

**IDENTIFIKASI POLA HAPLOTIPE DNA MITOKONDRIA UDANG JARI
(*Metapenaeus elegans*) SEGARA ANAKAN KABUPATEN CILACAP JAWA
TENGAH MENGGUNAKAN ENZIM RESTRIKSI *HindIII***

Fitra Arya DN. (10620024)

Pembimbing Biologi: Kholifah Holil, M.Si

Pembimbing Agama: Umayyatus Syarifah, M.A

Abstrak

Kerusakan ekosistem di Segara Anakan, Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah serta eksploitasi yang berlebihan dan terus menerus menimbulkan permasalahan pada kelestarian sumberdaya udang Jari. Informasi genetik udang Jari sangat diperlukan dalam rangka menjaga kelestarian plasma nutfah udang Jari di alam. Salah satu cara untuk memperoleh informasi genetik udang Jari adalah dengan mengidentifikasi pola haplotipe DNA mitokondria menggunakan enzim restriksi *HindIII*. DNA mitokondria hanya diturunkan dari induk betina dan memiliki variasi yang tinggi. Enzim restriksi *HindIII* telah digunakan dalam penelitian Klinbunga *dkk* (1998) dan memotong banyak fragmen pada udang penaeidae. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah dan ukuran fragmen serta pola haplotipe DNA mitokondria yang dipotong oleh enzim restriksi *HindIII*.

Jenis penelitian ini adalah deskriptif. Sampel yang digunakan adalah 7 individu udang Jari dari hasil tangkapan di Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah. Isolasi DNA dilakukan pada bagian kaki jalan dan ekor, amplifikasi menggunakan primer COIL dan COIH. Parameter penelitian ini adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$), kemurnian ($A_{260/280}$) dan ukuran (bp) DNA genom hasil isolasi, ukuran (bp) DNA mitokondria hasil amplifikasi, ukuran (bp) dan pola haplotipe DNA mitokondria hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi *HindIII*.

Hasil penelitian ini menunjukkan konsentrasi DNA genom hasil isolasi antara 1,85 $\mu\text{g/ml}$ – 8,23 $\mu\text{g/ml}$, kemurnian antara 1,30 – 1,95 dan ukuran DNA genom hasil isolasi lebih dari 10.000 bp. DNA mitokondria yang teramplifikasi menggunakan primer COIL dan COIH berukuran 950 bp. Pemotongan dengan enzim restriksi *HindIII* pada hasil amplifikasi diperoleh 4 pita berukuran 114 bp, 200 bp, 250 bp dan 386 bp yang membentuk pola haplotipe monomorfik.

Kata Kunci : Pola Haplotipe, DNA Mitokondria, Udang Jari (*Metapenaeus elegans*), Enzim restriksi *HindIII*.

PENDAHULUAN

Segara Anakan merupakan suatu ekosistem unik yang berfungsi sebagai tempat habitat berbagai macam spesies. Namun, perubahan kondisi ekosistem seperti pendangkalan dan penyempitan Segara Anakan, kerusakan hutan mangrove, pembangunan desa telah mengancam kelestarian sumberdaya hayati di kawasan Segara Anakan. (Kompas,

2013; Hidayat, 2007; Balai Data dan Informasi SDA Jawa Barat, 2010; Atmaja, 2010; Dudley, 2000a). Berdasarkan hasil penelitian Dudley (2000a, 2000b), udang Jari merupakan jenis udang yang paling banyak ditangkap diperairan Segara Anakan yaitu sebanyak 51% dari total udang yang tertangkap.

Informasi genetik sangat penting untuk menjaga kelestarian sumberdaya

udang Jari. Salah satu cara mendapatkan informasi genetik udang Jari adalah dengan mengidentifikasi pola haplotipe DNA mitokondria dengan enzim restriksi *HindIII*.

DNA mitokondria hanya diwariskan oleh induk betina, memiliki laju mutasi yang tinggi, memiliki salinan per sel dalam jumlah banyak dan relatif berukuran kecil, sehingga sangat relevan dan cocok untuk dijadikan objek penelitian yang mengarah pada kelestarian suatu spesies di alam.

Informasi sekuens DNA udang Jari belum tersedia di berbagai situs penyedia sekuens DNA, sehingga acuan pemilihan enzim restriksi adalah pada penelitian sebelumnya. Penelitian Klinbunga (1998) menggunakan enzim restriksi *HindIII* pada udang Windu (*Penaeus monodon*) menghasilkan pola pemotongan paling banyak dibandingkan dengan enzim restriksi yang lainnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah dan ukuran fragmen DNA mitokondria udang Jari yang dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* dan mengetahui pola haplotipe yang dihasilkan.

