

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Kuantitas dan Kualitas DNA Udang Jari Hasil Isolasi

Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam analisis molekuler yang berbasis DNA. Tahapan ini sangat berperan penting dalam menjamin keberhasilan suatu penelitian. Jika proses isolasi tidak optimal dan tidak mendapatkan DNA dengan kuantitas dan kualitas baik, maka dapat dipastikan proses-proses berikutnya seperti amplifikasi dan pemotongan DNA oleh enzim restriksi juga tidak mendapatkan hasil yang baik.

Hasil penelitian identifikasi pola haplotipe DNA mitokondria udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Segara Anakan Kabupaten Cilacap menggunakan enzim restriksi *HindIII* menunjukkan konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan kemurnian DNA (A260/A280) yang berbeda-beda sebagaimana tertera pada **Tabel 4.1** berikut ini.

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

Sampel	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	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 hasil pengukuran nilai kuantitas 7 isolat DNA udang Jari (tabel 4.1), sampel yang mempunyai konsentrasi DNA tertinggi adalah sampel nomor 5 yaitu 8,23  $\mu\text{g/ml}$  dan konsentrasi paling rendah adalah sampel nomor 2, yaitu 1,85  $\mu\text{g/ml}$ . Tinggi atau rendahnya konsentrasi DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi dapat disebabkan oleh beberapa faktor.

Pertama, faktor suhu inkubasi. Sampel yang telah dicampur dengan larutan *lysis buffer* diinkubasi pada suhu tertentu. Larutan tersebut berfungsi untuk menghancurkan jaringan dan membran sel, mengeliminasi kontaminan, sehingga yang didapatkan pada tahapan ini adalah DNA genom yang terdapat dalam sel, yaitu DNA inti dan mitokondria. Jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu tinggi maka dapat merusak DNA, sedangkan jika suhu terlalu rendah maka membran serta jaringan sel tidak dapat hancur. Larutan *lysis buffer* bekerja dengan optimal

pada suhu yang tidak terlalu rendah. Pada penelitian ini suhu inkubasi adalah 50°C.

Kedua, lama waktu inkubasi. Jika terlalu lama diinkubasi maka dapat merusak DNA dan jika terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel. Oleh karena itu, baik suhu dan waktu, kedua-duanya harus diatur dengan sebaik mungkin agar diakhir isolasi didapatkan DNA dalam konsentrasi yang diharapkan. Lama waktu inkubasi pada penelitian ini adalah sekitar 14 – 16 jam. Suhu dan lama waktu inkubasi pada penelitian ini sama seperti yang digunakan oleh Tamayo (2006) untuk mengisolasi DNA udang Vaname (*Litopenaeus vanamei*). Menurut Sari *dkk* (2014) penambahan waktu inkubasi dapat menghasilkan konsentrasi yang tinggi.

Kombinasi pengaturan suhu dan lama inkubasi yang tepat dapat menghasilkan konsentrasi isolat DNA sesuai yang diharapkan, sehingga isolat DNA dapat digunakan untuk melakukan tahapan lanjutan seperti PCR. Namun selain konsentrasi DNA, kemurnian juga merupakan syarat penting agar tahapan PCR dapat berhasil.

Kemurnian DNA merupakan rasio antara A260 dengan A280. Isolat DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/A280 berkisar antara 1,8 sampai 2,0 (Muladno, 2002). Pada penelitian ini sampel-sampel yang memiliki kemurnian diantara 1,8-2,0 adalah sampel nomor 1 (1,8319), 3 (1,8469), 5 (1,7981), 6 (1,9555) dan 7 (1,8245), sedangkan sampel 2 dan 4 memiliki nilai kemurnian lebih kecil dari 1,8 yang mengindikasikan adanya kontaminan pada DNA hasil

isolasi. Kontaminan itu dapat berupa etanol 70% ataupun jumlah DNA terlalu sedikit.

