

## **IDENTIFIKASI FRAGMEN DNA MIOGLOBIN SEPANJANG 114PB PADA BEBERAPA JENIS HEWAN LAUT YANG MAMPU HIDUP PADA ZONA MINIMUM OKSIGEN**

*Identification of Myoglobin DNA Fragment Homology along 114bp in Some Kind of Marine Animal which Able to Live in Oxygen Minimum Zone*

**ISRINA FEBIANTI, RINI PUSPITANINGRUM & RUSDI**

*Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta (UNJ). Jl. Pemuda No. 10 Rawamangun, Jakarta Timur. 13220. Indonesia.*

Email: isrinafeby@gmail.com

Tanggal publikasi online:

---

### **ABSTRACT**

Myoglobin is a hemoprotein that contributes to intracellular oxygen storage and facilitates diffusion oxygen into mitochondria. Myoglobin production will increase as low levels of environmental oxygen called hypoxia. When oxygen in tissue is low, the body will respond by forming myoglobin in some tissues, such as muscle tissue. The aims of this study was to detect DNA fragments of myoglobin along 114pb in muscle tissue of marine animals are capable to live in the oxygen minimum zone, such as the green turtle, mackerel tuna and hammerhead sharks. The oxygen minimum zone is zone of oceans which have low dissolved oxygen levels at  $> 1,4\mu\text{LO}_2\text{L}^{-1}$ , the oxygen levels can be categorized as hypoxic conditions. This study was conducted in the Biochemistry laboratory, State University of Jakarta. This study used descriptive method by PCR and electrophoresis. The results indicated that myoglobin found in muscles of marine animals were capable live in oxygen minimum zone such as the green turtle, mackerel tuna and hammerhead shark. This information can be used as the basic that the tissue able to make adaptation strategy towards low oxygen environmental levels by increasing formation of myoglobin in muscle tissue.

*Kata kunci: Myoglobin DNA, Green Turtle, Mackerel Tuna and Hammerhead Sharks.]*

---

### **PENDAHULUAN**

Mioglobin merupakan hemoprotein, yang memiliki gugus hem berupa besi (fe) (Husnil, 2012). Mioglobin berperan sebagai tempat penyimpanan O<sub>2</sub> serta memfasilitasi difusi O<sub>2</sub>. Saat jumlah oksigen dalam darah cukup untuk melakukan transfer elektron di mitokondria mioglobin akan mengikat oksigen dengan afinitas yang tinggi, dan pada saat tekanan oksigen parsial yang rendah membuat mioglobin akan melepas oksigen dan memfasilitasi difusi oksigen dari sarkolema menuju mitokondria. Konsentrasi mioglobin akan meningkat pada kondisi dimana kadar O<sub>2</sub> rendah

(Postnikova et al., 2013).

Perairan laut memiliki zona dengan kadar oksigen yang rendah. Zona tersebut merupakan zona oksigen minimum, zona ini berada pada kedalaman 500-2500mdpl (Roger, 2000). Menurut Fisher et al., (2012), kadar oksigen rendah dalam lautan dikarenakan sirkulasi oksigen pada zona lautan tersebut kurang baik. Menurutnya bahwa pada wilayah tropical North Atlantic Ocean, zona oksigen minimum terdapat pada kedalaman 200-700mdpl.

Zona pelagik di perairan laut termasuk ke dalam zona oksigen minimum. Hal ini diketahui berdasarkan adanya penurunan habitat ikan pelagik akibat adanya zona oksigen minimum (Stramma et al., 2011). Hewan laut yang mampu hidup pada zona oksigen minimum diantaranya yaitu penyu hijau, ikan tongkol, dan ikan hiu martil. Hewan tersebut mampu hidup pada kedalaman > 200m di bawah permukaan laut. Beberapa hewan laut yang memiliki kadar mioglobin yang tinggi adalah ikan tongkol, tuna, dan sarden (Thiansilakul et al., 2011). Protein mioglobin merupakan protein penting bagi hewan untuk dapat bertahan hidup dalam kondisi kekurangan oksigen (hipoksia). Hewan yang hidup pada kondisi kekurangan oksigen akan melakukan mekanisme adaptasi dengan meningkatkan kadar mioglobin pada jaringan, salah satunya pada jaringan otot. Langkah awal untuk mengetahui mengenai hal tersebut yaitu dengan mendeteksi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada jaringan otot hewan laut yang mampu hidup pada zona minimum oksigen seperti penyu hijau, ikan tongkol, dan ikan hiu martil.

