

SKRIPSI

**EKSTRAKSI DAN AMPLIFIKASI DNA GANGGANG HIJAU
(CHLOROPHYTA) GENERA *Caulerpa* DAN *Codium***

Disusun dan diajukan oleh

RISKA WILDAJAYA

L011 18 1321



**DEPARTEMEN ILMU KELAUTAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**EKSTRAKSI DAN AMPLIFIKASI DNA GANGGANG HIJAU
(CHLOROPHYTA) GENERA *Caulerpa* DAN *Codium***

RISKA WILDAJAYA

L011 18 1321

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan



**DEPARTEMEN ILMU KELAUTAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

**Ekstraksi dan Amplifikasi DNA Ganggang Hijau (Chlorophyta) Genera
Caulerpa dan *Codium***

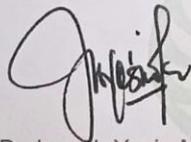
Disusun dan diajukan oleh

RISKA WILDAJAYA
L011 18 1321

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Ilmu Kelautan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin pada tanggal 10 November 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan.

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Dr. Inayah Yasir, M. Sc
NIP. 19661006 199202 2 001

Pembimbing Pendamping,



Dr. Irmawati, S. Pi., M. Si
NIP. 19700516 199603 2 002

Ketua Program Studi,



Dr. Khairul Anam, ST., M.Sc.Stud.
NIP. 19690706 199512 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riska Wildajaya
NIM : L011 18 1321
Program Studi: Ilmu Kelautan
Jenjang : S1

menyatakan dengan ini bahwa karya tulis yang berjudul:

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA Ganggang Hijau (Chlorophyta) Genera *Caulerpa* dan
Codium.

adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain. Skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 10 November 2022

Yang Menyatakan,



Riska Wildajaya

PERNYATAAN AUTHORSHIP

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riska Wildajaya
NIM : L011 18 1321
Program Studi : Ilmu Kelautan
Fakultas : Ilmu Kelautan dan Perikanan,

menyatakan bahwa publikasi sebagian atau keseluruhan isi Skripsi/Tesis/Disertasi pada jurnal atau forum ilmiah lain harus seizin dan menyertakan tim pembimbing sebagai *author* dan Universitas Hasanuddin sebagai institusinya. Apabila dalam waktu sekurang-kurangnya dua semester (satu tahun sejak pengesahan Skripsi) saya tidak melakukan publikasi dari sebagian atau keseluruhan skripsi ini, maka pembimbing sebagai salah seorang dari penulis berhak mempublikasikannya pada jurnal ilmiah yang ditentukan kemudian, sepanjang nama mahasiswa tetap diikutkan.

Makassar, 10 November 2022

Mengetahui,



Dr. Khairul Amri, ST., M.Sc.Stud.
NIP: 19690706-199512 1 002

Penulis



Riska Wildajaya
NIM: L011 18 1321

ABSTRAK

Riska Wildajaya. L011181321. “Ekstraksi dan Amplifikasi DNA Ganggang Hijau (Chlorophyta) Genera *Caulerpa* dan *Codium*”. Dibimbing oleh **Inayah Yasir** sebagai Pembimbing Utama dan **Irmawati** sebagai Pembimbing Anggota.

Meskipun ganggang hijau (Divisio Chlorophyta) hanya menempati < 1% produksi biomassa rumput laut global, akan tetapi dari sektor budidaya, ganggang hijau menunjukkan tren peningkatan produktivitas dan diversifikasi karena bioprospeksinya di sektor makanan. Selain itu, makroalga hijau juga menunjukkan keragaman yang unik dari sitomorfologi, sifat ekofisiologis, kapasitas propagasi dan kandungan senyawa bioaktifnya dibandingkan dengan makroalga merah (Divisio Rhodophyta) dan makroalga coklat (Classis Phaeophyceae). Karakteristik makroalga sangat plastis sehingga identifikasi jenis berbasis konvensional (morfologi) harus dikombinasikan dengan identifikasi berbasis molekuler untuk pengklasifikasian yang benar. Penelitian ini mengambil sampel makroalga hijau dari area budidaya rumput laut Puntondo, Kabupaten Takalar dengan tujuan menentukan dan membandingkan metode ekstraksi yang memberi hasil terbaik pada makroalga hijau *Caulerpa* dan *Codium*. Dua metode ekstraksi diujicobakan yaitu metode konvensional (CTAB) dan metode KIT menggunakan *DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)*. Keberhasilan ekstraksi genom DNA dianalisis dari hasil uji kuantitas dan kualitas DNA genom serta keberhasilan amplifikasi yang menggunakan produk ekstraksi sebagai template. Kuantitas dan kualitas DNA genom dianalisis menggunakan *Kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity)* pada *Qubit 3 Fluorometer* dan nilai absorbansi A260/280 menggunakan spektrofotometer sedangkan parameter keberhasilan amplifikasi dianalisis dari muncul atau tidaknya pita DNA. Hasil penelitian menunjukkan metode CTAB memberikan konsentrasi dan rasio absorbansi lebih baik dibandingkan dengan metode Kit. Selain itu, penggunaan primer OPA-02, OPD-03, dan OPC-11 hanya berhasil mengamplifikasi DNA genom *Caulerpa lentillifera*.

Kata Kunci: alga hijau, CTAB, Kit, DNA, Marka

ABSTRACT

Riska Wildajaya.L011181321. "Extraction and DNA Amplification of Green Algae (Chlorophyta) Genera *Caulerpa* and *Codium*". Supervised by **Inayah Yasir** as Main Advisor and **Irmawati** as Member Advisor.

Although green algae (Divisio Chlorophyta) only occupy <1% of global seaweed biomass production, from the cultivation sector, green algae show a trend of increasing productivity and diversification due to their bioprospecting in the food sector. In addition, green macroalgae also show a unique diversity of cytomorphology, ecophysiological properties, propagation capacity, and content of bioactive compounds compared to red macroalgae (Divisio Rhodophyta) and brown macroalgae (Classis Phaeophyceae). The characteristics of macroalgae are very plastic so conventional type identification (morphology) must be combined with molecular-based identification for correct classification. This study took samples of green macroalgae from the seaweed cultivation area of Puntondo, Takalar Regency. The purpose of this study was to determine and compare the extraction methods that gave the best results to the green macroalgae *Caulerpa* and *Codium*. Two extraction methods were tested, namely the conventional method (CTAB) and the KIT method using the DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). The success of genomic DNA extraction was analyzed from the results of the quantity and quality of genomic DNA as well as the success of amplification using the extraction product as a template. The quantity and quality of genomic DNA were analyzed using the Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Kit on the Qubit 3 Fluorometer and the absorbance value of A260/280 using a spectrophotometer while the amplification success parameters were analyzed by looking the presence or absence of DNA bands. The results showed that the CTAB method gave a better concentration and absorbance ratio than the Kit method. In addition, the use of primers OPA-02, OPD-03, and OPC-11 only succeeded in amplifying *Caulerpa lentillifera* genomic DNA.

