

**KERAGAMAN GENETIK ABALON (*Haliotis asinina*) PERAIRAN MADURA DAN
ABALON (*Haliotis squamata*) PERAIRAN BALI MENGGUNAKAN ANALISIS
PCR-RFLP DENGAN MARKA GENETIK 16S rDNA**

**LAPORAN SKRIPSI
BUDIDAYA PERAIRAN**

**Oleh: AAN TIKA KURNIA
NIM. 0610850001**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2010

KERAGAMAN GENETIK ABALON (*Haliotis asinina*) PERAIRAN MADURA DAN
ABALON (*Haliotis squamata*) PERAIRAN BALI MENGGUNAKAN ANALISIS
PCR-RFLP DENGAN MARKA GENETIK 16S rDNA

Oleh:

AAN TIKA KURNIA

NIM. 0610850001

Dosen Penguji I

(Ir. Agoes Soeprijanto, MS)
NIP. 19590807 198601 1 001
TANGGAL :

Dosen Penguji II

(Ir. Ellana Sanoesi, MP)
NIP. 19630924 199803 2 002
TANGGAL :

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Maftuch, MSi)
NIP. 19660825 199203 1 001
TANGGAL :

Dosen Pembimbing II

(Ating Yuniarti, SPi, M.Aqua)
NIP. 19750604 199903 2 002
TANGGAL :

Mengetahui
Ketua jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
TANGGAL :

RINGKASAN

AAN TIKA KURNIA. SKRIPSI tentang Keragaman Genetik Abalon (*Haliotis asinina*) Perairan Madura dan Abalon (*Haliotis squamata*) Perairan Bali Dengan Menggunakan Marka Genetik 16S rDNA di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Maftuch,MSi** dan **Ating Yuniarti, Spi, M.Aqua**).

Kegiatan pemanfaatan potensi perikanan di Indonesia mengalami peningkatan, lebih khususnya pada hasil laut yang bernilai ekonomis tinggi seperti abalon, untuk menunjang keberlanjutan kegiatan tersebut perlu adanya proses budidaya abalon karena selama ini abalon diambil secara langsung dari alam sehingga ditakutkan lama-kelamaan populasi abalon di alam akan cepat habis. Budidaya abalon masih mengalami permasalahan dalam hal penyediaan benih yang cukup bermutu dan tidak tergantung pada tangkapan alam.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik Abalon (*H. asinina*) dan (*H. squamata*) berdasarkan metode PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dengan membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi terhadap DNA target atau dari individu yang berbeda.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif yang menuturkan dan mengklasifikasikan data yang diperoleh dengan tujuan memaparkan secara sistematis, aktual dan akurat mengenai fakta-fakta dan sifat-sifat dari populasi tertentu dan secara rasional kesimpulan diambil dari data-data tersebut.

Kegiatan penelitian ini dimulai dengan pengumpulan sampel *H. asinina* dari perairan Madura sebanyak 25 sampel dan *H. squamata* dari Bali sebanyak 30 sampel, setelah diidentifikasi jenis kelamin dan panjang cangkang, sampel abalon disimpan di dalam freezer.

Setelah pengumpulan sampel, dilakukan ekstraksi DNA yang diambil dari daging kaki dengan cara memasukkan daging ke dalam eppendorf 15 µl yang telah diberi lysis buffer 400 µl kemudian daging dicacah menggunakan sectio set. Selanjutnya ditambahkan proteinase-K 10 µl dan segera diinkubasi dalam waterbath selama 16-18 jam. Setelah inkubasi selesai diangkat eppendorf dan ditambahkan dengan NaCl sebanyak 300 µl dan disentrifugasi sebanyak 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 27°C, setelah didapatkan supernatan, dimasukkan ke dalam eppendorf baru dan ditambahkan dengan isopropanol sebanyak 450 µl kemudian disentrifuge kembali sebanyak 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 27°C. Setelah selesai, air dalam eppendorf dibuang dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 1000 µl dan disentrifugasi kembali sebanyak 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 27°C. Dibuang isi eppendorf dan dibalik ± 1 jam setelah itu ditambahkan TE buffer sebanyak 50 µl dan kemudian disimpan di dalam kulkas.

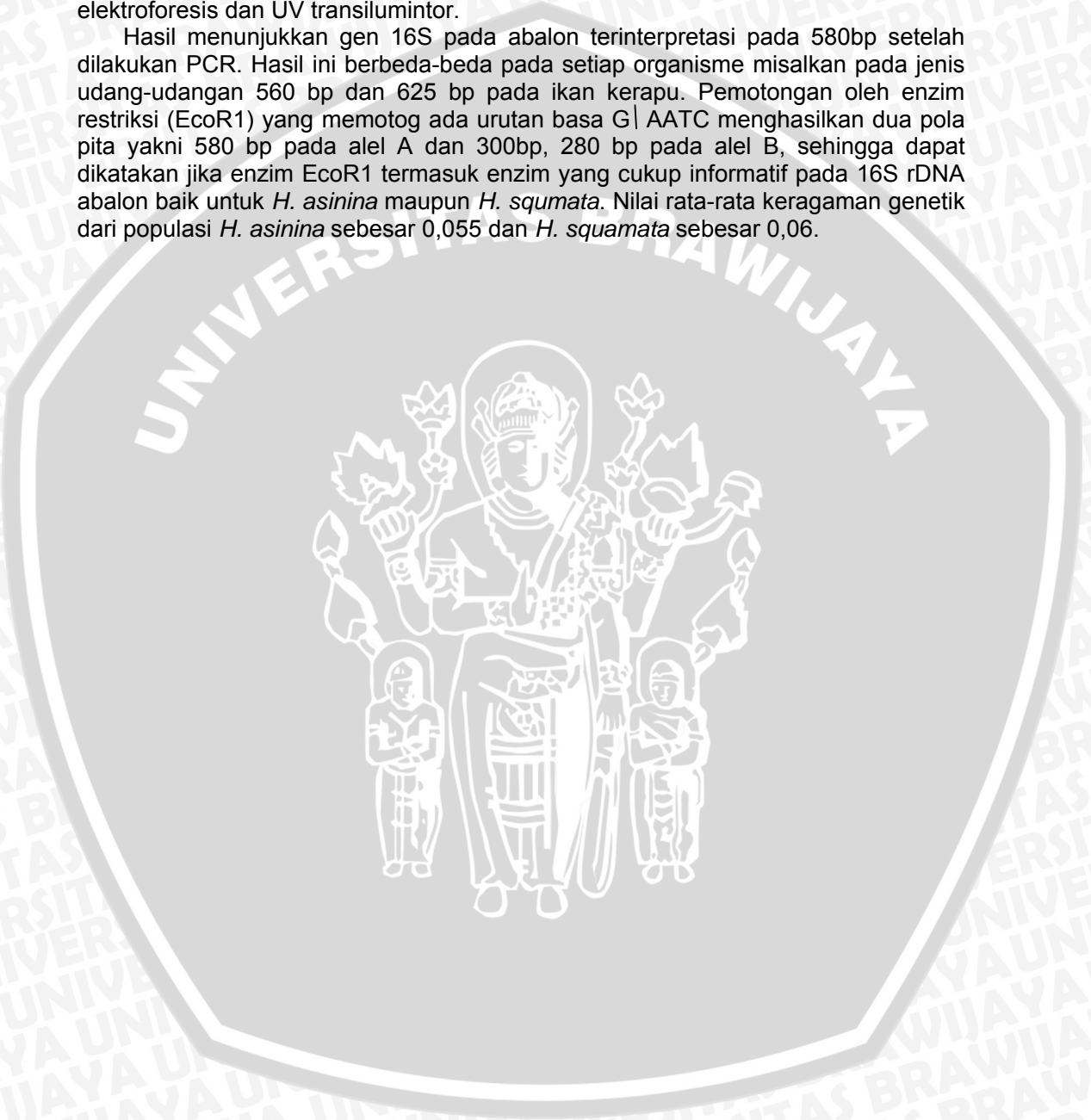
Selanjutnya hasil ekstraksi dielektroforesis, dimana sebelumnya dilakukan pembuatan gel terlebih dahulu dengan memasukkan 0,3 gram agarose ke dalam erlrmeyer 250 ml kemudian ditambahkan dengan TAE 1X sebanyak 30 ml kemudian dipanaskan dan setelah agak dingin ditambahkan EtBr 1 µl kemudian dituang ke dalam bak pencetak gel yang telah dipasang sisir. Setelah gel menjadi padat diangkat dan dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis dan direndam dengan TAE 1x sampai sumuran pada gel tergenang. Kemudian dimasukkan DNA leader sebanyak 1 µl ada sumur pertama dan selanjutnya dimasukkan sampel DNA 2 µl yang telah dicampur dengan loading dye sebanyak 1µl. Kemudian dinyalakan alat elektroforesis dan setelah itu diamati menggunakan UV transiluminator.

Proses selanjutnya yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan memasukkan sampel DNA sebanyak 2 µl pada eppendorf 200 µl dan ditambahkan

dengan 5 μ l PCR mix + $MgCl_2$ 0,3 μ l + Primer F1 0,4 μ l + primer R1 0,4 μ l + Nuclease Free Water 1,9 μ l.

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) merupakan tahap sesudah PCR dilakukan yakni dengan memasukkan sampel hasil PCR sebanyak 2 μ l yang teramplifikasi kemudian dimasukkan ke dalam eppendorf baru dan ditambahkan dengan enzim EcoR1 1 μ l + ddH₂O 15 μ l + buffer 2 μ l kemudian diinkubasi dalam waterbath selama 2 jam pada suhu 37°C dan setelah itu divisualisasi dengan elektroforesis dan UV transilumintor.

Hasil menunjukkan gen 16S pada abalon terinterpretasi pada 580bp setelah dilakukan PCR. Hasil ini berbeda-beda pada setiap organisme misalkan pada jenis udang-udangan 560 bp dan 625 bp pada ikan kerapu. Pemotongan oleh enzim restriksi (EcoR1) yang memotong ada urutan basa G|AATC menghasilkan dua pola pita yakni 580 bp pada alel A dan 300bp, 280 bp pada alel B, sehingga dapat dikatakan jika enzim EcoR1 termasuk enzim yang cukup informatif pada 16S rDNA abalon baik untuk *H. asinina* maupun *H. squamata*. Nilai rata-rata keragaman genetik dari populasi *H. asinina* sebesar 0,055 dan *H. squamata* sebesar 0,06.



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya yang telah memberikan inspirasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan SKRIPSI ini.

Laporan ini merupakan salah satu syarat yang diperlukan untuk memperoleh gelar sarjana (S-1) pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Begitu banyak bantuan yang penulis peroleh dalam penyelesaian SKRIPSI ini sampai pada penyusunan laporan ini. Oleh karena itu perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Orang Tua dan keluarga yang selalu mendukung dan mencintai tiada henti.
2. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi selaku dosen pembimbing I dan Ibu Ating Yuniarti, Spi, M.Aqua selaku dosen pembimbing II atas pembelajaran dan bimbingannya.
3. Bapak Ir. Agoes Soeprijanto, MS selaku dosen penguji I dan Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen penguji II atas kesediaannya untuk menguji dan kritik sarannya.
4. Laboran dan staff Laboratorium Biomedik FK dan LSIH Universitas Brawijaya
5. Keluarga BP 2006 dan 225C sumpersari yang selalu mendukungku.
6. M. Khoirul Huda yang tiba-tiba datang memberi motivasi batiniah.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa Laporan SKRIPSI ini masih jauh dari kata sempurna dengan segala kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan dari semua pihak agar Laporan SKRIPSI ini bermanfaat bagi yang membutuhkan, khususnya mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

