HOMOLOGI FRAGMEN DNA MIOGLOBIN 114PB PADA BEBERAPA IKAN DEMERSAL SEBAGAI DASAR PENGELOMPOKAN HEWAN TOLERAN HIPOKSIA

SKRIPSI

Disusun untuk melengkapi syarat-syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains

Aurora Hadiluhung

3425111433

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA

2017

HOMOLOGI FRAGMEN DNA MIOGLOBIN 114PB PADA BEBERAPA IKAN DEMERSAL SEBAGAI DASAR PENGELOMPOKAN HEWAN TOLERAN HIPOKSIA

Nama : **Aurora Hadiluhung**

No. Reg : **3425111433**

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
PenanggungJawab			
Dekan	: Prof. Dr. Suyono, M.Si NIP. 19671218 199303 1 005	.....	20/2 '17 .....
Wakil Penanggung Jawab			
Pembantu Dekan	: Dr. Muktiningsih, M.Si NIP. 19640511 198903 2 001	.....	20/2 '17 .....
Ketua	: Dr. Elsa Lisanti, M.Si NIP. 19710420 200112 2 002	.....	9/2/17 .....
Sekretaris/Penguji I	:Dr. Yulia Irnidayanti, M.Si NIP. 19650723 200112 2 001	.....	9/2-17 .....
Anggota			
Pembimbing I	: Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed NIP. 19681004 200112 2 001	.....	14/2 2017 .....
Pembimbing II	: Dra. Yulilina Retno D., M.Biomed NIP. 19640701 199703 2 001	.....	18/02. 2017 .....
Penguji II	: Dr. Ratna Komala, M.Si NIP. 19640815 198903 2 002	.....	14/02 2017 .....

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 31 Januari 2017

Scanned by CamScanner

ABSTRAK

Aurora Hadiluhung. Homologi Fragmen DNA Mioglobin 114pb pada Beberapa Ikan Demersal sebagai Dasar Pengelompokan Hewan Toleran Hipoksia. Skripsi. Jakarta: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Jakarta. 2017.

Mioglobin adalah protein globular pembawa oksigen yang bekerja untuk mempermudah difusi oksigen dari sitoplasma ke mitokondria. Mioglobin berfungsi sebagai protein penting bagi hewan untuk menjaga homeostatis oksigen tubuh agar dapat bertahan hidup, terutama dalam kondisi kekurangan oksigen yaitu hewan-hewan yang toleran hipoksia. Mioglobin juga merupakan protein homolog yang dapat dijadikan penanda untuk melihat jarak kedekatan antar spesies dalam pengelompokan hewan toleran hipoksia, salah satu contohnya ialah ikan-ikan demersal. Ikan demersal merupakan ikan yang dapat bertahan hidup di perairan berlumpur yang minim oksigen. Keadaan minim oksigen akan mestimulan gen-gen mioglobin untuk aktif dan melakukan fungsinya. Sehubungan dengan mioglobin yang merupakan protein homolog, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi persentase homologi fragmen DNA mioglobin 114pb pada beberapa ikan demersal yaitu ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur terhadap *Chelonia mydas* sebagai penanda. Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia dan Molekuler Universitas Negeri Jakarta dengan metode isolasi DNA, PCR dan sekuensing. Hasil penelitian menunjukkan persentase homologi cukup tinggi antara keempat jenis ikan dengan fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada Penyu Hijau (*Chelonia mydas)* yaitu sebesar 95% pada ikan Gabus, 93% pada ikan Lele, 91% pada ikan Kerapu Lumpur, dan 88% pada ikan Kakap Merah. Selain itu, pohon filogenetik yang terbentuk menunjukkan bahwa ikan Gabus memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan *Chelonia mydas*.

Kata kunci: *Chelonia mydas*, pohon filogenetik, sekuensing.

ABSTRACT

Aurora Hadiluhung. Homology of Myoglobin DNA Fragment 114bp In Demersal Fishes for Basic as Animal Hypoxia Tolerance Grouping. Undergraduate Thesis. Jakarta: Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science. State University of Jakarta. 2017.

Myoglobin is the oxygen-carrying globular protein that facilitate diffusion of oxygen from the cytoplasm to the mitochondria. it has essential function for animal protein to maintain homeostatis of the body's oxygen in order to survive, especially in conditions of lack of oxygen like animals tolerant to hypoxia. Myoglobin is also the homologous proteins that can be used as a marker to see the genetic relationship between species within the grouping of animals tolerant to hypoxia, and one of them is demersal fish. Demersal fish is a fish that can survive in the muddy waters that lack of oxygen. Lack of oxygen condition will stimulate myoglobin gene to active and do the function. The purpose of this study was to identify the nucleotide composition and percentage homology of DNA fragment myoglobin 114bp at some demersal fish those are *Clarias batrachus*, *Channa striata*, *Epinephelus tauvina,* and *Lutjanus argentimaculatus*. The study was conducted in the laboratory of Biochemistry and Molecular State University of Jakarta with DNA isolation, PCR and sequencing methods. The results obtained nucleotide sequences DNA fragments of myoglobin throughout 114bp of the genome fish *Clarias batrachus*, *Channa striata*, *Epinephelus tauvina,* and *Lutjanus argentimaculatus* and the percentage of homology is quite high with DNA fragments of myoglobin 114bp on a *Chelonia mydas* with a percentage of homology of nucleotides by 95% in *Channa striata*, 93% in *Clarias batrachus,* 91% in *Epinephelus tauvina*, and 88% in *Lutjanus argentimaculatus.* The phylogenetic tree from software *Clustal Omega* shows that *Channa striata* has the closest genetic relationship with *Chelonia mydas.*

Keywords: *Chelonia mydas*, phylogenetic tree, sequencing.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat rahmat serta kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Homologi Fragmen DNA Mioglobin 114pb pada Beberapa Ikan Demersal sebagai Dasar Pengelompokan Hewan Toleran Hipoksia**". Tujuan penulisan skripsi ini untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Sains bagi mahasiswa program S-1 di Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh sebab itu penulis mengharapkan masukan dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

Terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak, sehingga pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya bagi semua pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materil baik langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini hingga selesai, terutama kepada yang penulis hormati:

1. Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed, dan Dra. Yulilina Retno D., M.Biomed, selaku dosen pembimbing skripsi penulis yang telah memfasilitasi penelitian ini, sabar membimbing, memberikan masukan, saran maupun arahan dalam penyusunan skripsi ini.

2. Dr. Yulia Irnidayanti, M.Si, dan Dr. Ratna Komala, M.Si, selaku dosen penguji skripsi penulis yang telah memberikan masukan, kritik dan saran maupun arahan untuk perbaikan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Dr. Reni Indrayanti, M.Si, selaku dosen pembimbing akademik, yang telah membantu selama beberapa tahun perjalanan perkuliahan penulis.
4. Dr. Elsa Lisanti, M.Si, selaku ketua sidang yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memimpin jalannya sidang saya.
5. Teristimewa kepada orang tua penulis Hadi Marminto dan Haryati Harahap yang selalu mendoakan, memberikan motivasi dan pengorbanannya baik dari segi moril dan materi kepada penulis. Teruntuk teman-teman dekat, terima kasih atas dukungan dan doanya.
6. Terima kasih juga kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah membantu penulisan skripsi ini.

.

Jakarta, Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN i

ABSTRAK ii

KATA PENGANTAR iv

DAFTAR ISI vi

DAFTAR GAMBAR ix

DAFTAR TABEL x

DAFTAR LAMPIRAN xi

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang 1

B. Rumusan Masalah 3

C. Tujuan Penelitian 3

D. Manfaat Penelitian 4

BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR

A. Kajian Pustaka 5

1. Mioglobin 5

a. Homologi Mioglobin 7

b. Fragmen DNA Mioglobin 114pb..... 7

2. Teknik Molekuler 8

3. Ikan Demersal 11

a. Ikan Lele (*Clarias batrachus*) 13

b. Ikan Gabus (*Channa striata)* 14

c. Ikan Kakap Merah (*Lutjanus argentimaculatus*) 15

d. Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) 16

4. Hewan-hewan Toleran Hipoksia 18

B. Kerangka Berpikir 19

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian 21

B. Tempat dan Waktu Penelitian 21

C. Metode Penelitian 22

D. Prosedur Penelitian 22

E. Teknik Pengumpulan Data 28

F. Teknik Analisis Data 29

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian 30

1. Isolasi DNA Genom pada Ikan Lele, Ikan Gabus, Ikan Kakap Merah dan Ikan Kerapu Lumpur 30

2. Amplifikasi dan Deteksi Fragmen DNA Mioglobin 114pb dengan Menggunakan Teknik PCR dan Elektroforesis Gel Agarose 2 % 31

3. Identifikasi Homologi DNA Mioglobin 114 PB dengan Menggunakan Aplikasi BLASTn 32

B. Pembahasan 38

1. DNA Genom Ikan Lele, Ikan Gabus, Ikan Kakap Merah dan Ikan Kerapu Lumpur 38

2. Fragmen DNA Mioglobin114 PB Ikan Lele, Ikan Gabus, Ikan Kakap Merah dan Ikan Kerapu Lumpur 39

3. Homologi DNA Mioglobin 114pb dengan Menggunakan Program BLASTn 41

BAB V KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN

A. Kesimpulan 44

B. Implikasi 44

C. Saran 45

DAFTAR PUSTAKA 46

LAMPIRAN 50

SURAT KEASLIAN SKRIPSI

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

DAFTAR GAMBAR

No. Halaman

1. Pita DNA Produk PCR 114pb 32

2. Persentase Homologi Ikan Gabus dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial Cds* Sebesar 95% 32

3. Persentase Homologi Sampel Ikan Lele dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial Cds* Sebesar 93% 33

4. Persentase Homologi Ikan Kakap Merah dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial Cds* Sebesar 88% 34

5. Persentase Homologi Ikan Kerapu Lumpur dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial Cds* Sebesar 91% 35

6. Jarak Kekerabatan Berdasarkan Penyejajaran Nukleotida Fragmen Gen DNA Mioglobin 114pb 36

DAFTAR TABEL

No. Halaman

1. Kemurnian dan Konsentrasi Hasil Isolasi 30

2. Komposisi Formula pada Program PCR 31

3. Formula Program PCR Hasil Optimasi 32

4. Persentase Homologi Hasil BLAST Mioglobin 114pb Keempat Sampel 36

DAFTAR LAMPIRAN

No. Halaman

1. Protokol *Genomic DNA Mini Kit (Tissue*) 51

2. Gambar Alat dan Bahan Penelitian 52

3. Modifikasi Formula PCR. 54

4. Grafik Hasil Sekuensing..... 55

5. Hasil BLASTn..... 60

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Mioglobin adalah protein globular pembawa oksigen yang pada awalnya hanya ditemukan di dalam otot yang berfungsi mempermudah difusi oksigen dari sitoplasma ke mitokondria. Saat jumlah oksigen dalam darah cukup untuk melakukan transfer elektron di mitokondria, mioglobin mengikat oksigen dengan afinitas yang tinggi, dan pada saat tekanan parsial oksigen rendah menyebabkan mioglobin melepaskan oksigen dan memfasilitasi difusi oksigen dari sarkolema menuju mitokondria (Postnikova *et al*., 2013). Protein mioglobin merupakan protein penting bagi hewan untuk menjaga homeostatis oksigen tubuh agar dapat bertahan hidup terutama dalam kondisi kekurangan oksigen yaitu hewan-hewan yang toleran hipoksia. Oleh karena itu, protein mioglobin menjadi acuan dasar pengelompokkan organisme sensitif hipoksia dan organisme toleran hipoksia (Puspitaningrum, *et al*. 2010).