## **METODOLOGI PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. gen mioglobin yang telah diamplifikasi kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 2% dan didokumentasikan. setelah itu, pita positif berupa fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb yang terbentuk akan disekuensing dan di BLAST untuk mengetahui keabsahan hasil amplifikasi fragmen DNA mioglobin. Sampel penelitian adalah jaringan otot penyu hijau, ikan tongkol, dan ikan hiu martil sebanyak 40mg.

### ***Isolasi DNA genom***

Pengisolasian DNA dilakukan dengan menggunakan Wizard Genomic Purification Kit. Sampel Otot dihancurkan menggunakan mortar. Sampel otot yang telah halus dimasukkan kedalam tabung mikro sebanyak 40mg. Selanjutnya, pengisolasian DNA genom sampel otot dilakukan berdasarkan protokol Wizard Genomic Purification Kit dengan beberapa modifikasi, yaitu penambahan Proteinase K dan perubahan suhu inkubasi menjadi 55°C. Sampel yang telah diisolasi akan dihitung indeks kemurnian dan konsentrasinya menggunakan spektrofotometer Maestro Nanodrop. DNA genom yang berkonsentrasi tinggi dan murni disimpan dilemari pendingin pada suhu -4°C untuk digunakan pada proses PCR.

### ***Amplifikasi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb***

Amplifikasi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb dilakukan dengan kit Taq Polimerase: KAPA Taq Ready mix. Primer yang digunakan untuk memperoleh fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb adalah : Primer reverse (Myo Turtle 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'). Konsentrasi DNA template

100ng/ul dan suhu annealing 58°C, serta jumlah siklus 40 kali.

### ***Deteksi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb menggunakan metode elektroforesis agarosa 2%.***

Deteksi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb dilakukan dengan metode elektroforesis agarosa 2%. Hasil PCR sebanyak 50µL dan 5µL marker DNA (KAPA Universal Ladder) dimasukkan kedalam sumur agarosa. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100V selama 55 menit. Visualisasi dilakukan dengan UV-transilluminator. Hasil berupa pita positif sepanjang 114pb didokumentasikan kemudian agarosa yang berisikan pita positif dipotong kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro.

### ***Sekuensing Fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb Pemurnian gel dengan QIAquick Gel Extraction Kit***

Tahap awal untuk melakukan sekuensing, yaitu dengan melakukan pemurnian gel yang berisi pita positif berupa fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb. Gel agarosa yang berisi pita positif sebanyak 300mg dimurnikan menggunakan QIAquick Gel Extraction Kit. Proses pemurnian gel dilakukan sesuai dengan Protokol yang dianjurkan oleh QIAquick Gel Extraction Kit. konsentrasi dan kemurnian DNA hasil pemurnian dihitung menggunakan spektrofotometri Maestro Nanodrop, kemudian sampel dengan hasil pemurnian yang baik (konsentrasi DNA mencapai 50ng/µL dan kemurnian > 1,8) akan disekuensing. Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan sampel yang telah dimurnikan ke macrogen melalui jasa pengiriman sekuensing Bio SM.

### ***Uji Keabsahan hasil amplifikasi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb***

Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin digabungkan dengan menggunakan software Bioedit sehingga membentuk fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb. Urutan nukleotida sepanjang 114pb yang telah digabungkan diBLAST menggunakan program bioinformatika BLASTN untuk mengetahui keabsahan nukleotida dan BLASTX untuk mengetahui keabsahan asam amino dari hasil amplifikasi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb. Program BLASTX dan BLASTX diakses melalui NCBI.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### ***DNA Genom***

Hasil isolasi mempunyai Indeks kemurnian lebih dari 1,8 dan memiliki konsentrasi yang besar (>100ng/µL). Konsentrasi DNA tertinggi adalah 213,48ng/µL yaitu pada sampel ikan pari

