



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGGUNAAN METODE *FREEZING* (-4° C) DENGAN
KONSENTRASI DMSO 5% UNTUK PRESERVASI
STRAIN-STRAIN *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886**

SKRIPSI

**MAULIDA OKTAVIANI
0606029113**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGGUNAAN METODE *FREEZING* (-4° C) DENGAN
KONSENTRASI DMSO 5% UNTUK PRESERVASI
STRAIN-STRAIN *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**MAULIDA OKTAVIANI
0606029113**

**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 : Maulida Oktaviani

NPM : 0606029113

Tanda Tangan : 

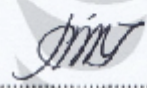
Tanggal : 15 Juli 2011


HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Maulida Oktaviani
NPM : 0606029113
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Penggunaan Metode *Freezing* (-4° C) dengan
Konsentrasi DMSO 5% untuk Preservasi
Strain-strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet et
Flahault 1886

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

DEWAN PENGUJI

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

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

Penguji II : Dra. Nining B. Prihantini, M. Sc. (.....) 

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 15 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam penulis sampaikan kepada teladan terbaik sepanjang masa, Rasulullah Muhammad SAW beserta seluruh keluarganya dan para sahabatnya.

Penulis menyadari bahwa dalam menuntut ilmu di Departemen Biologi FMIPA UI hingga skripsi ini selesai disusun, tidak terlepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dian Hendrayanti, S. Si., M. Sc. selaku pembimbing tunggal yang telah memberikan begitu banyak fasilitas, tenaga, dan waktu untuk membimbing, mengarahkan, mendukung, memberikan nasihat, dan saran bagi penulis. Terima kasih untuk semangat dan inspirasi yang luar biasa yang sudah dibagi kepada penulis selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph. D., Dra. Nining B. Prihantini, M. Sc., dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M. Sc. selaku penguji atas pengetahuan, koreksi, masukan, dan saran yang konstruktif bagi skripsi ini.
3. Dra. Lestari Rahayu, M. Sc. selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan, perhatian, saran, ilmu dan motivasi kepada penulis selama menimba ilmu di Departemen Biologi.
4. Dr. Abinawanto selaku Ketua Laboratorium Genetika, Ariyanti Oetari, Ph. D. selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi, dan Mega Atria, S. Si., M. Si. yang telah memberikan banyak fasilitas dan bantuan semenjak KP hingga pengambilan data bagi skripsi ini.
5. Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M. Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dr. Anom Bowolaksono, M. Sc. selaku Koordinator Seminar, Dra. Titi Soedjiarti, S. U. selaku Koordinator Pendidikan, serta seluruh pengajar yang telah memberikan begitu banyak bekal ilmu yang bermanfaat. Tidak lupa pada seluruh staf Departemen Biologi (Ahmad Supriyadi, S. Ip., Asri Martini,

- S. Si., Ir. Rusmalina, Pak Taryana, Pak Taryono, Mas Dedi, Pak Arif, Bu Ida, Bu Siti, dan Mba Aam) yang telah memberikan bantuan bagi penulis.
6. Orang tua terbaik, Papa dan Mama, yang telah merawat, mendidik, memberikan kasih sayang, dan doa yang selalu mengiringi gerak langkah penulis. Semoga Allah memberikan balasan terbaik atas pengorbanan kalian. Terima kasih pula kepada H. Soetari (Alm.), Hj. Surahmi, Dhe Lia dan Ummi Nur atas dukungan, doa dan semangat yang telah diberikan.
 7. Rekan-rekan Taksonomi Tumbuhan (Widi, Qumil, Asma, dan Anggi) yang telah menemani penulis dalam suka dan duka selama melaksanakan penelitian. Kepada Pratiwi Yuliana, S. Si., Devri Ari Sinaga, S. Si., Wanda Anggi Andirisananti, S. Si., Raesti Wulan, S. Si., Afiatri P., S. Si., Mulyati D. A., S. Si., dan Shilvana, S. Si., terima kasih atas dukungan, semangat dan pengetahuan yang diberikan kepada penulis.
 8. Teman-teman seperjuangan (Fuji, Vinda, Vita, Rika, Betty, Galuh, Iqbal, Rachmat), Sahabat (Mardha, Eka, Lili, Teddy), dan semua teman Felix`06 yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Terima kasih pula kepada seluruh mahasiswa Biologi angkatan 2005--2010 atas kekeluargaan, canda tawa, dan semangat selama berada di Departemen Biologi.
 9. Teman-teman *Core Team* (CT) HIMBIO`08, CT Kaderisasi UI`10 (SUPER N), MS SALAM UI X3 (Icha, Ka Satriyo, Ka Anto, Bang Er, Bang Dhon, Agung, Ridho, Faris, Akbar), teman-teman MIPA`06 (Dian, Nany, Ami, Linda, Nita, Tika, Desi B., Agus, Tino), dan seluruh aktivis dakwah kampus UI, khususnya Anis, Vivid, Meli, dan Dewi-FIB. *Jazakumullah khairan jaza* atas dukungan, doa, dan ukhuwah terindah yang telah diberikan kepada penulis selama ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan segala bentuk kritik dan saran untuk perbaikan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

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

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

Nama : Maulida Oktaviani
NPM : 0606029113
Program Studi : S-1 Reguler
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 penulis yang berjudul:

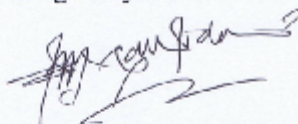
Penggunaan Metode *Freezing* (-4° C) dengan Konsentrasi DMSO 5% untuk Preservasi Strain-strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir penulis tanpa meminta izin dari penulis selama mencantumkan nama penulis sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini penulis buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada Tanggal : 15 Juli 2011

Yang menyatakan



(Maulida Oktaviani)

ABSTRAK

Nama : Maulida Oktaviani
Program Studi : S-1 Biologi Reguler
Judul : Penggunaan Metode *Freezing* (-4° C) dengan Konsentrasi DMSO 5% untuk Preservasi Strain-strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet et Flahault 1886

Penelitian tentang metode *freezing* (-4° C) dengan menggunakan *freezer* lemari pendingin untuk preservasi 13 strain *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet et Flahault 1886 telah dilakukan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh dan respon tumbuh strain *Nostoc* setelah dipreservasi. Strain *Nostoc* yang diujikan berumur 15 hari dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen (pH 7,2). Preservasi koloni *Nostoc* menggunakan DMSO 5% selama 1 dan 7 hari. Koloni *Nostoc* tanpa penambahan DMSO 5% digunakan sebagai kontrol. Masing-masing perlakuan dan kontrol dilakukan dalam dua kali ulangan. Hasil penelitian menunjukkan sebanyak 11 dari 13 strain (84,62%) dapat bertahan dan berhasil tumbuh setelah preservasi. Sebelas strain *Nostoc* tersebut menunjukkan respon tumbuh yang berbeda-beda. Metode *freezing* (-4° C) menggunakan *freezer* lemari pendingin dapat digunakan sebagai metode preservasi strain *Nostoc* yang sederhana dan mudah.

Kata kunci : DMSO, *freezing*, *Nostoc*, preservasi, respon, tumbuh.
xiv + 79 halaman : 31 gambar
Daftar referensi : 81 (1956--2010)

ABSTRACT

Name : Maulida Oktaviani
Study Program : S-1 Department of Biology-Regular
Judul : The Use of Freezing Method (-4° C) with 5% DMSO for
Preservation of *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et*
Flahault 1886 Strains

The use of freezing method (-4° C) by using freezer refrigerator for preservation thirteen *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flahault 1886 strains had been studied. The purpose of this study was to assess strains ability to grow and grow response after being preserved. *Nostoc* strains cultured in BG11 N free agar (pH 7,2) for 15 days were used. The preservation used 5% DMSO for 1 and 7 days. *Nostoc* colonies without presence of 5% DMSO were used as a control. Each test was carried out in duplicate. The results showed that 11 of 13 strains (84,62%) were able to survive and grow after treatment. 11 *Nostoc* strains showed different grow response. Freezing method (-4° C) by using freezer refrigerator can be used as a simple and inexpensive preservation method for *Nostoc* strains.

Key words : DMSO, freezing, grow, *Nostoc*, preservation, response.
xiv + 79 pages : 31 pictures
Bibliography : 81 (1956--2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Nostoc</i>	5
2.2 Pertumbuhan Mikroorganisme	7
2.3 Preservasi	9
2.4 Metode Preservasi	9
2.4.1 Metode Preservasi Jangka Pendek	10
2.4.1.1 Metode Subkultur	10
2.4.1.2 Metode Penyimpanan dalam <i>Mineral Oil (Mineral Oil Storage)</i>	10
2.4.2 Metode Preservasi Jangka Panjang	11
2.4.2.1 Metode <i>Freeze-Drying</i> (Liofilisasi)	11
2.4.2.2 Metode <i>Freezing</i> dan Kriopreservasi	11
2.5 Protektan	13
2.5.1 Pengertian, Jenis, dan Fungsi Protektan	13
2.5.2 Dimetil Sulfoksida sebagai Protektan	14
2.6 Mekanisme Respon Cyanobacteria terhadap <i>Cold Stress</i>	16
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	18
3.1 Lokasi dan Waktu	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.2.1 Alat	18
3.2.2 Bahan	19
3.2.2.1 Mikroorganisme	19
3.2.2.2 Medium	19
3.2.2.3 Bahan Kimia	20
3.2.2.4 Bahan Habis Pakai	20
3.3 Cara Kerja	20
3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	20
3.3.2 Pembuatan Medium	21

3.3.2.1	Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen.....	21
3.3.2.2	Protektan untuk Metode <i>Freezing</i>	23
3.3.3	Pemurnian Strain dan Perbanyak Jumlah Koloni.....	24
3.3.4	Pengamatan Morfologi Strain <i>Nostoc</i> secara Makroskopis dan Mikroskopis.....	25
3.3.5	Persiapan Suspensi Sel <i>Nostoc</i>	27
3.3.6	Ekuilibrasi.....	28
3.3.7	Pembekuan (<i>Freezing</i>).....	28
3.3.8	Pencairan (<i>Thawing</i>).....	29
3.3.9	Pengamatan Morfologi Sel <i>Nostoc</i> secara Mikroskopis setelah <i>Thawing</i>	29
3.3.10	Penyucian Suspensi <i>Nostoc</i> setelah <i>Thawing</i>	30
3.3.11	Evaluasi Pertumbuhan Koloni <i>Nostoc</i> setelah Satu Hari Preservasi (H ₁) dan Tujuh Hari Preservasi (H ₇).....	31
3.4	Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data.....	32
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1	Pengamatan Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis 13 Strain <i>Nostoc</i>	34
4.2	Pertumbuhan Strain-strain <i>Nostoc</i>	39
4.2.1	Pertumbuhan Strain-strain <i>Nostoc</i> Umur 15 Hari (Normal).....	39
4.2.2	Pertumbuhan Strain-strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) selama 1 Hari (H ₁) dan 7 Hari (H ₇).....	42
4.3	Respon Tumbuh Strain-strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) pada H ₁ dan H ₇ Menggunakan DMSO 5% (Perlakuan).....	50
4.4	Respon Tumbuh Strain-strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) pada H ₁ dan H ₇ Tanpa Menggunakan DMSO 5% (Kontrol).....	53
4.5	Efek <i>Freezing</i> terhadap Strain <i>Nostoc</i>	57
4.5.1	Kerusakan Sel Pasca <i>Thawing</i>	57
4.5.2	Morfologi Strain <i>Nostoc</i> Hasil Preservasi setelah Ditumbuhkan dalam Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen.....	60
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	69
5.1	Kesimpulan.....	69
5.2	Saran.....	69
DAFTAR REFERENSI.....		70
LAMPIRAN.....		78

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi <i>Nostoc</i> secara Makroskopis dan Mikroskopis	6
Gambar 2.2	Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme.....	8
Gambar 2.3	Struktur Kimia DMSO	15
Gambar 3.1	Skema Kerja Sterilisasi Alat dan Bahan	21
Gambar 3.2	Skema Kerja Pembuatan Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen ...	23
Gambar 3.3	Skema Kerja Pembuatan Protektan.....	24
Gambar 3.4	Skema Kerja Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture</i>	25
Gambar 3.5	Skema Kerja Pengamatan Morfologi Makroskopis <i>Nostoc</i>	26
Gambar 3.6	Skema Kerja Pengamatan Morfologi Mikroskopis <i>Nostoc</i>	26
Gambar 3.7	Skema Kerja Pembuatan Suspensi Sel <i>Nostoc</i>	27
Gambar 3.8	Skema Kerja Ekuilibrasi Suspensi Sel <i>Nostoc</i>	28
Gambar 3.9	Skema Kerja Proses <i>Freezing</i>	28
Gambar 3.10	Skema Kerja Proses <i>Thawing</i>	29
Gambar 3.11	Skema Kerja Pengamatan Morfologi Mikroskopis Sel <i>Nostoc</i> setelah <i>Thawing</i>	30
Gambar 3.12	Skema Kerja Penyucian Suspensi Sel <i>Nostoc</i> setelah <i>Thawing</i>	31
Gambar 3.13	Skema Kerja Evaluasi Pertumbuhan Koloni <i>Nostoc</i>	32
Gambar 4.1	Morfologi Makroskopis Koloni 13 strain <i>Nostoc</i> Umur 15 hari dalam Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 35	
Gambar 4.2	Morfologi Mikroskopis 13 Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 hari dalam Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$	37
Gambar 4.3	Kurva Rerata Penambahan Diameter Koloni 13 Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 Hari (Normal).....	41
Gambar 4.4	Kurva Rerata Penambahan Diameter Koloni 13 Strain <i>Nostoc</i> Hasil Preservasi pada H ₁ (Atas) dan H ₇ (Bawah).....	45
Gambar 4.5	Struktur Lapisan Lendir (<i>Mucilagenous</i>) Cyanobacteria	52
Gambar 4.6	Respon Sel dengan dan tanpa Penambahan Protektan terhadap <i>Freezing</i>	55
Gambar 4.7	Perbandingan Pengamatan Mikroskopis pada Sel <i>Nostoc</i> Perlakuan setelah <i>Thawing</i> dan Sel <i>Nostoc</i> Umur 15 Hari (Normal)	58
Gambar 4.8	Kerusakan Sel Pasca <i>Thawing</i> pada Strain <i>Nostoc</i> TAB7d dan GIA13a yang Dipreservasi pada H ₁	59
Gambar 4.9	Morfologi Strain <i>Nostoc</i> dengan Profil Koloni Menyebarkan Hasil Preservasi pada H ₁ dengan Metode <i>Freezing</i> (-4°C).....	62
Gambar 4.10	Morfologi Strain <i>Nostoc</i> dengan Profil Koloni Menggunung Hasil Preservasi pada H ₁ dengan Metode <i>Freezing</i> (-4°C).....	62
Gambar 4.11	Morfologi Strain <i>Nostoc</i> dengan Profil Koloni Menyebarkan Hasil Preservasi pada H ₇ dengan Metode <i>Freezing</i> (-4°C).....	63
Gambar 4.12	Morfologi Strain <i>Nostoc</i> dengan Profil Koloni Menggunung Hasil Preservasi pada H ₇ dengan Metode <i>Freezing</i> (-4°C).....	63
Gambar 4.13	Akinet pada Beberapa Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 hari setelah Preservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4°C)	65

Gambar 4.14 Perbandingan Jumlah Heterokis 8 Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 hari sebelum dan setelah Preservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) pada H ₁ dan H ₇	66
Gambar 4.15 Struktur Selubung Sel Heterokis	68

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Daftar 13 Strain <i>Nostoc</i> Koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan yang Digunakan dalam Penelitian.....	19
Tabel 3.2. Komposisi Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen per Liter Berdasarkan Kim & Lee (2005: 241)	22
Tabel 4.1. Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopis Koloni 13 Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 Hari dalam Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu 23±2° C	36
Tabel 4.2. Hasil Pengamatan Morfologi Mikroskopis 13 Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 Hari dalam Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen pada Suhu 23±2° C	38
Tabel 4.3. Hasil Pengukuran Rerata Penambahan Diameter Koloni 13 Strain <i>Nostoc</i> Umur 15 Hari (Normal).....	40
Tabel 4.4 Hasil Pengukuran Rerata Penambahan Diameter Koloni 13 Strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) dengan Konsentrasi DMSO 5% (Perlakuan) selama 1 Hari (H ₁) dan 7 Hari (H ₇)	43
Tabel 4.5. Perbandingan Kecepatan Tumbuh 13 Strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi pada H ₁ dan H ₇	49
Tabel 4.6. Rasio Σ Penambahan Diameter Koloni 11 Strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) pada H ₁ dan H ₇ Menggunakan DMSO 5% (Perlakuan).....	50
Tabel 4.7 Rasio Σ Penambahan Diameter Koloni 11 Strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) pada H ₁ dan H ₇ Tanpa Menggunakan DMSO 5% (Kontrol)	54
Tabel 4.8 Morfologi Makroskopis 11 strain <i>Nostoc</i> setelah Dipreservasi dengan Metode <i>Freezing</i> (-4° C) pada H ₁ dan H ₇	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Alur Kerja Penelitian	78
Lampiran 2. Panduan Warna Castell-Polychromos No. 9216	79



BAB I PENDAHULUAN

Nostoc merupakan Cyanobacteria yang memiliki banyak manfaat bagi kehidupan manusia (Hoek *dkk.* 1995: 19 & 24; Sabarinathan & Ganesan 2008: 79). Beberapa strain *Nostoc* [Vaucher] Bornet *et* Flahault dapat digunakan sebagai bahan makanan karena mengandung komposisi protein yang tinggi dan dapat dicerna dengan baik (Thajuddin & Subramanian 2005: 53). Pemanfaatan *Nostoc* di bidang pertanian juga telah dilakukan di India dengan menggunakan *Nostoc commune* [Vaucher] Bornet *et* Flahault sebagai agen penyubur tanah (*biofertilizer*) (Vaishampayan *dkk.* 2001: 457; Nilsson *dkk.* 2002: 518). Pemanfaatan *Nostoc* di Indonesia telah diteliti oleh Simanungkalit (2001: 58) yang menunjukkan bahwa *Nostoc muscorum* C. Agardh merupakan salah satu mikroorganisme yang terkandung dalam pupuk hayati komersial Indonesia.

Berbagai macam manfaat yang dapat diperoleh dari *Nostoc* menuntut adanya upaya konservasi. Konservasi merupakan usaha yang dilakukan manusia dalam melindungi, memelihara, dan memanfaatkan sumberdaya alam secara berkelanjutan untuk generasi manusia sekarang dan yang akan datang (Krishnamurthy 2003: 106). Konservasi dibagi menjadi dua, yaitu konservasi *in situ* dan *ex situ*. Konservasi *in situ* merupakan usaha pemeliharaan spesies di dalam habitat atau ekosistem aslinya, sedangkan konservasi *ex situ* meliputi pemeliharaan spesies di luar habitat atau ekosistem aslinya. Upaya yang umum digunakan untuk konservasi alga secara *ex situ* adalah penyimpanan pada koleksi biakan (*culture collection*), penyimpanan dalam bentuk spora, kista (*cyst*), DNA atau pada kondisi artifisial khusus lainnya (Watanabe 2005: 422--423).

Preservasi mikroorganisme merupakan metode penyimpanan koleksi mikroorganisme untuk menjaga agar biakan tetap hidup dan ciri-ciri genetiknya tetap stabil. Preservasi mikroorganisme dapat dilakukan dengan berbagai metode, mulai dari metode subkultur berkala, penyimpanan dalam minyak mineral atau parafin cair, pengeringan (*drying*), metode kering beku (*freeze-drying*), pembekuan (*freezing*), dan kriopreservasi (Thakur 2009: 38).

Salah satu teknik preservasi yang banyak diaplikasikan dalam preservasi mikroalga adalah metode subkultur. Metode subkultur umumnya digunakan apabila jumlah kultur yang dipreservasi dalam skala kecil. Walaupun demikian, metode subkultur memiliki banyak kelemahan, di antaranya adalah rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme, membutuhkan banyak biaya, waktu, dan tempat penyimpanan (Day & Brand 2005: 166). Menurut Carr (*lihat* Whitton & Potts 2000: 9), subkultur yang dilakukan berulang kali dan terus menerus dapat mengakibatkan perubahan morfologi dan fisiologi mikroalga yang bersangkutan. Perubahan tersebut dapat berupa perubahan struktur koloni, akinet, atau perubahan kandungan eksopolisakarida.

Metode lain yang juga banyak diaplikasikan dalam preservasi mikroalga adalah metode *freezing* (Day *dkk.* 1999: 129). *Freezing* merupakan metode penyimpanan sel pada suhu rendah. Prinsip metode *freezing* adalah menurunkan suhu sampai cairan di dalam sel membeku sehingga metabolisme sel terhenti. Suhu yang digunakan dalam *freezing* berkisar antara suhu 0° C pada *freezer* konvensional hingga suhu -196° C pada nitrogen cair (kriopreservasi) (Leung & Jamieson 1991: 252). *Freezing* memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan metode preservasi lainnya. Salah satu kelebihannya adalah kultur yang dipreservasi dengan metode *freezing* memiliki resiko yang lebih kecil terhadap terjadinya kontaminasi dan hilangnya stabilitas genetik (Day & Brand 2005: 166).

Penelitian tentang preservasi mikroalga menggunakan metode *freezing* pertama kali dilakukan oleh Cohn tahun 1871, dengan melaporkan kemampuan toleransi alga hijau *Nitella* terhadap suhu -20° C. Mori *dkk.* (2002: 50) melaporkan bahwa 24 dari 28 strain (85,71 %) Cyanobacteria ordo Nostocales berhasil dipreservasi dengan metode *freezing* menggunakan konsentrasi DMSO 3% pada suhu -196° C. Hasil penelitian Beaty & Parker (1992: 406) menunjukkan bahwa 3 dari 4 strain (75%) Cyanobacteria ordo Nostocales berhasil dipreservasi dengan metode *freezing* menggunakan DMSO 5% pada suhu -196° C.

Walaupun memiliki banyak kelebihan, metode *freezing* juga memiliki kelemahan. Metode *freezing* membutuhkan peralatan dan biaya yang mahal, seperti *deep freezer* dan *liquid-nitrogen storage* (Kirsop 1988: 90 & 96). Oleh

karena itu, diperlukan alternatif teknik preservasi dengan metode *freezing* menggunakan peralatan dan biaya yang lebih murah. Penggunaan *freezer* lemari pendingin kemungkinan dapat menjadi alternatif. Akan tetapi, penelitian mengenai penggunaan *freezer* lemari pendingin (-4°C) untuk preservasi alga belum pernah dilaporkan.

Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi FMIPA UI memiliki koleksi Cyanobacteria indigenos Indonesia yang berasal dari tanah persawahan beberapa daerah di Indonesia, yaitu daerah Jawa, Bali, dan Sulawesi Selatan. Penelitian awal melalui karakterisasi morfologi dan molekuler menggunakan data sekuen parsial gen 16SrRNA dengan panjang 700 pb menunjukkan bahwa strain-strain Cyanobacteria tersebut merupakan genus *Nostoc* (Hendrayanti, komunikasi pribadi). Strain-strain tersebut hingga saat ini dipreservasi dengan metode subkultur.

Metode *freezing* (-4°C) telah berhasil digunakan untuk preservasi strain-strain khamir koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) selama 1 dan 14 hari (Nabilah 2010: 32). Namun demikian, metode *freezing* (-4°C) belum pernah digunakan untuk preservasi strain-strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI. Informasi mengenai keberhasilan metode *freezing* dalam preservasi *Nostoc* di Indonesia sangat terbatas. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah metode *freezing* dengan menggunakan *freezer* lemari pendingin (-4°C) dapat digunakan untuk preservasi jangka panjang strain-strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI.

Penelitian preservasi alga dengan metode *freezing* telah dilakukan sebelumnya dengan waktu penyimpanan yang bervariasi. Sebagai contoh, strain Cyanobacteria koleksi *Algal Culture Collection* (ACC) MIRCEN, Thailand dipreservasi selama 1 hari dan 18 bulan (Mahakhant *dkk.* 2008:1--2). Penelitian preservasi strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI dilakukan selama 1 hari dan 7 hari, dengan tujuan sebagai penelitian awal untuk mengetahui pengaruh lama waktu penyimpanan terhadap pertumbuhan strain *Nostoc* setelah *freezing*.

Salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan preservasi mikroalga adalah jenis dan konsentrasi protektan. Protektan adalah senyawa kimia yang dapat melindungi sel dari pengaruh pembentukan kristal es intraseluler dan ekstraseluler selama proses pembekuan (Liu 2009: 10). Konsentrasi protektan yang umum digunakan untuk preservasi alga dengan metode *freezing* dengan tingkat keberhasilan yang relatif tinggi adalah sebesar 5--10%.

Efektivitas metode *freezing* dievaluasi berdasarkan kemampuan tumbuh strain *Nostoc* setelah preservasi. Kemampuan tumbuh strain *Nostoc* hasil preservasi ditandai dengan penambahan diameter koloni *Nostoc* setelah ditumbuhkan dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen selama 15 hari. Respon tumbuh strain *Nostoc* setelah preservasi dievaluasi secara kualitatif dengan menghitung rasio rerata (Σ) penambahan diameter koloni *Nostoc*. Respon tumbuh setiap strain *Nostoc* terhadap metode *freezing* juga dapat dievaluasi berdasarkan pengamatan karakteristik morfologi koloni dan sel *Nostoc* sebelum dan setelah preservasi. Individu sel yang dapat bertahan terhadap pembekuan dan *thawing* dapat diamati melalui pemeriksaan morfologi di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Crutchfield *dkk.* 1999: 50).

Strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian sebanyak 13 strain, yaitu strain *Nostoc* CPG24, CPR31, CIM7, CPG8, CIG10, BAD5, TAB7d, GIA13a, GIA12-02, GIA12-03, TAK23, BTM6-01, dan BTM6-02. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh dan respon tumbuh 13 strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI setelah dipreservasi dengan metode *freezing* (-4°C) dengan menggunakan konsentrasi DMSO 5% selama 1 dan 7 hari. Hipotesis penelitian adalah strain-strain *Nostoc* mampu tumbuh setelah dipreservasi dengan menggunakan metode *freezing* dan setiap strain *Nostoc* memiliki respon tumbuh yang berbeda. Hasil yang diharapkan dari penelitian, yaitu strain-strain *Nostoc* mampu tumbuh setelah dipreservasi dengan metode *freezing* menggunakan *freezer* lemari pendingin (-4°C). Strain-strain *Nostoc* tersebut juga diharapkan tidak mengalami perubahan karakteristik morfologi koloni dan sel, sehingga dapat dimanfaatkan secara berkelanjutan dalam berbagai bidang.

