

**PERBANDINGAN METODE ISOLASI DNA TERIPANG PASIR *Holothuria scabra*  
MENGUNAKAN METODE CTAB (CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE)  
DAN KIT EKSTRAKSI**



**NURUL DINZA JENIA**

**H041 20 1048**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**PERBANDINGAN METODE ISOLASI DNA TERIPANG PASIR *Holothuria scabra*  
MENGUNAKAN METODE CTAB (CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE)  
DAN KIT EKSTRAKSI**

**NURUL DINZA JENIA**

**H041 20 1048**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM UNIVERSITAS  
HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**PERBANDINGAN METODE ISOLASI DNA TERIPANG PASIR *Holothuria scabra*  
MENGUNAKAN METODE CTAB (CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE)  
DAN KIT EKSTRAKSI**

NURUL DINZA JENIA  
H041 20 1048

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

## SKRIPSI

**PERBANDINGAN METODE ISOLASI DNA TERIPANG PASIR *Holothuria scabra*  
MENGUNAKAN METODE CTAB (CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE)  
DAN KIT EKSTRAKSI****NURUL DINZA JENIA**  
H041201048

Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 03 Oktober 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan  
pada



UNIVERSITAS HASANUDDIN  
Program Studi Biologi  
Departemen Biologi  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



Dr. Rosana Agus., M.Si  
NIP 196509051991032003

Pembimbing Pertama,



Dr. Magdalena Litaay., M.Sc  
NIP 196409291989032002

Mengetahui,  
Ketua Program Studi

Dr. Magdalena Litaay., M.Sc  
NIP 196409291989032002

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, karya ilmiah berjudul "Perbandingan Metode Isolasi DNA Teripang Pasir *Holothuria Scabra* Menggunakan Metode CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) dan Kit Ekstraksi" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Dr. Rosana Agus., M.Si dan Dr. Magdalena Litaay, M.sc.. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.



03 Oktober 2024

NURUL DINZA JENIA  
H041 20 1048

## UCAPAN TERIMA KASIH

### *Bismillahirrahmanirrahim*

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT. atas limpahan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perbandingan Metode Isolasi DNA Teripang Pasir *Holothuria Scabra* Menggunakan Metode CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) Kit Ekstraksi”. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat yang wajib ditempuh untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Skripsi ini penulis persembahkan untuk kedua orang tua penulis, Ibunda tercinta Nurdiah dan Ayahanda terkasih Nurdin N atas limpahan cinta, kasih sayang, perhatian, dan doa yang tulus yang telah beliau berikan kepada penulis. Kepada saudaraku Jihan Armita, Faridjilham Nur dan Nurul Salzabila Setia terima kasih telah memberikan dukungan semangat bagi penulis. Selanjutnya di dalam penyusunan skripsi ini, penulis telah mendapatkan baik secara moril dan materil, bimbingan, masukan, kritik serta saran dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Bapak Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc., beserta staf pegawainya.
2. Bapak Dr. Eng. Amiruddin, S.Si., M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay., M.Sc selaku Ketua Program Studi Sarjana Biologi yang telah banyak memberikan pengetahuan, rekomendasi, saran dan masukan dalam keikutsertaan aktivitas MBKM bagi penulis selama perkuliahan.
4. Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si selaku Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc, selaku Pembimbing Pertama yang telah memberikan arahan, saran, dan masukan yang sangat bermanfaat bagi penelitian skripsi penulis serta turut memberikan rekomendasi dan saran untuk mengikuti berbagai kegiatan penunjang akademik yang telah memberikan berbagai pengalaman tambahan yang berharga bagi penulis selama perkuliahan.
5. Ibu Dr. Syahribulan, M.Si selaku dosen penasihat akademik yang telah memberikan banyak arahan berharga bagi penulis, baik dalam kegiatan perkuliahan maupun kegiatan magang dan studi independen.
6. Seluruh Dosen yang telah bersedia memberikan banyak pengetahuan bagi penulis selama perkuliahan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan dengan baik.
7. Kak Atisa Muslimin dan Kak Zainul Muttaqin selaku Pendamping Laboratorium HUMRC dan Bioteknologi Kehutanan yang telah banyak memberikan arahan selama di Laboratorium.
8. Staf Departemen Biologi yang telah membantu penulis dalam keperluan akademik selama perkuliahan maupun dalam penyelesaian tugas akhir.
9. Teman-teman dekat penulis dari IGNITE 22, Andi Muthiah Ilham dan Avrina Dewi Nacita yang telah memberikan banyak motivasi, inspirasi, dan dukungan selama ini.

