

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 Udang Jari (*Metapenaeus elegans*)

2.1.1 Tinjauan Umum Udang Jari (*Metapenaeus elegans*)

Udang jari (*Metapenaeus elegans*) dalam dunia perdagangan dikenal dengan nama *brown shrimp*. *Metapenaeus elegans* atau disebut juga fine shrimp (Inggris), *crevette elegans* (Prancis), *camaron fino* (Spanyol) dan nama lokal udang jahe, udang jari, dan udang dogol hijau (Zarochman, 2003). Panjang tubuh maksimum *M. elegans* betina 11,8 cm dan jantan 8,4 cm. *Metapenaeus elegans* termasuk kategori spesies yang seluruh hidupnya berada di muara sungai dengan salinitas rendah (Dudley, 2000). Dalam al-Qur'an surat An-Nahl (16) ayat 14 Allah SWT berfirman:

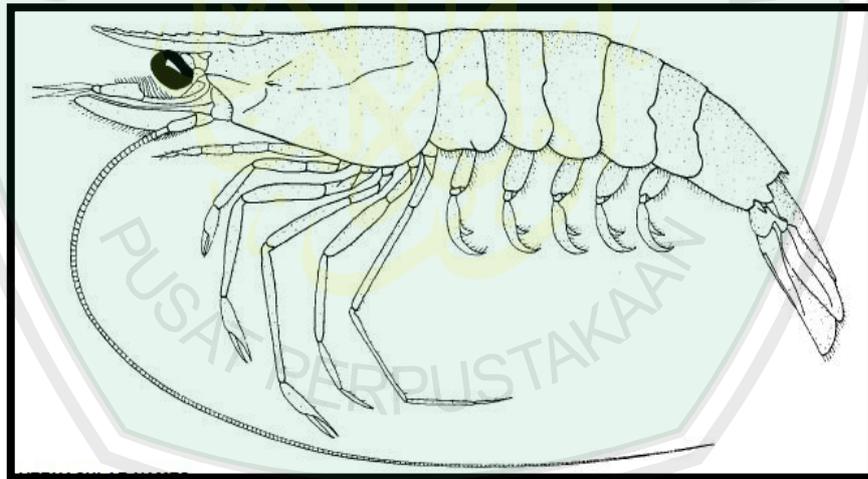
وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً
تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ
تَشْكُرُونَ ﴿١٤﴾

Artinya: “Dan Dia-lah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan dari padanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur (Q.S an-Nahl:14).

Penundukan lautan adalah mengoptimalkan manusia dalam berbuat dan mengendalikan dalam hal ini adalah memanfaatkan lautan yang merupakan nikmat diantara nikmat-nikmat Allah untuk kita (Qurthubi, 2009). Dari ayat tersebut dapat diketahui bahwa Allah SWT menundukkan lautan agar manusia

dapat memakan daging segar yang dihasilkan oleh lautan. Maksud dari daging segar tersebut merupakan hasil tangkapan laut yang dapat dikonsumsi oleh manusia. Hasil tangkapan laut dapat berupa ikan, udang, cumi-cumi, kerang, dan lain-lain. Salah satu hasil tangkapan laut yang utama bagi nelayan ialah sumber daya udang. Udang merupakan hasil laut terbesar kedua setelah ikan. Selain itu, udang merupakan spesies paling banyak digemari oleh masyarakat, hal ini karena udang memiliki harga yang ekonomis dan rasanya yang enak. Salah satu jenis udang yang banyak digemari oleh masyarakat ialah udang jari (*M. elegans*) yang merupakan komoditas utama hasil tangkapan laut yang ada di Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah.

2.1.2 Klasifikasi Udang Jari (*Metapenaeus elegans*)



Gambar 2.1 *Metapenaeus elegans* (De Man, 1907) (Holthuis, 1980).

Klasifikasi *Metapenaeus elegans* adalah sebagai berikut (Lovett, 1981) :