Keywords: green algae, CTAB, Kit, DNA, Markers

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Syukur Alhamdulillah, segala puji Penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan skripsi dengan judul “**Ekstraksi dan Amplifikasi DNA Ganggang Hijau (Chlorophyta) Genera *Caulerpa* dan *Codium***” dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun berdasarkan data-data hasil penelitian sebagai tugas akhir untuk memperoleh gelar sarjana di Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, informasi, dan membawa kepada suatu kebaikan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang terdapat dalam skripsi ini. Oleh karena itu, Penulis menerima kritik dan saran yang membangun dari para pembaca. Akhirnya, kepada semua pihak yang berperan dalam penelitian ini, Penulis mengucapkan banyak terima kasih dan berharap semoga Allah SWT membalas segala budi baik, serta dapat menjadi suatu ibadah amal jariah.

Melalui Skripsi ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya sebagai bentuk penghargaan dan penghormatan kepada pihak-pihak yang telah memberikan bimbingan, bantuan, dukungan, serta doa selama melakukan penelitian dan penyelesaian skripsi. Ucapan ini penulis berikan untuk:

1. Kepada kedua orang tua tercinta, Zainuddin dan Hj. Resmiati yang telah mendoakan kebaikan, kemudahan dan kelancaran, serta memberikan dukungan semangat dan kasih sayang untuk penulis agar menyelesaikan perkuliahan.
2. Kepada saudariku Riski Jayanti yang telah menyemangati penulis dalam menyelesaikan masa perkuliahan.
3. Kepada yang terhormat Ibu Dr. Inayah Yasir, M. Sc selaku pembimbing utama sekaligus juga pembimbing akademik yang selalu memberikan bimbingan, arahan, dukungan serta ilmu yang sangat berharga sejak penulis menjadi mahasiswa baru hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.
4. Kepada yang terhormat Ibu Dr. Irmawati, S. Pi., M. Si selaku pembimbing pendamping yang selalu memberikan bimbingan dan arahan serta ilmu dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Kepada yang terhormat Ibu Dr. Widyastuti, S. Kel dan Bapak Prof. Dr. Ir. Abdul Haris, M. Si selaku penguji yang selalu memberi saran dan arahan hingga terselesaikannya skripsi ini.
6. Kepada Para Dosen Program Studi Ilmu Kelautan Universitas Hasanuddin yang telah memberikan bimbingan serta ilmu pengetahuan sejak menjadi mahasiswa baru

hingga terselesaikannya skripsi ini.

7. Kepada Kak Atisa Muslimin, S. Hut sebagai pendamping laboratorium atas kesabaran dan ilmu yang diberikan kepada penulis demi terselesaikannya skripsi ini.
8. Kepada tim Alga Squad (Wilya Ananda, S. Kel, Ardyansyah kahar, Sri Dawana, dan King Abdul Azis) yang telah memberikan semangat dan motivasi untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Kepada yang saya banggakan teman-teman seperjuangan (Aulia Putri, Winarso Usman, S. Kel, Sri Mulyani Anugerah, Andi Dewi Aprilia A. P., Indra Kurniawan, St. Firjatih Widhah, S. Kel., Bau Ashary Nasir, dan Nuryani Khadijah Syaputri, S. Kel) yang telah memberikan waktu, semangat, canda tawa serta tenaga untuk membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.
10. Kepada Bangtan So Nyeondan (Kim Namjoon, Kim Seokjin, Min Yoongi, Jung Hoseok, Park Jimin, Kim Taehyung, dan Joen Jungkook) yang telah menjadi metivator penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Kepada Sri Junianti, Andi Riska Roswati dan Risna Nur Syam yang senantiasa membantu, memberikan semangat dan canda tawa kepada penulis.
12. Kepada keluarga yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan semangat kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
13. Kepada seluruh pihak tanpa terkecuali yang namanya luput disebutkan satu persatu karena telah banyak memberikan bantuan selama penyusunan skripsi.

Semoga Allah SWT. selalu memberikan anugerah-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa skripsi ini terdapat banyak kekurangan dan masih jauh mencapai kesempurnaan dalam arti sebenarnya, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan para pembaca pada umumnya. Akhir kata penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca untuk meningkatkan kemampuan penulis dalam menulis karya ilmiah.

Terima Kasih

Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Makassar, 10 November 2022

Penulis

Riska WILDajaya

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Massila pada hari Sabtu tanggal 22 April 2001. Penulis merupakan anak kedua dari 2 bersaudara dari pasangan Zainuddin dan Hj. Resmiati. Tahun 2012 penulis lulus dari SD/INPRES 3/77 Massila Kecamatan Patimpeng, Kabupaten Bone, Sulawesi Selatan. Tahun 2015 lulus di SMP Negeri 2 Tonra, Kecamatan Patimpeng, Kabupaten Bone, Sulawesi Selatan. Tahun 2018 lulus di SMA Negeri 6 Bone, Kecamatan Kahu, Kabupaten Bone, Sulawesi Selatan. Pada bulan Agustus 2018 penulis diterima sebagai mahasiswa Program Studi Ilmu Kelautan, Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin melalui Seleksi Jalur SBMPTN.

Selama masa studi di Universitas Hasanuddin, penulis aktif menjadi asisten laboratorium pada mata kuliah Botani Laut, Biologi laut, Planktonologi Laut, Bioremediasi, Ekologi Perairan, serta Perbenihan dan Penangkaran Biota Laut. Penulis pernah mengikuti kegiatan Simposium Nasional ke-9 Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin sebagai presenter. Penulis juga pernah aktif dalam beberapa kegiatan kemahasiswaan himpunan KEMA JIK FIKP-UH. Selain itu, Penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata Tematik di Desa Paccing, Kecamatan Patimpeng, Kabupaten Bone, Sulawesi Selatan pada KKN Gelombang 106 pada tanggal 9 Juni sampai 14 Agustus 2021.