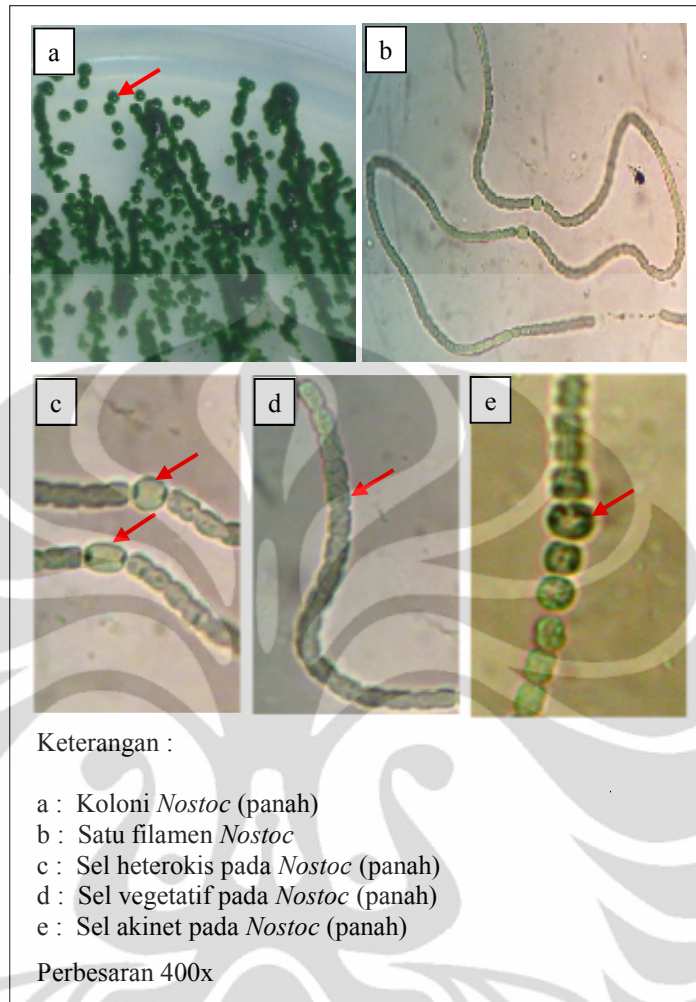
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Nostoc*

Nostoc merupakan salah satu genus dari filum Cyanobacteria yang digolongkan ke dalam kelas Cyanophyceae, ordo Nostocales, dan famili Nostocaceae (Whitton 2002: 90). *Nostoc* berbentuk filamen lurus seperti untaian rantai yang tersusun atas sel-sel vegetatif berbentuk bulat atau oval dengan ukuran 3--9 μm (Whitton 2002: 105--109). Satu filamen *Nostoc* terdiri atas satu trikom yang diselubungi oleh selaput gelatin (Vashishta 1999: 38) (Gambar 2.1b). Satu koloni *Nostoc* merupakan kumpulan beberapa trikom dengan panjang bervariasi membentuk susunan seperti benang kusut dan dikelilingi oleh lapisan lendir. Koloni *Nostoc* terlihat menyerupai *jelly* dengan warna hijau tua, hijau muda hingga kecokelatan (Gambar 2.1a) (Vashishta 1999: 38; Potts 2000: 469--471).

Reproduksi *Nostoc* berlangsung dengan beberapa cara. Metode reproduksi yang umum dilakukan adalah fragmentasi filamen. Patahan dari fragmentasi filamen disebut hormogonia. Hormogonia yang terbentuk akan lepas dari massa lendir yang melapisi koloni. Kemudian, hormogonia akan membentuk selaput gelatin untuk kemudian berkembang menjadi filamen baru (Vashishta 1999: 40).

Nostoc juga dapat bereproduksi melalui pembentukan sel akinet dan sel heterokis. Sel akinet dan sel heterokis merupakan diferensiasi dari sel vegetatif. Baik sel akinet maupun sel heterokis pada *Nostoc* dapat bergerminasi lalu berkembang menjadi trikom vegetatif dan membentuk filamen baru. Selain sel akinet dan sel heterokis, reproduksi *Nostoc* dapat berlangsung dengan pembentukan endospora. Namun, pembentukan endospora hanya ditemukan beberapa jenis saja, seperti pada *N. commune* dan *N. microscopicum* (Vashista 1999: 39--40).



Gambar 2.1. Morfologi *Nostoc* secara makroskopis dan mikroskopis

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.]

Heterokis merupakan sel khusus yang berfungsi untuk fiksasi nitrogen pada lingkungan aerobik (Gambar 2.1c). Sel heterokis memiliki enzim nitrogenase yang akan mengikat nitrogen bebas (N_2) dari udara. Senyawa nitrogen kemudian akan direduksi menjadi amonia dan asam amino berupa glutamin. Glutamin kemudian akan ditransportasikan ke dalam sel vegetatif (Sze 1993: 24).

Heterokis dibedakan dari sel vegetatif, karena memiliki ukuran yang lebih besar dan dinding sel yang lebih tebal. Dinding sel yang lebih tebal pada heterokis membantu dalam mengurangi konsentrasi oksigen yang terlalu tinggi di dalam sel (Graham & Wilcox 2000: 117--118). Selain itu, sel heterokis memiliki

plasma membran yang transparan dengan konten berwarna kekuningan pucat sehingga tampak seperti sel kosong. Heterokis dapat terletak di antara sel vegetatif (interkalar) maupun di ujung (terminal) filamen (Vashishta 1999: 20). Heterokis dan sel vegetatif dihubungkan oleh polar nodul sehingga memungkinkan terjadinya kerjasama metabolisme biokimia antara sel vegetatif dan heterokis (Bold & Wynne 1985: 45).

Akinet berasal dari diferensiasi sel vegetatif yang membesar dan dipenuhi cadangan makanan (Gambar 2.1e). Selain sebagai struktur penyimpan nutrisi, akinet juga diketahui berfungsi sebagai organ reproduktif (Vashishta 1999: 24). Akinet umumnya terbentuk ketika kondisi lingkungan tidak menguntungkan. Akinet dapat dibedakan dari sel vegetatif karena ukurannya yang lebih besar (Bold & Wynne 1985: 44). Selain itu, akinet memiliki dinding sel yang lebih tebal karena mengandung glikolipid dan polisakarida (Fay *dkk.* 1984: 163).

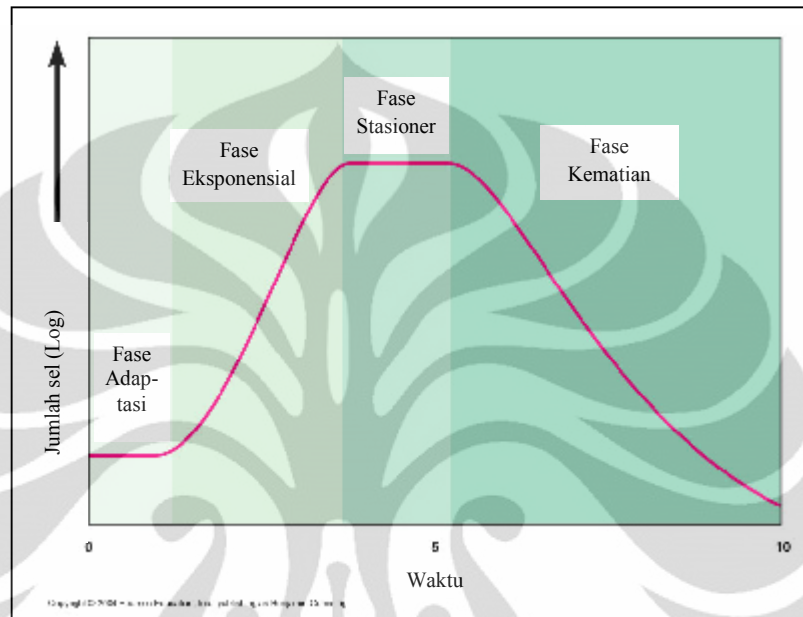
Nostoc dapat ditemukan pada berbagai jenis habitat. Penyebaran *Nostoc* luas, meliputi tanah dan perairan. *Nostoc* juga mampu beradaptasi dengan habitat yang ekstrim, seperti pada habitat dengan suhu mencapai -60°C . *Nostoc* juga diketahui memiliki kemampuan bertahan terhadap kondisi kekeringan (desikasi). Sebagai contoh, spesimen herbarium *Nostoc* mampu ditumbuhkan kembali setelah 100 tahun dikoleksi (Graham & Wilcox 2000: 119--120).

Nostoc di Indonesia banyak ditemukan hidup pada areal persawahan. Strain *Nostoc* tersebut pada umumnya berupa koloni yang kompak (*firm*), berbentuk bulat, dan diselubungi oleh selaput lendir. Warna koloni *Nostoc* bervariasi, mulai dari hijau tua, cokelat hingga hitam. Filamen *Nostoc* berbentuk lurus dan tidak bercabang. Sel heterokis pada *Nostoc* dapat ditemukan pada bagian terminal (ujung) atau interkalar (tengah) filamen, sedangkan sel akinet biasanya terletak pada bagian interkalar filamen.

2.2 Pertumbuhan Mikroorganisme

Pertumbuhan *Nostoc*, seperti pertumbuhan mikroalga pada umumnya, didefinisikan sebagai pertumbuhan jumlah sel atau multiplikasi (Sarles *dkk.* 1956: 80). Pertumbuhan tersebut dapat digambarkan dengan kurva pertumbuhan

(Gambar 2.2). Kurva pertumbuhan terdiri dari beberapa fase, yaitu fase adaptasi (*lag phase*), fase eksponensial (*exponential phase*), fase stasioner (*stationary phase*) dan fase kematian (*death phase*) (Sarles *dkk.* 1956: 90; Gandjar *dkk.* 2006: 39).



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan mikroorganisme
[Sumber: modifikasi dari Pearson Education 2006: 21.]

Fase adaptasi merupakan fase penyesuaian sel-sel mikroalga dengan lingkungan dan pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat. Pada fase adaptasi, pembelahan sel belum terjadi atau berlangsung sangat lambat (Gandjar *dkk.* 2006: 39). Lama fase adaptasi tergantung pada umur kultur dan jumlah inokulum yang dipakai (Fogg & Thake 1987: 12). Fase adaptasi *Nostoc* sp. dalam medium BG11 (pH 7,2) umumnya berlangsung ketika kultur berumur 0--10 hari (Back & Liang 2008: 5).

Fase eksponensial merupakan faktor yang penting dalam pertumbuhan mikroalga. Fase eksponensial ditandai dengan perbanyakan jumlah sel yang sangat banyak dan laju pertumbuhan sel yang tinggi (Madigan *dkk.* 1997: 154). Menurut Back & Liang (2008:5), fase eksponensial pada *Nostoc* sp. umumnya berlangsung ketika kultur berumur 10--15 hari.

Fase stasioner berlangsung setelah fase eksponensial. Fase stasioner ditandai oleh populasi sel yang relatif tetap karena jumlah sel yang membelah dan jumlah sel yang mati relatif seimbang. Hal tersebut disebabkan karena konsentrasi nutrisi di dalam medium pertumbuhan mulai berkurang karena digunakan untuk pembelahan sel pada fase eksponensial (Madigan *dkk.* 2000: 150). Fase stasioner akan terus berlangsung hingga nutrisi dalam medium pertumbuhan habis sehingga sel akan mengalami kematian dalam jumlah besar dan memasuki fase kematian (Fogg & Thake 1987: 36--41).

2.3. Preservasi

Preservasi mikroorganisme merupakan upaya penyimpanan biakan mikroorganisme yang bertujuan untuk mempertahankan viabilitas dan kestabilan fisiologi mikroorganisme dengan cara menurunkan kecepatan metabolisme mikroorganisme selama proses preservasi berlangsung (Sly 1984: 34--35). Pemilihan teknik preservasi tergantung pada beberapa hal, antara lain jenis dan jumlah strain yang akan dipreservasi, ketersediaan dana, dan peralatan yang dimiliki oleh suatu koleksi kultur (Meza *dkk.* 2004: 36). Pemilihan metode yang digunakan untuk preservasi mikroorganisme juga sangat tergantung pada tujuan preservasi dan karakter mikroorganisme (Nagai *dkk.* 2005: 19).

2.4 Metode Preservasi

Berdasarkan lama waktu penyimpanannya, metode preservasi mikroorganisme dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu metode preservasi jangka pendek dan jangka panjang. Metode preservasi jangka pendek merupakan metode yang memungkinkan mikroorganisme tetap tumbuh, atau dengan kata lain metabolisme mikroorganisme tetap aktif. Metode tersebut meliputi metode subkultur atau transfer berkala dan penyimpanan dalam minyak mineral (*mineral oil storage*). Metode preservasi jangka panjang merupakan metode yang menyebabkan metabolisme mikroorganisme menjadi tidak aktif.

Metode preservasi jangka panjang terdiri dari pengeringan (*drying*), metode kering beku (*freeze drying*) atau liofilisasi, *freezing* dan kriopreservasi (Thakur 2009: 38).

2.4.1 Metode Preservasi Jangka Pendek

2.4.1.1 Metode Subkultur

Metode subkultur merupakan metode peremajaan mikroorganisme yang paling sering digunakan pada banyak koleksi kultur di dunia (Smith & Onions 1971: 1218). Metode subkultur umum dilakukan apabila jumlah biakan mikroorganisme yang harus diremajakan tidak terlalu banyak atau dalam skala kecil (Day & Brand 2005: 166). Prinsip utama metode subkultur adalah memindahkan sel mikroorganisme dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru secara berkala sehingga dapat terus berkembang biak (Kirsop 1988: 77--78). Keberhasilan metode subkultur dipengaruhi oleh periode antar interval transfer, jenis medium pertumbuhan yang digunakan, dan suhu inkubasi yang sesuai (Thakur 2009: 38).

Metode subkultur memiliki beberapa kelebihan dan kelemahan. Kelebihannya, antara lain sederhana, mudah, tidak memerlukan peralatan khusus, dan dapat digunakan secara luas bagi berbagai jenis mikroorganisme. Kelemahan metode subkultur, di antaranya rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme lain, membutuhkan banyak biaya, waktu, dan tempat apabila dikerjakan dalam skala besar dan jangka waktu yang lama. Kultur yang dipreservasi dengan metode subkultur juga rentan terhadap resiko kehilangan stabilitas genetik (Mori *dkk.* 2002: 45; Day & Brand 2005: 166).

2.4.1.2 Metode Penyimpanan dalam *Mineral Oil* (*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 kemudian ditutup

dengan minyak mineral atau parafin cair steril. Prinsip dasar metode *mineral oil storage* adalah membatasi akses oksigen ke biakan sehingga dapat meminimalisasi metabolisme dan pertumbuhan biakan (Donev 2001: 19; Thakur 2009: 39).

Keuntungan penggunaan metode *mineral oil storage* yaitu ekonomis, mudah, dan tidak membutuhkan perlengkapan khusus yang mahal. Selain itu, metode tersebut dapat diaplikasikan pada berbagai jenis mikroorganisme. Metode *mineral oil storage* juga dapat mencegah kerusakan medium akibat terjadinya dehidrasi. Namun demikian, metode *mineral oil storage* memiliki banyak kelemahan, yaitu rentan terhadap resiko kontaminasi mikroorganisme lain dan perubahan stabilitas genetik (Donev 2001: 19).

2.4.2 Metode Preservasi Jangka Panjang

2.4.2.1 Metode *Freeze-Drying* (Liofilisasi)

Prinsip metode *freeze drying* adalah pengeringan suspensi sel dari fase cair dengan cara sublimasi melalui proses pembekuan terlebih dahulu. Proses *freeze-drying* dibagi ke dalam tiga tahap. Tahap pertama, yaitu proses pembekuan. Tahap kedua, yaitu proses pengeringan primer melalui proses sublimasi pada suhu rendah, sehingga menyebabkan sebagian besar air tertarik dari suspensi beku sel. Tahap ketiga, yaitu proses pengeringan sekunder pada suhu yang lebih tinggi dengan tujuan mengeringkan sisa air (Matejtschuk 2007: 60).

Kelemahan metode *freeze-drying* adalah memerlukan peralatan yang mahal, teknik pengerjaan yang kompleks dan waktu pengerjaan lama. Selain itu, metode *freeze-drying* tidak dapat digunakan untuk mempreservasi mikroorganisme yang tidak tahan terhadap suhu rendah (Bjerketorp *dkk.* 2006: 2).

2.4.2.2 Metode *Freezing* dan Kriopreservasi

Freezing merupakan metode penyimpanan sel pada suhu rendah (Bozkurt 2005: 63). Suhu yang digunakan dalam *freezing* berkisar antara suhu 0° C pada *freezer* konvensional hingga suhu -196° C pada nitrogen cair (kriopreservasi)

(Leung & Jamieson 1991: 252). Preservasi dengan metode *freezing* pertama kali dilakukan oleh Polge *dkk.* (1949). Melalui metode ini, berbagai organisme dan sel telah berhasil dipreservasi, di antaranya mikroorganisme, spermatozoa, oosit, embrio, sel somatik hewan dan tumbuhan (Taylor & Fletcher 1999: 481). Saks (1978) menyatakan bahwa 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 dan rehidrasi. Dehidrasi merupakan proses keluarnya air dari dalam sel, sedangkan rehidrasi adalah proses 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 ketika sampel dicairkan (*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 (Day & Brand 2005: 171). Menurut Day & Brand (2005: 173), umur kultur merupakan salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan proses *freezing*. Kultur yang umumnya digunakan dalam preservasi menggunakan metode *freezing* adalah kultur yang berada pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Sel yang tumbuh secara eksponensial secara umum lebih tahan terhadap pembekuan dan memiliki viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang berada pada fase stasioner (Day & Brand 2005: 171 & 173).

Selain umur kultur, penggunaan protektan juga memengaruhi keberhasilan preservasi dengan metode *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; Liu 2009: 10). Faktor lain yang dapat memengaruhi keberhasilan metode *freezing* adalah pencairan (*thawing*). *Thawing* merupakan proses pencairan kembali sel yang telah dibekukan. Proses *thawing* dapat dilakukan pada suhu ruangan (37° C) atau pada suhu tertentu pada *water bath* (Simione 1998: 6).

2.5 Protektan

2.5.1 Pengertian, Jenis, dan Fungsi Protektan

Protektan merupakan senyawa kimia yang berfungsi mengurangi pengaruh yang mematikan akibat proses *freezing*, baik yang berupa efek larutan (*solution effect*) maupun pembentukan kristal es ekstraseluler atau intraseluler, sehingga viabilitas sel dapat terjaga (Supriatna & Pasaribu 1992: 122). Suatu senyawa kimia dapat berfungsi sebagai protektan apabila memenuhi beberapa kriteria, di antaranya dapat menjaga viabilitas, ciri morfologi, dan fisiologi sel selama preservasi. Selain itu, protektan harus memiliki sifat tidak beracun serta dapat berikatan dengan air membentuk larutan koligatif (Doneva & Donev 2004: 22).

Berdasarkan perpaduan sifat fisika-kimia (besar molekul, polaritas, dan koligatif) dan kemampuan menembus membran sel, protektan dibedakan atas protektan intraseluler dan protektan ekstraseluler. Protektan intraseluler, yaitu protektan yang dapat menembus membran sel sehingga keadaan ekuilibriasi antara cairan di luar sel dan cairan di dalam sel dapat tercapai (Day & Brand 2005: 173). Ukuran molekul yang relatif kecil (≤ 340 dalton) dan daya larut tinggi dalam air menyebabkan protektan intraseluler mampu menembus membran sel. Menurut Benson (*lihat* Day & Brand 2005: 173), protektan intraseluler juga berfungsi meminimalisasi pembentukan radikal bebas. Contoh protektan intraseluler, antara lain dimetil sulfoksida (DMSO), gliserol, metanol, dan etilen glikol (Tambunan & Mariska 2003: 14; Liu 2009: 12).

Protektan ekstraseluler adalah protektan yang sulit menembus membran sel, karena memiliki ukuran molekul yang relatif besar (≥ 340 dalton) (Brockbank *dkk.* 2007: 2). Beberapa contoh protektan ekstraseluler, antara lain polimer seperti

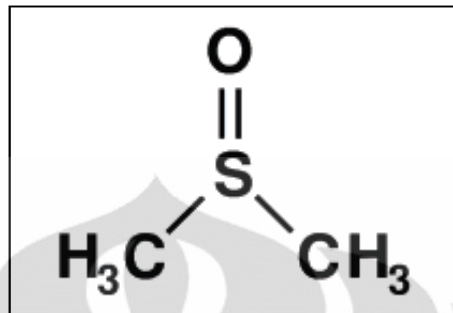
gula, sukrosa, polivinilpirolidon (PVP), dekstran dan polietilen glikol (PEG) (Tambunan & Mariska 2003: 14; Doneva & Donev 2004: 23; Day & Brand 2005: 174). Walaupun tidak dapat menembus sel, protektan ekstraseluler mampu menstabilkan membran *fosfolipid bilayer* ketika sel terdehidrasi di bawah tekanan dingin (Day & Brand 2005: 174).

Perlindungan sel dari efek pembentukan kristal es intraseluler dan ekstraseluler selama proses pembekuan, dapat dilakukan melalui penggunaan kombinasi protektan intraseluler dan ekstraseluler. Protektan intraseluler berperan dalam menggantikan cairan sel intraseluler ketika proses dehidrasi serta melindungi membran sel dari bagian dalam dengan cara berikatan di bawah kepala lipid (Simione 1998: 1). Sementara itu, protektan ekstraseluler berperan melindungi membran sel dari bagian luar dengan cara berikatan di atas kepala lipid.

Penggunaan konsentrasi protektan yang terlalu tinggi dapat memberikan efek yang merugikan bagi sel. Penggunaan protektan dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel, seperti denaturasi membran fosfolipid. Toksisitas protektan dapat diminimalisasi dengan menggunakan protektan pada konsentrasi yang tepat (Tambunan & Mariska 2003: 15).

2.5.2 Dimetil Sulfoksida (DMSO) sebagai Protektan

Dimetil sulfoksida (DMSO) merupakan senyawa kimia dengan rumus bangun $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Gambar 2.3). DMSO pertama kali berhasil disintesis oleh ahli kimia Rusia bernama Alexander Saytzeff pada tahun 1867. Berat molekul DMSO sebesar 78,13 g/mol, serta memiliki titik beku pada suhu antara $18^\circ\text{--}18,55^\circ\text{C}$ dan titik didih pada suhu 189°C . DMSO berbentuk larutan tidak berwarna yang memiliki sifat aprotik dipolar, yaitu dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar. Selain itu, dimetil sulfoksida juga memiliki sifat amfifilik (memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik) (Gaylord Chemical Company 2007: 2). Sifat amfifilik yang dimiliki DMSO mendukung kemampuan DMSO dalam menembus membran sel sehingga dapat melakukan penetrasi ke dalam sel (Sum & Pablo 2003: 3636).



Gambar 2.3. Struktur kimia DMSO
[Sumber: Gurtovenko & Anwar 2007: 10453]

Dimetil sulfoksida merupakan protektan yang umum digunakan dalam penelitian preservasi mikroalga dengan metode *freezing* (Crutchfield *dkk.* 1999: 43). Keberadaan DMSO di dalam sel akan melindungi kandungan sel dari kristal-kristal es intraseluler dan dari pengaruh perubahan konsentrasi larutan akibat dehidrasi sel selama proses *freezing*. Selain itu, DMSO yang berada di dalam sel dapat mencegah presipitasi dari larutan seperti protein dan garam (Supriatna & Pasaribu 1992: 124--125). Adam *dkk.* (lihat Day & Brand 2005: 173) melaporkan bahwa DMSO dapat melindungi enzim selama proses *freezing* berlangsung.

Konsentrasi DMSO yang umum digunakan dalam penelitian preservasi mikroalga pada *Culture Collection of Algae at University of Texas-Austin* (UTEX) berkisar antara 5--8 % (v/v). Nilai konsentrasi tersebut berdasarkan pada efektifitas dan toksisitas DMSO. Konsentrasi DMSO kurang dari 2% tidak efektif dalam mempreservasi mikrolaga, sedangkan apabila konsentrasi DMSO lebih dari 12% akan menyebabkan toksik bagi mikroalga (Day & Brand 2005: 174). Berdasarkan Adam *dkk.* (lihat Day & Brand 2005: 173), konsentrasi DMSO yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi enzim pada suhu ruang dan menyebabkan ketidakstabilan protein.

2.6 Mekanisme Respon Cyanobacteria terhadap *Cold Stress*

Cyanobacteria, termasuk *Nostoc*, mampu beradaptasi dengan lingkungan dan habitat yang memiliki suhu rendah (Graham & Wilcox 2000: 119). Salah satu jenis *Nostoc*, yaitu *Nostoc commune*, dapat ditemukan hampir di semua habitat Antartika yang memiliki suhu di bawah -20°C (Lin *dkk.* 2004: 57). Jenis *Nostoc* lainnya, seperti *Nostoc flagelliforme* ditemukan dapat menolerir tekanan kekeringan dan suhu rendah (*drought and cold stress*) pada daerah arid dan semiarid di Cina (Wang *dkk.* 2000: 1264). Kemampuan *recovery* dari *freezing* dan adaptasi terhadap dehidrasi, rehidrasi, dan siklus *freeze-thaw* yang penuh tekanan juga menjadikan Cyanobacteria sebagai organisme dominan pada habitat terestrial kutub (Šabacká & Elster 2006: 31).

Nostoc dan Cyanobacteria lainnya dapat beradaptasi terhadap *cold stress* melalui beberapa cara. Koloni *Nostoc* terdiri dari sejumlah filamen yang diselubungi oleh massa selaput gelatin/selubung lendir (*mucilage*) (Vashishta 1999: 38). Lapisan lendir merupakan perlindungan (*barrier*) pertama bagi *Nostoc* terhadap kondisi yang tidak menguntungkan (Huang *dkk.* 2004: 1186). Lapisan lendir tersebut mengandung polisakarida yang berperan dalam melindungi dinding dan membran sel *Nostoc* terhadap dehidrasi dan rehidrasi akibat kekeringan dan perubahan suhu (Hill *dkk.* 1997: 238; Potts 1999: 319--320). Menurut Tamaru *dkk.* (2005) polisakarida ekstraselular yang dihasilkan *Nostoc* juga berperan penting dalam regulasi aktivitas fotosintesis selama terjadi penurunan suhu (Yoshida & Sakamoto 2009: 135).

Nostoc juga diketahui dapat menyintesis senyawa protektan alami yang dapat mengurangi titik beku pada cairan intraseluler akibat penurunan suhu. Menurut Yoshida & Sakamoto (2009: 142), *Nostoc punctiforme* dapat menghasilkan trehalosa sebagai respon terhadap dehidrasi sel yang diakibatkan oleh kekeringan dan perubahan suhu. Trehalosa merupakan disakarida yang terdiri dari dua molekul glukosa. Trehalosa diketahui dapat berperan sebagai senyawa osmoprotektif pada Cyanobacteria terestrial. Guo *dkk.* (2000: 168) melaporkan bahwa trehalosa berfungsi menggantikan molekul air yang hilang selama proses dehidrasi. Selain itu, trehalosa juga berperan menstabilisasi

membran sel dan mencegah denaturasi protein ketika molekul air keluar dari sel akibat proses dehidrasi.

Pada tingkat molekuler, Cyanobacteria memiliki mekanisme tertentu dalam merespon *cold shock* yang diakibatkan oleh penurunan suhu. Grauman & Marahiel (*lihat* Los & Murata 1999: 221) menyatakan bahwa kejutan dingin (*cold shock*) dapat terjadi sebagai respon mikroorganisme terhadap perubahan suhu selama mengalami *freezing*. Cyanobacteria memiliki gen yang dapat teraktivasi apabila terpapar oleh *cold shock*, contohnya gen *des* pada *Synechocystis* sp. Sato (1994) melaporkan bahwa gen *des* pada *Synechocystis* sp. dapat terinduksi oleh *cold stress* sehingga meregulasi proses transkripsi dan translasi enzim dan protein spesifik (Los & Murata 1999: 221). Protein spesifik yang dihasilkan kemudian berperan dalam menstabilisasi membran sel Cyanobacteria sehingga mampu beradaptasi terhadap proses dehidrasi dan rehidrasi sel selama *freezing* (Hoiczky & Hansel 2000: 1197).

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilakukan di Ruang Kultur Alga, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok. Penelitian berlangsung selama 5 bulan dari bulan Oktober 2010 hingga Februari 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian meliputi peralatan gelas dan peralatan nongelas. Peralatan tersebut, antara lain jarum tanam bulat (*ose*), jarum tanam tajam, cawan petri, pembakar spiritus, tabung Erlenmeyer 100 ml [Iwaki], tabung Erlenmeyer 500 ml [Iwaki], pipet tetes, pipet volumetrik, pipet *tips* [Axygen], mikropipet [Bio Rad & Capp], gelas ukur, vorteks [Thermolyne Tipe Maxi Mix II], *digital* kaliper [Tekimen], gelas *beaker* [Pyrex], *cryotube* [Iwaki], *storage box* [Iwaki], *freezer* lemari pendingin [SANYO], autoklaf besar [Hirayama HL 36 AE], autoklaf kecil [Hirayama], mikroskop cahaya [Olympus], mikroskop binokuler [Carton], oven [Heraeus Instruments], timbangan analitik [Shimadzu Libror AEL-200], *stirer & hot plate magnetic stirer*, mesin sentrifugasi kecil [Chibitan II Millipore], termometer, labu Buchner [Iwaki], kompor listrik, *water bath*, pensil, buku catatan, penggaris dan kamera digital [SONY].

