

**Pengaruh Suhu *Annealing* pada Program PCR Terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA
Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap,
Jawa Tengah.**

Ayu Ludyasari (09620007)

Pembimbing Biologi: Dr. RetnoSusilowati, M.Si.

Pembimbing Agama: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag.

Abstrak

Penurunan ekosistem yang terjadi di Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah telah mengakibatkan masalah terhadap penurunan jumlah produksi Udang Jari (*Metapenaeus elegans*). Menurunnya jumlah produksi Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) juga akan mempengaruhi keragaman genetik yang dianggap penting karena sumberdaya genetik merupakan kunci penting bagi suatu individu untuk bertahan hidup sampai generasi yang akan datang. Informasi mengenai keragaman genetik digunakan sebagai dasar seleksi genotip yaitu DNA. Analisis DNA semakin terbantu dengan adanya amplifikasi PCR yang memanfaatkan cara replikasi DNA. Namun keberhasilan amplifikasi PCR dipengaruhi oleh suhu *annealing* yang optimal dalam proses penempelan primer. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu *annealing* pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans*).

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 individu udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian kaki jalan dan ekor yang diambil dari hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah. Sampel tersebut diekstraksikan dan diamplifikasi dengan metode PCR. Parameter penelitian adalah kadar kemurnian DNA pada absorbansi $A_{260/280}$, ukuran DNA total (bp) hasil ekstraksi, ukuran mtDNA (bp) hasil PCR.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu *annealing* mempengaruhi keberhasilan amplifikasi PCR yaitu suhu 44°C . Pengaruh tersebut ditunjukkan dari kadar kemurnian DNA pada absorbansi $A_{260/280}$ berkisar antara 1,65-2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan dari hasil elektroforesis berupa pita DNA total Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) yang didapatkan berukuran 12000 bp dan pita tunggal mtDNA berukuran 950 bp dan sedikitnya *smear* yang terbentuk.

Kata Kunci : Udang Jari (*Metapenaeus elegans*), *Annealing*, PCR

PENDAHULUAN

Segara Anakan merupakan ekosistem bakau dengan laguna yang unik dan langka yang terletak di antara Pantai Selatan Kabupaten Cilacap dan Pulau Nusakambangan (Saputra, 2005). Salah satu sumberdaya alam yang terdapat di Segara Anakan adalah sumberdaya udang air payau. Ada berbagai jenis udang air payau yang menempati perairan Segara Anakan, antara lain udang jari (*Metapenaeus elegans*), udang dogol (*Metapenaeus ensis*), udang pasir (*Metapenaeus affinis*), udang

windu (*Penaeus monodon*), udang pacet (*Penaeus semisulcatus*) dan udang krosok (*Parapenaopsis sp.*). *Metapenaeus elegans* merupakan spesies yang seluruh daur hidupnya berada di Segara Anakan, sedangkan spesies lain umumnya akan bermuara kembali ke laut (Dudley, 2000).

Beberapa faktor yang menyebabkan menurunnya ekosistem di perairan Segara Anakan diantaranya adalah menerima endapan lumpur dari Sungai Citanduy, Kayumari, Cikujang, Cibereum, Cikonde, Muaradua, Ujunggalang dan Donan yang

mencapai sekitar 3.000.000 m³ setiap tahunnya (ECI-ABD 1994, dalam Saputra 2008). Pengendapan ini mengakibatkan terjadinya pendangkalan perairan Laguna Segara Anakan. Disamping itu, penebangan bakau ilegal juga menjadi penyebab turunnya ekosistem perairan Laguna Segara Anakan. Dengan adanya faktor-faktor tersebut menyebabkan sumberdaya udang terutama udang jari di Segara Anakan mengalami penurunan jumlah produksi udang. Hal ini diperkuat dengan adanya penangkapan intensif dan eksploitasi yang dilakukan secara terus-menerus pada *Metapenaeus elegans* dengan ukuran udang yang tertangkap adalah juvenil dan udang muda sehingga lambat laun sumberdaya tersebut akan semakin berkurang (Dudley, 2000).

Udang jari (*Metapenaeus elegans*) di perairan Segara Anakan merupakan spesies yang sangat dominan dan sebagai komoditas utama hasil tangkapan bagi nelayan apong. Udang jari memiliki rasa yang cukup enak dan digemari terutama oleh masyarakat lokal karena harganya yang relatif lebih murah dibandingkan udang Penaeidae lainnya. Udang jari biasanya dipasarkan dalam bentuk segar dan asin-kering (ebi). Udang jari yang sudah diolah menjadi ebi dijual ke Jakarta dan sekitarnya sehingga harganya lebih mahal dibandingkan udang jari segar (Warintek, 2003).