Saat ingin memperoleh gelar sarjana kelautan, penulis melakukan penelitian yang berjudul “Ekstraksi dan Amplifikasi DNA Ganggang Hijau (Chlorophyta) Genera *Caulerpa* dan *Codium*” pada tahun 2022 yang dibimbing oleh Dr. Inayah Yasir, M. Sc., selaku pembimbing utama dan Dr. Irmawati, S. Pi., M. Si selaku pembimbing pendamping.

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN.....	i
PERNYATAAN AUTHORSHIP.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	iii
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR	vi
BIODATA PENULIS.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN.....	1
A.Latar Belakang	1
B.Tujuan Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A.Biologi Genus <i>Caulerpa</i>	5
a. Klasifikasi dan Morfologi <i>Caulerpa racemosa</i>	5
b. Klasifikasi dan Morfologi <i>Caulerpa lentillifera</i>	6
B.Biologi Genus <i>Codium</i>	7
a. Klasifikasi dan Morfologi <i>Codium fragile</i>	7
C. DNA (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>).....	8
D. Ekstraksi DNA	10
E.Kualitas dan Kuantifikasi DNA	10
F.PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	11
G. Elektroforesis.....	12
H. Marka RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic</i>).....	12
I. Tinjauan Jenis Marka dalam Analisis Molekuler Makroalga.....	13
1. ISSR (<i>Intersimple Sequence Repeats</i>).....	13
2. <i>RuBisCo Plastid</i> (rbcl).....	13
3. COI (<i>Cytochrome Oxidase I</i>).....	13
4. tufA.....	14
III. METODE PENELITIAN	15
A.Waktu dan Tempat	15

	Halaman
B. Alat dan bahan	15
C. Prosedur Kerja	16
1. Preparasi Sampel.....	16
2. Ekstraksi DNA.....	16
3. Quantifikasi dan Kemurnian Genom.....	17
4. Amplifikasi PCR-RAPD (<i>Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA</i>).....	18
5. Elektroforesis.....	19
D. Analisis Data	19
E. Bagan Alir Ekstraksi metode CTAB	20
IV. HASIL.....	22
A. Karakterisasi Morfologi <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Caulerpa lentillifera</i> dan <i>Codium</i> sp.....	22
B. Kuantitas dan Kualitas Genom Hasil Ekstraksi DNA <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Caulerpa lentillifera</i> , dan <i>Codium</i> sp.....	23
C. Amplifikasi DNA (PCR-RAPD).....	25
V. PEMBAHASAN.....	27
A. Kuantitas dan Kualitas Genom <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Caulerpa lentillifera</i> dan <i>Codium</i> sp.	27
B. Amplifikasi DNA.....	30
VI. PENUTUP.....	32
A. Kesimpulan.....	32
B. Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	38

DAFTAR GAMBAR

No.	Halaman
1. Morfologi umum genus <i>Caulerpa</i> dan bagian-bagiannya.....	5
2. Ganggang hijau jenis <i>Caulerpa racemosa</i>	6
3. Ganggang hijau Jenis <i>Caulerpa lentillifera</i>	7
4. Ganggang hijau jenis <i>Codium fragile</i>	8
5. Struktur dasar Untai Ganda DNA.....	9
6. Makroalga jenis <i>Caulerpa racemosa</i> yang digunakan pada penelitian ini.....	22
7. Makroalga jenis <i>Caulerpa lentillifera</i> yang digunakan pada penelitian ini.....	22
8. Makroalga jenis <i>Codium</i> sp. yang digunakan pada penelitian ini.....	23
9. Hasil uji kualitatif genom DNA <i>C. racemosa</i> , <i>C. lentillifera</i> dan <i>Codium</i> sp. menggunakan elektroforesis gel.....	25
10. Pita DNA hasil amplifikasi <i>Caulerpa lentillifera</i> , <i>C. racemosa</i> , dan <i>Codium</i> sp. menggunakan primer OPA-02.....	25
11. Pita DNA hasil amplifikasi <i>Caulerpa lentillifera</i> , <i>C. racemosa</i> , dan <i>Codium</i> sp. menggunakan primer OPD-03.....	26
12. Pita DNA hasil amplifikasi <i>Caulerpa lentillifera</i> , <i>C. racemosa</i> , dan <i>Codium</i> sp. menggunakan primer OPC-11.....	26

DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Hasil uji kuantitas DNA <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>C. lentillifera</i> dan <i>Codium</i> sp. menggunakan metode ekstraksi genom CTAB dan <i>DNAeasy Plant Mini Kit</i> (Qiagen, Germany) dihitung menggunakan <i>Kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay</i> (Invitrogen, USA).....	23
2. Tingkat konsentrasi dan kemurnian genom DNA <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>C. lentillifera</i> dan <i>Codium</i> sp. menggunakan spektrofotometer	23
3. Jenis dan sekuen primer oligonukleotida yang digunakan dan hanya menghasilkan pita pada analisis molekuler <i>Caulerpa lentillifera</i>	26

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Data <i>biner</i> hasil skoring sampel <i>Caulerpa lentillifera</i> , <i>C racemosa</i> , dan <i>Codium</i> sp. menggunakan tiga primer.	38
2. Dokumentasi Alat dan Bahan Penelitian.....	40
3. Dokumentasi Kegiatan	42

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Makroalga merupakan salah satu produsen primer di laut, yang dapat dikelompokkan ke dalam tiga divisi, yaitu Chlorophyta, Phaeophyta, dan Rhodophyta. Dua genera makroalga dari divisi Chlorophyta yaitu *Caulerpa* dan *Codium* merupakan sumber daya hayati laut yang dimanfaatkan oleh masyarakat di kawasan Timur Indonesia, sebagai makanan yang dikonsumsi dalam kondisi mentah. Pada umumnya *Caulerpa* tumbuh di laut dangkal dan di aliran air yang tenang, sedangkan *Codium* biasanya ditemukan di daerah bebatuan atau pinggir dermaga (Saptasari, 2010). Menurut Prud'homme Van Reine & Trono (2001) kedua genera ini secara luas tersebar di pantai daerah tropik sampai subtropik, namun keanekaragaman terbesar berada di daerah tropik. Beberapa jenis *Caulerpa* dan *Codium* dimanfaatkan sebagai material aditif pada pakan udang dan ikan bandeng dalam upaya mengurangi material impor (Nasmia *et al.* 2022), juga sebagai suplemen pembeku sperma sapi cryopreservasi sperma (Saberivand *et al.* 2022), dan produksi biodiesel (Iyyappan *et al.* 2022; Gengiah *et al.* 2022). Selain itu, ekstrak dari *Caulerpa* mengandung anti-kanker (Reiko *et al.*, 2012), antioksidan (Vanderlei *et al.*, 2010), antibakteri, antijamur (Da *et al.*, 2014) dan antivirus (Zheng *et al.*, 2020). Genus *Codium* mengandung senyawa bioaktif untuk industri *pharmaceutical and nutraceutical* (Zbakh *et al.* 2020).