METODE PENELITIAN

Isolasi DNA dilakukan pada kaki jalan dan ekor menggunakan metode Tamayo (2006) yang dimodifikasi. Amplifikasi dengan primer COIL-COIH sebanyak 35 siklus yaitu: 1 siklus predenaturasi pada suhu 94° C selama 3 menit, 35 siklus denaturasi pada suhu 94° C selama 20 detik, penempelan pada suhu 44° C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72° C selama 90 detik dan 1 siklus pemanjangan akhir pada suhu 72° C selama 7 menit. Pemotongan dengan enzim restriksi *Hind III* dilakukan dengan

volume total 50 µl terdiri dari 40,75 µl ddH₂O, 5 µl RE 10X buffer, 0,5 µl Acetylated BSA 10µg/µl, 2,5 µl DNA 1µg/µl dan 1,25 µl enzim restriksi *HindIII* 10U/µl, diinkubasi pada suhu 37° C selama 4 jam. Elektroforesis hasil isolasi pada gel 0,8%, hasil amplifikasi pada gel 1% dan hasil pemotongan enzim restriksi pada gel 2%.

Data yang didapatkan berupa: ukuran, konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi; ukuran DNA mitokondria hasil amplifikasi; ukuran, jumlah fragmen dan pola haplotipe DNA miokondria yang dipotong dengan enzim restriksi *HindIII*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi dan Kemurnian DNA Hasil Isolasi

Tabel 4.1 Nilai kuantitas DNA genom udang Jari hasil isolasi menggunakan spektrofotometer

Sampel	Konsentrasi DNA (µg/ml)	Kemurnian DNA (A260/A280)
1	3,12	1,83
2	1,85	1,48
3	3,02	1,84
4	3,80	1,30
5	8,23	1,79
6	3,80	1,95
7	1,93	1,82

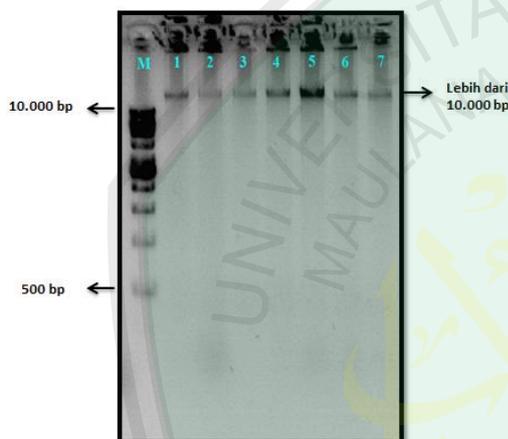
Berdasarkan tabel 4.1 di atas, sampel dengan konsentrasi tertinggi adalah sampel 5 dan terendah pada sampel 2. Sampel yang tidak murni adalah sampel nomor 2 dan 4.

Tinggi rendahnya konsentrasi isolat DNA dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah suhu inkubasi saat proses pemecahan sel dan jaringan, serta lama inkubasi. Jika, suhu terlalu tinggi dan terlalu lama dapat menyebabkan degradasi DNA, jika terlalu rendah *buffer lysis* tidak dapat bekerja secara optimal. Suhu dan lama inkubasi harus dikombinasikan secara tepat agar

konsentrasi yang didapatkan sesuai dengan harapan.

Kemurnian DNA hasil isolasi yang baik adalah antara 1,8-2,0 (Sambrook dan Russell, 2001). Kemurnian DNA isolat dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah kesterilan alat dan bahan, pemisahan supernatan dari debris sel dan pengeringan DNA berupa pelet setelah langkah purifikasi.

DNA Genom Udang Jari



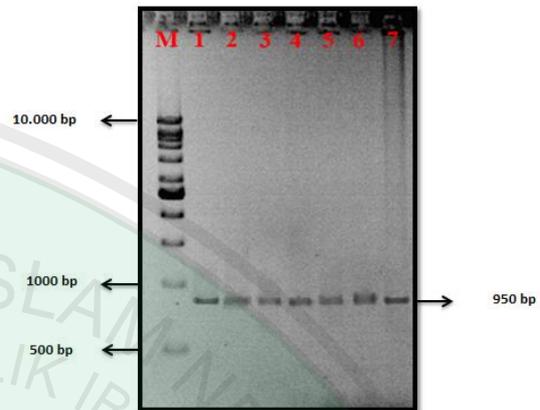
Gambar 4.1 Visualisasi DNA genom udang Jari hasil isolasi. M = DNA marker 1 kb (Vivantis); 1 = sampel dari individu 1; 2 = sampel dari individu 2; 3 = sampel dari individu 3; 4 = sampel dari individu 4; 5 = sampel dari individu 5; 6 = sampel dari individu 6; 7 = sampel dari individu 7.