Berdasarkan uraian di atas yang menjelaskan bahwa penurunan ekosistem perairan Segara Anakan juga menyebabkan menurunnya produksi udang jari (*Metapenaeus elegans*). Menurunnya jumlah produksi Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) juga akan mempengaruhi keragaman genetik yang dianggap penting, karena sumberdaya genetik merupakan kunci penting bagi suatu individu untuk bertahan hidup sampai generasi yang akan datang. Informasi mengenai keragaman genetik digunakan sebagai dasar seleksi genotip

yaitu DNA. Penelitian tentang udang jari secara khusus diperairan Laguna Segara Anakan sejauh ini masih sangat sedikit. Penelitian udang jari baru dilakukan oleh Saputra (2005) yang mencakup aspek-aspek biologi reproduksi dan dinamika populasi udang jari (*Metapenaeus elegans*) di Laguna Segara Anakan dan penelitiannya Hidayat (2007) mengenai keragaman genetik udang jari (*Metapenaeus elegans*) berdasarkan karakter morfometrik di Laguna Segara Anakan.

Sifat genetik yang ada pada udang jari (*Metapenaeus elegans*) di Laguna Segara Anakan sejauh ini hanya diketahui berdasarkan pada sifat fenotipnya sedangkan sifat genotipnya belum banyak diketahui. Sifat genotip merupakan ciri-ciri yang disimpan sebagai informasi genetik dalam gen-gen yang secara molekuler tersusun atas asam nukleat DNA yang akan tersimpan dalam kodon-kodon. DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) merupakan persenyawaan kimia yang terpenting pada makhluk hidup yang membawa keterangan genetik dari generasi ke generasi berikutnya. Dengan susunan kimia molekuler yang kompleks dan terdiri atas banyak nukleotida yang terangkai menjadi polinukleotida yang panjang.

Beberapa teknik molekuler yang dapat digunakan untuk mengetahui genotip suatu individu salah satunya adalah dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Analisis genetik dengan menggunakan metode PCR yang memanfaatkan cara replikasi DNA dengan bantuan primer yang mengapit daerah tertentu dan optimasi suhu dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal, sehingga dihasilkan produk PCR spesifik yaitu terbentuk pita DNA tebal. Untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal secara umum dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Muladno (2010) mengemukakan bahwa PCR merupakan reaksi yang menggandakan

jumlah molekul DNA pada target tertentu, dengan cara mensintesis molekul DNA yang baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut.

PCR ini dimulai dengan proses denaturasi yaitu pemisahan dua utas DNA yang saling bergabung (*double helix*) menjadi dua utas tunggal DNA yang dilakukan pada suhu tinggi. Setelah proses denaturasi kemudian dilanjutkan dengan proses *annealing* yaitu penempelan primer pada DNA *template* untuk awal pembentukan basa nitrogen pasangannya. Setelah proses *annealing* kemudian dilanjutkan dengan proses *extension* yaitu perpanjangan pembentukan basa nitrogen dari DNA *template* (Wahyudi, 2007).

Pada tahap *annealing* salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi adalah suhu karena proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimal. Jika suhu terlalu tinggi akan menyebabkan gagalnya amplifikasi karena tidak terjadi penempelan primer sebaliknya jika suhu terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom akibatnya DNA yang terbentuk memiliki spesifisitas rendah, sehingga sangat penting untuk mencari suhu *annealing* yang optimum bagi proses amplifikasi (Rybicky, 1996). Oleh karena proses *annealing* merupakan proses yang sangat penting maka cukup beralasan adanya pencarian suhu optimum, sehingga diharapkan bisa diperoleh DNA hasil dalam jumlah yang maksimum pada daerah yang ditargetkan sehingga cukup memudahkan bagi analisis DNA. Dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh suhu *annealing* pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) sehingga didapat suhu *annealing* yang paling optimum untuk mendapatkan kualitas DNA hasil PCR yang cukup banyak dengan spesifisitas yang cukup tinggi.

METODE PENELITIAN

Penelitian tentang “Pengaruh Suhu *Annealing* pada Program PCR terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah”, merupakan penelitian eksperimental dengan 5 sampel dari 5 individu Udang Jari (*Metapenaeus elegans*). Percobaan yang dilakukan dirancang perlakuan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dengan primer DNA yang digunakan adalah primer spesifik COIL *reverse* dengan untai (5' TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA 3') dan COIH *forward* dengan untai (5' ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA 3').

