



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI GEN OMEGA-3 DESATURASE DARI  
*Nannochloropsis* sp. ISOLAT LOKAL**

**SKRIPSI**

**IRA TRISNAWATI  
0806340063**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK  
JANUARI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI GEN OMEGA-3 DESATURASE DARI  
*Nannochloropsis* sp. ISOLAT LOKAL**

**SKRIPSI**

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

**IRA TRISNAWATI  
0806340063**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK  
JANUARI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Ira Trisnawati**

**NPM : 0806340063**

**Tanda Tangan :** 

**Tanggal : 20 Januari 2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Ira Trisnawati  
NPM : 0806340063  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul Skripsi : Isolasi Gen Omega-3 Desaturase dari  
*Nannochloropsis* sp. Isolat Lokal

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Ir. Rita Arbianti, MSi

Pembimbing II : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si, M. Eng

Penguji I : Dr. Heri Hermansyah, ST., M. Eng

Penguji II : Dr. Tania Surya Utami, ST., MT

Penguji III : Dr. Ir. Siswa Setyahadi, MSc.

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 20 Januari 2012

## KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

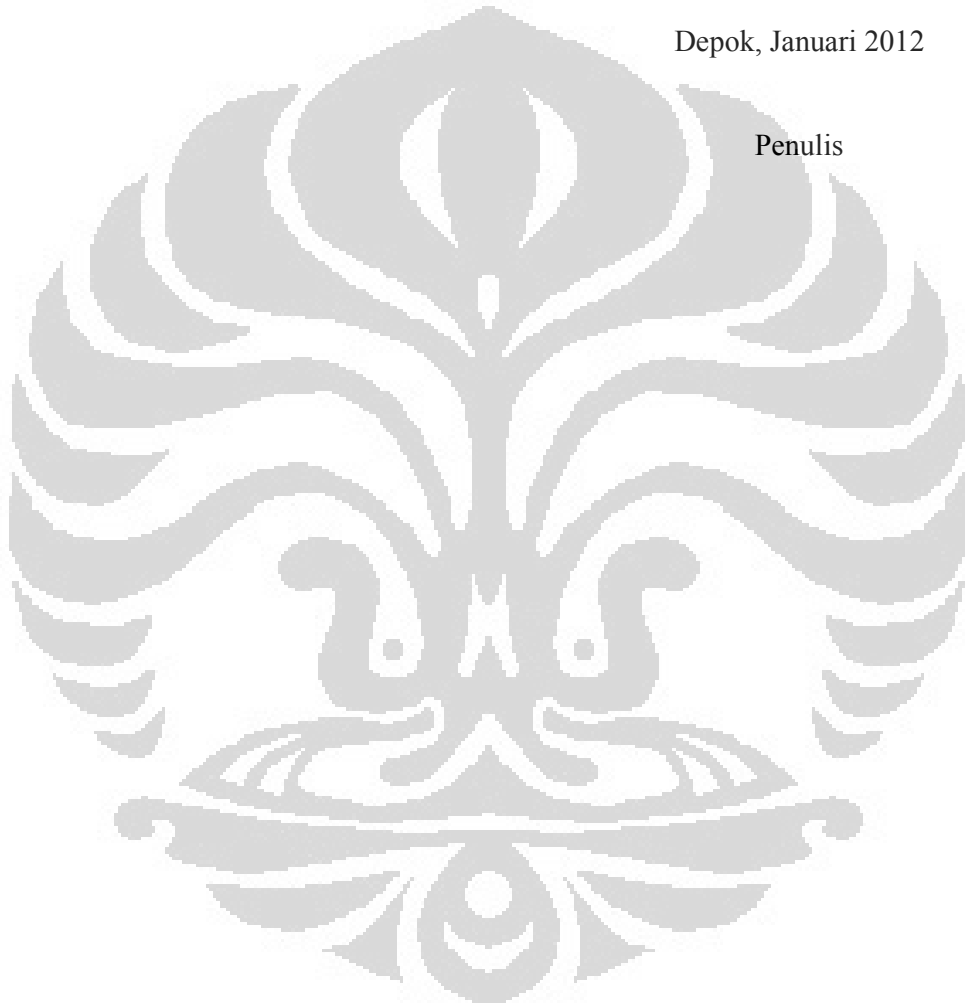
Segala puja dan puji syukur kehadirat Allah SWT atas setitik ilmu-Nya dan kehendak-Nya hingga skripsi ini dapat selesai tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Ir. Rita Arbianti , M.Si selaku dosen pembimbing yang selalu sabar dan tidak kenal lelah membimbing dan memotivasi penulis.
2. Dr. Eng Muhamad Sahlan S.Si, M. Eng yang telah membuka kesempatan bagi penulis untuk melakukan riset ini di *Laboratorium Life Science and Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology ( TUAT ), Japan*, serta telah bersedia meluangkan waktu untuk memberikan berbagai bimbingan dan masukan yang membangun sehingga skripsi ini bisa diselesaikan.
3. Kedua orang tua penulis yang selalu mendoakan dan memotivasi penulis dalam segala hal.
4. Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA selaku Ketua Departemen Teknik Kimia FTUI , Dr. Heri Hermansyah selaku Ketua Program Studi Teknologi Bioproses dan Ir. Yuliusman, M. Eng selaku koordinator mata kuliah spesial.
5. Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M. Eng yang telah banyak membantu persiapan penulis untuk riset di Jepang.
6. Profesor Yohda dari TUAT, Jepang yang telah memberi masukan dalam penelitian ini.
7. Mbak Risma dari TUAT Jepang, yang telah dengan sabar menjadi supervisor penulis selama riset di Jepang.
8. Rekan satu grup riset, Ester Kristin, Khairul Hadi, David Adi Prakoso, Aziz Priambodo dan Hari Sutioso yang telah bersedia menjadi teman diskusi.
9. Rekan-rekan di *Laboratorium Life Science and Biotechnology TUAT, Jepang*, Yohei Yamamoto, Ayane Takechi, Yosuke Fukutani, Mizuki Kitajima, dan lain-lain yang telah banyak membantu dalam melakukan riset ini.
10. Rekan-rekan program studi Teknologi Bioproses dan Teknik Kimia yang saling menyemangati dan saling mengingatkan dalam kebaikan.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, Januari 2012

Penulis



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

---

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

Nama : Ira Trisnawati  
NPM : 0806340063  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis Karya : Skripsi

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

**ISOLASI GEN OMEGA-3 DESATURASE DARI *Nannochloropsis* sp.**

**ISOLAT LOKAL**

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 saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 20 Januari 2012

Yang Menyatakan



(Ira Trisnawati)

## ABSTRAK

Nama : Ira Trisnawati  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul : Isolasi Gen Omega 3 Desaturase dari *Nannochloropsis* sp.  
Isolat Lokal

Asam lemak omega-3 merupakan asam lemak esensial bagi tubuh manusia. Mikroalga merupakan salah satu sumber asam lemak omega-3 yang sangat prospektif untuk dikembangkan, karena kualitas yang lebih tinggi dibanding sumber asam lemak omega-3 lainnya. Pemanfaatan langsung asam lemak omega-3 dari mikroalga memerlukan biaya produksi lebih tinggi. Sehingga penelitian terkini banyak diarahkan pada studi genetika terhadap enzim yang berperan penting dalam biosintesis asam lemak omega-3, salah satunya adalah enzim omega-3 desaturase. Penelitian ini akan difokuskan pada isolasi dan kloning gen yang mengkode enzim omega-3 desaturase dari mikroalga *Nannochloropsis* sp. Gradient *Polymerase Chain Reaction* ( PCR ) berhasil mengamplifikasi gen omega-3 desaturase dengan panjang 489bp. Gen disisipkan pada plasmid T-vector pMD20 dan dikloning pada sel kompeten bakteri *Escherichia coli* DH5a. Konfirmasi produk kloning melalui *colony* PCR dan dari hasil konfirmasi berat molekul yang dianalisa menggunakan metode *agarose electrophoresis* menunjukkan terdapat 6 koloni yang positif mengandung gen omega-3 desaturase. Konfirmasi dengan DNA *sequencing* masih perlu dilakukan di masa yang akan datang.

Kata Kunci : omega-3 desaturase, *Nannochloropsis* sp, asam lemak omega-3, isolasi gen.



## ABSTRACT

Name : Ira Trisnawati  
Study Program : Bioprocess Technology  
Title : Isolation of Omega 3 Desaturase Gene from Local Isolate of *Nannochloropsis* sp

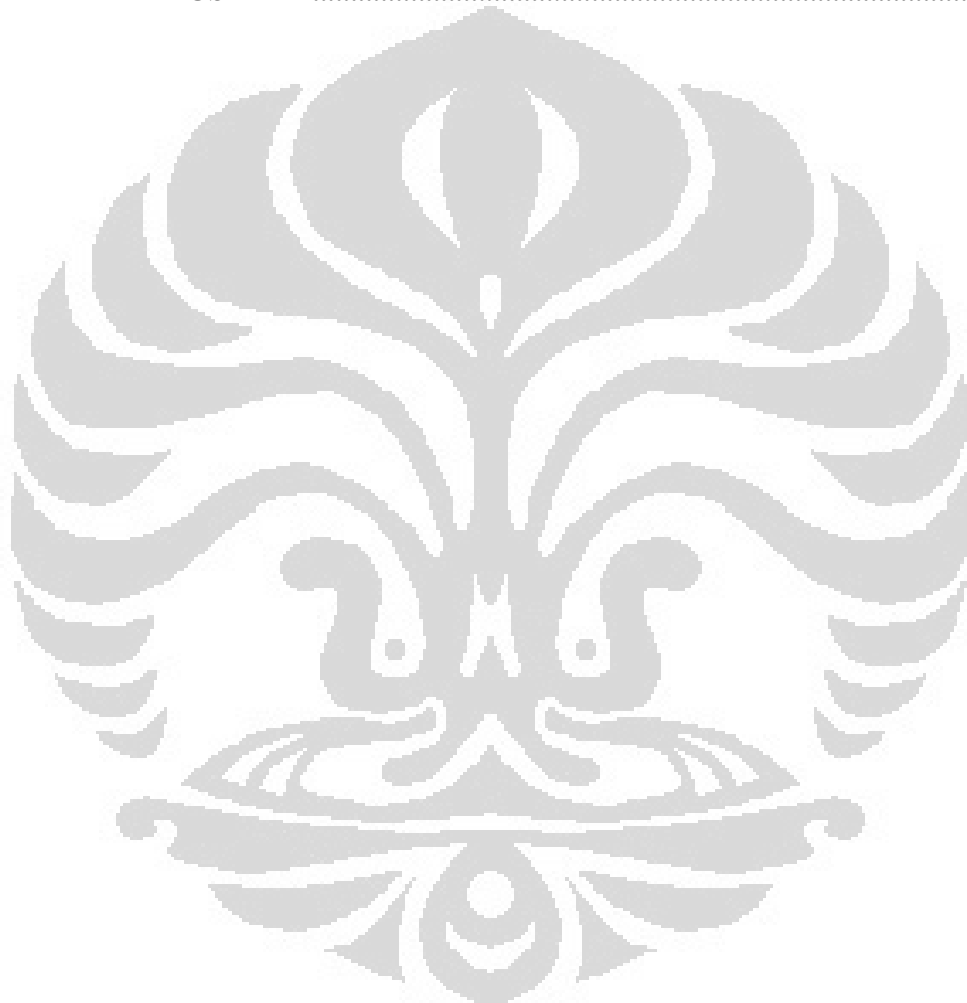
*Omega-3 fatty acids are essential fatty acids for the human body. Microalgae is one source of omega-3 fatty acids which is highly prospective for development, because it has higher quality than the other sources of omega-3 fatty acids. Direct utilization of omega-3 fatty acids from microalgae requires higher production cost. Therefore, many of the recently studies focus on genetic study for the enzymes which play important role in biosynthesis of omega-3 fatty acids, one of them is omega-3 desaturase enzyme. This research will be focused on the isolation and cloning of gene encoding omega-3 desaturase enzyme from microalgae Nannochloropsis sp. Gradient Polymerase Chain Reaction (PCR) successfully amplified 489bp of omega-3 desaturase gene. The gene was inserted into T-Vector pMD20 plasmid and cloned to Escherichia coli DH5a competent cell. Confirmation cloning product using colony PCR and from molecular weight analyzing by agarose electrophoresis method showed that there are 6 colonies positively content omega-3 desaturase gene. Confirmation by DNA sequencing still needs to be done in the future.*

*Keywords: omega-3 desaturase, Nannochloropsis sp, omega-3 fatty acids, gene isolation.*

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vii
ABSTRAK .....	viii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Batasan Masalah.....	2
1.5 Sistematika Penulisan.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Asam Lemak Omega-3.....	4
2.1.1 Jenis-Jenis Asam Lemak Omega-3.....	4
2.1.2 Mikroalga Sebagai Sumber Asam Lemak Omega-3.....	6
2.1.3 Biosintesis Asam Lemak Omega-3.....	7
2.2 Isolasi Gen Omega-3 Desaturase.....	7
2.2.1 Pemurnian DNA.....	8
2.2.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> .....	9
2.2.3 Gel Elektroforesis.....	10
2.2.4 Spektroskopi.....	11
2.3 Kloning Gen Omega-3 Desaturase.....	11
2.4 <i>State of the Arts</i> .....	12
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	16
3.2 Alat dan Bahan .....	17
3.2.1 Alat .....	18
3.2.2 Bahan .....	18
3.3 Prosedur Penelitian.....	20
3.3.1 Disain Primer .....	20
3.3.2 Purifikasi DNA Genom .....	21
3.3.3 Isolasi Gen Omega-3 Desaturase .....	23
3.3.4 Kloning Gen Omega-3 Desaturase .....	24
3.3.5 <i>Colony PCR</i> .....	25
3.3.6 <i>Sequencing</i> .....	25
3.3.7 Analisa Genetika .....	27
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Disain Primer .....	28

