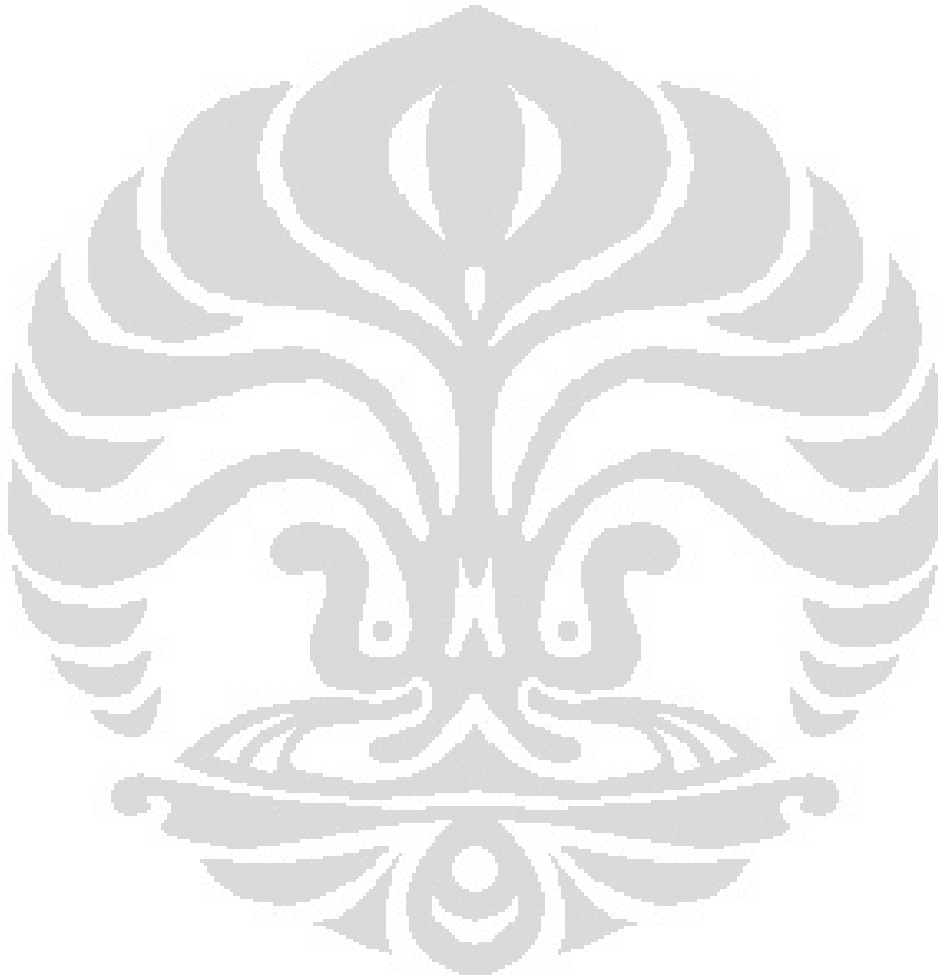
kisaran penurunan sebesar 0,05--0,3 ng/ μ l atau sebesar 7,69%--37,5% dari kadar awal protein. Sebanyak empat strain *Nostoc* memiliki kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan sebelum preservasi. Strain tersebut adalah CIM7, TAK23, TAB7d, dan GIA13a dengan kisaran kenaikan sebesar 0,1--0,2 ng/ μ l. Strain CIG10 memiliki kadar protein yang sama saat sebelum preservasi dan sesudah preservasi, yaitu sebesar 0,1 ng/ μ l.

Kenaikan yang terjadi pada kadar protein sebelum dan sesudah preservasi kemungkinan dapat terjadi karena proses *freezing* yang terjadi belum cukup maksimal untuk menonaktifkan metabolisme di dalam sel strain-strain *Nostoc*. Hal tersebut menyebabkan sintesis protein tetap terjadi selama preservasi, sehingga menyebabkan kenaikan kadar protein yang terukur pada strain-strain *Nostoc* sesudah preservasi. Selain itu, beberapa mikroorganisme memiliki protein khusus yang disebut protein *cold shock*. Protein tersebut terbentuk sebagai mekanisme adaptasi terhadap suhu dingin (Uluzu & Tezcan 2000: 284). Hal tersebut dapat menyebabkan kenaikan pada kadar protein yang terukur pada beberapa strain *Nostoc* setelah preservasi.