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah 13 strain *Nostoc* koleksi kultur alga (*Alga Culture Collection*) Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi, FMIPA UI, yang berasal dari Jawa Barat, Bali, dan Sulawesi Selatan. Strain-strain *Nostoc* tersebut, yaitu CPG8, CPG24, CPR31, BAD5, CIG10, CIM7, TAB7d, GIA12-02, GIA12-03, GIA13a, BTM6-01, BTM6-02, dan TAK23 (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Daftar 13 strain *Nostoc* koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan yang digunakan pada penelitian

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

3.2.2.2 Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian terdiri atas medium *Blue Green* 11 (BG11) bebas unsur nitrogen (N), baik cair maupun padat. Medium cair BG11 bebas unsur nitrogen digunakan sebagai pelarut bagi larutan DMSO, sedangkan medium padat BG11 bebas unsur nitrogen digunakan untuk pembuatan *stock culture*, pembuatan *working culture*, dan media pertumbuhan Cyanobacteria setelah dipreservasi dengan metode *freezing*.

3.2.2.3 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia dari Merck yang digunakan dalam pembuatan medium adalah $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, asam sitrat, ferri amonium sitrat, EDTA, $NaCO_3$, H_3BO_3 , $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, dan Na_2EDTA . Bahan kimia lain yang digunakan dalam penelitian adalah agar, DMSO 100% [Merck], alkohol 70% teknis, spiritus teknis, dan akuades.

3.2.2.4 Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan, antara lain kapas, kertas pH 5,2--7,2 [Merck], label tempel, parafilm [Novix-II], membran filter 0,45 μm [Millipore], aluminium foil [Bagus], masker wajah [General Care], dan tisu.

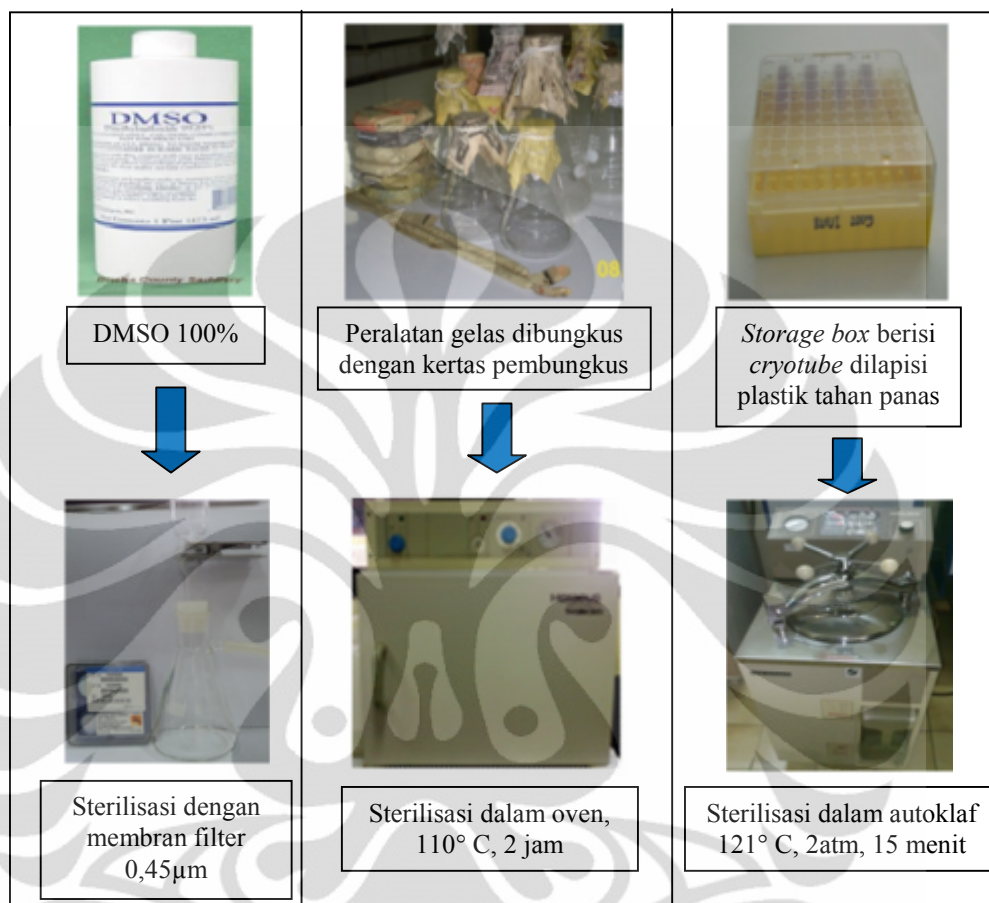
3.3 Cara Kerja

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

DMSO 100% yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan membran filter 0,45 μm . Peralatan gelas yang akan digunakan seperti cawan petri, labu Erlenmeyer, pipet tetes, pipet volumetrik, gelas ukur, dan *beaker glass* serta peralatan non gelas seperti *cryotube* dan *storage box*, 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 kertas aluminium foil, lalu dilapisi dengan kertas pembungkus. Peralatan gelas tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan oven pada suhu 110° C selama 2 jam. *Cryotube* dimasukkan ke dalam *storage box*. *Storage box* kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan ditutup rapat. Peralatan

tersebut kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Skema kerja sterilisasi alat dan bahan

3.3.2 Pembuatan Medium

3.3.2.1 Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen

Medium cair BG11 bebas unsur nitrogen (N) dibuat dari sejumlah bahan kimia tanpa unsur nitrogen dan larutan stok berdasarkan modifikasi Kim & Lee (2005: 241) (Tabel 3.2). Sebanyak 0,04 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,036 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,006 g *citric acid*; 0,006 g *ferric ammonium citrate*; 0,001 g $\text{Na}_2\text{EDTA-Mg}$; 0,02 g Na_2CO_3 ; dan 1 ml larutan *trace metal mix (A5 solution)*

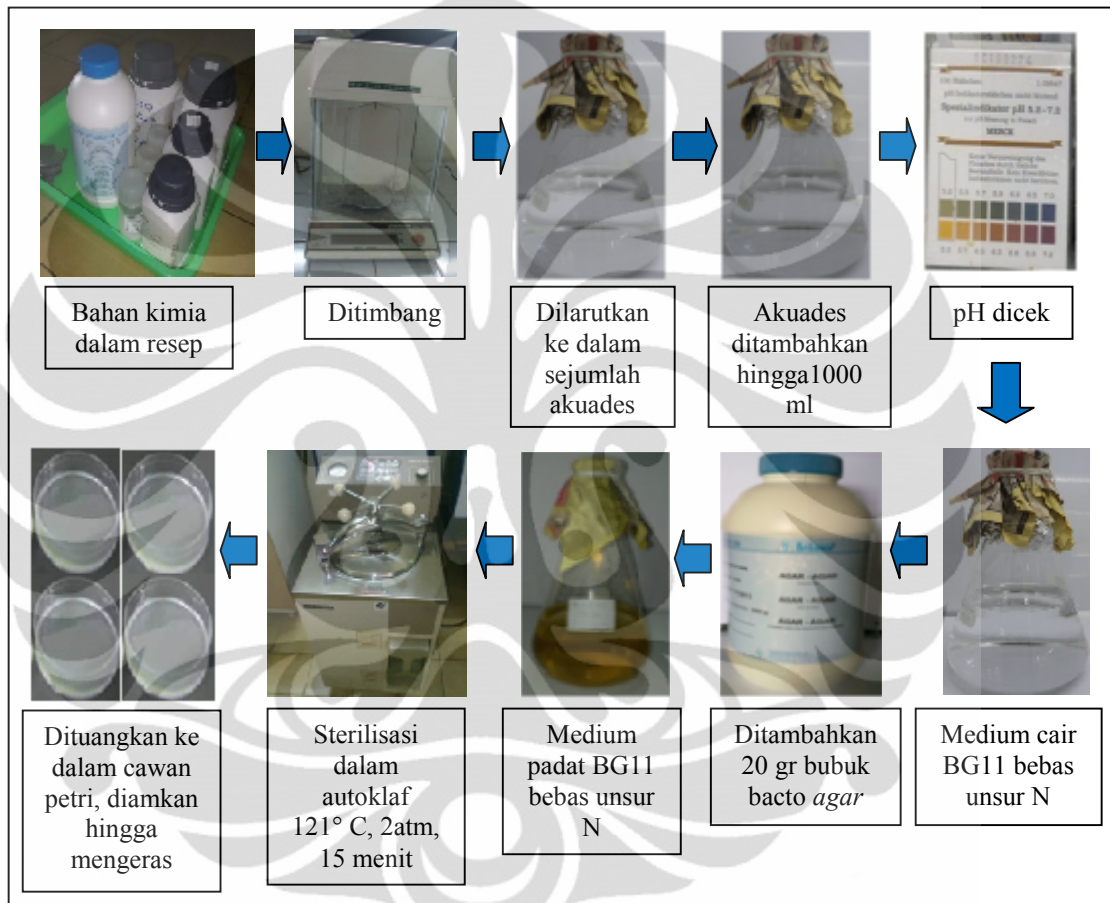
dilarutkan dalam sejumlah akuades. Setelah semua bahan kimia dilarutkan dalam sejumlah akuades, volume akuades ditambahkan hingga mencapai volume akhir 1.000 ml. Derajat keasaman medium kemudian diukur dengan menggunakan kertas indikator pH dengan skala 5,2--7,4. Larutan NaOH 1 M ditambahkan ke dalam medium hingga pH medium mencapai 7,2. Medium kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Medium yang telah homogen disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Tabel 3.2 Komposisi medium BG11 bebas unsur nitrogen per liter berdasarkan Kim & Lee (2005: 241)

Zat kimia	Komposisi (gr)
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
H ₃ BO ₃	2,860
MnCl ₂	1,810
ZnSO ₄	0,222
NaMoO ₄	0,390
CuSO ₄	0,079
Co(NO ₃) ₂	49,400
Akuades	
*Agar (medium agar)	20,000

Medium padat BG11 bebas unsur nitrogen dibuat dengan cara menambahkan 20 g bubuk *bacto agar* (Watanabe 2005: 19) ke dalam medium cair BG11 bebas unsur nitrogen. Sebelum ditambahkan agar, medium cair BG11 bebas unsur nitrogen dipanaskan terlebih dahulu. Medium kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen dan ditunggu hingga sedikit mendidih. Medium yang telah homogen disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium agar BG11 bebas unsur nitrogen yang telah steril didinginkan hingga mencapai suhu 50--60° C.

Sebanyak 20 ml medium BG11 bebas unsur nitrogen yang telah steril 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 apabila sudah dingin (Gambar 3.2).

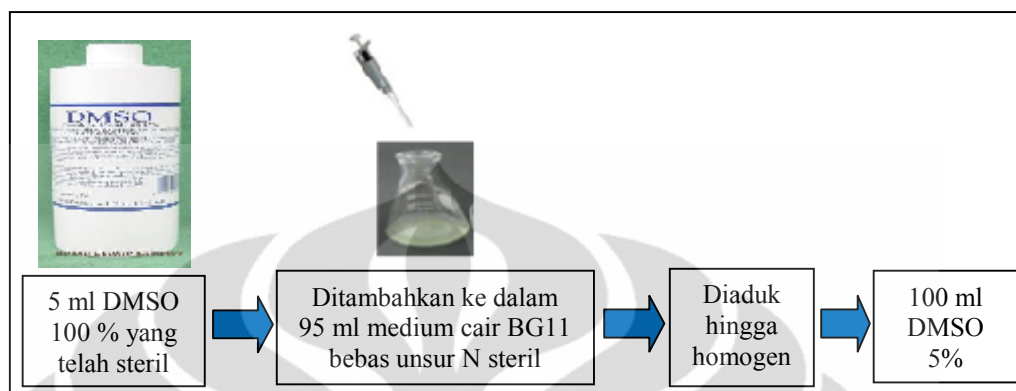


Gambar 3.2 Skema kerja pembuatan medium BG11 bebas unsur nitrogen

3.3.2.2 Protektan untuk Metode *Freezing*

Protektan yang digunakan pada penelitian adalah dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi sebesar 5%. Sebanyak 95 ml medium cair BG11 bebas unsur nitrogen yang telah steril dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Sebanyak 5 ml larutan DMSO 100% yang telah steril kemudian ditambahkan ke

dalam labu Erlenmeyer sehingga volume total larutan mencapai 100 ml. Medium kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen (Gambar 3.3).



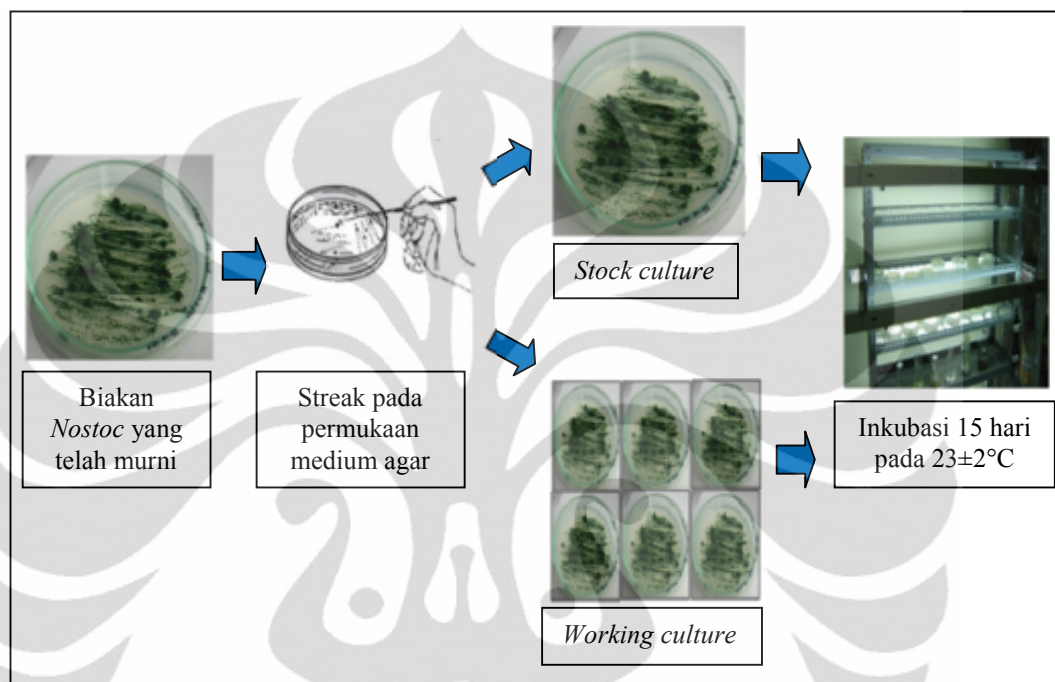
Gambar 3.3 Skema kerja pembuatan protektan

3.3.3 Pemurnian Strain dan Perbanyak Jumlah Koloni

Pemurnian strain *Nostoc* dilakukan secara aseptis dengan metode *streak* berdasarkan Hoshaw & Rosowski (1979: 58--59). Jarum tanam bulat (ose) dibakar terlebih dahulu dan didinginkan sebelum menyentuh biakan. Koloni *Nostoc* diambil dengan menggunakan jarum tanam bulat, kemudian digoreskan pada medium padat BG11 bebas unsur nitrogen. Biakan diinkubasi selama 15 hari pada suhu $23 \pm 2^\circ \text{C}$. Sel-sel *Nostoc* akan tumbuh di sepanjang goresan dan tumbuh menjadi koloni tunggal *Nostoc*. Setelah selesai, cawan petri kemudian ditutup dan sekeliling cawan petri diisolasi menggunakan parafilm. Nama strain *Nostoc* dan tanggal pemurnian koloni ditulis pada tutup cawan petri dengan menggunakan spidol.

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). Tujuan perbanyak jumlah koloni adalah mendapatkan jumlah koloni *Nostoc* yang cukup untuk digunakan pada saat pengambilan data. Koloni *Nostoc* yang tumbuh pada cawan Petri dijadikan sebagai *stock* dan *working culture* (Gambar 3.4). 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 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Pencahayaan berasal dari lampu neon dengan intensitas cahaya 3000 luks ($600\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Faktor lingkungan ruang kultur alga diukur dan diamati selama penelitian.



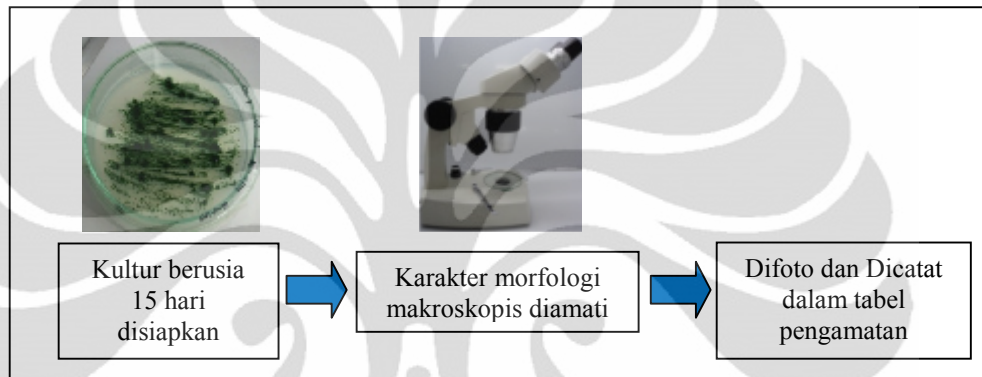
Gambar 3.4 Skema kerja pembuatan *stock culture* dan *working culture*

3.3.4 Pengamatan Morfologi Strain *Nostoc* secara Makroskopis dan Mikroskopis

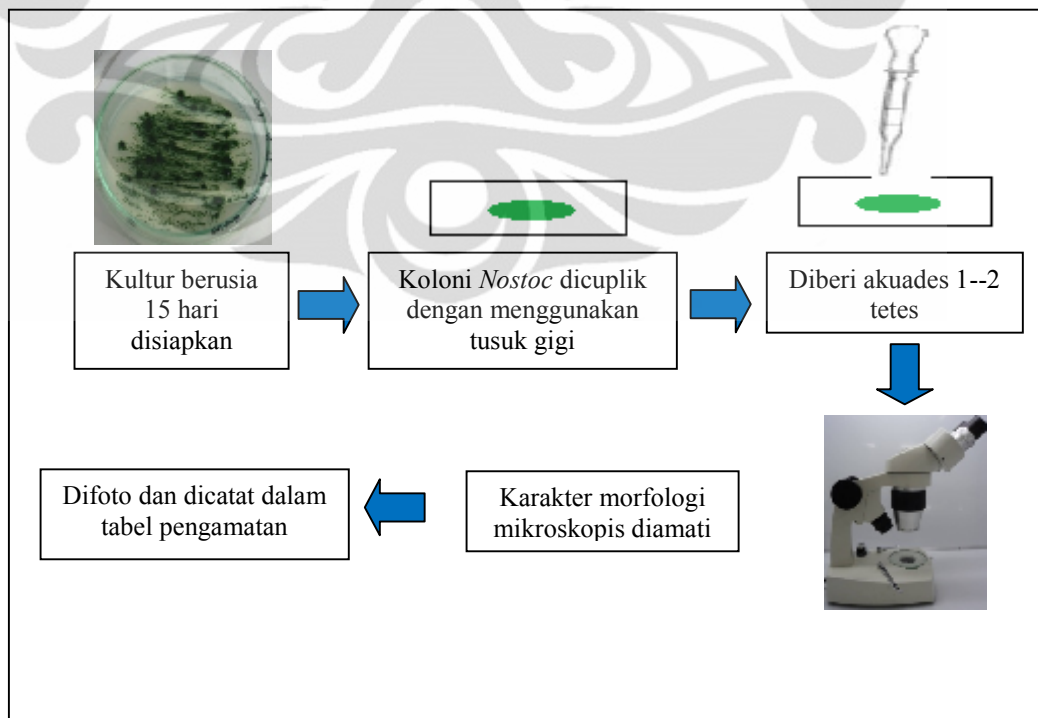
Koloni *Nostoc* yang ditumbuhkan dalam medium agar BG11 bebas unsur nitrogen dan telah berumur 15 hari diamati. Karakter morfologi koloni *Nostoc* yang diamati, antara lain warna koloni, bentuk koloni, tekstur permukaan koloni, pola pertumbuhan koloni, dan adanya selaput lendir. Setiap strain difoto dan dicatat karakter morfologinya (Gambar 3.5).

Pengamatan karakter morfologi sel *Nostoc* dilakukan dengan mengamati sel vegetatif, sel heterokis, dan sel akinet. Koloni *Nostoc* yang tumbuh pada medium agar BG11 bebas unsur nitrogen dicutik dengan tusuk gigi bersih, dan diletakkan di atas gelas objek (*object glass*). Sebanyak 1--2 tetes akuades ditetaskan pada gelas objek. Koloni tersebut kemudian diurai dengan

menggunakan tusuk gigi hingga koloni *Nostoc* terurai. Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*). Filamen *Nostoc* kemudian diamati. Sel vegetatif, sel heterokis, dan sel akinet diukur dengan menggunakan mikrometer. Pengamatan dilakukan pada setiap 10 filamen *Nostoc*. Pengamatan mikroskopis *Nostoc* dilakukan pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya. Filamen *Nostoc* yang terlihat difoto dan dicatat karakter morfologinya (Gambar 3.6).



Gambar 3.5 Skema kerja pengamatan morfologi makroskopis *Nostoc*

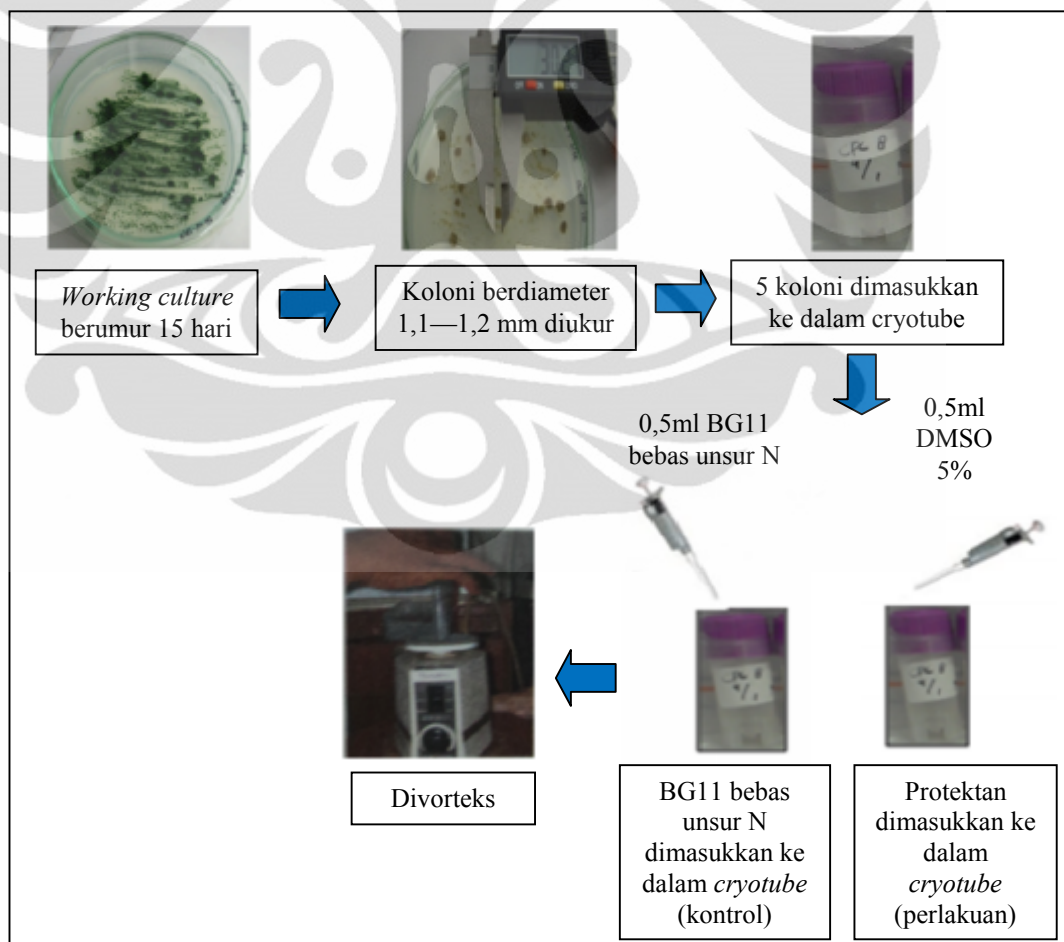


Gambar 3.6 Skema kerja pengamatan morfologi mikroskopis *Nostoc*

3.3.5 Persiapan Suspensi Sel *Nostoc*

Strain *Nostoc* yang digunakan untuk suspensi sel adalah strain yang berumur 15 hari dengan kisaran diameter koloni antara 1,1--1,2 mm. Strain *Nostoc* masing-masing diambil sebanyak lima (5) koloni dengan menggunakan jarum tanam bulat (ose). Koloni *Nostoc* kemudian dimasukkan ke dalam *cryotube* steril berukuran 2 ml yang telah diberi label.

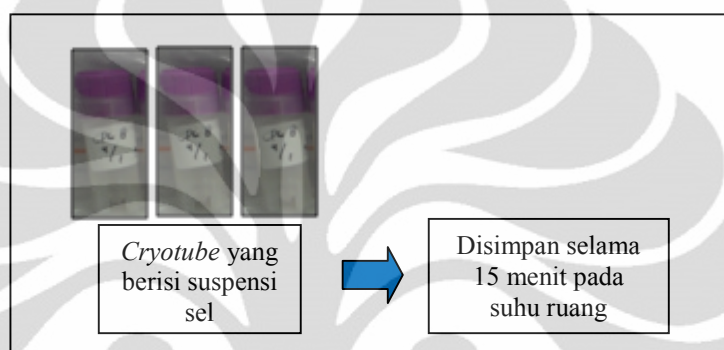
Sebanyak 0,5 ml medium protektan dimasukkan ke dalam *cryotube*, kemudian dihomogenisasi dengan vorteks. *Cryotube* yang telah berisi suspensi sel dan protektan ditutup dan dilapisi dengan parafilm. Kontrol dibuat dengan langkah yang sama tanpa penambahan protektan (Gambar 3.7). Semua langkah-langkah di atas dilakukan secara aseptis.



Gambar 3.7 Skema kerja pembuatan suspensi sel *Nostoc*

3.3.6 Ekuilibrasi

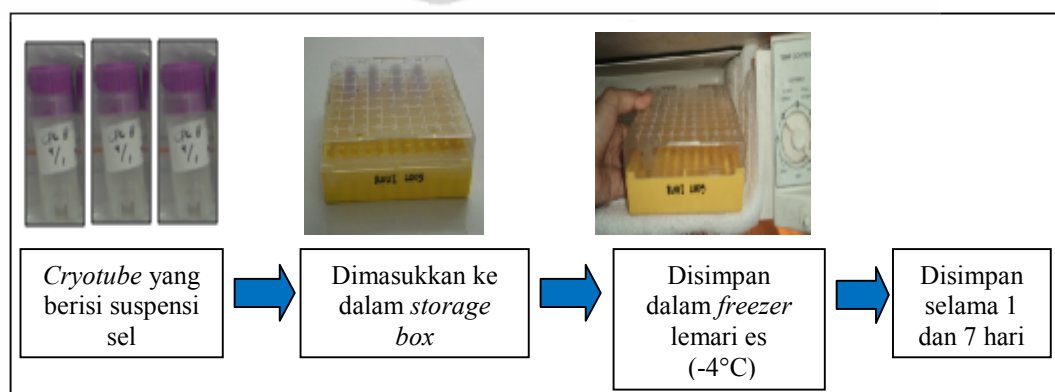
Proses ekuilibrasi dilakukan berdasarkan Mori *dkk.* (2002: 49), dengan cara menyimpan *cryotube* berisi suspensi sel pada suhu ruang selama 15 menit (Gambar 3.8). Tujuan ekuilibrasi adalah meningkatkan konsentrasi protektan sampai memiliki konsentrasi optimum sehingga dapat melindungi sel dari tahap pembekuan (Supriatna & Pasaribu 1992: 138).