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *vortex mixer*, sentrifuge, mikropipet BioRad (1000 ul, 200 ul, 10 ul), mikrotube PCR, sarung tangan, tube ependorf volume 1,5 ml dan 2 ml, alat elektroforesis BioRad, UV transiluminator BioRad, spektrofotometer BioRad dan PCR BioRad konvensional.

Bahan-bahan yang digunakan adalah spesimen udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*), larutan EDTA (etilen diamin trichloro asetat), *Nuclei Lysis Solution*, larutan Proteinase-K, isopropanol, ethanol 70%, TE buffer, DNA Rehydration Solution, enzim *Taq polymerase*, larutan TBE (TrisBoratEDTA) 1x, gel agarose 0,8%, primer *forward* COIH (5') TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA yang memiliki *melting temperature* 48,8°C dan *reverse* COIL (5') ATA TTA GCC ATT GGT GTC TAA yang memiliki *melting temperature* 47,4°C.

Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan, yaitu tahap yang meliputi pembuatan larutan-larutan ekstraksi DNA (*Lysis solution*), dan pengambilan sampel udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*) di Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah.

2. Tahap pelaksanaan, yaitu tahap yang meliputi tahap ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dengan perlakuan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dan menggunakan primer COIL dan COIH, uji kualitatif elektroforesis, uji kuantitatif spektrofotometer.

3. Tahap pengambilan data, yaitu tahap yang meliputi pengukuran pita/band genom (bp) *Metapenaeus elegans* dari hasil ekstraksi dan amplifikasi PCR dengan menggunakan elektroforesis, kadar DNA genom (µg) udang jari hasil isolasi DNA yang diukur dengan spektrofotometer.

Ekstraksi DNA

Sumber sel yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*) dari udang jari dengan masing-masing sampel yang digunakan sebanyak 20-25 mg dengan menggunakan metode lysis solution yang telah dikembangkan pada udang *vannamei* (Tamayo, 2006).

Sampel organ diambil sebanyak 20-25 mg per sampel, kemudian dimasukkan ke dalam tube ependorf 1,5 ml yang sudah berisi 300 µl larutan TE buffer untuk menghilangkan etanol dan dibuang kembali TE buffer. Selanjutnya sampel ditambahkan 8µl proteinase-K, lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,5 dan 4 M Urea), 20% SDS lalu diinkubasi 50°C selama ±24 jam untuk mempercepat proses lisis sel.

Pada tahap eliminasi RNA selanjutnya larutan sel hasil inkubasi ditambah dengan 350 µl larutan NaCl kemudian sentrifus pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Setelah itu larutan supernatan (lapisan paling atas) diambil ±300 µl, kemudian dimasukkan ke dalam tube ependorf 2 ml yang baru dan ditambah 1ml isopropanol kembali disentrifus.

Tahap selanjutnya yaitu tahap pengendapan DNA. Supernatan yang diperoleh ditambahkan 250 µl ethanol 70% dingin. Selanjutnya tube ependorf yang

berisi larutan sampel disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Setelah kering tambahkan 50-100µl buffer TE, kemudian disimpan genom pada suhu 2°C - 8°C (untuk penyimpanan jangka pendek) atau -70°C (untuk penyimpanan jangka panjang) sebelum dilakukan pengecekan hasil ekstraksi melalui elektroforesis pada gel Agarose 1% dan UV transiluminator.

Analisa PCR

Sekuens DNA dari udang jari diamplifikasi mengikuti protokol PCR yang mengacu pada Nugroho (1997) dengan sedikit modifikasi. Komposisi reaksi PCR dalam satu mikrotube PCR antara lain 7,5 Master Mix; DNA genom 1,0 µl; 1,5 µl primer COIL, 1,5 µl primer COIH, dan ddH₂O sampai 15 µl. Jumlah komponen dapat diubah-ubah tergantung pada keperluan analisa.

Reaksi amplifikasi pada mesin PCR berlangsung sebanyak 35 siklus setelah pra-PCR selama 5 menit pada suhu 94°C. Masing-masing siklus terdiri dari : 1 menit dengan suhu 94°C untuk denaturasi, 1 menit dengan beberapa suhu (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) untuk penempelan DNA (*annealing*), dan 1 menit pada suhu 72°C untuk pemanjangan fragmen DNA (*ekstensi*). Reaksi amplifikasi diakhiri dengan pasca PCR selama 10 menit dengan suhu 72°C dan normalisasi pada suhu 4°C selama 5 menit.