Kandungan protein yang terdapat pada Cyanobacteria termasuk *Nostoc* berasal dari sintesis protein. Protein adalah senyawa yang berperan penting untuk pertumbuhan. Menurut Becker (1994: 52), peningkatan kadar protein pada mikroalga termasuk *Nostoc* dapat dijadikan indikator pertumbuhan. Protein dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan fungsi, yaitu protein struktural dan protein fungsional. Protein struktural adalah protein yang berfungsi menyusun struktur sel. Protein fungsional adalah protein yang berfungsi sebagai enzim (Brock & Madigan 1991: 34).

Protein struktural juga membentuk kompleks protein-klorofil a dan karotenoid (Colyer *dkk.* 2005: 560). Strain CIM7, CIG10, GIA12-02, BTM6-01, dan TAK23 memiliki kenaikan kadar klorofil dibandingkan dengan sebelum preservasi. Kenaikan kadar klorofil tersebut juga diikuti oleh kenaikan kadar protein yang terukur pada pengukuran kadar protein strain *Nostoc* setelah *freezing*. Strain CPR31 mengalami kenaikan kadar klorofil dan protein pada H₁ lalu mengalami penurunan kembali pada H₇. Namun demikian, peningkatan kadar klorofil tidak selalu sama dengan peningkatan kadar protein. Strain CPG8,

BAD5-02, GIA12-03 dan BTM6-02 mengalami peningkatan kadar klorofil, namun mengalami penurunan kadar protein. Hal tersebut dapat terjadi karena strain-strain *Nostoc* memiliki kemampuan untuk mensintesis klorofil dan protein yang berbeda-beda.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Sebanyak 11 strain dari 13 strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan dapat tumbuh kembali setelah dipreservasi menggunakan metode *freezing* (-4°C) pada *freezer* konvensional dengan penambahan DMSO 5%. Metode *freezing* (-4°C) tersebut dapat digunakan sebagai teknik preservasi strain *Nostoc* yang praktis dan murah.
2. Setiap strain *Nostoc* memiliki respon yang berbeda-beda terhadap proses preservasi dengan menggunakan metode *freezing* (-4°C).
2. Sebanyak tiga strain *Nostoc* mengalami penurunan kadar klorofil setelah dipreservasi menggunakan metode *freezing* selama satu hari dan tujuh hari. Penurunan kadar klorofil yang terjadi adalah sekitar 0,2--4,2 mg/ml, atau sekitar 7,32% -- 47,02% dari kadar awal klorofil.
3. Sebanyak lima strain *Nostoc* mengalami penurunan kadar protein setelah dipreservasi menggunakan metode *freezing* selama satu hari dan tujuh hari. Kisaran penurunan kadar protein adalah sebesar 0,05--0,3 Ng/ μl , atau sekitar 7,69%--37,5% dari kadar awal protein.
4. Metode *freezing* (-4°C) dapat digunakan untuk preservasi strain-strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI, namun memiliki pengaruh terhadap kadar klorofil dan kadar protein pada strain-strain *Nostoc*.

5.2 SARAN

Perlu dilakukan penelitian preservasi dengan metode lain dengan jangka waktu penyimpanan yang lebih lama (1 bulan atau 6 bulan) untuk mengetahui pengaruh metode tersebut terhadap karakter fisiologis strain-strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI.