Gambar 3.8 Skema kerja ekuilibrasi suspensi sel *Nostoc*

3.3.7 Pembekuan (*Freezing*)

Sebelum disimpan dalam *freezer* lemari pendingin, *storage box* yang telah berisi *cryotube*, ditutup dan sekeliling *storage box* diisolasi dengan menggunakan parafilm. *Storage box* kemudian disimpan pada *freezer* lemari pendingin (suhu -4°C) selama satu dan tujuh hari (Gambar 3.9).



Gambar 3.9 Skema kerja proses *freezing*

3.3.8 Pencairan (*Thawing*)

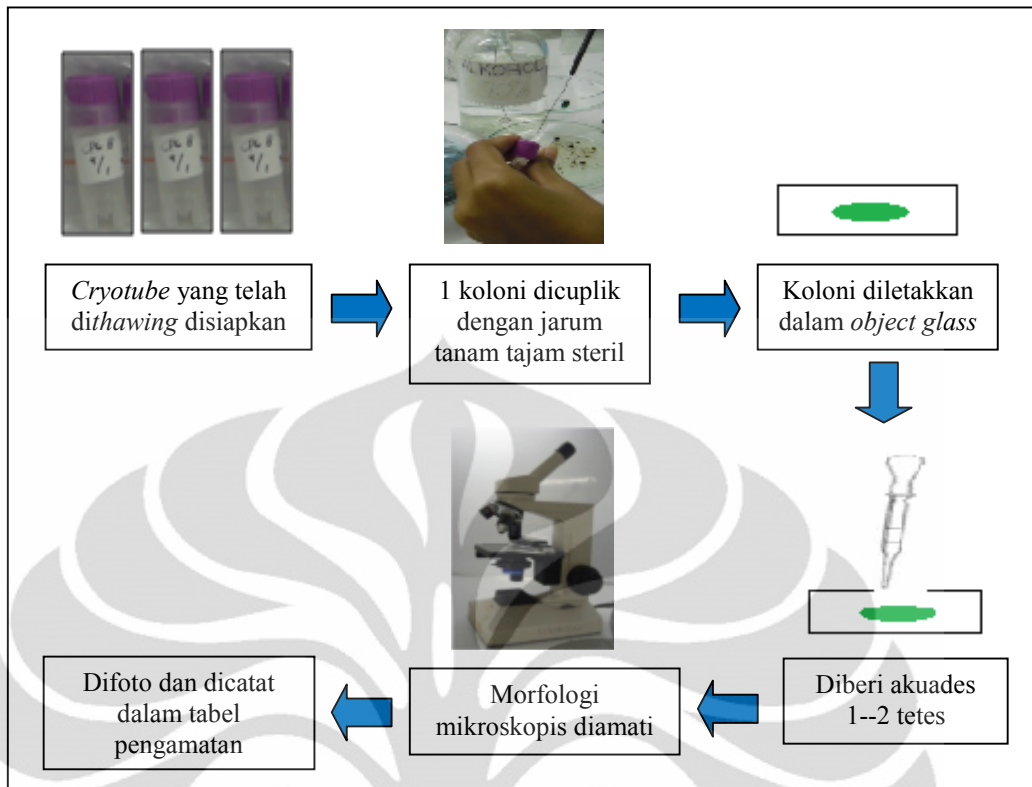
Pencairan dilakukan berdasarkan Kuzmina (2004: 3), dengan merendam *cryotube* ke dalam water bath (suhu 37° C) selama 5 menit atau hingga kristal es terakhir mencair. Seluruh permukaan *cryotube* kemudian dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% untuk meminimalisasi terjadinya kontaminasi (Simione 1998: 6) (Gambar 3.10).



Gambar 3.10 Skema kerja proses *thawing*

3.3.9 Pengamatan Morfologi Sel *Nostoc* secara Mikroskopis setelah *Thawing*

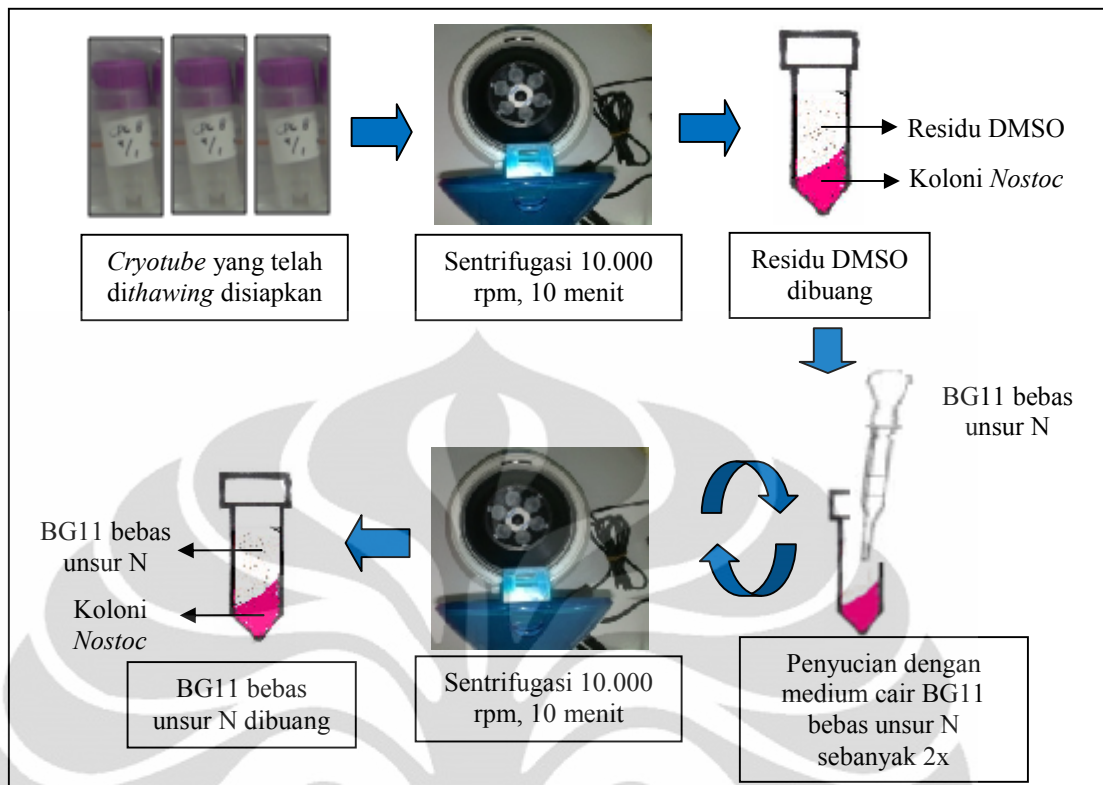
Pengamatan strain *Nostoc* setelah *thawing* dilakukan untuk mengetahui apakah terjadi kerusakan pada sel *Nostoc* akibat proses *freezing* atau tidak. Satu koloni *Nostoc* pada *cryotube* yang telah *dithawing*, dicutik dengan menggunakan tusuk gigi, dan diletakkan di atas gelas objek (*object glass*). Sebanyak 1--2 tetes akuades diteteskan pada gelas objek. Koloni tersebut kemudian diurai dengan menggunakan tusuk gigi hingga koloni *Nostoc* terurai. Preparat kemudian ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*). Pengamatan dilakukan pada setiap 10 filamen *Nostoc*. Pengamatan mikroskopis dilakukan pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya. Filamen *Nostoc* yang terlihat diamati, dicatat karakter morfologinya, dan difoto untuk kemudian dibandingkan dengan strain *Nostoc* sebelum mengalami proses *freezing* (Gambar 3.11).



Gambar 3.11 Skema kerja pengamatan morfologi mikroskopis sel *Nostoc* setelah *thawing*

3.3.10 Penyucian Suspensi Sel setelah *Thawing*

Penyucian suspensi sel bertujuan untuk menghilangkan residu DMSO dan meminimalisasi resiko paparan DMSO terhadap sel (Simione 1998: 6). *Cryotube* yang berisi suspensi sel disentrifugasi dengan mesin sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang dengan pipet. Sebanyak 0,5 ml medium BG11 bebas unsur nitrogen (N) ditambahkan ke dalam tabung yang berisi pelet. Tabung tersebut lalu disentrifugasi kembali. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Pekerjaan tersebut diulangi sebanyak dua kali (Gambar 3.12).

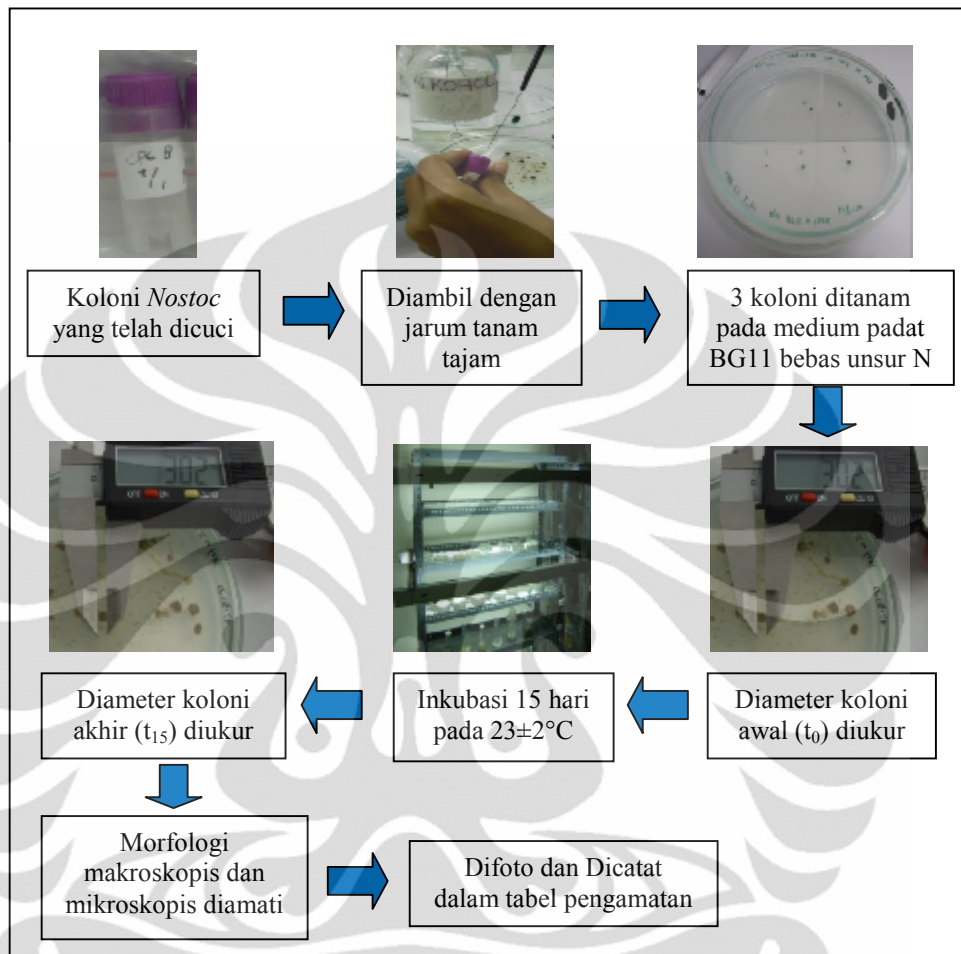


Gambar 3.12 Skema kerja penyucian suspensi sel *Nostoc* setelah *thawing*

3.3.11 Evaluasi Pertumbuhan Koloni *Nostoc* setelah Satu Hari Preservasi (H_1) dan Tujuh Hari Preservasi (H_7).

Evaluasi pertumbuhan strain *Nostoc* pasca preservasi dilakukan dengan menghitung rerata (Σ) penambahan diameter koloni *Nostoc* setelah ditumbuhkan. Koloni *Nostoc* yang telah dicuci, diambil dari *cryotube* dengan menggunakan jarum tanam tajam steril kemudian ditanam pada cawan petri berisi medium padat BG11 bebas unsur Nitrogen. Pada setiap cawan petri ditanam masing-masing tiga (3) koloni *Nostoc*. Setelah itu, cawan petri ditutup dan pada tutup dituliskan nama strain dan tanggal penanaman strain dengan menggunakan spidol. Sekeliling cawan petri kemudian diisolasi dengan parafilm. Diameter awal koloni sebelum inkubasi (H_0) diukur dengan menggunakan *digital* kaliper dan dicatat. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 15 hari pada suhu $23 \pm 2^\circ \text{C}$. Pengambilan data dilakukan setiap tiga hari sekali ($t_0, t_3, t_6, t_9, t_{12}, t_{15}$) selama 15 hari inkubasi (Gambar 3.13). Pada setiap pengambilan data dilakukan dua kali ulangan untuk

setiap strain. Pertumbuhan *Nostoc* ditandakan dengan ukuran diameter koloni yang semakin bertambah.

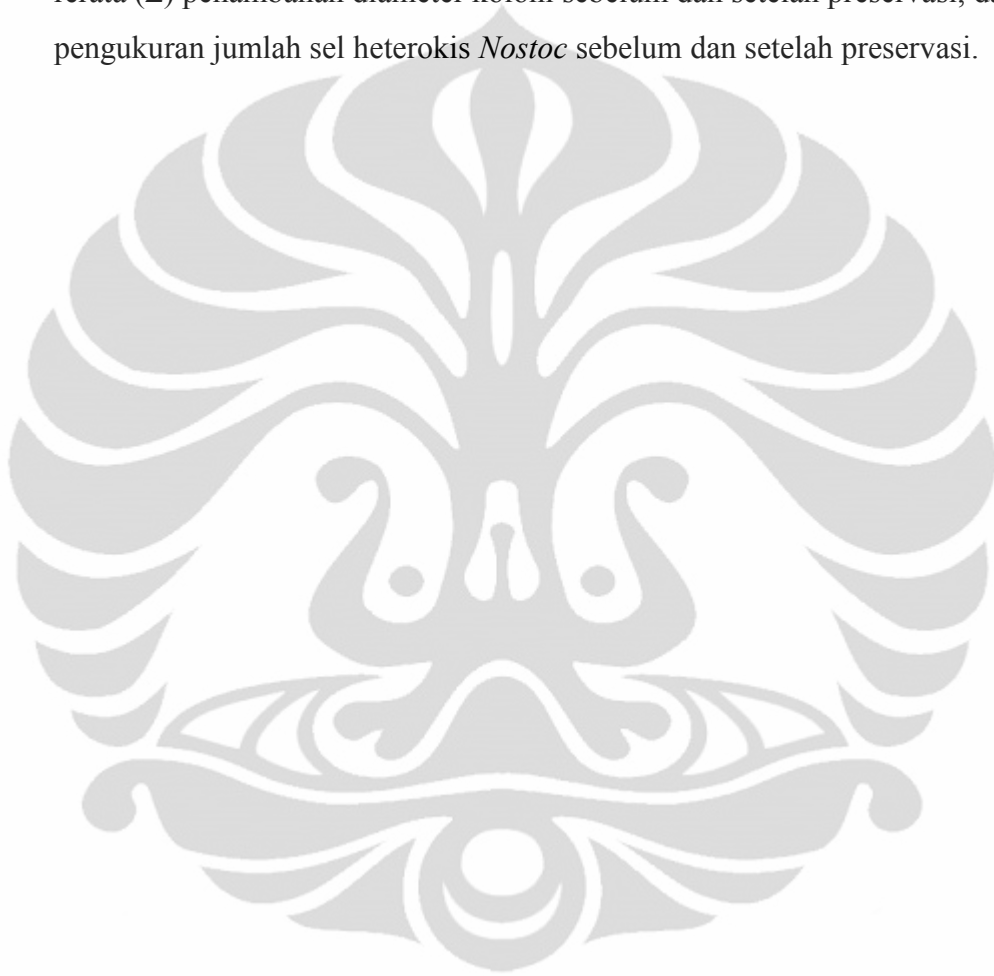


Gambar 3. 13. Skema kerja evaluasi pertumbuhan koloni *Nostoc*

3.4 Penyusunan, Pengolahan, dan Analisis Data

Penelitian bersifat noneksperimental dan deskriptif. Data yang diperoleh disusun dalam bentuk tabel, kurva dan dilengkapi dengan foto. Data yang diperoleh meliputi data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif meliputi pengamatan morfologi *Nostoc* secara makroskopis dan mikroskopis sebelum preservasi, pengamatan morfologi *Nostoc* secara makroskopis dan mikroskopis setelah preservasi dengan konsentrasi DMSO 5%, serta pengamatan morfologi *Nostoc* secara makroskopis dan mikroskopis setelah preservasi tanpa menggunakan protektan (kontrol).

Data kuantitatif meliputi pengukuran rerata (Σ) diameter koloni *Nostoc* umur 15 hari (normal), pengukuran rerata (Σ) diameter koloni *Nostoc* setelah 1 hari preservasi (H_1) dengan konsentrasi DMSO 5% dan tanpa protektan (kontrol), pengukuran rerata (Σ) diameter koloni *Nostoc* setelah 7 hari preservasi (H_7) dengan konsentrasi DMSO 5% dan tanpa protektan (kontrol), penghitungan rasio rerata (Σ) penambahan diameter koloni sebelum dan setelah preservasi, dan pengukuran jumlah sel heterokis *Nostoc* sebelum dan setelah preservasi.



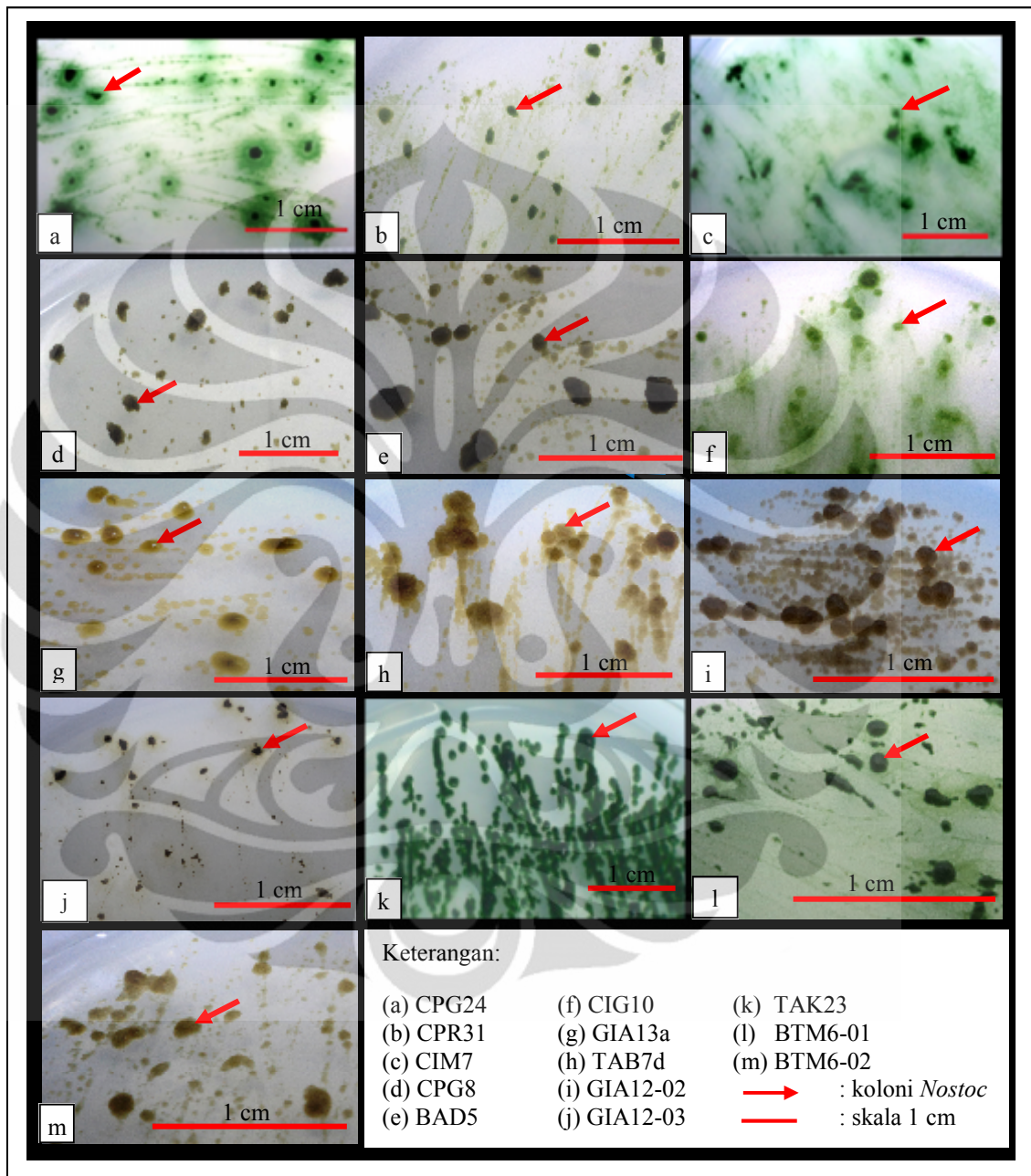
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis 13 Strain *Nostoc*

Strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian berjumlah 13 strain koleksi Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA UI, yang diisolasi dari tanah persawahan beberapa daerah di Indonesia, yaitu daerah Jawa, Bali, dan Sulawesi Selatan. Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis 13 strain *Nostoc* dilakukan untuk mencocokkan karakter strain yang digunakan dalam penelitian dengan karakter pada Whitton (2002) dan Yuliana (2010). Pengamatan morfologi makroskopis dan mikroskopis dilakukan pada biakan *Nostoc* berumur 15 hari dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen yang diinkubasi pada suhu $23\pm 2^\circ\text{C}$ dengan intensitas cahaya 3000 luks ($600\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Kultur *Nostoc* diinkubasi pada suhu $23\pm 2^\circ\text{C}$ karena suhu $23\pm 2^\circ\text{C}$ masih termasuk dalam kisaran suhu optimum bagi pertumbuhan *Nostoc*. Menurut Fogg & Thake (1987:23), suhu optimum bagi pertumbuhan mikroalga umumnya berkisar pada $15\text{--}25^\circ\text{C}$, bergantung pada jenis mikroalga.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi makroskopis, 13 strain *Nostoc* menunjukkan keanekaragaman warna, tekstur, bentuk, dan profil koloni (Gambar 4.1 dan Tabel 4.1). Ketiga belas strain tersebut masing-masing tampak tergabung dalam koloni yang kompak (*firm*) dan diselubungi oleh selaput lendir. Warna koloni hijau rumput hingga hijau zaitun (Standar warna Castell-Polychromos No. 9216). Bentuk koloni bulat. Strain-strain *Nostoc* juga menunjukkan dua profil koloni yang berbeda, yaitu profil koloni menyebar dan menggantung. Strain *Nostoc* yang memiliki profil koloni menyebar adalah strain *Nostoc* CPG24, CPR31, CIG10, CIM7, GIA12-03, BTM6-01, dan TAK23, sedangkan strain *Nostoc* yang memiliki profil koloni menggantung adalah strain *Nostoc* CPG8, BAD5, TAB7d, GIA12-02, GIA13a, dan BTM6-02. Tekstur permukaan koloni 13 strain *Nostoc* juga menunjukkan keanekaragaman. Strain *Nostoc* CPG8, BAD5, GIA12-02, dan BTM6-02 memiliki tekstur permukaan koloni kasar dan bergranul. Strain *Nostoc* CIG10 dan CIM7 memiliki tekstur permukaan koloni

licin dan mengilap. Strain *Nostoc* CPG24, CPR31, GIA12-03, GIA13a, TAB7d, BTM6-01, dan TAK23 memiliki tekstur permukaan koloni licin.



Gambar 4.1. Morfologi makroskopis koloni 13 strain *Nostoc* umur 15 hari dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen pada suhu $23 \pm 2^\circ \text{C}$

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.]

Tabel 4.1 Hasil pengamatan morfologi makroskopis koloni 13 strain *Nostoc* umur 15 hari dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen pada suhu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$

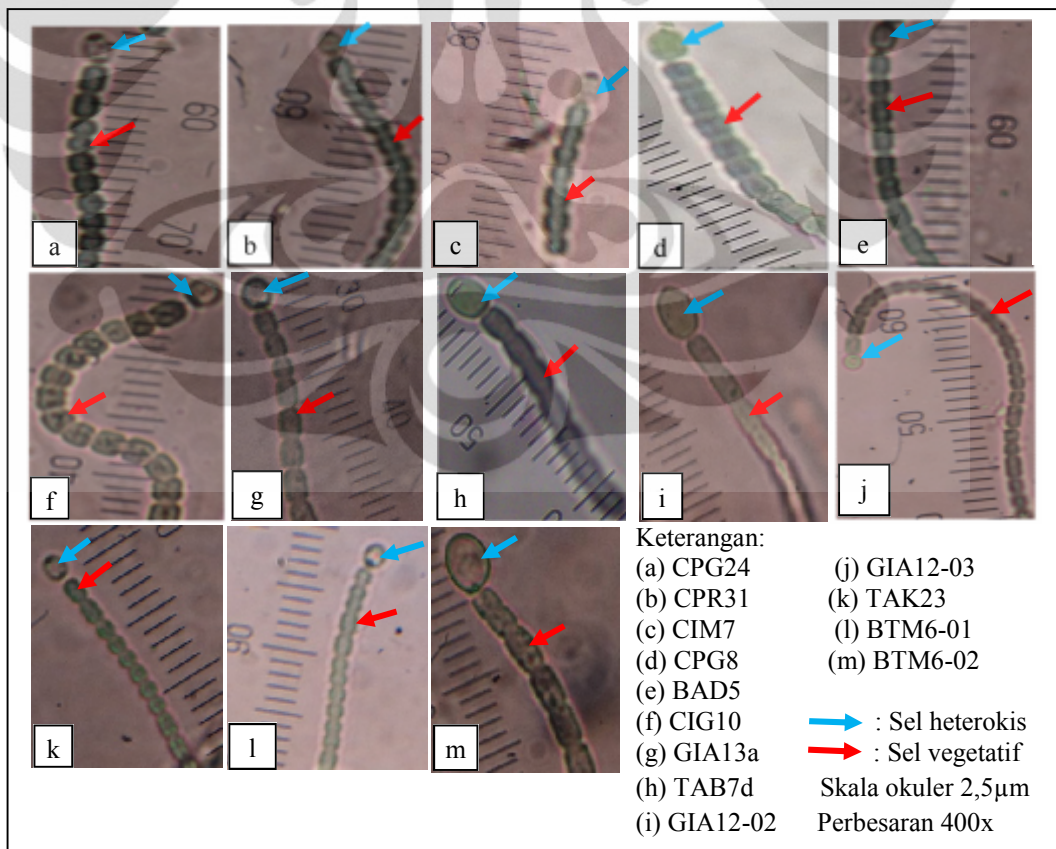
No	Kode Strain	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Tekstur Permukaan Koloni	Profil Koloni
1	CPG24	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
2	CPR31	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
3	CIM7	Hijau rumput	Bulat	Licin & Mengilap	Menyebar
4	CPG8	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggunung
5	BAD5	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggunung
6	CIG10	Hijau rumput	Bulat	Licin & Mengilap	Menyebar
7	GIA13a	Hijau zaitun	Bulat	Licin	Menggunung
8	TAB7d	Hijau zaitun	Bulat	Licin	Menggunung
9	GIA12-02	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggunung
10	GIA12-03	Hijau zaitun	Bulat	Licin	Menyebar
11	TAK23	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
12	BTM6-01	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
13	BTM6-02	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggunung

Karakter morfologi makroskopis 13 strain *Nostoc* tersebut, secara umum sesuai dengan karakter genus *Nostoc* dalam monograf *Phylum Cyanophyta* (Cyanobacteria) oleh Whitton (2002) dan Yuliana (2010), kecuali strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d. Karakter morfologi makroskopis strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d sedikit menunjukkan perbedaan dengan karakter morfologi makroskopis strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d dalam deskripsi Yuliana (2010). Strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d yang digunakan dalam penelitian memiliki tekstur permukaan koloni licin, sedangkan Yuliana (2010: 41--59) melaporkan bahwa karakter tekstur permukaan strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d adalah kasar dan bergranul. Perubahan karakter morfologi kedua strain tersebut diduga akibat proses subkultur yang telah dilakukan berulang kali dan terus menerus. Carr (*lihat* Whitton & Potts 2000: 9) mengemukakan bahwa subkultur yang dilakukan berulang kali dan terus menerus dapat mengakibatkan perubahan morfologi dari organisme yang bersangkutan.