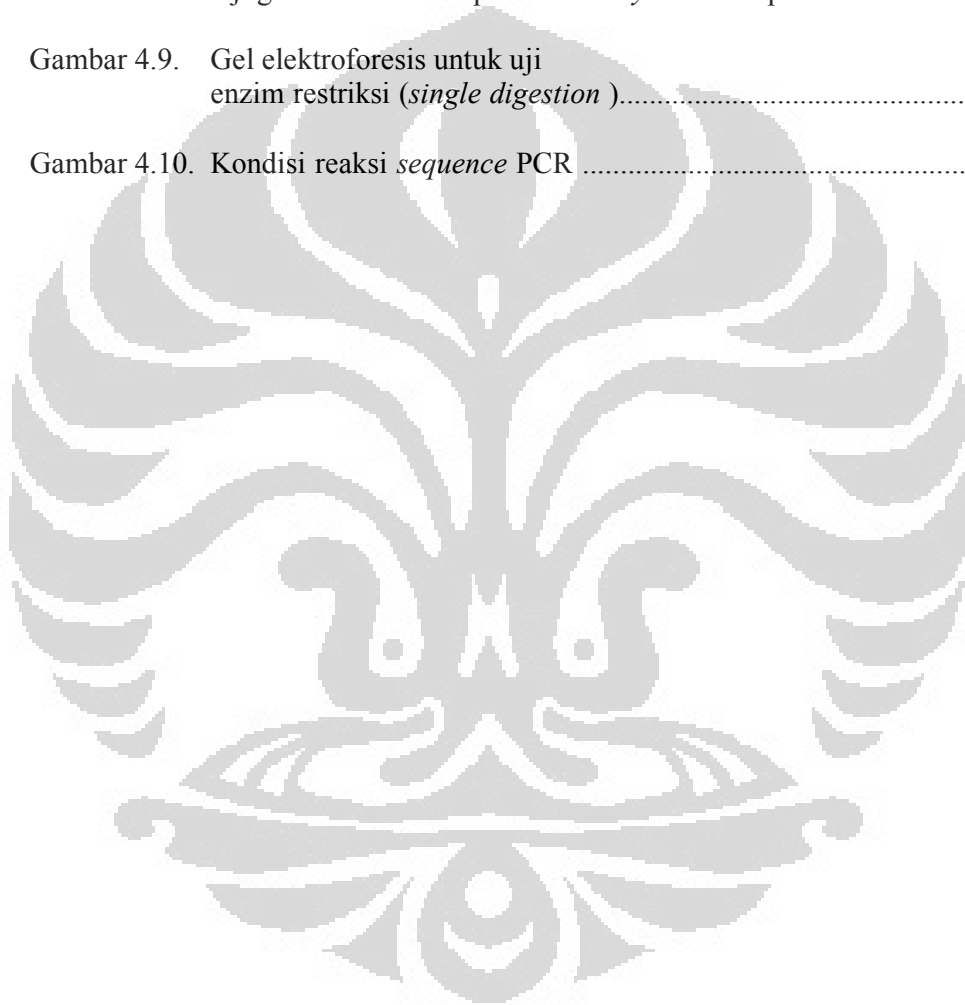
4.2	Purifikasi DNA Genom .....	28
4.3	Isolasi Gen Omega-3 Desaturase .....	29
4.4	Kloning Gen Omega-3 Desaturase .....	33
4.5	<i>Colony</i> PCR .....	34
4.6	DNA <i>Sequencing</i> .....	35
4.7	Analisis Genetika.....	37
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>39</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>40</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur ALA.....	4
Gambar 2.2.	Struktur SDA.....	5
Gambar 2.3.	Struktur EPA.....	5
Gambar 2.4.	Struktur DHA.....	5
Gambar 2.5.	Biosintesis asam lemak omega 3 dan omega 6.....	7
Gambar 2.6.	Tahap PCR ( Vicente, 2003 ).....	10
Gambar 2.7.	<i>Thermocycler</i> .....	10
Gambar 2.8.	NanoDrop 2000.....	11
Gambar 2.9.	Mesin <i>sequencer</i> a) tampak depan b) bagian dalam c) tempat sampel.....	12
Gambar 2.10.	Bagan <i>State of the Arts</i> .....	15
Gambar 3.1.	Diagram alir penelitian.....	16
Gambar 3.2.	Diagram alir perancangan primer.....	20
Gambar 3.3.	Data cDNA gen omega 3 desaturase ( GenBank ).....	20
Gambar 3.4.	Diagram alir proses ekstraksi DNA genom.....	22
Gambar 3.5.	Diagram alir pemurnian DNA dari gel agarosa .....	23
Gambar 3.6.	Diagram alir proses kloning gen omega 3 desaturase.....	24
Gambar 3.7.	Pemurnian DNA plasmid .....	26
Gambar 3.8.	<i>Persiapan proses Sequencing</i> .....	27
Gambar 4.1.	DNA genom hasil ekstraksi menggunakan enzim proteinasi K .....	29
Gambar 4.2.	Kondisi operasi PCR pada percobaan 1.....	30
Gambar 4.3.	Kondisi operasi PCR pada percobaan 2.....	30

Gambar 4.4.	Uji elektroforesis produk PCR , a) percobaan 1, b) percobaan 2.....	31
Gambar 4.5.	Identifikasi fragmen DNA target dengan gel elektroforesis.....	32
Gambar 4.6.	Kondisi reaksi <i>colony</i> PCR .....	34
Gambar 4.7.	Uji gel elektroforesis produk <i>colony</i> PCR sampel L1 .....	34
Gambar 4.8.	Uji gel elektroforesis produk <i>colony</i> PCR sampel L2.....	35
Gambar 4.9.	Gel elektroforesis untuk uji enzim restriksi ( <i>single digestion</i> ).....	36
Gambar 4.10.	Kondisi reaksi <i>sequence</i> PCR .....	37



## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Alat beserta fungsinya .....	18
Tabel 3.2.	Bahan dan fungsinya .....	19
Tabel 4.1.	<i>Oligonucleotide Data Sheet</i> .....	28
Tabel 4.2.	Data pengukuran konsentrasi DNA genom .....	29
Tabel 4.3.	Komposisi campuran PCR .....	30
Tabel 4.4.	Komposisi campuran untuk gradient PCR .....	32
Tabel 4.5.	Kondisi Reaksi <i>Gradient</i> PCR .....	32
Tabel 4.6.	Data konsentrasi gen omega 3 desaturase.....	33
Tabel 4.7.	Komposisi sampel untuk uji enzim restriksi.....	34
Tabel 4.8.	Data konsentrasi DNA plasmid .....	35
Tabel 4.9.	Komposisi campuran sampel <i>Colony</i> PCR.....	36
Tabel 4.10.	Komposisi campuran sampel <i>Sequence</i> PCR.....	37

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asam lemak omega-3 adalah salah satu jenis asam lemak rantai panjang tak jenuh atau sering juga disebut *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang esensial bagi tubuh manusia ( Wertz, 2009; Zevenbergen dkk., 2009 ). Asam lemak tersebut merupakan komponen penting yang tidak bisa diproduksi sendiri oleh tubuh manusia. Sumber utama asam lemak omega-3 adalah ikan salmon, ikan tuna, tumbuh-tumbuhan dan mikroalga.

Minyak ikan yang selama ini menjadi sumber utama omega-3 memiliki beberapa kelemahan, diantaranya memiliki kandungan vitamin larut lemak yang tinggi, terutama vitamin A, dimana konsumsi dalam jumlah banyak tidak akan memberi manfaat yang signifikan, sebaliknya menjadi racun bagi tubuh ( Levy & Turkish, 2002 ). Selain itu minyak ikan dan sumber omega-3 lainnya seperti minyak nabati juga mengandung asam lemak omega 6 dalam tingkat tinggi. Hal ini ditengarai dapat menyebabkan penyakit degeneratif ( Hoyos dkk., 2008 ). Adanya kandungan senyawa kontaminan seperti merkuri pada minyak ikan, juga merupakan salah satu pertimbangan untuk mencari sumber lain yang lebih sehat dan potensial.

Mikroalga merupakan salah satu sumber asam lemak omega-3 yang diprediksi memiliki prospek cerah untuk dikembangkan. Asam lemak omega-3 yang berasal dari mikroalga memiliki kelebihan dari minyak ikan, yaitu tidak mengandung senyawa kontaminasi. Namun biaya yang diperlukan untuk produksi langsung cukup tinggi, sehingga membatasi pemanfaatannya sebagai makanan kesehatan ( Damude & Kinney, 2007 ).

Pada dasarnya mikroalga tidak hanya berfungsi sebagai sumber asam lemak omega-3, namun juga bisa digunakan sebagai sumber gen-gen untuk implementasi biosintesis PUFA pada tanaman ( Iskandarov dkk., 2009 ) atau pada mikroorganisme lain seperti bakteri *Escherichia coli* dan *yeast* ataupun untuk optimasi lebih lanjut pada mikroalga itu sendiri. Informasi genetika terkait enzim

yang terlibat dalam biosintesis PUFA dapat dijadikan pijakan untuk aplikasi produksi PUFA secara *in vivo* ( Iskandarov dkk., 2009 ).

Salah satu enzim yang berperan penting dalam biosintesis asam lemak omega-3 adalah omega-3 desaturase, yang mengubah asam linoleat menjadi asam  $\alpha$ -linoleat, yang kemudian dikatalis oleh enzim elongase dan desaturase lainnya (  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 8$  dan  $\Delta 4$  desaturase ) menjadi berbagai produk turunan asam lemak omega-3 ( DHA dan EPA ) ( Zhou dkk., 2007 ) . Gen yang bertanggung jawab dalam mengkode enzim omega-3 desaturase telah dipelajari pada beberapa spesies tanaman seperti *Arabidopsis* dan bunga matahari ( Li dkk., 2007 ) serta pada mikroalga *Dunaliella salina* ( Lyukevich dkk., 2002 ).

Salah satu mikroalga yang diketahui memiliki kandungan PUFA tinggi adalah *Nannochloropsis*. Pada riset ini akan dicoba isolasi gen yang mengkode enzim omega-3 desaturase dari mikroalga *Nannochloropsis sp.* yang berasal dari laut Indonesia. Diharapkan dari informasi genetika yang diperoleh nantinya dapat digunakan untuk optimasi produksi asam lemak omega-3 dari mikroalga tersebut.

## 1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang melandasi dilaksanakannya penelitian ini adalah bagaimana meningkatkan proses produksi asam lemak omega-3 yang berasal dari mikroalga. Permasalahan yang akan dipecahkan dalam penelitian ini meliputi studi genetika terhadap enzim omega-3 desaturase yang berperan penting dalam sintesis asam lemak omega-3, dengan melakukan isolasi dan kloning terhadap gen yang mengkode enzim tersebut.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah isolasi dan kloning gen omega-3 desaturase dari mikroalga *Nannochloropsis sp.* yang berasal dari laut Indonesia.

## 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah :

- Mikroalga yang digunakan adalah *Nannochloropsis sp.* yang diisolasi dari laut Indonesia.



- Mikroalga yang digunakan dalam kondisi kering ( *dried sample* ).

### 1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan dalam skripsi ini dilakukan dengan membagi tulisan menjadi lima bab, yaitu :

- **BAB 1           PENDAHULUAN**  
Bab ini berisi latar belakang penelitian, perumusan masalah yang dibahas, tujuan dilakukannya penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan .
- **BAB 2           TINJAUAN PUSTAKA**  
Bab ini berisi tentang asam lemak omega-3, biosintesis asam lemak omega-3 dan enzim-enzim yang terkait, metode isolasi dan kloning gen serta *state of the arts* dari penelitian ini.
- **BAB 3           METODE PENELITIAN**  
Bab ini berisi tentang metode pelaksanaan penelitian, model penelitian, peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian dan prosedur penelitian.
- **BAB 4           HASIL DAN PEMBAHASAN**  
Bab ini berisi tentang pembahasan hasil isolasi gen yang mengkode enzim omega-3 desaturase pada *Nannochloropsis sp.*
- **BAB 5           KESIMPULAN**  
Bab ini berisi kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Asam Lemak Omega-3

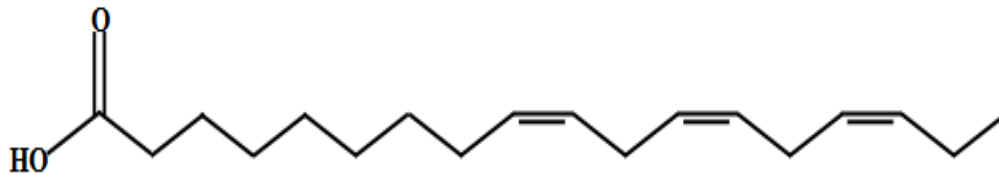
Asam lemak omega-3 merupakan golongan dari asam lemak rantai panjang tak jenuh atau *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang memiliki ikatan rangkap terakhir pada karbon ke-tiga dari ujung rantainya. Lemak tak jenuh memiliki jumlah molekul hidrogen dan kandungan kalori yang lebih sedikit dibandingkan lemak jenuh, namun lebih aktif dalam berbagai proses fisiologis tubuh seperti fungsi membran sel dan *cell signaling* serta dalam proses pengendalian inflamasi. Asam lemak omega-3 dikategorikan asam lemak esensial karena sangat diperlukan untuk pembentukan struktur dan kinerja fungsi sistem tubuh yang baik, namun tidak dapat diproduksi langsung oleh tubuh manusia, sehingga diperlukan suplemen dari luar (Collins, 2010).

##### 2.1.1 Jenis-Jenis Asam Lemak Omega-3

Asam lemak omega-3 yang bermanfaat bagi tubuh manusia adalah *α-linolenic acid* (ALA) 18:3n-3, *stearidonic acid* (SDA) 18:4n-3, *eicosapentaenoic acid* (EPA) 20:5n-3 dan *docosahexaenoic acid* (DHA) 22:6n-3 (Collins, 2010).

- *Alpha-linolenic Acid (ALA) 18:3n-3*

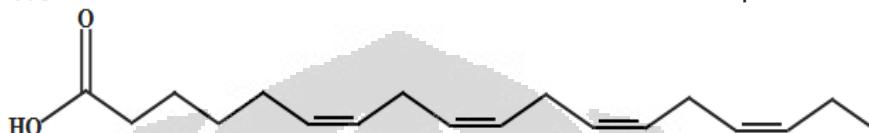
*Alpha-linolenic acid* (ALA) adalah asam lemak omega-3 yang banyak ditemukan pada tumbuhan. ALA memiliki 18 karbon dengan 3 ikatan rangkap antar karbon. ALA bisa dikonversi menjadi asam lemak tak jenuh lebih tinggi atau *highly unsaturated fatty acid* (HUFA) yang memiliki 20 atau lebih karbon dengan 3 atau lebih ikatan rangkap antar karbon. ALA dikonversi menjadi 6% sampai 21% untuk EPA dan 3.8% sampai 9% untuk DHA.



Gambar 2.1. Struktur ALA

- *Stearidonic Acid (SDA) 18:4n-3*

*Stearidonic acid* (SDA) adalah salah satu asam lemak omega-3 yang terdapat dalam jumlah sedikit pada ikan dan makanan laut lainnya. SDA memiliki 18 karbon dengan 4 ikatan rangkap antar karbon. Penelitian menunjukkan bahwa SDA bisa dimanfaatkan untuk meningkatkan kandungan EPA dalam lipid manusia, dan jauh lebih efektif dari ALA.



**Gambar 2.2.** Struktur SDA

- *Eicosapentaenoic Acid (EPA) 20:5n-3*

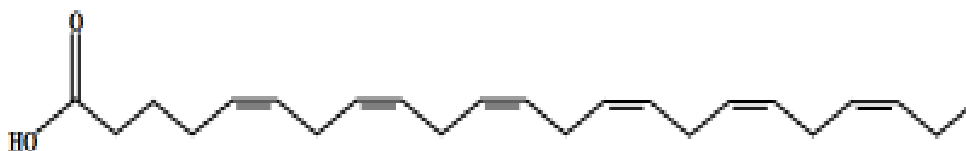
*Eicosapentaenoic acid* (EPA) merupakan asam lemak omega-3 yang bisa dibiosintesis dari PUFA yang dihasilkan oleh tumbuhan atau diekstrak langsung dari minyak ikan, seperti salmon, sarden dan minyak hati ikan kod. EPA memiliki 20 karbon dengan 5 ikatan rangkap antar karbon. Manfaat makanan atau suplemen yang kaya kandungan EPA berhubungan dengan anti *inflammatory*.



**Gambar 2.3.** Struktur EPA

- *Docosahexaenoic Acid (DHA) 22:6n-3*

*Docosahexaenoic Acid* (DHA) adalah asam lemak omega-3 yang bisa dibiosintesis dari EPA atau diperoleh langsung dari minyak ikan. Manfaat DHA jauh lebih banyak dikarenakan kemampuannya dalam meningkatkan fungsi membran sel dan *cellular signaling*. Asam lemak ini memiliki 22 karbon dengan 6 ikatan rangkap antar karbon.