10. Teman-teman seperjuangan penulis Nurul Ardiyah Sari, Adiatna Ayu Kamila, Adilah Nur Syahbani, Iffah Muthiah dan Indira Djiloi yang telah memberikan semangat, dukungan, dan senantiasa memberikan tempat berbagi keluh kesah bagi penulis selama penelitian.
11. Teman-teman Dandelions, Nurfadillah dan Asfira Dwi Anggriani yang telah banyak memberikan dukungan yang sangat berharga bagi penulis.
12. Teman-teman NBB, Nurul Hikmah Amir, Natasya Anugerah dan Nurpadilla, yang selalu memberikan motivasi dan semangat dari jauh.
13. Keluarga komunitas Laut Biru yang telah membantu penulis dan memberikan wawasan baru dan masukan yang berharga bagi penulis.
14. Masyarakat dan nelayan Desa Bonde Utara Majene dan Desa Laliko Polewali Mandar yang telah bersedia membantu penulis dalam pengumpulan sampel
15. Teman-teman BIOTROPIC angkatan 2020 yang telah banyak membantu penulis dalam menghadapi dunia perkuliahan.
16. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu penulis dalam berbagai hal selama perkuliahan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT dapat membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis, pembaca, dan semua pihak.

Makassar, 03 Oktober 2024

Penulis

## ABSTRAK

NURUL DINZA JENIA. **Perbandingan Metode Isolasi DNA Teripang Pasir *Holothuria Scabra* Menggunakan Metode CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) dan Kit Ekstraksi** (dibimbing oleh Rosana Agus dan Magdalena Litaay)

**Latar belakang.** Penelitian molekuler pada teripang pasir *Holothuria scabra* masih belum memadai sehingga keadaan spesies ini secara molekuler belum tergambarkan dengan baik. Namun, belum ada penelitian yang memperlihatkan perbedaan kemampuan isolasi DNA spesies ini menggunakan metode CTAB dan kit ekstraksi. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kemampuan metode CTAB dan kit ekstraksi dalam proses isolasi DNA teripang pasir berdasarkan konsentrasi DNA yang dihasilkan dan kesulitan pengerjaan. **Metode.** Metode yang digunakan pada penelitian ini, yaitu isolasi DNA teripang pasir menggunakan kit ekstraksi dan CTAB yang diikuti dengan pengukuran kuantitas DNA menggunakan Qubit Fluorometer serta pengukuran kualitas DNA menggunakan gel elektroforesis. **Hasil.** Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa konsentrasi DNA teripang pasir dengan metode CTAB menghasilkan nilai kuantitas 3,59 ng/ $\mu$ L, sementara nilai kuantitas dengan kit ekstraksi menghasilkan nilai 2,78 ng/ $\mu$ L. Berdasarkan tingkat kesulitan, metode kit ekstraksi lebih mudah dan lebih cepat digunakan dibanding metode CTAB meskipun menghasilkan DNA lebih rendah. **Kesimpulan.** Metode ekstraksi DNA teripang pasir menggunakan metode CTAB menghasilkan kuantitas DNA yang lebih baik dibandingkan isolasi menggunakan kit ekstraksi.

Kata kunci: Isolasi DNA, Teripang pasir *Holothuria scabra*, CTAB, Kit ekstraksi

## ABSTRACT

NURUL DINZA JENIA. **Comparison of DNA Isolation Methods of Sandfish *Holothuria Scabra* Using the CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) Method and Extraction Kit** (supervised by Rosana Agus and Magdalena Litaay).

**Background.** Molecular research on the sandfish *Holothuria scabra* still needs to be improved as the molecular condition of this species has not been well described. However, studies have yet to show the difference in the ability to isolate this DNA species using the CTAB method and extraction kit. **Aim.** This study aims to compare the ability of the CTAB method and extraction kit in isolating sandfish DNA based on the concentration of DNA produced and the difficulty of the work. **Method.** The method used in this study, namely the isolation of sandfish DNA using an extraction kit and CTAB, followed by measuring the quantity of DNA using a Qubit Fluorometer and the DNA quality using gel electrophoresis. **Results.** The results showed that the concentration of sandfish DNA with the CTAB method produced a quantity value of 3.59 ng/ $\mu$ L, while the quantity value with the kit extraction produced an extraction value of 2.78 ng/ $\mu$ L. Based on the difficulty level, the extraction kit method is easier and faster to use than the CTAB method, even though it produces lower DNA concentration. **Conclusion.** The sandfish DNA extraction method using the CTAB method produced more DNA concentration than isolation using an extraction kit.

**Keyword(s):** DNA Isolation, Sandfish *Holothuria scabra* Jaeger, CTAB, Extraction Kit

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK .....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Teori.....	2
1.2.1 Teripang Pasir <i>Holothuria scabra</i> .....	2
1.2.2 Isolasi DNA .....	4
1.2.3 CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide).....	5
1.2.4 Kit Isolasi DNA .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
BAB 2 METODE PENELITIAN.....	7
2.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	7
2.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	7
2.2.1 Alat.....	7
2.2.2 Bahan.....	7
2.2.3 Kriteria Sampel.....	8
2.3 Metode Kerja.....	8
2.3.1 Pengambilan sampel.....	8
2.3.2 Isolasi DNA Menggunakan Kit.....	8
2.3.3 Isolasi DNA Menggunakan Metode CTAB .....	9
2.3.4 Uji Kuantitas DNA .....	9
2.3.5 Uji Kualitas DNA.....	9
2.3.6 Kriteria Perbandingan Metode Isolasi DNA.....	10