Kondisi hipoksia dapat ditemukan secara alamiah di dalam perairan berlumpur. Ikan-ikan yang dapat bertahan hidup di perairan berlumpur disebut ikan-ikan demersal. Ikan demersal adalah ikan-ikan yang hidup pada lapisan dasar perairan yang umumnya berlumpur atau berpasir. Ikan-ikan ini memiliki kemampuan tinggi untuk beradaptasi hidup di perairan dalam. Dasar perairan yang umumnya berlumpur dan berpasir

memiliki kadar oksigen terlarut yang rendah yang disebabkan oleh banyaknya kandungan bahan organik yang dapat menurunkan pH perairan tersebut (Alamsyah, 2013). Ikan-ikan demersal seperti ikan Lele (*Clarias batrachus)*, ikan Gabus (*Channa striata*), ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) dan ikan Kakap Merah (*Lutjanus argentimaculatus*) adalah ikan-ikan yang memiliki keunikan untuk dapat hidup pada dasar perairan berlumpur minim kadar oksigen. Oleh karena itu, ikan-ikan tersebut diduga memiliki “perangkat” tubuh berupa karakteristik mioglobin yang khas yang membantunya untuk bertahan hidup dalam lingkungan minim kadar oksigen.

Karakteristik mioglobin pertama kali ditemukan sebagai dasar pengelompokan hewan-hewan sensitif dan toleran hipoksia oleh Puspitaningrum (2010). Karakteristik mioglobin meliputi struktur urutan, jumlah sekuen gen mioglobin, serta jumlah dan distribusi protein mioglobin. Merujuk pada level molekuler, urutan nukleotida gen mioglobin yang menjadi biomarker standar adalah sepanjang 114pb yang terdapat pada *Chelonia mydas* sebagai hewan yang toleran hipoksia.

Mioglobin merupakan protein homolog yang dapat dijadikan penanda untuk melihat jarak kedekatan antar spesies dalam pengelompokan hewan toleran hipoksia. Protein homolog merupakan protein yang memiliki kesamaan urutan residu tetap dan juga fungsi. Analisis mioglobin dapat dilakukan untuk mempelajari kerjanya dalam mempertahankan homeostatis sel. Langkah awal yang dilakukan untuk mengetahui

karakteristik mioglobin yaitu dengan mendeteksi susunan nukleotida fragmen DNA mioglobin. Namun sayangnya informasi karakteristik mioglobin pada ikan-ikan demersal masih belum banyak dibahas.

Oleh karena itu, dipilih beberapa ikan demersal yaitu ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur untuk mendapatkan fragmen DNA mioglobin 114pb menggunakan teknik isolasi, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan sekuensing. Analisis homologi menggunakan program aplikasi bioinformatika BLASTn untuk penyejajaran nukleotida serta mengelompokan hewan-hewan tersebut ke dalam hewan sensitif atau toleran hipoksia secara molekuler menggunakan program *Clustal Omega*.

B. Perumusan Masalah

Perumusan masalah pada penelitian ini adalah: berapa besar homologi nukleotida fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur sebagai ikan demersal?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mengidentifikasi homologi fragmen DNA mioglobin 114pb pada ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur terhadap *Chelonia mydas* sebagai hewan yang toleran hipoksia.

2. Mengidentifikasi kedekatan hubungan genetik pada ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur terhadap *Chelonia mydas* sebagai hewan yang toleran hipoksia berdasarkan persentase homologi sekuens fragmen DNA mioglobin 114pb.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari hasil penelitian ini adalah:

1. Nukleotida penyusun fragmen DNA mioglobin yang telah diketahui sekuensnya dapat dijadikan sebagai *database* pada *bank gen*.
2. Menjadi acuan untuk melihat pengelompokan hewan yang toleran hipoksia dan antoleran dari segi genetika dengan penanda urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin.
3. Mengungkap informasi mengenai keragaman genetika ikan demersal yang toleran hipoksia di Indonesia.
4. Menjadi model sebagai langkah awal jangka panjang pengaplikasiannya sebagai terapi untuk jaringan yang hipoksia.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR

A. KAJIAN PUSTAKA

1. Mioglobin

Mioglobin adalah protein globular yang ditemukan di dalam otot rangka dan jantung, berfungsi sebagai cadangan pembawa oksigen dan mempermudah difusi melalui sel. Mioglobin memiliki dua komponen molekuler, yaitu rantai polipeptida tunggal yang mengandung 153 residu asam amino (BM = 17.600) dan suatu gugusan hem, biomolekul mengandung zat besi yang merupakan suatu porifirin. Hem dari mioglobin dikenal sebagai gugusan prostetik, suatu molekul organik nonprotein yang berikatan erat dengan struktur polipeptida (Parveen, 2014).

Perbedaan antara hemoglobin dan mioglobin sebagai pembawa oksigen terlihat dengan melihat saturasi dari tempat pengikatan (gugusan hem) dengan oksigen. Mioglobin memiliki afinitas yang lebih besar terhadap oksigen dibandingkan dengan hemoglobin. Mioglobin juga tidak memiliki struktur kuartener dari hemoglobin, yang membantu membawa oksigen dengan sifat biologinya. Urutan asam amino dari tiga rantai polipeptida mioglobin maupun hemoglobin tidak memperlihatkan kemiripan yang sebanding (Postnikova, *et al,*. 2013).

Mioglobin terdapat pada otot dalam menanggapi kebutuhan mitokondria akan oksigen yang diangkut dari sarkolemma ke mitokondria.

Konsentrasi mioglobin tinggi diamati dalam otot hewan air, yang hidup dalam kondisi kekurangan O_2. Pada kondisi normal, jika aliran O_2 dari darah cukup untuk fungsi rantai transfer elektron mitokondria, mioglobin akan mengikat oksigen dengan afinitas tinggi, dan melepaskannya bila tekanan parsial oksigen (PO_2) turun di bawah tingkat minimum. Mioglobin diekspresikan terutama pada sel-sel otot rangka pada seluruh hewan vertebrata, kardiomiosit dan miofiber oksidatif otot rangka (Klaus, 2000).

Fungsi mioglobin antara lain adalah sebagai hemoprotein penyimpan oksigen, fasilitator transportasi oksigen intraseluler dan modulator homeostatis oksigen dan nitrat oksida (NO). Otot yang berfungsi untuk kegiatan kontraktil lama (misalnya miosit jantung dan miofibril otot skeletal oksidatif) memiliki konsentrasi mioglobin lebih tinggi dibandingkan dengan otot yang bekerja untuk kontraktil jangka pendek. Diduga 2 kb dari daerah promoter mioglobin berisi elemen penting untuk mengatur transkripsi mioglobin, setidaknya pada kondisi normoksik (Klaus, 2000).

Pengikatan dari atom zat besi dengan suatu hem melibatkan empat nitrogen dari cincin pirol. Zat besi dalam mioglobin akan mengikat suatu molekul oksigen. Gugusan hem pengikat oksigen terletak dekat permukaan molekul dalam suatu celah yang memberikan lingkungan nonpolar sehingga akan membantu mencegah molekul air untuk merusak kemampuan membawa oksigen dari molekul. Struktur genom secara keseluruhan dari mioglobin terdiri dari tiga ekson dan dua intron (Klaus, 2000).

a. Homologi Mioglobin

Protein homolog adalah protein yang menjalankan fungsi yang sama pada berbagai spesies. Protein homolog merupakan protein yang memiliki rantai polipeptida yang identik atau hampir sama panjangnya. Protein homolog memiliki dua residu asam amino yaitu residu tetap dan residu tidak tetap. Residu tetap merupakan deret asam amino dari protein homolog yang ditempati oleh asam amino yang sama pada semua spesies, sedangkan residu tidak tetap merupakan variasi deret asam amino antar spesies (Lehninger, 2004). Protein dikatakan homolog jika memiliki kesamaan persentase 80% (Fatchiyah, 2011).

Mioglobin merupakan suatu protein yang mempunyai deret asam amino yang homolog antar spesies atau dikenal dengan homologi deret (Lehninger, 2004). Hal tersebut mengindikasikan bahwa protein mioglobin dapat dijadikan sebagai penanda untuk menunjukan tingkat kekerabatan antar spesies yang satu dengan spesies lainnya. Tingkat kekerabatan dapat ditunjukkan dengan seberapa besar persentase similaritas antara satu spesies dengan spesies lainnya (Schaum, 2007). Hal tersebut dikarenakan gen merupakan molekul pembawa informasi genetik yang dapat dianggap sebagai pembawa rekaman evolusi.

b. Fragmen DNA Mioglobin 114pb

Sebuah penelitian telah dilakukan untuk mempelajari ekspresi dan karakteristik mioglobin dan menemukan bahwa mioglobin 114pb pada

Chelonia mydas dapat dijadikan model protein pengikat dan penyimpan oksigen hewan toleran hipoksia. *Chelonia mydas* merupakan hewan yang toleran hipoksia dilihat dari habitatnya dan cara hidupnya bahwa ia memiliki mekanisme adaptasi yaitu salah satunya adalah dengan pengekspresian mioglobin. Mioglobin 114pb dapat dijadikan sebagai biomarker molekuler sebagai dasar untuk pengelompokan hewan toleran hipoksia dan sensitif hipoksia (Puspitaningrum, 2010).

Mioglobin 114pb telah digunakan dalam menganalisa ikan pelagis yang hidup pada zona minim oksigen dan menemukan bahwa ikan hiu martil, ikan pari kupu-kupu dan ikan tongkol dapat dihomologikan fragmen DNA mioglobinnya dengan fragmen DNA mioglobin 114pb pada *Chelonia mydas*. Mioglobin 114pb merupakan pengkode 38 asam amino protein miglobin pada *Chelonia mydas* yang berada di posisi 63-100 sisi-N terminal. Mioglobin 114pb memiliki urutan nukleotida sebagai berikut yaitu: 5’ AAG AAG CAT GGA ACT ACT GTC CTT ACC GCC CTG GGC AGG ATC CTG AAG CAG AAA AAC AAT CAT GAA CAG GAG CTG AAG CCA CTG GCA GAG AGC CAT GCC ACC AAG CAT AAA ATC 3’.

2. Teknik Molekuler

Teknik analisis Biologi Molekuler adalah salah satu kunci dalam memahami dogma sentral dalam Biologi. Keberadaan teknik ini akan membantu untuk memahami proses replikasi, transkripsi, dan translasi. Dengan teknik ini dimungkinkan agar dapat mengenal organisme sampai

pada tingkatan molekuler yaitu sampai pada tingkatan DNA, RNA, asam amino, dan protein (Holil, 2014). Beberapa teknik yang sering dilakukan di bidang Biologi Molekuler antara lain isolasi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan sekuensing (penyejajaran urutan DNA).