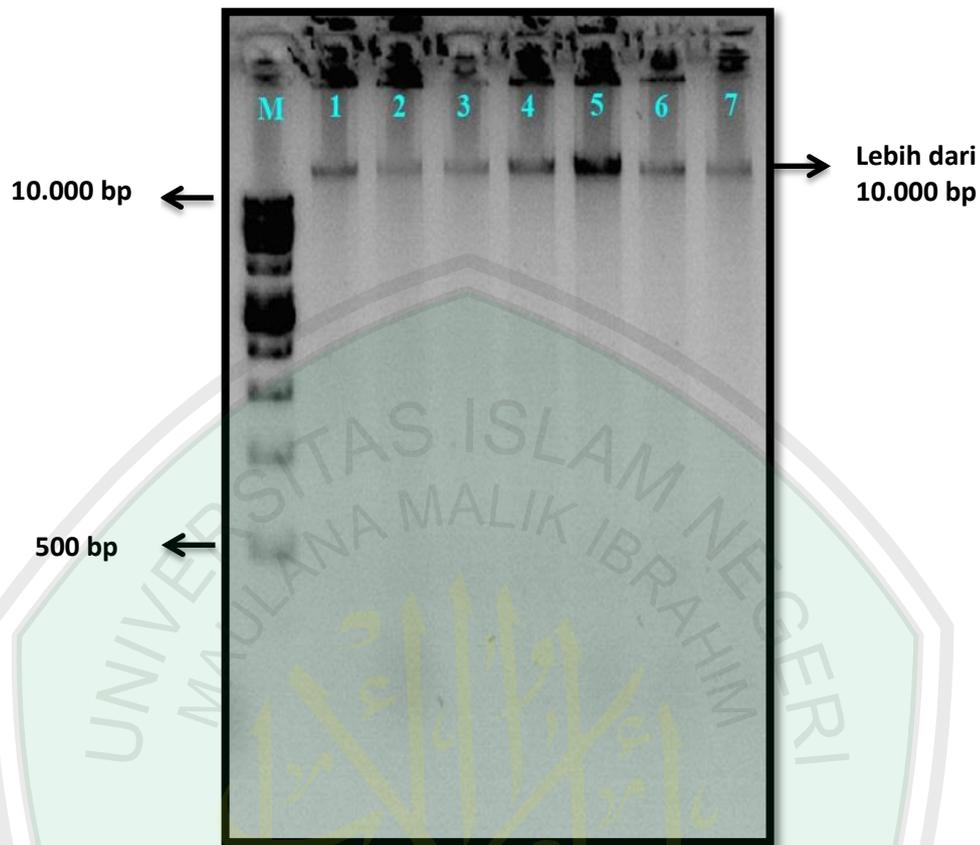
Hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/A280 adalah antara 1,8 sampai 2,0. Jika nilai rasio A260/A280 kurang dari 1,8, maka hal ini menunjukkan bahwa isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika nilai rasio A260/A280 lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya (Sambrook dan Russell, 2001).

Konsentrasi maupun kemurnian DNA yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh faktor teknis selama pengerjaan isolasi DNA, diantaranya adalah faktor pemindahan supernatan yang mengandung DNA setelah diinkubasi ke dalam tabung eppendorf yang baru dan pengeringan isolat. Pemindahan harus dilakukan secara teliti agar jaringan-jaringan yang telah hancur dan berada dibagian bawah tabung tidak ikut terambil, sedangkan pengeringan DNA yang berupa pelet pada tahap akhir isolasi harus benar-benar kering dari larutan sebelumnya yang dipakai untuk purifikasi. Jika pengeringan kurang sempurna, maka larutan purifikasi seperti alkohol atau etanol dapat menurunkan nilai kemurnian DNA pada saat pengukuran pada spektrofotometer. Pengeringan DNA pelet dapat dilakukan menggunakan alat *vacum dryer*, *hair dryer*, inkubasi di dalam *waterbath*, ataupun dikeringkan pada udara terbuka di dalam laboratorium. Selain faktor teknis, faktor alat dan bahan yang digunakan juga akan sangat berpengaruh pada kualitas DNA

yang dihasilkan. Alat-alat seperti tabung eppendorf, tabung PCR, *tips*, harus steril sebelum digunakan untuk mengisolasi DNA.

