

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah metode penelitian deskriptif laboratorium yang dirancang untuk mendeteksi pengaruh media pertumbuhan terhadap *Chlorella* sp. dalam memperoleh data mengenai hasil biomassa, karakteristik biokimia (protein, lipid, karbohidrat, klorofil-a, dan karotenoid), dan keanekaragaman genetik (PCR-RAPD) yang didasarkan pada sampel hasil penelitian eksperimen ketika pelaksanaan praktik Magang Mandiri MBKM. Metode penelitian deskriptif laboratorium digunakan untuk mengukur dan mendeskripsikan data mengenai hasil biomassa, karakteristik biokimia, dan variasi genetik tanpa manipulasi variabel, seperti pengukuran hasil biomassa *Chlorella* sp. pada berbagai media sebagai gambaran awal tentang efektivitas media pertumbuhan yang digunakan. Data ini kemudian dilengkapi dengan analisis karakteristik biokimia mencakup metabolit primer (protein, lipid, karbohidrat, dan klorofil-a) dan metabolit sekunder (karotenoid). Analisis variasi genetik melalui pola pita hasil PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dan konstruksi dendrogram sebagai bagian dari deskripsi variasi genetik yang menggambarkan hubungan genetik antar sampel berdasarkan pengaruh perbedaan media.

Dalam praktik Magang Mandiri MBKM telah dilakukan observasi terhadap proses pertumbuhan *Chlorella* sp. yang dikultivasi pada media yang berbeda sebagai variabel bebas, yaitu media standar AF6, media limbah tahu anaerobik 100% (LT OUT), dan variasi komposisi media limbah tahu anaerobik 100% dengan ada/tanpa penambahan mikronutrien magnesium dan besi. Tahap kultivasi yang dilakukan saat Magang Mandiri MBKM, setiap perlakuan dibuat tiga kali pengulangan untuk memahami pengaruhnya terhadap terhadap variabel terikat seperti biomassa, karakteristik biokimia, dan variasi genetik *Chlorella* sp. Metode eksperimental juga dilakukan dalam proses optimasi kondisi PCR dan seleksi primer untuk memastikan bahwa amplifikasi DNA berlangsung dengan efektif, optimal, termasuk suhu dan konsentrasi komponen reaksi, serta pemilihan primer yang dapat menghasilkan pola pita yang paling informatif dan dapat direproduksi.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini melibatkan analisis karakteristik biokimia (protein, lipid, karbohidrat, klorofil-a, dan karotenoid) dan keanekaragaman genetik *Chlorella* sp. dalam dua kondisi pertumbuhan yang berbeda, yaitu dalam media standar AF6 dan variasi limbah tahu anaerobik 100% (LT OUT). Populasi yang digunakan yaitu kultur *Chlorella* sp., cair dan *freeze dry*, kemudian diambil sebagai sampel penelitian mencakup kelompok *Chlorella* sp. yang tumbuh dalam dua kondisi pertumbuhan K (kontrol/AF6), A (LT OUT 100%), B (LT OUT 100% + Mg), C (LT OUT 100% + Fe), D (LT OUT 100% + Mg + Fe), E (LT OUT 100% + Mg + Fe + AF6 A2). Pengambilan sampel dilakukan secara representatif mencakup variasi genetik yang ada dalam populasi mikroalga.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Februari sampai Juli 2024. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikroalga, Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Gedung Limnologi, BRIN Cibinong untuk proses preservasi (pengawetan) sampel *Chlorella* sp. dan analisis proksimat seperti kandungan protein, lipid, karbohidrat, dan pigmen klorofil *Chlorella* sp., sedangkan proses penelitian analisis keanekaragaman genetik *Chlorella* sp. dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Universitas Pendidikan Indonesia dengan mempertimbangkan faktor-faktor seperti kestabilan lingkungan dan ketersediaan sumber daya yang diperlukan untuk penelitian.

3.4 Alat dan Bahan

Daftar jenis alat dan bahan yang digunakan tersedia di Laboratorium Mikroalga, Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Gedung Limnologi, BRIN Cibinong untuk analisis biokimia, dan di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Pendidikan Indonesia untuk analisis molekuler (Lampiran 1).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam analisis biokimia dan molekuler dipersiapkan dalam kondisi steril, seperti gelas ukur, gelas piala, tabung reaksi,

tabung *microcentrifuge* 1.5 mL dan 2.0 mL untuk meminimalisasi kontaminasi. Penelitian ini melibatkan mikroalga *Chlorella* sp. yang dikultur dalam media K (kontrol/AF6), A (LT OUT 100%), B (LT OUT 100% + Mg), C (LT OUT 100% + Fe), D (LT OUT 100% + Mg + Fe), E (LT OUT 100% + Mg + Fe + AF6 A2).

3.5.2 Validasi Identifikasi Sel Mikroalga

Strain mikroalga diidentifikasi berdasarkan ciri morfologi. Ciri morfologi mikroalga yang diisolasi didokumentasikan secara fotografis dengan pembesaran 100x menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX43* yang dihubungkan dengan sistem kamera digital.