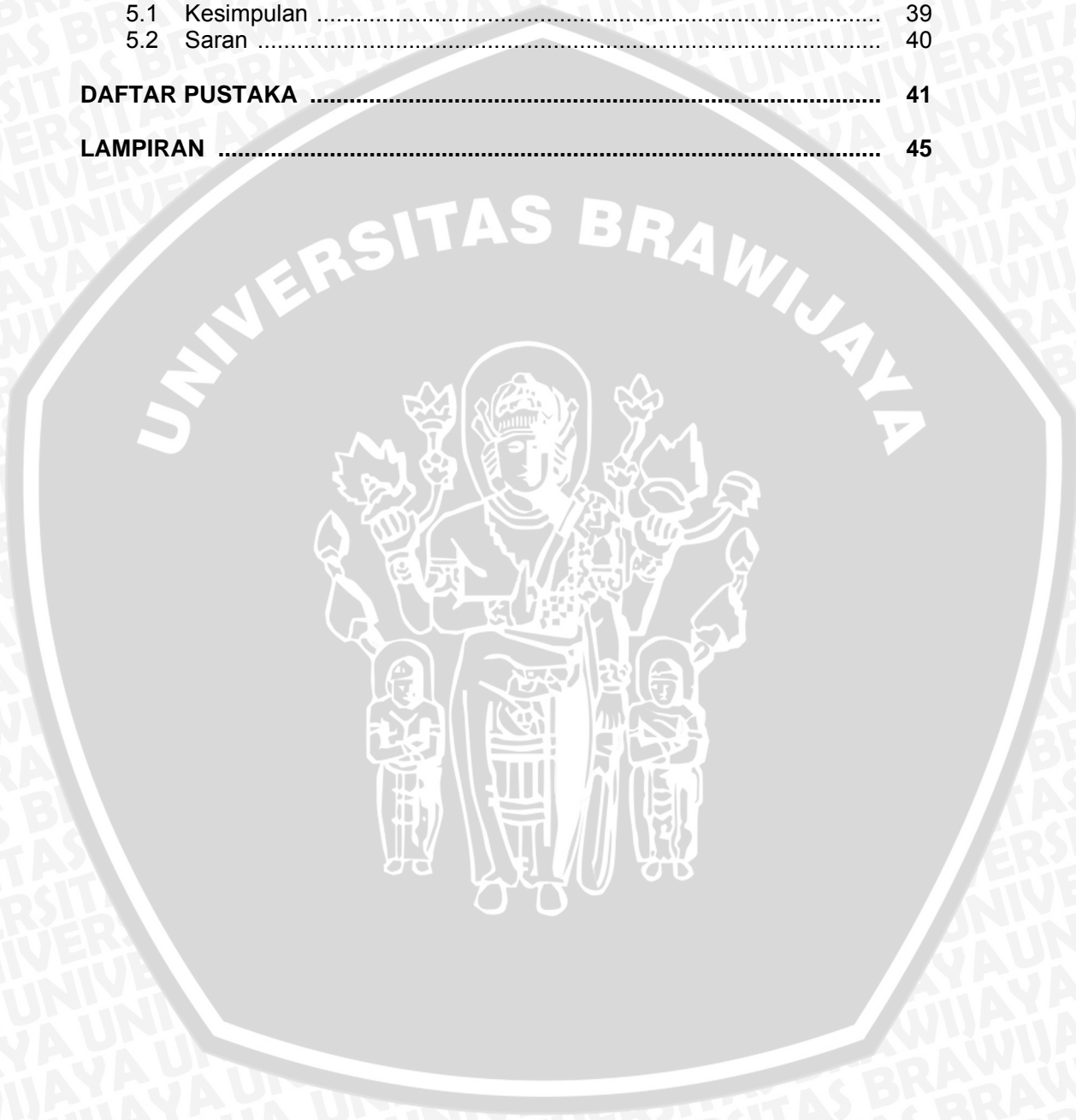
Malang, Desember 2010

Penulis

DAFTAR ISI

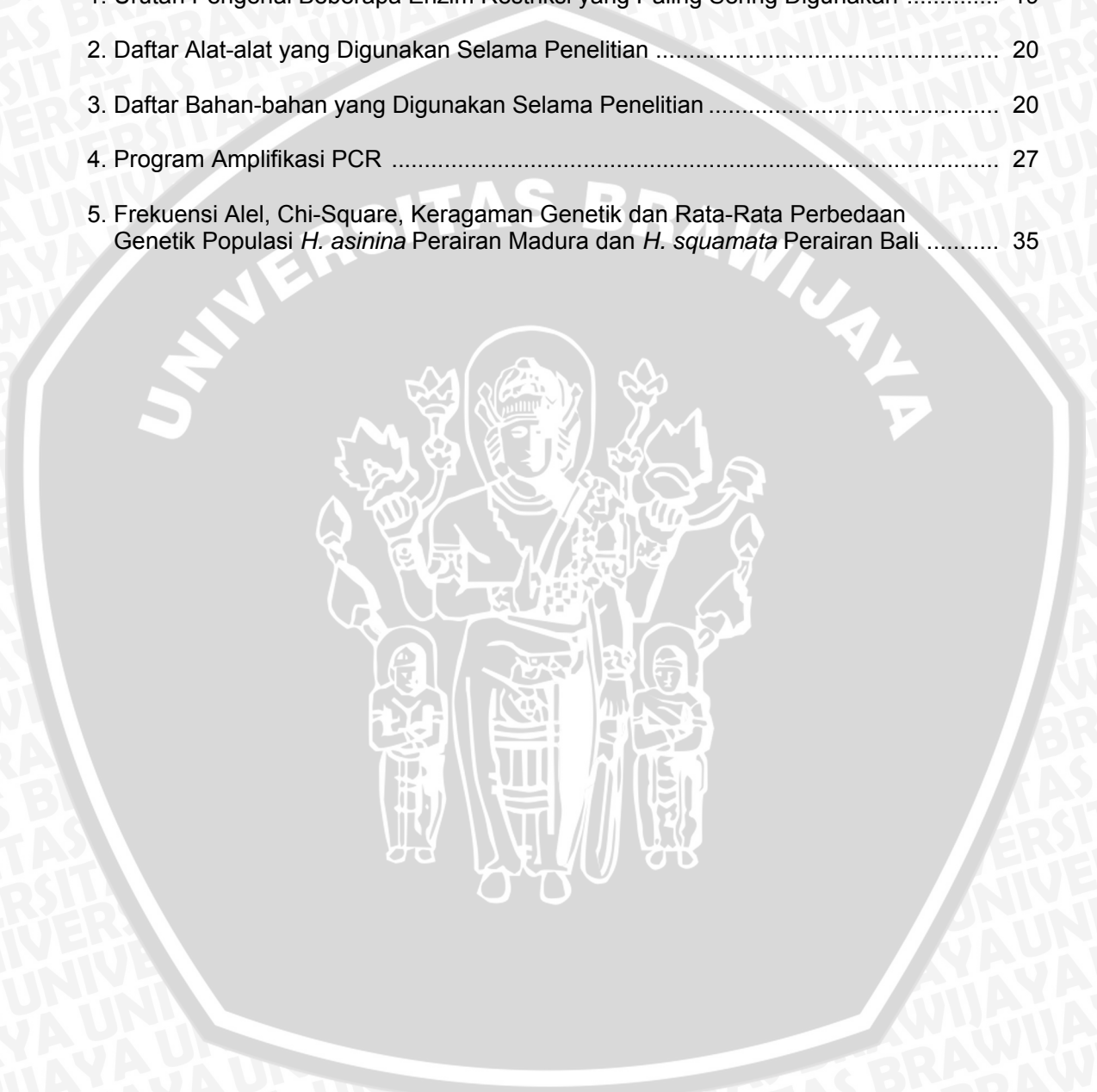
	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biologi Abalon (<i>Haliotis asinina</i>)	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Morfologi	4
2.1.3 Anatomi	5
2.1.4 Habitat dan Tingkah Laku	7
2.1.5 Kebiasaan Makan	7
2.2 Biologi Abalon (<i>Haliotis squamata</i>)	8
2.2.1 Klasifikasi	8
2.2.2 Morfologi	8
2.2.3 Habitat dan Tingkah Laku	9
2.2.5 Makanan dan Kebiasaan Makan	9
2.3 Manfaat Abalon	10
2.4 Gen dan DNA (<i>Deoxyribonucleid acid</i>)	10
2.4 Metode PCR (<i>Polymerase Chain Rection</i>)	14
2.5 Metode RFLP (<i>Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i>)	16
2.6 Enzim Restriksi	18
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	20
3.1 Materi Penelitian	20
3.1.1 Alat-alat Penelitian	20
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian	20
3.2 Metode Penelitian	21
3.3 Prosedur Penelitian	21
3.3.1 Alur Penelitian	21
3.3.2 Pelaksanaan	21
a. Pengumpulan Sampel	21
b. Ekstraksi DNA dari Daging Kaki	22
c. Elektroforesis Gel Agarose 1%	24
d. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	26
e. RFLP (<i>Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i>)	27
3.4 Analisis Data	28

4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Ekstraksi DNA	29
4.2 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	31
4.3 RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) dengan Enzim EcoR1.....	33
5. KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Urutan Pengenal Beberapa Enzim Restriksi yang Paling Sering Digunakan	19
2. Daftar Alat-alat yang Digunakan Selama Penelitian	20
3. Daftar Bahan-bahan yang Digunakan Selama Penelitian	20
4. Program Amplifikasi PCR	27
5. Frekuensi Alel, Chi-Square, Keragaman Genetik dan Rata-Rata Perbedaan Genetik Populasi <i>H. asinina</i> Perairan Madura dan <i>H. squamata</i> Perairan Bali	35

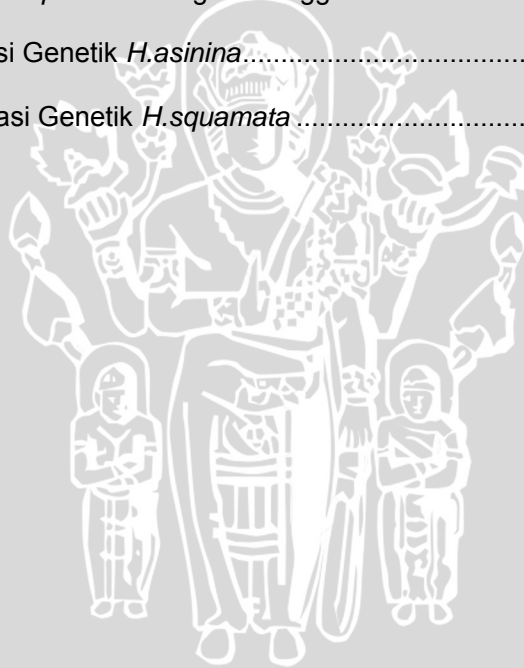


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Abalon (<i>Haliotis asinina</i>).....	4
2. Garis-Garis Pertumbuhan pada Cangkang Abalon.....	5
3. Gonad Kerang Abalon Keterangan; a. Gonad Betina b. Gonad Jantan ...	6
4. Bagian-bagian Tubuh Kerang Abalon Keterangan; a. Alat Pencernaan b. Anatomi Kerang Abalon	6
5. Pakan Abalon Keterangan; (a) <i>G. Verucosa</i> (B) <i>Navicula sp</i>	7
6. Abalon (<i>Haliotis squamata</i>)	8
7. Struktur Basa dan Gula	12
8. Struktur Mitokondria	12
9. Pemotongan oleh Enzim EcoR1.....	18
10. a. Eppendorf 1500 µl dan 250 µl b. Freezer.....	23
11. a. Waterbath b. Mikropipet dan Tip	23
12. Sentrifuge Mikro 22R.....	24
13. a. Agarose b. Timbangan Digital	25
14. Peralatan Pembuatan Gel Keterangan; a. Alas gel b. Sisir	25
15. a. Peralatan Elektroforesis b. UV Transiluminator.....	26
17. Mesin PCR	26
18. Hasil Ekstraksi DNA Keterangan; (M=marker, 1-22= nama sampel) a. <i>H. asinina</i> b. <i>H. squamata</i> c. <i>H. squamata</i>	30
19. Hasil Amplifikasi PCR Keterangan; (M=marker, 1-22= <i>H.squamata</i> , 1-14= <i>H.asinina</i>) a. <i>H. asinina</i> b. <i>H. squamata</i> c. <i>H. squamata</i>	32
20. Pemotongan dengan Enzim EcoR1 Keterangan; 1=marker, 2 dan 3=pemotongan dengan EcoR1, 5 dan 6= kontrol positif	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Morfologi Sampel Abalon.....	45
2. Diagram Alur Prosedur Pengambilan Data Penelitian.....	46
3. Data Kemurnian DNA.....	47
4. Daftar Perubahan Alur Ekstraksi.....	49
5. Perhitungan Nilai Heterozigositas <i>H.asinina</i>	50
6. Perhitungan Nilai Heterozigositas <i>H.squamata</i>	51
7. Pola Fragmentasi <i>H.asinina</i> dengan Menggunakan Enzim EcoR1.....	52
8. Pola Fragmentasi <i>H.squamata</i> dengan Menggunakan Enzim EcoR1.....	53
9. Perhitungan Variasi Genetik <i>H.asinina</i>	54
10. Perhitungan Variasi Genetik <i>H.squamata</i>	56



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemanfaatan sumber daya laut tidak hanya dilakukan melalui penangkapan, tetapi juga perlu dikembangkan usaha budidaya, salah satunya ialah budidaya laut. Saat ini pengembangan budidaya laut lebih banyak mengarah kepada ikan - ikan bernilai ekonomis tinggi, sementara di perairan Indonesia, yakni di Madura dan Bali masih banyak biota - biota laut yang masih bisa dikembangkan dan mempunyai nilai ekonomis tinggi, salah satunya adalah kerang abalon (Tisna, 2008).

Ciri - ciri dari *H. asinina* ialah berbentuk seperti telinga dan memiliki pusat cangkang berbentuk lingkaran yang berukuran kecil dan terletak di bagian posterior. Pada bagian anterior yakni mantel tepi cangkang akan muncul lubang yang berfungsi dalam proses respirasi. Lubang tersebut akan bertambah jumlahnya seiring dengan bertambahnya ukuran cangkang, sampai terbentuk di sepanjang sisi kiri cangkang (Fallu, 1991).

Berbeda dengan jenis *H. asinina*, *H. squamata* memiliki ciri-ciri bercangkang lebih pendek, lebih bulat atau cembung dengan lubang terbuka berjumlah 5 lubang. Cangkang lebih tebal dengan alur garis yang dalam sehingga terasa kasar. Warna cangkang dominan coklat kehitaman terkadang seperti ditemplei kapur berwarna putih atau merah. Menempel pada substrat dengan posisi tidak menumpuk dan lebih soliter (Thyni, 2010).

Dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dalam bidang biologi molekuler, khususnya pada pengkajian karakter bahan genetik telah menghasilkan kemajuan yang sangat pesat bagi perkembangan informasi suatu organisme dan pemanfaatannya bagi kesejahteraan manusia diperlukan informasi keragaman genetik diantara kedua spesies tersebut. Keragaman genetik dinyatakan penting karena dari keragaman genetik tersebut bisa terjaga keanekaragaman antar spesies. Terdapat beberapa cara untuk mengukur keanekaragaman genetik. Beberapa diantaranya adalah RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DGGE

(*Degradative radien Gel Electrophoresis*), MFLP (*Macrorestricted Fragment Length Polymorphism*) dan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Suryanto, 2006).