BAB 3 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	11
3.1 Morfologi Teripang Pasir <i>Holothuria scabra</i> .....	11
3.2 Perbandingan Isolasi DNA Teripang Pasir Dengan Metode CTAB dan Kit.....	13
3.3 Uji Kuantitatif DNA Teripang Pasir .....	15
3.4 Uji Kualitatif DNA Teripang Pasir .....	18
BAB 4 KESIMPULAN DAN SARAN.....	21
4.1 Kesimpulan .....	21
4.2 Saran .....	21
DAFTAR PUSTAKA.....	22
LAMPIRAN .....	22

**DAFTAR TABEL****Halaman**

1. Perbandingan Metode CTAB dan Kit Ekstraksi.....	14
2. Pengukuran Konsentrasi DNA Menggunakan Qubit Fluorometri.....	16

**DAFTAR GAMBAR**

	<b>Halaman</b>
1. Teripang Pasir <i>Holothuria scabra</i> dari Pulau Bungin .....	2
2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Teripang Pasir .....	7
3. Teripang pasir yang didapatkan.....	11
4. Bagian anterior (depan) dan posterior (belakang) teripang pasir .....	12
5. Hasil Elektroforesis gel agarosa.....	19

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Perairan Laut Indonesia menjadi habitat yang penting bagi teripang, dimana terdapat lebih dari 400 jenis timun laut di perairan Indonesia dengan 56 jenis di antaranya yang telah dimanfaatkan dan diperdagangkan. Timun laut sendiri tersebar luas di wilayah tropis dan subtropis di seluruh dunia, tetapi pusat keanekaragaman jenis (*species diversity*) dan kelimpahannya (*abundance*) terdapat di pulau-pulau yang tersebar di wilayah Asia Tenggara dan sekitarnya yang lebih dari 1400 jenis timun laut dari perairan seluruh dunia, dengan 66 jenis diantaranya termasuk dalam kelompok teripang. Kata “timun laut” merujuk pada jenis-jenis yang tidak dimanfaatkan secara ekonomi atau tidak dikonsumsi oleh masyarakat, sementara kata “teripang” merujuk pada jenis-jenis yang dikonsumsi dan dimanfaatkan secara ekonomi. Di Indonesia sendiri, sebaran teripang dapat ditemukan di banyak perairan Indonesia, termasuk di Sulawesi (Setyastuti dkk., 2019).

Salah satu spesies teripang yang terdapat di Sulawesi adalah *Holothuria scabra* yang juga disebut sebagai teripang pasir. Spesies ini dieksploitasi secara komersial di hampir seluruh dunia karena nilainya yang tinggi sebagai makanan mahal bagi konsumen Asia. Berdasarkan studi kuantitatif dan kualitatif, populasi spesies ini secara global diperkirakan telah menurun lebih dari 90% pada setidaknya 50% wilayah jelajahnya. Penurunan dan eksploitasi berlebihan telah terjadi terutama sejak tahun 1960-an. Spesies ini diperkirakan mengalami penurunan setidaknya 50% selama 30-50 tahun terakhir, sehingga spesies ini dikategorikan sebagai spesies *Endangered* (Hamel dkk., 2001).

Keadaan teripang pasir yang kian mengkhawatirkan akibat eksploitasi berlebihan turut mengancam keseimbangan ekosistem sekitarnya. Spesies ini diketahui memiliki peran penting dalam siklus dan remineralisasi bahan organik di pada sedimen laut melalui proses makan, buang air besar, dan bioturbasi. Berdasarkan kepadatan alami, individu spesies ini dapat mengolah 10.590 kg sedimen kering per 1000 m<sup>2</sup> per tahun. Dengan tidak adanya *H. scabra*, kedalaman penetrasi O<sub>2</sub> menurun sebesar 63%, dan tingkat konsumsi oksigen sedimen meningkat sekitar dua kali lipat dalam bulan pertama, dan secara konsisten lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan dengan kepadatan tinggi (Tuwo dkk., 2020; Tuwo dkk., 2021). Hasil ini menunjukkan bahwa hilangnya teripang pasir dapat mengurangi kapasitas sedimen untuk menyangga bahan organik, sehingga menghambat fungsi dan produktivitas ekosistem pesisir dangkal (Lee dkk., 2018).

Meskipun memiliki peran penting dalam ekosistem dan perekonomian masyarakat, informasi genom yang komprehensif pada spesies ini masih kurang. Hal ini membatasi penyelidikan menyeluruh terhadap hubungan evolusioner dan genomik fungsionalnya. Upaya terkini telah ditujukan untuk mengatasi kesenjangan ini. Genom utuh pertama *H. scabra* telah dilaporkan, menyediakan sumber daya yang berharga untuk penelitian genetik dan filogenetik dengan perakitan genom yang mencakup 34.418 gen penyandi protein yang diberi anotasi (Zhong dkk., 2024). Meskipun demikian,

informasi genetik secara keseluruhan masih kurang komprehensif dibandingkan dengan spesies teripang lain (Brown dkk., 2022).

Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam berbagai teknik biologi molekuler, termasuk Polymerase Chain Reaction (PCR), DNA sekuensing, dan kloning memungkinkan para ilmuwan untuk mempelajari gen-gen tertentu dan fungsinya. Kualitas dan integritas DNA yang diisolasi secara langsung mempengaruhi keberhasilan tahapan selanjutnya, sehingga sangat penting untuk memperoleh sampel DNA dengan kemurnian tinggi demi hasil yang akurat. Hal ini penting untuk mengidentifikasi genotipe, memahami keragaman genetik, dan mengeksplorasi sifat-sifat yang terkait dengan gen yang diinginkan (Aboul-Maaty dan Oraby, 2019; Kumar, 2023). Saat ini, belum terdapat metode isolasi DNA yang membahas secara khusus isolasi DNA teripang pasir. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui kemampuan dua metode berbeda dalam mengisolasi DNA teripang, khususnya teripang pasir.

## 1.2 Teori

### 1.2.1 Teripang Pasir *Holothuria scabra*

*Holothuria scabra* atau teripang pasir adalah salah satu jenis teripang (Echinodermata: Holothuroidea) yang paling banyak dipelajari secara intensif sejak awal abad ke-19. Spesies ini penting karena beberapa alasan, yaitu tersebar luas dan secara historis berlimpah di beberapa habitat dasar lunak yang dangkal di seluruh Indo-Pasifik, memiliki nilai komersial yang tinggi di pasar Asia, tempat sebagian besar spesies ini dijual sebagai produk kering (*beche-de-mer*) dan merupakan satu-satunya spesies holothuroidea tropis yang saat ini dapat diproduksi secara massal di tempat pembenihan. Penelitian mengenai *H. scabra* terus terakumulasi, didorong oleh eksploitasi komersial yang intens, dan semakin menurunnya stok alami di seluruh wilayah distribusinya (Hamel dkk., 2019).



**Gambar 1.** *Holothuria scabra* dari Pulau Bungin  
Sumber: Ardiansyah dkk., (2020)

Teripang pasir memiliki berbagai kandungan nilai gizi yang telah diteliti. Nilai protein tinggi dan rendah lemak ditemukan pada teripang *Holothuria scabra* dari berbagai tempat secara umum. Kandungan mineral utama yang diperoleh adalah Kalsium, Natrium, dan Magnesium. Glisin adalah salah satu komponen utama asam amino pembentuk protein. Omega-6 dan omega-9 merupakan komponen utama asam lemak. Semua logam berat yang dianalisis tidak terdeteksi, sehingga teripang *H. scabra* aman untuk dikonsumsi dan berpotensi untuk dijadikan pangan fungsional di masa depan (Ardiansyah dkk., 2020).

Adapun klasifikasi *H. scabra* sebagai berikut (WoRMS, 2023):

Kingdom : Animalia  
Filum : Echinodermata  
Subfilum : Echinozoa  
Kelas : Holothuroidea  
Subkelas : Actinopoda  
Ordo : Holothuriida  
Famili : Holothuriidae  
Genus : *Holothuria*  
Spesies : *Holothuria scabra*

Karakteristik habitat *H. scabra* terutama berada di lingkungan dengan gelombang dan arus yang rendah di belakang terumbu karang tepi atau di dalam teluk dan pantai yang dilindungi. Perairan dengan kedalaman kurang dari 2 m dan kondisi vegetasi lamun dengan kepadatan sedang baik untuk budidaya teripang karena memungkinkan sinar matahari mencapai substrat untuk mendukung pertumbuhan lamun dan mikroalga, sehingga memungkinkan pergerakan teripang pada sedimen dengan leluasa namun masih memberikan perlindungan dari predator. Kedalaman perairan pada saat air surut dan air pasang adalah  $\pm 155$  cm, dimana kedalaman air pada saat air surut terendah sekitar 35 cm dan kedalaman air pada saat air surut tertinggi sekitar 190 cm (Mercier dkk., 1999; Hamel dkk., 2022).

Wilayah jelajah dan persebaran teripang pasir sangat luas dan dapat ditemukan di berbagai negara di seluruh dunia dengan variasi ukuran yang beragam. Spesies ini dapat ditemukan di wilayah pasang surut di Kaledonia Baru, yang sebagian besar populasinya berada di daerah pasang surut. Selain itu juga dapat ditemukan di India, misalnya di Teluk Mannar pada kedalaman antara 5 dan 10 m, di Papua Nugini, Australia, Oman (Teluk Mahout), Mesir, Sudan (Laut Merah), Zanzibar, Indonesia, Filipina (Teluk Sarangani), Pulau Solomon terutama di sekitar padang lamun, di substrat lumpur atau pasir berlumpur pada kedalaman 0,3–1,2 m, Tiongkok dan masih banyak negara lainnya (Hamel dkk., 2022).