Analisa Data

Jenis data yang didapatkan dalam penelitian ini adalah data deskriptif dengan cara membandingkan hasil elektroforesis pada setiap perlakuan :

1. Kadar DNA genom (µg) *Metapenaeus elegans* hasil ekstraksi DNA yang didapat dari pengukuran dengan spektrofotometer pada rasio absorbansi 260 nm dan 280 nm.
2. Pita/band DNA genom (bp) *Metapenaeus elegans* hasil ekstraksi DNA yang didapat dari elektroforesis gel agarose 0,8% dan divisualisasikan dengan UV transiluminator.
3. Pita/band (bp) *Metapenaeus elegans* hasil amplifikasi PCR dengan perlakuan suhu

annealing yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dengan jumlah siklus 35 siklus dengan menggunakan primer COIL dan COIH.

PEMBAHASAN

Pengujian kualitas DNA udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer, kemurnian DNA dilihat dari rasio $A_{260/280}$. Rata-rata kemurnian (R) DNA yang diperoleh dari hasil penelitian ini berkisar antara 1,65-2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Sambrook dan Ruslle (2001) mengatakan bahwa hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio $A_{260/280}$ antara 1,8 hingga 2,0. Jika nilai rasio $A_{260/280}$ melebihi 2,0 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan dari protein membran atau senyawa lainnya dan kadar DNA yang didapat belum murni. Sedangkan, jika nilai rasio $A_{260/280}$ kurang dari 1,8 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak sedangkan DNA yang diambil terlalu sedikit.

Sampel	$A_{260}:A_{280}$ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Keterangan
1	1,81	DNA murni
2	2,07	Kontaminasi protein atau senyawa lain
3	1,65	Kontaminasi fenol dan DNA terlalu sedikit
4	1,76	Kontaminasi fenol dan DNA terlalu sedikit
5	1,87	DNA murni

Tabel 4.1 Tingkat kemurnian DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) dengan Spektrofotometer.

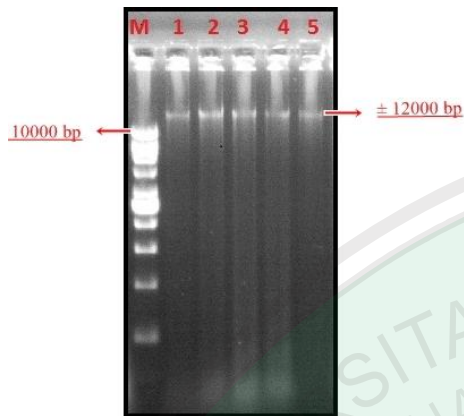
Berdasarkan hasil pengukuran tingkat kemurnian DNA pada Tabel 4.1 di atas menunjukkan bahwa dari 5 sampel yang

diuji, terdapat 2 sampel yang menghasilkan DNA murni dengan nilai rasio $A_{260/280}$ berkisar antara 1,65 - 2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 3 sampel menghasilkan DNA yang masih mengandung kontaminan. Sampel-sampel yang menghasilkan DNA murni yakni pada sampel 1 (1,81 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dan sampel 5 (1,87 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sedangkan sampel-sampel yang masih mengandung kontaminan yakni pada sampel 2 (2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 3 (1,65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sampel 4 (1,76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Sampel 2 memiliki nilai rasio $A_{260/280}$ lebih besar dari 2,0 yang mengindikasikan sampel telah terkontaminasi protein atau senyawa lain sedangkan sampel 3 dan 4 memiliki nilai rasio $A_{260/280}$ lebih kecil dari 1,8 yang mengindikasikan sampel telah terkontaminasi dengan fenol dan memiliki DNA yang terlalu sedikit.

Salah satu penyebab sedikitnya DNA yang terekstraksi dan kemurnian yang tidak mendekati 100% diduga adalah dari aspek teknis pelaksanaan dari setiap tahap yang dilakukan seperti halnya dalam pemisahan supernatan dengan endapannya pada tahap penghilangan sisa protein dan bahan lain dalam sel yang kemungkinan terlalu sedikit yang terambil sehingga DNA berbobot berat tidak terambil dan jumlah DNA yang terambil pun menjadi sedikit. Pengeringan alkohol yang kurang sempurna juga memungkinkan terjadinya kontaminasi yang dapat memberikan efek pada penghitungan DNA dengan spektrofotometer (Fatchiyah *et al.*, 2011). Nilai kuantitas DNA total yang tidak merata ini diduga karena perlakuan sampel organ kaki jalan dan ekor yang kurang optimal selama penyimpanan dan pada saat proses ekstraksi. Hal ini dapat memberikan pengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi.