#### 4.2 DNA Genom Udang Jari

DNA genom adalah DNA yang dimiliki oleh sel dari suatu makhluk hidup (Campbell, 2010), yaitu DNA inti, DNA mitokondria, DNA kloroplas (pada sel tumbuhan) dan DNA plasmid (pada sel bakteri). Masing-masing organisme memiliki ukuran DNA genom yang berbeda-beda. DNA genom yang telah didapatkan melalui proses isolasi pada penelitian ini, selanjutnya divisualisasikan pada gel agarose 0,8% (**gambar 4.1**).



**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.

Kualitas pita DNA yang dihasilkan melalui visualisasi DNA pada gambar 4.1 di atas menunjukkan adanya perbedaan. Pita pada sampel 1, 4, 5, 6 terlihat lebih terang dan tebal dibandingkan pita pada sampel 2, 3 dan 7. Hal tersebut berkaitan dengan konsentrasi DNA yang didapatkan. Semakin tinggi konsentrasi yang didapatkan, maka pita yang terbentuk semakin tebal dan terang (Sambrook dan Russel, 2011). Sampel 1, 4, 5 dan 6 memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel 2, 3 dan 7 (**lihat Tabel 4.1**).

Berdasarkan gambar 4.1, diketahui bahwa DNA genom udang Jari hasil isolasi pada penelitian ini 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). Perbedaan ukuran molekul DNA spesies udang menunjukkan betapa agung-Nya penciptaan Allah SWT. Melalui cara perkawinan yang sama, hidup pada habitat yang relatif sama, memakan makanan yang sama, namun udang memiliki ukuran DNA genom yang berbeda-beda.

Perbedaan ukuran DNA di atas menunjukkan kebesaran penciptaan Allah SWT. Allah SWT telah menjelaskan itu di dalam al-Quran surat al-Furqon (25):2,

الَّذِي لَهُ مَلِكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُن لَّهُ شَرِيكٌ فِي الْمَلِكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: “Yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan-Nya, dan dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat.”(Q.S al-Furqon:2).

Pada surat al-Furqon ayat 2 di atas, Allah SWT telah menetapkan segala sesuatu dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah, berjalan dengan ketentuan-Nya, bukan karena nafsu dan kelalaian (Qurthubi, 2008). Kata كل شيء bermakna bahwa Allah SWT yang menciptakan semua ciptaan, termasuk DNA genom yang terdapat dalam makhluk hidup, kemudian kata فقدره bermakna bahwa Allah SWT menetapkan ukuran-ukuran DNA genom setiap makhluk hidup dengan

sangat tepat (تقديرًا), sehingga semua ciptaan Allah SWT merupakan yang terbaik agar semua sistem dapat berjalan dengan teratur.