DAFTAR ACUAN

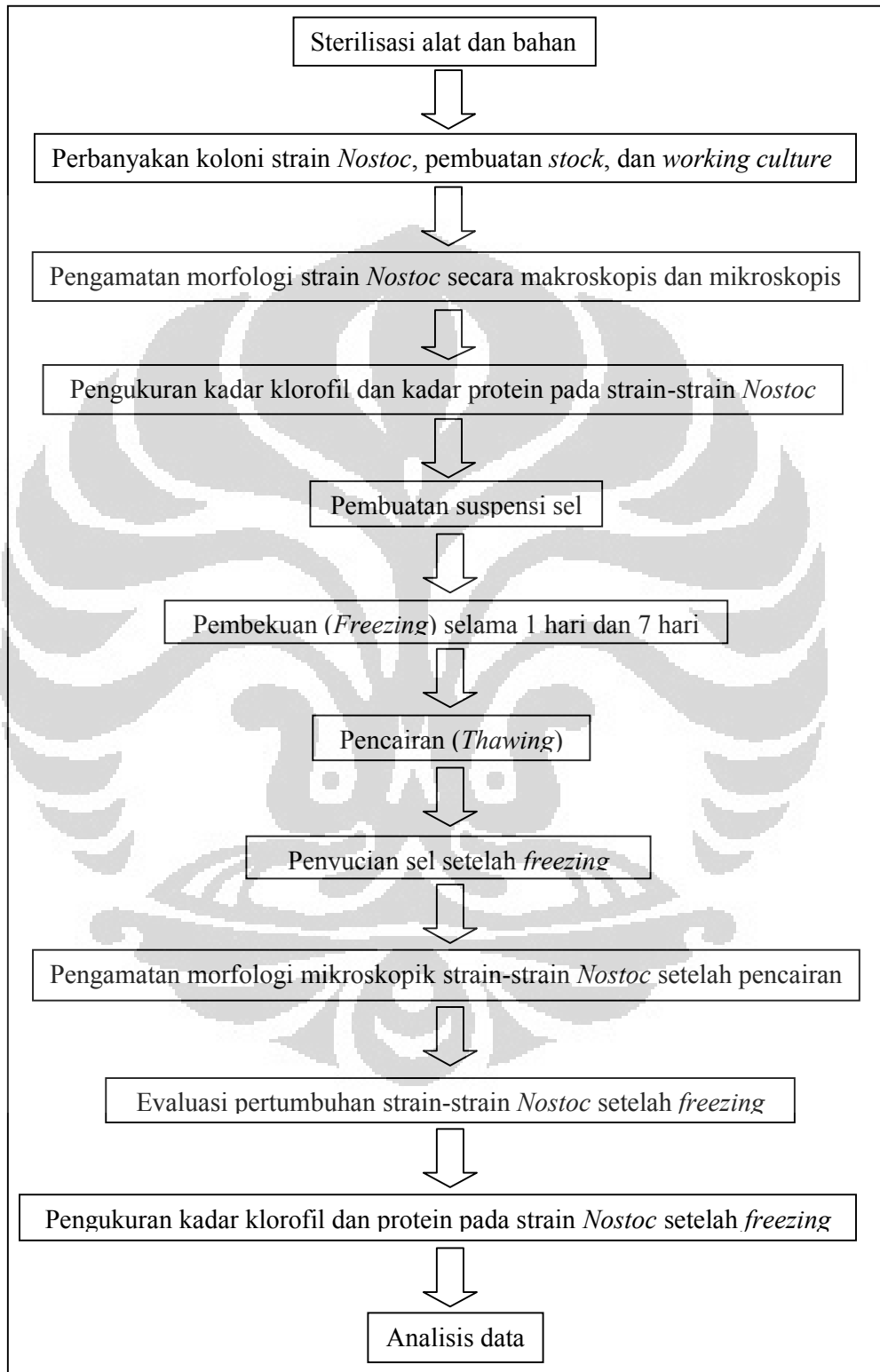
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & J.D. Watson. 1994. *Biologi molekuler sel: mengenal sel*. Ed. ke-2. terj. dari *Molecular biology of the cell*. 2nd ed., oleh Kantjono, A.T. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta: xxiv + 346 hlm.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge. University Press, New York: vii + 293 hlm.
- Bidwell, R.G.S. 1979. *Plant physiology*. 2nd ed. Macmillan Publishing, New York: xx + 726 hlm.
- Bjerketorp, J., S. Hakansson, S. Belkin & A. K. Jansson. 2006. Advances in preservation methods: Keeping biosensor microorganisms alive and active. *Biotechnology*, 17: 1--7.
- Bold, H.C. & M.J. Wynne. 1985. *Introduction to the algae: Structure and reproduction*. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xvi + 720 hlm.
- Boyer, R. F. 1986. *Modern experimental biochemistry*. Addison Wesley Publishing Company Inc., Massachusetts: xiv + 583 hlm.
- Bozkurt, Y. 2006. Relationship between body connection and spermatological properties in scaly carps (*Cyprinus carpio*) semen. *Journal of Animal and Veterinary Advener* 5 (5): 412--414.
- Brockbank, K. G. M/, J. C. Covault & M. J. Taylor. 2007. *Cryopreservation guide*. Thermo Fisher Inc., South Carolina: v + 30 hlm.
- Brock, T.D. & M.T. Madigan. 1991. *Biology of microorganism*. 6th ed. Prentice Hall Inc., New Jersey: xix + 874 hlm.
- Campbell, A. N., J. B. Reece & L. G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Ed. ke-5. Jilid 1. terj. dari *Biology*. 5th ed., oleh Lestari, R. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- Caprette, David R. 1995. Bradford protein assays.
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>. 19 May 05. 3 hlm
- Clegg, C.G. & D.G. Mackean. 2000. *Advanced biology: principles & applications*. John Murray Publishers Ltd., London: vi + 74 hlm.