Di Indonesia sendiri teripang pasir dapat ditemukan di banyak wilayah dan memiliki ukuran yang bervariasi, dimana teripang dewasa di Teluk Un di Maluku berkisar antara 9,5 hingga 23,3 cm dan beratnya 80 hingga 450 g (Natan et al., 2015). Selain itu, di Tanjung Tiram, Maluku populasi *H. scabra* didominasi oleh individu dengan panjang antara 16,5 dan 19,5 cm, yang mewakili 49% dari total sampel dengan panjang berkisar

antara 7,5 hingga 28,0 cm (dengan rata-rata 18 cm) dan berat antara 38,0 hingga 137,6 g (rata-rata 64 g) (Ongkers et al., 2018).

Populasi teripang ini di Sulawesi tersebar di banyak wilayah, terutama ditemukan di Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara. Di Sulawesi Selatan terdapat beberapa wilayah dengan populasi Teripang Pasir yang cukup melimpah, yaitu di Kabupaten Barru, Pangkep dan perairan Barrang Lompo (Massin, 1999; Yusuf dkk., 2017). Di Kabupaten Pangkep tercatat penurunan ukuran teripang pasir dari ukuran sebelumnya yang pernah dilaporkan, dari ukuran dewasa rata-rata 150 gram menjadi 30 gram hanya dalam waktu 4 tahun (2016-2019). Penyusutan ukuran yang terjadi mengindikasikan adanya tekanan *overfishing* pada populasi tersebut (Sembiring dkk., 2019; Yanti dkk., 2020).

### 1.2.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan serangkaian proses yang dilakukan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lain seperti lipid, protein, dan RNA. Tahap ini sangat penting sebelum melangkah ke tahap-tahap selanjutnya. Isolasi DNA sangat penting untuk memungkinkan berbagai teknik biologi molekuler, seperti Polymerase Chain Reaction (PCR), dimana DNA yang diisolasi diperlukan untuk memperbanyak urutan DNA tertentu untuk analisis lebih lanjut. Pengurutan DNA, dimana DNA berkualitas tinggi diperlukan untuk menentukan urutan nukleotida gen atau genom, dan kloning, dimana DNA yang diisolasi dapat dimasukkan ke dalam vektor untuk kloning gen dan studi ekspresi (Puspitaningrum dkk., 2018).

Mengisolasi DNA memungkinkan peneliti untuk mempelajari keragaman genetik, struktur populasi, dan hubungan evolusi di antara spesies. Selain itu juga dapat meningkatkan program pemuliaan dengan memilih sifat-sifat yang diinginkan, menganalisis sampel biologis yang dikumpulkan, menilai keanekaragaman hayati, dan memantau kesehatan ekosistem, serta menciptakan organisme yang dimodifikasi secara genetik (GMO). Informasi ini penting untuk mengembangkan strategi pengelolaan yang efektif bagi spesies yang terancam punah, seperti populasi teripang tertentu, dan memastikan keberlanjutan dan ketahanan mereka terhadap perubahan lingkungan (Lu dkk., 2013; Puch-Hau dkk., 2019).

Prinsip kerja isolasi dan purifikasi DNA terdiri atas 5 tahap, yaitu pemecahan membran sel (lisis), penghilangan protein, penghilangan RNA, presipitasi DNA, pengukuran kemurnian dan kuantitas DNA. Prinsip lisis sel adalah pemecahan membran sel dan organel sel (mitokondria, inti sel atau kloroplas) serta dinding sel dengan kombinasi interaksi fisik, reaksi kimia dan enzimatis. Adapun sebagai target molekul adalah fosfolipid dan protein membran, lipid dan peptidoglikan dinding sel, struktur polisakarida pada dinding sel tanaman (selulosa). Dalam melakukan lisis kita harus mempertimbangkan beberapa hal, antara lain (Maksum dkk., 2019):

1. Pemahaman tentang organisasi sel organisme tertentu (sebagai sumber DNA).
2. Pemahaman tentang struktur dan komposisi kimia membran dan dinding sel organisme tertentu.
3. Pemahaman tentang bagaimana cara memecahkan yang efektif dan aman untuk reaksi selanjutnya.
4. Konsep perlindungan molekul DNA hasil lisis dari aktivitas nuklease selama proses lisis.

5. Konsep menghilangkan kemungkinan adanya inhibitor untuk reaksi PCR pada sumber DNA, contoh menghilangkan Fe heme dengan Tris-EDTA (TE) pada isolasi DNA dari sel darah sampai diperoleh sel limfosit.

### **1.2.3 CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*)**

Metode CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*) merupakan teknik yang banyak digunakan untuk mengisolasi DNA, terutama yang berasal dari jaringan tanaman. CTAB merupakan deterjen kationik yang membantu melisiskan sel dan melarutkan komponen seluler, sehingga memungkinkan ekstraksi DNA sekaligus meminimalkan kontaminasi dari polisakarida dan metabolit sekunder lainnya yang umum terdapat dalam jaringan tanaman (Saraswathi dan Mullainathan, 2020).