Isolasi DNA merupakan sebuah teknik untuk memisahkan DNA dari komponen sel lainnya. Prinsip isolasi DNA adalah merusak membran sel serta melisiskan sel melalui beberapa tahapan secara mekanis dan enzimatis sehingga akan terjadi ekstraksi DNA yang kemudian dapat diisolasi dari material sel lain yang tidak dibutuhkan. Untuk mengisolasi DNA dapat menggunakan bahan-bahan konvensional seperti garam, deterjen, isopropanol, etanol yang bersifat melisiskan sel dan sebagai buffer. Namun sekarang ini sudah banyak kit isolasi DNA yang secara praktis dapat mengisolasi DNA dengan hasil yang baik (Fatchiyah, 2011).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik untuk mengamplifikasi urutan DNA spesifik yang dibutuhkan. Jumlah DNA spesifik yang telah diamplifikasi tersebut akan mempermudah kerja karena biasanya diperlukan dalam jumlah yang banyak untuk pengerjaan kloning, sekuensing, ekspresi gen serta reaksi biokimia lainnya yang akan mengarah pada diagnosa baru. PCR menggunakan primer spesifik untuk mengamplifikasi fragmen DNA. Prinsip PCR adalah dengan memformulasikan PCR kit dan rumusan optimasi PCR (Fatchiyah, 2011).

Sekuensing merupakan teknik molekuler dalam pembacaan urutan nukleotida pada suatu molekul DNA. Sekuensing DNA merupakan

tahapan akhir penentuan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi. *direct sequencing* merupakan tahapan untuk menentukan urutan nukleotida dari fragmen hasil amplifikasi dengan PCR tanpa melalui proses kloning. Pada dasarnya *direct sequencing* sama seperti proses sekuensing biasa. Namun ada beberapa perbedaan dalam tahapan-tahapan reaksinya, yaitu pada penyiapan DNA template dan proses amplifikasi dengan PCR (Gumilar, *et al*. 2008)

Salah satu program yang digunakan untuk analisis homologi asam amino maupun protein pada suatu organisme yaitu program bionformatika BLASTn (*Basic Local Aligment Search Tool)*. BLASTn merupakan program pencari kesamaan urutan DNA yang dapat diakses melalui web untuk membandingkan permintaan kombinasi urutan nukleotida atau protein yang diminta pengguna dengan database yang ada. BLASTn adalah salah satu program penelitian yang paling banyak digunakan dalam bidang bioinformatika. BLASTn dapat menyejajarkan antara dua urutan nukleotida dan memberikan data statistik seberapa besar persamaan yang ada. Saat program ini sedang berjalan, ia akan melaporkan status seberapa jauh pekerjaan berjalan dan perkiraan berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikannya (Johnson, 2008).

BLASTn berkembang secara berkembang secara bertahap pada koleksi program dan algoritma BLASTn tersebut. BLASTn dapat melakukan pencarian terhadap profil ekpresi gen. BLASTn akan memilih

database yang dicari. Pencarian terbatas pada organisme tertentu (spesies atau kelompok taksonomi) dengan cara mengetikkan nama ilmiah atau nama di database Taksonomi NCBI. BLASTn terintegrasi dengan Bank Gen NCBI dalam mengambil database genom dan mRNA berbagai jenis organisme sebagai pembanding urutan yang ada. (Johnson, 2008).

3. Ikan Demersal

Ikan demersal adalah ikan yang berada pada lapisan yang lebih dalam hingga dasar perairan yang umumnya berlumpur atau berpasir (Alamsyah, 2013). Sifat-sifat ekologi ikan demersal adalah antara lain, kemampuan tinggi dalam beradaptasi dengan perairan dalam, aktifitas rendah dan daerah migrasi terbatas, habitat utama berada di lapisan dasar perairan, kecepatan pertumbuhan rendah dan tingkat kedewasaannya lambat dan cenderung membentuk kelompok kecil (Aidy, 2003). Penyebaran ikan demersal lebih dipengaruhi oleh lingkungan fisik dibandingkan dengan interaksi spesifik. Identifikasi hubungan antara spesies dan habitatnya dapat mengarahkan pada pengertian yang lebih baik mengenai pengaruh lingkungan pada distribusi dan pola migrasi ikan (Alamsyah, 2013).

Terdapat pola perbedaan karakteristik dalam darah ikan demersal dibandingkan dengan ikan pelagis. Ikan demersal memiliki aktivitas rendah dan memiliki jumlah eritrosit serta kadar hemoglobin yang rendah,

sedangkan ikan pelagis yang hidup di perairan atas memiliki tingkat metabolisme tinggi sehingga mempunyai jumlah eritrosit yang lebih banyak dan kadar hemoglobin lebih tinggi (Techilina, 1992). Kadar yang rendah tersebut membuat mioglobin berperan lebih besar pada ikan-ikan demersal dalam penyediaan oksigen dalam jaringan dibandingkan dengan hemoglobin.

Ikan bernapas menggunakan insang yang berbentuk lembaran-lembaran tipis berwarna merah muda. Bagian terluar dari insang berhubungan dengan air, sedang bagian dalam berhubungan erat dengan kapiler-kapiler darah. Tiap lembaran insang terdiri dari sepasang filamen dan mengandung banyak lapisan tipis (lamela). Pada filamen terdapat pembuluh darah yang memiliki banyak kapiler, sehingga memungkinkan O_2 berdifusi masuk dan CO_2 berdifusi keluar. Saat tutup insang mengembang, membran brankiostega menempel rapat pada tubuh, sehingga air masuk lewat mulut. Sebaliknya saat tutup insang mengempis, rongga faring menyempit, dan membran brankiostega melonggar sehingga air keluar melalui celah dari tutup insang. Air dengan oksigen yang larut di dalamnya membasahi filamen insang yang penuh kapiler darah dan karbondioksida ikut keluar dari tubuh bersama air melalu celah tutup insang. Ikan juga mempunyai gelembung renang yang berfungsi untuk menyimpan oksigen dan membantu gerakan ikan naik turun (Randall, 1982).

Ikan demersal memiliki jumlah yang sangat banyak. Beberapa jenis yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah sebagai berikut:

a. Ikan Lele (*Clarias batrachus*)

Ikan Lele (*Clarias batrachus*) adalah salah satu jenis ikan air tawar. Dalam bahasa Inggris Lele disebut dengan beberapa nama, salah satunya *mudfish* karena habitat ikan ini berada di dasar perairan berlumpur. Klasifikasi ikan Lele berdasarkan Nelson, 2006 yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Actinopterygii
Ordo : Siluriformes
Famili : Clariidae
Genus : Clarias
Spesies : *Clarias batrachus*

Ikan Lele memiliki tubuh yang pipih dibagian posterior. Rahang atas yang lebih menjorok. Ujung dari sirip pektoral mengeras menyerupai duri dan kasar dibagian sisi luar serta bergerigi dibagian ujung dalam serta adanya sungut yang menyembul dari daerah sekitar mulutnya. Genital jantan panjang dan meruncing, serta memiliki warna hitam keabuan, dan jika dalam keadaan stress disertai bintik putih (Puspowardjoyo dan Djarijah, 2002).

Lele dapat bertahan hidup di semua perairan tawar selama tempat itu tetap dalam keadaan lembab dan basah dengan arus air yang perlahan seperti kolam air stagnan, rawa, sungai, dan lahan padi yang terkena banjir. Ikan Lele bahkan mampu bertahan cukup lama di daratan. Lele

dapat mengkonsumsi ikan kecil, Moluska, Invertebrata lain, detritus, serta gulma air di habitat alaminya. Lele sangat toleransi terhadap suhu air 20º–35º C. Disamping itu Lele dapat hidup pada kondisi lingkungan perairan yang jelek. Lele memiliki alat pernafasan tambahan yang disebut organ arborescent (Santoso, 1994). Dalam budidaya ikan Lele, kualitas air diusahakan arusnya mengalir secara perlahan atau lambat. Lele kurang menyukai aliran air arus yang deras sesuai dengan kultur ikan. Air diupayakan tidak terlalu bening agar Lele merasa lebih nyaman (Puspowardoyo dan Djarijah, 2002).

b. Ikan Gabus (*Channa striata)*

Ikan Gabus merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki kepala mirip ular sehingga di luar negeri biasa disebut sebagai *snakehead.* Klasifikasi ikan Gabus (*Channa striata)* berdasarkan Nelson, 2006 adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Famili : Chanidae
Genus : Channa
Spesies : *Channa striata*

Ikan Gabus memiliki sisik-sisik besar di atas kepala. Tubuh berbentuk bulat giling memanjang. Sirip punggung memanjang dan sirip ekor membulat di ujungnya. Sisi atas tubuh dari kepala hingga ke ekor berwarna gelap, hitam kecokelatan atau kehijauan. Sisi bawah tubuh

berwarna putih dan sisi samping berstriata. Warna ini sering kali menyerupai lingkungan sekitarnya. Mulut besar dengan gigi-gigi besar dan tajam menunjukkan bahwa ia merupakan ikan karnivora (Mustar, 2013).

c. Ikan Kakap Merah (*Lutjanus argentimaculatus*)

Ikan Kakap Merah umumnya termasuk ikan buas, merupakan predator yang senantiasa aktif mencari makan pada malam hari (nokturnal). Gerakannya lambat, cenderung diam dan arah geraknya tidak dilengkapi area yang luas dibandingkan ikan diurnal. Klasifikasi ikan Kakap Merah menurut Nelson, 2006 adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Famili : Lutjanidae
Genus : Lutjanus
Spesies : *Lutjanus argentimaculatus*

Ciri-ciri Kakap Merah (*Lutjanus argentimaculatus*) mempunyai tubuh yang memanjang dan melebar, kepala cembung atau sedikit cekung. Bagian bawah pra penutup insang bergerigi dengan ujung berbentuk tonjolan yang tajam. Sirip punggung terdapat sepanjang punggungnya dan berlekuk pada bagian antara yang berduri keras dan bagian yang berduri lunak. Warna sangat bervariasi, mulai dari yang kemerahan, kekuningan, kelabu hingga kecoklatan. Ada yang mempunyai garis-garis berwarna gelap dan terkadang dijumpai adanya bercak kehitaman pada sisi tubuh di bawah awal sirip punggung berjari lunak (Gunarso, 1995).

Ikan Kakap Merah *(Lutjanus argentimaculatus*) umumnya menghuni daerah perairan karang ke daerah pasang surut di muara. Jenis Kakap Merah berukuran besar umumnya membentuk gerombolan yang tidak begitu besar dan bermigrasi ke dasar perairan menempati bagian yang lebih dalam daripada jenis yang berukuran kecil. Selain itu biasanya Kakap Merah tertangkap pada kedalaman dasar antara 40–50 meter dengan substrat sedikit karang dan salinitas 30–33 ppt serta suhu antara 5- 32º C (Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, 1991). Ikan Kakap Merah lebih suka memangsa jenis-jenis kepiting, udang, jenis crustacea, gastropoda serta berbagai jenis plankton yang ada di dekat permukaan di perairan karang.