Terdapat banyak penelitian dalam pengenalan spesies makroalga melalui identifikasi konvensional (non-molekuler), seperti identifikasi dengan karakteristik morfologi anatomi, identifikasi secara fisiologis, dan secara biokimia namun semuanya sering menimbulkan masalah dalam pengaplikasiannya.

Makroalga adalah tumbuhan yang sel penyusun tubuhnya belum mengalami diferensiasi, yang menjadi salah satu alasan mengapa sifat plastisitas makroalga sangat besar. Karakter morfologi dapat berbeda bila parameter oseanografi lingkungan berbeda, padahal karakter morfologi umumnya dijadikan sebagai dasar dalam identifikasi. Selain itu, faktor lain seperti umur *thallus* juga dapat mempengaruhi tampilan morfologi (Julisaniah *et al.*, 2008). Adanya perubahan generasi antara sporofit dan gametofit pada kedua genera ini, juga dapat menimbulkan kesulitan dalam identifikasi taksonomi tingkat spesies (Kazi *et al.*, 2013).

Identifikasi jenis *Caulerpa* umumnya menggunakan kunci determinasi yang mengacu pada bentuk assimilator dan ramuli, namun hal tersebut sangat tergantung pada faktor lingkungan. Hal ini menjadikan identifikasi secara konvensional tidak lagi

dapat diandalkan utamanya ketika penentuan jenis dan filogenik spesies menjadi hal penting (Guiry *et al.*, 2014). Selain itu, morfologi dan anatomi keduanya yang relatif sederhana dan hampir mirip antara satu jenis dengan jenis yang lain dalam satu genus (Saunders, 2010) juga menambah kerumitan. Sebagai contoh, bentuk ramuli dan asimilator pada *Caulerpa racemosa* dan *Caulerpa lentillifera*, pada beberapa kondisi sangat mirip sehingga menyulitkan dalam identifikasi secara morfologi.

Alga hijau jenis *Caulerpa* dan *Codium* berasal dari Perairan Takalar. Jenis *Caulerpa* yang dibudidayakan oleh masyarakat setempat adalah dari jenis *C. racemosa* dan *C. lentillifera*. Umumnya oleh masyarakat, keduanya dikenal dengan nama lawi-lawi, namun jenis *C. lentillifera* dikenali dengan nama lawi-lawi bulaeng karena lebih sering ditemukan dengan variasi warna hijau muda dengan sedikit warna keemasan (*self observation*). Jenis *C. racemosa* memiliki variasi bentuk morfologi asimilator yang sangat besar, mulai dari yang berbentuk hanya serupa batang tanpa bulatan, ramuli menyirip serupa susunan tulang ikan, hingga yang bulirnya kecil rapat serupa *C. lentillifera*.

Codium yang dikenal oleh masyarakat setempat dengan nama donge-donge, dimanfaatkan dengan cara dikonsumsi langsung oleh masyarakat setempat. *Codium* juga termasuk ganggang hijau dengan banyak jenis, yang bentuk satu sama lainnya sangat mirip. *Codium* yang dikonsumsi masyarakat di Takalar hingga saat ini juga belum teridentifikasi jenisnya secara benar. Selama ini sampel yang dijual di pasar-pasar yang berasal dari perairan Takalar dikenali sebagai *Codium fragile* (Navya & Khora, 2016) dan *Codium edule* (Yaqin *et al.*, 2011). Identifikasi morfologi juga didukung oleh analisis anatomi, dengan melihat bentuk utrikelnya. Namun kedua metode ini masih sangat meragukan karena kedua jenis ini sangat mirip. Untuk mendapat kepastian jenis, diperlukan analisis biomolekuler.

Karakteristik genetik alga dapat diketahui dengan melakukan analisis molekuler. DNA *barcoding* adalah salah satu bentuk pendekatan yang digunakan untuk identifikasi molekuler (Zubaidah, 2011). Penerapan teknik molekuler untuk alga masih mengalami banyak kesulitan, terutama dalam memperoleh jumlah dan kualitas DNA serta hasil amplifikasi gen target yang ideal untuk analisis biomolekuler lebih lanjut (Anggraeni *et al.*, 2006).

Metode ekstraksi DNA yang digunakan sebagai langkah awal dalam proses analisis molekuler, menjadi salah satu kunci keberhasilan. Metode yang sama seringkali memberikan hasil yang berbeda untuk jenis makroalga yang berbeda. Prosedur yang berhasil digunakan untuk satu kelompok alga dapat saja gagal untuk kelompok alga

lainnya (Doyle & Doyle, 1987). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi, di antaranya perbedaan karakteristik dinding sel, kandungan polisakarida kompleks, kandungan polifenol, dan metabolit sekunder setiap jenis alga (Tuney & Sukatar, 2010; Hengkengbala *et al.*, 2018).

Selama ini, prosedur ekstraksi DNA alga telah dilakukan dengan berbagai metode, baik konvensional maupun menggunakan kit ekstraksi komersil. Metode konvensional ekstraksi DNA seringkali melalui beberapa modifikasi prosedur untuk menyesuaikan dengan kondisi masing-masing jenis alga yang diteliti. Penggunaan kit komersil akan menghasilkan kualitas produk ekstraksi yang berbeda tergantung tipe dan pabrik/*brand* dari kit yang digunakan (Hengkebala *et al.*, 2018). Kendala lain yang dihadapi dalam analisis molekuler adalah masih kurang tersedianya primer spesifik yang sesuai dalam proses amplifikasi DNA, sehingga di akhir ekstraksi pada saat elektroforesis, seringkali tidak ditemukan pita DNA.

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) adalah salah satu penanda molekuler yang dapat digunakan untuk mengevaluasi hubungan genetik populasi organisme (Ayuningrum *et al.*, 2012). Penanda molekuler ini sering digunakan untuk mengakses informasi genetik pada beberapa jenis makroalga seperti *Laminaria digitata*, *Mazzaella laminarioides*, dan *Gigartina skottsbergii* (Anggraeni *et al.*, 2008). Penggunaan RAPD memiliki kelebihan dibandingkan dengan penanda molekuler lain seperti SSR dan RFLP, karena menghasilkan pita DNA dalam jumlah besar, tidak memerlukan pengetahuan genetik awal tentang organisme, efisien, ekonomis, dan mudah dalam mendapatkan primer yang acak untuk menganalisis genom (Windarsih *et al.*, 2019). Selain itu, RAPD juga tidak memerlukan *probe* atau informasi sekuens seperti analisis dengan RFLP dan mikrosatelit. Marka RAPD menghasilkan polimorfisme tinggi, simpel dan cepat (Anggraeni *et al.*, 2008).