3.5.3 Preservasi Sel *Chlorella* sp.

Preservasi sel *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-16 sebagai fase stasioner akhir, sehingga kultur *Chlorella* sp. dipanen. Kultur cair diperoleh sebanyak 250 mL, kemudian dibagi menjadi beberapa bagian untuk dipreservasi sebagai sampel dalam analisis biokimia dan analisis molekuler. Volume yang dipreservasi untuk analisis molekuler yaitu sebanyak 30 mL, kemudian untuk analisis biokimia sebanyak 200 mL. Sampel dalam analisis biokimia merupakan hasil pemanenan dengan metode sentrifugasi untuk memisahkan mikroalga dari suspensi. Pelet yang diperoleh sebagai biomassa dilanjutkan ke tahap *freeze dry* menggunakan alat BUCHI Lyvapor L-200, setelah biomassa basah dibekukan semalaman pada suhu -20 hingga -80 °C.

Sampel yang akan di *freeze dry* dipersiapkan maksimal 50% dari total volume tabung konikal yang digunakan, seperti tabung konikal 50 mL (*Corning CentriStar*TM), maka maksimal untuk volume sampel yaitu 25 mL. Tabung konikal 50 mL berisi sampel, kemudian ditutup dengan parafilm berlubang dan posisi penyimpanan miring untuk memperluas permukaan sampel yang terkena udara dingin dan tekanan rendah meningkat, sehingga mempercepat proses sublimasi es menjadi uap.

3.5.4 Analisis Kandungan Protein

Reagen yang digunakan dalam analisis kandungan protein dalam mikroalga terdiri dari enam reagen, meliputi larutan stok *sodium dodecyl sulfate* (SDS), reagen A dari sodium hidroksida (NaOH, MERCK) ditambah natrium karbonat (Na₂CO₃,

MERCK), reagen B1 dari tembaga sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_{4.5}\text{H}_2\text{O}$, MERCK), reagen B2 dari natrium kalium tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6.4\text{H}_2\text{O}$, MERCK), reagen C gabungan antara 20 mL reagen A, 0.2 mL reagen B1, dan 0.2 mL reagen B2, dan larutan penyangga fosfat (PBS). Protein diekstrak dari sampel *Chlorella* sp. dalam bentuk *freeze dried* biomassa sebanyak 5.0 mg dan dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1.5 mL (satu tabung mikro berisikan 2.5 mg sampel), kemudian ditambahkan 10 mg *glass bead* (0.5 mm, Sigma-Aldrich) dan 2.5 mL larutan penyangga fosfat. Proses lisis sel menggunakan alat *bead beater* (TOMY *Micro-Smash*TM MS-100 *Cell Disruptor*) dilakukan dengan kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit (dilakukan dua kali, total waktu 10 menit), kemudian sampel diinkubasi selama 20 menit dalam kondisi gelap.

Kuantifikasi protein dalam *Chlorella* sp. dianalisis menggunakan uji Lowry-Folin (López dkk., 2010) dengan standar *Bovine Serum Albumin* (merek Sigma-Aldrich) pada konsentrasi berkisar antara 0.0-2.0 mg/mL. Persiapan larutan standar dilakukan dengan dipersiapkannya larutan stok sebanyak 10 mg/mL *Bovine Serume Albumine* (BSA) yang dilarutkan menggunakan PBS mencapai konsentrasi yang diinginkan.

Larutan standar sebanyak 0.1 mL dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 1.5 mL gelap steril, ditambahkan 0.1 mL SDS dan dihomogenisasi menggunakan alat vortex (Fisher Scientific Mini Vortex Mixer). Larutan standar yang sudah homogen ditambahkan dengan 1.0 mL reagen C, vortex, dan diinkubasi selama sepuluh menit dalam kondisi tanpa cahaya. Setelah waktu menit ke-10, ditambahkan reagen Folin (merek MERCK) sebanyak 0.1 mL, dihomogenisasi menggunakan vortex, dan diinkubasi selama 30 menit.

Sampel protein sebanyak 0.1 mL dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 1.5 mL gelap steril dan dilakukan penambahan reagen (selain BSA dan PBS) dengan proses yang sama seperti membuat standar. Sampel blanko juga disiapkan tanpa penambahan protein dengan cara yang sama seperti sampel dan standar. Kadar protein diukur menggunakan alat spektrofotometer (UV-1800 Shimadzu UV *Spectrophotometer*) dengan panjang gelombang 750 nm pada menit ke-30. Hasil pengukuran larutan standar di plot untuk memperoleh rumus $y=mx+c$. Kalkulasi dalam analisis kandungan protein menggunakan rumus, sebagai berikut:

$$\text{Persentase protein (b/b\%)} = \frac{\text{Konsentrasi protein (mg/L)} \times \text{volume reaksi (1.3 mL)} \times \text{faktor pengenceran (jika ada)}}{\text{biomassa (5 mg)}} \times 100\%$$

3.5.5 Analisis Kandungan Lipid

Lipid yang terdapat dalam *Chlorella* sp. dianalisis menggunakan metode Ryckebosch dkk. (2012) dengan pendekatan gravimetri yang melibatkan penggunaan pelarut polar dan non-polar. Sampel mikroalga yang digunakan merupakan *freeze dried* biomassa. Biomassa *Chlorella* sp. sebanyak 20.0 mg, dimasukkan ke dalam tabung konikal 15.0 mL, kemudian ditambah dengan 4.0 mL CH₃OH (metanol, MERCK Supelco) dan 4.0 mL kloroform (MERCK) (1:1 v/v). Sampel dan larutan dihomogenisasi menggunakan vortex selama 30 detik. Setelah vorteks menyeluruh, larutan ditambah dengan 2.0 mL aquades steril dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex selama 30 detik. Larutan yang sudah homogen dilakukan pemisahan fase menggunakan alat sentrifugasi (TOMY MX-370 *Centrifuge*) selama 5 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Hasil sentrifugasi larutan sampel akan terlihat menjadi tiga fase, yaitu fase polar (atas), biomassa (tengah), dan non-polar (bawah).