Jenis yang berukuran kecil seringkali dijumpai beragregasi di dekat permukaan perairan karang pada waktu siang hari. Ikan-ikan berukuran kecil untuk beberapa jenis ikan kakap biasanya menempati daerah bakau yang dangkal atau daerah-daerah yang ditumbuhi rumput laut. Potensi ikan Kakap Merah jarang ditemukan hidup soliter pada perairan dangkal, muara sungai, hutan bakau, daerah pantai sampai daerah berkarang atau batu karang (Wedjatmiko, 2010)

d. Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*)

Epinephelus tauvina dikenal dengan “groupers”, hidupnya soliter dan memangsa ikan serta krustase. Ikan kerapu di alam sering ditemui berlindung diantara terumbu karang atau benda-benda yang tenggelam

lainnya dan menyergap mangsanya dari posisi persembunyiannya (Paruntu, 2015). Klasifikasi ikan Kerapu Lumpur Nelson, 2006 adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Famili : Serranidae
Genus : Epinephelus
Spesies : *Epinephelus tauvina*

Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) memiliki bentuk tubuh memanjang bagian kepala dan punggung berwarna gelap dan kehitaman, sedangkan perut berwarna keputihan, seluruh tubuhnya dipenuhi bintik-bintik kasar berwarna kecoklatan atau kemerahan (Paruntu, 2015).

Pertumbuhan dan perkembangan ikan Kerapu Lumpur bersifat protagoni hermaphrodite yaitu jenis kelamin ikan berubah sejalan dengan pertumbuhannya yaitu setelah fase memijah. Ikan ini berubah kelamin menjadi jantan tanpa perubahan morfologi yang jelas. Kerapu Lumpur termasuk karnivora yang memangsa ikan –ikan kecil, udang, cumi-cumi, rajungan dan kepiting. Pada stadia larva, ikan ini memangsa plankton (Paruntu, 2015). Kualitas perairan yang optimal untuk pertumbuhan ikan kerapu, seperti suhu berkisar antara 24 - 31ºC, salinitas antara 30-33 ppt, oksigen terlarut > 3,5 ppm dan pH berkisar antara 7,8 - 8,0 (Langkosono, 2007).

4. Hewan-hewan Toleran Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan jaringan kekurangan oksigen. jaringan dapat mengalami hipoksia ketika terjadi ketidakseimbangan antara suplai dengan konsumsi oksigen. Suplai oksigen menurun kedalam tahapan bahwa banyaknya konsumsi oksigen tidak dapat menjaga fungsi jaringan. Organ otak merupakan jaringan yang paling sensitif terhadap kondisi hipoksia dibandingkan jaringan otot yang merupakan organ yang paling toleran terhadap hipoksia (Gylani, 2010).

Hewan-hewan toleran hipoksia merupakan hewan-hewan yang telah mengalami adaptasi terhadap kondisi habitatnya yang minim oksigen. Toleransi hewan-hewan tersebut berbeda satu dengan yang lain, bergantung pada adaptasi fisiologi dan morfologi yang terbentuk turun-temurun sehingga terjadi penyesuaian secara genetik pada molekul yang berperan dalam konsumsi oksigen, yaitu antara lain mioglobin yang akan berperan dalam menjaga homeostatis oksigen jaringan ketika dalam keadaan hipoksia.

Beberapa organisme dapat bertahan hidup dalam kondisi hipoksia dengan mekanisme adaptasi bermacam-macam. Organisme yang hidup di kedalaman dasar perairan yang memiliki tekanan tinggi, mamalia air dan organisme-organisme yang hidup di lapisan tanah yang kaya akan nitrogen akan lebih toleran terhadap kondisi hipoksia dibandingkan dengan organisme yang hidup di daratan (Puspitaningrum, 2010).

B. Kerangka Berpikir

Mioglobin merupakan suatu protein yang ditemukan di dalam otot rangka dan jantung, berfungsi sebagai suatu cadangan pembawa oksigen dan mempermudah difusi melalui sel. Pada kondisi normal, jika aliran O_2 dari darah cukup untuk fungsi rantai transfer elektron mitokondria, mioglobin akan mengikat oksigen dengan afinitas tinggi, dan melepaskannya bila tekanan parsial oksigen (PO_2) turun di bawah tingkat minimum. Mioglobin bekerja ketika pasokan oksigen berkurang karena mioglobin memiliki afinitas yang lebih besar terhadap oksigen dibandingkan dengan hemoglobin.

Produksi mioglobin akan meningkat seiring dengan rendahnya kadar oksigen lingkungan rendah yang disebut hipoksia. Kondisi hipoksia dapat ditemukan pada habitat ikan demersal yang hidup di dasar perairan yang umumnya berlumpur dan berpasir memiliki kadar oksigen terlarut yang rendah, seperti ikan Lele, ikan Gabus, ikan kerapu dan ikan Kakap Merah mampu hidup pada zona berlumpur yang minim oksigen. Diduga, ikan-ikan tersebut mempunyai suatu mekanisme untuk bertahan pada lingkungan perairan keadaan minim oksigen tersebut. Salah satu bentuk mekanisme adaptasi makhluk hidup yaitu melalui adaptasi fisiologis mioglobin yang berperan besar dalam adaptasi hipoksia/anoksia ini. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui karakteristik pengelompokan kekerabatan hewan yang toleran hipoksia dari segi genetis mioglobin ikan-ikan tersebut.

Mioglobin dapat dijadikan sebagai penanda untuk mengidentifikasi tingkat kekerabatan antar spesies yang satu dengan spesies lainnya dalam pengelompokan hewan toleran hipoksia. Hal ini dikarenakan mioglobin merupakan suatu protein homolog. Hewan yang memiliki protein homolog mempunyai asal-usul evolusi yang sama. Semakin besar similaritas pada struktur proteinnya maka semakin dekat kekerabatannya. Hal tersebut menjadi acuan penelitian ini untuk melihat jarak kekerabatan beberapa jenis hewan demersal dengan cara mengidentifikasi urutan basa nukleotida DNA gen mioglobin pada ikan-ikan demersal dan melihat besar persentase similaritasnya.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian

Tujuan operasional dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi DNA menggunakan kit jaringan hewan untuk mendapatkan DNA genom.
2. Mengamplifikasi fragmen DNA mioglobin menggunakan primer spesifik untuk menghasilkan fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb melalui teknik PCR.
3. Menyejajarkan urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb menggunakan sistem bioinformatika BLASTn untuk mengetahui persentase homologi nukleotida fragmen DNA mioglobin.
4. Menyejajarkan urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur secara bersamaan menggunakan *software Clustal Omega* untuk mengetahui homologi urutan nukleotida antar sampel.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia dan Molekuler FMIPA Universitas Negeri Jakarta pada bulan November 2015.

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. DNA yang akan diekstraksi berasal dari jaringan otot rangka ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur. DNA yang telah diisolasi akan diuji kemurnian dan konsentrasi melalui metode spektrofotometri menggunakan *Nanodrop* dan diamplifikasi menggunakan teknik PCR. Fragmen DNA mioglobin hasil amplifikasi dideteksi menggunakan elektroforesis. Hasil elektroforesis kemudian akan dikirimkan ke Macrogen, Korea untuk disekuensing. Data berupa fragmen DNA mioglobin didokumentasikan dan urutan basa nukleotida akan dianalisis.

D. Prosedur Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan Lele (*Clarias batrachus*), ikan Gabus (*Channa striata*), ikan Kakap Merah (*Lutjanus argentimaculatus*), dan ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) dewasa yang diambil dari tempat penangkapan ikan di Pasar Rawamangun dan Pasar Muara Angke.

2. Alat dan Bahan

a. Isolasi DNA Genom dari Jaringan Otot

Alat-alat yang digunakan untuk mengisolasi DNA mioglobin adalah lumpang dan alu, timbangan, mikrotube, sentifugasi, vortex, tip steril serta mikropipet ukuran 0,1-10 µl; 10-100 µl; dan100-1000 µl.

Bahan-bahan yang digunakan berupa jaringan otot rangka ikan Lele, ikan Gabus, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur, aquades steril, etanol absolut, serta *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Tissue)* Cat. No. GT. 050.

b. Amplifikasi Fragmen DNA Mioglobin dengan Menggunakan Teknik PCR

Amplifikasi fragmen DNA mioglobin dilakukan dengan teknik PCR. Alat yang digunakan untuk proses amplifikasi ini berupa TECHNE *thermal cycler*, mikrosentrifugasi, tip steril beserta mikropipet ukuran 0,1-10 µl, 10-100 µl,100-1000 µl), mikrotube beserta rak mikrotube ukuran 1,5 ml, dan tabung PCR ukuran 0,5 ml.

Bahan yang digunakan adalah sampel Genom DNA, Kit PCR, primer, aquades steril. Primer yang digunakan yaitu *Primer Reverse* (*Myo Turtle* R1): (5’ GAT TTT ATG CTT GGT GGC ATG GC 3’), *Primer Forward* (*Myo Turtle* F2): (5’ AAG AAG CAT GGA ACT ACT GTC 3’).

c. Deteksi Fragmen DNA Mioglobin 114pb

1) Metode Spektrofotometri

Deteksi DNA menggunakan spektrofotometri bertujuan untuk mengetahui indeks kemurnian DNA dengan panjang gelombang tertentu. Alat-alat yang digunakan pada metode deteksi DNA ini menggunakan mesin *Nanodrop*, mikro pipet beserta tipsteril ukuran 0,5-10 µL, dan

sarung tangan karet. Bahan-bahan yang digunakan berupa Genom DNA sampel, dan blanko (*Elution Buffer*).

2) Metode elektroforesis (Agarose konsentrasi 2%)

Deteksi DNA menggunakan elektroforesis bertujuan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukurannya dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Alat-alat yang digunakan pada metode ini berupa 1 set perangkat elektroforesis horizontal gel agarose, *microwave*, mikro pipet beserta tip steril ukuran 0,5-10µL, *aluminium foil*, gelas erlenmeyer beserta batang pengaduk, dan alat timbang. Bahan-bahan yang digunakan adalah 1x TAE buffer (Terdiri atas: 50 mM Na-asetat, 2 mM EDTA (pH 7,2), 0,8 gr bubuk agarose, dan 1 µL loading dye.

3. Cara Kerja

a. Preparasi sampel

Sampel ikan Lele serta ikan Gabus didapatkan dari tempat penangkapan ikan. Ikan-ikan tersebut masih dalam keadaan segar lalu dikuliti dan diambil otot yang dekat dengan bagian ekor. Semua jaringan otot dari sampel tersebut kemudian masuk ke dalam tahapan isolasi DNA.

b. Isolasi DNA Genom Jaringan Otot

Isolasi DNA dari jaringan otot menggunakan *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Tissue)* Cat. No. GT. 050. Jaringan sampel otot direaksikan sesuai dengan protokol pada kit, kemudian simpan pada suhu 4° C.

Prosedur pengisolasian DNA sampel adalah sebagai berikut:

1) 30 mg jaringan otot dimasukkan ke dalam 1,5ml mikrotube.
2) Jaringan tersebut dihaluskan dengan *micropestle*.
3) Lalu ditambahkan 200 µl *GT Buffer* dan dihomogenisasikan.
4) Kemudian ditambahkan 20 µl *Proteinase K* lalu dikocok dan diinkubasi pada suhu 60º C selama 30 menit. Tabung dibolak-balikan setiap 5 menit.
5) *GBT Buffer* ditambahkan lalu dikocok selama 5 detik.
6) Sampel diinkubasi pada suhu 60º C selama ± 20 menit untuk memastikan lisat jernih.
7) Selama masa inkubasi, sampel ditambahkan 4 µl Rnase lalu dikocok.
8) Kemudian diinkubasi kembali pada suhu ruangan selama 5 menit.
9) Ditambahkan 200 µl etanol absolut dan segera mungkin dikocok selama 10 detik.
10) Kemudian lisat dipindahkan ke dalam mikrotube yang digabungkan dengan *GD Column*.
11) Sampel disentrifuse pada kecepatan 14-16.000 x g selama 30 detik.
12) Larutan dibuang dan ditempatkan kembali *GD Column* ke dalam mikrotube.
13) Disentifuse kembali pada kecepatan 14-16.000 x g selama 3 menit hingga *column matrix* kering.
14) *GD Column* dipindahkan ke dalam mikrotube baru yang steril.