Teknik RFLP sering digunakan untuk mengetahui perbedaan genetik misalnya berdasarkan gen ribosomal DNA (contoh 16S-rRNA). Oleh karenanya teknik ini seringkali pula disebut ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*). Penggunaan teknik PCR-RFLP telah pula mampu secara mengesankan mengungkap keanekaragaman genetik mikroba yang tidak dapat dikulturkan di laboratorium. Dengan menggunakan teknik isolasi DNA dari lingkungan yang kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi dengan menggunakan primer spesifik untuk 16S-rRNA telah dapat diungkap adanya jenis-jenis mikroba baru. Dengan menggunakan primer tertentu, teknik ini juga dapat digunakan untuk gen-gen lain yang ada dalam contoh lingkungan (Suryanto, 2006).

Penggunaan marker genetik untuk mengetahui jarak kekerabatan dalam satu populasi abalon, merupakan informasi penting untuk dijadikan sebagai masukan dalam program breeding dan reproduksi abalon untuk menghindari terjadinya inbreeding. Diagnosa mengenai marker genetik dari *H. asinina*, *H. Ovina* dan *H. Ovaria* menggunakan PCR-RFLP dari 16S rDNA dapat dibedakan perbedaannya secara jelas (Tang *et al.*, 2005).

Untuk melihat keanekaragaman jenis dapat dilakukan melalui analisis sekuen gen. Terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Urutan

basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dalam satu spesies (Pangastuti, 2006).

1.2 Perumusan Masalah

Budidaya abalon masih belum berkembang pesat, hal ini banyak menimbulkan gagasan baru dalam manajemen atas permasalahan yang terjadi yakni dalam masalah perbenihan. Abalon yang dibudidayakan masih banyak tergantung pada alam dan masih belum jelas asal usulnya. Keadaan ini dapat menjadikan hasil anakan yang kurang bagus karena belum bisa dipastikan induk yang dikawinkan tidak berasal dari hubungan kekerabatan yang dekat, hal ini menyebabkan terjadinya inbreeding. Adapun permasalahan dalam hal ini ialah:

1. Bagaimanakah hubungan kekerabatan dalam spesies abalon *H. asinina* perairan Madura?
2. Bagaimanakah hubungan kekerabatan dalam spesies abalon *Haliotis squamata* perairan Bali?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui keragaman genetik dalam populasi abalon (*H. asinina*) dan (*H. squamata*) berdasarkan metode PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini sebagai informasi dasar tentang variasi genetik abalon (*H. asinina*) yang berasal dari perairan Madura dan (*H. squamata*) yang berasal dari perairan Bali, sehingga dapat digunakan untuk penentuan arah dan metode pemuliaan (*selective breeding*) sebagai acuan untuk manajemen benih dalam upaya meningkatkan mutu benih dan selanjutnya dapat dijadikan tambahan referensi dalam program hibridisasi abalon.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Kerang Abalon (*H. asinina*)

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Geiger (2007) dalam Alfi (2010) klasifikasi ilmiah kerang abalon (*H. asinina*) secara lengkap ialah sebagai berikut :

Kingdom	:Animalia
Subkingdom	: Metazoa
Filum	: Mollusca
Kelas	: Gastropoda
Subkelas	: Orthogastropoda
Ordo	: Archeogastropoda
Superordo	: Vetigastropoda
Superfamili	: Haliotoidea
Famili	: Haliotidae
Genus	: Haliotis
Spesies	: <i>H. asinina</i>



Gambar 1. Abalon (*H. asinina*)

2.1.2 Morfologi

Kerang abalon memiliki satu cangkang yang terletak pada bagian atas. Pada cangkang tersebut terdapat lubang-lubang dalam jumlah yang sesuai dengan ukuran abalon, semakin besar ukuran kerang abalon maka semakin banyak lubang yang terdapat pada cangkang. Lubang-lubang tersebut tertata rapi mulai dari ujung depan hingga belakang cangkang yang berfungsi sebagai jalan masuknya air yang mengandung oksigen dan keluarnya karbondioksida bahkan keluarnya sel-sel telur dan sperma. Kerang abalon juga mempunyai mulut dan sungut yang terletak di bawah cangkang serta sepasang mata (Admin, 2008).

Abalon memiliki kepala yang terdapat di bagian anterior sedangkan puncak dari lingkaran (spiral) ialah bagian belakang (posterior) pada sisi kanan. Bagian luar cangkang agak kasar sedangkan bagian dalam halus dan tampak lapisan *nacre* bahkan beberapa spesies berwarna-warni. Pertumbuhan cangkang terjadi dengan adanya penambahan bagian depan pada sisi kanan. Garis-garis pada cangkang menunjukkan pertumbuhan (Gambar 2), semakin banyak garis pertumbuhan yang ada, maka semakin tua umur abalon tersebut. Kaki pada abalon bersifat kaki semu, selain digunakan untuk berjalan, kaki juga digunakan untuk menempel pada substrat atau dasar perairan. Kaki ini sebagian besar tertutup cangkang dan terlihat jelas ketika abalon dibalik. Sebagian dari kaki yang tidak tertutup cangkang tampak seperti sepasang bibir. Bibir ini ditutup oleh kulit yang keras berfungsi sebagai perisai untuk melawan musuhnya (Admin, 2008).



Gambar 2. Garis-Garis Pertumbuhan pada Cangkang Abalon

2.1.3 Anatomi

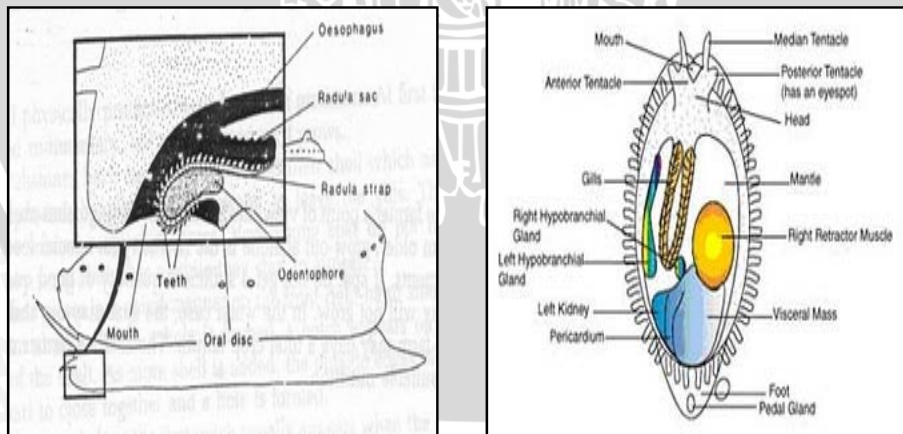
Kelenjar reproduksi atau gonad berbentuk kerucut yang terletak antara cangkang dan kaki, gonad terletak sejajar dengan cangkang seperti lubang pada cangkang dan memanjang sampai ke bagian puncak gelungan cangkang (*umbo*). Warna gonad betina yang telah matang berwarna biru kehijauan atau coklat (Gambar 3a), sedangkan yang jantan berwarna krem atau putih tulang (Gambar 3b), warna gonad yang belum matang berwarna abu-abu sehingga sulit untuk

membedakan antara jantan dan betina. Bagian-bagian lain dari kerang abalon menurut Tisna (2008), dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 3. Gonad Kerang Abalon.
Keterangan; a. Gonad Betina b. Gonad Jantan

Abalon mempunyai sepasang insang dalam sebuah ruang rongga mantel di bawah deretan lubang pada cangkang. Proses respirasi abalon ialah air laut melalui lubang pada cangkang masuk ke dalam rongga mantel bagian depan dan keluar melalui insang. Pada saat air melalui insang, oksigen diserap dan sisa gas dibuang. Sistem pencernaan berturut-turut yaitu mulut, gigi, odontophore, radula strap, radula sac, oesophagus, lambung, usus, rektum dan anus (Gambar 4a).



(a) (b)

Gambar 4. Bagian-Bagian Tubuh Kerang Abalon.
Keterangan; (a). Alat Pencernaan. (b). Anatomi Kerang Abalon (Tisna, 2008).

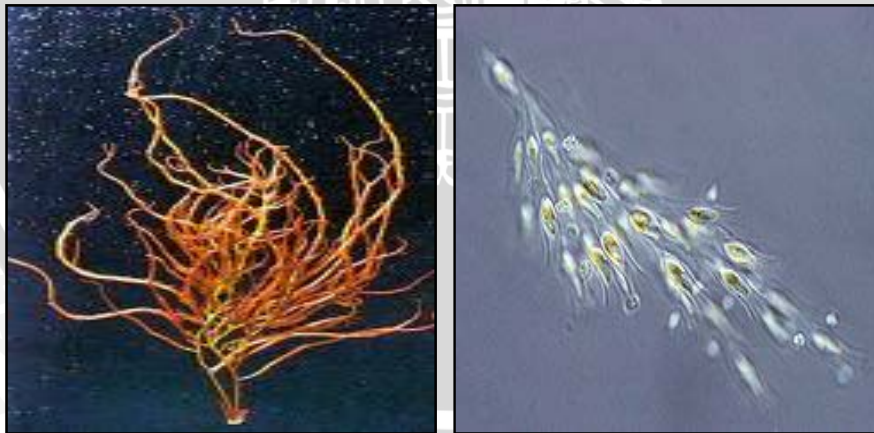
2.1.4 Habitat dan Tingkah Laku

Kerang abalon biasa ditemukan pada daerah yang berkarang dan sekaligus dipergunakan sebagai tempat menempel. Abalon lebih menyukai hidup di perairan dengan salinitas konstan sehingga tidak ditemukan di daerah estuaria yaitu pertemuan air tawar dan air laut. Kerang abalon bergerak dan berpindah tempat pada saat malam hari (*nocturnal*) dengan menggunakan satu organ yaitu kaki. Gerakan kaki yang sangat lambat sangat memudahkan predator untuk memangsanya.

Secara umum spesies kerang abalon mempunyai toleransi terhadap suhu air yang berbeda-beda seperti *H. kamtschatkana* dapat hidup dalam air yang lebih dingin sedangkan *H. asinina* dapat hidup dalam air bersuhu tinggi (30°C). Parameter kualitas air yang lain adalah pH antara 7–8, salinitas 31–33 ppt, H₂S dan NH₃ kurang dari 1 ppm serta oksigen terlarut lebih dari 3 ppm (Admin, 2008).

2.1.5 Kebiasaan Makan

Alfi (2010) menyatakan saat abalon mencapai juvenil awal (panjang cangkang 4 – 5 mm) sampai abalon dewasa menyukai pakan berupa makroalga seperti rumput laut (*seaweed*) jenis *Gracillaria sp*, yaitu *G. verucosa* dan *G. arcuata*.



(a)

(b)

Gambar 5. Pakan Abalon (*H. asinina*)

Keterangan; (a) *G. Verucosa* (B) *Navicula sp*
(Admin, 2008)

Menurut Admin (2008), kebiasaan makan dari abalon tergantung dari tingkat pertumbuhan. Awal larva menetas atau *trochopore* masih tergantung pada kuning telur sebagai sumber nutrisi. Ketika masih larva, abalon mulai melekatkan diri pada substrat atau batu dan makan mikroalga terutama epiphyte diatom seperti *Navicula*, *Nitzschia*, *Ampora* dan lain-lain.

2.2 Biologi Abalon (*H. squamata*)

2.2.1 Klasifikasi

Menurut Darmawan (1988) dalam Thyni (2010), klasifikasi abalon (*Haliotis squamata*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
 Phylum : Mollusca
 Class : Gastropoda
 Sub Class : Archaeogastropoda)
 Super Family : Pleuromariaceae
 Family : Haliotidae
 Genus : Haliotis
 spesies : *H. squamata*



Gambar 6. Abalon (*H. squamata*)

2.2.2 Morfologi

Menurut Thyni (2010), jenis ini di kenal dengan sebutan “tokobushi” (*H. squamata*) atau dalam istilah perdagangan dikenal dengan sebutan “mata empat”. Berbeda dengan jenis mata tujuh, tokobushi memiliki ciri-ciri morfologi sebagai berikut :

- Bentuk cangkang lebih bulat atau cembung dengan lubang terbuka berjumlah 5 lubang.
- Cangkang lebih tebal dengan alur garis yang dalam sehingga terasa kasar.
- Warna cangkang dominan coklat kehitaman terkadang seperti ditemeli kapur berwarna putih atau merah.

- Otot kaki atau badan lebih sedikit, terlihat saat berjalan dengan ciliata yang mengelilingi tepi otot kakinya.
- Bagian dalam cangkang memiliki nacre yang lebih tebal atau bersinar.
- Sungut panjang berwarna hitam, ciliata lebih jelas terlihat (saat bergerak dalam air).
- Menempel pada substrat dengan posisi tidak menumpuk dan lebih soliter.

2.2.3 Habitat dan Tingkah Laku

Keluarga Haliotid memiliki distribusi di seluruh dunia, di sepanjang perairan pantai dari setiap benua, kecuali pantai Atlantik, Amerika Selatan, Karibia dan Pantai Timur Amerika Serikat. Sebagian besar spesies abalon ditemukan di perairan dingin, lepas pantai belahan Selatan Selandia Baru, Afrika Selatan, Australia, Barat Amerika Utara dan Jepang di belahan bumi utara (Anonymous, 2010a).

Kerang Abalon biasa ditemukan pada daerah yang berkarang dan sekaligus dipergunakan sebagai tempat menempel. Kerang abalon bergerak dan berpindah tempat dengan menggunakan satu organ yaitu kaki. Gerakan kaki yang sangat lambat sangat memudahkan predator untuk memangsanya. Pada siang hari atau suasana terang, kerang abalon lebih cenderung bersembunyi di karang-karang dan pada suasana malam atau gelap lebih aktif melakukan gerakan berpindah tempat. (Admin, 2008).