**Gambar 2.4.** Struktur DHA

### 2.1.2 Mikroalga Sebagai Sumber Asam Lemak Omega-3

Sumber utama asam lemak omega-3 adalah minyak ikan. Selain itu asam lemak omega-3 juga terdapat pada biji-bijian seperti biji bunga matahari. Minyak ikan yang selama ini menjadi sumber utama omega-3 memiliki beberapa kelemahan, diantaranya memiliki kandungan vitamin larut lemak yang tinggi, terutama vitamin A, dimana konsumsi dalam jumlah banyak tidak akan memberi manfaat yang signifikan, sebaliknya menjadi racun bagi tubuh (Levy & Turkish, 2002). Selain itu minyak ikan dan sumber omega-3 lainnya seperti minyak nabati juga mengandung asam lemak omega 6 dalam tingkat tinggi. Hal ini ditengarai dapat menyebabkan penyakit degeneratif (Hoyos dkk., 2008). Adanya kandungan senyawa kontaminan seperti merkuri pada minyak ikan, juga merupakan salah satu pertimbangan untuk mencari sumber lain yang lebih sehat dan potensial.

Mikroalga telah menjadi sumber asam lemak omega-3 yang menjanjikan, karena beberapa spesies telah teridentifikasi sebagai produsen primer dalam produksi asam lemak ini. Beberapa spesies mikroalga memiliki sistem enzimatik untuk sintesis asam lemak omega-3. Bahkan sebagian spesies memiliki kemampuan untuk mengakumulasi sejumlah besar minyak dengan profil asam lemak yang sangat sederhana dimana omega-3 adalah komponen utamanya. Kelebihan utama dari asam lemak omega-3 yang berasal dari mikroalga adalah bebas dari kontaminan (Kiy dkk., 2005).

Beberapa spesies mikroalga yang telah diselidiki memiliki kandungan asam lemak omega-3 diantaranya *Porphyridium cruentum*, *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum tricorutum* dan *Monodus subterraneus* yang bisa menghasilkan EPA. Sementara *Cryptocodinium cohnii* dan *Chroomonas salina* mengandung DHA (Cohen dan Goldberg, 2005).

Mikroalga kemudian tidak hanya dijadikan sebagai sumber langsung asam lemak omega-3, tapi juga dijadikan sebagai sumber gen yang dapat mengkode enzim yang terlibat dalam sintesis asam lemak omega-3. Gen ini kemudian diimplementasikan untuk produksi asam lemak omega-3 pada organisme yang lebih terkontrol dan cepat dalam memproduksi seperti *E. coli* dan *yeast* (Iskandarov dkk., 2009).

### 2.1.3 Biosintesis Asam Lemak Omega-3

Mikroalga memiliki sistem enzimatik untuk biosintesis asam lemak omega-3. Asam lemak omega-3 diawali dari konversi *Linoleic Acid* ( LA, asam lemak omega 6 ) menjadi ALA ( asam lemak omega-3 ) yang dikatalis oleh enzim omega-3 desaturase. ALA kemudian dikatalis oleh enzim  $\Delta 6$ -desaturase menjadi SDA. SDA dibantu oleh enzim  $\Delta 6$ -elongase diubah menjadi ETA. Selanjutnya ETA dikonversi menjadi EPA oleh enzim  $\Delta 5$ -desaturase. EPA dibantu oleh enzim  $\Delta 5$ -elongase diubah menjadi DPA, kemudian DPA diubah menjadi DHA dengan bantuan enzim  $\Delta 4$ -desaturase.



**Gambar 2.5.** Biosintesis asam lemak omega-3 dan omega 6 ( Zhou dkk., 2007 )

Enzim omega-3 desaturase memiliki peran yang sangat besar dalam biosintesis asam lemak omega-3. Enzim ini tidak hanya bekerja pada awal biosintesis, tapi juga mampu mengubah GLA dan AA ( omega 6 ) menjadi SDA dan EPA ( omega-3 ).

### 2.2 Isolasi Gen Omega-3 Desaturase

Gen omega-3 desaturase merupakan gen yang mengkode pembentukan enzim omega-3 desaturase. Gen ini telah dipelajari pada beberapa spesies tanaman seperti *Arabidopsis* dan bunga matahari ( Li dkk., 2007 ) serta pada mikroalga *Dunnaliella salina* ( Lyukevich dkk., 2002 ).

### 2.2.1 Pemurnian DNA

Pemurnian DNA merupakan salah satu langkah awal untuk mengisolasi gen omega-3 desaturase. Secara umum tahap untuk pemurnian DNA meliputi pemecahan sel, ekstraksi menggunakan fenol atau kloroform, presipitasi menggunakan etanol, pemurnian dari RNA menggunakan enzim RNase, dan pengulangan ekstraksi dan presipitasi.

Untuk sel tumbuhan dan mikroalga pemecahan sel meliputi pemecahan dinding sel dan membran sel. Pemecahan dinding sel umumnya dilakukan dengan cara mekanis menggunakan *mortar* dan *pestle* dalam larutan nitrogen. Larutan nitrogen membuat jaringan dan sel menjadi kering dan rapuh sehingga lebih mudah dihancurkan. Kemudian untuk menghancurkan membran sel umumnya digunakan deterjen. Terdapat dua jenis deterjen yang biasa digunakan dalam ekstraksi DNA, yaitu *sodium dodecyl sulphate* ( SDS ) dan *cetyl trimethyl ammonium bromida* ( CTAB ). Molekul deterjen memiliki dua sisi yang berlawanan, yaitu sisi hidrofobik dan sisi hidrofilik. Sementara membran sel memiliki dua lapisan lemak dengan molekul yang juga memiliki sisi hidrofobik dan hidrofilik. Saat molekul deterjen bercampur dengan sel, maka sisi yang sama akan saling berikatan, sehingga deterjen dapat mengikat lemak. Dengan demikian struktur membran sel akan rusak, dan nukleus yang mengandung DNA terlepas dari sel ( Vinod, 2004 ).

Ekstraksi umumnya menggunakan pelarut organik seperti kloroform dan fenol atau campuran ke duanya. Setelah sentrifugasi, akan terbentuk dua fasa, dimana fasa bagian atas adalah fasa cair berwarna bening, mengandung DNA yang terlarut dalam air. Sementara fasa bagian bawah adalah fasa organik yang mengandung lipid dan protein. Diantara kedua fasa ini, terdapat interfasa yang mengandung debris, molekul-molekul yang tidak terlarut dalam kedua fasa.

DNA yang terkandung dalam fasa cair, kemudian digumpalkan dengan alkohol dan garam. Proses ini menghasilkan asam nukleat secara umum. Untuk mendapatkan DNA yang murni, maka perlu ditambahkan enzim RNase untuk menghilangkan RNA. Setelah proses ini umumnya dilakukan lagi proses ekstraksi menggunakan fenol/kloroform untuk meningkatkan kemurnian DNA. Pellet DNA

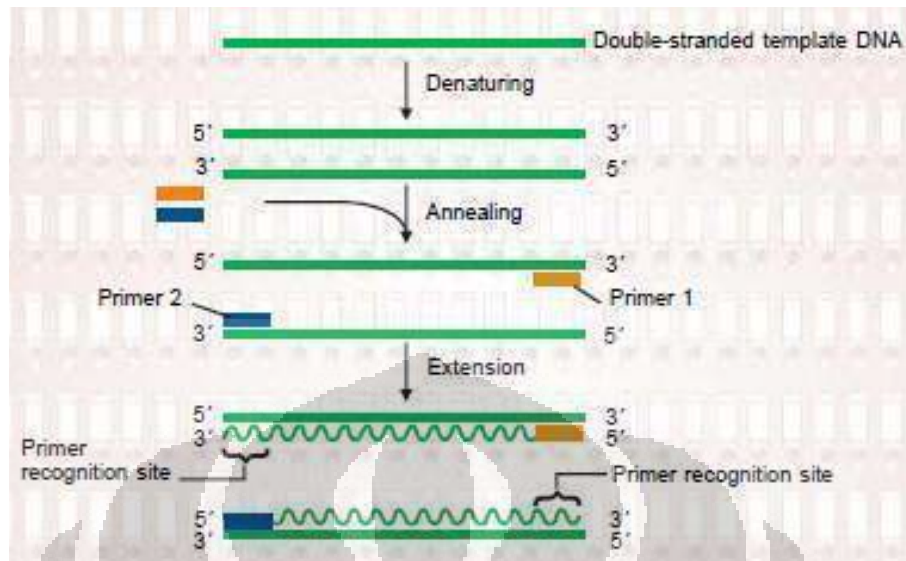
dilarutkan dalam aquades atau bufer Tris-EDTA ( TE ), kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2 *Polymerase Chain Reaction*

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik yang digunakan untuk menggandakan DNA secara eksponensial ( Lisby, 1998 ). Pada proses PCR diperlukan DNA target, enzim *polymerase*, primer dan deoksinukleotida. DNA target digunakan sebagai templat yang akan digandakan. Polimerase merupakan enzim yang dapat merangkaikan blok-blok tunggal ( deoksinukleotida ) pembentuk DNA menjadi suatu rantai molekul yang panjang. Primer merupakan fragmen singkat yang komplementer terhadap DNA target, digunakan sebagai inisiator untuk membentuk DNA yang diinginkan ( Sridhar, 2006 ).

Tahap PCR adalah sebagai berikut ( Vicente, 2003 ) :

- *Denaturation*  
Fragmen DNA dipanaskan pada temperatur tinggi (  $94-96^{\circ}\text{C}$  ) yang membuat bentuk *double helix* DNA menjadi *single helix*.
- *Annealing*  
Campuran reaksi didinginkan. Kemudian primer mendekat pada sisi DNA templat yang komplementer. Kemudian terbentuk DNA rantai ganda diantara primer dan rantai komplementer.
- *Extension*  
Enzim *polymerase* mensintesis sebuah rantai yang komplementer. Enzim akan mengenali urutan nukleotida pada rantai yang berlawanan dan memperpanjang primer dengan penambahan nukleotida sehingga rantai yang terbentuk bisa berpasangan. Proses keseluruhan diulangi terus-menerus.



**Gambar 2.6.** Tahap PCR ( Vicente, 2003 )

Proses PCR dilakukan dalam mesin PCR yang disebut *Thermocycler*.



**Gambar 2.7.** *Thermocycler*

### 2.2.3 Gel Elektroforesis

Gel elektroforesis merupakan metode elektroforesis menggunakan gel agarosa untuk memvisualisasikan produk PCR. Proses ini digunakan untuk mengetahui keberhasilan PCR secara kualitatif ( Crandall dan Barber, 2004 ). Prinsip kerjanya adalah pemisahan fragmen DNA berdasarkan berat molekul



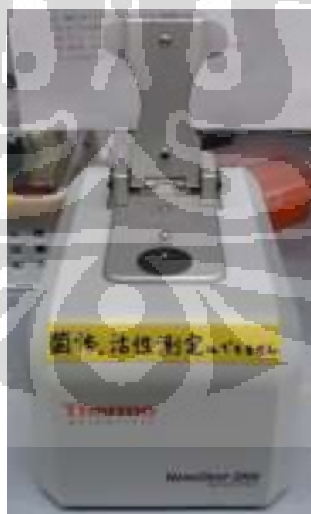
dengan dibantu oleh arus listrik. DNA yang bermuatan negatif didalam gel agarosa akan bergerak menuju anoda. Gel agarosa berfungsi sebagai filter selektif, dimana DNA dengan berat molekul yang berbeda akan memberikan *band* yang spesifik ( Vinod, 2004 ).

Pada gel elektroforesis digunakan larutan etidium bromida untuk pewarnaan. Larutan ini akan berpendar saat visualisasi DNA dengan menggunakan cahaya UV. Ukuran fragmen DNA bisa diketahui dengan membandingkan band dari produk dengan band dari DNA yang telah diketahui ukurannya, yang disebut marker ( Vinod , 2004 ).

#### 2.2.4 Spektroskopi

Metoda spektroskopi digunakan untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 260. Sementara kemurniannya diketahui dengan membandingkan rasio yang diperoleh dari pengukuran pada panjang gelombang 260 dan 280 atau 260 dan 230. DNA dikatakan murni jika rasio absorbansi 260:280 sebesar 1.7-1.9, dan jika rasio absorbansi 260:230 sebesar 1.5 ( Vinod, 2004 ).

Pada penelitian kali ini, digunakan peralatan spektroskopi UV-Vis.



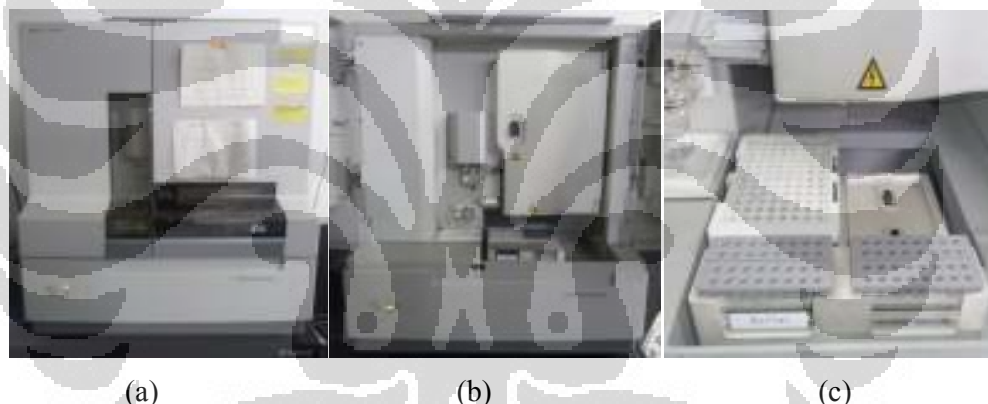
**Gambar 2.8.** Spektroskopi UV-Vis

### 2.3 Kloning Gen Omega-3 Desaturase

Kloning merupakan proses pemindahan suatu gen dari kromosom asalnya ke dalam suatu vektor atau plasmid untuk kemudian digandakan dalam sel yang

telah kompeten. Gen yang disisipkan kedalam vektor disebut *insert* dan proses penyisipannya disebut ligasi. *Insert* yang telah menyatu dengan vektor disebut DNA rekombinan. DNA rekombinan kemudian dikenalkan dalam sel inang. Sel inang yang umum digunakan adalah sel kompeten bakteri *Eschericia coli* DH5 $\alpha$ . Didalam sel inang, *insert* akan direplikasi bersama dengan vektor sehingga dihasilkan molekul DNA identik dalam jumlah yang sangat banyak ( Lodish dkk., 2008 ).

Konfirmasi keberhasilan proses kloning umumnya dilakukan dengan *colony* PCR dan DNA *sequencing*. *Colony* PCR merupakan proses untuk konfirmasi dan skrining *insert* plasmid secara langsung dari koloni *E. coli*. DNA *sequencing* merupakan proses untuk karakterisasi cDNA dari DNA kloning, konfirmasi identitas hasil kloning atau mutasi, serta identifikasi produk dari PCR ( Sambrook, 2001 ).



**Gambar 2.9.** Mesin *sequencer* a) tampak depan b) bagian dalam c) tempat sampel.

#### 2.4 *State of the Arts*

Studi genetika meliputi isolasi dan kloning gen yang mengkode enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis asam lemak pada mikroalga telah banyak dilakukan oleh peneliti-peneliti sebelumnya.