15) 100 µl *Elution Buffer* bersuhu 60º C ditambahkan pada pusat column matrix.
16) Terakhir, dibiarkan selama 5 menit untuk memastikan *Elution Buffer* terserap sempurna.
17) Kemudian disentrifuse pada kecepatan 14-16.000 x g selama 30 detik untuk mengelusi DNA.

c. Amplifikasi Fragmen DNA Mioglobin

Proses amplifikasi gen mioglobin membutuhkan sepasang primer spesifik. Primer yang digunakan untuk memperoleh fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb, adalah: *Primer Reverse (Myo Turt*le R1) : (5' GAT TTT ATG CTT GGT GGC ATG GC 3'), dan *Primer Forward (Myo Turtle* F2) : (5' AAG AAG CAT GGA ACT ACT GTC 3'). Proses PCR, diawali dengan pembuatan optimasi dan formulasi PCR *mixture*. Tabung kemudian dimasukkan ke dalam mesin TECHNE *thermal cycler*.

d. Deteksi Fragmen DNA Mioglobin

1) Metode spektrofotometri

Spektrofotometri dimulai dengan memilih menu *measure blank*. Kemudian 2 µL blanko (*Elution Buffer*) dipipetkan pada plat uji secara perlahan, lalu plat uji ditutup dan tombol *blank* ditekan, setelah itu plat uji dibersihkan menggunakan *tissue* steril. Langkah selanjutnya pada program terdapat menu sampel lalu ditekan. Sebanyak 2 µL DNA hasil

isolasi dipipetkan pada plat uji, kemudian plat uji ditutup lalu menu *enter* ditekan. Setelah enter ditekan, hasil pembacaan serapan akan keluar pada layar. Hasil berupa besaran nilai serapan pada panjang gelombang 230 nm, 260 nm, dan 280 nm, serta kemurnian DNA dan konsentrasi DNA (ng/µL). Kemudian hasil pengujian dicetak.

2) Metode Elektroforesis Gel Agarose Konsentrasi 2%

a) Pembuatan gel agarose

Bubuk agarose sebanyak 0,8 gr dilarutkan kedalam 40 mL larutan buffer TAE 1x. Larutan tersebut dipanaskan menggunakan *microwave* selama 2 menit sampai larutan berubah warna menjadi jernih. Larutan didiamkan sampai suhunya menurun kemudian ditambahkan 1 µL EtBr dan dikocok perlahan. Setelah tercampur larutan tersebut dituangkan kedalam alat pencetak gel agarose yang telah dipasangi *well-forming comb* (alat pencetak “sumur”). Larutan dibiarkan hingga memadat.

Comb (sisir) dicabut dengan perlahan setelah agar mulai padat. *Tray* (plat cetakan*)* yang berisi gel dipindahkan ke dalam bejana (*chamber*) elektroforesis. Gel dengan *well* ditempatkan pada posisi kutub negatif, kemudian dituangkan buffer TAE 1x hingga gel terendam 1mm di atas permukaan gel.

b) Running Hasil Amplifikasi Gen Mioglobin

Hasil amplifikasi gen mioglobin yang akan dijalankan dalam gel agarose disiapkan. Marker DNA dan loading dye dimasukan perlahan

kedalam sumur pertama sebagai standar untuk mengetahui panjang basa DNA sampel. Sumur berikutnya diisi dengan hasil amplifikasi fragmen DNA mioglobin (dilakukan secara perlahan). Setelah semua sampel dimasukan kedalam *well, chamber* ditutup dan disambungkan dengan *power supply.* Tegangan pada *power supply* diatur sebesar 100V dengan waktu *running* diatur selama 35 menit. Proses ini dijalankan hingga pewarna *loading dye* mendekati batas bawah gel.

c) Visualisasi DNA hasil elektroforesis

Gel hasil elektroforesis diletakan di atas UV-transilluminator/geldoc, dan pita DNA akan dipendarkan. Selanjutnya dokumentasi dilakukan dengan kamera digital. Kemudian pita DNA sepanjang 114pb dipotong menggunakan pisau steril dan potongan gel tersebut dimasukan kedalam mikrotube steril, untuk dimurnikan.

3) Pemurnian gel dan sekuensing

Pemurnian gel dan sekuensing dilakukan pengiriman sampel ke laboratorium Macrogen, Korea.

4. Teknik Pengumpulan Data

Hasil amplifikasi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb dideteksi menggunakan metode elektroforesis. Fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb yang terbentuk kemudian didokumentasikan serta dimurnikan untuk dianalisis hasil sekuensingnya.

5. Teknik Analisis Data

Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin akan dianalisis dengan *software* Bioedit untuk menggabungkan hasil sekuensing (*forward* dan *reverse*) sehingga terbentuk fragmen mioglobin sepanjang 114pb, kemudian fragmen tersebut dianalisis secara bioinformatika menggunakan BLASTn dan *Clustal Omega* yang terdapat pada NCBI.

Hasil persentase yang didapat dari BLASTn didapat dengan menggunakan formula:

$$\text{Persentase (\%) homologi} = \frac{\text{Jumlah basa yang sama antara Q dan S}}{\text{Jumlah basa sepanjang rantai nukleotida}}$$

Keterangan :

Q = Query, organisme yang dianalisis.

S = Subject, organisme yang terdapat dalam *database* NCBI.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Isolasi DNA Genom pada Ikan Lele, Ikan Gabus, Ikan Kakap Merah dan Ikan Kerapu Lumpur

Hasil isolasi DNA diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan alat spektrofotometer *Maestro Nanodrop* melalui pembacaan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm sampai 280 nm seperti yang disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Kemurnian dan Konsentrasi Hasil Isolasi

Sampel	A260 (nm)	A280 (nm)	Kemurnian (A260/A280)	Konsentrasi (ng/µl)
Ikan Gabus	1.008	0.556	1.815	50.42
Ikan Lele	2.411	1.154	2.089	120.54
Ikan Kakap Merah	1.276	0.604	2.111	63.80
Ikan Kerapu Lumpur	0.849	0.525	1.617	42.45

Nilai kemurnian DNA keempat sampel berada pada rentang nilai 1.617-2.089 dengan nilai kemurnian terendah terdapat pada sampel ikan Kerapu Lumpur yaitu sebesar 1.617 dan sampel dengan nilai kemurnian yang tertinggi yaitu ikan Kakap Merah yaitu sebesar 2.111. Nilai konsentrasi keempat sampel berada dalam rentang nilai 42.45-120.54 ng/µl dengan nilai terendah terdapat pada sampel ikan Kerapu Lumpur yaitu sebesar 42.45 ng/µldan nilai konsentrasi tertinggi yaitu pada ikan Lele sebesar 120.54 ng/µl.

2. Amplifikasi dan Deteksi Fragmen DNA Mioglobin 114pb dengan Menggunakan Teknik PCR dan Elektroforesis Gel Agarose 2 %.

DNA genom keempat sampel yang telah berhasil diisolasi kemudian diamplifikasi dengan target DNA mioglobin sepanjang 114pb dengan menggunakan teknik PCR. Prosedur yang dilakukan sesuai dengan protokol *KAPPA Taq ReadyMix PCR Kit* Cat. No. GT. 050 dan dirancang komposisinya hingga mencapai volume total reaksi 25 µl dengan formula seperti yang disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Formula pada Program PCR

Jenis Larutan	Volume (µl)				Konsentrasi
	ikan Gabus	Ikan Lele	Ikan Kakap Merah	Ikan Kerapu Lumpur	
DNA template	2	2	2	2	100 ng/µl
Primer R	1	1	1	1	10 pmol
Primer F	1	1	1	1	10 pmol
Mastermix PCR	12,5	12,5	12,5	12,5	1 x
Aquadest	8,5	8,5	8,5	8,5	-

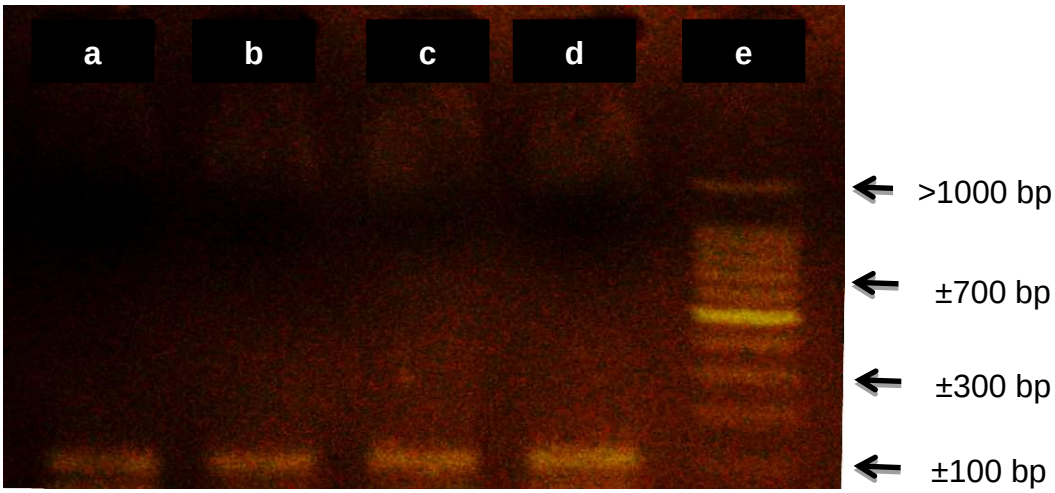
Selain merancang formula larutan bahan PCR, rancangan program PCR juga diatur dengan proses optimasi yang menghasilkan pengaturan seperti yang disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Formula Program PCR Hasil Optimasi

Tahapan PCR	Suhu (ºC)	Waktu (menit)	Siklus (x)
Denaturasi Awal	95	3	1
Denaturasi	95	1	40
Annealing	50	1	40
Elongasi	72	2	40
Elongasi Akhir	72	5	1
Simpan	4	∞	

Produk PCR yang dihasilkan dideteksi dengan menggunakan teknik elektroforesis gel agarose 2% yang ditunjukkan pada gambar 1.