2.2.4 Makanan dan Kebiasaan Makan

Menurut Admin (2008), kerang abalon merupakan hewan herbivor, yaitu hewan pemakan tumbuh-tumbuhan dan aktif makan pada suasana gelap. Jenis makanannya adalah *seaweed* yang biasa disebut makro alga. Jenis seaweed atau makro alga yang tumbuh di laut sangat beraneka ragam. Secara garis besar ada 3 golongan seaweed atau makro alga yang hidup di laut, yaitu; 1) makro alga merah (*Red seaweeds*), 2) alga coklat (*Brown seaweeds*), dan 3) alga hijau (*Green seaweed*). Ketiga golongan tersebut terbagi atas beberapa jenis dan beraneka

ragam. Keragaman tersebut tidak semuanya dapat dimanfaatkan kerang abalon sebagai makanannya. Berikut ini spesies atau jenis seaweed yang dapat dimanfaatkan kerang abalon sebagai makanannya, yaitu:

- a. Makro alga merah, yaitu:
 - *Corallina*
 - *Gracilaria*
 - *Porphyra*
 - *Lithothamnium*
 - *Jeanerettia*
- b. Makro alga coklat:
 - *Ecklonia*
 - *Macrocystis*
 - *Nereocystis*
 - *Laminaria*
 - *Sargasum*
 - *Undaria*
- c. Makro alga hijau, seperti *Ulva*

2.3 Manfaat Abalon

Abalon merupakan salah satu jenis kerang yang telah menjadi komoditi perikanan dunia yang saat ini sedang mengalami peningkatan permintaan sebagai makanan mewah untuk dikonsumsi terutama di Jepang, China dan Hongkong, Amerika Latin (khususnya Chili) dan Asia Tenggara (Alfi 2010). Warna-warni lapisan *nacre* cangkang abalon secara tradisional telah digunakan sebagai perhiasan dan sebagai hiasan dalam alat-alat musik seperti gitar. Perhiasan mutiara abalon sangat populer di Selandia Baru dan Australia (Anonymous, 2010a).

2.4 Gen dan DNA (*Deoxyribonucleid acid*)

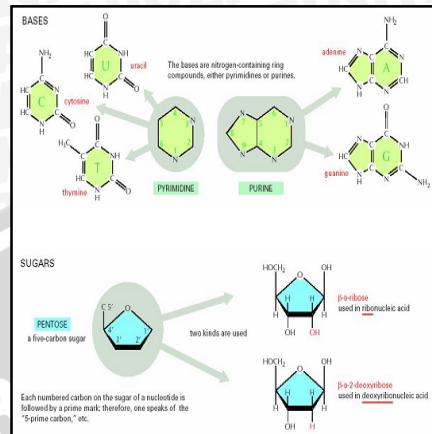
Gen adalah unit hereditas (pewarisan watak dari induk ke keturunannya secara biologis melalui gen) suatu organisme hidup. Gen ini dikode dalam material genetik organisme yaitu molekul DNA, yang ekspresinya dipengaruhi oleh lingkungan internal atau eksternal seperti perkembangan fisik atau perilaku dari organisme itu. Gen tersusun atas daerah urutan basa nukleotida (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006).

Gen memiliki bentuk-bentuk alternatif yang dinamakan alel. Alel merupakan bentuk alternatif dari suatu gen dalam kaitan dengan ekspresi suatu sifat (fenotip). Pada individu, pasangan alel menentukan genotip dari individu yang bersangkutan. Pada tingkat genom, alel merupakan variasi - variasi yang diperoleh pada panjang berkas DNA (polimorfisme DNA). Apabila suatu organisme diploid memiliki dua alel berbeda pada gen tertentu maka disebut heterozigot, namun jika alelnya sama disebut homozigot.

Bahan genetik adalah material atau substansi yang menyimpan informasi genetik dari suatu organisme hidup. Bahan ini diwariskan secara generatif dari satu individu ke individu lain. Hampir semua organisme menyimpan bahan genetik dalam bentuk DNA. DNA (*Deoxyribonucleic acid*) adalah sejenis asam nukleat yang tergolong biomolekul utama penyusun berat kering setiap organisme. Umumnya DNA terletak di dalam inti sel (Anonymous, 2009a).

DNA terbentuk dari empat tipe nukleotida, yang berikatan secara kovalen membentuk rantai polinukleotida (rantai DNA) dengan tulang punggung gula-fosfat tempat melekatnya basa-basa. Dua rantai polinukleotida saling berikatan melalui ikatan hidrogen antara basa-basa nitrogen dari rantai yang berbeda. Semua basa berada di dalam *double helix* dan gula-fosfat berada di bagian luar. Purin selalu berpasangan dengan pirimidin (A-T, G-C). Untuk memaksimalkan pengemasan pasangan basa tersebut, kedua tulang punggung gula-fosfat berpilin membentuk *double helix*, dengan satu putaran komplementer setiap 10 pasang basa. Polaritas dari rantai DNA ditunjukkan dengan sebutan ujung 5' dan ujung 3'. Arah pembacaan basa nukleotida dari ujung 5' menuju ujung 3'. DNA *double helix* dapat dikopi secara persis karena masing-masing untai mengandung sekuen nukleotida yang persis berkomplemen dengan sekuen untai pasangannya. Masing-masing untai dapat berperan sebagai cetakan untuk sintesis dari untai komplemen baru yang identik

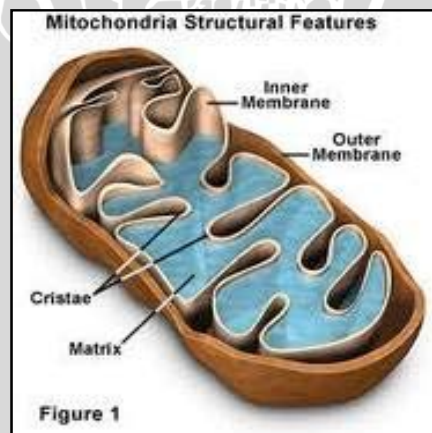
dengan pasangan awalnya. DNA terbagi menjadi dua tipe yakni DNA mitokondria (mtDNA) dan DNA kromosom atau DNA inti (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006).



Gambar 7. Struktur basa dan gula (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006)

Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel yang bertanggungjawab dalam aktivitas respirasi aerob sel-sel eukariot yang meliputi proses-proses biokimia dari siklus krebs (siklus asam sitrat), transport elektron dan fosforilasi oksidatif (Ngili, 2004).



Gambar 8. Struktur Mitokondria (Ngili, 2004)

Mitokondria merupakan organel yang berfungsi menyediakan energi selular (ATP). Ukuran dan bentuk mitokondria bervariasi menurut jaringannya dan menurut keadaan fisiologis sel. Kebanyakan mitokondria berbentuk oval atau lonjong dengan diameter antara 0.5 sampai 1 μm dan panjang sampai 7 μm . Mitokondria tidak dapat dilihat dengan mikroskop cahaya karena ukurannya yang sangat kecil.

Pengamatan dengan mikroskop elektron menunjukkan susunan khas mitokondria seperti terlihat pada Gambar 8. Mitokondria diliputi oleh selaput rangkap yang disebut membran luar dan membran dalam. Selaput dalam membagi ruang organel menjadi dua yaitu matriks dan ruang antar selaput. Matriks berisi cairan seperti gel diliputi oleh selaput dalam. Matriks adalah ruang antar selaput, selaput luar dan selaput dalam mengandung bermacam-macam enzim. Matriks mengandung enzim-enzim siklus Krebs, garam, air, DNA dan ribosom (Anonymous, 2010b).

DNA Mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria berbeda dengan DNA inti, dimana setiap cetakan DNA mitokondria terdiri dari 15.000 – 17.000 pasang basa. Di dalam matriks mitokondria terdapat suatu struktur untai DNA khusus yang berbeda dengan DNA inti. DNA mitokondria inilah yang kemudian kerap dijadikan alat dalam menentukan kondisi dan keragaman genetik pada setiap organisme maupun individu yang tujuan utamanya adalah menelusuri perjalanan kolonisasi populasi, pemisahan biogeografi populasi, hubungan filogeni dan menelusuri asal usul hewan atau untuk identifikasi spesies (DuPraw 1970; Sumartini 2001; Pereira 2000, *dalam* Ngili, 2004).

DNA mitokondria umumnya memiliki bentuk molekul bulat dengan panjang lingkaran mencapai 16 kb. DNA mitokondria tidak sama dengan DNA kromosom, DNA mitokondria tidak memiliki fase meiosis dan replikasi DNA yang berfungsi menunjukkan proses penggandaan DNA. Rangkaian genome mitokondria diketahui terdapat pada sejumlah hewan vertebrata dan avertebrata dengan perbedaan urutan gen dalam lingkaran genom berdasarkan phylumnya. Misalnya pada ikan, terdapat 13 gen coding untuk protein, 2 gen coding untuk RNA ribosom, 22 gen coding untuk molekul transfer RNA dan 1 gen non-coding sebagai pembentukan awal replikasi mtDNA dan transkripsi RNA (Beaumont dan Hoare, 2003). mtDNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan keragaman genetik antar individu dalam suatu populasi, hubungan evolusi di antara populasi dan rekonstruksi migrasi suatu populasi (Toha, 2001 *dalam* Faqih, 2004).

DNA mitokondria (mtDNA) merupakan DNA ekstra-kromosomal yang memiliki sifat dan karakter yang berbeda dengan DNA inti. Digunakan mtDNA sebagai alat untuk menganalisa variasi genetik karena mtDNA mengalami proses mutasi dan evolusi, proses evolusinya kira-kira satu tingkat lebih cepat daripada genom nukleus (DNA inti) sehingga tingkat heterogenitas inter dan intra spesifik dari mtDNA dapat dibuktikan pada beberapa organisme. Karena kecepatan evolusinya maka analisa mtDNA dianggap sebagai metode yang lebih akurat dibandingkan dengan analisis DNA inti (Rustidja, 2002).

Kajian variasi genetik yang didasarkan pada mtDNA banyak dilakukan. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa faktor antara lain, mtDNA mempunyai jumlah kopi yang tinggi (*high copy number*) sehingga mudah diisolasi dan dipurifikasi, ukuran mtDNA kecil sehingga dapat dipelajari secara utuh (Ngili, 2004). Dengan banyaknya sifat khusus dan positif yang dimilikinya, maka DNA mitokondria dapat dijadikan penanda genetik yang besar manfaatnya untuk studi keragaman genetik (Iguchi, *et al.* 1994 dalam Faqih, 2004). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah kopi DNA mitokondria pada vertebrata berkisar antara 10³ – 10⁴ molekul per sel somatik, bahkan dapat mencapai ribuan kopi mtDNA seperti yang terdapat dalam oosit. Oleh karena ukurannya yang sangat kecil dan jumlahnya yang cukup banyak dalam tiap sel, DNA mitokondria cenderung untuk digunakan dalam studi populasi misalnya dengan mengambil sampel yang sangat sedikit, misalnya cairan tubuh, akar atau daging hewan bahkan tulang dan fosil tulang (Ngili, 2004).

2.4 Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR adalah sebuah teknik biologi molekuler untuk mereplikasikan DNA. PCR digunakan untuk mengamplifikasi (melipatgandakan) bagian DNA yang pendek (sampai 10 kb). Ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1983 (Anonymous, 2009b). Teknik PCR merupakan teknik penggandaan jutaan lingkaran target DNA melalui sejumlah proses amplifikasi yang diletakkan pada *microeppendorfs* menggunakan

piring plastik dalam lingkaran mesin pemanas. Pada masing-masing *microeppendorf* berisi sejumlah bahan dan rangka DNA yang akan digandakan (Beaumont dan Hoare, 2003).

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* (dari dalam). Metode PCR dapat meningkatkan jumlah kopi DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali. Pada setiap n siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara mengamplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006).

Secara prinsip, menurut (Anonymous, 2009c) PCR merupakan proses yang diulang-ulang antara 20–30 kali. Setiap siklus terdiri dari tiga tahap, yaitu :

1. Tahap peleburan (*melting*) atau denaturasi. Pada tahap ini (berlangsung pada suhu tinggi, 94–96°C) ikatan hidrogen DNA terputus (denaturasi) dan DNA menjadi untai tunggal. Biasanya pada tahap awal PCR ini dilakukan agak lama (sampai 5 menit) untuk memastikan semua untai DNA terpisah. Pemisahan ini menyebabkan DNA tidak stabil dan siap menjadi templat ("cetakan") bagi primer. Durasi tahap ini 1–2 menit.
2. Tahap penempelan atau *annealing*. Primer menempel pada bagian DNA templat yang komplementer urutan basanya. Ini dilakukan pada suhu antara 45–60°C. Penempelan ini bersifat spesifik. Suhu yang tidak tepat menyebabkan tidak terjadinya penempelan atau primer menempel di sembarang tempat. Durasi tahap ini 1–2 menit.
3. Tahap pemanjangan atau elongasi. Suhu untuk proses ini tergantung dari jenis DNA-polimerase yang dipakai. Dengan Taq-polimerase, proses ini biasanya dilakukan pada suhu 76°C. Durasi tahap ini biasanya 1 menit.

Beberapa aplikasi dari PCR di bidang akuakultur antara lain mendeteksi patogen (misal virus) spesifik pada organisme budidaya dan mendeteksi sifat genetik dari organisme budidaya. Teknik PCR juga memberikan terobosan signifikan dalam pemanfaatan teknologi DNA khususnya teknologi rekombinan atau rekayasa genetik. Selanjutnya dengan teknik ini, orang dapat menghasilkan DNA dalam jumlah besar dalam waktu singkat sehingga memudahkan berbagai teknik lain yang menggunakan DNA. Penerapan PCR banyak dilakukan di bidang biokimia dan biologi molekular karena relatif murah dan hanya memerlukan jumlah sampel yang sangat kecil (Anonymous, 2009c).