Lyukevich dkk., 2002 melakukan kloning gen omega-3 desaturase dari spesies *Dunaliella salina* dan mempelajari ekspresi gen tersebut. Beberapa parameter yang dilihat dalam penelitian mereka adalah efek temperatur, level iradiasi cahaya dan konsentrasi CO<sub>2</sub> terhadap ekspresi gen omega-3 desaturase. Isolasi dilakukan terhadap fraksi Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA menggunakan *Messenger RNA*

*Isolation Kit* ( *Stratagene, United States* ) dari sel *D. salina*, kemudian dilakukan reaksi PCR. Fragmen DNA hasil PCR kemudian dimurnikan menggunakan gel elektroforesis dan diisolasi menggunakan *GeneClean III Kit* ( *Bio 101, United States*). *Sequencing* dilakukan dalam pT7Blue-des3-1 plasmid. Urutan nukleotida dari fragmen gen yang mengkode omega-3 desaturase *D. salina* kemudian dimasukkan ke dalam database internasional GenBank/EMBL/DDJB dengan nomor akses AF083613. Selain itu Lyukevich dan kawan-kawan juga melakukan isolasi total DNA, hibridisasi DNA-DNA dan hibridisasi RNA-DNA.

Untuk memastikan bahwa hasil kloning merupakan gen yang mengkode enzim omega-3 desaturase maka dilakukan perbandingan homologi antara urutan asam amino yang diperoleh dari eksperimen dengan urutan asam amino yang telah diketahui mengkode enzim omega-3 desaturase. Dari perbandingan ini diperoleh urutan yang homolog, terutama pada rentang urutan yang berhubungan dengan karakteristik sisi katalitik dari enzim omega-3 desaturase. Sehingga dapat disimpulkan bahwa fragmen hasil kloning merupakan gen omega-3 desaturase. Hibridisasi fragmen hasil kloning dengan DNA genomik dari *D.salina* menunjukkan bahwa genom dari mikroalga ini terdiri dari urutan nukleotida yang komplementer terhadap fragmen. Analisis filogenetik menunjukkan enzim omega-3 desaturase dari *D.salina* 50-57% homolog dengan omega-3 desaturase dari tanaman tingkat tinggi, 40% homolog dengan omega-3 desaturase *Cyanobacteria* dan 23% homolog dengan enzim hewan. Analisis ini juga menunjukkan bahwa enzim omega-3 desaturase dari *D.salina* lebih dekat dengan desaturase tanaman tingkat tinggi yang berasal dari retikulum endoplasma ( *FAD3* ). Ekspresi gen omega-3 desaturase didukung oleh temperatur yang rendah dan konsentrasi CO<sub>2</sub> yang tinggi. Faktor itulah yang meningkatkan kandungan asam lemak omega-3 pada sel *D.salina*. Ekspresi gen omega-3 desaturase tidak dipengaruhi oleh tingkat iradiasi cahaya.

Suga dkk., 2002 juga melakukan isolasi dua gen dari *Chlorella vulgaris*, yaitu gen untuk delta 12 desaturase dan omega-3 desaturase. Sequens asam amino untuk gen delta 12 desaturase yang dinamakan CvFad2 menunjukkan 66 % kesamaan dengan delta 12 desaturase dari beberapa tanaman tingkat tinggi, dan gen ini memiliki aktivitas enzim delta 12 desaturase saat diekspresikan dalam

*Saccharomyces cerevisiae*. Sementara sequens asam amino untuk gen omega-3 desaturase yang dinamakan CvFad3 menunjukkan 60% kesamaan dengan gen omega-3 desaturase dari beberapa tanaman tingkat tinggi. Ekspresi gen ini pada tanaman tembakau transgenik menunjukkan bahwa gen ini mengkode enzim omega-3 desaturase yang terdapat pada mikrosom.

Zhang dkk., 2011 melakukan isolasi gen omega-3 desaturase lengkap yang dinamakan CiFAD3 dari alga antartika, *Chlamydomonas sp.* Isolasi dilakukan melalui metode RT-PCR dan RACE. *Sequence alignment* dan analisis filogenetik menunjukkan bahwa gen yang diisolasi homolog dengan gen omega-3 desaturase kloroplas yang telah diketahui. Tingkat ekspresi mRNA pada CiFAD3 diukur dengan RT-PCR kuantitatif. Hasilnya menunjukkan temperatur dan salinitas bisa mendorong pengaturan ekspresi CiFAD3.

Isolasi gen desaturase juga telah dilakukan oleh Zhou dkk., 2007 yang meliputi gen untuk enzim delta 4, delta 5 dan delta 8 desaturase, dari mikroalga laut *Pavlova salina*. Isolasi terhadap gen yang mengkode enzim desaturase juga dilakukan terhadap beberapa spesies mikroalga lain, seperti isolasi gen delta 6 desaturase pada *Nannochloropsis oculata* ( Xiaolei dkk., 2011 ), mikroalga *Phaeodactylum tricornutum* ( Domergue dkk., 2002 ) dan *Thalassiosira pseudonana* ( Tonon dkk., 2005 ) kemudian juga delta 4 desaturase dari *Thraustochytrium sp.* ATCC 21685 ( Qiu dkk., 2001 ), *Pavlova lutheri* (Tonon dkk., 2003). Gen ini, dan lainnya telah dikenalkan atau dikloning ke dalam *yeast* dan tanaman tingkat tinggi dalam rangka sintesis asam lemak tak jenuh rantai panjang ( LCPUFA ).

Mikroalga

Gen ↑	Omega 3 desaturase	Zhang <i>et al.</i> , 2011	Suga <i>et al.</i> , 2002	Lyukevich <i>et al.</i> , 2002							Penelitian Sekarang
	Delta 12 desaturase										
	Delta 8 desaturase					Zhou <i>et al.</i> , 2007					
	Delta 6 desaturase				Xiaolei <i>et al.</i> , 2011			Domergue <i>et al.</i> , 2002	Tonon <i>et al.</i> , 2005		
	Delta 5 desaturase					Zhou <i>et al.</i> , 2007					
	Delta 4 desaturase						Tonon <i>et al.</i> , 2003			Qiu <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Chlamydomonas sp</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. salina</i>	<i>N. oculata</i>	<i>P. salina</i>	<i>P. lutheri</i>	<i>P. tricorutum</i>	<i>T. pseudonana</i>	<i>Thraustochytrium sp. ATCC 21685</i>	<i>Nannochloropsis sp. Isolat Lokal</i>	

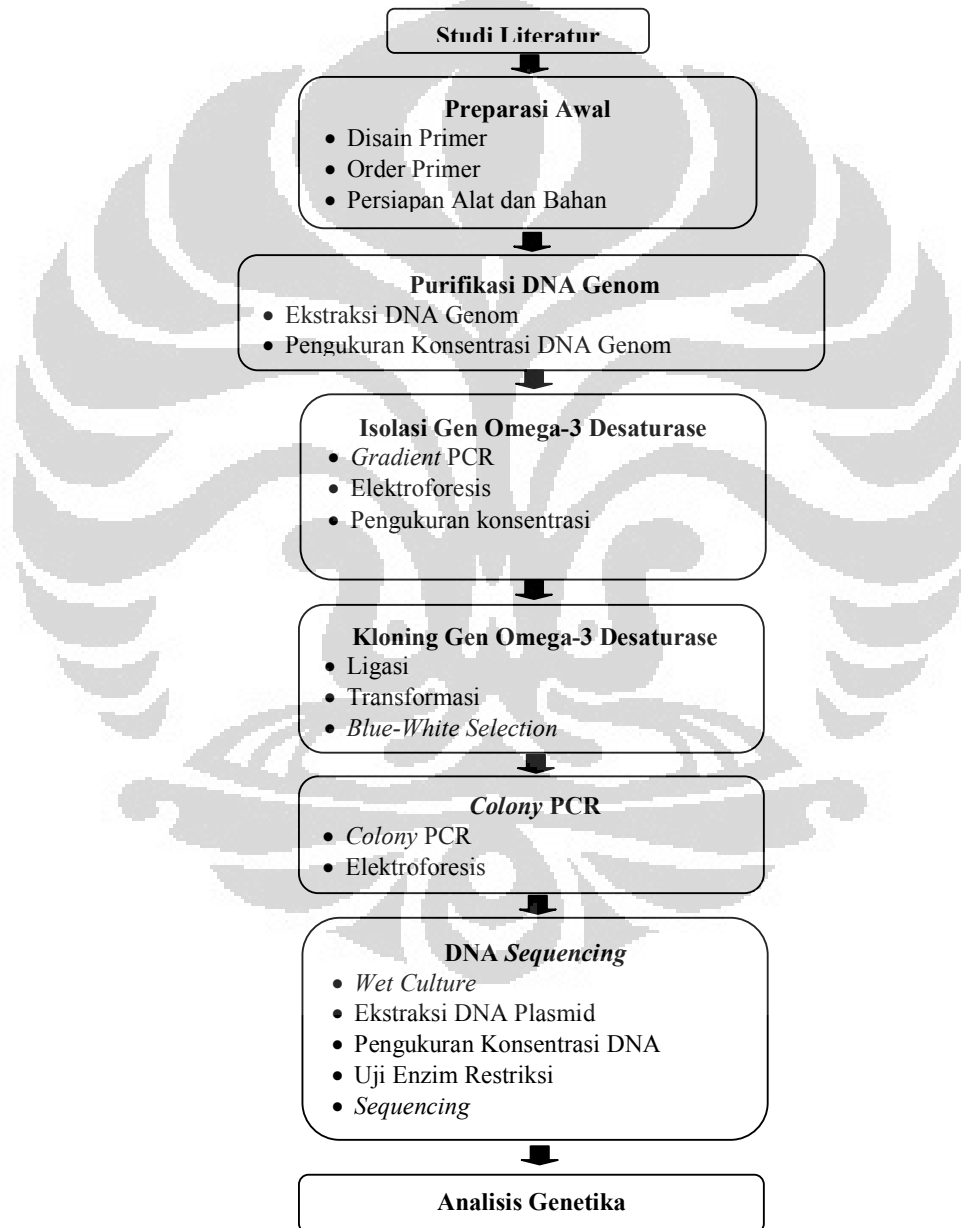
Mikroalga →

**Gambar 2.10.** Bagan *State of the Arts*

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Life Science and Biotechnology*, *Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan*. Diagram alir penelitian ditunjukkan pada gambar 3.1 di bawah ini.



**Gambar 3.1.** Diagram alir penelitian

Penelitian ini diawali dengan studi literatur terhadap jurnal nasional dan internasional yang terkait. Selanjutnya dilakukan preparasi awal yang meliputi perancangan primer, pengorderan primer serta persiapan alat dan bahan.

Secara garis besar eksperimen terbagi atas 5 tahap. Tahap pertama adalah purifikasi DNA genom dari *Nannochloropsis* sp. menggunakan metode ekstraksi dengan bantuan proteinase K sebagai pendegradasi dinding sel mikroalga. Konsentrasi DNA genom kemudian diukur menggunakan spektroskopi UV-Vis. Tahap kedua adalah isolasi gen omega-3 desaturase melalui *gradient Polymerase Chain Reaction* ( PCR ) dan elektroforesis. Untuk memperbanyak fragmen DNA omega-3 desaturase dilakukan PCR. Untuk pemisahan, identifikasi dan purifikasi fragmen DNA tersebut dilakukan dengan gel elektroforesis. Selanjutnya fragmen DNA yang telah dimurnikan diukur kembali konsentrasinya menggunakan Spektroskopi UV-Vis. Tahap selanjutnya adalah kloning gen omega-3 desaturase melalui proses ligasi menggunakan T-vector pMD20 ( Takara, Jepang ), kemudian ditransformasikan kedalam sel kompeten bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$ . Bakteri kemudian dikulturkan pada *plat* agar yang mengandung antibiotik *ampicilin*. Kemudian dipilih koloni yang berwarna putih untuk diteruskan ke tahap selanjutnya. Tahap berikutnya adalah *colony* PCR yang dilakukan untuk mengkonfirmasi keberadaan fragmen gen omega-3 desaturase pada koloni yang telah dipilih dari tahap sebelumnya. Koloni yang positif mengandung fragmen gen omega-3 desaturase kemudian dikultur cair, dan diekstrak plasmid yang telah disisipi DNA omega-3 desaturase. Plasmid yang telah diisolasi kemudian diuji menggunakan enzim restriksi secara *double digestion* maupun *single digestion*. Pengujian ini dilakukan untuk memastikan bahwa plasmid yang diekstrak mengandung gen yang telah disisipi ke vektor. Selanjutnya barulah dilakukan *sequencing* untuk mendapatkan data urutan nukleotida dari gen yang diisolasi.

Setelah tahapan eksperimen selesai, dilakukan analisis genetika dengan menggunakan *software* Genetyx.

### 3.2 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini digunakan alat dan bahan sebagai berikut :

### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan beserta fungsinya dapat dilihat pada table 3.1 .

**Tabel 3.1.** Alat beserta fungsinya

No.	Alat	Fungsi
1	Labu ukur 100 mL	Wadah untuk membuat larutan gel agarosa
2	Gelas beaker 100 mL	Wadah untuk membuat larutan dan bufer
3	<i>Polypropilene Tubes</i> 10 mL	Wadah untuk proses ekstraksi dan kultur basah
4	<i>Microtubes</i> 2 mL	Wadah untuk sampel pada proses ekstraksi
5	<i>Microtubes</i> 1.5 mL	Wadah untuk sampel pada proses ekstraksi
6	<i>Microtubes</i> 0.5 mL	Wadah untuk sampel pada proses PCR
7	Mikropipet	Memindahkan larutan secara kuantitatif
8	Neraca	Menimbang massa sampel dan bahan yang dibutuhkan
9	<i>Magnetic Stirrer</i>	Mengaduk larutan
10	<i>Mortar dan pestle</i>	Menghaluskan sampel
11	<i>Ampicilin</i>	Medium kultur bakteri
12	<i>96 well plat</i>	wadah untuk sampel pada proses <i>sequencing</i>
13	Cetakan Gel	Wadah untuk membentuk gel agarosa
14	Inkubator	Inkubasi sampel
15	<i>Waterbath</i>	Inkubasi dan sterilisasi
16	<i>Autoclave</i>	Sterilisasi alat dan bahan
17	<i>Microwave</i>	Memanaskan larutan gel agarosa
18	Vortex	Homogenisasi larutan
19	<i>Centrifuge</i>	Mengendapkan
20	<i>Dry vacuum</i>	Mengeringkan
21	<i>Thermalcycler</i>	Mesin untuk reaksi PCR
22	Spektroskopi UV-Vis	Mengukur konsentrasi DNA
23	Elektroforesis	Pemisahan dan pemurnian fragmen DNA
24	<i>Sequencer</i>	Mesin untuk <i>sequencing</i>
25	Refrigerator -20°C	Menyimpan sampel

### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dan fungsinya terdapat pada tabel 3.2 berikut ini.