CTAB efektif dalam mengisolasi DNA genomik berkualitas tinggi, terutama dari jaringan hewan yang mungkin mengandung polisakarida dan protein tingkat tinggi. Studi telah menunjukkan bahwa protokol CTAB yang dimodifikasi dapat menghasilkan DNA genomik yang umumnya bebas dari kontaminan, sehingga dapat dilakukan sebelum langkah lanjutan, termasuk *high output sequencing* dan PCR. Metode CTAB dapat diadaptasi untuk mengakomodasi jaringan hewan yang kaya kontaminan, yang sering kali menimbulkan tantangan untuk ekstraksi. Dengan memodifikasi protokol CTAB, peneliti dapat berhasil mengekstraksi DNA dengan metode standar seperti ekstraksi fenol-kloroform atau *salting out* dari sampel yang berpotensi menghasilkan kualitas yang buruk (Mishra dkk., 2019).

Metode CTAB dikenal dapat menghasilkan DNA dengan kualitas dan hasil yang tinggi, yang penting untuk aplikasi selanjutnya. Dengan mengoptimalkan konsentrasi CTAB dan reagen lainnya, peneliti dapat memperoleh DNA dengan kemurnian tinggi yang cocok untuk berbagai aplikasi. Namun, metode CTAB dapat memakan waktu lama dan memerlukan penanganan bahan kimia berbahaya secara hati-hati, seperti fenol dan kloroform, yang menimbulkan risiko keselamatan. Efisiensi ekstraksi DNA dapat bervariasi tergantung pada jenis jaringan hewan dan protokol khusus yang digunakan, yang memerlukan pengoptimalan untuk sampel yang berbeda (Tamari dkk., 2013).

### **1.2.4 Kit Isolasi DNA**

Kit ekstraksi DNA adalah produk komersial yang dirancang untuk memfasilitasi isolasi dan pemurnian DNA dari berbagai sampel biologis. Kit ini biasanya berisi serangkaian reagen dan bahan untuk menyederhanakan proses ekstraksi, sehingga lebih efisien dan mudah digunakan dibandingkan dengan metode tradisional. Terdapat beberapa komponen utama Kit Ekstraksi DNA, yaitu lisis buffer, berupa larutan yang membantu memecah membran sel untuk melepaskan DNA. Media Pengikat DNA, yaitu komponen yang secara selektif mengikat DNA sambil membiarkan kontaminan terlepas. *Wash buffer* yang digunakan untuk menghilangkan kotoran dan kontaminan dari DNA yang terikat. Buffer Elusi, digunakan untuk memulihkan DNA yang dimurnikan dari media pengikat (Yahya dkk., 2017).

Kit isolasi DNA dirancang untuk ekstraksi yang cepat dan efisien, menghasilkan DNA berkualitas lebih tinggi dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan metode konvensional. Banyak metode konvensional yang melibatkan bahan kimia berbahaya, seperti fenol dan kloroform, yang dapat menimbulkan risiko bagi pengguna. Sebaliknya, sebagian besar kit ekstraksi menggunakan reagen yang lebih aman dan

tidak memerlukan zat berbahaya. Kit seringkali dilengkapi dengan protokol terperinci yang menyederhanakan proses ekstraksi. Penelitian telah menunjukkan bahwa meskipun metode konvensional terkadang dapat menghasilkan DNA dalam jumlah yang lebih tinggi, kit ekstraksi dapat menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi, yang sangat penting untuk aplikasi PCR dan sekuensing (Djurkin dkk., 2015).

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan nilai kuantitas, kualitas DNA dan prosedur kerja ekstraksi teripang pasir *H. scabra* yang dihasilkan dari metode isolasi menggunakan CTAB dan Kit ekstraksi.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

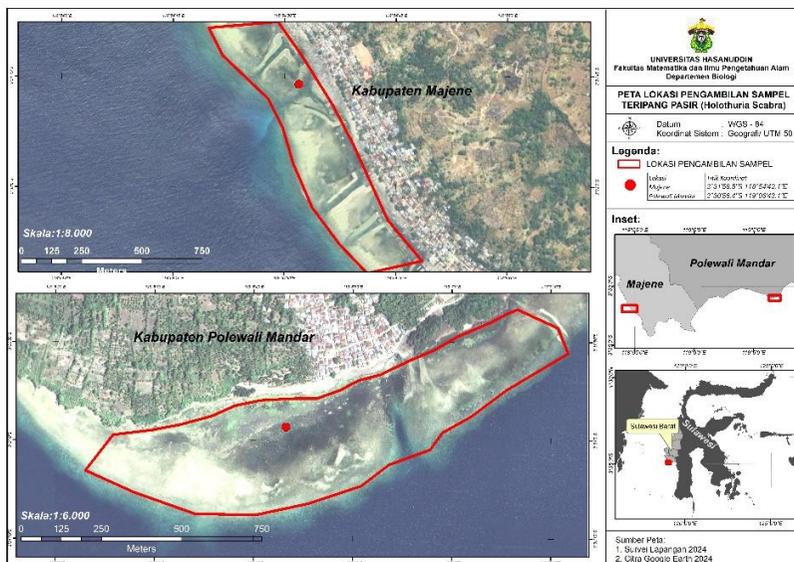
Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang perbandingan kedua metode yang digunakan baik dari segi kuantitas maupun kualitas DNA yang dihasilkan.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai isolasi DNA teripang pasir untuk penelitian selanjutnya dalam upaya meningkatkan hasil dan kualitas dari DNA yang diisolasi.