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi secara molekuler genom dan optimasi PCR pada ganggang hijau (Chlorophyta) genera *Caulerpa* dan *Codium* melalui amplifikasi DNA menggunakan marka RAPD. Hal ini penting sebagai langkah awal dalam melakukan berbagai studi atau penelitian terkait biologi molekuler ganggang hijau, antara lain untuk menentukan jenisnya yang hingga saat ini studi serupa masih sedikit dibandingkan jenis alga lainnya.

B. Tujuan Penelitian

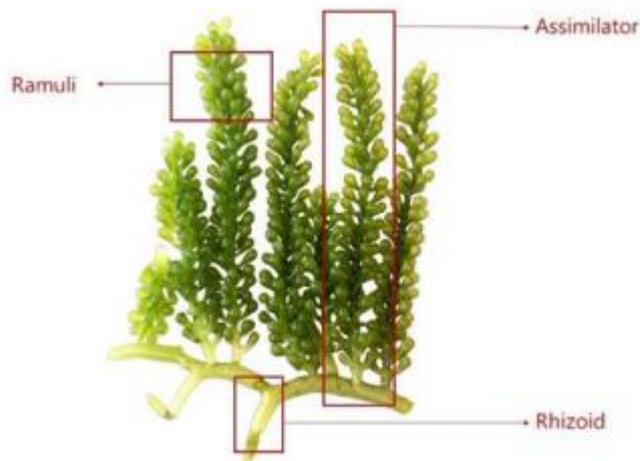
Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keberhasilan, membandingkan metode yang sesuai dan memberi hasil terbaik dalam mengekstraksi DNA ganggang hijau (Chlorophyta) genera *Caulerpa* dan *Codium*. Penelitian ini juga bertujuan untuk

melakukan optimasi amplifikasi genom *Caulerpa* dan *Codium* menggunakan marka RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Penelitian ini diharapkan mampu menemukan metode ekstraksi untuk kedua genera tersebut, yang membuka wawasan untuk mencoba menemukan metode ekstraksi yang cocok untuk jenis-jenis makroalga hijau yang ada di Indonesia, sehingga memudahkan dalam mengidentifikasi. Bila ini dapat terjadi, jenis-jenis makroalga hijau yang ditemukan di Indonesia dapat teridentifikasi sehingga menambah *database* yang digunakan dalam konservasi kawasan pesisir serta sebagai bahan acuan untuk penelitian selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi Genus *Caulerpa*

Ciri umum dari *Caulerpa* adalah keseluruhan tubuhnya terdiri dari satu sel dan bersifat multi nukleat (*Coenocytic*). Hal ini membuat proses lisis sel dari genus ini sulit untuk dilakukan (Saptasari, 2010). *Caulerpa* dapat tumbuh hingga berukuran besar, terdiri dari stolon yang merayap dan dilengkapi dengan rhizoid dan assimilator tegak. Assimilator terdiri dari poros tengah dengan banyak cabang (ramuli). Perbedaan spesies dicirikan oleh perbedaan pola percabangan assimilator, susunan, bentuk ramuli dan stolon (Belton *et al.*, 2014).



Gambar 1. Morfologi umum genus *Caulerpa* dan bagian-bagiannya (Estrada *et al.*, 2020)

a. Klasifikasi dan Morfologi *Caulerpa racemosa*

Klasifikasi *Caulerpa racemosa* J. Agardh, 1873

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Ulvophyceae

Order: Bryopsidales

Family: Caulerpaceae

Genus: *Caulerpa*

Species: *C. racemosa*

(Sumber: marinespecie.org)

C. racemosa memiliki *thallus* berwarna hijau muda, dengan stolon berukuran agak besar bila dibandingkan jenis lain dari marga yang sama. Perakaran pendek dan agak rapat, dengan ramuli yang rapat dan rimbun yang timbul pada stolon (seperti buah

anggur) dengan interval pendek. Panjang ramuli dapat mencapai 3 cm (Pulukadang *et al.*, 2013). Variasi nama untuk jenis *Caulerpa racemosa* yaitu *Caulerpa racemosa* var. *clavifera* (Turner) C. Agardh (1817), *Caulerpa obtuse* (J. V. Lamouroux, 1809), *C. racemosa* var. *disticha* (V. J. Cahpman, 1977), dan *C. uviera* (C. Agardh, 1817) (marinespecies.org).



Gambar 2. Ganggang hijau jenis *Caulerpa racemosa* (Saptasari, 2010)

b. Klasifikasi dan Morfologi *Caulerpa lentillifera*

Klasifikasi *Caulerpa lentillifera* J. Agardh, 1837

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Ulvophyceae

Order: Bryopsidales

Family: Caulerpaceae

Genus: *Caulerpa*

Species: *C. lentillifera*

(Sumber: marinespecies.org).

C. lentillifera berwarna hijau kekuningan, ramuli menyerupai anggur (bulat) dengan panjang cabang dapat mencapai 8,5 cm dan tegak. Setiap ramuli memiliki tangkai dengan ujung bulat berdiameter 1-3 mm (Pulukadang *et al.*, 2013). Beberapa bentuk ramuli *C. racemosa* serupa dengan *C. lentillifera* yaitu ramuli yang bulat seperti buah anggur. Beberapa variasi nama untuk jenis ini di antaranya *Ahnfeldita lentillifera* (J. Agardh) Trevisan (1849), *C. kilneri* (J. Agardh, 1873), *C. longistipitata* (Weber-van

Bosse) Svedelius (1906), *Chauvinia lentillifera* (J. Agardh) Kuitzing (1849), dan *Chauvinia microphysa* (Kuitzing, 1863) (marinespecies.org).