2.5 Metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) adalah salah satu teknik pertama yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuen DNA. Deteksi RFLP dilakukan berdasar pada adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi terhadap DNA target atau dari individu yang berbeda. Berbagai mutasi yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dengan berbagai cara, menghasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah dilakukan elektroforesis pada gel dan visualisasi. Aplikasi teknik RFLP biasa digunakan untuk mendeteksi diversitas genetik, hubungan kekerabatan, sejarah domestikasi, asal dan evolusi suatu spesies, *genetic drift* (perubahan frekuensi gen dalam populasi) dan seleksi, pemetaan keseluruhan genom, tagging gen, mengisolasi gen-gen yang berguna dari spesies liar dan mengkonstruksi perpustakaan DNA. Langkah-langkah kerja untuk mendeteksi RFLP di laboratorium meliputi; isolasi DNA, pemotongan dengan enzim restriksi dan elektroforesis gel (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006).

Potongan DNA yang berfungsi sebagai tempat kumpulnya gen dapat dibuat tanpa melalui serangkaian prosedur yang rumit. Misalnya, sejumlah copy potongan

DNA yang dihasilkan dari metode *cloning* dan PCR dapat diinkubasi dengan menggunakan sejumlah enzim *Restriction Endonucleases* (REs) yang berbeda. Sejumlah potongan DNA tersebut dipotong menggunakan satu atau lebih enzim restriksi pada lokasi pemotongan yang tersedia. Hasilnya didapatkan variasi individu yang berbeda ukuran dan jumlah potongan DNA-nya, jika enzim restriksi yang digunakan cocok. Identifikasi variasi genetik seperti ini disebut dengan RFLP (Beaumont dan Hoare, 2003).

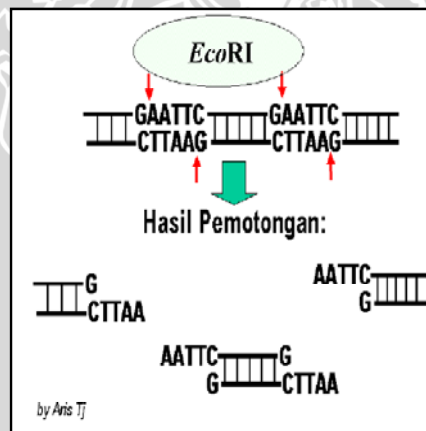
Teknik RFLP sering digunakan untuk mengetahui perbedaan jenis bakteri misalnya berdasarkan gen ribosomal DNA (contoh 16S-rDNA). Oleh karenanya teknik ini seringkali pula disebut ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Penggunaan teknik PCR-RFLP telah pula mampu secara mengesankan mengungkap keanekaragaman genetik mikroba yang tidak dapat dikulturkan di laboratorium. Dengan menggunakan teknik isolasi DNA dari lingkungan yang kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi dengan menggunakan primer spesifik untuk 16S-rDNA telah dapat diungkap adanya jenis-jenis mikroba baru. Dengan menggunakan primer tertentu, teknik ini juga dapat digunakan untuk gen-gen lain (Suryanto, 2003).

Kelebihan dan kekurangan teknik RFLP ialah merupakan metode yang mempunyai akurasi yang tinggi, mudah ditransfer antar laboratorium, bersifat kodominan sehingga dapat mendeteksi adanya heterozigisitas, tidak diperlukan informasi sekuen target. Teknik RFLP cocok untuk membuat peta linkage dan mempunyai kemampuan memisahkan yang tinggi baik pada tingkat populasi, spesies atau individual. Kekurangan RFLP adalah dibutuhkan DNA dengan kemurnian tinggi dalam jumlah banyak, tidak mungkin dilakukan otomatisasi, pada beberapa spesies mempunyai level polimorfisme yang rendah, sedikit lokus yang terdeteksi, membutuhkan waktu yang banyak dan membutuhkan biaya yang banyak (Fatchiyah dan Arumingtyas, 2006)

2.6 Enzim Restriksi

Enzim restriksi endonuklease adalah enzim – enzim bakteri yang dapat mengenali dan memotong sekuens nukleotida tertentu di dalam molekul DNA beruntai ganda. Enzim – enzim tersebut memotong DNA menjadi fragmen – fragmen dengan panjang yang bervariasi, bergantung pada berapa banyak situs yang dikenali enzim tersebut berada di dalam molekul DNA (Stansfield *et al.*, 2006).

Enzim restriksi digunakan untuk memotong DNA utas ganda. Enzim ini disebut dengan enzim restriksi atau endonuklease restriksi yang memotong DNA pada sekuens spesifik yang panjangnya 4 sampai dengan 8 pasang basa (urutan nukleotida). Misalnya, enzim *AluI* memotong DNA pada bagian yang urutan basanya adalah AGCT, enzim *EcoRI* memotong DNA pada bagian yang urutan basanya 5'-GAATTC-3' (Gambar 9) dan *NotI* memotong DNA pada bagian yang urutan basanya GCGGCCGC.



Gambar 9. Pemotongan oleh Enzim EcoRI (Tjahjoleksono, 2002)

Prinsipnya, di dalam sekuens pengenalan tersebut, masing-masing enzim di atas memotongnya tidak pada sembarang situs. Pada DNA utas ganda, sekuens pengenalan ini akan berpasangan dengan sekuens yang sama tetapi berlawanan arah. Akibatnya, potongan - potongan DNA utas ganda yang dihasilkan memiliki ujung yang berutas tunggal. Jadi kesimpulannya di dalam sekuens pengenalan tersebut, enzim *EcoRI* memotongnya tidak pada sembarang situs tetapi hanya memotong pada bagian atau situs antara G dan A (Tjahjoleksono, 2002). Enzim

restriksi endonuklease yang paling sering digunakan menurut sebagaimana tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan Pengenal Beberapa Enzim Restriksi Endonuklease yang Paling Sering digunakan.

ENZIM	ORGANISME	URUTAN PENGENAL	TIPE UJUNG
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Lengket
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Tumpul
<i>EcoRI</i>	<i>Escherchia coli</i>	GAATTC	Lengket
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Lengket
<i>Hinfi</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	GANTC	Lengket
<i>Sau3A</i>	<i>Stapylococcus aureus</i>	GATC	Lengket
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	Tumpul
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Tumpul
<i>NotI</i>	<i>Nocardia ofitidis-caviarium</i>	GCGGCCGC	Lengket



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-alat Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini tertera pada tabel 2;

Tabel 2. Daftar Alat-alat yang digunakan selama penelitian

No	Nama Alat	No	Nama Alat
1	- Eppendorf (1500µl)	12	- Gelas ukur (50 ml, 250 ml)
2	- Mikropipet (1 – 10 µl, 2 – 20 µl, dan 50 – 1000 µl)	13	- Microwave
3	- Sectio set	14	- Chamber (pembuatan gel)
4	- Waterbath	15	- Parafilm
5	- Micro Centrifuge (1500 µl)	16	- Peralatan elektroforesis
6	- Freezer	17	- UV transiluminator
7	- Refrigerator	18	- Mesin PCR
8	- Vortex mixer	19	- pH meter
9	- Timbangan	20	- Peralatan dokumentasi
10	- Bunsen	21	- Termo mixer
11	- Erlmeyer (250 ml)	22	- Botol Semprot alkohol
		23	- Autoklave
		24	- Stirer

3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan – bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut;

Tabel 3. Daftar Bahan-bahan yang Digunakan Selama Penelitian

No	Nama Bahan	No	Nama Bahan
1	- Sampel abalon (<i>H. asinina</i>) dan (<i>Haliotis squmata</i>)	13	- Tip (White tip, Yellow tip, Blue Tip)
2	- Lysis buffer (Tris Cl, EDTA, NaCl, SDS)	14	- MgCl ₂
3	- Proteinase K	15	- Primer : 16SF1 (5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC-3')
4	- NaCl		16 SR1 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3')
5	- Isopropanol	16	- Nuclease water
6	- Ethanol 70%	17	- Enzim restriksi : <i>AluI</i> , <i>BamHI</i> , dan <i>EcoRI</i>
7	- TE buffer	18	- Aquadest
8	- Gel agarose	19	- Aluminium foil
9	- TAE 1x (tris base, Asam Asetat Glacial, H ₂ O)	20	- Plastik penutup
10	- Ethidium Bromide	21	- Sarung tangan
11	- Masker	22	- Plastik penutup
12	- Loading dye		

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Menurut Suryabrata (1983), penelitian deskriptif adalah penelitian yang bermaksud untuk membuat gambaran mengenai situasi-situasi atau kejadian-kejadian.

Metode deskriptif adalah metode penyelidikan yang menuturkan dan mengklasifikasikan data yang diperoleh dari berbagai teknik pengambilan data (Surakhmad, 1994). Sedangkan tujuan metode deskriptif ini adalah memaparkan secara sistematis, aktual dan akurat mengenai fakta-fakta dan sifat-sifat dari populasi tertentu, data dikumpulkan sesuai tujuan dan secara rasional kesimpulan diambil dari data-data tersebut (Suharjono, 1995).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Alur Penelitian

Adapun alur penelitian yang dilakukan adalah dengan mencari habitat kerang abalon *H. asinina* dan *H. squamata* terlebih dahulu. Setelah diketahui letak populasi dari abalon yang dimaksud segera dilakukan pengambilan sampel. Pada saat populasi abalon yang dimaksud telah didapatkan, dilakukan ekstraksi daging. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode Ovenden dan kemudian di elektroforesis gel agarose 1%. Setelah dielektroforesis dilakukan amplifikasi PCR dan kemudian di elektroforesis kembali untuk mengetahui hasil PCR. Kegiatan selanjutnya berupa pemotongan oleh enzim restriksi (EcoR1) dengan metode RFLP dan tahap akhir berupa penganalisaan hasil data. Secara lengkap alur penelitian dapat dilihat pada lampiran 2.

3.3.2 Pelaksanaan

a. Pengumpulan Sampel

Sampel yang berupa abalon *H. asinina* yang akan digunakan untuk penelitian diperoleh dari perairan Madura dan abalon *H. squamata* diperoleh dari perairan Bali. Jumlah sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 sampel

untuk spesies *H. asinina* dan 30 sampel untuk spesies *H. squamata*. Jumlah sampel tersebut sudah memenuhi standar jumlah sampel untuk dilakukan PCR dan RFLP, hal ini sesuai dengan pernyataan Taniguchi dan Tabata (2000) yang mengatakan bahwa jumlah minimal sampel yang digunakan untuk PCR maupun RFLP adalah 20 sampel.

Sampel yang telah ada segera diidentifikasi jenis kelamin dan panjang cangkang. Setelah itu dimasukkan ke dalam freezer selama menunggu diberi perlakuan.

b. Ekstraksi DNA dari Daging Kaki

Ekstraksi DNA dilaksanakan menurut Ovenden (2000) yang telah mengalami modifikasi. Ekstraksi DNA diambil dari daging kaki, dilakukan dengan menyiapkan eppendorf (1500 μ l) sesuai dengan jumlah sampel dan diberi tanda sesuai nama sampel. Selanjutnya dimasukkan lysis buffer yang berfungsi sebagai cairan untuk mengamankan hasil ekstraksi DNA dari kerusakan akibat kerja enzim DNase (Haliman dan Adijaya 2005 dalam Ryantipoetra 2010) komposisi bahan yang diperlukan untuk membuat lysis buffer adalah sebagai berikut; tris Cl, EDTA, NaCl, dan SDS. Tris Cl yang berfungsi untuk menstabilkan pH buffer (Fais, 2010), EDTA merupakan agen yang dapat mengikat ion-ion logam atau ion-ion bermuatan dipositif seperti Ca²⁺ dan Mg²⁺ sehingga komponen-komponen di membran terluar sel akan terurai dengan terikatnya molekul yang biasanya mengikat. SDS adalah sejenis deterjen yang mampu mengemulsi lipid, sama dengan fungsi NaCl (Rizki, 2008), sebanyak 400 μ l ke dalam eppendorf (Gambar 10a), kemudian sampel berupa jaringan diambil dari freezer (Gambar 10b), dipotong kecil-kecil dengan sectio set yang sudah disterilkan dengan bunsen dan ditambahkan 10 μ l Pro-K yang memiliki fungsi membuka dinding sel sepanjang protein membungkus DNA.



(a)

(b)

Gambar 10. (a) Eppendorf 1500 µl dan 250 µl (b). Freezer

Eppendorf tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *waterbath* (Gambar 11a) dengan suhu 55°C selama ±16 jam untuk mengaktifkan kerja Pro-K. setelah waktu tersebut selesai kemudian eppendorf diangkat dari dalam *waterbath* dan ditambahkan 300µl NaCl 6 M pada masing-masing eppendorf menggunakan mikropipet (Gambar 10b). Setelah selesai segera disentrifuge sebanyak 10.000 rpm pada suhu 25°C selama 30 menit kemudian setelah proses sentrifuge selesai disiapkan eppendorf baru sejumlah sampel dan dari sampel diambil 450 µl supernatan menggunakan mikropipet (Blue=200-2000µl, Yellow=20-200µl, Red=1-10µl) dan dimasukkan ke dalam masing-masing eppendorf.