Pengamatan morfologi mikroskopis strain *Nostoc* dilakukan pada setiap 3 filamen per satuan bidang pandang mikroskop dengan perbesaran 400x.

Pengamatan dilakukan minimal pada 10 lapang pandangan yang berbeda untuk setiap strain yang diamati, sehingga total jumlah filamen yang diamati sebanyak 30 filamen. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa semua strain berbentuk filamen lurus, tidak bercabang, serta diselubungi oleh selaput lendir.

Strain-strain *Nostoc* tersebut memiliki bentuk dan ukuran sel heterokis, sel vegetatif dan sel akinet yang bervariasi (Gambar 4.2 dan Tabel 4.2). Sel heterokis umumnya berbentuk bulat dan oval, serta terletak di bagian terminal atau interkalar filamen. Ukuran sel heterokis memiliki kisaran panjang 2--7,5 μm dan lebar 1,5--5 μm . Ragam bentuk sel vegetatif ketiga belas strain *Nostoc* adalah oval, bulat, silindris, dan persegi. Sel vegetatif memiliki kisaran panjang 1--10 μm dan lebar 1--7,5 μm . Sel akinet memiliki bentuk bulat, oval, hingga silindris. Sel akinet memiliki kisaran panjang 5--8,25 μm dan lebar 3,75--7,5 μm .



Gambar 4.2. Morfologi mikroskopis 13 strain *Nostoc* umur 15 hari dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen pada suhu $23\pm 2^\circ\text{C}$

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].

Tabel 4.2. Hasil pengamatan morfologi mikroskopis 13 strain *Nostoc* umur 15 hari dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen pada suhu 23±2° C

Kode Strain	Sel Heterokis				Sel Vegetatif			Sel akinet		
	Bentuk	Letak	Ukuran (µm)		Bentuk	Ukuran (µm)		Bentuk	Ukuran (µm)	
			p	l		p	l		p	l
CPG24	B--O	terminal--interkalar	2,5--3,75	2,5	S--B	2,5--6,25	2,5--5	B--O	6,25--10	5--7,5
CPR31	O	terminal	2,5--3,75	2,5--3,75	O--S	2,5--5	2,5--5	B--O	5--6,25	3,75--5
CIM7	B--O	terminal--interkalar	2--3	1,5--2	B--O	1--2	1--1,5	-	-	-
CPG8	B--O	terminal--interkalar	2,5--6,25	2,5--5	O--P	5--7,5	5--7,5	-	-	-
BAD5	B--O	terminal--interkalar	2,5--6,25	2,5--5	S	5--6,25	2,5--5	-	-	-
CIG10	O	terminal--interkalar	2,5--5	2,5--5	S--B	5--7,5	3,75--5	-	-	-
GIA13A	B--O	terminal--interkalar	5--7,5	2,5--5	O--P	7,5--10	5--7,5	-	-	-
TAB7d	O	terminal--interkalar	3,5--5	2,5--5	B--O	7,5--10	6,25--7,5	-	-	-
GIA12-02	B--O	terminal--interkalar	3,75--7,5	2,5--5	O--P	7,5--11,25	5--7,5	-	-	-
GIA12-03	B--O	terminal--interkalar	2,5--5	2,5--3,75	B--S	5--8,75	5--6,25	-	-	-
TAK23	B--O	terminal--interkalar	2,5--3,75	2,5--5	B--S	5	2,5--3,75	B	5--6,25	5
BTM6-01	B--O	terminal--interkalar;	2,5--5	2,5--3,75	B--S	5--7,5	5	-	-	-
BTM6-02	B--O	terminal--interkalar	2,5--6,25	2,5--5	B--S	7,5--10	6,25--7,5	-	-	-

Keterangan:

B : Bulat

O : Oval

S : Silindris

P : Persegi

p : panjang

l : lebar

- : tidak ditemukan

Karakter-karakter mikroskopis strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian secara umum sesuai dengan karakter genus *Nostoc* dalam monograf *Phylum Cyanophyta* (Cyanobacteria) oleh Whitton (2002) dan Yuliana (2010), kecuali strain *Nostoc* BAD5 dan CIG10. Karakter morfologi mikroskopis strain *Nostoc* BAD5 dan CIG10 yang digunakan dalam penelitian sedikit menunjukkan perbedaan dengan karakter morfologi mikroskopis strain *Nostoc* BAD5 dan CIG10 dalam deskripsi Yuliana (2010:46&48). Strain *Nostoc* BAD5 dan CIG10 yang digunakan dalam penelitian memiliki heterokis yang terletak pada bagian terminal dan interkalar filamen, sedangkan Yuliana melaporkan bahwa heterokis pada strain *Nostoc* BAD5 dan CIG10 terletak pada bagian terminal filamen.

Berdasarkan hasil karakterisasi molekuler melalui data sekuen parsial gen 16SrRNA dengan panjang 385--510 pb, dua belas strain yang digunakan dalam penelitian terdiri dari genus *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*, dan *Tolypothrix*. Satu strain lainnya, yaitu strain CIM7 belum dapat diidentifikasi melalui sekuen parsial gen 16S rRNA (Yuliana 2009: 91). Namun demikian, hasil tersebut berbeda dengan hasil karakterisasi molekuler data sekuen parsial gen 16SrRNA dengan panjang 700 pb, yang menunjukkan bahwa ketiga belas strain yang digunakan dalam penelitian merupakan genus *Nostoc* (Hendrayanti, komunikasi pribadi).

4.2 Pertumbuhan Strain-strain *Nostoc*

4.2.1 Pertumbuhan Strain-strain *Nostoc* Umur 15 Hari (Normal)

Strain-strain *Nostoc* ditumbuhkan dalam medium agar BG11 bebas unsur nitrogen untuk diinkubasi selama 15 hari pada suhu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Koloni *Nostoc* yang berukuran 1,1--1,2 mm kemudian ditanam dengan metode tanam untuk dihitung rerata (Σ) penambahan diameternya selama 15 hari (Tabel 4.3). Hal tersebut dilakukan untuk mendapatkan kurva pertumbuhan strain *Nostoc* umur 15 hari (normal) sebagai pembanding bagi kurva pertumbuhan strain *Nostoc* hasil preservasi dengan metode *freezing*.

Tabel 4.3. Hasil pengukuran rerata (Σ) penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* umur 15 hari (normal)

Lama Preservasi	Umur koloni	Σ Diameter Strain (mm)												
		CPG24	CPR31	CIM7	TAK23	CPG8	BAD5	GIA13A	TAB7d	GIA12-02	GIA12-03	CIG10	BTM6-01	BTM6-02
H₁	t₀	1,19	1,20	1,14	1,20	1,17	1,18	1,17	1,20	1,20	1,12	1,16	1,17	1,18
	t₃	1,38	1,39	1,37	1,36	1,45	1,61	1,73	2,13	1,35	1,20	1,92	1,23	1,85
	t₆	1,62	1,53	1,60	1,48	1,56	1,90	2,44	2,64	1,37	1,20	2,16	1,25	2,35
	t₉	4,17	3,18	1,93	2,26	1,56	2,20	3,14	3,06	1,59	1,37	2,51	1,38	2,71
	t₁₂	5,53	4,01	2,17	4,75	1,57	2,39	3,45	3,54	1,56	1,67	3,89	1,37	3,05
	t₁₅	6,16	6,36	7,53	6,89	1,96	3,08	3,69	3,98	1,95	2,17	4,24	1,89	3,65

Keterangan:

t₀ = hari ke-0 (ketika koloni ditanam)

t₃ = hari ke-3

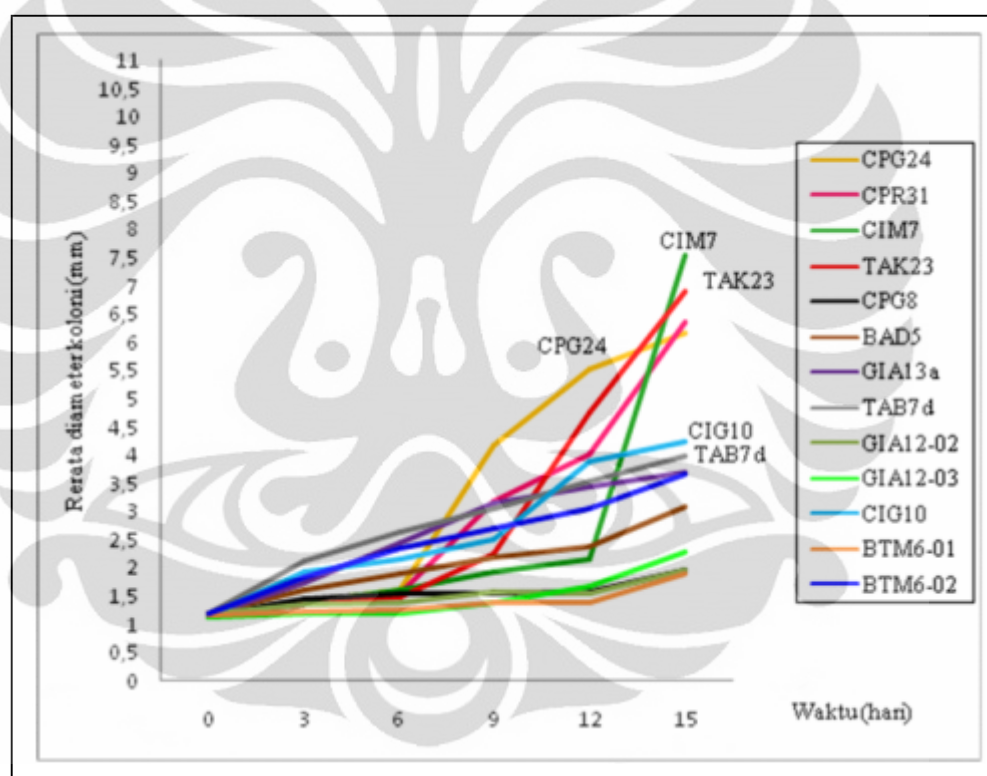
t₆ = hari ke-6

t₁₂ = hari ke-12

t₁₅ = hari ke-15

Berdasarkan data yang diperoleh, rerata diameter koloni 13 strain *Nostoc* terus bertambah dari t_1 hingga t_{15} (Tabel 4.3). Rerata diameter koloni akhir (t_{15}) yang terbesar ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CIM7 dengan rerata diameter koloni sebesar 7,53 mm, sedangkan rerata diameter koloni akhir (t_{15}) yang terkecil ditunjukkan oleh strain *Nostoc* BTM6-01 dengan rerata diameter koloni sebesar 1,89 mm.

Rerata penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* umur 15 hari dapat digambarkan dalam bentuk kurva pertumbuhan. Gambar 4.3 menyajikan kurva rerata penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* umur 15 hari (normal).



Gambar 4.3 Kurva rerata penambahan diameter koloni *Nostoc* umur 15 hari (normal)

Berdasarkan kurva, terlihat bahwa strain *Nostoc* CPG24, TAK23, dan CPR31 telah mengalami fase eksponensial pada hari ke-6 (t_6). Strain *Nostoc* CIG10 telah mengalami fase eksponensial pada hari ke-9 (t_9), sedangkan strain *Nostoc* CIM7 telah mengalami fase eksponensial pada hari ke-12 (t_{12}). Strain *Nostoc* lainnya, seperti TAB7d, GIA12-03, BAD5, CPG8, BTM6-01, BTM6-02,

GIA12-02, dan GIA12-03, memasuki fase eksponensial setelah hari ke-12 (t_{12}). Hal tersebut terlihat dari kurva strain-strain *Nostoc* tersebut yang baru mengalami peningkatan setelah t_{12} . Fogg (*dkk.* 1973:139) menyatakan bahwa pada umumnya, *Nostoc* akan memasuki fase *log* pada usia biakan 4--7 hari. Back & Liang (2008:5) melaporkan bahwa *Nostoc* sp. Strain ATCC 53789 berada pada fase eksponensial ketika kultur berusia 10--15 hari.

4.2.2 Pertumbuhan Strain-strain *Nostoc* setelah Dipreservasi dengan Metode *Freezing* (-4° C) selama 1 Hari (H_1) dan 7 Hari (H_7)

Metode *freezing* dilakukan menggunakan *freezer* lemari pendingin dengan suhu preservasi -4° C selama 1 (H_1) dan 7 (H_7) hari. Strain-strain *Nostoc* yang digunakan dalam preservasi dengan metode *freezing* merupakan strain *Nostoc* yang telah ditumbuhkan dalam medium agar BG11 bebas unsur nitrogen dan diinkubasikan selama 15 hari pada suhu $23\pm 2^{\circ}$ C. Strain-strain *Nostoc* tersebut telah berada pada fase *log* atau fase eksponensial. Menurut Day & Brand (2005:173), kultur alga yang umumnya digunakan dalam preservasi menggunakan metode *freezing* adalah kultur yang berada pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Sel alga yang tumbuh secara eksponensial pada umumnya lebih tahan terhadap pembekuan dan memiliki viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang berada pada fase stasioner.

Kemampuan tumbuh 13 strain *Nostoc* setelah *freezing* ditandai dengan penambahan diameter koloni *Nostoc* setelah ditumbuhkan dalam medium BG11 bebas unsur nitrogen dan diinkubasi selama 15 hari pada suhu $23\pm 2^{\circ}$ C. Berdasarkan hasil penelitian, terdapat perbedaan penambahan diameter koloni pada setiap strain *Nostoc*, baik strain yang dipreservasi selama 1 hari (H_1) maupun 7 hari (H_7). Tabel 4.4 menyajikan hasil pengukuran rerata (Σ) penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* umur 15 hari hasil preservasi pada H_1 dan H_7 setelah ditumbuhkan pada medium BG11 bebas unsur nitrogen pada $23\pm 2^{\circ}$ C.

Tabel 4.4. Hasil pengukuran rerata (Σ) penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* setelah dipreservasi dengan metode *freezing* (-4°C) dengan konsentrasi DMSO 5% (perlakuan) selama 1 hari (H_1) dan 7 hari (H_7)

Lama Preservasi	Umur koloni	Σ Diameter Strain (mm)												
		CPG24	CPR31	CIM7	TAK23	CPG8	BAD5	GIA13A	TAB7d	GIA12-02	GIA12-03	CIG10	BTM6-01	BTM6-02
H₁	t₀	1,24	1,42	1,52	1,27	1,33	1,66	1,83	1,39	1,22	1,27	1,55	1,30	1,62
	t ₃	1,53	1,26	1,35	1,50	1,46	1,61	1,64	0,68	1,38	1,33	4,57	1,38	1,73
	t ₆	2,58	1,52	1,83	1,58	2,26	2,07	2,01	0	1,55	1,32	5,30	1,33	1,37
	t ₉	4,52	1,67	2,32	2,99	2,26	2,20	1,76	0	1,78	1,68	6,76	1,08	1,65
	t ₁₂	6,46	2,16	2,62	5,85	2,26	2,84	0	0	1,78	1,98	6,96	1,08	1,77
	t ₁₅	6,49	5,66	10,44	7,75	2,87	4,13	0	0	2,21	3,80	7,50	1,40	1,76
H₇	t₀	1,56	1,38	1,74	1,27	1,71	1,64	1,75	1,74	1,60	1,21	1,49	1,39	1,66
	t ₃	1,28	1,11	1,45	1,41	1,88	1,71	0,89	0	1,88	1,31	2,44	1,46	1,77
	t ₆	1,47	1,38	1,14	1,69	1,82	1,77	0	0	1,95	1,36	3,21	1,56	1,83
	t ₉	3,08	1,47	1,28	1,98	1,89	1,90	0	0	2,16	1,54	4,09	1,63	1,72
	t ₁₂	4,49	1,93	1,51	3,45	1,86	1,98	0	0	2,22	1,76	5,91	1,78	1,70
	t ₁₅	5,30	5,71	2,42	3,50	1,89	2,71	0	0	2,69	3,59	6,26	1,81	2,35

Keterangan:

t₀ = hari ke-0 (ketika koloni ditanam)

t₃ = hari ke-3

t₆ = hari ke-6

t₁₂ = hari ke-12

t₁₅ = hari ke-15

Berdasarkan hasil penelitian, sebanyak 11 (84,62 %) dari 13 strain *Nostoc*, yaitu strain *Nostoc* CIG10, CPR31, CPG24, GIA12-03, TAK23, BAD5, GIA12-02, CIM7, BTM6-02, CPG8, dan BTM6-01, berhasil tumbuh setelah dipreservasi pada H₁ dan H₇. Pertumbuhan tersebut diketahui dari rerata diameter koloni strain-strain tersebut yang bertambah dari t₀ hingga t₁₅. Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh 2 strain *Nostoc*, yaitu strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d. Strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d tidak menunjukkan pertumbuhan bahkan mengalami kematian setelah dipreservasi pada H₁ dan H₇. Hal tersebut diketahui dari rerata diameter koloni strain tersebut yang terus menurun hingga mencapai 0 mm pada t₁₅ (Tabel 4.4).

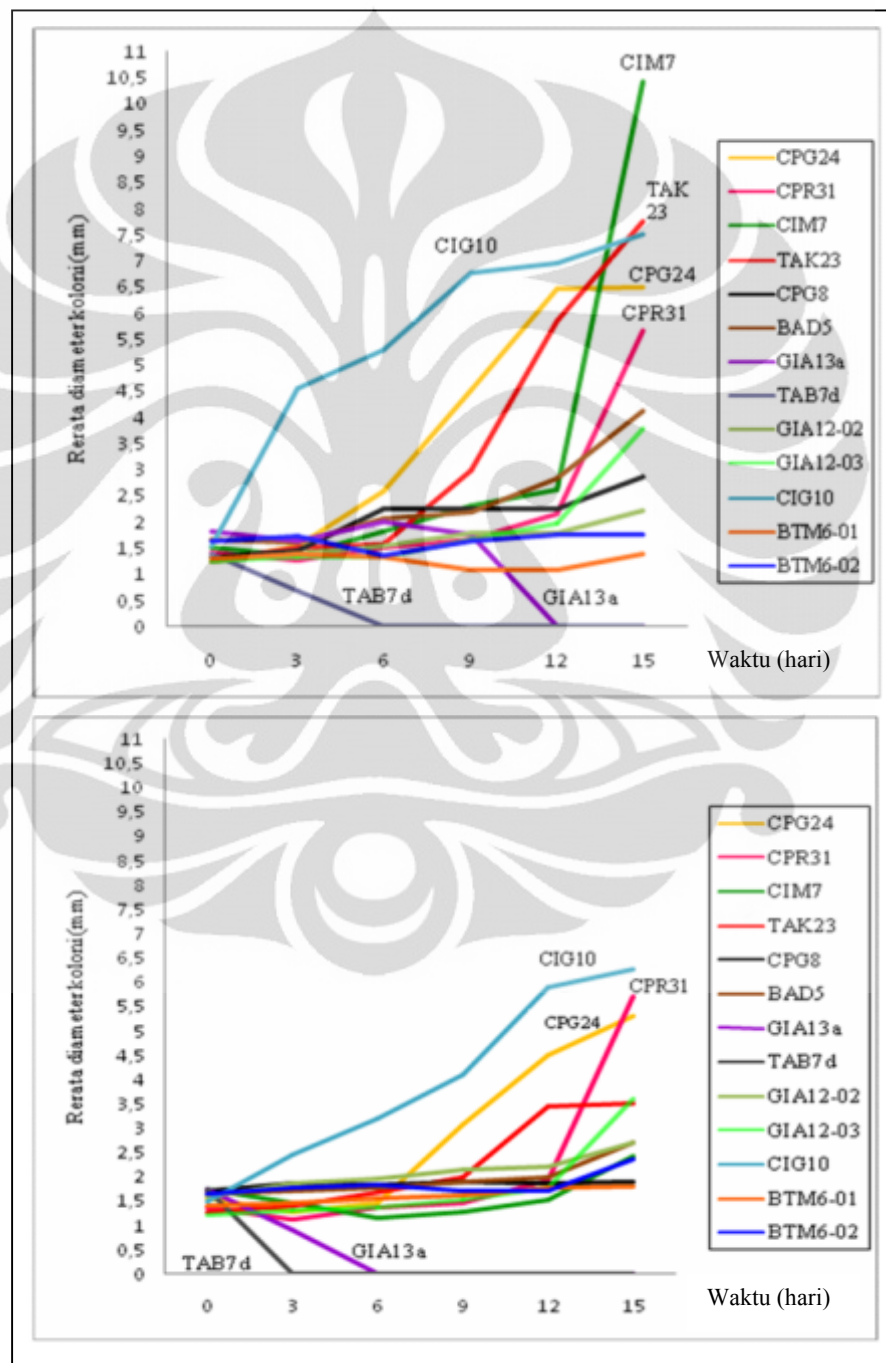
Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat variasi hasil rerata diameter awal (t₀) 13 koloni hasil preservasi pada H₁ dan H₇. Hasil tersebut menandakan terdapat penambahan diameter koloni sebelum *freezing* dengan setelah *thawing*. Penambahan diameter koloni tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan kondisi fisiologis pada setiap koloni masing-masing strain. Perbedaan kondisi fisiologis masing-masing strain memungkinkan terjadinya perbedaan dalam merespon tekanan osmotik yang terjadi selama proses *freezing* dan *thawing*.

Rerata diameter akhir 11 koloni hasil preservasi pada H₁ dan H₇ yang berhasil tumbuh bervariasi antara 1,40--10,44 mm. Hasil preservasi pada H₁ menunjukkan bahwa rerata diameter koloni terbesar ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CIM7, yaitu sebesar 10,44 mm, sedangkan rerata diameter koloni terkecil ditunjukkan oleh strain *Nostoc* BTM6-01 dengan diameter koloni sebesar 1,40 mm. Hasil preservasi pada H₇ menunjukkan bahwa strain yang memiliki rerata diameter koloni akhir terbesar adalah strain *Nostoc* CIG10, yaitu sebesar 6,26 mm, sedangkan strain yang memiliki diameter akhir koloni terkecil yaitu strain *Nostoc* BTM6-01 dengan rerata diameter sebesar 1,81 mm.

Timotius (1982: 120) menyatakan bahwa arti pertumbuhan dapat ditinjau dari dua segi, yaitu dari segi sel secara individu dan dari segi populasi. Pertumbuhan sel ditunjukkan dengan adanya pembelahan sel dan penambahan ukuran sel, sedangkan pertumbuhan populasi dapat diketahui dari adanya penambahan jumlah atau massa sel yang tumbuh. Bertambahnya diameter koloni strain *Nostoc* setelah ditumbuhkan kembali menunjukkan bahwa telah terjadi

pertumbuhan pada koloni *Nostoc*. Pertumbuhan yang dimaksud adalah penambahan jumlah sel dalam tiap koloni.

Pertumbuhan strain *Nostoc* setelah preservasi juga dapat disajikan dalam bentuk kurva pertumbuhan. Gambar 4.4 menyajikan kurva rerata penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* hasil preservasi selama 1 hari dan 7 hari.



Gambar 4.4 Kurva rerata penambahan diameter koloni 13 strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ (atas) dan H₇ (bawah)

Berdasarkan kurva, dapat dilihat pertumbuhan strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ lebih cepat daripada pertumbuhan strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₇. Beberapa strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ umumnya hanya mengalami fase adaptasi selama 3--6 hari, yaitu dari t₀ hingga t₃ atau t₆. Hal berbeda ditunjukkan oleh strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₇ yang memperlihatkan fase adaptasi lebih lama, yaitu dari t₀ hingga t₆ atau t₉. Salah satu strain *Nostoc*, yaitu strain *Nostoc* CIG10 bahkan tidak memperlihatkan fase adaptasi, baik pada H₁ maupun H₇. Fase adaptasi strain *Nostoc* CIG10 diduga berlangsung kurang dari 3 hari karena telah terjadi peningkatan grafik yang cukup tinggi dari t₀ hingga t₃.

Menurut Gandjar *dkk.* (2006: 39), fase lag/fase adaptasi merupakan fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan dan pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat. Fogg & Thake (1987:13) melaporkan bahwa lama fase adaptasi mikroalga bergantung pada umur kultur, jumlah inokulum, jenis medium, serta faktor fisiologis masing-masing jenis mikroalga dalam memanfaatkan nutrisi dalam medium. Perbedaan lama fase adaptasi pada strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ dan H₇ dapat disebabkan oleh dua faktor, yaitu perbedaan jumlah inokulum dan faktor fisiologis *Nostoc* dalam memanfaatkan nutrisi dalam medium.

Faktor pertama adalah perbedaan jumlah inokulum. Jumlah inokulum yang berbeda ditandai oleh perbedaan diameter awal koloni masing-masing strain pada t₀. Perbedaan diameter awal koloni mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pada tiap koloni ketika ditanam. Li & Gao (2004:10) melaporkan bahwa diameter koloni yang berbeda pada strain *Nostoc sphaeroides* berpengaruh pada laju metabolisme strain tersebut setelah preservasi.

Faktor kedua adalah perbedaan kondisi fisiologis, kimiawi, dan metabolisme masing-masing strain. Strain *Nostoc* yang dipreservasi pada H₇, lebih lama berada pada suhu rendah (-4° C) daripada strain *Nostoc* yang dipreservasi pada H₁. Menurut Kvéderová (2004: 9), suhu rendah dapat menyebabkan penurunan laju metabolisme sel. Hal tersebut diduga memengaruhi kemampuan strain *Nostoc* dalam memanfaatkan nutrisi dan beradaptasi kembali dengan medium pertumbuhan yang baru setelah ditumbuhkan.

Beberapa strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ telah mengalami fase eksponensial pada t₃ atau t₆. Hal tersebut berbeda dengan strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₇ yang rata-rata mengalami fase eksponensial pada t₆ atau t₉ (Gambar 4.3). Menurut Fogg & Thake (1987: 13&30), pada fase eksponensial, jumlah sel meningkat dengan cepat karena sel-sel membelah dengan kecepatan maksimal. Apabila waktu inkubasi diperpanjang menjadi 21 hari (t₂₁) atau 28 hari (t₂₈), maka akan terlihat bahwa kesebelas strain *Nostoc* yang mampu tumbuh setelah dipreservasi dengan metode *freezing* pada H₁ dan H₇, masih terus tumbuh hingga mencapai stasioner.

Apabila dibandingkan dengan pertumbuhan strain-strain *Nostoc* umur 15 hari (normal), terlihat bahwa kurva pertumbuhan strain-strain *Nostoc* hasil preservasi/perlakuan (Gambar 4.4) memiliki pola yang tidak jauh berbeda dengan kurva pertumbuhan strain-strain *Nostoc* normal (Gambar 4.3). Strain *Nostoc* CPG24 dan TAK23, baik perlakuan maupun normal, terlihat mengalami fase eksponensial pada hari ke-6 (t₆). Demikian pula pada strain *Nostoc* CIM7, yang mengalami fase eksponensial pada hari ke-12 (t₁₂). Strain-strain *Nostoc* lainnya, seperti strain *Nostoc* GIA12-03, BAD5, CPG8, BTM6-01, BTM6-02, GIA12-02, dan GIA12-03, baik perlakuan maupun normal, juga memiliki pola yang serupa dan terlihat baru memasuki fase eksponensial setelah hari ke-12 (t₁₂).

Pola kurva yang sedikit berbeda antara strain *Nostoc* perlakuan dan normal, ditunjukkan oleh strain *Nostoc* TAB7d, GIA13a, CIG10, dan CPR31. Strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a perlakuan memang mengalami kematian setelah preservasi sehingga kurva mengalami penurunan drastis setelah beberapa hari beradaptasi (Gambar 4.4). Hal tersebut berbeda dengan kurva pertumbuhan strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a normal yang tampak masih terus meningkat hingga hari ke-15 (Gambar 4.3).