**Tabel 1. Hasil serapan absorbansi spektrofotometri Maestro Nanodrop serta konsentrasi DNA genom.**

<b>Sampel</b>	<b>A230 (nm)</b>	<b>A260 (nm)</b>	<b>A280 (nm)</b>	<b>A260/ A230 (nm)</b>	<b>A260/ A280 (nm)</b>	<b>[DNA] (ng/µl)</b>
<b>Penyu hijau</b>	2,644	4,111	2,155	1,555	1,908	205,56
<b>Ikan tongkol</b>	1,729	3,513	3,354	1,047	2,032	175,64
<b>Ikan hiu martil</b>	3,683	3,371	1,790	0,915	1,884	168,55

kupu-kupu, sedangkan konsentrasi DNA terendah adalah 168,55 ng/ $\mu$ L yaitu pada sampel ikan hiu martil (Tabel 1).

Teknik dalam pembuatan homogenat untuk memperoleh supernatan dalam proses pengisolasian DNA, dapat mempengaruhi hasil yang akan di dapatkan (Burden, 2012).

Berdasarkan informasi tersebut maka pada isolasi dilakukan penghancuran jaringan dilakukan menggunakan mortar. Menurut Burden (2012) Mortar merupakan alat tradisional yang digunakan untuk menghancurkan jaringan maupun pembuatan homogenat. Kelebihan menggunakan mortar dalam menghancurkan jaringan yaitu dapat menghasilkan partikel-partikel yang halus namun hasil yang di dapatkan akan berkurang. Oleh karena itu pada saat penghancuran sampel jumlah sampel yang di hancurkan cukup banyak.

Selain mengubah cara menghancurkan jaringan, juga dilakukan modifikasi lain yaitu meningkatkan jumlah sampel jaringan menjadi 2 kali lipat, penambahan Proteinase K dan perubahan suhu inkubasi menjadi 55°C. Penambahan proteinase K bertujuan untuk mendegradasi protein. Proteinase K adalah sebuah enzim proteinase yang diekstrak dari

*Tritirachium album*. Proteinase merupakan enzim yang dapat mengubah protein menjadi peptida dan dapat menjadi agen pelindung dalam ekstraksi DNA dengan cara mengaktivasi endrogen nuclease (Cabral et al., 2000). Selanjutnya Pengubahan suhu inkubasi menjadi 55°C merupakan suhu optimum proteinase K. Proteinase K aktif pada suhu berkisar 55-60°C (Cabral et al., 2000).

Berdasarkan pengukuran indeks kemurnian serta konsentrasi menggunakan alat Maestro Nanodrop menunjukkan bahwa DNA genom yang diperoleh memiliki nilai indeks kemurnian DNA yang baik (>1,8) (Tabel 5). DNA dapat dikatakan memiliki kemurnian yang baik jika memiliki indeks kemurnian berkisar 1,8-2,0 (Sulandari dan Zein, 2003).

Hasil Isolasi DNA umumnya mengandung; RNA, protein maupun Polisakarida (Pharmawati,



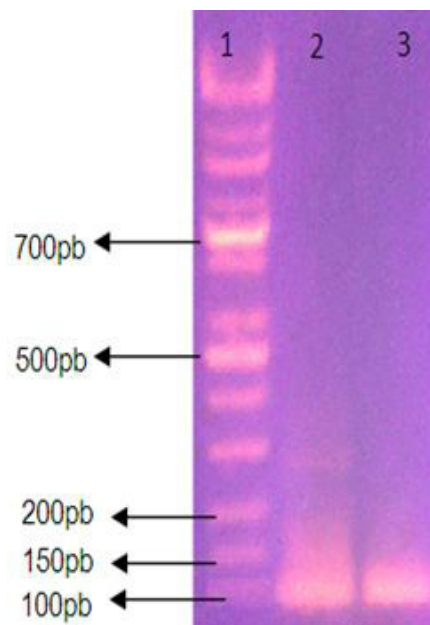
**Gambar 1.** Pita positif sampel penyusut pada beberapa suhu annealing. (kolom M: marker DNA (Promega Ladder 100bp), kolom 1: 55°C, kolom 2: 56°C, kolom 3: 57°C, kolom 4: 58°C, kolom 5: 59°C, kolom 6: 60°C, kolom 7: 61°C, kolom 8: 62°C).