(a)

(b)

Gambar 11. (a) Waterbath (b) Mikropipet dan Tip

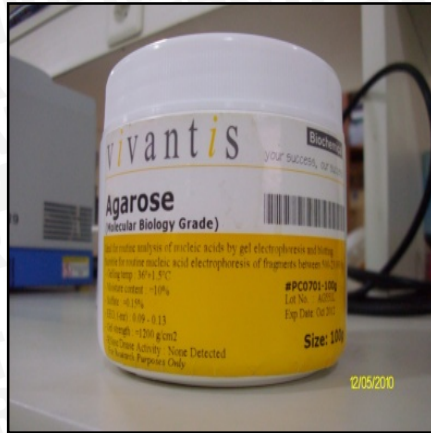
Setelah sampel masuk ke dalam eppendorf baru ditambahkan isopropanol dengan perbandingan 1:1 (450 μ l) kemudian dimasukkan ke dalam refrigerator \pm 1 jam dan setelah itu disentrifuge kembali sebanyak 10.000 rpm pada suhu 25 $^{\circ}$ C selama 20 menit dengan sentrifuge mikro 22R (Gambar. 12), setelah proses selesai air dari dalam eppendorf dibuang, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 1000 μ l (1 ml). Setelah itu disentrifuge kembali sebanyak 10.000 rpm pada suhu 25 $^{\circ}$ C selama 20 menit dan kemudian dibuang air dari dalam eppendorf dan dikering anginkan, setelah eppendorf benar-benar kering ditambahkan dengan TE buffer (mengawetkan sampel DNA dengan cara menstabilkan pH 8) sebanyak 50 μ l pada masing-masing eppendorf dan disimpan di dalam freezer sebelum diberi perlakuan.



Gambar 12. Sentrifuge Mikro 22R

c. Elektroforesis Gel Agarose 1%

Sebelum dilakukan elektroforesis harus dilakukan pembuatan gel agarose terlebih dahulu, yakni dengan menimbang agarose (Gambar 13a) sebanyak 1% dari komposisi = 0,3 gram dengan timbangan digital (Gambar 13b) kemudian dimasukkan ke dalam erlnmeyer 250 ml kemudian ditambahkan dengan TAE 1X sebanyak 30 ml dan erlnmeyer ditutup dengan plastik agar tidak menguap (jangan lupa untuk melubangi plastik penutup agar saat dipanaskan tidak meletus) kemudian dipanaskan menggunakan microwave pada tingkat medium selama \pm 2 menit dan setelah selesai dikeluarkan dari microwave dan didiamkan \pm 2 menit.



(a)



(b)

Gambar 13. (a) Agarose (b) Timbangan Digital

Setelah suhu menurun ditambahkan EtBr 1 μ l dan dihomogenkan dengan cara menggoyang-goyangkan erlmeyer tersebut. Kemudian disiapkan bak pencetak gel (Gambar 14a) yang telah dipasang alas gel (Gambar 14b) dan cairan dalam erlmeyer dituang ke dalam bak pencetak yang di atasnya telah dipasang sisir (Gambar 14c), ditunggu sampai mengeras (berbentuk gel padat) kemudian dilepaskan sisir dengan hati-hati agar gel tidak rusak dan dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan TAE 1X, diusahakan gel terendam seluruhnya oleh TAE agar proses elektroforesis berjalan dengan sempurna.



(a)



(b)

Gambar 14. Peralatan pembuatan gel.
Keterangan; (a) alas gel (b) sisir

Kemudian disiapkan parafilm dan diisi dengan loading dye sebanyak 1 μ l tiap-tiap lubang sebanyak jumlah sampel, kemudian disiapkan sampel yang akan di running (elektroforesis) dan dicampur antara loading dye dengan 2 μ l DNA menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tiap-tiap sumur, sumur pertama diisi dengan DNA leader.

Alat elektroforesis (Gambar 15a) sudah siap untuk dinyalakan dengan cara dihubungkan kabel dari sumber listrik ke tangki elektroforesis kemudian ditutup tangki dan mulai menjalankan dengan menekan tombol 'run' dengan kecepatan setengah (half) untuk elektroforesis hasil ekstraksi dan penuh (full) untuk elektroforesis hasil PCR dan RFLP. Setelah itu ditunggu \pm 45 menit setelah itu gel diangkat dan diamati menggunakan UV transiluminator (Gambar 15b).



(a) (b)
Gambar 15. (a) Peralatan Elektroforesis (b) UV Transiluminator

d. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dilakukan dengan cara disiapkan sampel hasil ekstraksi DNA yang teramplifikasi dan disiapkan eppendorf sesuai dengan jumlah sampel kemudian dimasukkan dalam masing-masing eppendorf sebanyak 2 μ l. Setelah itu ditambahkan dengan 5 μ l PCR mix + $MgCl_2$ 0,3 μ l + Primer F1 0,4 μ l + primer R1 0,4 μ l + Nuclease Free Water 1,9 μ l dan diampifikasi dengan mesin PCR (Gambar 17) sesuai alur pada tabel 4 dibawah ini.

Tabel 4. Program Amplifikasi PCR

No.	Program	Temperature (°C)	Waktu (menit)
1.	<i>Pre denaturation</i>	95°C	3
2.	<i>Denaturation</i>	95	1
3.	<i>Annealing</i>	58	1
4.	<i>Extention</i>	72	1
5.	<i>Final extention</i>	72	7
6.	<i>Cycles</i>	30 X	-
7.	<i>Soak temperature</i>	4	-

Kemudian hasil PCR diamati dengan elektroforesis gel agarose 1% dan diamati dengan UV transiluminator.



Gambar 17. Mesin PCR

e. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RFLP dilakukan dengan cara DNA hasil PCR disiapkan dan dimasukkan ke dalam masing-masing eppendorf sebanyak 2 μ l, setelah itu ditambah dengan enzim EcoRI 1 μ l + ddH₂O 15 μ l + buffer 2 μ l kemudian diinkubasi di dalam waterbath selama 2 jam dengan suhu 37°C. EcoRI disini merupakan enzim pemotongan (*enzym restriction*) yang diisolasi dari *E.coli* strain R1 dengan spesifikasi memotong pada sekuens G AATTC. Setelah diinkubasi segera divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dan diamati dengan UV transiluminator setelah itu dilakukan interpretasi band (pita DNA).

3.4 Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan Hardy-Weinberg. Data yang diperoleh dari hasil interpretasi band yang muncul (teramplifikasi) selanjutnya digunakan untuk menghitung beberapa parameter keragaman genetik populasi yang meliputi;

Frekuensi Alel

Frekuensi alel merupakan prosentase semua alel pada suatu lokus tertentu dalam suatu populasi yang diwakili oleh suatu alel tertentu.

- Frekuensi alel yang terpotong (P)

$$P = \frac{O}{N}$$

- Frekuensi alel yang tidak terpotong (X)

$$X = 1 - P$$

Dimana : O : Jumlah sampel hasil pengamatan

N : jumlah individu yang dianalisis

Frekuensi null Alel (qi)

qi merupakan perbandingan alel hasil pengamatan dengan jumlah sampel.

Frekuensi alel ini dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$q_i = \sqrt{X \left[1 - \frac{VAR X}{8 \times X} \right]^{-1}}$$

Kergaman Genetik Populasi

Hj merupakan keragaman genetik populasi j dalam lokus i. Dimana dapat dihitung melalui rumus di bawah ini:

$$H_j(i) = 2 q_i (1 - q_i) + 2 VAR q_i$$

Rata-rata perbedaan genetik dalam populasi (Hw)

Merupakan hasil akhir akhir dari nilai keragaman genetik dalam masing-masing populasi spesies, perhitungan bisa dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$H_w = \frac{1}{N} \sum H_j(i)$$

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

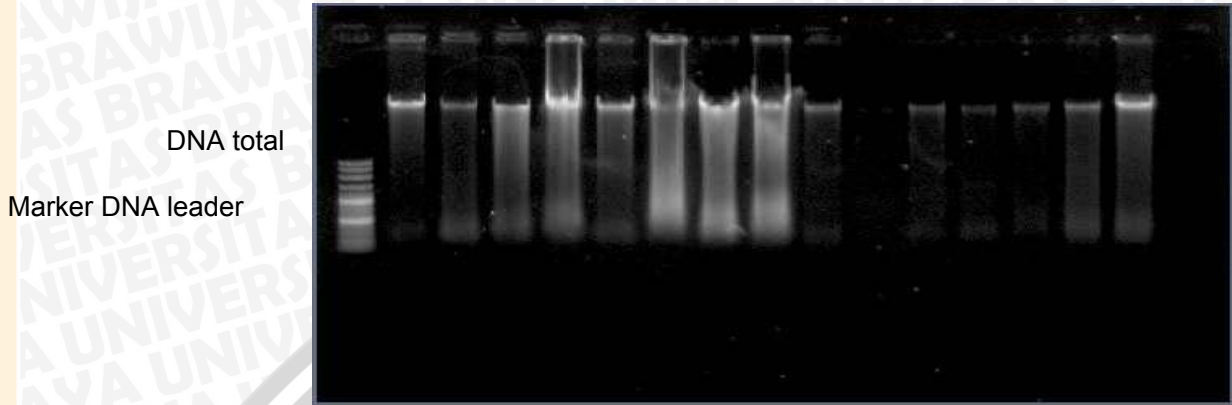
4.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA yang telah dilakukan mengikuti metode ekstraksi menurut Ovenden (2000) yang telah mengalami modifikasi. Modifikasi ekstraksi DNA diantaranya yaitu metode Ovenden yang menggunakan larutan 10% Chelex-100 sedangkan pada ekstraksi yang telah dilakukan menggunakan Lysis Buffer. Lysis Buffer berfungsi sebagai cairan untuk mengamankan hasil ekstraksi DNA dari kerusakan akibat kerja enzim DNase (Haliman dan Adijaya 2005 *dalam* Ryantipoetra 2010).

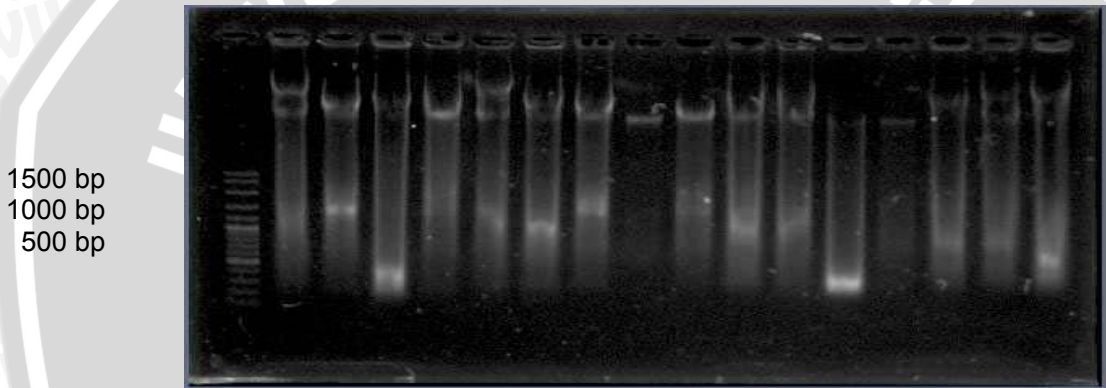
Penggunaan jumlah enzim pro-K menurut Ovenden sebanyak 5 ml sedangkan jumlah pro-K yang telah digunakan selama kegiatan ekstraksi adalah 10 ml. Selama proses inkubasi pada metode Ovenden menggunakan Thermoblock sedangkan pada inkubasi yang dilakukan menggunakan waterbath. Perbedaan lama inkubasi dikarenakan alat yang digunakan berbeda. Pada penggunaan Thermoblock waktu inkubasi selama 2,5 jam dan menjadi 16-18 jam jika menggunakan waterbath. Proses inkubasi menggunakan Thermoblock dilakukan dua kali, yang pertama menggunakan suhu 55°C dan yang kedua 89°C sedangkan pada saat menggunakan waterbath proses inkubasi dilakukan sekali dengan suhu 55°C. Sentrifugasi dengan metode Ovenden dilakukan dalam satu kali proses dengan kecepatan 13.000 rpm sedangkan pada kegiatan sentrifugasi yang telah dilakukan menggunakan kecepatan 10.000 rpm dengan 3 kali proses.

Hasil ekstraksi DNA menunjukkan adanya hasil kemurnian DNA yang berbeda (Lampiran 3 dan 4). DNA dinyatakan murni pada rasio absorbansi 260 nm/280 nm yaitu sekitar 1,8 (Brown, 1991 *dalam* Asmanik, 2003). Pada sampel M3, M9 dan M12 didapatkan nilai absorbansi kurang dari 1,8 yang menunjukkan bahwa sampel hasil ekstraksi tersebut tidaklah murni. Bila tingkat kemurnian DNA kurang dari 1,8

dapat dinyatakan adanya kontaminasi oleh protein dan bila tingkat kemurnian DNA di atas dua, berarti terkontaminasi oleh RNA (Brown, 1991 dalam Asmanik, 2003).



(a)



(b)



(c)

Gambar 18. Hasil ekstraksi DNA

Keterangan; (M=marker, 1-22= nama sampel) (a) *H. asinina* (b) *H. squamata* (c) *H. squamata*

Pada hasil elektroforesis menggunakan gel agarose 1% diperoleh tingkat ketebalan pita yang berbeda. Penampakan pita dengan hasil yang tebal seperti M3, M4, M5xd, M6 dan M7 (Gambar 18) dimungkinkan terjadi kontaminasi pada saat kegiatan ekstraksi dilakukan, baik dari alat dan bahan yang kurang steril maupun terdapat kontaminan dari RNA dan protein. Menurut Comey *et al.* (1994), hasil elektroforesis ekstraksi DNA yang menampakkan smear dapat terjadi karena terkontaminasi oleh RNA maupun protein.

Data hasil tingkat kemurnian DNA dapat dijadikan sebagai acuan dalam penentuan sampel yang akan dilakukan proses selanjutnya yakni (PCR). Pada penelitian ini, terdapat beberapa sampel yang tidak teramplifikasi sehingga dilakukan ekstraksi ulang. Pada sampel *H. asinina* misalnya telah terjadi pengulangan ekstraksi dikarenakan selama proses amplifikasi sampel tidak memunculkan pita.