Kurva strain *Nostoc* CIG10 perlakuan langsung meningkat dari t₀ hingga t₃ (Gambar 4.4), sedangkan kurva strain *Nostoc* CIG10 normal baru meningkat secara signifikan pada t₉ (Gambar 4.3). Hal tersebut menunjukkan bahwa fase eksponensial strain *Nostoc* CIG10 perlakuan berlangsung jauh lebih cepat daripada fase eksponensial strain *Nostoc* CIG10 normal. Penyimpanan pada suhu rendah (-4° C) diduga justru merangsang pertumbuhan strain *Nostoc* CIG10

menjadi lebih cepat. Hal yang berbeda ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CPR31. Penyimpanan pada suhu rendah (-4°C) tampaknya justru memperlambat pertumbuhan strain *Nostoc* CPR31. Hal tersebut terlihat pada kurva strain *Nostoc* CPR31 perlakuan yang baru mengalami peningkatan atau eksponensial pada t_{12} (Gambar 4.4), sedangkan kurva strain *Nostoc* CPR31 normal telah mengalami peningkatan atau eksponensial pada t_6 (Gambar 4.3).

Strain-strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian memiliki dua tipe profil koloni, yaitu profil koloni menyebar dan profil koloni menggunung. Perbedaan pola kurva pertumbuhan masing-masing strain *Nostoc* diduga pula disebabkan oleh perbedaan profil koloni masing-masing strain *Nostoc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar memiliki diameter akhir koloni yang lebih besar pada t_{15} daripada strain *Nostoc* yang memiliki profil koloni menggunung, baik yang dipreservasi pada H_1 maupun H_7 (Tabel 4.4). Strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar yang dipreservasi pada H_1 memiliki diameter akhir koloni berkisar antara 1,40--10,44 mm, sedangkan strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung yang dipreservasi pada H_1 memiliki diameter akhir koloni yang hanya mencapai kisaran 0--4,13 mm. Demikian juga strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar yang dipreservasi pada H_7 , memiliki diameter akhir koloni antara 1,81--6,26, sedangkan strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung yang dipreservasi pada H_7 hanya memiliki diameter akhir koloni yang berkisar antara 0--2,71 mm.

Perbedaan profil koloni dapat menyebabkan perbedaan kecepatan tumbuh tiap koloni yang berbeda pula. Kecepatan tumbuh tiap koloni strain *Nostoc* telah berhasil diketahui dengan membagi rerata penambahan diameter koloni strain *Nostoc* dari t_0 hingga t_{15} dengan jumlah hari ditumbuhkan (15 hari) (Tabel 4.5).

Tabel 4.5 Perbandingan kecepatan tumbuh 13 strain *Nostoc* setelah dipreservasi pada H₁ dan H₇

Kode strain <i>Nostoc</i>	Profil koloni	Preservasi pada H ₁			Preservasi pada H ₇		
		Σ Diameter koloni (mm)		Kecepatan Tumbuh (mm/hari)	Σ Diameter koloni (mm)		Kecepatan Tumbuh (mm/hari)
		T ₀	T ₁₅		T ₀	T ₁₅	
CPG24	Menyebar	1,24	6,49	0,35	1,56	5,30	0,25
CPR31	Menyebar	1,42	5,66	0,28	1,38	5,71	0,29
CIM7	Menyebar	1,52	10,44	0,59	1,74	2,42	0,05
TAK23	Menyebar	1,27	7,75	0,43	1,27	3,50	0,15
GIA12-03	Menyebar	1,27	3,80	0,17	1,21	3,59	0,16
CIG10	Menyebar	1,55	7,50	0,39	1,49	6,26	0,32
BTM6-01	Menyebar	1,30	1,40	0,01	1,39	1,81	0,03
CPG8	Menggunung	1,33	2,87	0,10	1,71	1,89	0,01
BAD5	Menggunung	1,66	4,13	0,17	1,64	2,71	0,07
GIA13A	Menggunung	1,83	0	-0,12	1,75	0	-0,12
TAB7d	Menggunung	1,39	0	-0,09	1,74	0	-0,12
GIA12-02	Menggunung	1,27	3,80	0,07	1,60	2,69	0,07
BTM6-02	Menggunung	1,62	1,76	0,01	1,66	2,35	0,05

Berdasarkan Tabel 4.5 terlihat bahwa hampir semua strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar memiliki kecepatan tumbuh yang lebih cepat daripada strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung, baik pada H₁ maupun H₇. Kecepatan tumbuh strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar setelah preservasi pada H₁ berkisar antara 0,01--0,59 mm/hari, sedangkan kecepatan tumbuh strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung setelah preservasi pada H₁ hanya berkisar antara -0,12--0,17 mm/hari. Hal yang sama ditunjukkan oleh strain *Nostoc* yang dipreservasi pada H₇. Kecepatan tumbuh strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar setelah preservasi pada H₇ berkisar antara 0,03--0,32 mm/hari, sedangkan kecepatan tumbuh strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung setelah preservasi pada H₇ hanya berkisar antara -0,12--0,07 mm/hari.

Strain *Nostoc* yang memiliki profil koloni menyebar pada umumnya memiliki kecepatan tumbuh yang lebih cepat dibandingkan strain *Nostoc* yang memiliki profil koloni menggunung. Hal tersebut disebabkan karena strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar memiliki perbandingan luas permukaan dan volume yang lebih besar dibandingkan dengan strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung. Menurut Chang (1980), perbandingan antara luas permukaan dan volume sel yang besar pada koloni *Nostoc* dengan profil koloni

menyebarkan memungkinkan lebih banyak sel melakukan kontak langsung dengan medium sehingga memudahkan penyerapan nutrisi langsung dari medium (Li & Gao 2004: 13).

Kemungkinan lain yang dapat memengaruhi pertumbuhan strain *Nostoc* setelah preservasi adalah faktor genetik. Brock & Madigan (1991: 313) menyatakan bahwa karakteristik genetik merupakan salah satu faktor yang memengaruhi kecepatan pertumbuhan mikroorganisme. Karakteristik genetik yang berbeda antara strain *Nostoc* menyebabkan laju pemanfaatan nutrisi pada medium pertumbuhan yang juga berbeda, sehingga memengaruhi kecepatan tumbuh masing-masing strain *Nostoc* setelah preservasi.

4.3 Respon Tumbuh Strain-strain *Nostoc* setelah Dipreservasi dengan Metode *Freezing* (-4°C) pada H₁ dan H₇ Menggunakan DMSO 5% (Perlakuan)

Respon tumbuh strain *Nostoc* terhadap *freezing* juga dapat dievaluasi secara kuantitatif dengan rasio rerata (Σ) penambahan diameter koloni masing-masing strain *Nostoc* sebelum dan setelah preservasi. Penghitungan rasio Σ penambahan diameter koloni telah berhasil dilakukan terhadap 11 strain *Nostoc* yang berhasil dipreservasi dari total 13 strain yang ada (Tabel 4.6).

Tabel 4.6 Rasio Σ penambahan diameter koloni 11 strain *Nostoc* setelah dipreservasi dengan metode *freezing* (-4°C) pada H₁ dan H₇ menggunakan DMSO 5% (perlakuan)

Kode Strain	Σ Diameter Koloni (mm)					
	H ₁			H ₇		
	T ₀	T ₁₅	Rasio Σ penambahan diameter koloni	T ₀	T ₁₅	Rasio Σ penambahan diameter koloni
CPG24	1,24	6,49	4,23	1,56	5,30	2,40
CPR31	1,42	5,66	2,99	1,38	5,71	3,14
CIM7	1,52	10,44	5,87	1,74	2,42	0,39
TAK23	1,27	7,75	5,10	1,27	3,50	1,76
CPG8	1,33	2,87	1,16	1,71	1,89	0,11
BAD5	1,66	4,13	1,49	1,64	2,71	0,65
GIA12-02	1,22	2,21	0,81	1,60	2,69	0,68
GIA12-03	1,27	3,80	1,99	1,21	3,59	1,97
CIG10	1,55	7,50	3,84	1,49	6,26	3,20
BTM6-01	1,30	1,40	0,08	1,39	1,81	0,30
BTM6-02	1,62	1,76	0,09	1,66	2,35	0,42

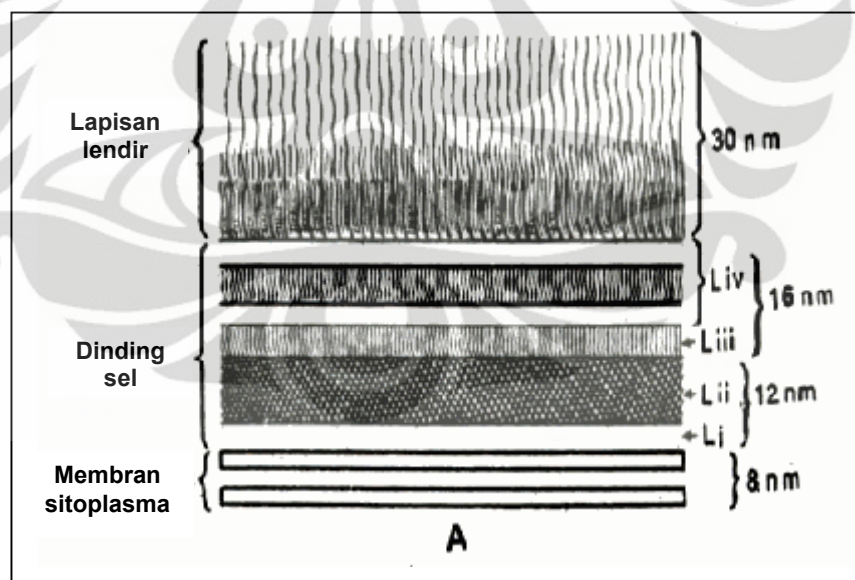
Berdasarkan Tabel 4.6, seluruh strain *Nostoc* memiliki respon tumbuh yang berbeda-beda pada H₁ dan H₇. Rasio Σ penambahan diameter koloni sebelas strain *Nostoc* berkisar antara 0,08--5,87. Sebanyak 2 strain *Nostoc* perlakuan yang dipreservasi pada H₁ memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni di atas 5, yaitu strain *Nostoc* CIM7 dengan rasio sebesar 5,87 dan strain *Nostoc* TAK23 dengan rasio sebesar 5,10. Strain yang memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni pada kisaran 1--5 pada H₁, yaitu strain *Nostoc* CPG8, BAD5, GIA12-03, CPR31, CIG10, dan CPG24. Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* tersebut masing-masing sebesar 1,16, 1,49, 1,99, 2,99, 3,84, dan 4,23. Sementara itu, strain *Nostoc* yang memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni di bawah 1 pada H₁ adalah strain *Nostoc* BTM6-01, BTM6-02, dan GIA12-02, dengan rasio masing-masing strain sebesar 0,08, 0,09, dan 0,81.

Respon tumbuh strain *Nostoc* setelah preservasi selama 7 hari (H₇) dihitung dengan tujuan mengetahui pengaruh lama waktu penyimpanan terhadap strain *Nostoc* yang dipreservasi. Berdasarkan perhitungan, sebanyak 8 strain *Nostoc* perlakuan yang dipreservasi pada H₇ memiliki respon tumbuh yang lebih lambat daripada strain *Nostoc* perlakuan yang dipreservasi pada H₁. Tidak ada satu pun strain *Nostoc* yang mencapai rasio Σ penambahan diameter koloni di atas 5 setelah dipreservasi pada H₇. Respon tumbuh tercepat strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₇ ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CIG10 dengan rasio Σ penambahan diameter koloni sebesar 3,20. Rasio Σ penambahan diameter koloni antara 1--3 ditunjukkan oleh strain *Nostoc* TAK23, GIA12-03, dan CPG24, dengan rasio masing-masing strain sebesar 1,76, 1,97, dan 2,40. Sementara itu, rasio Σ penambahan diameter koloni di bawah 1 ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CPG8, BTM6-01, CIM7, BTM6-02, BAD5, dan GIA12-02, dengan rasio masing-masing strain sebesar 0,11, 0,30, 0,39, 0,42, 0,65, dan 0,68.

Strain-strain *Nostoc* yang dipreservasi pada H₇ memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni antara 0,11--3,20. Walaupun berhasil tumbuh, namun strain-strain *Nostoc* tersebut mengalami respon tumbuh yang lebih lambat dibandingkan dengan strain *Nostoc* yang dipreservasi pada H₁. Bahkan, terdapat beberapa strain *Nostoc* pada H₇, seperti strain *Nostoc* CIM7 dan TAK23, yang memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni yang jauh lebih kecil daripada H₁.

Rasio Σ penambahan diameter koloni CIM7 menurun cukup signifikan dari 5,87 pada H₁ menjadi hanya 0,39 pada H₇. Begitu pula dengan rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* TAK23 yang menurun dari 5,10 pada H₁ menjadi hanya 1,76 pada H₇. Rasio Σ penambahan diameter koloni yang lebih rendah memberikan asumsi bahwa beberapa strain *Nostoc* yang digunakan dalam penelitian mampu bertahan terhadap *freezing* (-4° C), akan tetapi kemampuan tumbuhnya menjadi lebih lambat apabila dipreservasi dalam jangka waktu yang lama. Hasil tersebut diharapkan dapat menjadi acuan mengenai lama waktu preservasi yang sesuai bagi strain *Nostoc*.

Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* yang bervariasi, baik pada H₁ maupun H₇, menunjukkan bahwa setiap strain *Nostoc* memiliki respon tumbuh yang berbeda terhadap *freezing*. Respon tumbuh masing-masing strain yang berbeda terhadap *freezing* diduga disebabkan oleh perbedaan komposisi dan ketebalan lapisan lendir (*mucilaginous*) pada setiap strain *Nostoc*.



Gambar 4.5. Struktur lapisan lendir (*mucilaginous*) Cyanobacteria [Sumber: modifikasi dari Sharma 1992: 92.]

Gambar 4.5 menunjukkan struktur lapisan lendir (*mucilaginous*) Cyanobacteria. Lapisan lendir pada Cyanobacteria merupakan komponen penting yang dapat melindungi sel dari proses dehidrasi selama *freezing* (Huang *dkk.*

2004: 1186). Strain *Nostoc* yang memiliki lapisan lendir yang lebih tebal diduga akan mengalami lebih sedikit kerusakan dibandingkan dengan strain *Nostoc* yang memiliki lapisan lendir yang lebih tipis. Strain yang hanya sedikit mengalami kerusakan sel cenderung memiliki kemampuan bertahan (survival) yang lebih baik terhadap *freezing*.

4.4 Respon Tumbuh Strain-strain *Nostoc* setelah Dipreservasi dengan Metode *Freezing* (-4° C) pada H₁ dan H₇ Tanpa Menggunakan DMSO 5% (Kontrol)

Penghitungan rasio Σ penambahan diameter koloni juga dilakukan terhadap 11 strain *Nostoc* yang berhasil tumbuh setelah dipreservasi dengan metode *freezing* (-4° C) pada H₁ dan H₇ tanpa menggunakan DMSO 5% (kontrol). Penghitungan tersebut dilakukan untuk mengetahui pengaruh penggunaan protektan, dalam penelitian ini adalah DMSO, terhadap respon tumbuh strain *Nostoc* yang dipreservasi.

Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* kontrol yang dipreservasi pada H₁, berkisar antara 0,02--4,58. Rasio penambahan diameter koloni terbesar pada H₁ ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CIM7 dengan rasio sebesar 4,58. Rasio Σ penambahan diameter koloni terkecil ditunjukkan oleh strain *Nostoc* BTM6-02 dengan rasio sebesar 0,02.

Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* kontrol pada H₇ berkisar antara 0,00--2,62. Rasio Σ penambahan diameter koloni terbesar ditunjukkan oleh strain *Nostoc* CPG24 dengan rasio sebesar 2,62, sedangkan rasio Σ penambahan diameter koloni terkecil ditunjukkan oleh strain *Nostoc* TAK23 dan BTM6-01 dengan rasio sebesar 0,00. Tabel 4.7 menyajikan hasil penghitungan rasio Σ penambahan diameter koloni 11 strain *Nostoc* kontrol yang dipreservasi dengan metode *freezing* (-4° C) pada H₁ dan H₇.

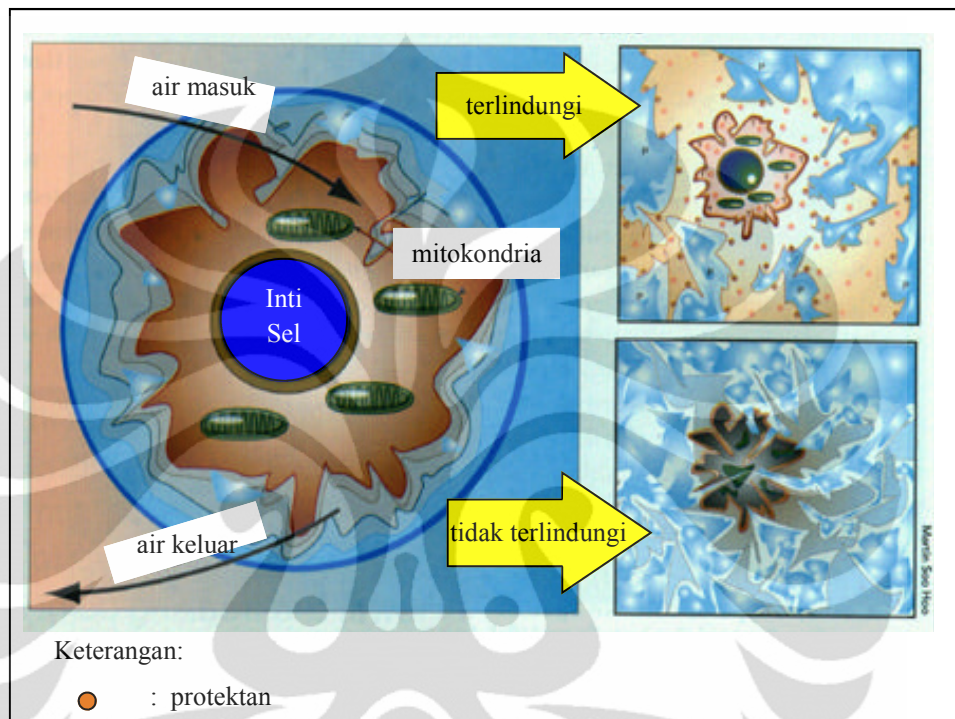
Tabel 4.7. Rasio Σ penambahan diameter koloni 11 strain *Nostoc* setelah dipreservasi dengan metode *freezing* (-4° C) pada H₁ dan H₇ tanpa menggunakan DMSO 5% (kontrol)

Kode Strain	Σ Diameter Koloni (mm)					
	H ₁			H ₇		
	T ₀	T ₁₅	Rasio Σ penambahan diameter koloni	T ₀	T ₁₅	Rasio Σ penambahan diameter koloni
CPG24	1,07	5,33	3,98	1,23	4,45	2,62
CPR31	1,29	5,86	3,52	1,46	4,93	2,34
CIM7	1,41	7,86	4,58	1,91	2,39	0,25
TAK23	1,27	3,82	2,01	1,68	0,84	0,00
CPG8	1,31	2,28	0,74	1,37	1,51	0,10
BAD5	1,45	2,20	0,52	1,50	2,01	0,34
GIA12-02	1,37	1,74	0,27	1,68	1,90	0,13
GIA12-03	1,10	1,44	0,31	1,25	1,44	0,15
CIG10	1,54	5,61	2,64	1,39	4,81	2,46
BTM6-01	1,28	1,71	0,32	1,31	0,59	0,00
BTM6-02	1,63	1,67	0,02	1,61	1,73	0,08

Berdasarkan Tabel 4.7, sebanyak 9 strain dari total 11 strain *Nostoc* kontrol yang dipreservasi pada H₁ memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni yang lebih kecil daripada strain *Nostoc* perlakuan yang dipreservasi pada H₁ (Tabel 4.6). Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* kontrol yang lebih kecil daripada perlakuan tidak hanya terdapat pada H₁, melainkan juga pada H₇. Sebanyak 10 strain *Nostoc* kontrol yang dipreservasi pada H₇ menunjukkan rasio Σ penambahan diameter koloni yang lebih kecil dibandingkan dengan H₁.

Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* kontrol yang lebih kecil dibandingkan perlakuan, mengindikasikan bahwa terdapat pengaruh protektan dalam preservasi strain *Nostoc* dengan menggunakan metode *freezing*. Penggunaan protektan penting dalam menjaga ketahanan strain *Nostoc* selama preservasi. Hal tersebut berkaitan dengan kemampuan protektan dalam memberikan perlindungan bagi sel terhadap adanya kemungkinan kerusakan selama proses pembekuan (*cryoinjury*) (Doneva & Donev 2004: 22). Protektan dapat menurunkan titik beku air sehingga dapat mencegah pembentukan kristal es ekstraseluler yang terlalu cepat (Leung 1991: 242). Selain itu, protektan dapat menstabilisasi membran bilayer dan menjaga integritas membran selama proses *freezing*, sehingga viabilitas strain tetap tinggi (Storey & Storey 2005: 22)

(Gambar 4.6). Silva *dkk.* (2007: 241) melaporkan bahwa *Tolypothrix tenuis* yang dipreservasi dengan metode *freezing* pada -20°C selama 3 bulan dengan menggunakan metanol memiliki viabilitas yang lebih tinggi sebesar 59,24% dibandingkan dengan kontrol yang hanya memiliki viabilitas sebesar 40,76%.



Gambar 4.6. Respon sel dengan dan tanpa penambahan protektan terhadap *freezing*
 [Sumber: modifikasi dari Storey & Storey 2005: 22.]

Ketahanan sel selama *freezing* erat kaitannya dengan kondisi membran sel selama proses *freezing* berlangsung. Membran sel harus dilindungi dari berbagai stress mekanik yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Penambahan protektan penting untuk menjaga ketahanan strain *Nostoc* selama preservasi, karena protektan dapat melindungi membran sel dari kerusakan akibat *freezing*. Janz & Maclean (*lihat Rao dkk.* 1977: 8) menyatakan bahwa rusaknya permeabilitas membran sel merupakan faktor utama penyebab rendahnya viabilitas sel.

DMSO selain dapat melakukan penetrasi ke dalam sel, juga dapat membuat membran sel menjadi lebih padat dan stabil sehingga dapat meningkatkan permeabilitas membran. Mekanisme perlindungan DMSO terhadap membran sel adalah dengan membentuk ikatan hidrogen dengan gugus

fosfat pada membran fosfolipid sehingga stabilitas membran terjaga. Permeabilitas membran yang lebih baik akibat penambahan DMSO dapat menjaga suatu sel dari kematian atau tetap hidup (*viable*). Selain itu, DMSO juga berperan dalam meregulasi tekanan osmotik sel selama *freezing* karena DMSO berada di bawah *lipid headgroups* sehingga sel terhindar dari kerusakan selama proses *freezing* berlangsung (Notman *dkk.* 2006: 13982).

Strain *Nostoc* CPR31 dan BTM6-01 kontrol pada H₁ (Tabel 4.7) memiliki rasio penambahan Σ diameter koloni yang lebih besar daripada strain *Nostoc* CPR31 dan BTM6-01 perlakuan pada H₁ (Tabel 4.6). Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* CPR31 kontrol sebesar 3,52, sedangkan rasio Σ penambahan strain strain *Nostoc* CPR31 perlakuan hanya sebesar 2,99. Demikian juga dengan strain *Nostoc* BTM6-01 kontrol yang memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni sebesar 0,32 dibandingkan dengan rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* BTM6-01 perlakuan yang hanya sebesar 0,08.

Rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* kontrol yang lebih besar daripada perlakuan, tidak hanya diperlihatkan oleh strain pada H₁ melainkan juga pada H₇. Hasil penghitungan diameter koloni strain *Nostoc* setelah dipreservasi pada H₇ menunjukkan bahwa strain *Nostoc* CPG24 kontrol memiliki rasio Σ penambahan diameter koloni yang lebih besar daripada strain *Nostoc* CPG24 perlakuan. Hal tersebut diketahui berdasarkan rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* CPG24 kontrol sebesar 2,62 dibandingkan dengan rasio Σ penambahan diameter koloni strain *Nostoc* CPG24 perlakuan yang hanya sebesar 2,40.

Rasio Σ penambahan diameter koloni beberapa strain *Nostoc* kontrol yang lebih tinggi daripada perlakuan memberikan asumsi bahwa terdapat kemungkinan strain *Nostoc* dapat bertahan terhadap *freezing* tanpa penambahan protektan. Beberapa strain alga seperti *Chlorella protothecoides* Shihira *et* Kraus dan *Chlorella vulgaris* dapat bertahan terhadap pembekuan langsung dalam nitrogen cair tanpa menggunakan protektan (McLellan 1991: 202; Day & Brand 2005: 170). Toleransi terhadap *freezing* tanpa penambahan protektan mungkin saja terjadi mengingat *Nostoc* memiliki beberapa mekanisme dalam menolerir *cold shock* akibat proses *freezing* (Zakhia *dkk.* 2005: 129). Selain itu, terdapat asumsi

lain bahwa strain *Nostoc* CPR31, BTM6-01, dan CPG24 sangat sensitif terhadap penambahan protektan DMSO. Konsentrasi DMSO sebesar 5% mungkin berakibat toksik sehingga menimbulkan efek yang merugikan bagi ketiga strain tersebut. Adam *dkk.* (lihat Day & Brand 2005: 173) menyatakan bahwa konsentrasi DMSO yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi membran sel dan menyebabkan ketidakstabilan protein, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan sel.

4.5 Efek *Freezing* terhadap Strain *Nostoc*

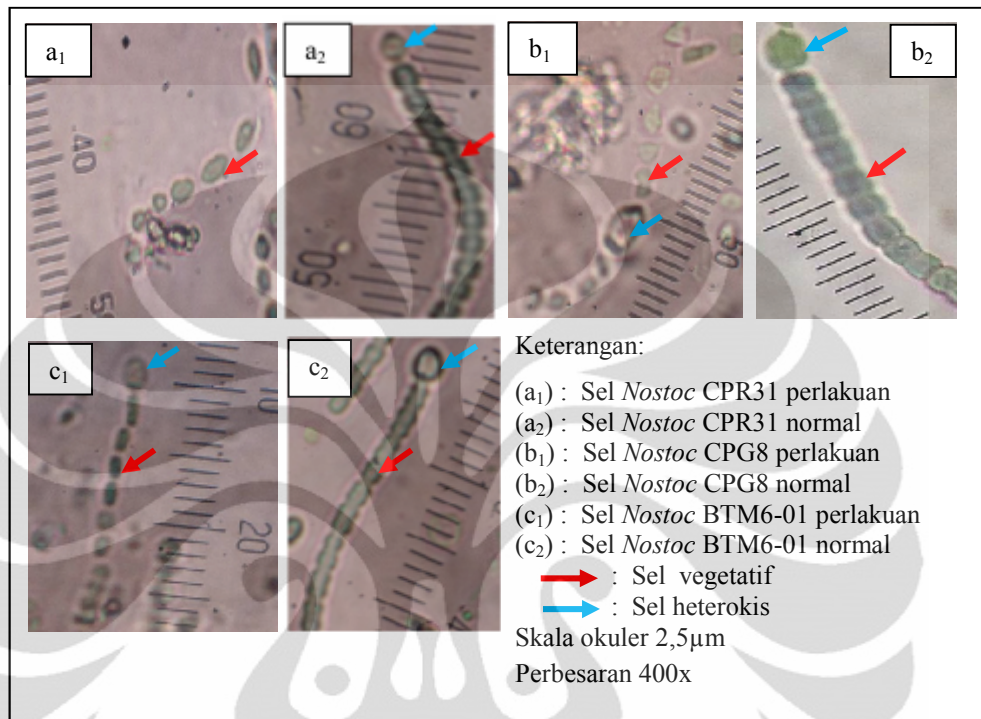
4.5.1 Kerusakan Sel *Pasca Thawing*

Walaupun beberapa strain *Nostoc* memperlihatkan kemampuan bertahan terhadap suhu rendah, kerusakan sel merupakan salah satu akibat yang sangat mungkin terjadi akibat proses *freezing*. Storey & Storey (2005: 3) melaporkan bahwa pembentukan kristal es pada cairan intraselular dapat menyebabkan kerusakan langsung pada sel dan jaringan. Proses *freezing* memungkinkan terganggunya air ekstraselular oleh kristal es sehingga konsentrasi cairan ekstraselular meningkat (hipertonis). Pollari (2008: 19) menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi cairan ekstraselular menyebabkan keluarnya cairan intraselular melalui membran sel akibat perbedaan gradien osmotik antara lingkungan ekstraselular yang hipertonis dengan lingkungan dalam sel yang hipotonis. Peristiwa ini yang disebut sebagai dehidrasi sel.