- Colyer, C. L., C. S. Kinkade, P. J. Viskari & J. P. Landers. 2005. Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. *Anal Bioanal Chem* 382: 559--569.
- Dwidjoseputro, D. 1983. *Pengantar fisiologi tumbuhan*. PT. Gramedia, Jakarta: xv + 232 hlm.
- Day, J. G. & J. J. Brand. 2005. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. *Dalam: Andersen, R.A. (ed.). 2005. Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, Amsterdam: 165--187.
- Doneva, T. U. & T. Donev. 2004. Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of culture collection*, 4: 17--28.
- Dubois, John. D & Lawrence A. Kapustaka. 1983. Freeze-recovery physiology of nitrogenase activity in terrestrial *Nostoc* sp. colonines. *American society for microbiology*: 773--778.
- Gandjar, I. 2006. Pertumbuhan fungi. *Dalam: Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. Mikologi dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: 36--46.
- Graham, L.E. & L. W. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice-Hall, Inc., New York: xvi + 640 hlm.
- Hoek, V.Den., D.G. Mann & H.M. Jahns. 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, New York: xiv + 623 hlm.
- Jensen, G. S., D. I. Ginsberg & C. Drapeau. 2001. Blue green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *Winter* 3(4): 11 hlm.
- Krishnamurthy, K. V. 2003. *Textbook of biodiversity*. Science Publisher, Inc., Enfield: vii + 260 hlm.
- Liu, J. 2009. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Thesis Master of Science The University of British Columbia, Vancouver: xi + 89 hlm.
- Lund, H.C. & J.W.G. Lund. 1995. *Freshwater algae: Their microscopic world explored*. Biopress Ltd., Bristol: xv + 360 hlm.
- Mahakhant, A. W. Kunalung & U. Klinhom. 2008. Development of long term preservation techniques for *ex situ* conservation of microalgal strain at

- MIRCEN, TISTR. *GMSARN International Conference on Sustainable Development; Issues and Prospect for the GMS*, Thailand: 1--6.
- Meeks, J. C. 1974. *Chlorophylls*. Dalam: Stewart, W. D. P. (ed.). *Algal physiology and biochemistry*. University of California Press, California: 161--175.
- Mori, F., M. Erata & M. M. Watanabe. 2002. Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-Collection. *Microbial Culture Collection*, 18: 45--55.
- Nagai, T., K. Tomioka, K. Takeuchi, M. Iida, M. Kawada, & T. Sato. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF genebank. *JARQ*, 39: 19--27.
- Nilsson, M., J. Bhattacharya, A.N. Rai & B. Bergman. 2002. Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains. *New Phytologist*. 156(3): 517--525.
- Pandey, S. N. & P. S. Trivedi. 1997. A textbook of botany: Algae, fungi, bacteria, mycoplasma, viruses, lichens, and elementary plant pathology vol. 1. 10th ed. Vikas Publishing House PVT. LTD, New Delhi: 613 hlm.
- Sabarinathan, K. G. & G. Ganesan. 2008. Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycoyanin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium-*Westiellopsis* sps. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 12: 79--82.
- Simione, F. P. 1998. Cryopreservation manual. *Nalge Nunc International* : 1--8.
- Tambunan, I. K. & I. Mariska. 2003. Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. *Buletin Plasma Nutfah* 9 (2): 10--18.
- Taylor, R. & R. L. Fletcher. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies. *Journal of Applied Phycology*. 10: 481--501.
- Thajuddin, N. & G. Subramanian. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 89: 47--57.
- Thakur, D. 2009. In vitro and cryopreservation techniques for conservation of microbial resources. *Newsletter of North East India Research Forum*, 3: 36--43.

- Vaishampayan, A., R.P. Sinha, D.P. Hader, T. Dey, A.K. Gupta, U. Bhan & A.L. Rao. 2001. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review* **67**(4): 453—516.
- Vashishta, B. R., A. K. Sinha, & V. P. Singh. 1999. *Botani for degree students: Algae*. S. Ghand & Company Ltd, New Delhi: ix + 544 hlm.
- Watanabe, M. M. 2005. Cultures as a means of protecting biological resources: Ex situ conservation of threatened algal species. *Dalam: Andersen, R.A. (ed.). 2005. Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, Amsterdam: 419—428hlm.
- Waterborg, J. H. tth. *The Lowry method for protein quantitation*. Dalam: Walker, J. M. tth. *The protein protocols handbook*. 2nd ed. Humana Press Inc., New Jersey: 7--9.
- Whitton, B.A. 2002. Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria). *Dalam: John, D.M., B.A. Whitton & A.J. Brook. (eds.). 2002. The freshwater algal flora of British Isles: Identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, New York: 105--109.

Lampiran 1 Skema alur kerja penelitian



Lampiran 2. Panduan warna Castell-Polychromos No.9216