4.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

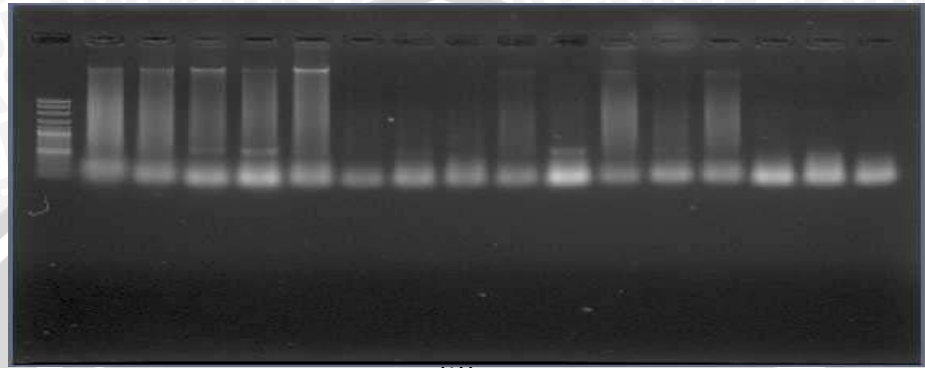
Pada penelitian ini, dapat diketahui bahwa hasil running elektroforesis memberikan gambaran pita tunggal (*single band*) pada fragmen 580 bp. Hal ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi dengan PCR dapat teramplifikasi dengan baik.

Ini berarti pada daerah genom mtDNA tersebut hanya terdapat daerah dengan urutan basa DNA yang dikenali oleh basa-basa primer yang dipakai sehingga pada daerah tersebut dijadikan *template* dan akan menghasilkan pita pada proses amplifikasi. Dikatakan juga bahwa pita yang muncul dari hasil amplifikasi PCR membuktikan bahwa primer-primer yang digunakan tersebut dapat mengamplifikasi daerah target mtDNA secara sempurna. Setiap fragmen hasil PCR berasal dari interaksi antara *template* dan *primer* pada tempat yang berbeda-beda, sehingga masing-masing akan mengamplifikasi panjang yang berbeda (Haryanti *et al.* (2001) dan Sugama (2000) dalam Faqih (2004)).

Hasil amplifikasi PCR diperoleh pita dengan tebal yang berbeda pada hasil amplifikasinya. Terdapat beberapa sampel dimana hasil amplifikasinya tidak terlalu tebal seperti pada sampel M4 dan M6 dan terdapat pula hasil amplifikasi yang tebal seperti M5 dan M14..

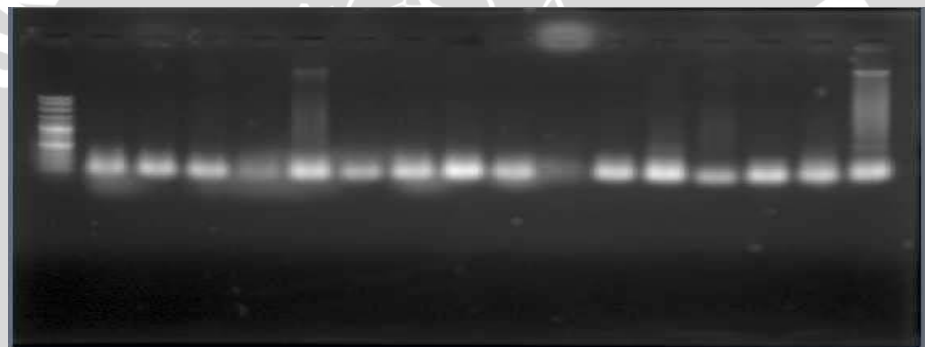
Marker DNA leader

580 bp

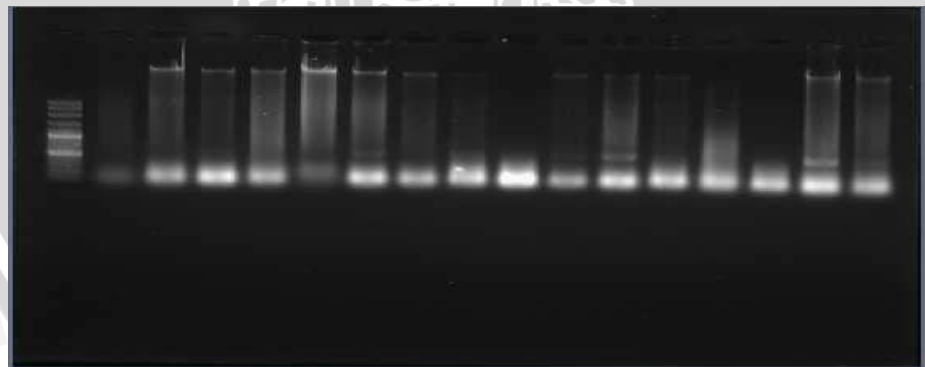


(a)

Marker DNA leader



(b)



(c)

Gambar 19. Amplifikasi PCR,
Keterangan; (M=marker, 1-22=*H. squamata*, 1-14=*H. asinina*), (A) *H. asinina* dan *H. squamata* (B) *H. asinina* (C) *H. squamata*

Menurut Susanto (2002) dalam Asmanik (2003), bahwa genom mtDNA yang memiliki konsentrasi dengan tingkat kemurnian yang tinggi akan menampakkan pita yang jelas, sedangkan mtDNA dengan konsentrasi yang rendah akan terlihat tipis dan samar. Meskipun hasil ekstraksi menunjukkan penampakan pita yang berbeda-beda tingkat ketebalannya, tetapi pada hasil amplifikasi PCR bisa juga muncul pita. Ini dikarenakan DNA target yang dapat dikenali oleh enzim pemotongan terdapat juga pada hasil elektroforesis yang menunjukkan pita tipis.

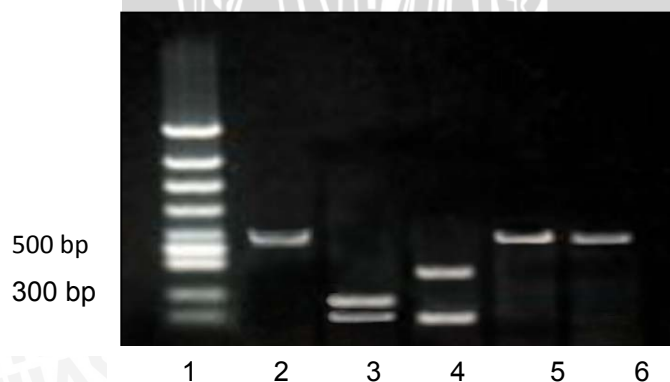
Hasil amplifikasi PCR pada *H. asinina* dan *H. squamata* telah menghasilkan pita tunggal mtDNA pada 580 bp (Gambar 19 a, b, c) dengan menggunakan primer 16S rDNA (F1 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC-3' dan R1 CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3') (Klinbunga, 2003). Saat digunakan primer yang sama pada DNA ikan kerapu sunu (*Plectrophomus leopardus*) diperoleh pita yang dihasilkan pada 625 bp (Permana et Al. 2007). Lebih lanjut Khamnamtong et al. (2005) melaporkan bahwa pada jenis udang-udangan (*P. Monodon*, *P. Semisulcatus*, *F. Merguensis*, *L. Vannamei* dan *M. japonicus*) 16s rDNA akan teramplifikasi pada 560 bp. Hal ini menunjukkan bahwa molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Urutan basa yang variatif menyebabkan inilah yang menyebabkan 16srDNA dari species ikan, moluska dan crustacea memiliki panjang basa yang berbeda.

4.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dengan Enzim EcoRI.

Pada penelitian ini, dapat diketahui bahwa hasil running elektroforesis memberikan gambaran dua pola pita yakni alel A pada 580 bp dan alel B pada 280 bp dan 300 bp. Penciri molekuler DNA *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi dan secara luas telah digunakan untuk mendapatkan gambaran populasi genetik dan juga untuk mengidentifikasi gen-gen yang mengkode sifat-sifat penting (Montaldo dan Herrera 1998 dalam

Jakaria *et al.*, 2007). Gen penyandi yang dimaksud adalah 16S rDNA dimana gen ini merupakan jenis penyandi genetik yang paling sering digunakan daripada 5S maupun 23S dalam penelitian molekuler. 16S lebih sering digunakan karena molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. 16S rDNA dimungkinkan dapat digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme, tetapi organisme yang sekerabat atau identik berdasarkan parameter ini belum tentu memiliki kesamaan fisiologi (Pangastuti, 2006).

Pada penelitian ini metode RFLP dilakukan dengan menggunakan enzim EcoR1 yang memotong pada sekuen (G|AATC) dan menghasilkan dua pola pita yakni 580 bp (alel A) dan 280 bp, 300 bp (alel B) baik untuk populasi *H. asinina* perairan Madura maupun *H. squamata* perairan Bali (Gambar 20). Hal ini menunjukkan bahwa enzim EcoRI merupakan enzim yang cukup informatif pada 16S rDNA abalon baik untuk *H. asinina* dan *H. squamata*. Dilaporkan oleh Klinbunga *et. al* (2003), hasil RFLP menggunakan enzim restriksi EcoR1 menunjukkan pola pada 580 bp. Hasil ini analisa ini telah dilakukan pada *H. asinina* dan *H. varia* di perairan Thailand.



Gambar 20. Pemotongan dengan enzim EcoR1.

Keterangan; 1= marker, 2 dan 3= pemotongan dengan ECoRI, 5 dan 6 = kontrol positif

Dari 55 sampel yang diamati, seluruhnya memiliki pola fragmentasi yang sama yaitu terpotong pada 580 bp dan 280, 300 bp. Hasil tersebut berdasarkan pemotongan oleh satu jenis enzim, idealnya semakin banyak enzim yang digunakan maka hasil yang didapatkan akan semakin akurat. Menurut Soewardi *et al.* (2006) keberhasilan dalam teknik RFLP tergantung pada banyaknya enzim restriksi yang dipakai, semakin banyak enzim maka hasil yang diinginkan akan semakin akurat.

Pada penelitian ini, analisa data dilakukan dengan menggunakan rumus Hardy-Weinberg. Perhitungan secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 10 dan 11 sedangkan hasil perhitungan selama penelitian dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Frekuensi Alel, Chi-Square, Keragaman Genetik dan Rata-Rata Perbedaan Genetik Populasi *H. asinina* Perairan Madura dan *H. squamata* Perairan Bali.

No	Parameter	<i>H. asinina</i>	<i>H. squamata</i>
1	Frekuensi alel yang terpotong (P)	Alel A = 0,8 Alel B = 0,2	0,9 0,1
2	Nilai chi-square harapan Hardy-Weinberg (X^2)	25	30
3	Frekuensi Alel Null (qi)	qi A = 0,97 qi B = 44,97	qi A = 0,527 qi B = 0,52
4	Keragaman Genetik Populasi j pada Lokus i	Alel A = 0,711 Alel B = 0,54	0,942 0,904
5	Rata-rata Perbedaan Genetik di dalam Populasi	0,055	0,06

Dari tabel yang diperoleh dapat diketahui bahwa variasi alel yang dimiliki oleh *H. squamata* dan *H. asinina* adalah sama, yakni alel A dan alel B. Adapun genotip yang muncul adalah genotip AA dan BB. Genotip AA pada satu pita yaitu 580 bp dan genotip BB pada dua pita yaitu 280, 300 bp. Data hasil perhitungan menunjukkan bahwa frekuensi alel A untuk *H. asinina* yakni 0,8 dan frekuensi alel B sebesar 0,2 dan hasil frekuensi alel untuk *H. squamata* berturut-turut untuk alel A dan alel B yaitu 0,9 dan 0,1. Hasil perhitungan frekuensi alel tersebut didapatkan dari hasil bagi antara jumlah alel berdasarkan pengamatan dengan jumlah keseluruhan sampel untuk *H. asinina* dan *H. squamata*. Menurut Nei dan Kumar (2000) dalam Dinoyo (2007), frekuensi alel adalah frekuensi relatif dari suatu alel

dalam populasi atau jumlah suatu alel terhadap jumlah total alel yang terdapat dalam suatu populasi.

Variasi genetik pada hewan laut rata-rata memiliki nilai variasi sebesar 0,6-0,9 (Nugroho, 2002). Nilai H_w untuk *H. asinina* sebesar 0,055 dan H_w untuk *H. squamata* sebesar 0,06. Hal ini menunjukkan bahwa gen 16S sebagai penunjuk keragaman genetik dari abalon sampel termasuk relatif konservatif. Sugama *et al.* (1996), mengatakan bahwa pada lingkungan yang stabil akan lebih sedikit ditemukan variasi alel daripada pada kondisi yang labil, karena laju mutasi dan seleksi lingkungan relatif rendah. Selain itu gen 16 S yang di potong oleh enzim EcoR1 pada *H. asinina* dan *H. squamata* dapat diketahui merupakan gen yang relatif konservatif, sehingga tidak banyak mengalami perubahan. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa 16S rRNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua taksa, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA-DNA Stackebrandt dan Goebel (1995) dalam Pangastuti (2006).

Pangastuti (2006) melaporkan, jika derajat kesamaan urutan basa gen penyandi 16S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru. Tetapi terdapat kasus yang berbeda pada penganalisaan kekerabatan berdasarkan gen 16 S pada kelompok bakteri, dimana walaupun kesamaan gen penyandi 16 S *Mycobacterium avium* dan *M. Intracellulare* mencapai 99,8% identik Bodinghaus *et al.* (1990) dalam Pangastuti (2006), tetapi keduanya dapat dibedakan menjadi kluster yang terpisah berdasarkan sekuens dua gen penyandi protein, yaitu *hsp* Kapur *et al.*, (1995) Ros dan Belak (1996) dalam Pangastuti (2006) serta protein 32 kDa Soini *et al.*, (1994) dalam Pangastuti (2006). Untuk menggambarkan keanekaragaman dengan fungsi secara ekologi, diperlukan analisis suatu gen yang

fungsional yang mengkodekan suatu protein. Pada gen semacam ini, keragaman pada tingkat DNA tidak selalu menghasilkan keragaman pada tingkat protein karena adanya *third codon wobble*. Kurang diskriminatifnya gen penyandi 16S rRNA dibandingkan dengan gen pengkode protein adalah karena gen fungsional berevolusi lebih cepat dibandingkan dengan gen 16S rRNA, karena berhubungan erat dengan proses adaptasi Avise (1994) dalam Pangastuti (2006). Populasi yang berbeda secara ekologi mungkin baru saja berevolusi, dan perubahan ini baru dapat diakumulasikan pada lokus yang berevolusi secara cepat, sehingga belum sempat diakumulasikan pada gen yang konservatif seperti gen 16S rRNA Palys *et al.* (1997) dalam Pangastuti (2006).