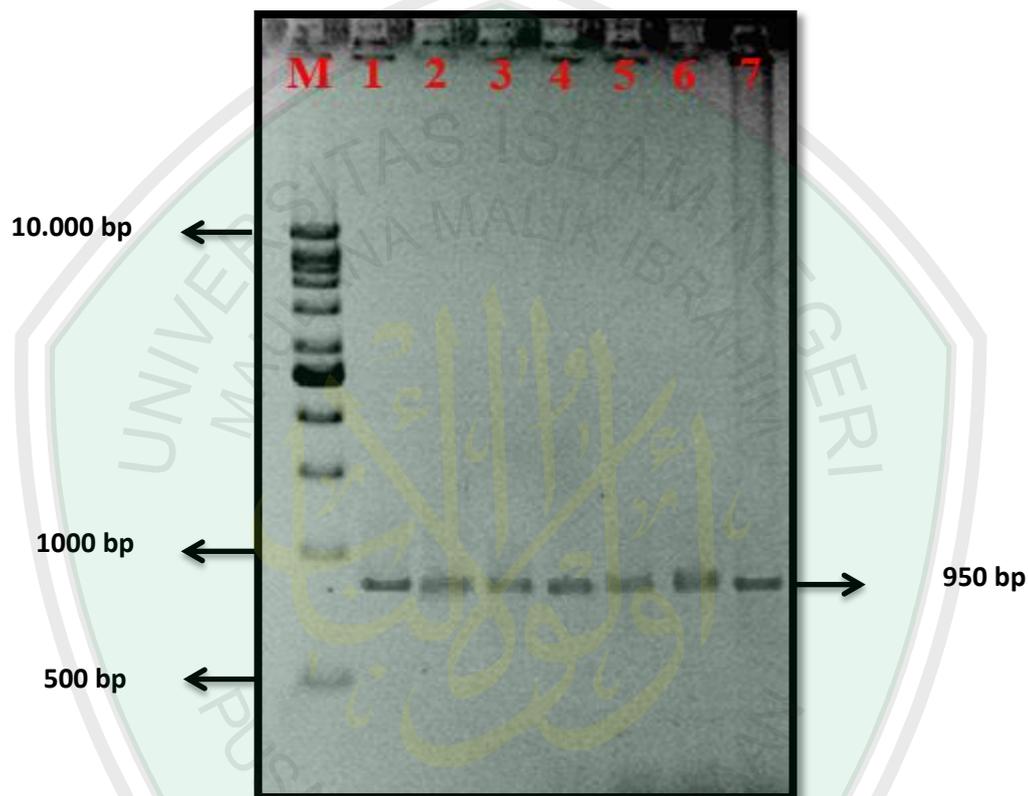
Ukuran DNA yang telah ditetapkan oleh Allah SWT memberikan hikmah tersendiri bagi makhluk hidup. Salah satunya adalah bahwa ukuran DNA pada setiap spesies adalah sama dan secara tidak langsung ukuran DNA telah menjadi penanda bagi suatu spesies. Selain itu, ukuran DNA yang begitu besar dan komponen DNA itu sendiri memberikan keuntungan dalam hal ketahanan hidup suatu populasi. Bukti-bukti ini telah memaparkan secara jelas bahwa Allah SWT benar-benar menetapkan segala ciptaan-Nya secara tepat (تقديرًا).

#### **4.3 Amplifikasi Daerah Kontrol DNA Mitokondria Udang Jari Menggunakan Primer COIL-COIH dengan mesin PCR**

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metode ini dapat meningkatkan jumlah urutan DNA sebanyak ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid untai DNA target dan mengamplifikasi urutan yang diinginkan (Fatchiyah dkk, 2011).

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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



**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.

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).

Daerah kontrol (*control region*) atau dikenal *D-loop* merupakan bagian bukan pengkode protein (*noncoding*). Sebagian besar daerah pada mtDNA eukariot merupakan daerah dengan urutan basa bukan pengkode protein (*noncoding*) dan merupakan DNA repetitif (Campbell, 2010). Pada bagian inilah terdapat daerah *origin of replication* dimana replikasi dimulai. Laju mutasi pada daerah ini diperkirakan sekitar lima kali lebih cepat dibandingkan dengan daerah lainnya (Ferris dan Berg, 1987). Bagian dari DNA yang tidak mengkode ini muncul dalam rangkaian unik yang diulang beratus hingga beribu kali pengulangan (Behrman *dkk*, 1999).

DNA repetitif berperan secara struktural bagi kromosom. Banyak DNA repetitif, terletak pada bagian telomer dan sentromer kromosom. Pada bagian sentromer, DNA repetitif berperan dalam pemisahan kromatid bersaudara dalam proses pembelahan sel. Selain itu, DNA repetitif pada sentromer juga berperan dalam mengatur kromatin pada nukleus saat interfase. Pada bagian telomer, DNA repetitif mengikat protein yang melindungi ujung kromosom dari degradasi, serta mencegah gen hilang ketika DNA memendek setelah satu putaran replikasi (Campbell, 2010).