Lipid ditunjukkan dengan hasil suspensi berwarna kuning di bagian bawah, kemudian lipid dikeringkan dari kloroform dengan dipindahkan ke cawan petri steril baru berukuran 60 x 15 mm yang telah ditimbang berat kosongnya. Biomassa hasil sentrifugasi yang masih menunjukkan warna hijau atau belum memudar (pucat), maka harus dilakukan kembali proses ekstraksi. Berat lipid diperoleh dari hasil selisih antara berat cawan petri kosong dengan cawan petri berisi lipid yang telah dikeringkan sampai nilai berat lipid konstan.

$$\text{Persentase lipid (b/b\%)} = \frac{\text{Berat lipid (mg)}}{\text{Berat biomassa (mg)}}$$

3.5.6 Analisis Kandungan Karbohidrat

Kuantifikasi karbohidrat dalam *Chlorella* sp. dianalisis menggunakan metode *Phenol-Sulfuric Acid* dari DuBois dkk., 1956 (Kurzyrna-Szklarek dkk., 2022) dengan modifikasi. Konsentrasi untuk standar glukosa berkisar antara 0.00-0.10 mg/mL. Larutan standar dilakukan dengan dipersiapkannya larutan stok sebanyak 4.0 mg glukosa (D(+)-*Glucose Anhydrous*, MERCK) dalam 40 mL aquades steril,

kemudian dilarutkan sesuai dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Larutan standar dengan konsentrasi yang sudah ditentukan (0.00-0.10%) sebanyak 0.5 mL dipindahkan ke tabung reaksi, ditambahkan 0.5 mL Fenol 5% (MERCK) dan 2.5 mL asam sulfat pekat (H₂SO₄, Superlco MERCK), dihomogenisasi menggunakan vortex selama 10 detik, kemudian diinkubasi selama 30 menit.

Ekstraksi karbohidrat dilakukan menggunakan sampel *Chlorella* sp. dalam bentuk *freeze dried* biomassa sebanyak 3.0 mg ditambah aquades steril mencapai 3.0 mL dalam tabung reaksi (16 x 150 mm, Iwaki), sehingga konsentrasi menjadi 1.0 mg/mL. Proses lisis sel *Chlorella* sp. menggunakan alat sonikator (*Ultrasonic Homogenizer* UV-050N, Taitec) dengan amplitude 60 selama 2 menit.

Sampel karbohidrat sebanyak 0.5 mL dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan dengan 0.5 mL Fenol 5% dan 2.5 mL H₂SO₄, kemudian homogenisasi menggunakan vortex selama 10 detik. Larutan yang sudah homogen, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Proses pemberian larutan untuk setiap sampel harus dalam rentang waktu yang sama, sehingga penambahan diberikan selang waktu tertentu. Sampel blanko disiapkan tanpa glukosa maupun sampel, namun dibuat dengan cara yang sama seperti sampel dan standar. Kadar karbohidrat diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490 nm pada menit ke-30. Hasil pengukuran larutan standar harus di plot untuk memperoleh rumus $y=mx+c$. Kalkulasi dalam analisis kandungan protein menggunakan rumus, sebagai berikut:

Persentase karbohidrat (b/b%) =

$$\frac{\text{Konsentrasi karbohidrat (mg/mL)} \times \text{volume reaksi (3.5 mL)} \times \text{df (jika ada)}}{\text{biomassa (3 mg)}} \times 100\%$$

3.5.7 Analisis Kandungan Klorofil dan Karotenoid

Ekstraksi klorofil dan karotenoid *Chlorella* sp. menggunakan metode Schüler dkk. (2020). Sampel berupa *freeze dried* sebanyak 1.0 mg ditambahkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 2.0 mL (dengan tutup termasuk O-ring/*silicone*) yang sudah berisi *glass beads* sebanyak 0.5 gram, kemudian ditambahkan juga dengan pelarut ekstraksi berupa aseton absolut (MERCK) dingin sebanyak 1 mL.

Proses lisis sel dilakukan menggunakan alat *bead beater* dengan kecepatan 3000 rpm selama 150 detik dan diulangi sebanyak 4x. Sampel dipisahkan

menggunakan alat sentrifugasi (Sorvall-Pico) dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit pada suhu 10°C. Supernatan yang mengandung pigmen dipindahkan ke tabung reaksi gelap dan ditempatkan di *fume hood* agar aseton menguap dan kering. Biomassa dalam tabung *microcentrifuge* 2.0 mL yang masih menunjukkan warna atau belum pucat, diperlukan ekstraksi kembali. Sampel yang sudah dikeringkan, kemudian ditambah dengan aseton sebanyak 2.0 mL untuk uji kuantifikasi menggunakan spektrofotometri.