**Tabel. 3.2.** Bahan dan fungsinya

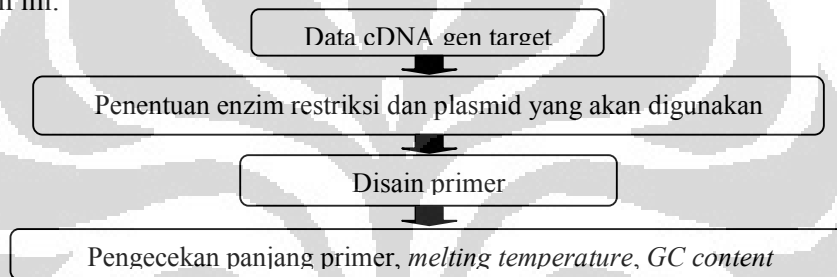
No.	Bahan	Fungsi
1	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Sampel
2	CTAB	Bufer untuk ekstraksi DNA
3	Tris	Bufer untuk ekstraksi DNA
4	0.5 M EDTA	Bufer untuk ekstraksi DNA
5	NaOH	Bufer untuk ekstraksi DNA
6	PVP	Bufer untuk ekstraksi DNA
7	Kloroform	Pelarut untuk ekstraksi DNA
8	Isoamilalkohol	Pelarut untuk ekstraksi DNA
9	isopropanol	Pelarut untuk ekstraksi DNA
10	Etanol	Pencuci pellet
11	RNAse A	Enzim yang digunakan untuk ekstraksi DNA
12	Agarosa	Gel elektroforesis
13	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Bufer untuk ekstraksi DNA
14	Etidium Bromida	Staining pada elektroforesis
15	1 kb & 100bp DNA Ladder	Marker untuk elektroforesis
16	Enzim Ex Taq	Enzim untuk reaksi PCR
17	Ex taq bufer	Bufer untuk reaksi PCR
18	Enzim Taq Polimerase	Enzim untuk reaksi PCR
19	Thermophol Bufer	Bufer untuk reaksi PCR
20	dNTPs	Campuran deoxynucleotida untuk proses PCR
21	Primer ( <i>forward &amp; reverse</i> )	Segmen DNA yang menginisiasi replikasi DNA pada reaksi PCR
22	T-Vector pMD20	Vektor untuk kloning
23	<i>DNA Ligation Kit</i>	Kit untuk proses ligasi
24	Sel kompeten <i>E.coli</i>	Sel yang digunakan untuk kloning
25	<i>Ampicilin, IPTG, X-Gal</i>	Medium kultur bakteri
26	<i>Cycle Growth</i>	Medium kultur bakteri
27	Enzim Restriksi NdeI	Kloning gen
28	Enzim Restriksi XhoI	Kloning gen
29	Enzim Restriksi SpeI	Uji enzim restriksi
30	Enzim Restriksi BamHI-HF	Uji enzim restriksi
31	Proteinase K	Enzim untuk ekstraksi
32	SDS	Bufer untuk ekstraksi DNA
33	PEG	Ekstraksi DNA
34	<i>GeneClean II Extraction Kit</i>	Untuk ekstraksi DNA dari gel agarosa
35	<i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Untuk <i>sequence</i> PCR
36	Aquades	Pelarut
37	Nitrogen Cair	Ekstraksi DNA genom

### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini secara umum dimulai dengan persiapan awal berupa disain dan order primer, diikuti dengan kegiatan eksperimen meliputi purifikasi DNA genom, isolasi gen omega-3 desaturase, kloning gen omega-3 desaturase, konfirmasi melalui *colony PCR* dan *sequencing* kemudian diakhiri dengan analisa genetika menggunakan *software* Genetyx.

#### 3.3.1 Disain Primer

Primer merupakan segmen DNA yang komplementari terhadap sequens DNA target. Primer dibutuhkan untuk inisiasi dalam proses replikasi DNA melalui reaksi PCR. Langkah-langkah disain primer ditunjukkan oleh bagan di bawah ini.



**Gambar 3.2.** Diagram alir perancangan primer

Data cDNA yang digunakan pada penelitian ini diambil dari database GenBank dengan *Accesion Number* AY685914. Data ini masih parsial, karena untuk gen omega-3 desaturase dari *Nannochloropsis oculata* belum terdapat cDNA yang lengkap.

```

GGTGGCCTCGATGAGGTGGTAATGGGGGATCTTGGGAAGAAGTGCTGCCGCTGTTGCCTTCGTTGTATC
GCCACGGCCTTCGGGAGAAGTTCAAGGGGAGAAGAAGGGTGAGGAGAATGAGGGGGAGAAAGAGGAGGA
CTACGCGCTTGCTGATAGAACAGTGGAGACTTTACACGGAGAGATGCCGGAGGTAGGCGGGGCGATGATC
AGGTGTGGGCTCTCGGCCGGGCGCTGGTATTAAGTTGGTACCAGCACTCATTTTGGGGTGTCTTGTCCG
TGACTGAGCTTGCGATCAATGAGACCTTGAGGTTCTTTACGGGCGCAAAGGGCAGGTGGCCCTGGTCTC
AGCCCTTTTTCGGCATGTGAGGGAGGAGTTATTGAGGGCGGGCGGGCAGGATGATATGCTCCGCTCTC
TTTCATCTCTTTTACACGGGGTACGGCGCTTTGAGTTTACGCCGAGGTGGTGGAGAACATGGGCTTG
  
```

**Gambar 3.3.** Data cDNA gen omega-3 desaturase ( GenBank )

Selanjutnya adalah menentukan enzim restriksi yang akan digunakan untuk mengambil gen ( *insert* ) dari vektor pada proses kloning. Disini enzim restriksi yang dipilih adalah enzim restriksi yang tidak memotong gen target. Untuk identifikasi enzim tersebut digunakan *software* Genetyx dan dipilih dua

enzim restriksi yaitu NdeI dan XhoI. Sementara plasmid yang digunakan adalah T-Vector pMD20.

Tahap selanjutnya adalah disain primer. Primer harus mengandung sisi yang mengenali enzim restriksi dan urutan DNA target. Setelah terbentuk sepasang primer, dilakukan pengecekan panjang primer, *melting temperature*, dan *GC content*. Pengecekan dilakukan menggunakan *software online OligoAnalyzer* ([www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer](http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer)).

Primernya adalah sebagai berikut :

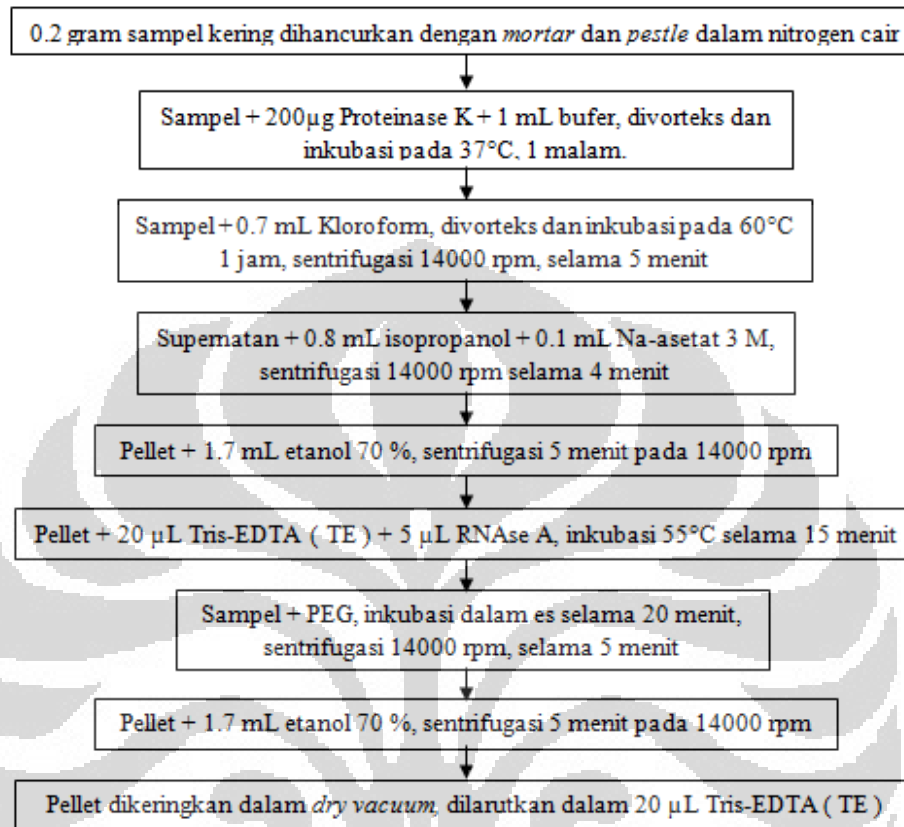
- Primer *forward* : NdeIO3DesNO\_Fw  
5'-CATATGAGGTGGTAATGGGGGATCTG-3'
- Primer *reverse* : XhoIO3DesNO\_Rv  
5'-CTCGAGCAAGCCCATGTTCTCCACCAC-3'

### 3.3.2 Purifikasi DNA Genom

Purifikasi DNA genom dilakukan dengan metode manual menggunakan proteinase K dan kloroform sebagai pelarut. Pada awalnya juga dilakukan ekstraksi menggunakan metode CTAB, namun tidak memberikan hasil yang memuaskan. Pada metode ini digunakan deterjen *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) untuk menghancurkan membran sel. Selanjutnya ekstraksi dilakukan dengan menggunakan fenol dan kloroform, yang diikuti dengan presipitasi menggunakan etanol. Ekstraksi dilakukan dua kali. RNase A ditambahkan untuk memurnikan DNA dari RNA. Kemudian diulangi lagi ekstraksi menggunakan fenol dan presipitasi dengan etanol. Pellet yang dihasilkan kemudian dilarutkan dalam larutan TE.

Pada proses ekstraksi menggunakan proteinase K, 0.2 gram sampel kering dihaluskan dalam cairan nitrogen menggunakan *mortar* dan *pestle* hingga menjadi bentuk pasta. Tujuan dari proses ini adalah untuk memecah dinding sel mikroalga. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam microtube 2 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL bufer dan 200 µg proteinase K. Bufer yang digunakan terdiri dari 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> dan 1% SDS. SDS adalah salah satu jenis deterjen, dibantu dengan proteinase K yang berfungsi untuk

memecah membran sel. EDTA digunakan untuk melindungi DNA dari enzim nuclease. Sampel kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 37° C semalaman.



**Gambar 3.4.** Diagram alir proses ekstraksi DNA genom

Selanjutnya dilakukan proses deproteinasi menggunakan pelarut berupa kloroform dan isopropanol. Kloroform dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi DNA karena kemampuannya untuk merusak protein, sementara isopropanol berfungsi untuk menggumpalkan protein. Setelah proses ini dilakukan pencucian pellet yang mengandung DNA dengan menggunakan 70% etanol, kemudian pellet dikeringkan dalam *dry vacuum*.

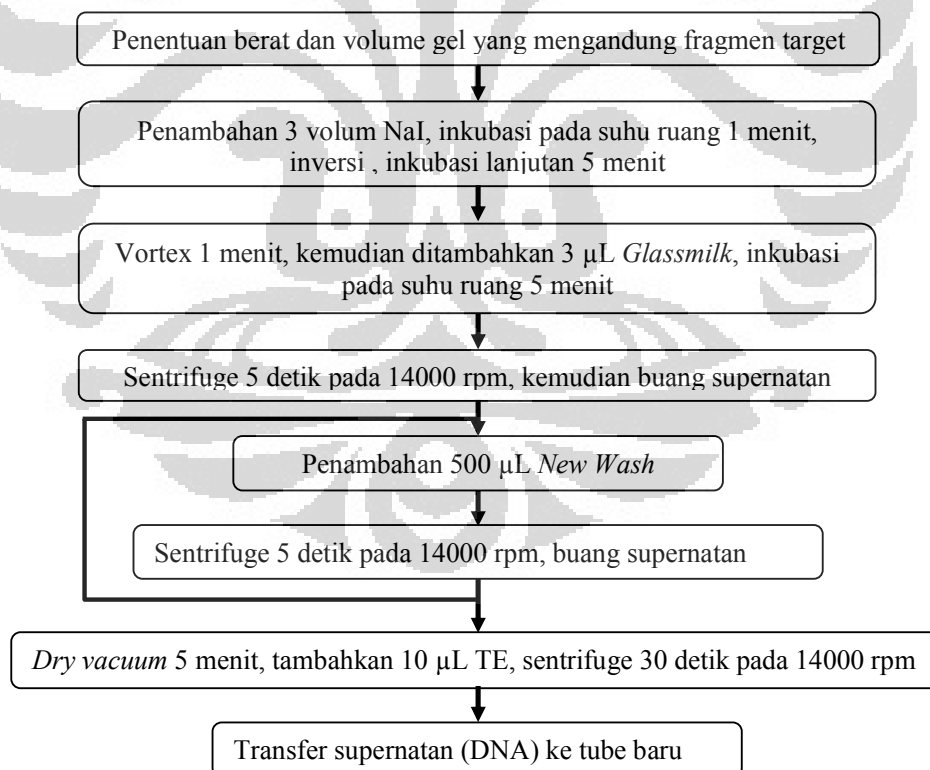
Untuk memurnikan DNA dari RNA maka dilakukan treatment menggunakan enzim RNase A. Pemurnian lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan PEG untuk menggumpalkan protein. Sampel disentrifuge, pellet kemudian dicuci dengan etanol dan dikeringkan. DNA kemudian dilarutkan dalam 20 µL TE. Konsentrasi DNA kemudian diukur dengan menggunakan Spektroskopi UV-Vis.

### 3.3.3 Isolasi Gen Omega-3 Desaturase

Isolasi gen Omega-3 Desaturase dilakukan dengan PCR. Pada awalnya dilakukan PCR biasa dengan komposisi campuran dan kondisi reaksi yang mengacu pada literatur. Namun dari beberapa kali percobaan PCR, tidak diperoleh hasil yang diinginkan.

Kemudian dilakukan *gradient* PCR yang berhasil mengamplifikasi DNA target yang diinginkan. Pada percobaan *gradient* PCR sampel dibagi menjadi 6 tubes dengan variasi komposisi pada primer dan enzim Ex Taq, dijalankan sebanyak 30 *cycles*.

Produk dari *gradient* PCR kemudian dipisahkan dan dimurnikan melalui gel elektroforesis. Pada percobaan ini digunakan 1% agarosa gel dengan *marker* berupa  $\lambda$  *marker* dan 100bp *marker*. Produk PCR dicampur dengan 10X *loading dye bufer*, kemudian dimasukkan ke sumur pada gel agarosa. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 25 menit. *Staining* dilakukan dalam larutan etidium bromida selama 15 menit.

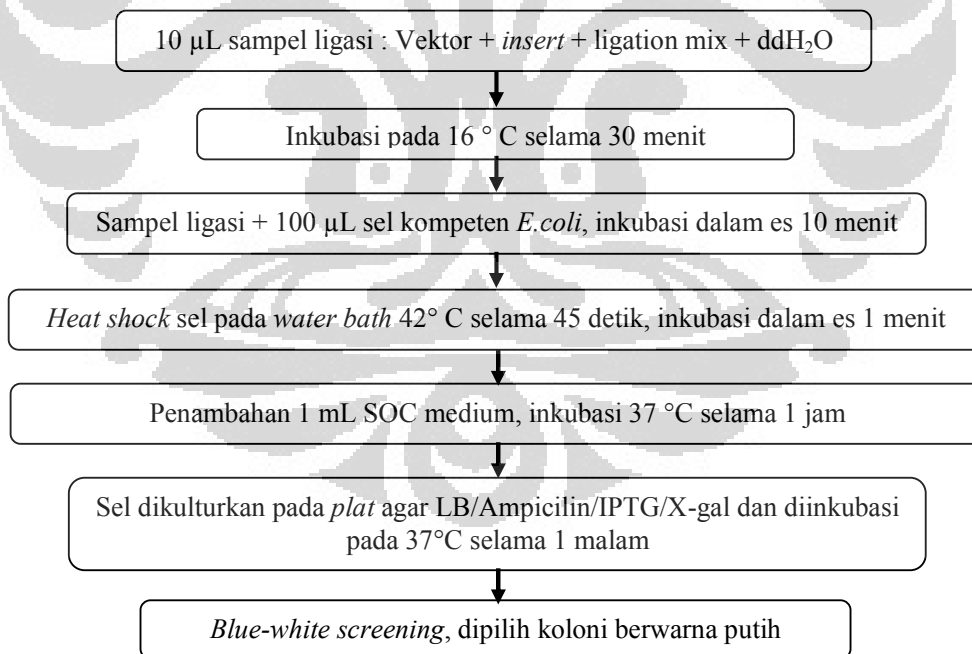


**Gambar 3.5.** Diagram alir pemurnian DNA dari gel agarosa

Selanjutnya dilakukan pemurnian fragmen DNA yang telah diidentifikasi sebagai gen omega-3 desaturase dari gel agarosa. Pemurnian dilakukan dengan *GeneClean II*, salah satu kit untuk ekstraksi dimana cara kerjanya terdiri dari 3 langkah umum yaitu pengikatan DNA, pencucian dan elusi. Kit ini digunakan untuk purifikasi DNA dengan panjang 200bp-20 Kb. Reagen yang digunakan pada purifikasi ini adalah NaI, glassmilk ( *silica matrix* ) dan *New Wash* ( campuran NaCl, EDTA dan Tris ).