Filum Arthropoda

Class Krustasea

Ordo Decapoda

Famili Penaidae

Genus *Metapenaeus*

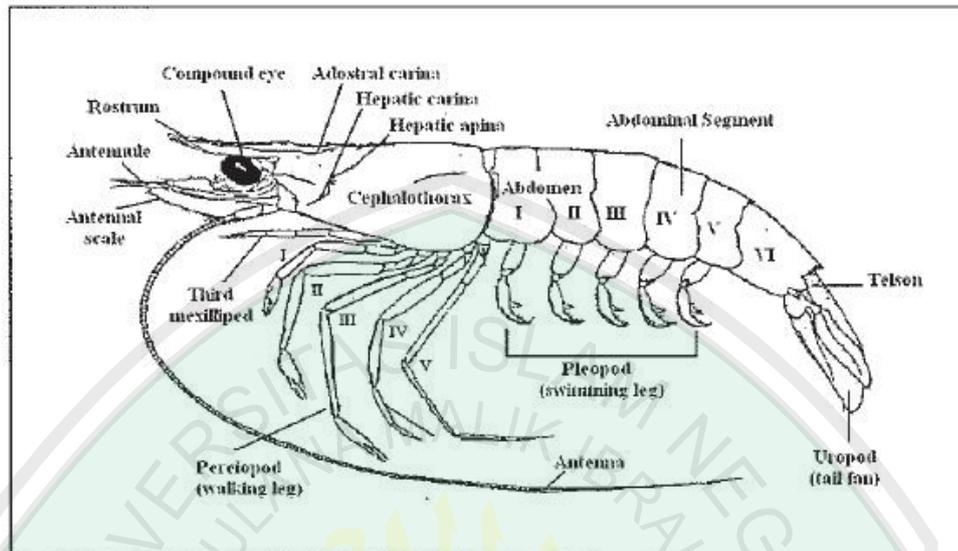
Species *M. elegans* (De Man, 1907)

2.1.3 Morfologi dan Anatomi Udang Jari (*Metapenaeus elegans*)

Ciri morfologis yang menonjol dari Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) adalah kulitnya keras, warna tubuh coklat kekuningan transparan sampai coklat seperti warna jahe, dengan bintik-bintik kecil berwarna coklat kehitaman. Pada udang matang gonad, bintik tersebut akan berwarna coklat kemerahan, terutama pada bagian dorsal *cephalothorac*. Pada kaki jalan memiliki warna yang jernih sampai berwarna pink, pada tepi dan bagian ujung kedua upopoda serta kedua antenanya berwarna merah muda (Hidayat, 2007).

Udang jari memiliki rostrum yang kuat, cenderung lurus dengan ujung yang tajam. Pada bagian atas rostrum terdapat 9 – 12 gerigi tetapi yang terbanyak 9 gerigi. Pada bagian bawahnya tidak terdapat gerigi, tetapi banyak ditemukan bulu-bulu halus (Motoh, 1981). Gigi bagian depan terletak di dekat ujung rostrum. *Adrostral carina* berakhir di antara gigi *epigaastric* dan gigi berikutnya. *Salcus adrostral epigastric*, mencapai 1/3 anterior dari panjang karapas. *Postrostral carina* berlanjut ke posterior 1/10 -1/12 dari panjang karapas. *Flagela* luar lebih panjang dari dalam, 2/5 dari panjang karapas dan 3/5 dari *antennular peduncle*.

Postantenna inferior mencapai ujung segmen I melampaui ujung kornea, 2/5 dari segmen pertama (Gambar 2.2) (Saputra, 2005).

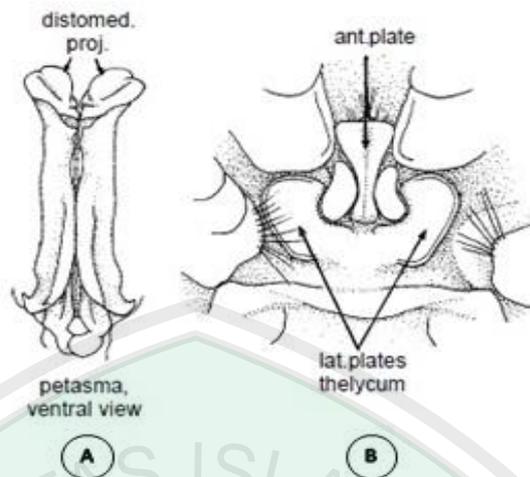


Gambar 2.2 Morfologi udang Jari (*Metapenaeus elegans*) (Primavera, 1990).

Sistem pencernaan udang dimulai dari mulut, kerongkong, lambung, usus, dan anus. Di dalam lambung terdapat alat kitin yang berguna untuk menggilas makanan. Makanan udang adalah udang-udang kecil gastropoda atau larva insekta atau bahan-bahan lainnya yang rapuh. Sistem syaraf udang terdiri atas ganglion yang disebut otak, dan dua circum penghubung oesophagus. Alat indera mata udang adalah mata majemuk yang bertangkai terletak pada bagian rostrum. Permukaan mata majemuk yang bertangkai terletak pada bagian rostrum. Permukaan mata yang konvex dilindungi oleh kutikula yang transparan disebut kornea (lensa). Kornea tersusun atas sejumlah bagian-bagian yang dibatasi oleh empat segi yang selanjutnya disebut facet. Tiap-tiap facet sebelah dalamnya mempunyai suatu batang panjang yang terkenal dengan nama ommatidium. Pada udang, sistem pernapasan menggunakan insang yang melekat pada anggota tubuhnya. Udang memiliki sistem peredaran darah terbuka O_2 masuk dari air ke

pembuluh insang, sedangkan CO₂ berdifusi dengan arah berlawanan, O₂ ini akan diedarkan ke seluruh tubuh tanpa melalui pembuluh darah (Jasin, 1984).