Berdasarkan gambar 4.1 di atas, kualitas pita pada sampel 1, 4, 5, 6 lebih terang dari pada sampel 2, 4 dan 7. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi DNA yang didapatkan (Lihat tabel 4.1) (Sambrook dan Russell, 2001).

DNA genom udang Jari pada gambar 4.1 berukuran lebih dari 10.000 bp. Rata-rata ukuran DNA mitokondria udang melebihi 10.000 bp, seperti pada udang *Litopenaeus vannamei* dan *Fenneropenaeus chinensis* berukuran 15.989 bp dan 16.004 bp (Shen dkk, 2007), *Triops cancriformis* berukuran 15.101 bp (Umetsu dkk, 2002), *Penaeus monodon* berukuran 15.984 bp (Wilson

dkk, 2000), dan *Pandalus borealis* berukuran 15.905 bp (Viker dkk, 2006).

Amplifikasi Daerah Kontrol DNA Mitokondria



Gambar 4.2 Visualisasi hasil amplifikasi menggunakan primer COIL dan COIH dengan mesin PCR. M = DNA marker 1 kb (Vivantis); 1 = sampel dari individu 1; 2 = sampel dari individu 2; 3 = sampel dari individu 3; 4 = sampel dari individu 4; 5 = sampel dari individu 5; 6 = sampel dari individu 6; 7 = sampel dari individu 7.

Penelitian ini menggunakan primer universal COIL (5' TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA 3') dan COIH (5' ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA 3') untuk mengamplifikasi daerah kontrol pada DNA mitokondria. DNA yang teramplifikasi berukuran 950 bp (**Gambar 4.2**). Beberapa penelitian telah mengungkapkan ukuran DNA udang genus *Metapenaeus* yang telah diamplifikasi menggunakan primer universal COI. Pada udang *M. affinis* (213-847 bp), *M. dobsoni* (590-598 bp), *M. dobsoni* (628 bp), *M. moyebi* (847 bp), *M. joyneri* (847 bp), *M. ensis* (847 bp) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

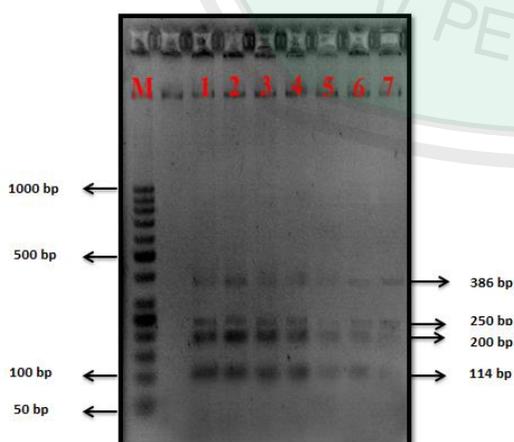
Berdasarkan data di atas (gambar 4.2), ukuran DNA mitokondria daerah kontrol yang teramplifikasi pada udang Jari lebih besar dari udang yang lainnya. Perbedaan ukuran DNA hasil amplifikasi pada daerah kontrol tidak menggambarkan berapa banyak produk yang disintesis melalui daerah kontrol tersebut, karena

daerah kontrol mitokondria merupakan daerah bukan pengkode protein dan tersusun atas urutan DNA yang berulang-ulang (repetitif) (Campbell, 2010).

DNA repetitif terdistribusi secara luas dalam tingkatan *family*, *genus*, ataupun yang lebih spesifik pada tingkat spesies dan kromosom, memiliki skala variasi yang besar akibat skala evolusi yang terjadi sehingga menjadikan DNA repetitif sebagai kajian-kajian studi taksonomi (Rao *dkk*, 2010). DNA repetitif juga telah digunakan secara luas untuk mempelajari genom dan hubungan kekerabatan spesies-spesies (Katsios *dkk*, 2000; Kamm *dkk*, 1995).

Selain itu, DNA repetitif memberikan informasi tentang keragaman genetik populasi di alam. Urutan DNA yang berulang-ulang tersebut memberikan keuntungan dalam menganalisa keragaman menggunakan metode RFLP. Pola-pola pemotongan dan jumlah haplotipe yang didapatkan dapat memberikan informasi yang akurat mengenai keragaman.