### 3.3.4 Kloning Gen Omega-3 Desaturase

Proses kloning terdiri dari dua tahap yaitu ligasi dan transformasi. Pada tahap ligasi, produk PCR yang disebut *insert* dimasukkan ke dalam vektor , dimana pada percobaan ini digunakan T-Vector pMD20 ( Takara, Japan ), dan diinkubasi pada 16 ° C selama 30 menit. Larutan dari reaksi ligasi ditransformasi pada sel kompeten *E.coli*. Bakteri kemudian dikultur pada medium ampisilin selama 1 malam. Selanjutnya dilakukan blue-white screening untuk memilih koloni yang akan dilanjutkan ke tahap konfirmasi yaitu *colony PCR* dan *sequencing*.



**Gambar 3.6.** Diagram alir proses kloning gen omega-3 desaturase

Untuk reaksi ligasi dibuat 2 sampel yaitu L1 dan L2 dengan komposisi sebagai berikut :

- Sampel L1 terdiri dari 3  $\mu\text{L}$  *insert*, 1  $\mu\text{L}$  T-vector pMD20, 4  $\mu\text{L}$  *ligation mix* dan 2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O.
- Sampel L2 terdiri dari 2  $\mu\text{L}$  *insert*, 0.5  $\mu\text{L}$  T-vector pMD20, 2.5  $\mu\text{L}$  *ligation mix* dan 5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O.

### 3.3.5 Colony PCR

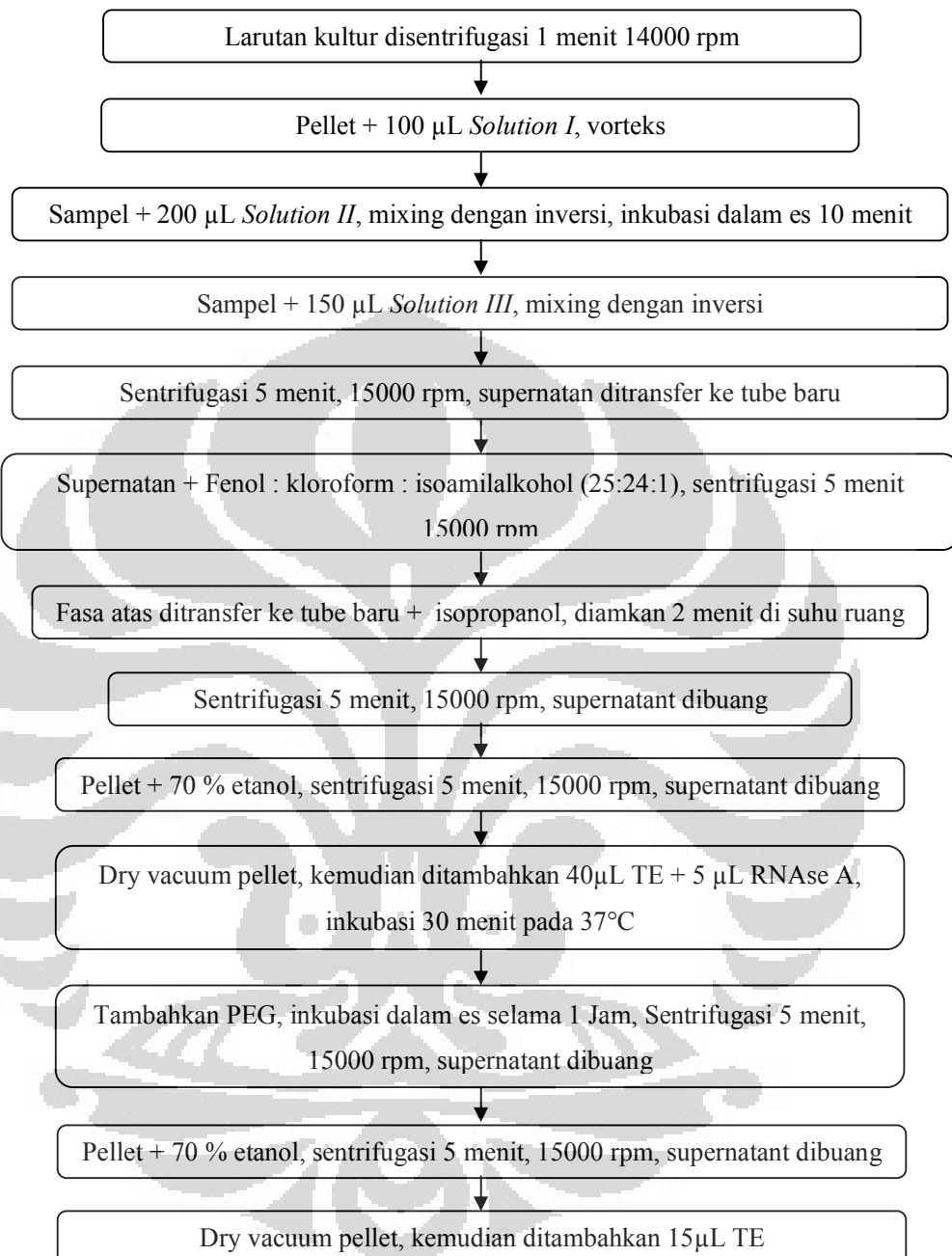
Koloni terpilih hasil proses kloning dikonfirmasi lebih lanjut melalui *colony* PCR yang diikuti dengan uji elektroforesis. Tahap ini dilakukan untuk menentukan keberhasilan proses ligasi.

### 3.3.6 Sequencing

Prosedur *sequencing* dilakukan pada koloni yang positif mengandung *insert* yang telah diidentifikasi dari *colony* PCR. Tahap awal adalah persiapan DNA plasmid yang dilakukan dengan kultur cair pada koloni positif, kemudian ekstraksi DNA plasmid menggunakan metode *alkaline lysis-SDS* ( *Minipreparation* ) yang diikuti dengan presipitasi menggunakan PEG. DNA yang diperoleh kemudian diukur konsentrasinya menggunakan Spektroskopi UV-Vis.

Selanjutnya dilakukan konfirmasi dengan uji enzim restriksi, untuk memotong DNA berbentuk sirkular yang merupakan gabungan vektor dan *insert* menjadi DNA linear. Pada percobaan ini dilakukan *single digestion* dengan menggunakan enzim restriksi SpeI ( NEB , England ) yang dapat memotong plasmid, namun tidak memotong *insert*. Selain itu juga dilakukan *double digestion* dengan menggunakan enzim restriksi SpeI ( NEB, England ) dan BamHI-HF ( NEB, England). BamHI-HF adalah enzim restriksi yang dapat memotong *insert* , namun tidak memotong plasmid.

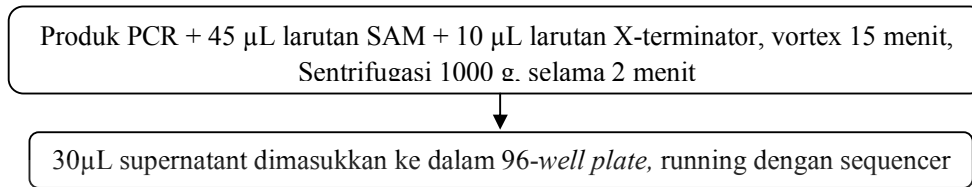
Setelah uji enzim restriksi DNA akan berbentuk linear sehingga bisa diidentifikasi menggunakan elektroforesis. Setelah diperoleh *band* yang diinginkan dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu *Sequence* PCR menggunakan *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Untuk tahap ini diperlukan 100-200 ng DNA.



**Gambar 3.7.** Pemurnian DNA plasmid



Sebelum memasuki *sequencer*, produk *sequence* PCR dimurnikan dulu menggunakan *sequence* solution dari *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Prosedurnya dapat dilihat pada bagan dibawah ini.

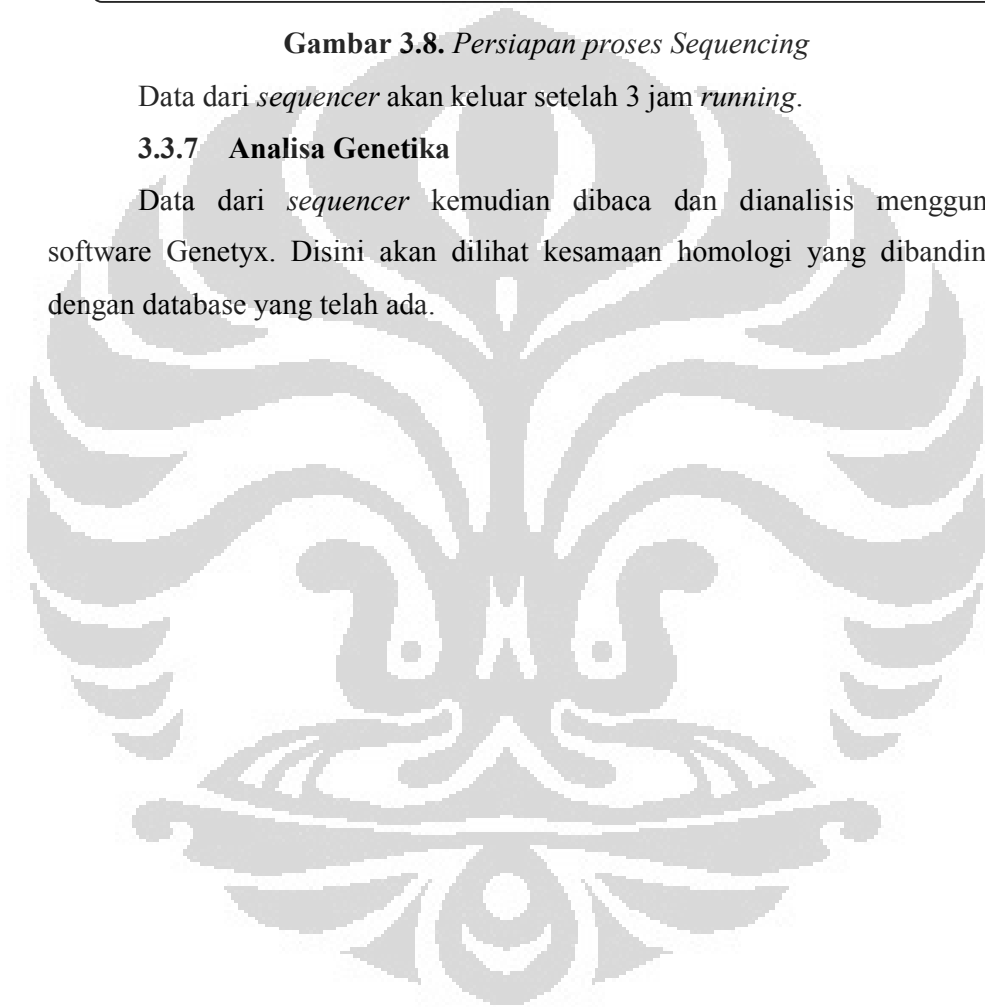


**Gambar 3.8.** *Persiapan proses Sequencing*

Data dari *sequencer* akan keluar setelah 3 jam *running*.

### 3.3.7 Analisa Genetika

Data dari *sequencer* kemudian dibaca dan dianalisis menggunakan software Genetyx. Disini akan dilihat kesamaan homologi yang dibandingkan dengan database yang telah ada.



## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Disain Primer

Pada penelitian ini telah berhasil didisain sepasang primer, *Forward* dan *Reverse* primer. Keterangan tentang primer ini dapat dilihat pada tabel berikut.

**Tabel 4.1.** *Oligonucleotide Data Sheet*

Ket.	Primer	
	Forward	Reverse
Nama	NdeIO3DesNO_Fw	XhoIO3DesNO_Rv
Sequens (5'-3')	CATATGAGGTGGTAATGGGGGATCTG	CTCGAGCAAGCCCATGTTCTCCACCAC
OD	1.7	1.7
Nmol	5.5	6.2
Base	27	27
MW	8451	8125
Tm1	61	66
Tm2	58	64
Purif.	OPC	OPC
μ M	50	50

### 4.2 Purifikasi DNA Genom

Pada awalnya ekstraksi DNA genom dilakukan dengan menggunakan metoda CTAB. Namun dari dua kali percobaan tidak diperoleh hasil yang diinginkan. Mikroalga merupakan sel eukariotik, sehingga kesulitan terbesar adalah pada saat penghancuran dinding sel. Oleh karena itu diperlukan metoda yang dapat benar-benar menghancurkan dinding sel, sehingga proses ekstraksi bisa lebih efisien.

Kegagalan yang terjadi pada proses ekstraksi menggunakan CTAB bisa disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, pemecahan dinding dan membran sel yang tidak sempurna. Pengulangan tahap ekstraksi beberapa kali memperkecil konsentrasi DNA. Presipitasi menggunakan etanol saja, masih menyisakan protein-protein lain yang bisa menjadi pengotor, sehingga DNA yang dihasilkan tidak murni. Pengukuran konsentrasi dilakukan dengan UV spektrofotometer. Konsentrasi DNA bisa diukur dari nilai absorbansi pada panjang gelombang 260. Sementara kemurniannya diperoleh dengan melihat rasio OD260:OD280. Larutan

DNA yang murni memiliki rasio OD260:OD280 sebesar  $1.8 \pm 0.1$  atau 1.7-1.9 . Dari hasil pengukuran diperoleh konsentrasi DNA hanya 34.5 ng/ $\mu$ L.

Selanjutnya dilakukan metode ekstraksi lain, yaitu menggunakan Proteinase K. Penggunaan proteinase K dipadukan dengan deterjen berupa SDS dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi. Analisis kuantitatif dilakukan dengan spektroskopi UV-Vis.