Allah SWT berfirman di dalam surat al-Anbiyaa (21):16,

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لِعِبِينِ ﴿١٦﴾

Artinya: “Dan tidaklah Kami (Allah) menciptakan langit dan bumi dan segala apa yang ada di antara keduanya dengan bermain-main.” (Q.S al-Anbiyaa: 16)

Berdasarkan surat al-Anbiyaa ayat 16 di atas, bumi dan langit beserta isinya jelas tercipta tidak secara kebetulan. Allah SWT telah menciptakan dengan hikmah, mengatur dengan hikmah dan kesungguhan, bukan dengan main-main (Quthb, 2004). Melalui ayat ini, Allah SWT menunjukkan keseriusan kepada umat manusia bahwa segala yang diciptakan-Nya mempunyai nilai dan hikmah. Termasuk dalam hal menciptakan DNA yang justru sebagian besar daerah urutan DNA merupakan urutan yang berulang-ulang (repetitif) dan tidak mengkode protein. Oleh karena jumlahnya yang begitu besar dalam genom, DNA repetitif disebut sebagai DNA sampah atau DNA parasit. Namun, sebaliknya DNA repetitif merupakan DNA yang mempunyai beberapa peran penting dalam kajian biologi.

Urutan DNA yang berulang-ulang tersebut diciptakan oleh Allah SWT ternyata mempunyai fungsi-fungsi penting di dalam regulasi sel. Shapiro dan Sternberg (2005) menjelaskan bahwa DNA repetitif berperan dalam kegiatan-kegiatan sintesis dalam sel, seperti proses transkripsi dan replikasi DNA. Selain itu, DNA repetitif juga berperan dalam studi-studi konservasi berbasis molekuler.

DNA repetitif terdistribusi secara luas dalam tingkatan *family*, *genus*, ataupun yang lebih spesifik pada tingkat spesies dan kromosom. DNA repetitif juga memiliki skala variasi yang besar akibat skala evolusi yang terjadi. Variasi tersebut 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).

Variasi yang terdapat dalam DNA repetitif selain dapat memberikan informasi taksonomi dan hubungan kekerabatan, juga dapat 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.

Oleh karena itu, ukuran DNA mitokondria yang diperoleh pada penelitian ini cukup menjadi bukti akan kebesaran dan keagungan penciptaan Allah SWT. Bahwa Allah SWT telah menciptakan DNA mitokondria dengan tidak bermain-main (surat al-Anbiyaa:16) dan menetapkan ukuran dengan ukuran yang tepat (surat al-Furqon:2).

#### **4.4 Pola Haplotipe DNA Mitokondria Udang Jari Menggunakan Enzim Restriksi *HindIII***

Pola pemotongan atau haplotipe adalah urutan DNA atau kombinasi alel dari lokus yang berdekatan yang berasal dari kromosom induk. Haplotipe dapat diperoleh dengan memotong fragmen DNA menggunakan enzim restriksi (Tarwinangsih *dkk*, 2011). Analisis dengan menggunakan enzim restriksi biasa disebut dengan analisis RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