Proses ekstraksi pigmen ini dilakukan dalam kondisi pencahayaan redup. Pengukuran pada spektrofotometri digunakan tiga panjang gelombang, yaitu 662 nm, 645 nm dan 470 nm. Konsentrasi pigmen ($\mu\text{g.ml of sample extract}^{-1}$) diukur menggunakan rumus Kulak dkk. (2021):

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = (\lambda 662 \text{ nm} \times 11.75) - (\lambda 645 \text{ nm} \times 2.35)$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = (\lambda 645 \text{ nm} \times 18.61) - (\lambda 662 \text{ nm} \times 3.96)$$

$$C_{x+c} = \frac{(1000 \times A_{470} - 2.27 \times C_a - 81.4 \times C_b)}{227}$$

3.5.8 Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan Metode *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB)

Reagen dalam ekstraksi DNA, terdiri dari larutan penyangga ekstraksi, larutan penyangga CTAB 2X, PCI (5%:24:1 v/v), amonium asetat 7.5 M (MERCK), etanol absolut (MERCK), etanol 70%, dan larutan penyangga TE. Larutan penyangga ekstraksi tersusun atas 10 mL 1M Tris-HCL (AppliChem), 2.5 mL 0.5M EDTA (AppliChem), 2.85 mL 3.5M NaCl (MERCK), 5.0 mL 5% SDS, kemudian dilarutkan dengan aquades steril mencapai 50 mL. Larutan penyangga CTAB 2X tersusun atas 5.0 mL 1M Tris-HCL, 2.0 mL 0.5M EDTA, 20 mL 3.5M NaCl, 5.0 gram CTAB (AppliChem), kemudian dilarutkan dengan aquades steril mencapai 50 mL. Larutan penyangga TE tersusun atas 1.0 mL 1M Tris-HCL, 0.1 mL 0.5M EDTA, dan dilarutkan dengan aquades mencapai 100 mL. Setiap larutan penyangga dilakukan pengecekan menggunakan pH meter (Ohaus AquaSearcher™ AB33PH) hingga setiap larutan penyangga memiliki pH 8.0. Reagen PIC (5%:24:1 v/v) tersusun atas 5% fenol, ditambah dengan 91.2 mL kloroform dan 3.8 mL isoamilalkohol (AppliChem).

Protokol isolasi DNA yaitu menggunakan biomassa berat basah hasil sentrifugasi pemanenan *Chlorella* sp. minimal 200 mg atau 10 mL kultur cair, dan metode isolasi berdasarkan metode CTAB (Ferdous dkk., 2012; Fei dkk., 2020; Mavrodiev dkk., 2021; Abdulameer & Thabit, 2022) ke dalam tabung *microcentrifuge* 1.5 mL (K, A, B, C, D, E). Proses sentrifugasi sampel kultur dilakukan dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 15°C. Pelet yang sudah ditempatkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1.5 mL ditambahkan 400 µL larutan penyangga ekstraksi dan 400 µL larutan penyangga CTAB 2X. Campuran sampel dengan komponen CTAB direndam selama 60 menit pada penangas air (GFL 910643 Bain-marie) suhu 65°C, kemudian tahap lisis sel menggunakan alat *ultrasonic bath* (BRANSON 3200) selama 60 menit dan dalam kedua tahapannya selalu dihomogenkan dengan dibolak-balikannya tabung *microcentrifuge* 1.5 mL berisi sampel satu sampai lima kali balik di setiap 10 menit.

Fenol:Kloroform:Isoamilalkohol (5%:24:1 v/v) sebanyak 500 µl ditambahkan ke dalam campuran dan dihomogenkan dengan inversi halus (tabung *microcentrifuge* 1.5 mL dijentik dengan jari). Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Bagian lapisan air (*aqueous layer*) yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 2.0 mL steril baru untuk proses purifikasi (pemurnian), tanpa mengganggu bagian lapisan organik.

Proses purifikasi sampel dilakukan dengan ditambahkan 0.1 volume 7.5M amonium asetat (pH 5.4) dan 2 volume etanol absolute dingin (-20°C) sesuai volume supernatan yang diperoleh, kemudian inkubasi terlebih dahulu selama 15-20 menit dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. DNA merupakan pelet hasil sentrifugasi, diendapkan dengan 300 µL etanol absolut dingin (simpan di lemari pembeku selama 20 menit). Setelah 20 menit dalam lemari pembeku, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang dengan hati-hati.

Pencucian DNA dilakukan dengan diresuspensi menggunakan 400 µL etanol 70%, dan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang hingga tersisa pelet DNA. Pelet DNA dikeringkan dalam laminar dengan suhu ruang hingga etanol menguap. Pelet DNA diresuspensi dengan 50 µL larutan penyangga TE, disimpan pada suhu -20°C. Kualitas DNA diperiksa

melalui elektroforesis gel agarosa 1%. Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan secara spektrofotometer.

3.5.9 Uji Kuantitatif Hasil Isolasi DNA

Kemurnian DNA yang dihasilkan dari isolasi DNA diamati melalui UV spektrofotometer (UV-1800 Shimadzu UV *Spectrophotometer*). Satu mikroliter sampel DNA ditempatkan ke tabung *microcentrifuge* 1.5 mL steril bebas RNase. Sampel DNA sebanyak 5 μ L diencerkan mencapai 500 μ L dengan ditambahkan ddH₂O 450 μ L. Homogenisasi menggunakan vortex.