2009). Kontaminasi berupa RNA dapat dihilangkan dengan menggunakan enzim pendegradasi RNA yaitu RNase.

### ***Visualisasi Hasil PCR***

Fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb berhasil diamplifikasi dengan suhu annealing 58°C dan jumlah siklus 40 kali dan menunjukkan pita positif dengan densitas yang tebal. Visualisasi hasil PCR dalam agarosa 2% dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

Keberhasilan dalam teknik PCR, dipengaruhi oleh suhu annealing. Menurut Henegariu et al., (2007) proses penempelan primer pada DNA template dipengaruhi oleh ketepatan suhu pada proses annealing. Primer yang digunakan dalam optimasi PCR memiliki T<sub>m</sub> sebesar 60°C untuk



**Gambar 2.** Pita Positif pada beberapa sampel (kolom 1: marker DNA (Kappa Universal Leader 100bp), kolom 2: hiu martil, kolom 3: ikan tongkol)

primer Myo Turtle F1 sedangkan pada Myo Turtle R1 memiliki T<sub>m</sub> sebesar 58°C. Berdasarkan hal tersebut maka suhu annealing berkisar 54-64°C. Suhu annealing yang digunakan pada suatu primer berkisar antara 3-5°C dari nilai rata-rata temperature melting (T<sub>m</sub>) (Sambrook dan david, 2001).

Suhu annealing optimal dalam menghasilkan fragmen DNA gen mioglobin sepanjang 114pb yaitu 58°C (Gambar 1 dan 2). Menurut Kolmodin dan Brich (2002) modifikasi program PCR dapat dilakukan dengan memodifikasikan suhu annealing serta penambahan jumlah siklus pada reaksi PCR.

Mioglobin merupakan gen konstitutif yaitu gen yang secara terus menerus diekspresikan di dalam sel. pengekspresian mioglobin akan meningkat sebagai respon adaptasi terjadinya peningkatan kebutuhan protein mioglobin dalam jaringan.

### ***Keabsahan fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb***

Hasil BLASTN menunjukkan bahwa urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin penyu hijau memiliki kesamaan dengan data nukleotida fragmen gen mioglobin pada penyu hijau NCBI yaitu 99%. Sedangkan hasil BLASTX menunjukkan bahwa urutan asam amino penyu hijau menunjukkan kesamaan sebesar 100% dengan fragmen gen mioglobin pada penyu hijau NCBI. Hasil BLASTN

dapat dilihat pada Gambar 4. dan BLASTX dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil amplifikasi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb benar. Salah satu program yang digunakan untuk analisis homologi maupun keabsahan nukleotida maupun protein pada suatu organisme yaitu program bionformatika BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST adalah program yang digunakan untuk membandingkan

### Penyejajaran sekuen nukleotida penyuh hijau dengan penyuh hijau NCBI

Chelonia mydas myoglobin (Mb) mRNA, partial cds  
 Sequence ID: **gb|HQ148882.1** | Length: 465 | Number of Matches: 1  
 Range 1: 187 to 300

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
201 bits(222)	1e-48()	113/114(99%)	0/114(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 1  AAGAAGCATGGAAGTACTGTCTTACCGCCCTGGGCAGGATCCTGAAGCAGAAGAACAAT 60
          |||
Sbjct 187  AAGAAGCATGGAAGTACTGTCTTACCGCCCTGGGCAGGATCCTGAAGCAGAAAAACAAT 246

Query 61  CATGAACAGGAGCTGAAGCCACTGGCAGAGAGCCATGCCACCAAGCATAAAATC 114
          |||
Sbjct 247  CATGAACAGGAGCTGAAGCCACTGGCAGAGAGCCATGCCACCAAGCATAAAATC 114
  
```

**Gambar 4.** Penyejajaran urutan nukleotida fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada penyuh hijau dengan data urutan nukleotida penyuh hijau diNCBI

### Penyejajaran residu asam amino penyuh hijau dengan penyuh hijau NCBI

myoglobin [Chelonia mydas]  
 Sequence ID: **gb|ADM87986.1** | Length: 38 | Number of Matches: 1  
 Range 1: 1 to 38

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
75.9 bits(185)	5e-17()	Compositional matrix adjust.	38/38(100%)	38/38(100%)	0/38(0%)	+1

Features:

```

Query 1  KKHGTTVLTALGRILKQKNNHEQELKPLAESHATKHKI 114
          |||
Sbjct 1  KKHGTTVLTALGRILKQKNNHEQELKPLAESHATKHKI 38
  
```

**Gambar 5.** Penyejajaran asam amino fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada penyuh hijau dengan data urutan nukleotida penyuh hijau diNCBI.

urutan nukleotida dan protein dengan database untuk menghitung signifikansi statistik perbandingan, dan digunakan untuk menyimpulkan hubungan evolusi antar urutan nukleotida dan urutan peptida (Nandikolla dan shaik, 2011).

Jenis BLAST diantaranya BLASTN dan BLASTX. BLASTN merupakan program BLAST yang membandingkan urutan nukleotida yang akan disejajarkan dengan urutan nukleotida pada database. Sedangkan BLASTX adalah program BLAST yang membandingkan urutan asam amino yang berasal dari urutan nukleotida telah diterjemahkan terlebih dahulu dengan urutan asam amino pada database (Pertsemliadis dan Fondon, 2001).

## KESIMPULAN

1. Telah terdeteksi fragmen DNA mioglobin sepanjang 114pb pada otot penyuh hijau, ikan

tongkol, dan ikan hiu martil.

2. Program Bioinformatika BLAST dapat digunakan untuk mengetahui keabsahan suatu urutan nukleotida dan asam amino.

## DAFTAR PUSTAKA

- Burden, W. David. Guide to the Disruption of Biological Samples – 2012. Random Primers, Issue No. 12 : 1-25.
- Cabral, H., M.T. Ruiz., C.M.A. Carareto., dan G.O. Bonilla-Rodriguez. 2000. A plant proteinase, extracted from *Bromelia fastuosa*, as an alternative to proteinase K for DNA extraction. *Dros. Inf. Serv.* 83:178-185.
- Fischer, T., Banyte, D., Brandt, P., Dengler, M., Krahnmann, G., Tanhua, T., dan Visbeck M. 2012. Diapycnal Oxygen Supply To The Tropical North Atlantic Oxygen Minimum Zone. *Bio-geosciences Discuss.* 9: 14291–14325.
- Hoffmann, G. Federico., Opazo, C. Juan., dan Storyz, F. Jay. 2011. Differential Loss and Retention of Cytoglobin, Myoglobin, and Globin-E during the Radiation of Vertebrates. *Genome Biol. Evol.* 3: 588–600.
- Husnil, Kadri. 2012. Hemoprotein dalam tubuh manusia. *Jurnal Kesehatan Andalas.* 1(1): 25-30.
- Kolmodin, J. L.A. D.E. Brich, 2002. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practice. *PCR Cloning Protocol.* 192:3-18.
- Nandikolla, K.S., dan Shaik, M. 2011. Statistic and Bioinformatics Ethnicity. *J. Proteomics Bio-inform* 4: 294-301.
- Pertsemlidis, A., dan Fandon III, J.W. 2001. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *GenomeBiology.* 2(10): 2002.1–2002.
- Pharmawati, M. 2009. Optimasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Gravillea* spp.(Proteaceae). *Jurnal Biologi Universitas Udayana.* 13: 12-16.
- Postnikova, G.B., dan Shekhovtsova, E. A. 2013. Myoglobin and Mitochondria: How Does The “Oxygen Store” Work?. *J Phys Chem Biophys* 3: 126.
- Puspitaningrum, Rini., Septelia Inawati Wanandi., Rondang., Roemiati Soegianto., Mohamad Sadikin., Daryl Robert Williams., Andrew Robert Cossins. 2010. Myoglobin Expression in *Chelonia mydas* Brain, Heart and Liver Tissues. *HAYATI Journal of Biosciences.* 17(3): 110-114.
- Sambrook, J., dan David W.R. 2001. *Molecular cloning.* Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Sulandari, S dan M.S.A. Zein. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA.* Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi LIPI. hal 72-87.
- Thiansilakul, Yaowapa, Benjakul, Soottawat., dan Richard, P. Mark. 2011. Isolation, Characterisation and Stability of Myoglobin From Eastern Little Tuna (*Euthynnus Affinis*) Dark Muscle. *Food Chemistry.* 124: 254–26.