**Gambar 4.1.** DNA genom hasil ekstraksi menggunakan enzim proteinasi K

**Tabel 4.2.** Data pengukuran konsentrasi DNA genom

No.	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1	<i>Nannocloropsis</i>	64.7	ng/ $\mu$ l	1.295	0.824	1.57

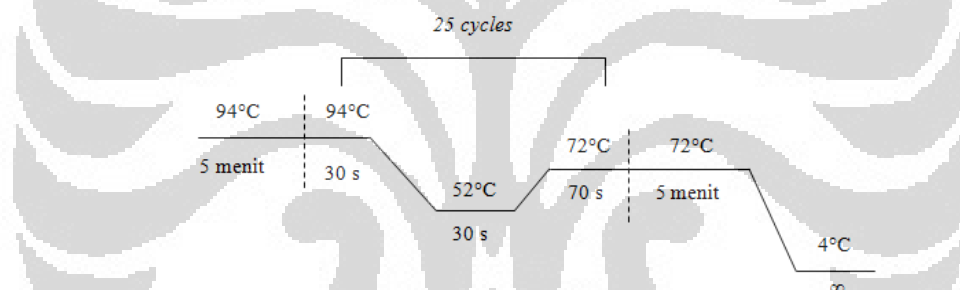
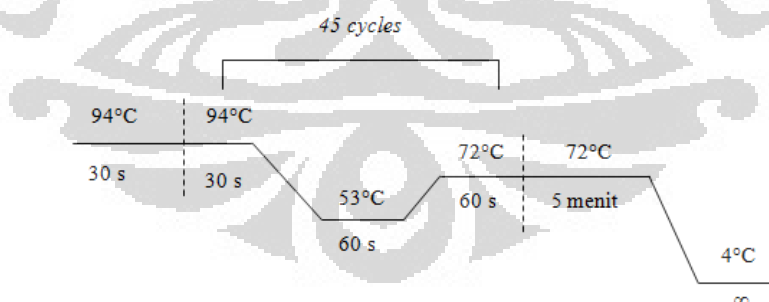
Berdasarkan data diatas konsentrasi dari produk ekstraksi 64.7 ng/ $\mu$ L. Kemurnian DNA ditentukan dengan melihat rasio OD260:OD280. DNA dikatakan murni jika rasio OD260:OD280 sebesar 1.7-1.9. Dengan data diatas, kemurnian DNA yang diperoleh tergolong tinggi dengan rasio OD260:OD280 sebesar 1.57.

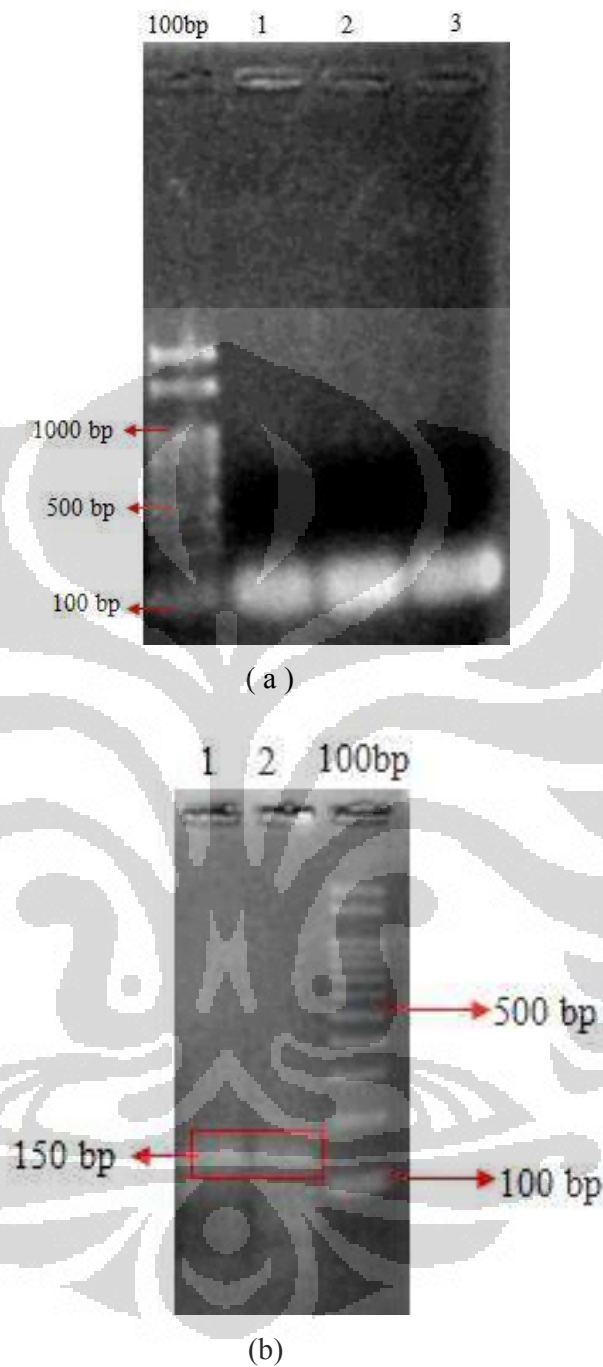
#### 4.3 Isolasi Gen Omega-3 Desaturase

Gen omega-3 awalnya diisolasi melalui proses PCR biasa. Namun dari dua kali percobaan, tidak diperoleh hasil yang diharapkan. Kemungkinan besar ketidakberhasilan ini dikarenakan kondisi operasi PCR yang tidak sesuai.

**Tabel 4.3.** Komposisi campuran PCR

Komponen	Volum ( $\mu\text{L}$ )	
	Percobaan 1	Percobaan 2
ddH <sub>2</sub> O	36	38.75
Ex Taq Bufer	5	5
dNTPs	5	1
Primer 1	1	2
Primer 2	1	2
DNA Templat	1	1
Ex Taq	1	0.25
Total Volum	50	50

**Gambar 4.2.** Kondisi operasi PCR pada percobaan 1**Gambar 4.3.** Kondisi operasi PCR pada percobaan 2



**Gambar 4.4.** Uji elektroforesis produk PCR , a) percobaan 1, b) percobaan 2

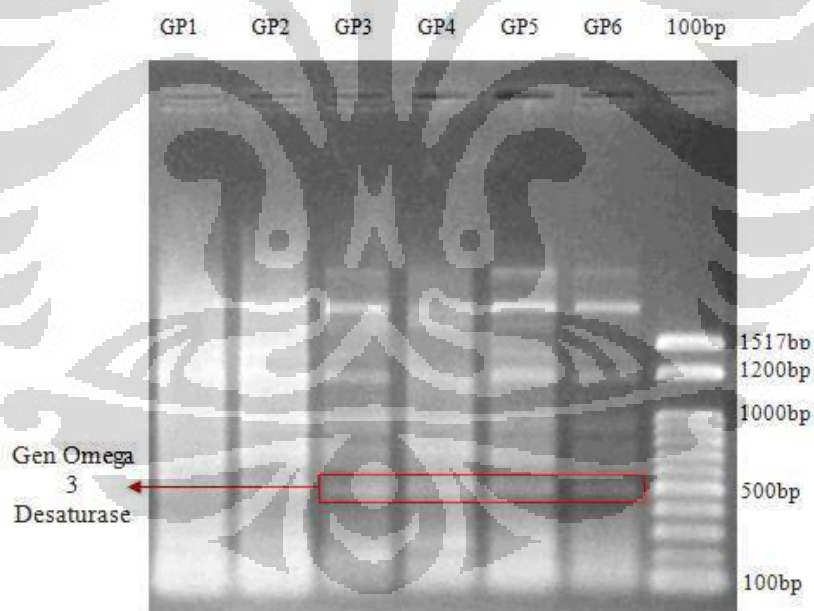
Gen Omega-3 desaturase berhasil diisolasi melalui *gradient* PCR. Identifikasi dan pemisahan fragmen DNA dilakukan dengan gel elektroforesis. Berdasarkan hasil elektroforesis, dari 6 sampel hanya 4 sampel yang memberikan *band* yang diinginkan yang diidentifikasi sebagai gen omega-3 desaturase.

**Tabel 4.4.** Komposisi campuran untuk *gradient* PCR

Sampel	Volum komponen ( $\mu\text{L}$ )						Total Volum	
	ddH <sub>2</sub> O	Ex Taq Bufer	dNTPs	Primer		DNA Templat		Ex Taq
				1	2			
GP 1	34	5	5	2	2	1.5	1	50
GP 2	34.5	5	5	2	2	1.5	0.5	50
GP 3	34.75	5	5	2	2	1.5	0.25	50
GP 4	36.5	5	5	0.5	0.5	1.5	1	50
GP 5	37	5	5	0.5	0.5	1.5	0.5	50
GP 6	37.25	5	5	0.5	0.5	1.5	0.25	50

**Tabel 4.5.** Kondisi Reaksi *Gradient* PCR

Tahap PCR	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Waktu ( Menit )
<i>Denaturation</i>	98	0.5
<i>Annealing</i>	49-56	1
<i>Elongation</i>	72	1
<i>Final Extension</i>	72	5

**Gambar 4.5.** Identifikasi fragmen DNA target dengan gel elektroforesis.

Sampel GP1 sampai dengan GP6 menggunakan DNA genom yang sama, namun komposisi campurannya divariasikan seperti yang tertera pada tabel 4.4. Komponen yang divariasikan meliputi konsentrasi enzim *polymerase* dan konsentrasi primer. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan *band* yang jelas saat uji

elektroforesis. Reaksi PCR merupakan reaksi yang unik. Keberhasilan reaksi PCR tidak bisa ditentukan dengan formula yang mutlak, keberhasilannya murni ditentukan dengan *trial* dan *error*. Berdasarkan hasil dari uji elektroforesis bisa dilihat bahwa konsentrasi enzim *polymerase* lebih mempengaruhi keberhasilan reaksi PCR. Dimana sampel GP3 dan GP6 dengan volume enzim *polymerase* yang sama, namun dengan volume primer yang berbeda memberikan bentuk *band* yang sama namun cenderung lebih jelas dibandingkan sampel yang lain.

PCR dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik didisain untuk gen omega-3 desaturase dari *Nannochloropsis* sp., dimana perancangan primer dilakukan dengan merujuk pada data cDNA dari gen omega-3 desaturase *Nannochloropsis* yang terdapat pada database GenBank dengan panjang 489bp. Oleh karena primer yang digunakan adalah spesifik untuk gen omega-3 desaturase dari *Nannochloropsis* sp., maka identifikasi dilakukan cukup dengan melihat panjang fragmen DNA. PCR ini dikatakan berhasil, karena telah menghasilkan fragmen DNA sepanjang 489bp, sesuai dengan panjang gen omega-3 desaturase yang dijadikan referensi ( GenBank ).

Gen omega-3 desaturase selanjutnya dimurnikan dari gel agarosa menggunakan *GeneClean II*. Dari hasil pemurnian, diperoleh gen omega-3 desaturase dengan konsentrasi seperti terlihat pada tabel 4.6.

**Tabel 4.6.** Data konsentrasi gen omega-3 desaturase

No.	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1	GP3	128.8	ng/µl	2.577	0.089	29.1
2	GP4	25.1	ng/µl	0.501	0.054	9.36
3	GP5	34.5	ng/µl	0.69	0.151	4.58
4	GP6	13.8	ng/µl	0.276	0.041	6.67

#### 4.4 Kloning Gen Omega-3 Desaturase

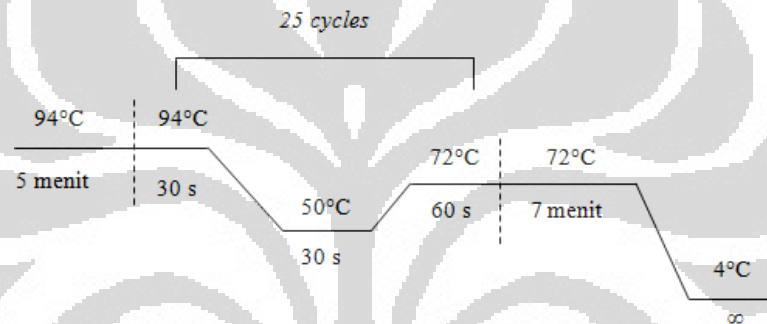
Sampel yang akan digunakan sebagai insert pada proses kloning berasal dari sampel GP3 yang memiliki konsentrasi DNA paling tinggi. Pada proses kloning dibuat dua sampel , yaitu L1 dan L2. Setelah dikulturkan selama semalam, diperoleh 21 koloni dari masing-masing plate yang akan dikonfirmasi lebih lanjut melalui *colony PCR* dan *sequencing*.

#### 4.5 Colony PCR

Total sampel untuk colony PCR sebanyak 42 sampel yang berasal dari dua plate L1 dan L2. Tujuan dari colony PCR adalah untuk identifikasi bahwa *insert* atau gen yang diinginkan terdapat dalam koloni yang dikulturkan.

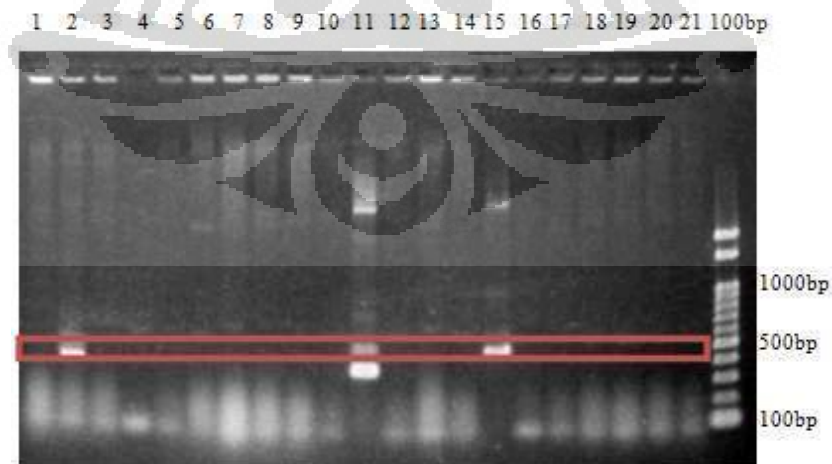
**Tabel 4.7.** Komposisi campuran sampel *Colony PCR*

Komponen	Volum ( $\mu\text{L}$ )
ddH <sub>2</sub> O	9.6
Thermophol Bufer	2.5
dNTPs	2.5
Primer 1	0.095
Primer 2	0.095
DNA Templat	10
Taq Polimerase	0.25



**Gambar 4.6.** Kondisi reaksi *colony PCR*

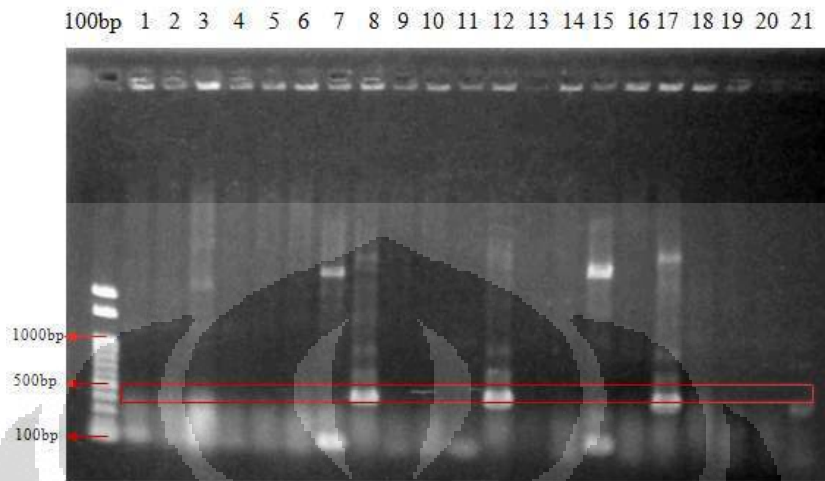
Berdasarkan uji gel elektroforesis terhadap produk *colony PCR* terdapat 3 koloni dari masing-masing plat L1 dan L2 yang positif mengandung DNA yang diinginkan.



**Gambar 4.7.** Uji gel elektroforesis produk *colony PCR* sampel L1



Dari 21 koloni pada L1 terdapat 3 koloni yang positif mengandung insert, yaitu koloni nomor 2, 11 dan 15.



**Gambar 4.8.** Uji gel elektroforesis produk *colony* PCR sampel L2

Untuk plate L2 juga terdapat 3 koloni yang positif mengandung insert, yaitu koloni nomor 8, 12 dan 17. Sehingga diperoleh total 6 koloni yang akan dipersiapkan untuk *sequencing*.