Dehidrasi dapat menyebabkan terlalu banyak cairan intraselular yang meninggalkan sel sehingga berdampak pada perubahan volume sel di bawah ambang batas volume sel minimum. Hal tersebut berdampak pada besarnya tekanan terhadap membran sel dan membran organel sehingga fungsi membran terganggu. Towill (lihat Tambunan & Mariska 2003: 14) menyatakan bahwa sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat mengalami lisis.

Pengamatan mikroskopis setelah *thawing* menunjukkan bahwa beberapa sel *Nostoc* yang dipreservasi tanpa protektan (kontrol) mengalami kerusakan yang lebih besar daripada sel *Nostoc* yang dipreservasi dengan DMSO. Kerusakan

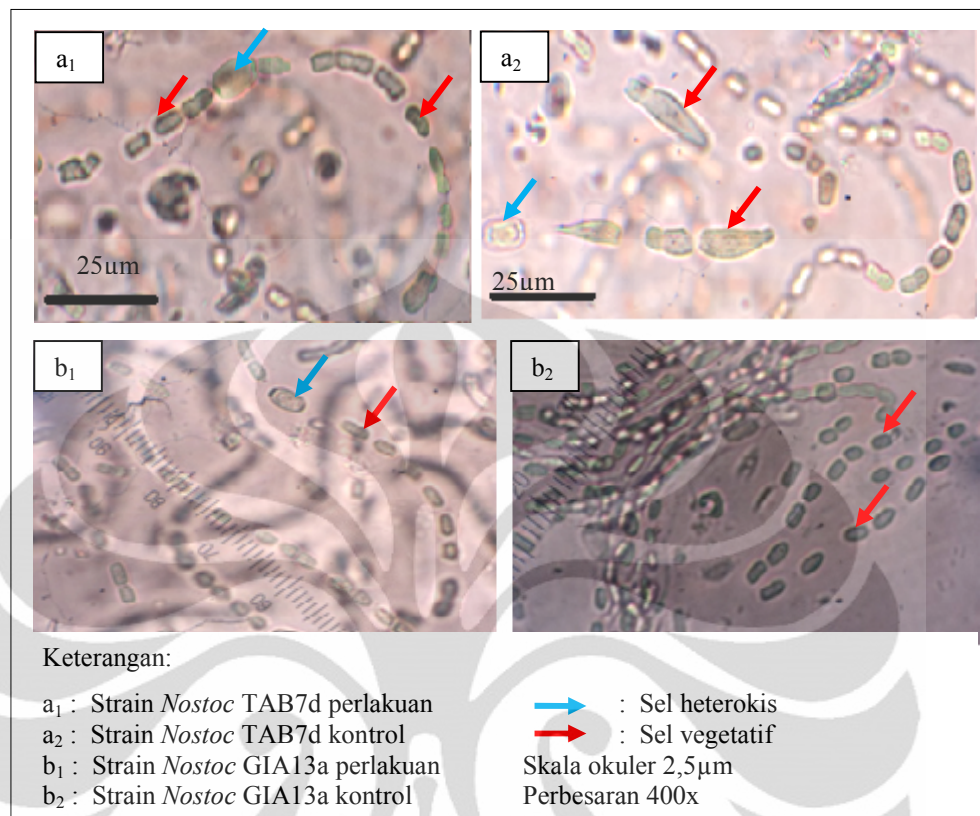
tersebut terlihat berupa reduksi ukuran sel atau terputusnya filamen *Nostoc*. Gambar 4.7 menyajikan perbandingan pengamatan morfologi mikroskopis antara sel *Nostoc* kontrol dan umur 15 hari (normal).



Gambar 4.7. Perbandingan pengamatan mikroskopis pada sel *Nostoc* perlakuan setelah *thawing* dan sel *Nostoc* umur 15 hari (normal)

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].

Kerusakan sel akibat *freezing* dan *thawing* terlihat jelas pada strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a, baik kontrol maupun perlakuan. Kerusakan sel tersebut diduga menjadi penyebab kematian setelah preservasi. Pengamatan pasca *thawing* menunjukkan bahwa filamen strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a tampak terputus dan beberapa sel vegetatif tampak mengalami penambahan volume sel sehingga menyebabkan lisis (Gambar 4.8). Supriatna & Pasaribu (1992: 133) menyatakan proses *thawing* pada suhu cukup tinggi dapat menimbulkan terjadinya kejutan osmotik (*osmotic shock*) sehingga mengakibatkan pengaruh yang mematikan terhadap sel. Kejutan osmotik disebabkan aliran air yang berasal dari proses pencairan mengalir cepat ke dalam sel akibat konsentrasi intraseluler yang tinggi, sehingga sel mengembang dan akhirnya pecah karena tekanan intraseluler yang besar.



Gambar 4.8 Kerusakan sel pasca *thawing* pada strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a yang dipreservasi pada H₁
[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].

Hasil penelitian menunjukkan walaupun protektan telah digunakan dalam preservasi, strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a perlakuan tetap mengalami kematian setelah *freezing*. Terdapat dua kemungkinan penyebab kematian strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a. Kemungkinan pertama, strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a mungkin saja memiliki lapisan lendir yang jauh lebih tipis dibandingkan dengan strain *Nostoc* lainnya. Apabila lapisan lendir terlalu tipis, maka DMSO lebih mudah masuk ke dalam sel dan sel akan terlalu lama terpapar oleh DMSO sehingga DMSO menjadi toksik bagi sel itu sendiri. Selain itu, lapisan lendir yang tipis tersebut juga diduga tidak mampu melindungi sel dari kerusakan mekanik akibat *freezing*, seperti yang terlihat pada strain *Nostoc* TAB7d dan GIA13a kontrol.

Kemungkinan kedua yang turut memengaruhi kegagalan preservasi strain adalah waktu ekuilibrase. Waktu ekuilibrase yang diduga terlalu lama

dibandingkan dengan kecepatan DMSO berpenetrasi ke dalam sel, dapat menyebabkan sel terlalu lama terpapar oleh DMSO sehingga berakibat toksik. Adam *dkk.* (lihat Day & Brand 2005: 173) menyatakan bahwa paparan DMSO yang terlalu lama terhadap sel dapat menyebabkan denaturasi enzim dan menyebabkan ketidakstabilan protein. Supriatna & Pasaribu (1992: 138) melaporkan bahwa ekuilibrasi yang optimum amat penting untuk memperoleh daya proteksi yang maksimum terhadap sel.

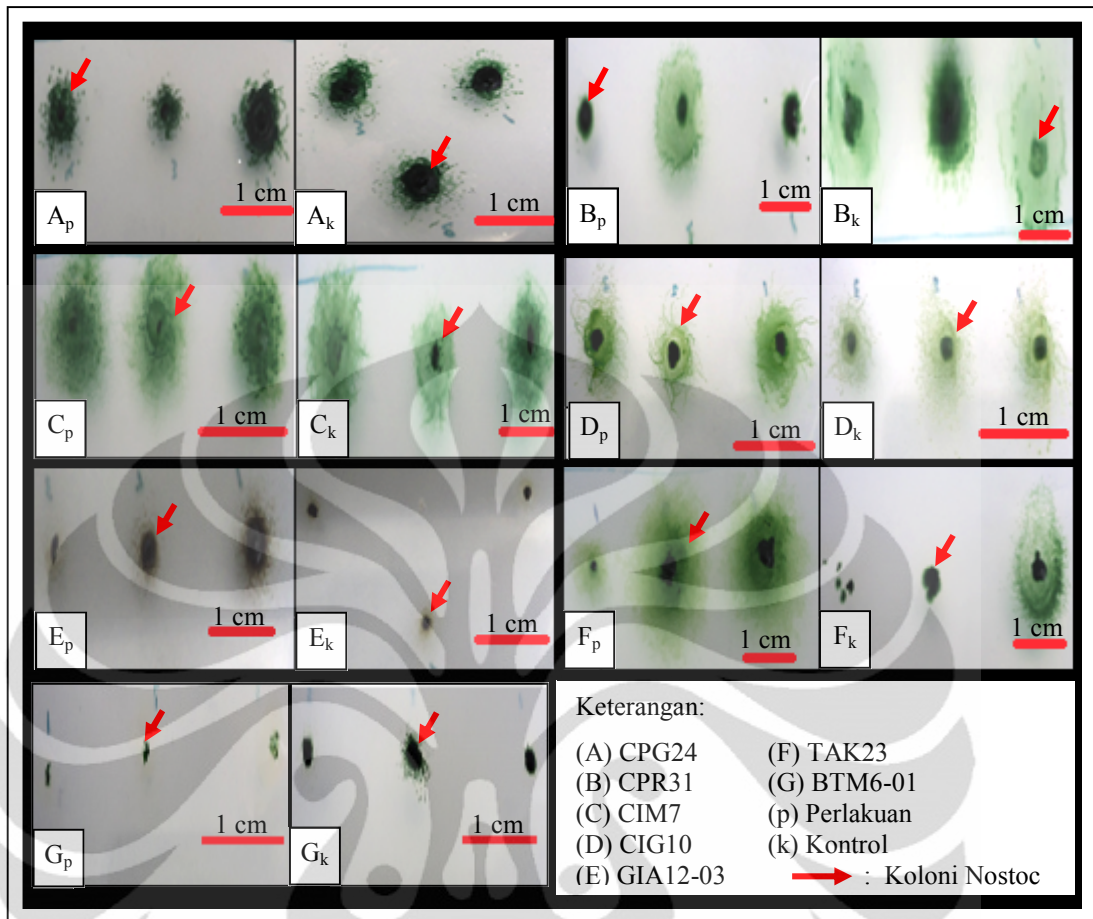
4.5.2 Morfologi Strain *Nostoc* Hasil Preservasi setelah Ditumbuhkan dalam Medium BG11 Bebas Unsur Nitrogen

Penggunaan metode *freezing* pada strain-strain *Nostoc* juga dievaluasi melalui pengamatan morfologi strain-strain *Nostoc* hasil preservasi. Strain-strain *Nostoc* hasil preservasi ditumbuhkan pada medium BG11 bebas unsur nitrogen dan diinkubasi selama 15 hari pada suhu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Crutchfield *dkk.* (1999: 50) menyatakan bahwa respon tumbuh setiap strain terhadap metode *freezing* dapat dievaluasi berdasarkan pengamatan karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis sebelum dan setelah preservasi. Pengamatan morfologi strain *Nostoc* hasil preservasi dilakukan terhadap semua strain *Nostoc* perlakuan dan kontrol yang berhasil tumbuh setelah dipreservasi pada H₁ dan H₇.

Tabel 4.8 dan Gambar 4.9--4.12 menyajikan hasil pengamatan morfologi makroskopis strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ dan H₇. Berdasarkan hasil pengamatan, diperoleh hasil bahwa 11 strain *Nostoc* hasil preservasi pada H₁ dan H₇ baik perlakuan maupun kontrol menunjukkan morfologi makroskopis dan mikroskopis yang tidak berbeda dengan morfologi makroskopis dan mikroskopis strain *Nostoc* sebelum preservasi (Gambar 4.1--4.2 dan Tabel 4.1--4.2).

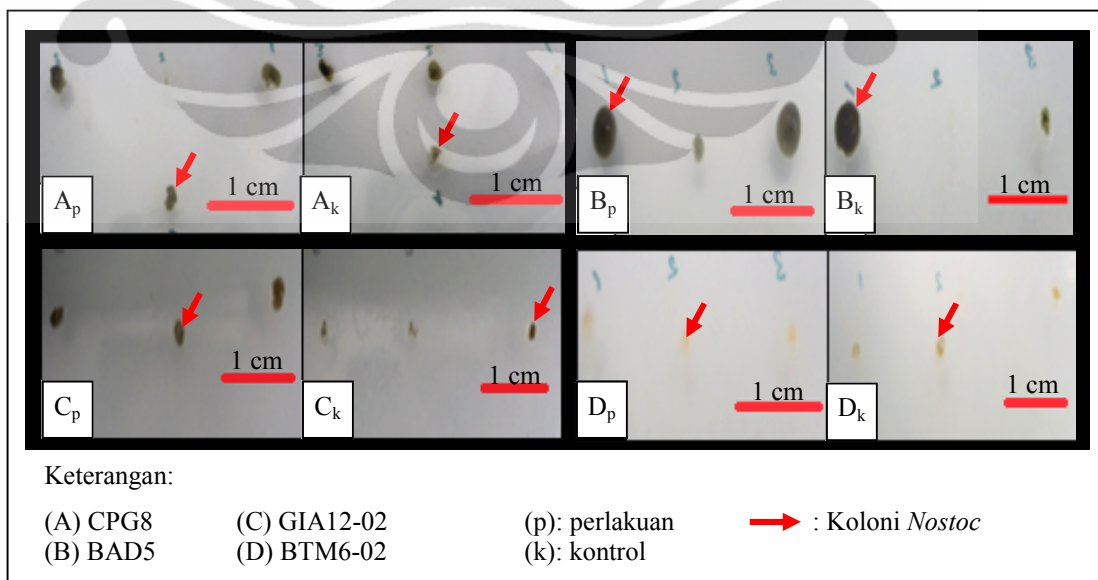
Tabel 4.8. Morfologi makroskopis 11 strain *Nostoc* setelah dipreservasi dengan Metode *Freezing* (-4° C) pada H₁ dan H₇

No	Kode Strain	Perlakuan	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Tekstur Permukaan Koloni	Profil Koloni
1	CPG24	DMSO 5%	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
		Kontrol	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
2	CPR31	DMSO 5%	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
		Kontrol	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
3	CIM7	DMSO 5%	Hijau rumput	Bulat	Licin & Mengilap	Menyebar
		Kontrol	Hijau rumput	Bulat	Licin & Mengilap	Menyebar
4	CIG10	DMSO 5%	Hijau rumput	Bulat	Licin & Mengilap	Menyebar
		Kontrol	Hijau rumput	Bulat	Licin & Mengilap	Menyebar
5	GIA12-03	DMSO 5%	Hijau zaitun	Bulat	Licin	Menyebar
		Kontrol	Hijau zaitun	Bulat	Licin	Menyebar
6	TAK23	DMSO 5%	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
		Kontrol	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
7	BTM6-01	DMSO 5%	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
		Kontrol	Hijau rumput	Bulat	Licin	Menyebar
8	CPG8	DMSO 5%	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
		Kontrol	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
9	BAD5	DMSO 5%	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
		Kontrol	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
10	GIA12-02	DMSO 5%	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
		Kontrol	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
11	BTM6-02	DMSO 5%	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung
		Kontrol	Hijau zaitun	Bulat	Kasar & Bergranul	Menggungung



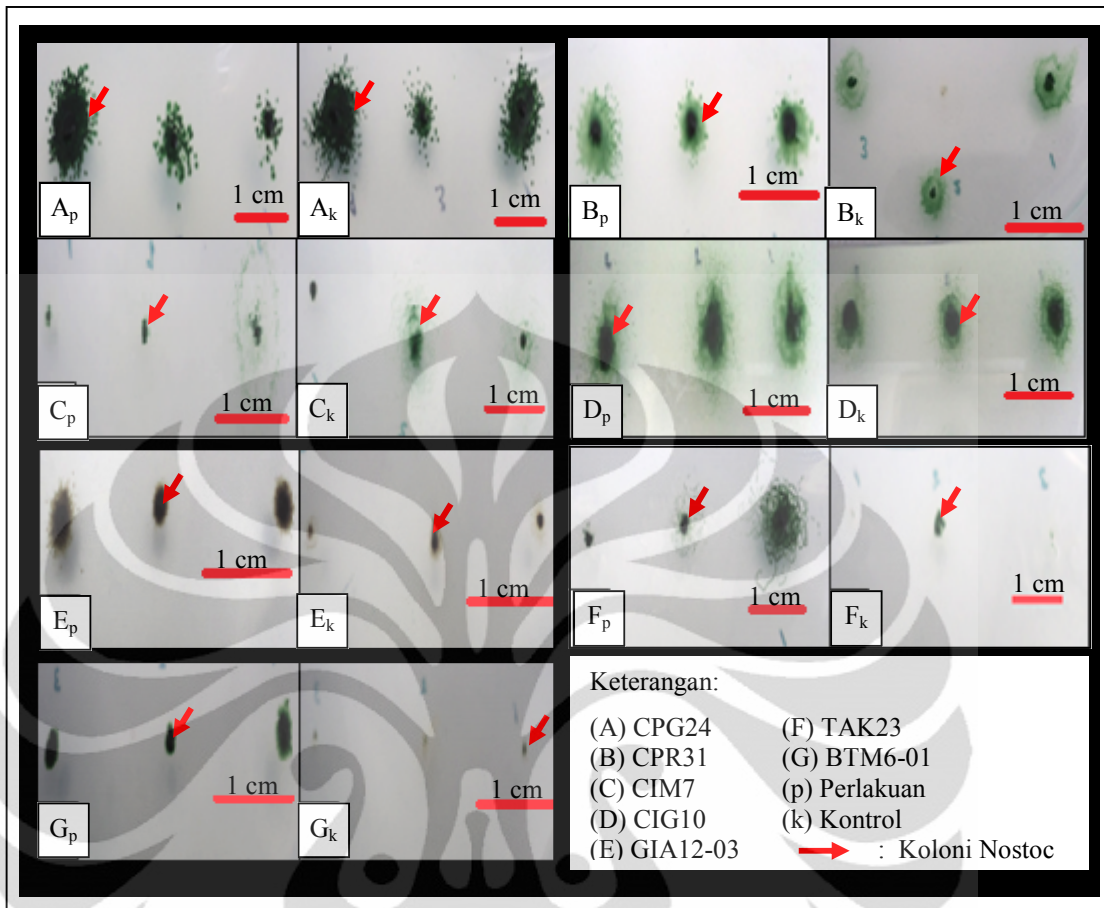
Gambar 4.9. Morfologi strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar hasil preservasi pada H₁ dengan metode *freezing* (-4° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].



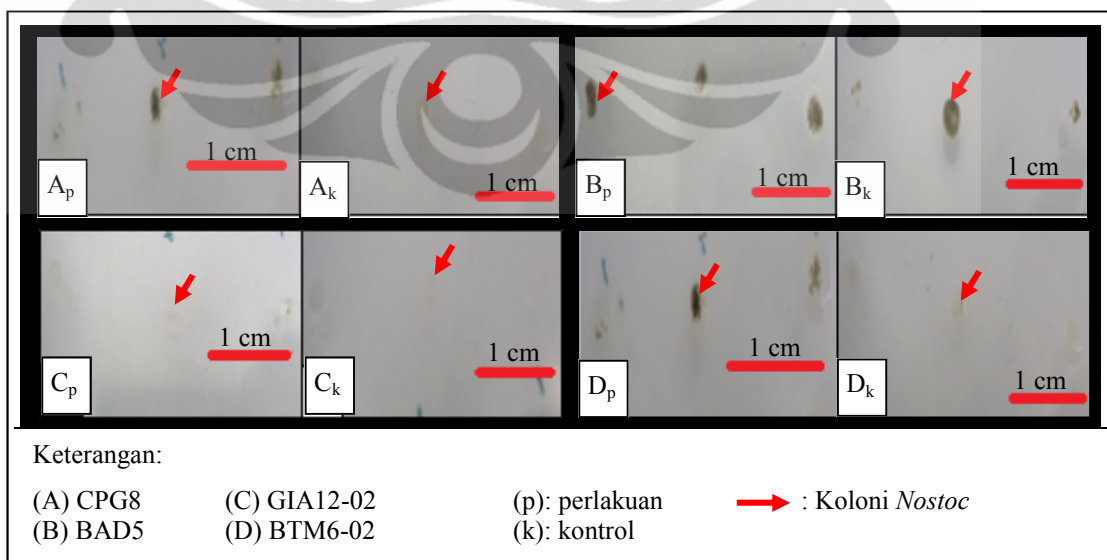
Gambar 4.10. Morfologi strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung hasil preservasi pada H₁ dengan metode *freezing* (-4° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].



Gambar 4.11. Morfologi strain *Nostoc* dengan profil koloni menyebar hasil preservasi pada H₇ dengan metode *freezing* (-4° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].



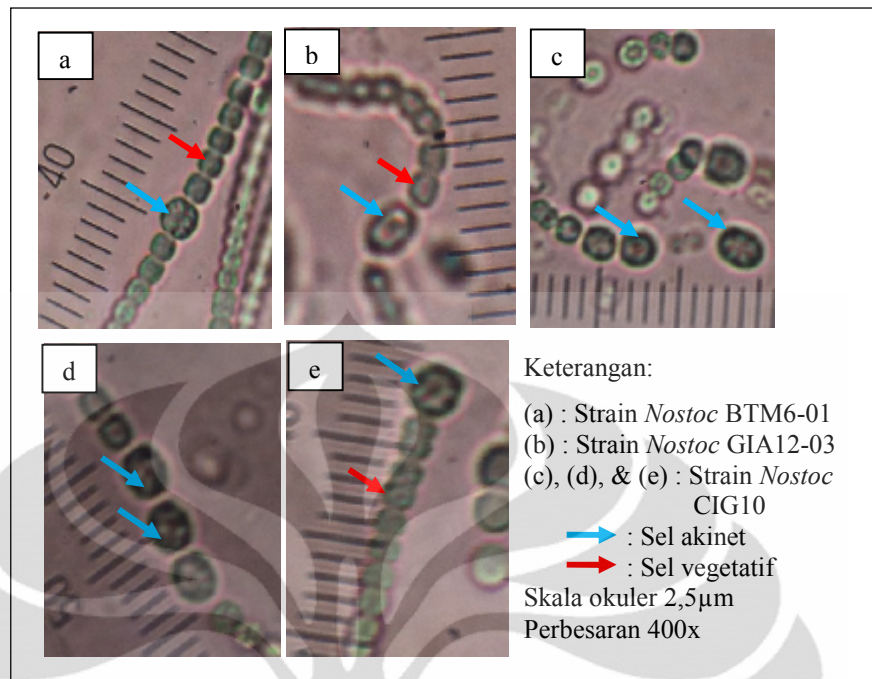
Gambar 4.12. Morfologi strain *Nostoc* dengan profil koloni menggunung hasil preservasi pada H₇ dengan metode *freezing* (-4° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.].

Pengamatan mikroskopis 11 strain *Nostoc* memperlihatkan bahwa morfologi sel *Nostoc* pada t_{15} setelah preservasi dengan metode *freezing* sama dengan morfologi sel *Nostoc* umur 15 hari sebelum preservasi dengan metode *freezing* (Tabel 4.2 & Gambar 4.2). Kesebelas strain *Nostoc* memiliki sel heterokis berbentuk bulat dan oval, serta terletak di bagian terminal dan interkalar filamen. Ukuran sel heterokis memiliki kisaran panjang 2--7,5 μm dan lebar 1,5--5 μm . Bentuk sel vegetatif kesebelas strain *Nostoc* umumnya oval, bulat, silindris, dan persegi. Sel vegetatif memiliki kisaran panjang 1--10 μm dan lebar 1--7,5 μm . Sel akinet memiliki bentuk bulat, oval, hingga silindris, dengan kisaran panjang 5--8,25 μm dan lebar 3,75--7,5 μm .

Akinet tidak hanya ditemukan pada 3 strain *Nostoc* (CPG24, CPR31, TAK23) seperti pada pengamatan morfologi sebelum *freezing*, namun juga ditemukan pada 3 strain *Nostoc* lainnya yaitu strain CIG10, BTM6-01, dan GIA12-03 (Gambar 4.13). Akinet ditemukan baik pada strain *Nostoc* yang dipreservasi pada H_1 maupun H_7 .

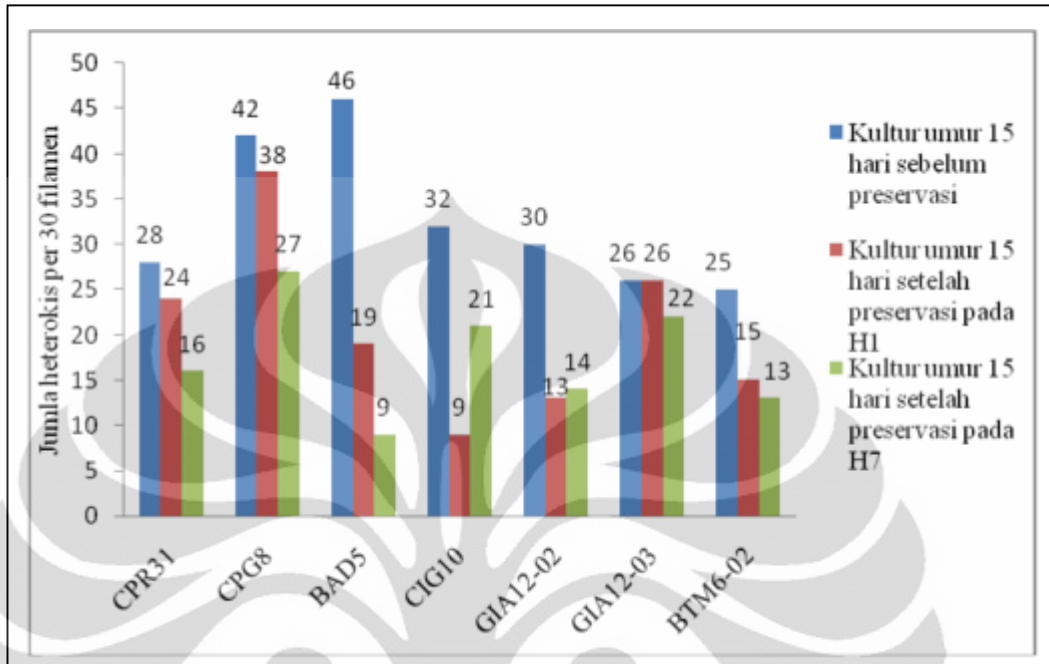
Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa sel vegetatif strain *Nostoc* CIG10 pada t_{15} setelah *freezing* banyak yang berdiferensiasi menjadi akinet. Akinet merupakan struktur dorman yang terbentuk ketika sel *Nostoc* berada pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Fay 1984: 163). Ketika dipreservasi dengan metode *freezing*, strain *Nostoc* disimpan pada suhu lebih rendah (-4°C) dibandingkan suhu inkubasi normal ($23\pm 2^\circ\text{C}$). Selanjutnya, strain *Nostoc* ditumbuhkan kembali dan diinkubasi pada temperatur yang lebih tinggi, yaitu $23\pm 2^\circ\text{C}$ (suhu ruang kultur). Fluktuasi penurunan dan kenaikan temperatur inkubasi dapat menyebabkan kondisi yang tidak menguntungkan bagi strain *Nostoc* sehingga diduga memicu pembentukan akinet.



Gambar 4.13. Akinet pada beberapa strain *Nostoc* umur 15 hari setelah preservasi dengan metode *freezing* (-4°C)
 [Sumber: Dokumentasi pribadi, 2011.]

Selain akinet, jumlah heterokis juga merupakan salah satu indikator respon tumbuh sel *Nostoc* terhadap tekanan *freezing*. Menurut Zaponeva *dkk.* (2008: 335), suhu merupakan salah satu faktor yang memengaruhi pembentukan sel heterokis pada suatu strain Cyanobacteria. Oleh karena itu, penghitungan jumlah sel heterokis pada kultur *Nostoc* berumur 15 hari setelah preservasi dengan metode *freezing* dilakukan untuk mengetahui respon tumbuh strain *Nostoc* terhadap perubahan suhu selama preservasi.