Gambar 3. Ganggang hijau Jenis *Caulerpa lentillifera* (Estrada *et al.*, 2020)

B. Biologi Genus *Codium*

Jenis makroalga hijau lain yang juga banyak dikonsumsi masyarakat pesisir adalah *Codium*. *Thallus* berwarna hijau gelap terdiri atas sel-sel filamen yang terjalin dengan dinding bersilangan yang tidak lengkap membentuk bagian dalam *thallus* yang juga bersifat *Coenocytic* (multi nukleat) (Kam, 2001). Umumnya melekat pada batuan, dermaga, maupun berasosiasi dengan lamun di daerah intertidal dan subtidal (Zaiko, 2005).

a. Klasifikasi dan Morfologi *Codium fragile*

Klasifikasi *Codium fragile* (Suringar) Hariot, 1889

Kingdom: Plantae

Division: Chlorophyta

Class: Ulvophyceae

Order: Bryopsidales

Family: Codiaceae

Genus: *Codium*

Species: *C. fragile*

(Sumber: marinespecies.org).

Codium fragile secara umum memiliki dua bentuk *thallus*, ada yang berbentuk tegak dan tidak. Tanaman yang berbentuk tegak akan bercabang secara dikotomis

hingga panjang 40 cm. Cabang membentuk struktur dari segmen-segmen silindris yang bercabang berulang kali dengan diameter 0,5 - 1,0 cm. Tekstur *thallus* seperti spons, tidak berkapur, sedangkan yang tumbuh tidak tegak berbentuk bulat (Burrows, 1991). Jenis *Codium* yang berada di perairan Takalar sering dikonsumsi masyarakat setempat, namun jenis spesifiknya belum diketahui secara pasti. Variasi nama jenis ini yaitu *Acanthocodium fragile* (Suringar, 1867) dan *Codium fragile var. typicum* (Schmidt, 1923) (marinespecies.org).



Gambar 4. Ganggang hijau jenis *Codium fragile* (Cherif *et al.*, 2016)

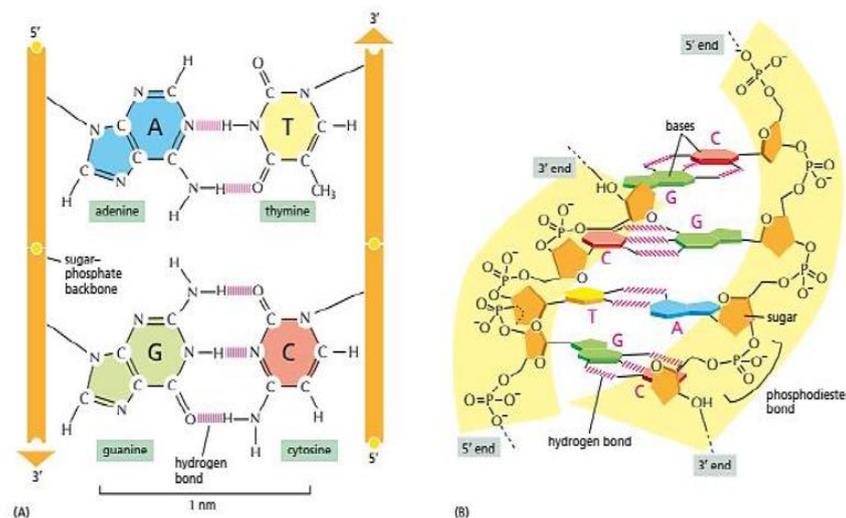
Karakteristik morfologi alga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti gerakan air, cahaya matahari, suhu, salinitas dan derajat keasaman (pH). Selain faktor lingkungan, faktor genetik juga dapat mempengaruhi perbedaan kualitas produksi dan karakteristik morfologi alga. Analisis molekuler DNA merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan untuk mengetahui karakteristik genetik dari suatu jenis tertentu (Tenriolu, 2016).

C. DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

Asam deoksiribonukleat (DNA) merupakan polinukleotida beruntai ganda yang karakteristik komponen penyusunnya terdiri dari gula deoksiribosa, gugus fosfat dan basa nitrogen (adenin, guanin, timin, dan sitosin). Untai DNA terdiri dari serangkaian nukleotida yang dihubungkan oleh ikatan fosfodiester yang terbentuk antara gula pentosa dan gugus fosfat. Untai ganda DNA terhubung melalui ikatan hidrogen yang terbentuk antara pasangan basa nitrogen. Pasangan basa nitrogen dalam DNA termasuk adenin - timin (dua ikatan hidrogen) dan guanin - sitosin (tiga ikatan hidrogen). (Nur'aini *et al.*, 2019).

DNA *barcode* menjadi salah satu sarana molekuler dan bioinformatika untuk mengidentifikasi jenis. Penggunaan DNA *barcoding* untuk menganalisis variasi genetik didasarkan pada asumsi bahwa variasi genetik antar spesies melebihi variasi intraspesies. Diharapkan DNA *barcode* dapat menganalisis variabilitas satu atau beberapa penanda molekuler terstandar, sehingga memungkinkannya untuk digunakan dalam membedakan entitas biologi. Sangat diharapkan entitas biologi ini berada dalam tingkatan takson spesies.

DNA *barcoding* digunakan untuk dua tujuan, yaitu identifikasi molekuler dari jenis yang sudah terdeskripsikan, dan untuk jenis yang belum terdeskripsikan. Identifikasi jenis makroalga berdasarkan karakteristik morfologi sulit dilakukan, karena banyak makroalga memiliki fenotip yang sangat bervariasi. Selain itu, evolusi konvergen juga terjadi secara bersamaan di banyak makroalga yang tidak berkerabat/terkait jauh dan menghasilkan bentuk serupa. Hal ini makin memperumit identifikasi berbasis morfologi (Prasanthi *et al.*, 2020). DNA *barcode* menjadi solusi yang dapat memberikan kontribusi kuat untuk penelitian keanekaragaman hayati dan taksonomi (Basith, 2015).



Gambar 5. Struktur dasar untai ganda DNA (Nur'aini *et al.*, 2019)

Pengkodean DNA melibatkan urutan fragmen gen dari sampel yang telah diidentifikasi dan telah tersimpan dalam *database*. Identifikasi jenis kemudian dilakukan hanya dengan membandingkan urutan gen yang sama yang didapatkan dari spesimen yang tidak teridentifikasi. Pengkodean DNA telah terbukti menjadi teknik yang efisien untuk memantau makroalga laut (Kucera *et al.*, 2008; Lee & Kim, 2015; Montes *et al.*, 2017; Bartolo *et al.*, 2020; Prasanthi *et al.*, 2020).

D. Ekstraksi DNA

Isolasi DNA adalah prosedur pengumpulan DNA untuk analisis molekuler atau analisis forensik lainnya (Doyle, Widyarti, & Rahayu, 2011; Romlah *et al.*, 2018), dan menjadi teknik dasar dan penting dalam studi DNA. Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen lainnya. Hasil ekstraksi tersebut merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya dan harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi (Tenriolu, 2016).