## BAB 2 METODE PENELITIAN

### 2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret 2024 di sekitar pantai Labuang, Kabupaten Polewali Mandar, Sulawesi Barat dan perairan Kabupaten Majene, Sulawesi Barat. Peta lokasi pengambilan sampel disajikan pada **Gambar 2**. Isolasi DNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin pada bulan Juli 2024.



**Gambar 2.** Peta lokasi pengambilan sampel teripang pasir

### 2.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 2.2.1 Alat

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini adalah silet, pinset, *coolbox*, tabung sentrifuge 1,5 ml, tabung centrifuge 2 ml, mikropipet, tip, *freezer*, *water bath*, sentrifugasi, cetakan gel agarose, qubit 3 Fluorometer, *spin column*, *collection tube*, rak tabung centrifuge, *vortex*, gelas ukur, gelas kimia, oven, timbangan digital, *microwave*, *power supply*, komputer, micropestle, lemari pendingin, spatula, kamera, dan penggaris.

#### 2.2.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel jaringan teripang pasir *Holothuria scabra*, CTAB, kloroform isoamil alkohol, kloroform, kit ekstraksi (Qiagen), akuades, etanol absolut, DNA ladder 100 bp, RedSafe Nucleic acid Staining Solution, marker F, tisu, *gloves*, alkohol 95%, parafilm, agarosa, pewarna PET, Tris-Borate EDTA (TBE) buffer, RNase, natrium asetat, isopropanol, *bluetip*, kertas label, dan plastik klip.

### 2.2.3 Kriteria Sampel

Sampel yang diambil adalah teripang pasir *Holothuria scabra* dewasa berdasarkan ciri morfologi yang dideskripsikan oleh Massin (1999) dan Hamel dkk. (2022). Teripang pasir (*H. scabra*) memiliki ciri tubuh berbentuk silinder yang memanjang, padat, agak pipih dan lentur. Dinding tubuhnya tebal, berpasir saat disentuh, dan berlendir. Permukaan dorsalnya halus dan memiliki beberapa kaki tabung yang tersebar tipis, berwarna abu-abu dengan garis-garis hijau-hitam melintang. Panjang teripang pasir dewasa biasanya berkisar antara 15-40 cm (Hamel dkk., 2022). Sementara untuk ciri-ciri pada bagian ventral teripang pasir, menurut Massin (1999) bagian permukaan ventral teripang pasir biasanya berwarna putih atau krem, kasar, dan memiliki banyak kaki tabung penggerak yang tersusun tidak teratur berwarna abu-abu-putih dengan kulit kasar dengan tebal sekitar 2-3 mm.

## 2.3 Metode Kerja

### 2.3.1 Pengambilan sampel

Sampel teripang pasir *Holothuria scabra* diambil sebanyak 12 individu yang diperoleh dari pengambilan sampel secara manual dan didapatkan dari hasil tangkapan nelayan lokal pada kedalaman 0-3 m. Sampel yang didapatkan kemudian difoto untuk pengamatan morfologi dan disimpan di dalam *coolbox* untuk dibawa ke laboratorium untuk diperiksa dan diekstraksi lebih lanjut. Sampel tersebut dibawa ke Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical Research Center) dan disimpan pada *freezer* bersuhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hingga proses isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan dengan langkah awal mengambil sebanyak 20-25 mg jaringan tubuh teripang (dinding tubuh) (Alcudia-Catalma dkk., 2020).

### 2.3.2 Isolasi DNA Menggunakan Kit

DNA teripang pasir diisolasi dari jaringan yang diawetkan di suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dengan pengirisan jaringan hewan seberat 20-25 mg. Jaringan yang telah diiris kemudian dipotong kecil-kecil menggunakan silet lalu ditempatkan pada tabung sentrifugasi 1,5 ml dan diekstraksi menggunakan kit ekstraksi Qiagen DNeasy Blood dan Tissue Kit mengikuti protokol perusahaan. Langkah-langkah dari protokol perusahaan tersebut, yaitu ditambahkan 180  $\mu\text{L}$  buffer ATL ke dalam tabung sentrifugasi berisi jaringan teripang yang digerus menggunakan micropestle. Lalu ditambahkan proteinase K sebanyak 20  $\mu\text{L}$  dan dicampur dengan cara divorteks lalu diinkubasi semalaman pada suhu  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  hingga lisis.