Jenis kelamin udang memiliki arti penting dalam perkembangbiakan udang karena adanya perbedaan dalam laju pertumbuhan, pola tingkah laku, waktu memijah, warna, bentuk dan ukuran maksimum. Udag Penaeid termasuk ke dalam kelompok heteroseksual, sehingga dapat dibedakan antara jantan dan betina secara morfologis (*sexual dimorphisme*). Udag jantan mempunyai alat kelamin sekunder yang disebut *petasma*, yang terletak diantara pasangan kaki renang (*pleopod*) pertama. Udag betina memiliki *terikum* yang terletak diantara kaki jalan (*pereiopod*) yang kelima (Gambar 2.3). Organ reproduksi udang jantan terdiri atas organ internal dan eksternal. Organ internal terdiri atas sepasang testis, sepasang *vas deferens*, dan sepasang terminal ampul. Testis terletak di tengah-tengah bagian dorsal sephalothoraks, tepatnya di bagian ventral jantung (tepat di bawah sinus perikardia dan bagian dorsal hepato-pankreas). *Vas deferens* merupakan saluran testis yang membentuk banyak gulungan berkelok-kelok, terletak di bagian anterior memanjang sampai ke organ hepato-pankreas membentuk tabung hampir lurus di bawah pinggiran posterolateral kepala dan diteruskan sampai ke terminal ampul yang membesar. Terminal ampul merupakan alat yang membentuk kantong diselaputi dengan lapisan otot tipis yang terletak pada kaki jalan kelima. Organ eksternalnya adalah petasma yang merupakan modifikasi dari bagian *endopodit* kaki renang pertama. Petasma berfungsi untuk menyalurkan sperma dan meletakkannya pada alat kelamin betina. Organ eksternal lainnya adalah *apendix masculina* yang terletak pada kaki renang kedua (Motoh, 1981).



Gambar 2.3 Alat kelamin pada udang jari (*Metapenaeus elegans*) : (A) Jantan; (B) Betina (Holthuis, 1980).

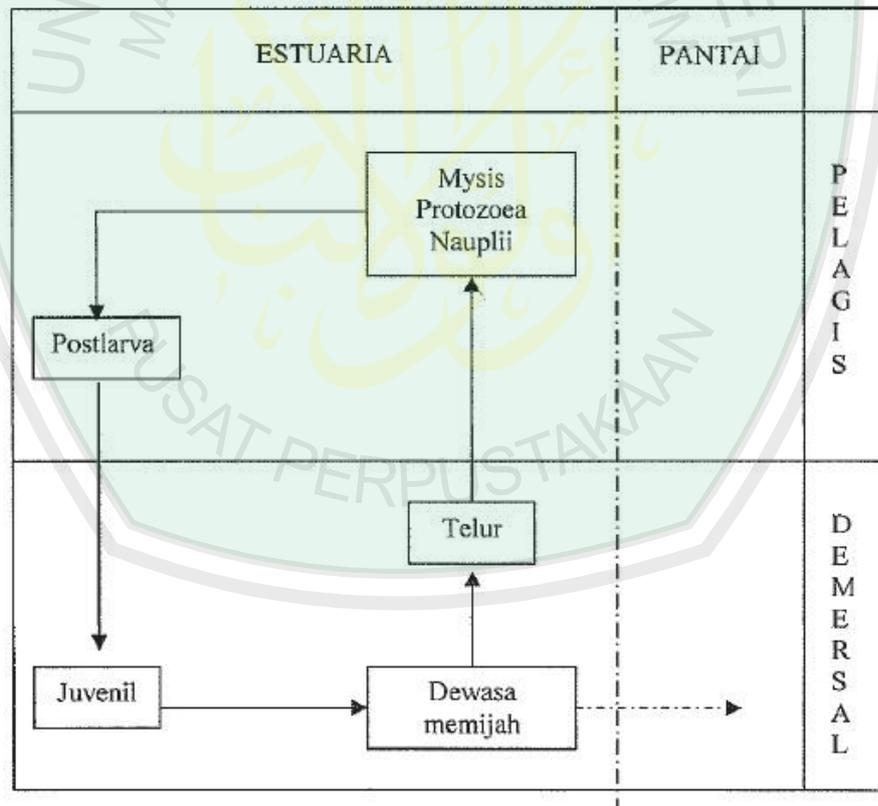
Organ reproduksi udang betina juga terdiri atas organ internal dan eksternal. Organ internal terdiri atas sepasang ovarikum yang memanjang di tengah-tengah bagian dorsal karapas, tepatnya di bagian ventral jantung dan di bagian dorsal hepatopankreas sampai ke bagian pangkal ekor (*telson*). Saluran telur (*oviduct*) keluar dari tengah-tengah kedua sisi ovarium, bermuara pada suatu lubang yang terdapat dalam koksapodit dari pasang kaki jalan ketiga. Organ eksternal udang betina adalah telikum. Pada bagian dalam telikum terdapat seminal reseptakel yang berfungsi untuk menyimpan spermatofora setelah terjadi kopulasi (Motoh, 1981).