Absorbansi untuk mengukur kemurnian DNA yaitu λ 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi λ 280 nm ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$), nilai yang dihasilkan dari sampel DNA yaitu 1.8-2.0. Nilai konsentrasi DNA digunakan rumus $[DNA] = \frac{A_{260}}{50} \times \text{faktor pengenceran}$. 50 menunjukkan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 μ g untai ganda DNA per mL.

3.5.10 Uji Kualitatif Hasil Isolasi DNA

Elektroforesis gel agarose menjadi metode yang digunakan untuk menguji kualitas DNA dengan alat elektroforesis. Larutan gel agarose 1% dibuat dalam volume 50 mL larutan penyangga TBE 1X. Larutan penyangga TBE 5X tersusun atas 10.8 gram Tris-HCL, 4.0 mL 0.5M EDTA, 5.5 gram asam borat (MERCK), kemudian dilarutkan dengan aquades mencapai 200 mL, untuk TBE 1X dibuat dari 200 mL TBE 5X ditambah aquades mencapai 1000 mL. Serbuk agarose (*Genetica Science*) ditimbang sebanyak 0.5 gram, dituang ke Erlenmeyer 100 mL, dan ditambah dengan larutan penyangga TBE 1X mencapai 50 mL, kemudian dihomogenkan. Erlenmeyer 100 mL berisi agarose dan larutan penyangga TBE 1X dipanaskan di atas alat *hot plate* (C-Mag HS 7) untuk melarutkan agarose dan menjadi gel berwarna bening keputihan. Agarose yang sudah larut diangkat dari *hot plate* untuk didinginkan sampai suhu agarose hangat, kemudian ditambah dengan pewarna gel (Biotium) dan segera dituangkan dalam cetakan, lalu memasang *well-forming combs* pada posisi 0.5–1.0 mm di atas pelat, sehingga dapat membentuk sumur yang lengkap, lalu diamkan gel agarose sampai memadat (30–45 menit pada suhu ruang) dan lepaskan *well-forming combs* pada cetakan dengan perlahan agar cetakan gel agarose tidak rusak.

Alat elektroforesis (*Submarine electrophoresis system* Mupid-exU) dipersiapkan dengan memasang bak sesuai kutub listrik positif dan negatifnya. Larutan penyangga TBE 1X dituang ke dalam bak elektroforesis secukupnya (sekitar 500 mL) untuk merendam gel. Wadang elektroforesis berisi gel agarose diletakkan ke dalam bak (*tank*) elektroforesis sampai terendam oleh larutan penyangga TBE 1X. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye buffer* (Promega) dengan formulasi perbandingan 5:1 (v/v μL), jadi total volume yang diinjeksikan ke setiap lubang sumur gel agarose yaitu 6.0 μL , meliputi sampel DNA sebanyak 5.0 μL dicampurkan dengan *loading dye buffer* 1.0 μL . Pencampuran dapat dilakukan di atas plat tetes atau parafilm sampai sampel DNA dan *loading dye* homogen.

Lubang sumur posisi pertama (kiri) diinjeksikan dengan 2.0 μL DNA *ladder* 1 Kb, dan lubang sumur lainnya diisi dengan sampel DNA. DNA *ladder* dan sampel yang diinjeksikan sudah homogen dengan *loading dye*. *Running* proses elektroforesis dilakukan selama 20-25 menit dengan tegangan listrik 100V, dan 30-90 menit dengan tegangan listrik 50V. Hasil elektroforesis diamati di bawah UV-Transiluminator dan didokumentasikan. Sampel DNA yang baik menunjukkan hasil pita yang jelas, dan sampel DNA yang memiliki berat molekul tinggi dapat ditentukan oleh posisi pita pada gel agarose.

3.5.11 PCR-RAPD

Proses amplifikasi DNA hasil isolasi, dilakukan melalui proses “*Polymerase Chain Reaction* (PCR)” berdasarkan metode Lai dkk. (2019) dengan komposisi campuran reaksi berdasarkan pada penelitian (Idenyi & Nwokpuru, 2019) (Tabel 3.1) dengan modifikasi. Alat amplifikasi DNA yang digunakan berupa mesin *Thermocycler* dengan program *Gene Amplified PCR System 9700*.

Proses pencampuran komponen PCR menjadi tahap awal dalam amplifikasi DNA setiap komponen PCR dimasukan secara berurutan diawali dengan dimasukkannya *deion water* (*Water for Injection*), larutan penyangga GoTaq 2X (Promega) dengan volume seperti yang tersusun pada Tabel 3.1, kemudian tabung *microcentrifuge* 1.5 mL dijentik secara berulang agar campuran homogen. Setelah komponen pertama homogen, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 detik menggunakan *microcentrifuge*.

Tabel 3.1 Komposisi Komponen PCR

Komposisi Komponen PCR	Konsentrasi Stock	Konsentrasi Akhir	Volume 1x Reaksi (uL)	Volume 1/2x Reaksi (uL)
GoTaq Green Master Mix	2X	1X	10 uL	5 uL
DNA Sampel	40 ng/uL	20 ng/uL	1 uL	0.5 uL
Primer RAPD	32 ng/ μ L	16 ng/uL	1 uL	0.5 uL
<i>Deion water</i> (ddH ₂ O steril)	-	-	8 uL	4 uL
Total			20.0 uL	10.0 uL

Tabung PCR 0.2 mL disiapkan dan diberi keterangan untuk setiap sampel DNA. Campuran komponen PCR yang homogen, dimasukkan ke dalam tabung PCR 0.2 mL steril, ditambahkan dengan 0.5 μ L sampel DNA dan primer RAPD 0.5 μ L (Oligo). Homogenisasi kembali dilakukan melalui sentrifugasi selama satu detik menggunakan alat mini *microcentrifuge*. Primer RAPD yang digunakan tercantum dalam Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Primer RAPD untuk *Chlorella* sp.