Hasil isolasi sampel DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah pada penelitian ini telah dikonfirmasi menggunakan metode

elektroforesis gel agarose dengan konsentrasi gel 0,8% (Mandayasa, 2007). Hasil karakter genetik udang jari (*Metapenaeus elegans*) dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Elektroforegram hasil ekstraksi DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) dengan menggunakan metode Elektroforesis gel Agarose. Keterangan : M (marker 1Kb) ; 1, 2, 3, 4, 5 (nomor sampel)

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan pada ekstraksi 5 sampel yang diambil dari kaki jalan dan ekor udang jari (*Metapenaeus elegans*) hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah menggunakan metode elektroforesis gel Agarose 0,8% (Gambar 4.1), terletak pada ukuran yang sama yaitu 12000 bp dan ketebalan pita DNA yang terbentuk akan menunjukkan kualitas karakter genetik dari sampel yang dianalisis.

Pada sumur 1 (sampel dari individu 1) dan sumur 5 (sampel dari individu 5) terlihat pita DNA yang terbentuk tipis dan mengumpul (tidak menyebar), sumur 2 (sampel dari individu 2), sumur 3 (sampel dari individu 3) dan sumur 4 (sampel dari individu 4) terlihat pita DNA yang terbentuk tebal dan mengumpul (tidak menyebar). Tingkat ketebalan pita DNA ditentukan dari kemurnian atau proses ekstraksi yang kurang tepat pada sampel yang diamati, sehingga menyebabkan sampel tersebut

tidak memiliki kualitas yang bagus. Ketebalan pita DNA total udang jari yang paling bagus terdapat pada sampel 2, 3 dan 4. Sedangkan ketebalan pita DNA total udang jari yang kurang bagus terdapat pada sampel 1 dan 5. Kualitas DNA total akan sangat berpengaruh terhadap analisis karakter genetik selanjutnya.

Menurut Irmawati (2003) mengatakan bahwa pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam *ependorf*, disentrifus, atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu.

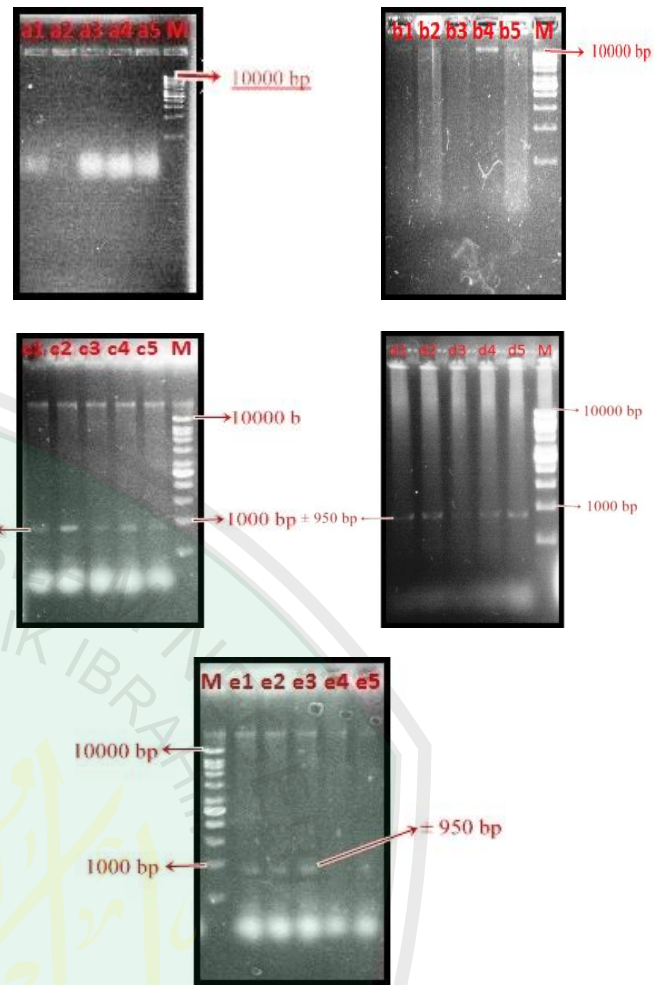
DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang berukuran sekitar 12000 bp menunjukkan materi genetik (DNA inti dan DNA mitokondria) yang terdapat di dalam udang jari (*Metapenaeus elegans*). DNA inti (nukleus) berperan sebagai materi genetik yang diwariskan dari kedua orang tua dan mengatur segala sel. Sedangkan DNA mitokondria berperan menyandi kompleks protein tertentu yang sangat diperlukan untuk produksi ATP dalam tubuh (Susminarsih, 2010). Ukuran DNA total pada udang jari (*Metapenaeus elegans*) berukuran 12000 bp lebih rendah dibandingkan dengan ukuran DNA total pada udang yang lain, seperti udang galah dan udang vanname. Pada udang galah (*Marchobranchium rosenbergii*) memiliki DNA total dengan ukuran lebih dari 15.000 bp (Mandayasa, 2007), udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) memiliki DNA total

dengan ukuran 10.000-13.000 bp (Annisa, 2008).