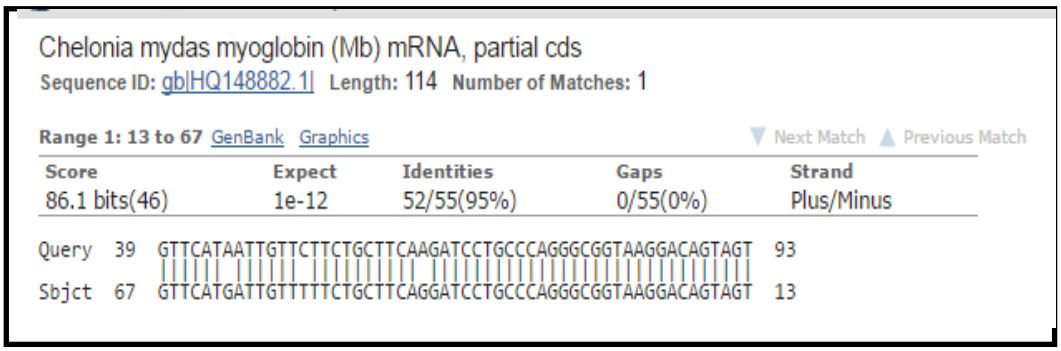
Hasil elektroforesis menunjukkan keempat sampel berada di kisaran panjang pasang basa produk PCR 110-150 pb dari marker, sesuai dengan panjang produk PCR target yaitu 114pb. Selanjutnya produk PCR fragmen DNA mioglobin 114pb yang diperoleh diidentifikasi urutannya.



Gambar 1. Pita DNA Produk PCR 114pb pada (a) ikan Gabus, (b) Ikan Lele, (c) Ikan Kakap Merah, (d) Ikan Kerapu Lumpur, dan (e) Marker Promega *Ladder*

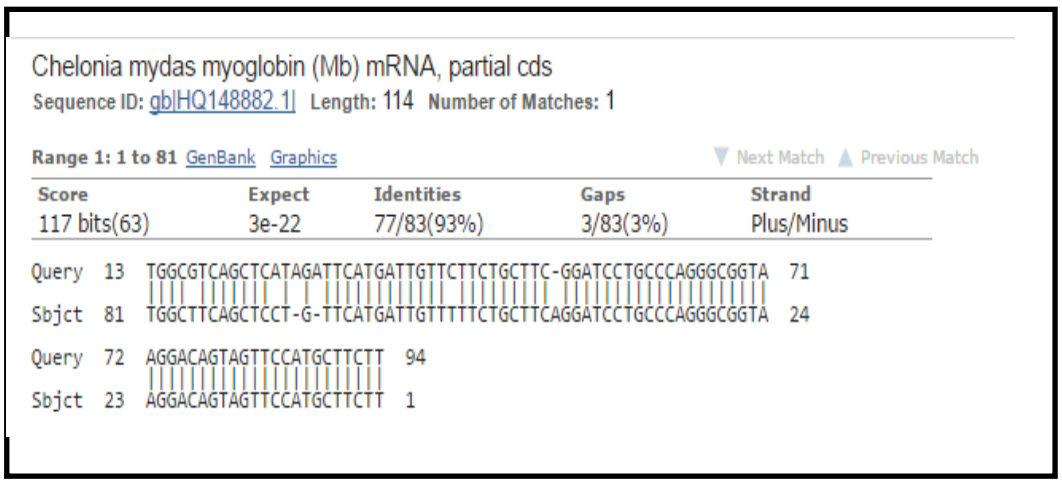
3. Identifikasi Homologi DNA Mioglobin 114pb dengan Menggunakan Aplikasi BLASTn

Hasil identifikasi homologi keempat sampel merujuk pada data gen mioglobin 114pb milik *Chelonia mydas (*Puspitaningrum *et al*, 2010). Adapun hasil seperti yang disajikan pada beberapa gambar berikut ini:



Gambar 2. Persentase Homologi Ikan Gabus dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial cds* Sebesar 95%.

Gambar 2 menunjukkan bahwa urutan nukleotida mioglobin ikan Gabus hasil penelitian memiliki persentase similaritas sebesar 95% terhadap *Chelonia mydas* dengan terdapat 52 basa nukleotida yang similar dan 3 basa nukleotida yang tidak similar. Similaritas terdapat pada basa nukleotida urutan 39-93 pada mioglobin ikan Gabus dengan basa nukleotida urutan ke 13-67 pada mioglobin *Chelonia mydas*. Tidak terdapat gap (basa nukleotida yang tidak terdeteksi) pada penyejajaran kedua organisme ini. Skor yang ditunjukkan tidak terlalu bagus yaitu 86.1 dari 114, namun didukung oleh Strand *plus/minus* menandakan bahwa untaian yang disejajarkan merupakan untaian *forward* dan *reverse* maka dapat dikatakan data yang ditunjukkan gambar diatas adalah valid.


Chelonia mydas myoglobin (Mb) mRNA, partial cds

Sequence ID: gb|HQ148882.1| Length: 114 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 81 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
117 bits(63)	3e-22	77/83(93%)	3/83(3%)	Plus/Minus

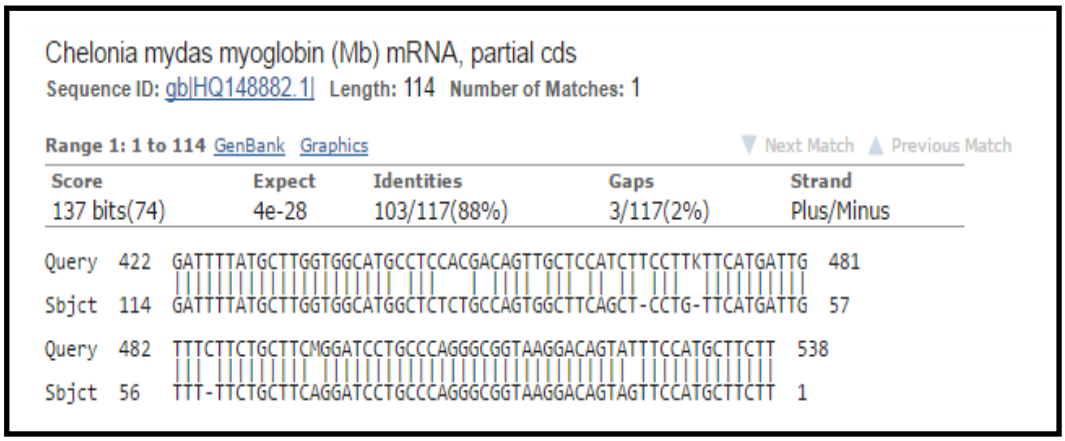
```
Query  13  TGGCGTCAGCTCATAGATTCATGATTGTTCTTCTGCTTC-GGATCCTGCCCAGGGCGGTA  71
           |||| ||||||| | | ||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  81  TGGCTTCAGCTCCT-G-TTCATGATTGTTTTTCTGCTTCAGGATCCTGCCCAGGGCGGTA  24

Query  72  AGGACAGTAGTTCCATGCTTCTT  94
           |||||||||||||||||||||||
Sbjct  23  AGGACAGTAGTTCCATGCTTCTT  1
```

Gambar 3. Persentase Homologi Ikan Lele dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial cds* Sebesar 93%.

Gambar 3 menunjukkan bahwa urutan nukleotida mioglobin ikan Lele hasil penelitian memiliki persentase similaritas sebesar 93% terhadap *Chelonia mydas* dengan terdapat 77 basa nukleotida yang similar dan 6

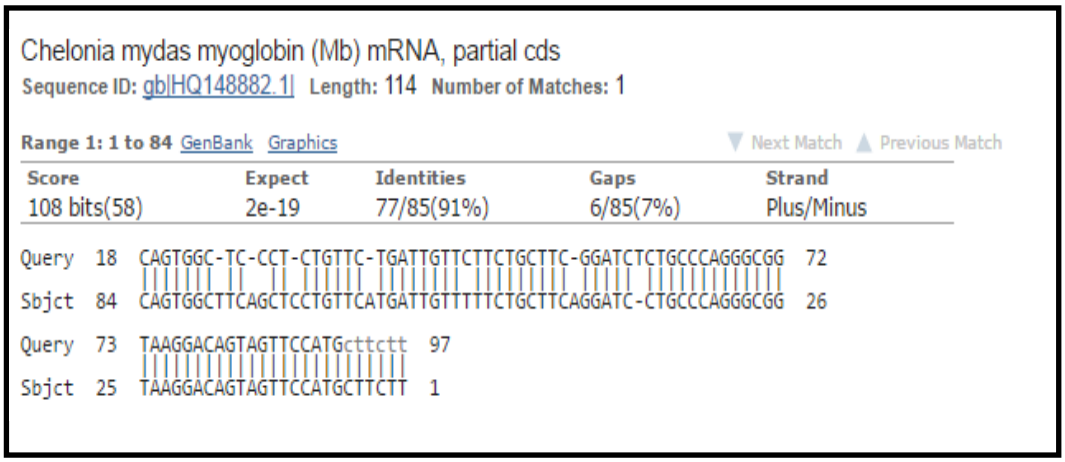
basa nukleotida yang tidak similar. Similaritas terdapat pada basa nukleotida urutan 13-94 pada mioglobin ikan Lele dengan basa nukleotida urutan ke 1-81 pada mioglobin *Chelonia mydas*. Terdapat 3 gap pada penyejajaran kedua organisme ini. Skor yang ditunjukkan sangat bagus yaitu 117 dari 114, didukung oleh Strand *plus/minus* menandakan bahwa untaian yang disejajarkan merupakan untaian *forward* dan *reverse* maka dapat dikatakan data yang ditunjukkan gambar diatas adalah valid.



Gambar 4. Persentase Homologi Ikan Kakap Merah dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial cds* Sebesar 88%.

Gambar 4 menunjukkan bahwa urutan nukleotida mioglobin ikan Kakap Merah hasil penelitian memiliki persentase similaritas sebesar 88% terhadap *Chelonia mydas* dengan terdapat 103 basa nukleotida yang similar dan 14 basa nukleotida yang tidak similar. Similaritas terdapat pada basa nukleotida urutan 422-538 pada mioglobin ikan Kakap Merah dengan basa nukleotida urutan ke 1-114 pada mioglobin *Chelonia mydas*. Terdapat 3 gap pada penyejajaran kedua organisme ini. Skor yang ditunjukkan sangat bagus yaitu 137 dari 114, didukung oleh Strand

plus/minus menandakan bahwa untaian yang disejajarkan merupakan untaian *forward* dan *reverse* maka dapat dikatakan data yang ditunjukkan gambar diatas adalah valid.



Gambar 5. Persentase Homologi Ikan Kerapu Lumpur dengan *Chelonia mydas* (Mb) mRNA *Partial cds* sebesar 91%.

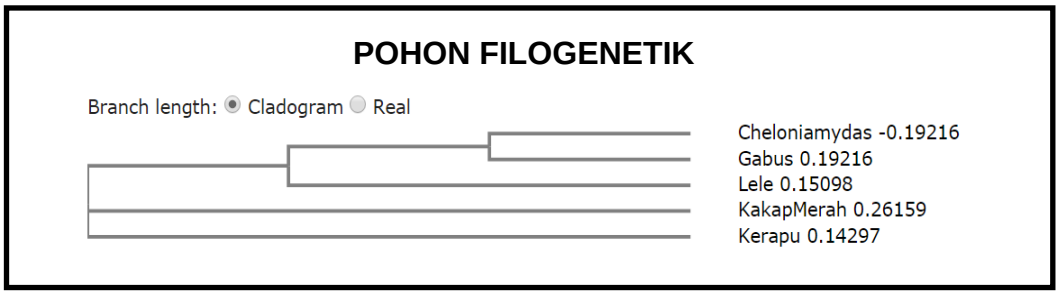
Gambar 5 menunjukkan bahwa urutan nukleotida mioglobin ikan Kerapu Lumpur hasil penelitian memiliki persentase similaritas sebesar 91% terhadap *Chelonia mydas* dengan terdapat 77 basa nukleotida yang similar dan 8 basa nukleotida yang tidak similar. Similaritas terdapat pada basa nukleotida urutan 18-97 pada mioglobin ikan Gabus dengan basa nukleotida urutan ke 1-84 pada mioglobin *Chelonia mydas*. Terdapat 6 gap pada penyejajaran kedua organisme ini. Skor yang ditunjukkan cukup bagus yaitu 108 dari 114, serta didukung oleh Strand *plus/minus* menandakan bahwa untaian yang disejajarkan merupakan untaian *forward* dan *reverse* maka dapat dikatakan data yang ditunjukkan gambar diatas adalah valid.