Primer	Sekuen	Primer	Sekuen
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-04	AATCGGGCTG	OPA-19	CAAACGTCCG
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPA-20	GTTGCGATCC
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPB-01	GTTTCGCTCC
OPA-07	GAAACGGGTG	OPB-02	TGATCCCTGG
OPA-08	GTGACGTAGG	OPB-03	CATCCCCCTG
OPA-09	GGGTAACGCC	OPE-2	GGTGCGGGAA
OPA-10	GTGATCGCAG	OPF-5	CCGAATTCCC
OPA-11	CAATCGCCGT	OPF-6	GGGAATTCCG
OPA-12	TCGGCGATAG	OPH-7	CTGCATCGTG
OPA-13	CAGCACCCAC	OPH-8	GAAACACCCC
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPY-4	GGCTGCAATG
OPA-15	TTCCGAACCC		

Reaksi amplifikasi DNA menggunakan PCR *System 9700* dilakukan dengan beberapa tahap. Denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama dua menit, dilanjutkan dengan 45 siklus yang diawali dengan tahap denaturasi kembali pada

suhu 94°C selama satu menit, *annealing* (penempelan primer pada DNA *template*) pada suhu 34°C selama satu menit 30 detik, tahap polimerisasi atau elongasi awal pada suhu 72°C selama dua menit. Tahap denaturasi sampai polimerisasi disebut dengan satu siklus, dan tahapan ini dilakukan sebanyak 45 siklus. Tahapan terakhir yaitu elongasi terakhir pada suhu 72°C selama lima menit dan *holding temperature* pada suhu 4°C.

3.5.12 Elektroforesis Hasil PCR

Elektroforesis gel agarose menjadi metode yang digunakan untuk menguji kualitas DNA dengan alat elektroforesis. Larutan gel agarose 1.0% dibuat dalam volume 50 mL buffer TBE 1X. Serbuk agarose (LE, Promega) ditimbang sebanyak 0.5 gram, dituang ke Erlenmeyer 100 mL, dan ditambah dengan larutan penyangga TBE 1X mencapai 50 mL, kemudian dihomogenkan. Erlenmeyer 100 mL berisi agarose dan buffer TBE 1X dipanaskan di atas *hot plate* untuk melarutkan agarose dan menjadi gel berwarna bening keputihan. Agarose yang sudah larut diangkat dari *hot plate* untuk didinginkan sampai suhu agarose hangat, ditambahkan dengan pewarna gel (Promega) segera dituangkan dalam cetakan, kemudian memasang *well-forming combs* pada posisi 0.5–1.0 mm di atas pelat, sehingga dapat membentuk sumur yang lengkap, lalu diamkan gel agarose sampai memadat (30–45 menit pada suhu ruang) dan ketika akan melepaskan *well-forming combs* pada cetakan, tuang sedikit larutan penyangga elektroforesis di atas gel dan angkat dengan perlahan agar cetakan gel agarose tidak rusak. Alat elektroforesis dipersiapkan dengan memasang bak sesuai kutub listrik positif dan negatifnya. Buffer TBE 1X dituang ke dalam bak elektroforesis secukupnya (sekitar 500 mL) untuk merendam gel. Wadah elektroforesis berisi gel agarose diletakkan ke dalam bak (*tank*) elektroforesis sampai terendam oleh larutan penyangga TBE 1X.

Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye buffer* (Promega) dengan formulasi perbandingan 2:1 (v/v μL), jadi total volume yang diinjeksikan ke setiap lubang sumur gel agarose yaitu 3.6 μL , meliputi sampel DNA sebanyak 3.0 μL dicampurkan dengan *loading dye buffer* 0.6 μL . Pencampuran dapat dilakukan di atas plat tetes sampai sampel DNA dan *loading dye* homogen. Lubang sumur posisi pertama (kiri) diinjeksikan dengan 2 μL DNA *ladder* 1 Kb, dan lubang sumur lainnya diisi dengan sampel DNA. DNA *ladder* dan sampel yang diinjeksikan

sudah homogen dengan *loading dye*. *Running* proses elektroforesis dilakukan selama 20-25 menit dengan tegangan listrik 100V, dan 30-90 menit dengan tegangan listrik 50V. Hasil elektroforesis diamati di bawah UV-Transilluminator (*BluPAD*) dan didokumentasikan. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 2X PCR. Sampel DNA yang baik menunjukkan hasil pita yang jelas, dan sampel DNA yang memiliki berat molekul tinggi dapat ditentukan oleh posisi pita pada gel agarose.

3.6 Analisis Data

3.6.1 Analisis Kandungan Protein, Lipid, Karbohidrat, dan Pigmen Fotosintetik *Chlorella* sp.

Kandungan biokimia *Chlorella* sp. dianalisis menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 20.0. Proses analisis mencakup uji normalitas, uji homogenitas, uji One Way ANOVA untuk data yang normal dan homogen, serta penerapan regresi linear sederhana menggunakan perangkat lunak Excel.