Selain dari faktor genetik, faktor lingkungan dan cara hidup juga mempengaruhi ada tidaknya perubahan struktur genetik dari suatu organisme, Permana *et al.* (2007) mengatakan, bahwa populasi dengan variasi genetik yang rendah diketahui hidup dan berkembang biak dari lingkungan yang relatif sama dan tidak mengalami perubahan, hal ini menyebabkan pada hasil keturunan yang memiliki nilai heterogenitas yang rendah. Dapat diketahui juga bahwa pergerakan abalon sangat terbatas, hal ini dikarenakan abalon bisa berpindah secara bebas pada fase trochopore sampai fase veliger disaat abalon abalon masih berifat planktonik. Masa perpindahan tempat tersebut dimulai dari 19 jam setelah menetas sampai berumur 2,5 hari. Setelah fase tersebut abalon sudah memulai untuk hidup menempel pada substrat berbatu dan berpindah tempat hanya pada malam hari untuk mencari makan dan menghindarkan diri dari mangsa (Totopando, 2009). Sifat dan tingkahlaku seperti ini pula yang dapat menyebabkan abalon tidak mengalami perubahan baik secara fisiologis maupun genetik karena jarang melakukan perpindahan tempat.

Klinbunga *et al* (2003) dalam penelitiannya mensekuensing rangkaian basa dari 16 S abalon *H. asinina* yang di potong oleh empat enzim (BamH1, EcoR1, Alu1, Hae111) dari pola pemotongan enzim tersebut, didapatkan hasilpemotongan yang

memiliki pola pita berbeda pada hasil Referse (R). Berikut adalah hasil sekuensing susunan urutan basa hasil pemotongan oleh enzim EcoR1 pada H.asinina.

- 16S F

AABB - CCCGGT GACTTA CGGGTT AAACGG CCGCCG TACTACT GACCCG
TGCAAA GGTAGC ACAATCA

ABBB - CCCGGT GACTTA CGGGTT AAACGG CCGCCG TACTACT GACCCG
TGCAAA GGTAGC ACAATCA

- 16S R

AABB - AGTAAA TTAAAT TTGGTC TGCTGA CTGATG ATCCGG CATTGT
CGATTA TCGGAA AAAGT

ABBB - AGTAGA TTGAAT TTGGTC TGCGA CTGATG ATCCGA CATTGT
CGATTA TCGGAA AAAGT



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Ekstraksi DNA yang telah dilakukan menggunakan metode Ovenden. Ekstraksi dilakukan pada daging kaki abalon.
- Dari 55 sampel yang telah dikumpulkan didapatkan nilai kemurnian DNA di atas 1,8 pada 52 sampel. Dimana hal ini menunjukkan bahwa kegiatan ekstraksi telah berhasil.
- Terdapat beberapa kali ekstraksi dikarenakan pada ekstraksi awal tidak didapatkan hasil.
- Pada amplifikasi PCR didapatkan single band pada 580 bp. Primer yang digunakan F1 5'-CGC CTG TTT AAC AAA AAC-3' dan R1 CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3'
- Teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) menggunakan enzim restriksi EcoR1 dapat digunakan sebagai marker spesifik untuk Abalon (*H. asinina* dan *H. squamata*).
- Enzim EcoR1 merupakan enzim restriksi yang diisolasi dari *E. Coli*. Enzim ini memotong khusus pada seken G |ATTC.
- Hasil pemotongan menunjukkan dua pola pita, pola A pada 580bp dan pola B pada 280 dan 300 bp baik pada populasi *H. asinina* maupun *H. squamata*.
- Nilai rata-rata perbedaan genetik dalam populasi abalon (*H. asinina*) perairan Madura sebesar 0,055 dan dalam populasi abalon (*H. squamata*) perairan Bali sebesar 0,06 hal ini menunjukkan bahwa gen 16S pada populasi abalon *H. asinina* dan abalon *H.squamata* yang telah dikenali termasuk dalam gen yang relatif konservatif yang tidak terlalu berubah mulai dari tetua sampai skarang dan termasuk cukup informatif untuk digunakan menganalisa keragaman genetik abalon,

- Enzim EcoRI merupakan enzim restriksi yang bisa digunakan untuk memotong susunan basa pada Abalon H. asinina dan H. squamata dibandingkan dengan enzim Alu I dan HaeIII.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan adalah :

- Diperlukan analisa dengan metode lain secara lebih lanjut misalkan dengan dendogram.
- Pada saat penelitian berlangsung diharapkan kondisi alat dan bahan dalam keadaan bersih sehingga dapat menghindari kontaminasi akibat kondisi yang kurang bersih.
- Perlu penelitian lanjutan dengan menggunakan enzim-enzim restriksi yang lain.
- Perlu dilakukan perbanyak sampel agar kemungkinan keberhasilan semakin besar.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous . 2010a. **Abalon**. <http://en.wikipedia.org/wiki/Abalon>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- _____. 2010b. **Biologi Molekular**. http://wikipedia.mobi/id/biologi_molekular. diakses pada tanggal 29 Januari 2010 pukul 16.45 WIB
- _____. 2009a. **Pengertian PCR**. <http://www.wikipedia.com>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- _____. 2009b. **Reaksi Berantai Polimerase**. <http://www.wikipedia.com>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- _____. 2009c. **Teknik PCR, RFLP dan STR-CODIS 13**. <http://oefy.blogmalhikdua.com/index.php/archives/184>. diakses pada tanggal 29 Januari 2010 pukul 16.45 WIB
- _____. 2006. **Unggulnya Akuakultur Indonesia**. <http://www.dkp.go.id>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- Admin. 2008. **Biologi Kerang Abalon**. <http://www.greenfinsindonesia.org/smf/index.php?action=printpage;topic=85.0>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- Alfi. 2010. **Laporan Manajemen Pemberian Pakan (Juvenil *H.asinina*)**. <http://alfi065.wordpress.com/2009/07/09/laporan-manajemen-pemberian-pakan-juvenil-h-asinina/>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- Asmanik. 2003. **Kajian Variasi Genetik Udang Api-Api (*Metapenaeus monoceros*, Fab.) Di Perairan Jawa Timur Dan Sulawesi Selatan Dideteksi Melalui Analisis RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) *mtDNA***. Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang. 17 hal.
- Beaumont, A.R and K, Hoare. 2003. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture**. School of Ocean Sciences University of Wales, Bangor, UK. London. p.1-65
- Comey, *et.al*.1994. **Pengumpulan Sampel dan Ekstraksi DNA**. <http://www.freewebs.com/pengumpulansampeldna/ekstraksidna.htm>. diakses pada tanggal 08 Juni 2010 pukul 20.35 WIB.
- Dinoyo, R. 2007. **Identifikasi Keragaman Gen *Calpastatin* Domba Lokal (*Ovis aries*) dengan Metode PCR-RFLP dan Hubungannya dengan Bobot Badan**. IPB. Bogor. 8 hal.

Fais. 2010. **Analisis protein.**
<http://kutankrobek.wordpress.com/2009/10/20/analisis-protein/>. Di akses pada tanggal 21 Juni 2010 pukul 13.05 WIB.

Fallu, R. 1991. **Abalon Farming.** Fishing News Book. England. 175 hal

Faqih, Abd. Rahem. 2004. **Optimasi Analisis Hasil Kajian Keragaman Genetik Udang *Metapenaeus Monoceros* Selat Makasar Berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* dan *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) mtDNA*.** Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang. 123 hal.

Fatchiyah dan Arumingtyas, E.L. 2006. **Analisa Biologi Molekuler (Isolasi DNA, PCR dan RFLP, SDS-PAGE, Immunobloting dan Isoenzym).** Tim Lab Biologi Molekuler dan Seluler JB-UB Universitas Brawijaya. Malang. 237 hal.

Jakaria, D. Duryadi, R. R. Noor, B. Tappa dan H. Martojo. 2007. **Evaluasi Keragaman Genetik Gen Hormon Pertumbuhan (GH) pada Sapi Pesisir Sumatra Barat Menggunakan Penciri PCR-RFLP.** Media Peternakan hlm 1-10, ISSN 0126-0472 Vol.30 No.1.

Khamnamtong, B. Sirawut Klinbunga and Piamsak Menasteva. 2005. **Species Identification of Five Penaeid Shrimps Using PCR-RFLP and SSCP Analyses of 16S Ribosomal DNA.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 38, No. 4, July 2005, pp. 491-499

Klinbunga. S, Pripue. P, Khamnamthong. N, Puanglarp. N, Tassanakajon. A, Jarayabhand.P, Hirono.I, Aoki. T, and Menasteva. P. 2003. **Genetic Diversity and Molecular Markers of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand.** Marine Biology. Springer- Verlag Newyork Inc.pag 1-10.

Ngili Yohanis. 2004. **Mengenal DNA mitokondria dan Aplikasinya.**
<http://kompas.com/kompas-cetak/0311/04/inspirasi/664826.ht> diakses pada tanggal 01 07 2010 pukul 16.05 wib

Nugroho, E. 2002. **Rapid Fluctuation of Genetic Variability in Artificially Propagated Population of Red Sea Bream.** Indonesian Journal Agriculture Biotechnology. Indonsian Agency for Agriculture Research and Development. 7(1):1-7

Ovenden. J. 2000. **Development of Restriction Enzym Markers for Red Snapper (*Lutjanus erythropterus* and *Lutjanus malabaricus*) tock Discrimination.** Pag. 68-82.

Pangastuti, A. 2006. **Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein Species definition of procaryotes based on 16S rRNA and protein coding genes sequence.** Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta. Jurnal BIODIVERSITAS Volume 7, Nomor 3 Juli 2006 Halaman: 292-296.

- Permana. 2007. **Variasi Genetik Ikan Tuna Sirip Kuning *Thunnus albacares* dengan Analisis Elektroforesis Allozyme dan Mt-DNA**. Gondol. Bali. Jurnal Ristek Akuakultur Vol.2 No.1 Tahun 2007;41-50.
- Rizki. 2008. **Isoasi DNA Tanaman Pisang (*Musa sp.*)**. <http://isolasidna.blogspot.com/> . diakses pada tanggal 08 Juni 2010 pukul 20.35 WIB.
- Rustidja. 2002. **Diktat Kuliah Breeding dan Reproduksi Hewan Air**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 112 hal.
- Ryantipoetra. 2010. **Polymerase Chain Reaction (PCR)**. <http://blog.beswandjarum.com/solehrifai/2010/04/25/polymerase-chain-reaction-pcr/> diakses pada tanggal 08 Juni 2010 pukul 20.35 WIB
- Soewardi dan Suwarso. 2006. **Variasi Geografik dalam Struktur Genetik Populas Ikan Kakap Merah (*Lutjanus malabaricus*) dan Interaksi Lingkungan di Laut Jawa**. Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia, Juni 2006, Jilid 13. Nomor:1:69-75.
- Stansfield, W.D., J.S. Colome, R.J. Cano. 2006. **Biologi Molekuler Dan Sel**. Penerbit Erlangga. Jakarta. 120 hal
- Sugama, K. 1988. **Population Genetics Analysis of Seabream**. Pagrus mayor Thesis. For Degree of Master of Science. Kochi University. Japan. Pag.1-8.
- Suhardjono. 1995. **Pengetahuan, Ilmu, Filsafat Ilmu dan Penelitian**. Universitas Brawijaya. Malang. 98 hal.
- Surakhmad. W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar, Metode dan Teknik, Edisi kedelapan**. Tarsito. Bandung. 143 hal.
- Suryabrata, Sumadi. 1983. **Metodologi Penelitian**. CV Rajawali. Jakarta. 20 hal
- Suryanto, D. 2006. **Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler**. Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. 12 hal.
- Thyni. 2010. **Budidaya Abalone**. <http://thyniimoet.blogspot.com/2009/03/budidaya-abalone.html> di akses pada tanggal 07 Januari 2010 pukul 11.30 WIB.
- Tisna K. 2008. **Pemeliharaan Kerang Abalon (*Haliotis asinina*) dengan Metode Pen-Culture (Kurungan Tancap) dan Keramba Jaring Apung (KJA)**. <http://kekerangan.blogspot.com/2008/08/pemeliharaan-kerang-abalon-haliotis.html>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.
- Tjahjoleksono, A. 2002. **Teknologi DNA Rekombinan**. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 15 hal
- Totopando. 2009. **Sekilas Tentang Abalon (*Haliotis asinina*)**. <http://daurhidupabalon.html>. diakses pada tanggal 15 Februari 2010 pukul 18.05 WIB.

Tang, S, A. Popongviwat, S. Klinbunga, A. Tassanokajon, P. Jayabhand, and P. Menasveta. 2005. **Genetic Heterogeneity of the Trofical Abalon (*Haliotis asinina*) Revealed by RAPD and Microsatellite Anallyses.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38 (2) :182-190.

Taniguchi, N dan Tabata, K. 2000. **Differences Between *Pagyrus major* and *P.auratus* Through Mainly mtDNA Control Region Analysis.** Fisheries Science 66 (1).