Pola Haplotipe DNA Mitokondria Menggunakan Enzim Restriksi *HindIII*



Gambar 4.3 Visualisasi hasil pemotongan daerah kontrol mtDNA menggunakan enzim restriksi *HindIII*. M = DNA marker 1000 bp (Intron); 1 = sampel dari individu 1; 2 = sampel dari individu 2; 3 = sampel dari individu 3; 4 = sampel dari individu 4; 5 = sampel dari individu 5; 6 = sampel dari individu 6; 7 = sampel dari individu 7.

Berdasarkan gambar 4.3 DNA mitokondria yang dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* menjadi 4 pita yang berukuran 114 bp, 200 bp, 250 bp dan 386 bp pada semua sampel, sehingga digolongkan kedalam pola haplotipe monomorfik.

Pola monomorfik menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji mempunyai situs restriksi pada posisi yang sama (Kevles dan Hood, 1993). Pola monomorfik menunjukkan kemungkinan homozigositas alel-alel pada situs yang dikenali oleh enzim restriksi (Campbell, 2010).

Homozigositas di dalam suatu populasi berhubungan dengan kualitas genetik dari populasi tersebut. Homozigositas menunjukkan rendahnya variasi urutan DNA yang dimiliki yang juga menunjukkan kemungkinan sedikit variasi gen yang dimiliki dan ini dapat berdampak buruk ketika terjadi perubahan-perubahan lingkungan. Homozigositas dapat memberikan dampak yang buruk bagi kelangsungan hidup populasi jangka panjang. Namun, homozigositas dalam populasi menandakan bahwa ada sifat khusus dari populasi tersebut yang menyebabkan individu dari populasi mampu bertahan dari seleksi alam yang telah terjadi.

Sebaliknya heterozigositas menunjukkan kemampuan adaptasi yang baik. Hal itu dikarenakan semakin beragamnya gen yang dimiliki oleh individu-individu di dalam populasi, sehingga dengan dimilikinya berbagai macam gen maka berbagai perubahan lingkungan yang terjadi akan dapat direspon lebih baik (Fahri, 2002).

Homozigositas dan heterozigositas dapat dijadikan informasi keragaman genetik suatu populasi. Namun, penggambaran keragaman genetik suatu

populasi tidak dapat dilakukan hanya dengan menggunakan satu enzim restriksi saja, karena satu enzim restriksi masih terlalu sempit untuk menggambarkan keragaman genetik dari sekian banyak individu dari populasi. Jumlah enzim restriksi yang pernah digunakan untuk mempelajari keragaman genetik adalah 4 enzim (Tarwinangsih *dkk*, 2011), 5 enzim (Klinbunga *dkk*, 1998; Lestary, 2001; Amelia, 2005), 6 enzim (Sartika *dkk*, 2000). Penelitian ini telah menambah jumlah enzim restriksi yang dipakai untuk memotong DNA mitokondria udang Jari Segara Anakan, menjadi 2 enzim.

Pemotongan daerah kontrol DNA mitokondria udang Jari Segara Anakan Kabupaten Cilacap dengan enzim *NlaIII* pada penelitian Suhartini (2014) menghasilkan pola polimorfik. Pola A (97 bp), pola B (198 bp + 200 bp) dan pola C (97 bp + 198 bp, 200 bp). Dengan demikian, DNA mitokondria udang Jari Segara Anakan yang dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* dan *NlaIII* menghasilkan 4 pola haplotipe.

Informasi-informasi molekuler terkait DNA udang Jari sangat diperlukan dalam rangka menjaga kelestarian sumber daya udang Jari. Untuk merancang program pemuliaan dan pembudidayaan, maka informasi tentang keragaman (polimorfisme) dengan metode marka DNA sangat diperlukan. Polimorfisme merupakan suatu informasi penting yang dapat digunakan untuk mengevaluasi *fitness* individu untuk jangka pendek dan kelangsungan hidup suatu populasi untuk jangka panjang.

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan:

1. Jumlah fragmen DNA mitokondria udang Jari Segara Anakan Kabupaten Cilacap Jawa Tengah yang dipotong oleh enzim restriksi adalah empat fragmen. Empat fragmen tersebut berukuran 114 bp, 200 bp, 250 bp dan 386 bp.
2. Pola haplotipe DNA mitokondria udang Jari Segara Anakan kabupaten Cilacap Jawa Tengah dengan menggunakan enzim restriksi *HindIII* adalah monomorfik.