Analisis data dimulai dengan uji normalitas untuk memastikan distribusi data pertumbuhan harian *Chlorella* sp. berada dalam kisaran normal. Hal ini penting untuk memvalidasi penggunaan uji statistik parametrik, yang selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk memastikan varians homogen antar kelompok data pertumbuhan harian. Setelah memastikan kedua persyaratan tersebut terpenuhi, dilakukan uji One Way ANOVA, kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* ($\alpha = 0.05$) untuk perbandingan kelompok perlakuan dan mengevaluasi perbedaan signifikan antara kelompok media standar dan limbah tahu. Uji ini memungkinkan penentuan apakah terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok tersebut.

Regresi linear sederhana menggunakan perangkat lunak Excel dilakukan untuk memodelkan hubungan antara larutan standar dan kandungan protein dan karbohidrat dalam *Chlorella* sp. Analisis regresi bertujuan untuk mengidentifikasi pola dan trend dalam data kandungan protein maupun karbohidrat. Hasil analisis statistik ini akan memberikan dasar yang kuat untuk menginterpretasikan implikasi signifikan dari variasi pertumbuhan harian mikroalga dalam konteks lingkungan yang berbeda. Perangkat lunak NTSYSpc 2.10e digunakan untuk membentuk dendrogram hasil analisis proksimat, meliputi konsentrasi protein, lipid, karbohidrat, klorofil, dan karotenoid (Arora & Philippidis, 2021; Estevam dkk., 2023; Silva dkk., 2023) (Tabel 3.3).

Tabel 3.3 Karakteristik Berdasarkan Analisis Biokimia

Karakteristik Biokimia	Skor Ada	Tidak Ada	Karakteristik Biokimia	Skor Ada	Tidak Ada	
Protein	21.0-31.0%	1	0	0.1-1.0 µg/mL	1	0
	32.0-48.0%	1	0	Klorofil a 1.1-2.5 µg/mL	1	0
	>48.0%	1	0	>2.5 µg/mL	1	0
Lipid	15.0-22.0%	1	0	0.1-1.0 µg/mL	1	0
	23.0-40.0%	1	0	Karotenoid 1.1-2.5 µg/mL	1	0
	>40.0%	1	0	>2.5 µg/mL	1	0
Karbohidrat	13.0-29.0%	1	0			
	30.0-40.0%	1	0			
	>40.0%	1	0			

3.6.2 Analisis Polimorfisme RAPD

Data diambil berdasarkan terbentuknya pola-pola fragmen yang dihasilkan oleh gel elektroforesis setelah proses PCR. Keberadaan atau ketiadaan fragmen-fragmen DNA pada setiap sampel dicatat dan direpresentasikan dalam bentuk matriks. Pita yang dipilih, dikonversikan menjadi matriks data biner, dengan nilai 0 menunjukkan tidak adanya pita yang terbentuk atau muncul dan nilai 1 yang menunjukkan keberadaan pita dalam sampel. Variasi dalam pola pita yang teramplifikasi oleh primer OPA-5, OPA-7, dan OPA-11, menunjukkan ukuran pasang basa dan jarak yang berbeda dari *marker* DNA (*ladder*), kemudian dihitung ukurannya menggunakan persamaan regresi linear sederhana. Persamaan regresi linear sederhana diperoleh dari hasil ukuran pasang basa dan jarak standar *ladder* DNA yang digunakan. Variasi dalam pola pita DNA yang dihasilkan mencerminkan diversitas genetik di antara sampel yang diteliti. Pita DNA (amplikon) yang muncul pada DNA *Chlorella* sp. yang ditumbuhkan dalam media limbah, namun tidak teridentifikasi atau tidak muncul pada DNA *Chlorella* sp. yang ditumbuhkan dalam media standar, maka dianggap sebagai polimorfisme. Pita polimorfisme yang dihasilkan, ditinjau kembali pada tingkat efektifitas primer yang digunakan melalui perhitungan *polymorphic information content* (PIC) berdasarkan rumus Roldán-Ruiz dkk. (2000), sebagai berikut:

$$PIC_i = 2 \cdot f_i (1 - f_i)$$

Hubungan genetik diinterpretasikan dengan melakukan analisis kluster menggunakan metode Sistem Taksonomi Numerik dan Analisis Multivariat versi 2.10e (NTSYSpc) melalui teknik *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested* (SAHN). Konstruksi dendrogram dengan koefisien kesamaan genetik (KKG) sampel *Chlorella* sp. yang diteliti, didasarkan pada indeks similaritas (SM: *Simple Matching*) (Tabel 3.4), menggunakan pendekatan *Group Average Clustering* pada perangkat lunak NTSYSpc 2.10e dengan teknik *Unweight Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA). Evaluasi kesamaan genetik dilakukan berdasarkan jumlah pita bersama. Proses pengelompokan matriks data dan menghasilkan dendrogram dilakukan dengan menggunakan metode UPGMA dan fungsi kesamaan kualitatif (SIMQUAL) (Li dkk., 2017). *Simple matching* diilustrasikan pada Tabel 3.4 dan digunakan rumus berdasarkan Sokal & Michener, 1985 (Sarstedt & Mooi, 2019), sebagai berikut:

$$SM_{xy} = \frac{M_{(00)} + M_{(11)}}{M_{(00)} + M_{(10)} + M_{(01)} + M_{(11)}}$$

dengan nilai $SM_{xy} : 0 \leq SM_{xy} \leq 1$

Tabel 3.4 *Simple Matching Coefficient*

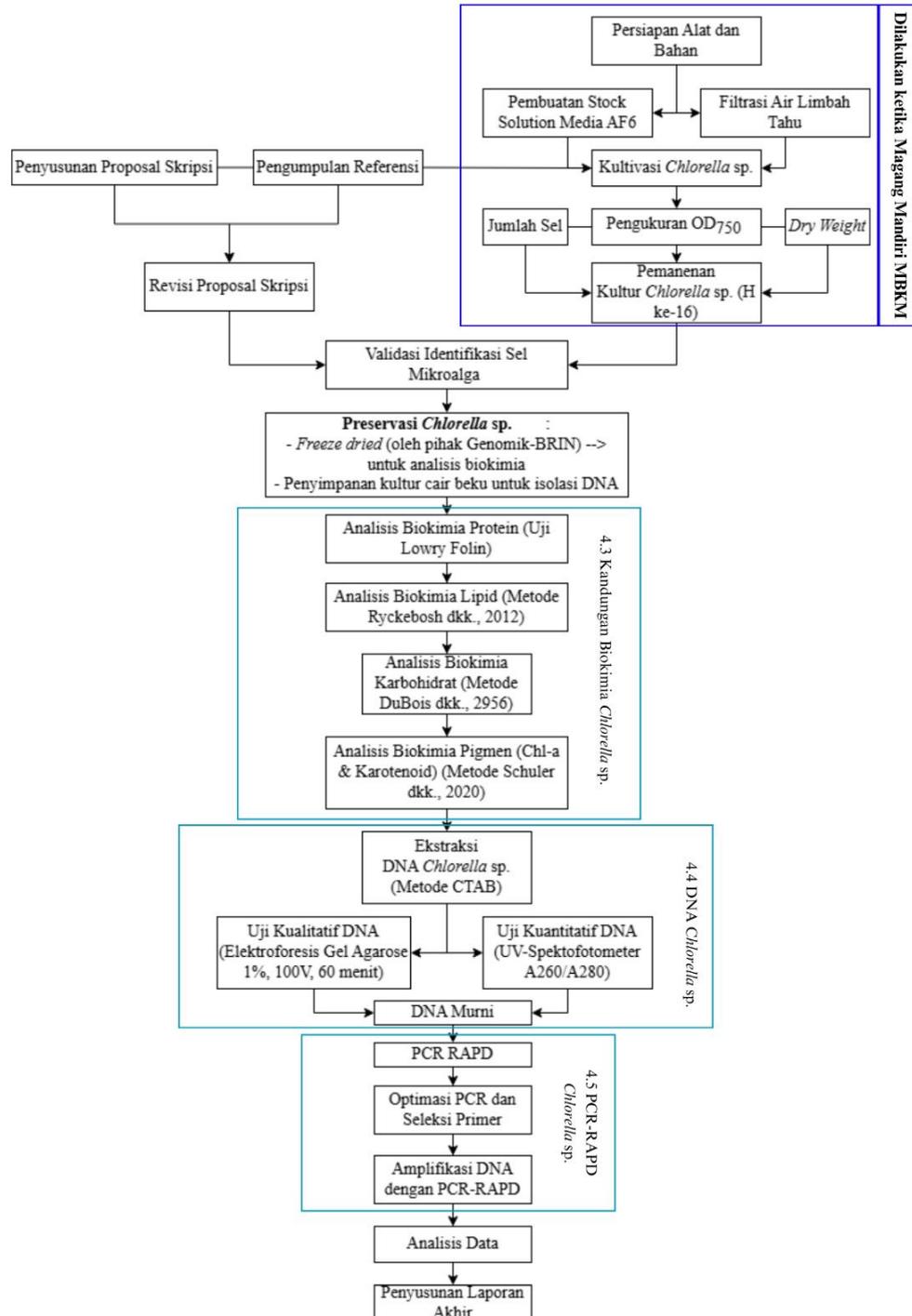
Objek		X	
		0	1
Y	0	$M_{(00)}$	$M_{(10)}$
	1	$M_{(01)}$	$M_{(11)}$

Keterangan :

- Angka 1 : terdapat pita DNA atau karakteristik sampel yang sudah ditentukan
- Angka 0 : tidak terdapat pita DNA atau karakteristik yang sudah ditentukan
- SM_{xy} : koefisien kesamaan genetik (*Simple Matching*)
- $M_{(11)}$: jumlah karakter yang ada pada objek X dan Y (sama)
- $M_{(01)}$: jumlah karakter yang tidak ada pada objek X tetapi ada pada objek Y
- $M_{(00)}$: jumlah karakter yang tidak ada pada objek X dan tidak ada pada objek Y (sama)
- $M_{(10)}$: jumlah karakter yang ada pada objek X tetapi tidak ada pada objek Y

3.7 Alur Penelitian

Penelitian ini merupakan lanjutan dari hasil kultivasi *Chlorella* sp. hingga pemanenan yang telah dilakukan saat Magang Mandiri MBKM. Tahapan penelitian yang dilakukan disajikan dalam bentuk diagram alur pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Penelitian