Jumlah sel heterokis setiap strain dihitung pada setiap 3 filamen per satuan bidang pandangan mikroskop dengan perbesaran 400x. Penghitungan jumlah sel tersebut dilakukan minimal pada 10 lapang pandangan yang berbeda untuk setiap strain yang diamati, sehingga total jumlah filamen yang diamati adalah sebanyak 30 filamen. Berdasarkan hasil penghitungan, diketahui bahwa jumlah heterokis pada strain *Nostoc* yang dipreservasi dengan metode *freezing* selama 1 dan 7 hari umumnya lebih sedikit jika dibandingkan dengan strain *Nostoc* berumur 15 hari sebelum preservasi. Perbandingan jumlah sel heterokis pada 8 strain *Nostoc* sebelum dan setelah preservasi dapat dilihat pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14. Perbandingan jumlah heterokis 8 strain *Nostoc* umur 15 hari sebelum dan setelah preservasi dengan metode *freezing* (-4°C) pada H₁ dan H₇

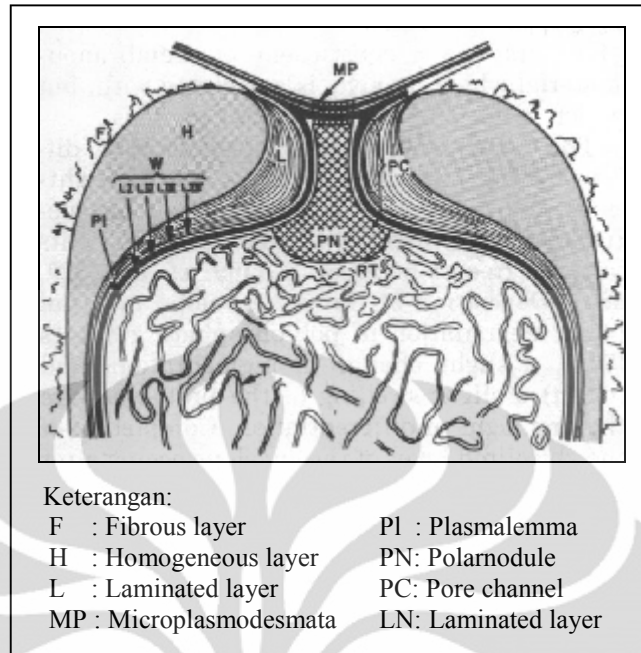
Berdasarkan gambar 4.14, dapat dilihat bahwa jumlah heterokis pada strain *Nostoc* CPR31, CPG8, BAD5, CIG10, GIA12-02, dan BTM6-02 setelah *freezing* jauh lebih sedikit daripada sebelum *freezing*. Perbedaan jumlah sel heterokis antara strain sebelum dan setelah *freezing* paling jelas terlihat pada strain *Nostoc* BAD5. Jumlah sel heterokis strain *Nostoc* BAD5 sebelum *freezing* mencapai 46 sel, sedangkan jumlah sel heterokis pada strain setelah *freezing* pada H₁ hanya sebanyak 19 sel dan sebanyak 9 sel pada strain setelah *freezing* pada H₇. Jumlah sel heterokis pada strain *Nostoc* GIA12-03 sebelum *freezing* sama banyaknya dengan jumlah heterokis pada strain *Nostoc* GIA12-03 setelah *freezing* pada H₁ yaitu sebanyak 26 sel, namun jumlahnya lebih sedikit pada strain *Nostoc* GIA12-03 setelah *freezing* pada H₇ yaitu sebesar 22 sel filamen.

Berdasarkan hasil di atas, sebanyak 7 dari 11 strain *Nostoc* memiliki jumlah sel heterokis setelah *freezing* yang lebih sedikit dibandingkan sebelum *freezing*. Hal ini memberikan asumsi bahwa penurunan suhu selama proses

freezing memengaruhi jumlah heterokis pada Cyanobacteria. Penurunan suhu dari suhu inkubasi ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) menjadi -4°C selama *freezing* diduga memperlambat pembentukan heterokis ketika strain *Nostoc* ditumbuhkan kembali. Penurunan jumlah sel heterokis juga dilaporkan pernah terjadi pada Cyanobacteria ordo Nostocales lainnya. Menurut laporan Zaponeva *dkk.* (2008: 133), jumlah sel heterokis pada strain *Anabaena* ANAPL-NECH00 dan *Anabaena* ANASPI-VRB00 menurun sebesar 3% ketika suhu inkubasi diturunkan dari 21°C menjadi $1,5^\circ \text{C}$. Penurunan jumlah heterokis juga terjadi pada strain *Tolypothrix* LUKESOVA 4195 yang menunjukkan penurunan sebesar 1% ketika mengalami penurunan suhu inkubasi dari 11°C menjadi 7°C .

Pembentukan heterokis pada *Nostoc* juga erat kaitannya dengan sintesis enzim nitrogenase. Heterokis merupakan struktur khusus yang terbentuk untuk melindungi enzim nitrogenase dari pengaruh oksigen yang dapat menghambat aktivitas fiksasi nitrogen. Temperatur rendah diduga memengaruhi sintesis enzim nitrogenase. Haystead *dkk.* (*lihat* Dubois & Kapustka 1987: 773) melaporkan bahwa aktivitas enzim nitrogenase pada ekstrak *Anabaena cylindrica* menurun secara signifikan sebesar 61,87% ketika temperatur inkubasi menurun dari 20°C menjadi 0°C . Hasil penelitian Dua & Buring (*lihat* Dubois & Kapustka 1987: 773) menyatakan bahwa terjadi inaktivasi 85% aktifitas enzim nitrogenase ketika *Clostridium* sp. diinkubasi pada 0°C . Zumpf & Mortenson (*lihat* Dubois & Kapustka 1987: 773) melaporkan bahwa temperatur rendah dapat menyebabkan perubahan struktural protein sehingga dapat menurunkan aktivitas enzim. Jumlah heterokis yang sedikit diduga berkaitan dengan rendahnya sintesis enzim nitrogenase akibat *freezing*.

Sesuai dengan fungsinya sebagai struktur pelindung enzim nitrogenase dari penghambatan O_2 , heterokis didukung oleh struktur selubung (*envelope*) multikomponen yang berperan sebagai barrier bagi difusi O_2 (Gambar 4.15). Selubung tersebut terdiri atas empat lapisan berlaminasi yang mengandung glikolipid (L_I , L_{II} , L_{III} , L_{IV}) dan polisakarida homogen (Wolk 1973: 70--71).



Gambar 4.15. Struktur selubung sel heterokis
[Sumber: Wolk 1973: 71]

Pembentukan selubung tebal heterokis tersebut merupakan proses yang “mahal” secara metabolisme, karena memerlukan jumlah energi (ATP) yang cukup banyak (Kangatharalingam *dkk.* 1992: 2677). Sedikitnya jumlah heterokis *pasca freezing* diduga disebabkan strain-strain *Nostoc* tersebut belum mencapai pemulihan optimal (*optimum recovery*) setelah ditumbuhkan kembali, sehingga proses metabolisme belum dapat berlangsung secara optimal. Energi (ATP) yang dihasilkan selama proses metabolisme *pasca recovery* tersebut kemungkinan lebih dimanfaatkan untuk pertumbuhan sel vegetatif strain *Nostoc* sehingga pembentukan sel heterokis tidak berlangsung optimal.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Sebanyak 11 dari 13 strain *Nostoc* (84,62%), yaitu strain *Nostoc* CIG10, CPR31, CPG24, GIA12-03, TAK23, BAD5, GIA12-02, CIM7, BTM6-02, CPG8, dan BTM6-01, berhasil tumbuh setelah dipreservasi selama 1 hari (H_1) dan 7 hari (H_7) menggunakan metode *freezing* (-4°C) dengan konsentrasi DMSO 5%.
2. Sebanyak 2 strain dari 13 strain *Nostoc* (15,38%), yaitu strain *Nostoc* GIA13a dan TAB7d tidak berhasil tumbuh setelah dipreservasi selama 1 hari (H_1) dan 7 hari (H_7) menggunakan metode *freezing* (-4°C) dengan konsentrasi DMSO 5%.
3. Metode *freezing* (-4°C) dengan menggunakan *freezer* lemari pendingin dapat digunakan sebagai alternatif metode preservasi strain *Nostoc* yang sederhana dan mudah.
4. 11 Strain *Nostoc* menunjukkan respon tumbuh yang berbeda-beda setelah dipreservasi dengan metode *freezing* (-4°C).

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan memperpanjang waktu pengamatan (1 atau 2 bulan) strain *Nostoc* setelah preservasi dengan metode *freezing* (-4°C) untuk mengetahui laju pertumbuhan strain *Nostoc*.

DAFTAR REFERENSI

- Back, S. & J. Liang. 2008. Production of cryptophycin from blue-green algae. *Journal of Young Investigators* **19**(12): 1--8.
- Beaty, M. H. & B. C. Parker. 1992. Cryopreservation of eukaryotic algae. *Virginia Journal of Science* **43**: 403--410.
- 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, C. H. & M. J. Wynne. 1985. Introduction of the algae structure and reproduction. 2nd ed. Prentice Hall, Inc., London: xvi + 720 hlm.
- Bozkurt, Y. 2005. Relationship between body connection and spermatological properties in scaly carps (*Cyprinus carpio*) semen. *Journal of Animal and Veterinary Advener* **5**(5): 412--414.
- Brock, T. D. & M. T. Mardigan. 1991. *Biology of microorganisms*. 6th ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs: x + 406 hlm.
- Brockbank, K. G. M., J. C. Covault & M. J. Taylor. 2007. *Cryopreservation guide*. Thermo Fisher Inc., South Carolina: v + 30 hlm.
- Crutchfield, A. L. M., K. R. Diller, & J. J. Brand. 1999. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Europe Journal Phycology* **34**: 43--52.
- Day, J. G., E. E. Benson & R. A. Fleck. 1999. In vitro culture and conservation of microalgae: Application for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **35**: 127--136.
- 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.
- Donev, T. 2001. *Methods for conservation industrial microorganism*. Bionep Publisher, Sofia: iii + 91 hlm.
- Doneva, T. U. & T. Donev. 2004. Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of culture collection* **4**: 17--28.

- Dubois, J. D. & L. A. Kapustka. 1983. Freeze-recovery physiology of nitrogenase activity in terrestrial *Nostoc* sp. colonies. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 773--778.
- Fay, P., J.A. Lynn & S.C. Majer. 1984. Akinete development in the planktonic blue green algae *Anabaena circinalis*. *Br. Phycol. J.* **19**: 163--173.
- Fogg, G. E. & B. Thake. 1987. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. 3rd ed. The University of Wisconsin Press, Wisconsin: xv + 175 hlm.
- Fogg, G. E., W. D. P. Stewart, P. Fay & A. E. Walsby. 1973. *The blue-green algae*. Academic Press, London: vii + 459 hlm.
- Gandjar, I. 2006. Pertumbuhan fungi. *Dalam*: Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. Mikologi dasar dan terapan. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: 36--46.
- Gaylord Chemical Company, L. L. C. 2007. Dimethyl sulfoxide (DMSO): Health and safety information. *Gaylord Chemical Company, L. L. C. Bulletin* **106**: 1--16.
- Graham, L. E. & L. W. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice-Hall, Inc., New York: xvi + 640 hlm.
- Guo, N., I. Puhlev, D. R. Brown, J. Mansbridge & F. Levine. 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature America Incorporation* **18**: 168--171.
- Hill, D. R., T. W. Keenan, R. F. Helm, M. Potts, L. M. Crowe & J. H. Crowe. 1997. Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology* **9**: 237--248.
- Hoek, V. Den., D. G. Mann & H. M. Jahns. 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, New York: xiv + 623 hlm.
- Hoiczky, E. & A. Hansel. 2000. Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* **182**: 1191--1199.
- Hoshaw, R.W. & R. Rosowski. 1979. Methods for microscopic algae. *Dalam*: Stein, J.R. (ed.). 1979. *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge: 160--167.

- Huang, H., Z. P. Zhong, K. B. Wang, K. Z. Bai, L. B. Li & T. Y. Kuang. 2004. Isolation and characterization of the cytoplasmic membrane from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Acta Botanica Sinica* **46** (10): 1186--1191.
- Kangatharalingam, N., J. C. Priscu & H. W. Paerl. 1992. Heterocyst envelope thickness, heterocyst frequency, and nitrogenase activity in *Anabaena flos-aquae*: Influence of exogenous oxygen tension. *Journal of General Microbiology* **138**: 2673--2678.
- Kim, Jeong-Dong & Choul-Gyun, Lee. 2005. Diversity of heterocystous filamentous Cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**(2): 240--246.
- Kirsop, B. E., C. P. Kurtzman, T. Nakase & D. Yarrow. 1988. *Living resources for biotechnology*. Bangkok Mircen, Bangkok: iv + 62--66.
- Krishnamurthy, K. V. 2003. *Textbook of biodiversity*. Science Publisher, Inc., Enfield: vii + 260 hlm.
- Kuzmina, J. 2004. Progress report on cryopreservation at the University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria : 1--6.
- Kvíděrová, J. 2004. *Adaptation of algae to extreme environments*. Botanical PhD theses, Academy of Sciences of the Czech Republic: 104 hlm.
- Leung, L. K. P. 1991. Principal of biological cryopreservation. *Dalam*: Jamieson, B. G. M. (ed). 1991. *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge: xiv + 319 hlm.
- Leung, L. K. P. & B. G. M. Jamieson. 1991. Live preservation of fish gametes. *Dalam*: Jamieson, B. G. M. (ed). 1991. *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge: xiv + 319 hlm.
- Li, Y. & K. Gao. 2004. Photosynthetic physiology and growth as a function of colony size in the cyanobacterium *Nostoc sphaeroides*. *Europe Journal of Phycology* **39**: 9--15.

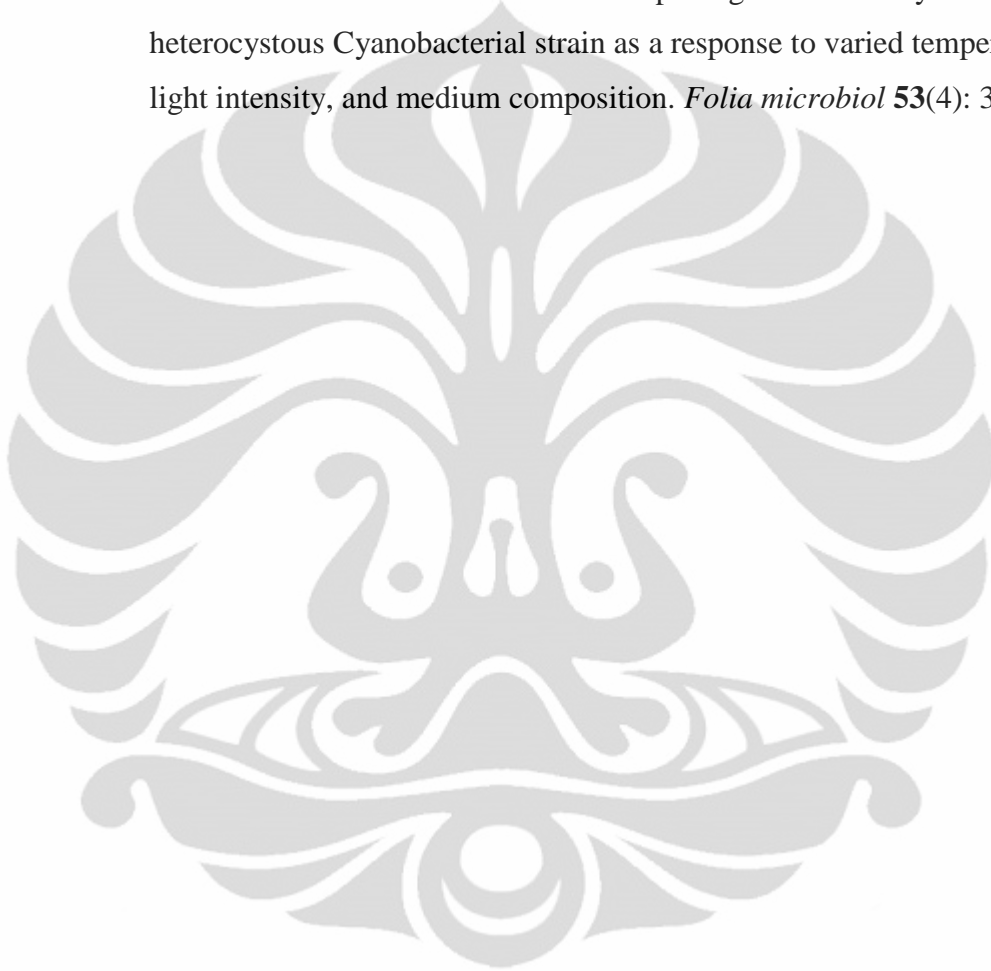
- Lin, Y., M. Hirai, Y. Kashino, H. Koike, S. Tuzi & K. Satoh. 2004. Tolerance to *freezing* stress in cyanobacteria, *Nostoc commune* and some cyanobacteria with various tolerances to drying stress. *Polar Biosci* **17**: 56--68.
- Liu, J. 2009. *Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue in Japanese quail (Coturnix japonica)*. Thesis Master of Science The University of British Columbia, Vancouver: xi + 89 hlm.
- Los, D. A. & N. Murata. 1999. Responses to cold shock in cyanobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2): 221--230.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap & D. P. Clark. 2000. *Brock: Biology of microorganism*. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco: xxviii + 1094 hlm.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 1997. *Biology of microorganisms*. 8th ed. Prentice Hall International, New Jersey: xviii + 986 hlm.
- Mahakhant, A. W. Kunyalung & 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.
- Matejtschuk, P. 2007. Lyophilization of protein. *Dalam*: Day, J. G. & G. N. Stacey. 2007. *Cryopreservation and freeze-drying protocol*. 2nd ed. Humana Press Inc., New Jersey: xi+347 hlm.
- McLellan, M. C., A. J. Cowling, M. Turner & J. G. Day. 1991. Maintenance of algae and protozoa. *Dalam*: Kirsop, B. E. & A. Doyle. 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods*. 2nd ed. Academic Press Ltd., London: x + 308 hlm.
- Meza, R. A., A. F. Monroy, M. Mercado, R. A. Pauotou, P. Rodriguez & A. M. Pedroza. 2004. Study of the stability in real time of cryopreserved strain bank. *Universitas scientiarum* **9**(2): 35--42.
- Mori, F., M. Erata & M. M. Watanabe. 2002. Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-Collection. *Microbial Culture Collection* **18**: 45--55.
- Nabilah, S. 2010. Penggunaan metode *freezing* (-4° C) dan metode *liquid-drying* untuk preservasi strain-strain khamir Ascomycota koleksi University of

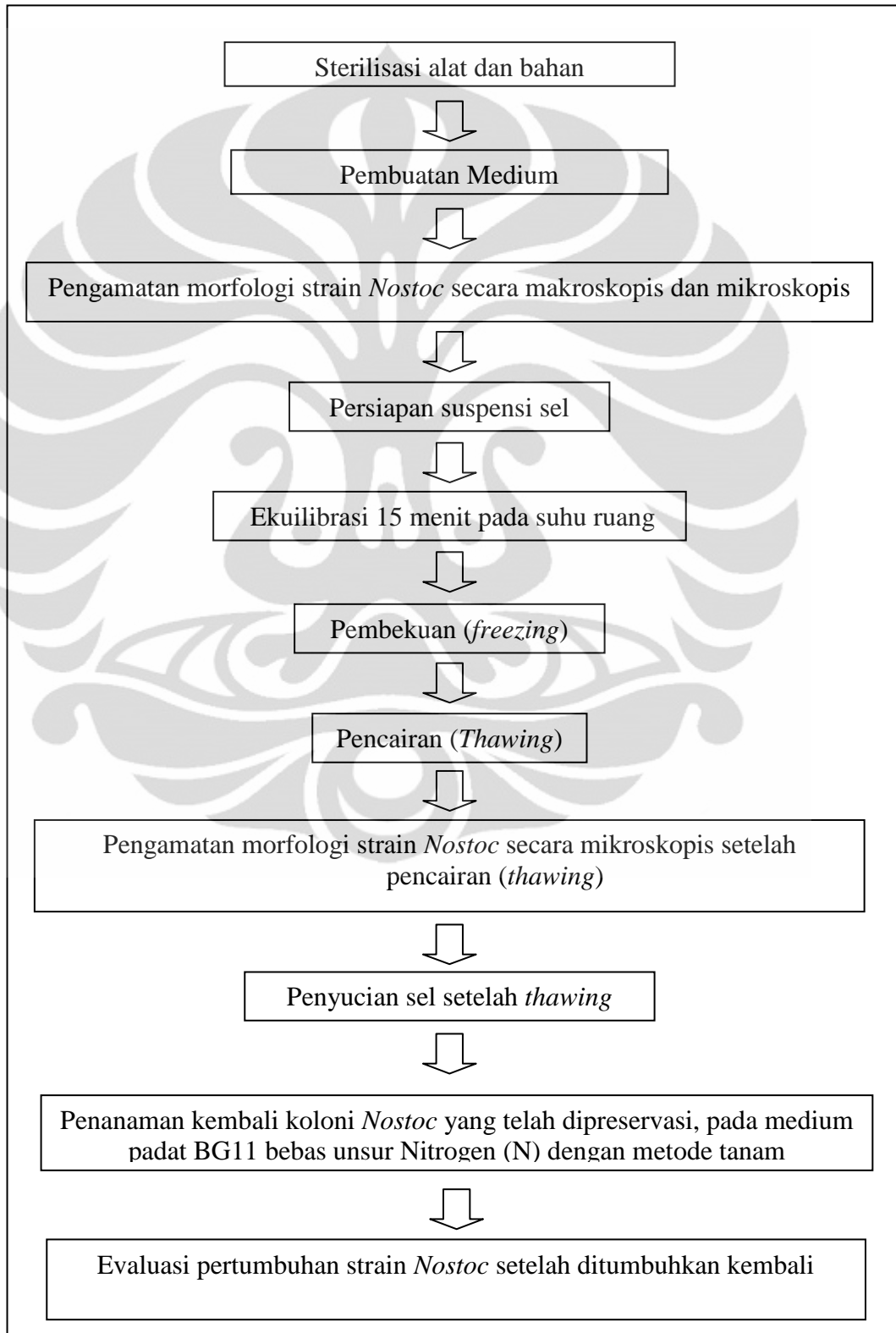
- Indonesia Culture Collection (UICC). Skripsi S1. Jurusan Biologi: xiii+55 hlm.
- Nagai, T., K. Tomioka, K. Takeuchi, M. Iida, M. Kawada, & T. Sato. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF genebank. *JARQ* **39**: 19--27.
- Nilsson, M., J. Bhattacharya, A. N. Rai & B. Bergman. 2002. Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains. *New Phytologist* **156**(3): 517--525.
- Notman, R. M., M. Nora, B. O., B. O'Malley & J. Anwar. 2006. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 13982--13983.
- Pearson Education. 2006. *Growth curve*. 1 hlm.
www.lpc1.clpccd.cc.ca.us/lpc/zingg/MicrobialGrowth, 5 Mei 2011, pk. 14.40.
- Pollari, M. 2008. Cyanobacterial acclimation to changing environmental conditions : role for group 2 sigma factors in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Thesis Master Biology University of Turku, Finland* : 55 hlm.
- Potts, M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Europe Journal of Phycology* **34**: 319--328.
- Potts, M. 2000. *Nostoc*. Dalam: Whitton, B.A. & M. Potts. (eds.). 2000. *The ecology of Cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 465--504.
- Rao, V. S. K., J. J. Brand & J. Myers. 1977. Cold shock syndrome in *Anacystis nidulans*. *Plant Physiology* **59**: 965--969.
- Šabacká, M. & J. Elster. 2004. Response of algal and cyanobacterial communities from arctic and antarctic wetland habitats to freezing and desiccation stress. *Międzynarodowe Sympozjum Polarne*: 181--182.
- 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.

- Sarles, W. B., W. C. Frazier, J. B. Wilson & S. G. Knight. 1956. *Microbiology*. 2nd ed. Harper & Brothers, New York: xiii + 491 hlm.
- Sharma, O. P. 1992. *Textbook of algae*. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi: xi + 396 hlm.
- Silva, P. G., S. G. Ferrari & H. J. Silva. 2007. Preservation methods of *Tolypothrix tenuis* for use as a Cyanobacterial fertilizer. *Journal Application Phycology* **19**: 239--246.
- Simanungkalit, R. D. M. 2001. Aplikasi pupuk hayati dan pupuk kimia: Suatu pendekatan terpadu. *AgroBio* **4**(2): 56--61.
- Simione, F. P. 1998. Cryopreservation manual. *Nalge Nunc International* : 1--8.
- Sly, L. I. 1984. The role of culture collection in microbiology and biotechnology. *Dalam: Atthasampunna. 1984. Yeast: Their identification preservation and use in Biotechnology*. Bangkok MIRCEN, Bangkok: 14--57.
- Smith, D. & Onions, H. S. 1971. *The preservation and maintenance of living fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane: vii + 51 hlm.
- Storey, K. B. & J. M. Storey. 2005. Freeze tolerance. *Dalam: Gerday, C. & N. Glansdorff. 2005. Extremophiles: Encyclopedia of life support systems (EOLSS)*. Eolss Publisher, Oxford: 25 hlm.
- Sum, A. K. & J. J. Pablo. 2003. Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* **85**: 3636--3645.
- Supriatna, I. & R. H. Pasaribu. 1992. In vitro fertilisasi: transfer embrio dan pembekuan embrio. Depdikbud Dirjen Dikti, IPB: 105 hlm.
- Sze, P. 1993. *A biology of the algae*. 2nd ed. Wm. C. Brown Publishers, Lowa: ix + 259 hlm
- 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.
- Wang, M., Y. N. Xu, G. Z. Jiang, L. B. Li & T. Y. Kuang. 2000. Membrane lipids and their fatty acid composition in *Nostoc flagelliforme* cells. *Acta Botanica Sinica* **42**(12): 1263--1266.
- 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--428
- Whitton, B. A. & M. Potts. 2000. Introduction to the Cyanobacteria. *Dalam: Whitton, B. A (ed.). 2000. The biology of Cyanobacteria: The diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Hingham: 1--11.
- 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.
- Wolk, C. P. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriological Reviews* **37**: 32--101.
- Yoshida, T. & T. Sakamoto. 2009. Water-stress induced trehalose accumulation and control of trehalase in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* IAM M-15. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 135--145.
- Yuliana, P. 2009. Karakterisasi morfologi dan molekuler isolat-isolat *Nostoc* [Vaucher 1803] Bornet *et* Flauhalt 1886 dari tanah persawahan di Indonesia berdasarkan sekuen parsial gen 16S rRNA. Skripsi S1. Jurusan Biologi, FMIPA UI: xiii + 119 hlm.

- Zakhia, F., A. D. Jungblut, A. Taton, W. F. Vincent & A. Wilmotte. 2008. Cyanobacteria in cold ecosystems. *Dalam: Magestin, R.* 2008. *Psychrophiles: From biodiversity to biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 135 hlm.
- Zaponeva, E., P. Hrouzek, K. Rehakova, M. Sabacka, M. Stibal, L. Caisova, J. Komarkova & A. Lukesova. 2008. Morphological variability in selected heterocystous Cyanobacterial strain as a response to varied temperature, light intensity, and medium composition. *Folia microbiol* **53**(4): 333--341.



LAMPIRANLampiran 1. Skema alur kerja penelitian

Lampiran 2. Panduan Warna Castell-Polychromos No. 9216

 101 Putih	 136 Ungu loh	 171 Hijau muda
 104 Kuning	 137 Ungu terung	 173 Hijau zaitun
 105 Kuning langsung	 139 Ungu muda	 174 Hijau cemara
 106 Kuning kunyit	 141 Biru Delft	 175 Sepia
 107 Kuning limau	 144 Biru kobalt muda	 176 Coklat
 108 Kuning kepodang	 146 Biru langit	 180 Coklat jangat
 109 Kuning jenar	 147 Biru muda	 182 Hartal coklat
 113 Jingga muda	 148 Biru jelah	 183 Hartal emas
 115 Jingga tua	 149 Biru Cina	 184 Hartal
 117 Merah merona	 150 Biru Berlin	 187 Hartal rentung
 118 Merah marak	 151 Biru Prusia	 189 Kayu manis
 121 Merah dadu	 153 Biru merak	 190 Merah Venetia
 124 Merah serah mawar	 155 Balu	 191 Merah Pompei
 126 Merah serah tua	 159 Hijau rumput	 192 Merah Indian
 127 Merah serah muda	 161 Hijau tembaga	 194 Lembayung
 128 Merah mengkudu mawar	 162 Hijau jelah	 195 Abu-abu muda
 129 Merah mengkudu jambon	 163 Hijau zamrud	 196 Abu-abu perak
 131 Merah daging medium	 167 Hijau getah	 197 Nilajada
 133 Merah anggur	 168 Hijau lumut	 198 Hitam sabak
 134 Merah lembayung	 170 Hijau apel	 199 hitam