Isolasi/ekstraksi DNA diperoleh dengan merusak atau memecahkan dinding sel sehingga DNA keluar dari dalam sel. Derajat kemurnian dan kualitas isolasi DNA sangat mempengaruhi hasil yang diperoleh. Secara umum, prosedur ekstraksi yang baik untuk isolasi DNA mencakup tiga hal penting, yaitu harus bisa menghasilkan DNA dengan kemurnian yang tinggi, DNA harus utuh (belum terdegradasi), dan dalam konsentrasi yang tinggi, yang dapat diamati dengan spektrofotometer pada λ 260 nm dan 280 nm. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio absorbansinya berkisar antara 1,8–2,0 (Minarsih *et al.*, 2016).

Metode isolasi DNA dapat dilakukan secara konvensional maupun menggunakan kit komersial. Metode konvensional dalam mengekstraksi DNA alga seringkali melalui beberapa prosedur yang telah dimodifikasi sesuai dengan kondisi masing-masing jenis alga yang diteliti. Metode ekstraksi menggunakan *kit* akan menghasilkan produk yang berbeda tergantung jenis kit.

Permasalahan utama yang sering muncul dalam proses isolasi DNA tanaman adalah keberadaan senyawa polisakarida, polifenol, protein, RNA, dan senyawa metabolit sekunder. Senyawa ini dapat menghambat tahapan isolasi DNA (Romlah *et al.*, 2018). Ketebalan dinding sel juga berpengaruh, utamanya karena dapat menyebabkan sel tidak terlisis dengan baik. Prosedur yang berhasil digunakan untuk satu kelompok alga, sering kali gagal untuk digunakan pada kelompok alga lainnya (Doyle & Doyle 1990; Hengkengbala *et al.*, 2018).

E. Kualitas dan Kuantifikasi DNA

Kuantitas DNA merupakan suatu proses dalam memastikan DNA yang diperoleh dari ekstraksi benar berasal dari sampel yang diteliti bukan dari kontaminan misalnya bakteri. Selain itu, kuantifikasi DNA juga penting untuk pemeriksaan sebelum proses PCR, dilakukan karena diharapkan jumlah DNA yang didapatkan tidak terlalu sedikit atau tidak terlalu banyak. DNA yang terlalu banyak menyebabkan kesulitan saat interpretasi dan memakan waktu yang lebih lama, sedangkan DNA yang terlalu sedikit mengakibatkan hilangnya alel-alel yang diperlukan (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Salah satu cara termudah dan akurat untuk menentukan konsentrasi DNA yaitu melalui analisis Spektrofotometer karena basa nitrogen dapat menyerap sinar UV, semakin tinggi DNA atau RNA dalam larutan maka sinar UV akan semakin menyerap. DNA mampu menyerap cahaya paling kuat pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada λ 280 nm. Kemurnian DNA dapat dihitung dengan rasio absorbansi ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$) dan nilai kemurnian DNA yang baik berkisar 1,7-2,0. Apabila rasio tersebut dibawah 1,7 berarti ada ketidakmurnian yang signifikan masih tertinggal di dalam sampel (Nurhayati & Darmawati, 2017).

Saat melakukan identifikasi, pemisahan dan purifikasi fragmen atau RNA secara kualitatif dapat menggunakan metode standar yaitu metode elektroforesis dibawah pengaruh medan listrik. Molekul terlarut dalam medan listrik akan bergerak dengan kecepatan yang ditentukan oleh rasio muatan dan massa. Elektroforesis melalui gel agarosa merupakan standar untuk pemisahan, identifikasi dan pemurnian fragmen (Nurhayati & Darmawati, 2017).

F. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR adalah teknik sintesis dan amplifikasi DNA *in vitro* yang melibatkan beberapa langkah/siklus berulang untuk menggandakan DNA untai ganda target dalam setiap siklusnya, sehingga jumlahnya memungkinkan untuk dipakai dalam mengidentifikasi. Prinsip dasar teknik PCR adalah mengalikan situs spesifik dengan enzim DNA *polymerase*. Proses ini diawali oleh perlekatan primer, dengan menghubungkan *deoxyribonucleotide triphosphate* (dNTP) dalam reaksi termal (Raven & Johnson, 2002; Yustinadewi *et al.*, 2018). Komponen yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah DNA *template*; sepasang primer *Forward* (F) dan *Reverse* (R), dNTP (*Deoxynucleotide triphosphate*); *buffer* PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim DNA *polymerase* (Handoyo & Rudiretna, 2001). Primer adalah oligonukleotida pendek yang memiliki urutan nukleotida yang melengkapi urutan nukleotida DNA *template*.

Menurut Ebd-Elsalam (2003), primer mempengaruhi spesifisitas dan sensitivitas reaksi PCR, dan merupakan salah satu parameter yang menentukan keberhasilan suatu proses PCR. Primer berfungsi sebagai *barrier* bagi fragmen DNA target yang akan diamplifikasi sekaligus memberikan gugus hidroksil (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi. Desain primer yang tidak tepat menyebabkan reaksi PCR tidak berjalan dengan baik, sehingga menghasilkan produk PCR yang tidak spesifik atau terbentuknya produk sampingan yang tidak diinginkan (*primer dimer*) (Yustinadewi *et al.*, 2018).

G. Elektroforesis

Elektroforesis adalah metode analisis kimia yang didasarkan pada pergerakan molekul protein bermuatan dalam medan listrik. Proses ini dilakukan dengan tujuan mengetahui bentuk dan ukuran pita DNA hasil ekstraksi maupun hasil amplifikasi PCR.

Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia molekul. Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makromolekul. Ketika arus listrik dialirkan ke media penyangga yang sudah mengandung protein plasma, komponen protein akan mulai bermigrasi (Ricardson *et al.*, 1986; Rianta, 2001).

Teknik elektroforesis dapat dalam bentuk elektroforesis larutan dan elektroforesis regional/zona. Pada teknik elektroforesis larutan, larutan buffer yang mengandung makromolekul ditempatkan dalam ruang tertutup kemudian dialiri listrik. Kecepatan migrasi makromolekul diukur dengan mengamati pemisahan molekul yang akan terlihat seperti pita dalam pelarut, sedangkan teknik elektroforesis regional/zona menggunakan bahan padat sebagai media pendukung yang diberi larutan buffer. Media pendukung yang biasa digunakan adalah gel agarosa, gel pati, gel poliakrilamida dan kertas selulosa poliasetat (Rianta, 2001). Terdapat dua model elektroforesis gel yaitu horizontal dan vertikal. Model horizontal lebih umum digunakan, selain karena peralatan yang digunakan sangat sederhana, dan relatif lebih murah, hasil pemisahannya, untuk enzim tertentu, lebih baik (Sargent & George, 1975; Rianta, 2001).