#### 4.6 DNA Sequencing

Tahap awal dari *sequencing* adalah persiapan DNA plasmid. Keenam koloni yang positif mengandung *insert* dikultur cair selama satu malam dalam medium *cycle grow* dan antibiotik *ampicilin*. Selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA plasmid dengan metode alkalin lisis dengan SDS dan presipitasi PEG. Kemudian dihitung konsentrasi DNA plasmid menggunakan Spektroskopi UV-Vis.

**Tabel 4.8.** Data konsentrasi DNA plasmid

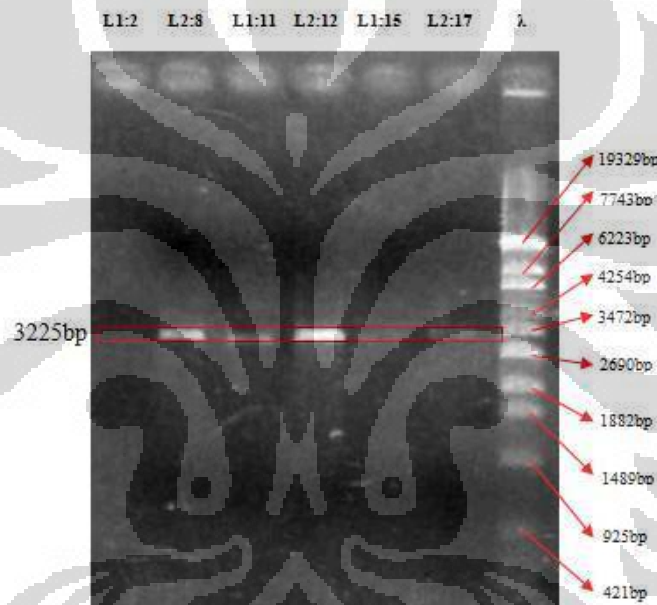
No.	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1	Koloni No.2 L1	91	ng/μl	1.819	0.941	1.93
2	Koloni No.11 L1	32.5	ng/μl	0.65	0.349	1.86
3	Koloni No.15 L1	32.6	ng/μl	0.652	0.336	1.94
4	Koloni No.8 L2	33.5	ng/μl	0.67	0.366	1.83
5	Koloni No.12 L2	25.3	ng/μl	0.507	0.268	1.89
6	Koloni No. 17 L2	51.1	ng/μl	1.022	0.532	1.92

DNA plasmid kemudian diuji dengan enzim restriksi untuk konfirmasi bahwa koloni tersebut mengandung insert. Pada percobaan ini dilakukan dua jenis

uji enzim restriksi, *single digestion* dan *double digestion*. Namun disini hanya ditampilkan hasil untuk *single digestion*.

**Tabel 4.9.** Komposisi sampel untuk uji enzim restriksi

Komponen	Volum ( $\mu\text{L}$ )	
	Single Digestion	Double digestion
ddH <sub>2</sub> O	17	12
10x Bufer 4 NEB	2.5	2.5
DNA	5	5
SpeI	0.5	0.5
BamHI-HF	-	5
Total Volum	25	25



**Gambar 4.9.** Gel elektroforesis untuk uji enzim restriksi (*single digestion*)

Pada *single digestion*, digunakan enzim SpeI yang hanya memotong 1 titik pada plasmid, dan tidak memotong *insert*. Sehingga DNA plasmid yang awalnya berbentuk sirkular, setelah dipotong akan menjadi linear dengan panjang DNA merupakan gabungan dari panjang plasmid dan panjang *insert*. Plasmid T-vector pMD20 memiliki panjang 2736bp, sementara *insert* memiliki panjang 489bp. Sehingga setelah *single digestion* dengan enzim restriksi SpeI akan dihasilkan DNA linear sepanjang 3225bp, seperti ditunjukkan oleh gambar 4.9.

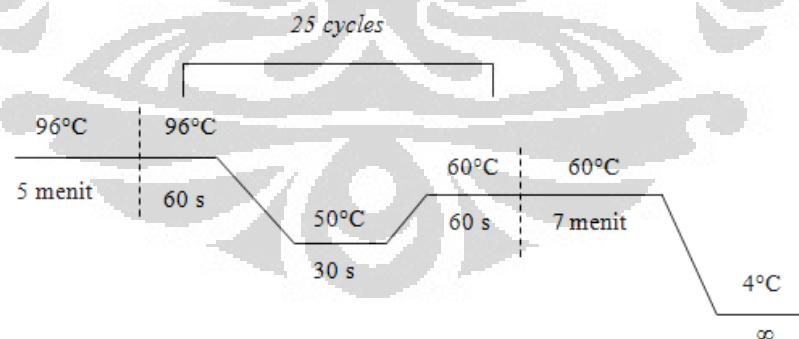
Pada hasil elektroforesis, DNA plasmid dari koloni nomor 8 dan 12 (sampel L2) dan koloni nomor 11 (sampel L1) memberikan band paling terang, menandakan kesuksesan uji enzim restriksi. Hal ini disebabkan DNA plasmid dari

ke tiga koloni tersebut memiliki kemurnian yang sangat tinggi. Hal ini bisa dilihat dari data pada tabel 4.8, dimana rasio OD260:OD280 untuk DNA plasmid dari koloni nomor 8, 11 dan 12 berturut-turut adalah 1.83, 1.86 dan 1.89. Sementara DNA plasmid dari koloni nomor 15 (sampel L1) dan koloni nomor 17 (sampel) L2 memberikan band yang sangat lemah. Hal ini disebabkan rasio OD260:OD280 dari ke dua sampel ini > 1.9 yang menandakan adanya kontaminan yang bisa menghambat kerja enzim restriksi. Koloni nomor 2 dari sampel L1 tidak memberikan band sama sekali. Hal ini selain disebabkan oleh kemurniannya yang rendah, juga dikarenakan konsentrasi untuk uji enzim restriksi yang tidak sesuai, sehingga enzim tidak berfungsi sebagaimana harusnya.

Berdasarkan hasil dari uji enzim restriksi maka dipilih 5 sampel DNA plasmid untuk dilanjutkan ke proses *sequencing* menggunakan mesin *sequencer*. Sebelum memasuki mesin *sequencer*, dilakukan *Sequence PCR* terhadap sampel. Produk dari *sequence PCR* dipurifikasi menggunakan *sequence solution*.

**Tabel 4.10.** Komposisi campuran sampel *Sequence PCR*

Komponen	Volum ( $\mu\text{L}$ )
DNA	X
ddH <sub>2</sub> O	5-x
0.8 $\mu\text{M}$ Primer	2
5 x sequencing Bufer	2
BigDye v3.1 Premix	1
Total volum	10



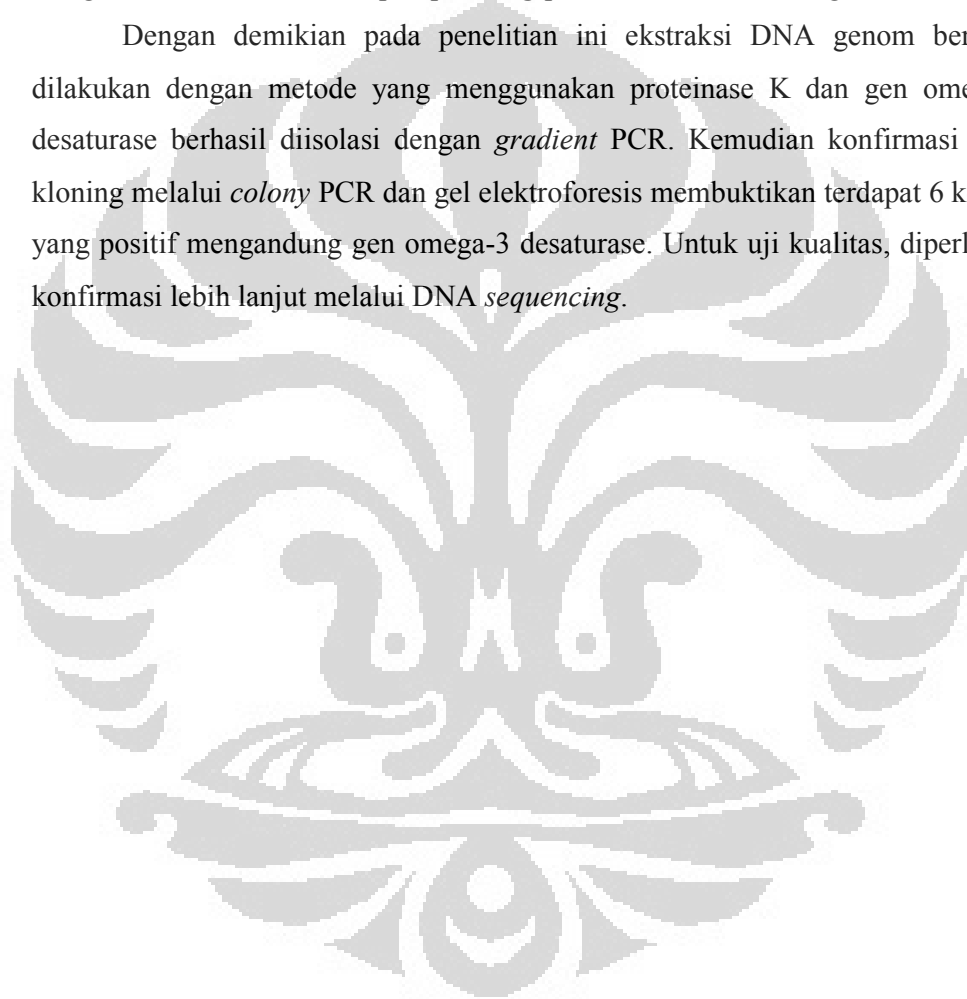
**Gambar 4.10.** Kondisi reaksi *sequence PCR*

#### 4.7 Analisis Genetika

Data dari hasil *sequencing* selanjutnya dianalisis menggunakan software genetika, yaitu Genetyx. Dengan *software* ini akan dilihat kesamaan homologi

antara data yang diperoleh dengan gen referensi yang berasal dari database GenBank, *Accession Number* AY685914. Proses *sequencing* dikatakan berhasil jika mendapatkan persentase homologi 100%. Namun, dari lima sampel yang dianalisis tidak satupun yang memiliki persentase kesamaan homologi 100%. Kegagalan ini bisa disebabkan karena primer yang digunakan mengamplifikasi kearah yang berlawanan, sehingga yang diperbanyak adalah vektor bukan *insert*. Dengan demikian untuk tahap *sequencing* perlu dikonfirmasi ulang.

Dengan demikian pada penelitian ini ekstraksi DNA genom berhasil dilakukan dengan metode yang menggunakan proteinase K dan gen omega-3 desaturase berhasil diisolasi dengan *gradient* PCR. Kemudian konfirmasi hasil kloning melalui *colony* PCR dan gel elektroforesis membuktikan terdapat 6 koloni yang positif mengandung gen omega-3 desaturase. Untuk uji kualitas, diperlukan konfirmasi lebih lanjut melalui DNA *sequencing*.



## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **Kesimpulan**

Berdasarkan dari hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa total DNA dari *Nannochloropsis* sp. isolat lokal telah berhasil dimurnikan dengan konsentrasi 64.7 ng/ $\mu$ L. Gen omega-3 desaturase telah diisolasi menggunakan metode gradien PCR, dan berhasil diligasi kedalam vektor pMD20.

#### **Saran**

Diperlukan pengulangan uji DNA *sequencing* untuk memastikan kualitas dari gen omega 3 desaturase hasil kloning dalam sel kompeten bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$ .

## DAFTAR PUSTAKA

- Cohen Z., Goldberg I.K. 2005. *Searching for PUFA-Rich Microalgae*. Z. Cohen dan I. K. Goldberg (Eds.), Single Cell Oils, AOCS Press, Illinois pp. 53-72.
- Collins J.J. 2010. *Omega-3 ( $\Omega$ -3) Essential Fatty Acids*. NutriNews. Douglas Laboratories.
- Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U., Heinz, E., 2002. *Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis*. Eur. J. Biochem. 269, 4105–4113.
- Howard G. Damude dan Anthony J. Kinney. 2007. *Engineering Oilseed Plants for a Sustainable, Land-Based Source of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids*. Lipids 42:179–185.
- Hoyos C., Almqvist C., Garden F., Xuan W., Oddy W.H., Marks G.B. & Webb K.L. 2008. *Effect of omega 3 and omega 6 fatty acid intakes from diet and supplements on plasma fatty acid levels in the first 3 years of life*. Asia Pac J Clin Nutr 17 : 552-557.
- Iskandarov, Inna Khozin-Goldberg, Rivka Ofir, Zvi Cohen. 2009. *Cloning and Characterization of the D6 Polyunsaturated Fatty Acid Elongase from the Green Microalga Parietochloris incisa*. Lipids 44:545–554.
- Kiy T., Rüsing M., Fabritius D. 2005. *Production of Docosahexaenoic Acid by the Marine Microalga, Ulkenia sp.*. Z. Cohen and I. K. Goldberg (Eds.), Single Cell Oils, AOCS Press. Illinois. pp. 99-106.
- L.Y. Li, X.L. Wang, J.Y. Gai and D.Y. Yu. 2007. *Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean*. Journal of Plant Physiology 164: 1516-1526.
- Levy J. & Turkish A. 2002. *Protective Nutrients*. Curr Opin Gastroenterol 18 : 717-722.
- Qiu, X., Hong, H., MacKenzie, S.L., 2001. *Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from Thraustochytrium sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae and Brassica juncea*. J. Biol. Chem. 276, 31561–31566.

- Suga, K., Ken-ichi Honjoh, Naoki Furuya, Hideyuki Shimizu, Koutarou Nishi, Fuminori Shinohara, Yoshie Hirabaru, Isao Maruyama, Takahisa Miyamoto, Shoji hatano, Masayoshi Ilo. 2002. *Two low temperature inducible Chlorella genes for d12 and 03 fatty acid desaturase ( FAD ) : isolation of d12 and 03 fad cDNA clones , espression of d12 fad in Saccharomyces cerevisiae, and expression of 03 fad in Nicotiana tabacum*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66 (6) : 1314-1327.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A., 2003. *Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Delta4-desaturase from the microalga Pavlova lutheri*. FEBS Lett. 553, 440–444.
- Tonon, T., Sayanova, O., Michaelson, L.V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T.R., Li, Y., Napier, J.A., Graham, I.A., 2005. *Fatty acid desaturases from the microalga Thalassiosira pseudonana*. FEBS J. 272, 3401–3412.
- Wertz P.W. 2009. *Essential fatty acids and dietary stress* . Toxicol Ind Health 25 : 279-283.
- Xiaolei, Jianzhong, Baohua, Kehou, Jin, Guanpin. 2011. *Cloning and characterization of a delta-6 desaturase encoding gene from Nannochloropsis oculata*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 29 : 290-296.
- Zevenbergen H., de Bree A., Zeelenberg M., Laitinen K., van duijn G. & Floter E. 2009. *Foods with high fat quality are essential for healthy diets*. Ann Nutr Metab 54 Suppl 1 : 15-24.
- Zhang, Liu, Cong, Wu, Liu, Lin, Shen Huang. 2011. *A Novel Omega-3 Fatty Acid Desaturase Involved in Acclimation Processes of Polar Condition from Antarctic Ice Algae Chlamydomonas sp. ICE-L*. Mar Biotechnol 13:393-401.
- Zhou, Stanley S. Robert, James R. Petrie, Dion M.F. Frampton, Maged P. Mansour, Susan I. Blackburn, Peter D. Nichols, Allan G. Green, Surinder P. Singh. 2007. *Isolation and characterization of genes from the marine microalga Pavlova salina encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis*. Phytochemistry 68:785–796.