Setelah diinkubasi semalaman, ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  Buffer AL, dicampur dengan cara divorteks lalu diinkubasi pada suhu  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Campuran dipindahkan ke *spin column* yang dimasukkan ke dalam 2 ml *collection tube*, lalu disentrifugasi pada kecepatan  $\geq 8000\text{ rpm}$  selama 1 menit. Aliran yang dihasilkan dibuang. Ditambahkan buffer AW1 sebanyak 500  $\mu\text{L}$  lalu disentrifugasi selama 1 menit kecepatan 8000 rpm. Aliran kembali dibuang dan campuran ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  buffer AW2 dan disentrifugasi pada 10.000 rpm dan aliran dibuang. Tabung *spin column* dipindahkan ke tabung 2 ml sentrifugasi yang baru dan dilakukan elusi dengan menambahkan 200  $\mu\text{L}$  buffer AE ke tengah *spin column*, diinkubasi pada suhu ruangan selama 1 menit dan disentrifugasi kembali selama 1 menit pada 8000 rpm. Sampel telah

selesai diekstraksi dan dapat disimpan pada freezer bersuhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hingga uji lebih lanjut.

### **2.3.3 Isolasi DNA Menggunakan Metode CTAB**

Metode CTAB untuk ekstraksi DNA teripang pasir mengikuti standar protokol lab bioteknologi untuk ekstraksi DNA. Langkah pertama yaitu jaringan diambil dan ditimbang seberat 20-25 mg lalu dipotong kecil-kecil menggunakan silet. Sampel digerus dan ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  Buffer CTAB kemudian divorteks. Sampel diinkubasi pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam dan divorteks tiap 30 menit. Ditambahkan kloroform isoamil alkohol sebanyak 100  $\mu\text{L}$  lalu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, cairan bening dipindahkan ke tabung baru. Isopropanol ditambahkan sebanyak 800  $\mu\text{L}$  lalu disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm. Cairan dibuang kemudian dikeringkan selama semalam.

Setelah didiamkan selama semalam, ditambahkan buffer TE sebanyak 500  $\mu\text{L}$ , kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada 10.000 rpm. Cairan bening yang diperoleh dipindahkan ke tabung baru. Kloroform ditambahkan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  lalu kembali disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm. Cairan bening dipindahkan ke tube baru lalu ditambahkan natrium asetat sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ditambah 800  $\mu\text{L}$  isopropanol lalu disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm. Larutan dibuang lalu dikeringkan selama semalam. Setelah dikeringkan, ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  buffer TE 1x pada setiap tabung lalu didiamkan. Kemudian ditambahkan RNase sebanyak 4  $\mu\text{L}$ .

### **2.3.4 Uji Kuantitas DNA**

Ekstraksi yang telah dilakukan selanjutnya diukur konsentrasi DNA yang dihasilkan menggunakan alat Qubit 3.0 Fluorometric Quantification System mengikuti panduan penggunaan alat. Qubit working solution dibuat dengan qubit buffer sebanyak 199  $\mu\text{L}$  dicampur dengan qubit reagen sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Campuran tersebut diambil sebanyak 199  $\mu\text{L}$  lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Sebanyak 1  $\mu\text{L}$  DNA dimasukkan ke dalam tabung yang telah dimasukkan campuran qubit reagent dan qubit buffer. Campuran tersebut didiamkan di suhu ruang tanpa cahaya selama 2 menit. Setelah didiamkan, campuran DNA dan reagen qubit dimasukkan ke dalam alat Qubit Fluorometer setelah dikalibrasi menggunakan blanko. Dilakukan pengulangan uji sebanyak 3 kali lalu hasilnya dirata-ratakan.

### **2.3.5 Uji Kualitas DNA**

Pengukuran kualitas DNA dilakukan menggunakan elektroforesis. Pada tahap ini memberikan informasi mengenai DNA master yang dapat memperlihatkan kualitas DNA dengan konsentrasi agarose 2% dengan menggunakan elektroforesis horizontal. Pada pengujian ini, agarose ditimbang sebanyak 2gram lalu dicampur TBE buffer sebanyak 100 ml kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 3 menit. Ditambahkan RedSafe Nucleic acid Staining Solution sebanyak 5  $\mu\text{L}$  lalu dimasukkan ke dalam cetakan agar dan didiamkan di suhu ruang hingga memadat. Setelah agar memadat, dibuat campuran 2  $\mu\text{L}$  loading dye dan 3  $\mu\text{L}$  DNA di kertas parafilm, dibuat sebanyak jumlah sampel. Masing-masing campuran dari 12 sampel dimasukkan ke dalam masing-masing sumur elektroforesis lalu dielektroforesis selama 90 menit.

### **2.3.6 Kriteria Perbandingan Metode Isolasi DNA**

Pada penelitian ini dilakukan perbandingan metode isolasi DNA menggunakan metode CTAB dan kit ekstraksi. Tujuan dari perbandingan metode adalah untuk melihat apakah terdapat perbedaan antara penggunaan metode satu dan metode lainnya serta untuk menilai apakah kedua metode itu memiliki hasil yang sama (Jensen dan Kjelgaard-Hansen, 2006). Adapun kriteria yang digunakan untuk membandingkan kedua metode isolasi DNA, yaitu berdasarkan waktu pengerjaan, penggunaan bahan berbahaya, tingkat kesulitan pengerjaan dan hasil yang diperoleh.