H. Marka RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

RAPD adalah salah satu penanda molekuler oligonukleotida acak dengan pasangan basa pendek (8-12 bp), menghasilkan pola polimorfisme yang dapat dipakai untuk mempelajari hubungan dan keragaman genetik, sehingga cocok digunakan untuk mengidentifikasi genotipe organisme (Anggraeni *et al.*, 2006; Windarsih *et al.*, 2019). Teknik ini dapat mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak (Pharmawati, 2014).

Marka RAPD memiliki kelebihan dibandingkan dengan marka lainnya, karena lebih mudah dalam pemanfaatan, cepat dalam memberikan informasi, menghasilkan pita DNA dalam jumlah besar, tidak memerlukan informasi mengenai genom, serta mudah dalam mendapatkan primer acak untuk menganalisis genom dari semua organisme. Namun penggunaan RAPD juga tidak selalu handal, karena apabila diulang dapat memberikan hasil/produk yang berbeda. Kelemahan tersebut dapat diatasi dengan mengoptimalkan proses ekstraksi, dan kondisi PCR (Ayuningrum *et al.*, 2012).

Penelitian menggunakan marka RAPD telah dilakukan oleh Anggraeni *et al.*, (2006) untuk *Eucheuma* sp. dan menghasilkan polimorfisme dari profil pita sebesar 98,67%. Nilai ini menunjukkan bahwa marka yang digunakan dapat mendeteksi variasi genetik dari spesies.

I. Tinjauan Jenis Marka dalam Analisis Molekuler Makroalga

Identifikasi makroalga secara non molekuler sangat terbatas. Hal ini berkaitan dengan karakteristik morfologi makroalga yang tidak terdiferensiasi (*Thallophyta*), sehingga teknik molekuler berbasis DNA semakin banyak digunakan dalam identifikasi taksonomi (Kim *et al.*, 2014). Kemajuan dalam sistematika DNA *barcoding* telah mengarah pada pengembangan pendekatan yang berbeda dalam filogenetik alga dan penggunaan pendekatan marka amplifikasi PCR (Alshehri *et al.*, 2019). Beberapa jenis marka yang sering digunakan dalam amplifikasi PCR DNA makroalga:

1. ISSR (*Intersimple Sequence Repeats*)

Intersimple Sequence Repeats (ISSR) merupakan marka molekuler berbasis PCR, yang mengamplifikasi daerah di antara dua ulangan nukleotida pendek (mikrosatelit) (Yulita *et al.*, 2014). ISSR memiliki panjang pita 250 bp -10000 bp (Alshehri *et al.*, 2021). Keuntungan penggunaan marka ini adalah dapat menganalisa multi lokus dalam reaksi tunggal, mendeteksi keragaman genetik dan kekerabatan, dan identifikasi mutan (Yulita *et al.*, 2014). Penggunaan marka ISSR telah digunakan pada penelitian Alshehri *et al.*, (2021) untuk beberapa jenis makroalga, dengan hasil 55% relevansi untuk semua alga yang diujikan.

2. *RuBisCo Plastid (rbcL)*

RuBisCo plastid (rbcL) telah banyak digunakan untuk mempelajari posisi taksonomi spesies yang tidak diketahui, sehingga mampu memperjelas hubungan filogenetik antara spesies yang berbeda. Struktur ekson yang stabil dari marka *rbcL* dan kesamaan urutan asam amino yang tinggi, mendukungnya sebagai penanda yang dapat digunakan. Gen *rbcL* berhasil mengidentifikasi spesies makroalga yang berbeda berdasarkan spesies dan genus (Kazi *et al.*, 2013).

3. COI (*Cytochrome Oxidase Subunit I*)

COI merupakan salah satu marka dalam DNA mitokondria yang digunakan dalam analisis molekuler makroalga khususnya alga merah. Menurut Sherwood *et al.*, (2011), marka COI digunakan untuk menentukan keanekaragaman genetik spesies makroalga dan struktur populasi biogeografis. Marka ini memiliki bagian DNA yang relatif pendek sehingga mudah diamplifikasi dengan satu pasang primer. Marka COI memiliki

rentang pita 1422 bp - 26.898 bp dan lebih cocok digunakan pada beberapa jenis alga merah, dibandingkan marka *rbcL* (Robba *et al.*, 2006). COI adalah penanda yang lebih tepat untuk melihat struktur populasi dan keragaman jenis alga merah (Yang *et al.*, 2008). Tiga belas jenis *Gracilaria* spp. berhasil diidentifikasi menggunakan marka COI dengan primer COI143F dan primer COI11549R dengan panjang pita DNA 1422 bp (Meinita *et al.*, 2021).

4. *tufA*

Gen kloroplas *tufA* digunakan untuk mengkode pemanjangan faktor TU, yaitu sebuah molekul yang memediasi masuknya amino-asil-tRNA ke situs reseptor ribosom selama pemanjangan rantai polipeptida pada sintesis protein. Gen ini tidak hanya mengkode genom kloroplas pada alga, namun dapat mengkode nukleus di beberapa Charophyceae dan tanaman darat (Famà *et al.*, 2002). Marka *tufA* merupakan kandidat yang kuat dalam studi filogenetik hingga ke tingkat spesies karena konservatismenya di berbagai organisme (Kirkendale *et al.*, 2013). Gen *tufA* yang relatif terkonservasi merupakan penanda yang dapat digunakan untuk identifikasi dan filogeni takson alga hijau (Kazi *et al.*, 2013).

Saunders, (2010) mengevaluasi beberapa penanda untuk makroalga hijau, dan mengusulkan marka *tufA* sebagai penanda yang dapat digunakan. Pada penelitian Kazi *et al.*, (2013) menggunakan tiga jenis penanda yaitu *tufA*, *rbcL* dan 18ITS-rDNA, penanda *tufA* dan 18ITS-rDNA menjadi pilihan yang tepat dalam amplifikasi ganggang hijau khususnya untuk *Caulerpa*. Hasil yang didapatkan rata-rata pasangan basa yang terkoreksi divergensi sebesar 0,063.