Optimasi Amplifikasi PCR DNA daerah kotrol DNA udang jari (*Metapanaeus elegans*) menggunakan primer COIL dan COIH.

PCR atau reaksi polimerase berantai merupakan cara untuk mengamplifikasi (melipat gandakan) suatu fragmen DNA secara *in vitro* dengan menggunakan suatu primer tertentu (Taylor *et al.*, 1995). Produk PCR yang akan diamplifikasi berasal dari hasil ekstraksi DNA total dan telah memiliki nilai kuantitas DNA total yang berasal dari pengamatan spektrofotometer. Pada penelitian ini amplifikasi PCR mtDNA udang jari (*Metapanaeus elegans*) menggunakan primer COIL (5'-TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA-3') dan COIH (5'-ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA-3'). Primer COIL mempunyai 20 panjang basa, sedangkan primer COIH mempunyai 21 panjang basa (Williams dan Benzie, 1997). Primer COI (Cytochrome *c* oxydase subunit I) merupakan primer universal yang digunakan untuk amplifikasi fragmen gen mitokondria pada daerah sitokrom *c* oksidase yang berperan sebagai gen penyandi protein dalam genom mitokondria hewan (Folmer *et al.*, 1994).

Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu DNA template, primer, *buffer* PCR, MgCl₂, enzim polimerase, suhu, waktu dan jumlah siklus (Sambrook dan Russell, 2001). Optimasi PCR perlu dilakukan terlebih dahulu untuk mendapatkan kondisi PCR yang tepat sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer COIL dan COIH dengan berbagai suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dengan jumlah siklus sebanyak 35, yang dideteksi dengan elektroforesis dalam gel agarose konsentrasi 0,8% dapat dilihat pada Gambar 4.2, elektroforegram yang didapat kemudian dibandingkan antar perlakuan.



Gambar 4.2 Elektroforegram hasil PCR dari ekstraksi DNA genom udang jari (*Metapanaeus elegans*) dengan Primer COIL dan COIH. Keterangan : M (marker); A (suhu *annealing* 41°C), B (suhu *annealing* 42°C), C (suhu *annealing* 43°C), D (suhu *annealing* 44°C), E (suhu *annealing* 45°C); nomor sampel (a1-5, b1-5, c1-5, d1-5, e1-5)

Gambar A dengan suhu *annealing* 41°C dan B dengan suhu *annealing* 42°C tidak terbentuk pita, hal ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* ini kurang sesuai dengan primer yang diberikan sehingga proses amplifikasi PCR tidak berhasil dilakukan disebabkan oleh terlalu rendah suhu *annealing* sehingga proses penempelan primer menjadi sulit. Hsu *et al* (1996) menyatakan bahwa suhu penempelan primer tidak melebihi atau kurang dari suhu diasosiasi primer tersebut,

dengan tidak menempelnya primer maka enzim polimerase tidak bisa mengkatalis pemasangan basa nitrogen komplemen yang ada dalam reagen ke dalam DNA template yang pada akhirnya tidak akan terbentuk DNA baru.

Gambar D memperlihatkan bahwa suhu *annealing* dengan suhu 44°C dapat mengamplifikasi DNA pada sample d1, d2, d4 dan d5, dimana pada suhu ini terlihat bahwa ketebalan pita yang terbentuk relatif sama, sedangkan pada sampel d3 pita yang terbentuk sangat tipis, hal ini menunjukkan bahwa kurangnya kehomogenan DNA yang terambil pada saat proses PCR. Intensitas pita yang semakin meningkat berarti bahwa kuantitas DNA yang terbentuk menjadi lebih banyak serta terbentuknya *smear* yang sangat tipis juga menandakan bahwa DNA non target pada suhu *annealing* 44°C yang terbentuk lebih sedikit dibandingkan dengan suhu 43°C dan 45°C.