Persentase kemiripan yang terbesar terdapat antara *Chelonia mydas* NCBI dengan ikan Gabus dengan nilai 95%, sedangkan persentase terkecil terdapat antara *Chelonia mydas* NCBI dengan ikan Kakap Merah dengan nilai 88%.

Tabel 4. Persentase Homologi Hasil BLASTn Mioglobin 114pb Keempat Sampel

Sampel	***Chelonia mydas* NCBI**
Ikan Gabus	95 %
Ikan Lele	93 %
Ikan Kakap Merah	88 %
Ikan Kerapu Lumpur	91 %

Jarak kekerabatan berdasarkan kesamaan urutan mioglobin diukur dengan menggunakan program *Clustal Omega* dengan menyejajarkan urutan nukleotida keempat sampel ditambah dengan urutan nukleotida *Chelonia mydas* sebagai pembanding. Didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar 6. Jarak Kekerabatan Berdasarkan Penyejajaran Nukleotida Fragmen Gen DNA Mioglobin 114pb dengan Menggunakan Program *Clustal Omega*

Dapat dilihat dari pohon filogenetik di atas bahwa terdapat tiga buah cabang besar dan 1 buah cabang kecil. Satu buah cabang kecil tersebut menunjukkan bahwa *Chelonia mydas* memiliki homologi gen mioglobin terdekat dengan ikan Gabus, yang kemudian diikuti oleh Ikan Lele dan

yang memiliki homologi terkecil yaitu ikan Kerapu Lumpur dan Ikan Kakap Merah. Skor pada pohon filogenetik tersebut menunjukkan kedekatan hubungan secara kekerabatan antar dua individu (Chenna, 2003). Skor yang terpaut jauh antara *Chelonia mydas* (-0.19216) dengan keempat jenis ikan lainnya menunjukkan bahwa *Chelonia mydas* memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dengan keempat jenis ikan lainnya, baik jika dibandingkan satu persatu maupun secara keseluruhan. Jika dilihat dari skor diatas, ikan Kerapu Lumpur memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan ikan Lele, diikuti oleh ikan Gabus dan yang memiliki kekerabatan terjauh adalah ikan Kakap Merah.

B. Pembahasan

1. DNA Genom Ikan Lele, Ikan Gabus, Ikan Kakap Merah dan Ikan Kerapu Lumpur

Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu isolasi sel, lisis dinding dan membran sel, ekstraksi, purifikasi serta presipitasi. Prinsip dasar isolasi DNA jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel-sel jaringan, DNA, dan RNA. Selanjutnya ekstrak sel dipurifikasi sehingga dihasilkan pelet sel yang mengandung DNA (Fatih, 2009).

Keberhasilan isolasi DNA genom dapat dilihat dari nilai kemurnian dan konsentrasinya. Hasil isolasi yang baik memiliki indeks kemurnian sekitar 1,7-2,00. Kemurnian di bawah 1,70 menandakan bahwa masih terdapat protein yang terkandung di dalamnya. Kemurnian di atas 2,00 menandakan bahwa masih terdapat RNA di dalamnya (Chen *et al*., 2010).

Hasil pengukuran kemurnian DNA menunjukkan bahwa fragmen DNA hasil isolasi pada ikan Gabus memiliki kemurnian yang baik yaitu sebesar 1,82, sedangkan untuk ikan Lele dan ikan Kakap Merah memiliki kemurnian tinggi RNA yaitu sebesar 2,1 dan ikan Kerapu Lumpur memiliki kemurnian DNA yang rendah yaitu 1,62.

Protein dan asam nukleat (DNA) berbeda kelarutannya dalam pelarut organik. Asam nukleat bersifat hidrofilik sehingga mudah larut dalam air, sedangkan protein mengandung banyak residu hidrofobik pada pusat molekulnya sehingga membuatnya larut dalam pelarut organik (Surzycki, 2003). Prinsip itulah yang digunakan untuk memisahkan protein dari DNA..

Penghilangan RNA dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan RNase.

Perbedaan kemurnian DNA ini disebabkan oleh kondisi sampel dan faktor saat ekstraksi. Larutan RNAse yang digunakan tidak sebanding dengan jumlah kandungan RNA yang terdapat pada sampel akan mengakibatkan nilai kemurnian DNA yang didapat tinggi. Sedangkan nilai kemurnian DNA rendah dapat disebabkan karena saat pemisahan DNA dan protein tidak dilakukan dengan baik.

2. Fragmen DNA Mioglobin 114pb Ikan Lele, Ikan Gabus, Ikan Kakap Merah dan Ikan Kerapu Lumpur

Keberhasilan proses PCR bergantung dari primer yang digunakan dan optimasi suhu *annealing*. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3’ yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA (Handoyo, 2004). Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Myoglobin Turtle* dengan urutan *Primer Forward*: 5’ AAG AAG CAT GGA ACT ACT GTC 3’ dan *Primer Rev*erse: 5’ GAT TTT ATG CTT GGT GGC ATG GC 3’. Pemilihan primer tersebut merujuk pada penelitian Puspitaningrum *et al*., (2010) yang mempelajari karakteristik mioglobin *Chelonia mydas* sebagai hewan yang toleran hipoksia. Berdasarkan hal tersebut, primer *Myoglobin Turtle* dapat digunakan karena ikan demersal juga merupakan hewan yang toleran hipoksia, ditandai dengan habitatnya yang berada di perairan dasar atau berlumpur yang minim oksigen.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pita fragmen DNA sampel terlihat berada di posisi target yaitu pada 110-150 pb dengan pita fragmen DNA yang baik dan tidak terpotong-potong (terfragmentasi) menandakan bahwa DNA hasil PCR dalam penelitian ini sudah baik. Konsentrasi gel agarose menentukan kecepatan migrasi molekul DNA. Deteksi fragmen DNA hasil PCR menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 2% sesuai dengan teori bahwa konsentrasi gel agarose berkisar 0,7% untuk DNA dengan ukuran 5-10 kb dan 2% untuk fragmen DNA 0,1-1kb (Lewis, 2011).

Suhu *annealing* merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan PCR. Hasil optimasi yang didapat dari penelitian ini berada pada suhu 50ºC. Secara umum suhu *annealing* pada program PCR yang digunakan berkisar antara 37 - 60º C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan Tm primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan (Tm – 5)º C sampai dengan (Tm + 5)º C. Suhu *annealing* yang digunakan dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan berdasarkan optimasi (Olsen, 2008).

Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan PCR adalah konsentrasi DNA genom. Konsentrasi DNA genom *template* yang terlalu rendah akan menurunkan perolehan PCR, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan akumulasi produk non-target yang disebabkan oleh terjadinya *mispriming* (Handoyo, 2004). Konsentrasi yang direkomendasikan untuk tahapan PCR pada protokol ialah 100 ng/µl.

Maka dilakukan modifikasi formula PCR yang hasil akhirnya membuat konsentrasi DNA *template* pada DNA *template* PCR menjadi kisaran 100 ng/µl dengan menambah volume DNA *template* dan mengurangi volume aquades (lampiran 3).

3. Homologi DNA Mioglobin 114pb dengan Menggunakan Program BLASTn

Protein mioglobin merupakan protein homolog yang memiliki residu asam amino tetap dan residu asam amino tidak tetap. Residu asam amino tetap adalah residu asam amino yang ditempati oleh asam amino yang sama pada semua spesies, sedangkan residu asam amino tidak tetap merupakan variasi deret asam amino antar spesies. Menurut Puspitaningrum (2010) dan Lehninger (2004) hewan yang memiliki protein homolog tersebut mempunyai asal usul evolusi yang sama. Makin dekat kekerabatannya, makin sedikit perbedaan pada urutan nukleotidanya.

Identifikasi homologi DNA mioglobin 114pb mendapatkan hasil bahwa keempat sampel memiliki similaritas dengan *Chelonia mydas* pada urutan fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada rentang 88-95%. Rentang persentase tersebut menunjukkan bahwa keempat sampel memiliki similaritas yang tinggi terhadap *Chelonia mydas*, didukung oleh Pearson (2013) yang menunjukkan bahwa similaritas dikatakan tinggi jika nilai similaritasnya lebih dari 80%. Similaritas yang tinggi menandakan bahwa organisme-organisme tersebut memiliki hubungan genetika yang dekat, dilihat dari fragmen gen DNA mioglobin sepanjang 114pb yang oleh memiliki urutan basa nitrogen yang sangat mirip. Hal tersebut didukung

(Suryo, 2008) yang menjelaskan bahwa hubungan kekerabatan di antara satu individu dapat dibandingkan individu lainnya dapat diketahui berdasarkan nilai similaritasnya.

Pohon filogenetik mengungkap seberapa dekat atau jauh kekerabatan secara evolusi berdasarkan pola urutan yang terkonservasi. Selain itu, pohon filogenetik juga berfungsi untuk mengetahui hubungan nenek moyang dari organisme yang diteliti (Suneetha *et al*., 2008). Skor yang terdapat pada pohon filogenetik menunjukkan kedekatan secara kekerabatan antar dua individu. Skor yang terpaut jauh antara *Chelonia mydas* dengan keempat jenis ikan lainnya menunjukkan bahwa *Chelonia mydas* memiliki kekerabatan yang cukup jauh dengan keempat jenis ikan lainnya, sedangkan ikan Kerapu Lumpur memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan ikan Lele.

Ikan Gabus memiliki homologi gen mioglobin yang paling besar dengan *Chelonia mydas*, walaupun secara skor yang terdapat di pohon filogenetik, keduanya memiliki kekerabatan yang jauh. Kekerabatan yang relatif jauh yang ditunjukan oleh angka tersebut dapat disebabkan pada klasifikasi yang merujuk pada Nelson (2006) menunjukkan keduanya terdapat pada kelas yang berbeda, sedangkan keempat jenis ikan memiliki skor yang nilainya berdekatan disebabkan mereka masih dalam kelas yang sama.

Ikan Lele berada pada cabang kedua terdekat dengan cabang *Chelonia mydas* dan ikan Gabus sebelumnya, yang menandakan bahwa

ikan Lele memiliki homologi gen mioglobin terbesar kedua. Ikan Kerapu Lumpur dan ikan Kakap Merah memiliki cabang yang jauh dari *Chelonia mydas*, ikan Lele dan ikan Gabus. Hal tersebut menunjukkan bahwa ikan Kerapu Lumpur dan ikan Kakap Merah memiliki homologi gen mioglobin terkecil dengan *Chelonia mydas*, walaupun nilai similaritas keduanya cukup tinggi pada penyejajaran fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb.