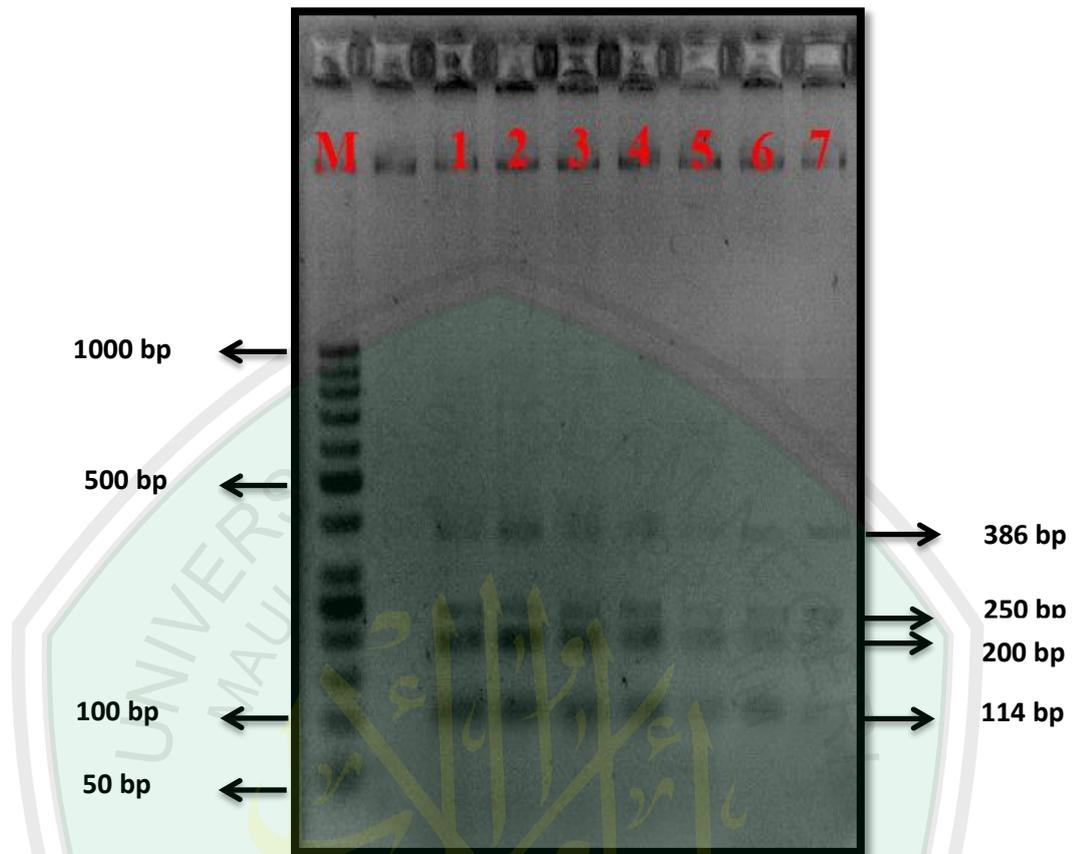
Ciri utama enzim restriksi adalah setiap enzim mengenal urutan spesifik pada molekul DNA yang akan dipotong. Enzim restriksi tertentu akan memotong

pada urutan pengenal dan tidak memotong daerah urutan lainnya (Fatchiyah dkk, 2011).

Hasil pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi dapat berbeda-beda, baik pada spesies yang sama ataupun pada spesies yang berbeda. Perbedaan pola pemotongan tersebut disebabkan oleh perbedaan pada urutan nukleotida masing-masing spesies ataupun individu. Campbell (2010) menyatakan bahwa jika perbedaan nukleotida antara dua alel terjadi dalam situs restriksi, maka akan menghasilkan campuran fragmen yang berbeda dan pola pita tersendiri dalam elektroforesis gel.

Hasil pemotongan daerah kontrol DNA mitokondria udang Jari menggunakan enzim restriksi *HindIII* dilihat menggunakan gel agarose 2%. DNA mitokondria yang teramplifikasi berukuran 950 bp, terpotong menjadi 4 pita yang berukuran 114 bp, 200 bp, 250 bp dan 386 bp pada semua sampel, sehingga digolongkan kedalam pola haplotipe monomorfik (**Gambar 4.3**).

Pada gambar 4.3 tersebut, ada beberapa pita yang terlihat kurang terang yaitu sampel 5 (pita 386 bp, 250 bp), sampel 6 (pita 386 bp), sampel 7 (pita 114 bp). Hal ini disebabkan konsentrasi DNA mitokondria yang dicampurkan dengan enzim restriksi *HindIII* lebih rendah, seperti yang telah dijelaskan bahwa kualitas pita berkaitan dengan konsentrasi DNA pada sub-bab 4.2.



**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.

Pola monomorfik pada gambar 4.3 di atas 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. Homozigositas akibat *inbreeding* harus dicegah karena dapat menurunkan kekebalan tubuh organisme dan kecepatan pertumbuhan (Murtidjo, 2001). 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.