Keadaan yang demikian ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang diberikan sesuai untuk primer yang digunakan yang memiliki suhu disosiasi (*melting temperature*) sebesar 48,8°C untuk primer *forward* dan 47,4°C untuk primer *reverse*, berarti bahwa suhu ini tidak terlalu tinggi dan tidak terlalu rendah, sehingga untuk memperoleh DNA dalam jumlah banyak dengan spesifisitas tinggi sangat besar. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan Erlich (1989) bahwa untuk meningkatkan spesifisitas DNA hasil PCR bisa dilakukan salah satunya dengan cara meningkatkan suhu *annealing*-nya.

Hasil elektroforesis pada gambar C dan E memiliki ketebalan pita yang terbentuk sangat tipis, hal ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang kurang sesuai dengan primer yang diberikan sehingga proses amplifikasi sedikit terhambat serta adanya *smear* yang tebal berarti bahwa ada DNA non target yang terbentuk. Erlich (1989) menyatakan bahwa untuk mengatasi masalah adanya DNA non target yang

ditunjukkan dengan adanya fragmen tambahan yang berbeda ukurannya dengan fragmen DNA target dan sering kali fragmennya lebih besar dari fragmen DNA target diantaranya melalui peningkatan suhu *annealing* dan menggunakan primer yang lebih panjang sehingga dengan panjangnya primer spesifisitasnya cukup baik.

Berdasarkan amplifikasi PCR mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang terlihat pada Gambar C, D dan E, menunjukkan amplifikasi PCR mtDNA menggunakan primer COIL dan COIH menghasilkan pita tunggal mtDNA yang terletak pada ukuran sekitar 950 bp. Dari 5 sampel DNA total udang jari (*Metapenaeus elegans*) pada masing-masing gambar dengan suhu berbeda yang berhasil diekstraksi dan dispektrofometer, semua sampel menghasilkan produk PCR dengan ketebalan pita yang berbeda-beda. Dari ketebalan pita yang terbentuk, terlihat bahwa gambar C sampel 2 dan 4, gambar D sampel 1, 2, 4 dan 5, gambar E sampel 1, 2 dan 3 memiliki ketebalan pita yang lebih tebal dibandingkan dengan sampel yang lain. Ketebalan pita yang sama menunjukkan bahwa kehomogenan DNA yang relatif sama dan adanya *smear* juga masih terlihat pada sampel. Wahyudi (2007) menjelaskan hal ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi masih bisa berlangsung baik, namun diikuti dengan terbentuknya DNA non target yang tidak diinginkan yang ditunjukkan oleh *smear* yang terbentuk.

Panjang genom mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang teramplifikasi menghasilkan pita tunggal daerah kontrol (D-loop) mtDNA dengan ukuran 950 bp. Ukuran tersebut relatif sama dengan ukuran daerah kontrol (D-loop) mtDNA pada jenis udang yang lain. Amplifikasi pada udang Vanname berukuran 600 bp (Annisa, 2008) dan udang galah memiliki panjang susunan basa antara 700-1500 bp

(Mandayasa, 2007). Hal ini sesuai dengan ukuran daerah kontrol (D-loop) mtDNA pada udang dengan genus *Metapenaeus*, yakni berkisar antara 200 – 1.900 bp (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2013). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat keberhasilan amplifikasi dengan suhu *annealing* 44 °C dan menggunakan primer COIL dan COIH berhasil mengamplifikasi daerah kontrol (D-loop) pada udang jari (*Metapenaeus elegans*).

Irmawati (2003) menjelaskan bahwa keberhasilan penggandaan DNA tergantung pada konsentrasi dan kemurnian sampel DNA, *Taq* polimerase, ukuran panjang primer, komposisi primer dan tingkat homologi primer dengan DNA target, sehingga faktor-faktor tersebut harus dikontrol secara hati-hati. Fatchiyah *et al.*, (2011) menambahkan bahwa kemurnian DNA target sangat penting karena ketidakmurnian suspensi DNA dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase. Meskipun demikian, pada kondisi tertentu, amplifikasi PCR masih dapat bekerja dalam suspensi kasar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ada pengaruh suhu *annealing* pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah.
2. Suhu *annealing* yang berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah adalah suhu 44 °C yang menghasilkan pita tunggal mtDNA yang terletak pada 950 bp, selain itu hasil penelitian menunjukkan kadar kemurnian DNA pada absorbansi $A_{260/280}$ berkisar antara 1,65-2,07

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dengan DNA total Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) yang didapatkan berukuran 12000 bp.