Saran

1. Perlu digunakan marker dengan ukuran lebih dari 10.000 bp untuk mengukur DNA genom yang didapatkan dari hasil isolasi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pola pemotongan DNA udang Jari dengan menggunakan enzim restriksi yang lainnya sehingga informasi-informasi genetik yang didapatkan lebih banyak.
3. Perlu dilakukan *sequencing* untuk mengetahui urutan DNA mitokondria udang Jari yang telah dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, Evi Rizky. 2005. Analisis Keragaman Genetik Labi-Labi (*Amyda cartilaginea*) Berdasarkan Genom Mitokondria. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Atmaja, Suherman Banon. 2010. *Dampak Krisis Habitat Terhadap Perikanan Tangkap: Kasus Perairan Segara Anakan*,

- Cilacap. Laporan Akhir. Jakarta: Balai Riset Perikanan Laut.
- Balai Data dan Informasi SDA Jawa Barat. 2010. *Konservasi dan Pengendalian Daya Rusak Laguna Segara Anakan*. Bandung: Dinas PSDA.
- Campbell, N.A., dan J. B. Reece. 2010. *Biologi*. Terj. Dari *Biology*, oleh Damaring Tyas Wulandari. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Dudley, Richard G. 2000a. *Segara Anakan Conservation and Development Project Components*. Consultant's report.
- Dudley, Richard G. 2000b. *Summary of data Related to Segara Anakan Fish and Shrimps Catches*.
- Hidayat, Ahmad. 2007. Keragaman Genetik Udan Jari (*Metapenaeus elegans* de Man 1907) Berdasarkan Karakter Morfometrik Di Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kamm, A., Galasso, I., Schmidt, T., Heslop-Harrison, J. S. 1995. Analysis of a repetitive DNA family *Arabidopsis arenosa* and relationship between *Arabidopsis* species. *Plant Molecular Biology*. Vol. 27.
- Katsiotis, A., Loukas, M., Heslop-Harrison, J. S. 2000. Repetitive DNA, genome and species relationship in *Avena* and *Arrhenatherum* (Poaceae). *Annals of Botany*. Vol. 86
- Kevles, Daniel J., dan Hood, Lerot. 1993. *The Code of Codes*. USA: First Harvard University Press.
- Klinbunga, S., Penman, D. J., McAndrew, B. J., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. 1998. Genetic Variation, Population Differentiation and Gene Flow of the Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Inferred from mtDNA-RFLP Data. *Advanced in Shrimp Biotechnology*.
- Kompas. 2013. Segara Anakan Kritis, <http://nasional.kompas.com/read/2013/04/18/0401249/about.htm> 1. (Diakses pada tanggal 23 April 2014).
- NCBI (National Center for Biotechnology Bioinformation). 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>, 20 Oktober 2014, pk. 09.00.
- Rao, Satyawada Rama., Trivedi, Sema., Emmanuel, Deepika., Merita, Keisham., Hynniewta, Marlykynti. 2010. DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review. *Journal of Cell and Molecular Biology*. Vol. 7 (2) dan 8 (1).
- Sambrook, J dan Rusell, David. 2001. *Molecular Cloning* Third Edition. New York: CSHL Press.

- Sartika, Tike., Duryadi, D., Mansjoer S.S., Gunawan, B. 2000. Keragaman Genetik Ayam Kampung Berdasarkan Analisis Penanda Daerah D-loop Mitokondria DNA. *JITV*. Volume 5 Nomor 2.
- Shen, X., Ren, J., Cui, Z., Sha, Z., Wang, B., Xiang, J., Liu, B. 2007. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. *Gene*. Vol. 403.
- Suhartini, Nur. 2014. Karakterisasi Genetik Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Hasil Tangkapan Dari Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah Berdasarkan haplotipe DNA Mitokondria Dengan Menggunakan Metode PCR-RFLP. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.
- Tamayo, Roman J. 2006. Assesment of Genetic Variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. *Thesis*. Norway: University of Tromso.
- Tarwinangsih, A. Farajallah, C. Sumantri dan E. Andreas. 2011. Analisis keragaman genetik kerbau lokal (*Bubalus bubalis*) berdasarkan haplotipe DNA mitokondria. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan veteriner*.
- Umetsu, K., Iwabuchi, N., Yuasa, I., Saitou, N., Clark, P. F., Boxshall, G., Osawa, M., Igarashi, K. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of a tadpole shrimp (*Triops cancriformis*) and analysis of museum samples. *Electrophoresis*. Vol. 23.
- Viker, S., Klingberg, A. N., Sundberg, P. 2006. The complete mtDNA sequence of the northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Jurnal of Crust. Biol.* Vol. 26 No. 3.
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E., Benzie, J. 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon* : are malacostracan crustacean more closely related to insects than to branchiopods. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 17 No. 6.