Similaritas yang tinggi berdasarkan urutan nukleotida pada fragmen DNA mioglobin sebesar 88-95% dapat menunjukkan bahwa terdapat kesamaan karakteristik kerja dan ekspresi mioglobin antara keempat jenis ikan dengan *Chelonia mydas*. Perbedaan persentase sebesar 5-12% didapatkan berdasarkan *gap* yang terdapat pada penyejajaran urutan nukleotida. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan genetik yang disebabkan oleh adanya region yang tidak terkonservasi pada gen mioglobin yang menunjukkan identitas masing-masing jenis organisme (Hardison, 2000).

BAB V

KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada ikan Gabus, ikan Lele, ikan Kakap Merah dan ikan Kerapu Lumpur memiliki similaritas yang tinggi dengan fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada *Chelonia mydas* dengan persentase homologi nukleotida sebesar 95% pada ikan Gabus, 93% pada ikan Lele, 91% pada ikan Kerapu Lumpur, dan 88% ikan Kakap Merah.
2. Merujuk pada kekerabatan sesama hewan toleran hipoksia yang diprediksi dari penyejajaran fragmen DNA mioglobin 114pb, pohon filogenetik menunjukkan *Chelonia mydas* memiliki jarak terdekat dengan ikan Gabus dan ikan Lele, dibandingkan dengan ikan Kakap Merah dan Kerapu Lumpur.

B. Implikasi

Implikasi dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menyajikan informasi biologi penting untuk pengembangan penelitian lanjutan.

2. Sebagai data acuan untuk analisis homologi gen mioglobin organisme dari habitat berbeda dengan kondisi hipoksia.
3. Sebagai dasar pengaplikasian manfaat fragmen DNA mioglobin yang terisolasi.
4. Sebagai data untuk melakukan pemuliaan hewan dan konservasi sumberdaya genetik hewan toleran hipoksia.

C. Saran

Lebih lanjut perlu adanya penelitian mengenai korelasi antara ekspresi gen mioglobin dengan kondisi hipoksia.

DAFTAR PUSTAKA

Aidy, Yusuf. 2003. Analisis Sebaran Ikan Demersal Yang Tertangkap Dengan Jaring Cantrang Di Perairan Kabupaten Demak. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.

Alamsyah, Ahmad Saiful. 2013. Studi Biologi Reproduksi Ikan Kerapu Sunu (*Plectropomus areolatus*) Pada Musim Tangkap. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. 01(01):73-83.

Chen, Hong, Murugesan Rangasamy, Sek Yee Tan, Haichuan Wang, Blair D. Siegfrie. 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PloS ONE*. 5(8).

Chenna, Ramu, *et al*. 2003. Multiple Sequence Alignment with The Clustal Series of Programs. *Nucleic Acids Research*. 31(13): 3497–3500.

Ernawati, Tri. 2007. Distribusi dan Komposisi Jenis Ikan Demersal Yang Tertangkap Trawl Pada Musim Barat Di Perairan Utara Jawa Tengah. *Jurnal lktiologi Indonesia.* 7(1).

Fatchiyah. 2011. *Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.

Fatih, Mukhlissul. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom (Isolation and Digestion of Chromosomal DNA). *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi.* 10(01):61 – 67.

Gumilar. 2008. *Bioteknologi*. Bandung: Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA UPI.

Gunarso, Widjaja. 1995. *Mengenal Kakap Merah, Komoditi Ekspor Baru Indonesia*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Gylani. 2010. A New Analysis of Hypoxia Tolerance In Fishes Using A Database of Critical Oxygen Level (Pcrit). Conserv Physiol. 4(1): 1-19.

Handoyo, 2004. *Analisa Homologi Gen Penyandi Kode Genetik*. Bogor: IPB.

Hardison, Ross C. 2000. Conserved Noncoding Sequences Are Reliable Guides To Regulatory Elements. *TIG*. 16(09):369-372.

Holil, Kholifah. 2014. *Teknik Analisis Biologi Molekuler*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Iskandar, B. H. dan Mawardi W. 1997.Studi Perbandingan Keberadaan Ikan-Ikan Karang Nokturnal dan Diurnal Tujuan Penangkapan di Terumbu Karang Pulau Pari Jakarta Utara. *Buletin PSP*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Klaus, Jürgens, Simon Papadopoulos, Thomas Peters, and Gerolf Gros. 2000. Myoglobin: Just an Oxygen Store or Also an Oxygen Transporter?. *Union Physiol*. *Soc.*15:269-274.

Kendrew, John. C. 1962. Myoglobin and The Structure Of Proteins. *Nobel Lecture December 11th*.

Langkosono. 2007. Budidaya Ikan Kerapu (Serranidae) dan Kualitas Perairan. *Neptunus*. 14(1):61 – 67.

Lehninger, A. L. 2004. *Dasar-dasar Biokimia: Edisi Ketiga*. Terjemahan *Principles of Biochemistry*, Oleh Thenawidjaja, M. Jakarta: Erlangga.

Lewis, M. 2011. *Agarose Gel Electrophoresis (Basic Method)*. Biological Protocols. England: University of Liverpool.

Mark, Johnson, Irena Zaretskaya, Yan Raytselis, Yuri Merezhuk, Scott McGinnis & Thomas L. Madden. 2008. NCBI BLAST: A Better Web Interface. *Nucleic Acids Research*. Vol. 36, Web Server issue W5–W9.

Mustar. 2013. *Studi Pembuatan Abon Ikan Gabus (Channa striata) Sebagai Makanan Suplemen*. Makassar: Universitas Hasanudin. Makassar.

Nelson, J.S. 2006. Fishes *of the World. Fourth edition.* New York: John Wiley and Sons, Inc.

Nurjanah, Komari, & E Susanto. 2006. Penambahan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) Dalam Mempertahankan Waktu Hidup Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus suillus*). *Buletin Teknologi Hasil Perikanan.* IX(2): 13-21.

Olsen, Jayme. 2008. *Introduction to "Primer Design" for PCR*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.

Paruntu, C. 2015. Budidaya Ikan Kerapu (*Epinephelus tauvina* Forsskal, 1775) dan Ikan Beronang (*Siganus canaliculatus* Park, 1797) dalam Karamba Jaring Apung dengan Sistim Polikultur. *Jurnal Budidaya Perairan*. 3(1):1-10.

Parveen, Farzana. 2014. *In silico* analysis of Myoglobin in *Channa striata. Bioinformation*. 10(1):19-20.

Pearson, William R. 2013. An Introduction to Sequence Similarity ("Similarity") Searching. *Curr Protoc Bioinformatics*. 03(10).

Postnikova. 2013. Myoglobin and Mitochondria: How Does The "Oxygen Store" Work*? J Phys Chem Biophys*. 3(4).

Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, 1991. *Alat dan Cara Penangkapan Ikan di Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Puslitbang Perikanan.

Puspitaningrum, Rini, Muhammad Sadikin, Septelia Inawati, Rondang Roemiati. 2010. Myoglobin Expression in *Chelonia mydas* Brain, Heart and Liver Tissues. *HAYATI Journal of Biosciences*. 17(3): 110-114.

Puspowardoyo, H. dan Djarijah, A.S. 2002. *Pembenihan dan Pembesaran Lele Dumbo Hemat Air.* Yogyakarta: Kanisius.

Ramli, 2010. Telaah Food Habits, Parasit Dan Bio-Limnologi Fase-Fase Kehidupan Ikan Gabus (*Channa striata*) Di Perairan Umum Kalimantan Selatan. *Ecosystem*. 10(2): 76-84.

Randal, David J. 1982. The Control Of Respiration And Circulation In Fish During Exercise And Hypoxia. *J Exp Biol*. 100:275-288.

Reebs, Stéphan G. 2009.*Oxygen and Fish Behavior*. Canada: Université de Moncton. *www.howfishbehave.ca*. Diakses pada tanggal 30 Juni 2016 pkl. 20.50 WIB.

Santoso, B. 1994, *Petunjuk Praktis Budidaya Lele Dumbo dan Lokal*. Yogyakarta: Kanisius.

Schaum. 2007. *Outlines of Theory and Problems of Genetics*. Fourth Edition. Jakarta: Erlangga.

Suneetha, Salomi. 2008. The Phylogenetics Analysis of Animal and Plant D-Types Cyclins. *Trends in Bioinformatics.* 1(1):25-32.

Suryanto, Dwi. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Medan: USU Digital Library.

Suryo. 2008. *Genetika*: Strata 1. Gajah Mada University Press: Yogyakarta.

Surzycki, Stefan. 2003. *Human Molecular Biology*. United Kingdom: Blackwell Science Publishing Company.

Techilina, L.V. 1992. Summer Haematologic Characteristics of Marine Fishes. *Hydrobiology Journal*. 28(4): 40–44

Thomas J., Moyland & Bruce D. Sidell. 2000. Consentration Of Myoglobin and Myoglobin mRNA In Heart Ventricles From Antartic Fishes. *The Journal of Experimental Biology*. 203:1277–1286.

Wedjatmiko. 2010. Beberapa Aspek Biologi Ikan Demersal Dan Krustasea Di Perairan Arafura Biological Aspects Of Demersal Fish And Crustaceans In Arafura Water. *Jurnal Perikanan* (*J. Fish. Sci.*). XII(1):35-42.

LAMPIRAN

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta,

Nama : Aurora Hadiluhung
No. Registrasi : 3425111433
Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "**HOMOLOGI FRAGMEN DNA MIOGLOBIN 114 PB PADA BEBERAPA IKAN DEMERSAL SEBAGAI DASAR PENGELOMPOKAN HEWAN TOLERAN HIPOKSIA**" adalah,

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan pada bulan November 2015 –Januari 2016.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh oranglain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karyatulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguh-sungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, Januari 2017

Yang membuat pernyataan

Aurora Hadiluhung

Scanned by CamScanner

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Aurora Hadiluhung lahir di Bondowoso, Jawa Timur pada tanggal 22 April 1993, merupakan anak bungsu dari tiga bersaudara. Penulis lahir dari pasangan suami istri Bapak Hadi Marminto dan Ibu Haryati Harahap. Penulis sekarang bertempat tinggal di Jalan Albarkah No. 44 RT.04 RW.03 Rawa Buaya, Cengkareng, Jakarta Barat 11740.

Penulis memulai pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri Langkai 6 Palangka Raya, Kalimantan Tengah, hingga kelas 3 Caturwulan III, kemudian pindah ke SD Negeri Rawa Buaya 03 Pagi pada tahun 2003 dan lulus pada tahun 2005. Penulis melanjutkan pendidikan di SLTP Negeri 264 Jakarta dan tamat pada tahun 2008. Kemudian Penulis melanjutkan pendidikannya di SMA Negeri 112 Jakarta dan lulus pada tahun 2011. Setelah tamat SMA, penulis diterima di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta. Pada tahun 2014 penulis mengikuti Praktik Kerja Lapangan di Pusarpedal-PLH, Puspitek Serpong dan menyelesaikan studinya pada tahun 2017 setelah menyelesaikan skripsi yang berjudul “Homologi Fragmen DNA Mioglobin 114pb pada Beberapa Ikan Demersal Sebagai Dasar Pengelompokan Hewan Toleran Hipoksia”.