SARAN

1. Hasil optimasi suhu *annealing* pada penelitian ini mendapatkan hasil yang optimal, namun masih diperlukan optimasi lebih lanjut pada faktor lain yang mempengaruhi proses amplifikasi, antara lain optimasi templat DNA, waktu amplifikasi dan jumlah siklus pada proses amplifikasi PCR dengan primer COIL dan COIH, sehingga diperoleh hasil DNA yang lebih banyak dan terjamin spesifitasnya.
2. Sebaiknya menggunakan DNA leader (marker) lebih dari 10000 bp untuk mengetahui ukuran DNA genom Udang Jari (*Metapenaeus elegans*).

DAFTAR PUSTAKA

- Annisa, D. 2008. Studi Karakteristik Genetik Populasi Induk Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) F1 dan F2 Asal Hawaii Berdasar Metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Skripsi. Malang: Universitas Brawijaya.
- Dudley RG. 2000. Segara Anakan Fisheries Management Plan. Specialist Fisheries Consultant Report. BCEOM-DITJEN BANGDA, Jakarta.
- ECI (Engineering Consultant Inc) – Asian Development Bank. 1994. Segara Anakan Conservation And Development Project. Final Report. Jakarta.
- Erlich, H.A. 1989. PCR Teknologi : Principles and Application for DNA Amplification. USA.
- Fatchiyah, Estri Laras A, Sri Widayarti dan Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Folmer O, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome COxidase Subunit I

- from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3 (5). 294-299.
- Hidayat, Ahmad. 2007. Keragaman Genetik Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Berdasarkan Karakter Morfometrik di Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah. *Skripsi*. Bogor: IPB.
- Hsu, J.T., S. Das dan M. Satish. 1996. Polymerase Chain Reaction Engineering. Bhiopharmacertical Thecnology Institute. Department of Chemical Engineering. Bethlehem: Lehigh University.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. *Thesis*. Bogor: IPB.
- Mandayasa, I Wayan Gede. 2007. Studi Keragaman Genetik Populasi Udang Galah (*Marcobrachium rosenbergii*) Berdasarkan Polimorfisme Mitokondria DNA. *Skripsi*. Bogor: IPB.
- Muladno, 2010. *Teknologi Rekayasa Genetik Edisi Kedua*. Bogor : IPB Press.
- NCBI (=National Center for Biotechnology Bioinformatics). 2013. The BLAST sequence analysis tool : 1 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>, 15 November 2013, pk. 20.15.
- Nugroho, E. 1997. Practical Manual on Detection of DNA Polymorphisme in Fish Population Study. In: Bulletin of Marine Science and Fisheries No. 17/1997. Pp, 109-129. Kochi University, Japan.
- Rybicky, E.P. 1996. PCR Primer Design and Reaction Optimisation. In Molecular Biology Techniques Manual. Ed. V.E. Coyne, M.D. James, S.J. Reid & E.P.Rybicki. Dept.of Microbiology. Univ. Cape Town.
- Sambrook, Joseph and David W. Russell. 2001. *Molecular Clonning: A Laboratory Manual*. 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1&2.
- Saputra, Suradi Wijaya. 2005. Dinamika Populasi Udang Jari (*Metapenaeus elegans* de Man 1907) Dan Pengolaannya di Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah. *Skripsi*. Bogor: IPB.
- Saputra, Suradi Wijaya. 2008. Distribusi dan Ruaya Udang Jari (*Metapenaeus elegans* de Man 1907) di Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah. *Jurnal Saintek Perikanan*. Vol. 3(2): 1-8.
- Susminarsih, T. 2010. Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*. Vol 2(2): 178-184.
- Tamayo, Roman J. Machado. 2006. Assessment of Genetic Variability in Two Lots of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Introduce to Cuba. Norway : University of Tromso.
- Taylor, G. R, M. J. McPherson, B. D. Hames. 1995. *PCR 2: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Wahyudi, Tri Harsono. 2007. Pengaruh Suhu Annealing dan Jumlah Siklus yang Berbeda Pada Program PCR Terhadap Keberhailan Iolasi dan Amplifikasi mtDNA Ikan Patin (*Pangasius hypothalmus*). *Skripsi*. Bogor: ITB.
- Warintek. 2003. Udang (Penaeidae). [www.warintek. Progression.or.id / perikanan/ udang.html](http://www.warintek.progression.or.id/perikanan/udang.html)
- Williams ST, JAH Benzie. 1997. Indo-West Pacific Patterns of Genetic Differntiation in High-Dispersal Starfish *Linckialaevegata*. *Mol. Ecol*. 6: 559-573.