Rasio kelamin udang akan mengalami perubahan tergantung pada tempat. Pada perairan estuaris, udang jantan relatif lebih banyak jika dibandingkan dengan udang betina. Sedangkan di lepas pantai justru udang betina yang relatif lebih banyak. Dall *et al.*,(1990) dalam Hidayat (2007) menyatakan bahwa rasio kelamin udang pada setiap tempat dipengaruhi oleh sifat genetiknya, diantaranya adalah ketahanan terhadap guncangan salinitas. Pada salinitas yang rendah udang betina

kurang tahan dibandingkan dengan udang jantan. Oleh sebab itu udang betina lebih cepat meninggalkan pantai menuju ke perairan yang lebih dalam dengan salinitas yang tinggi.

2.1.4 Siklus Hidup

Udang jari (*Metapenaeus elegans*) merupakan salah satu jenis udang penaeid yang seluruh siklus hidupnya berada di eustaria (Gambar 2.4). Pada fase pascalarva udang jenis ini cenderung bermigrasi ke bagaian hulu sungai dengan salinitas rendah. Setelah tumbuh menjadi juvenil, bergerak kembali ke muara sungai dengan salinitas yang lebih tinggi sehingga mampu bertahan hidup pada perairan tawar (Dall *et al.*, 1990).



Gambar 2.4 Siklus hidup udang jari (*M. elegans*) (Dall *et al.*, 1990)

Perkawinan udang dilakukan di luar tubuh, biasanya terjadi sebelum dan sesudah matahari terbenam, dan terjadi antara 3-16 detik. Udang jantan mengeluarkan spermatophore dari petasma. Spermatophore diletakkan pada telikum betina setelah malting sempurna. Setelah malting, 1 - 2 jam kemudian induk betina akan segera memijah/spawning. Proses spawning biasanya berlangsung sekitar 2 menit. Selama itu udang betina akan berenang perlahan dan menyemprotkan seluruh telurnya dari ovary. Selama telur disemprotkan, udang betina dengan cepat akan mencampur telur dan sperma yang melekat pada telikum dengan menggunakan kaki renang, dengan demikian telur akan terbuahi (Jasin, 1984).

Chan (1998) melaporkan bahwa setelah 14 - 24 jam telur dibuahi, telur akan menetas menjadi larva tingkat pertama yang disebut nauplius. Setelah mengalami delapan kali pergantian kulit (molting), nauplius berubah menjadi protozoa (zoea). Protozoa akan berubah menjadi mysis setelah mengalami tiga kali pergantian kulit. Pada mysis, larva masih bersifat planktonis. Mysis akan menjadi pascalarva setelah mengalami tiga kali pergantian kulit. Menurut Dall *et al.*, (1990), pada pascalarva udang sudah aktif berenang dan bermigrasi ke bagian hulu yang memiliki salinitas rendah, dan mulai menuju ke dasar perairan. Fase pascalarva biasanya membutuhkan waktu sekitar tiga minggu. Di perairan dengan salinitas rendah tersebut, pasca larva akan segera bertahap berubah menjadi juvenil setelah mengalami beberapa kali pergantian kulit. Setelah tumbuh menjadi juvenil, mereka bergerak kembali ke muara sungai dengan salinitas yang lebih tinggi. Juvenil mulai aktif mencari makan dan tumbuh di daerah asuhan. Selama tiga sampai empat bulan juvenil menjadi udang muda sampai menjelang dewasa,

kemudian akan mulai bermuara ke arah perairan terbuka (*spawning ground*) setelah matang gonad (Chan, 1998).

2.2 Keragaman Genetik

Keragaman genetik antar populasi merupakan hasil interpretasi dari isolasi secara fisik maupun terhalang secara ekologis, terpisah jauh secara geografis seperti waktu memijah (Sumantadinata, 1982). Dan perpindahan (migrasi) antar dua populasi yang berbeda tempat (Soelistyawati, 1996).

Keragaman genetik mempunyai arti penting dalam stabilitas dan ketahanan populasi seperti pencegahan terhadap kehilangan fitness individu yang disebabkan oleh inbreeding yang dapat mengakibatkan kepunahan karena sifat yang seragam (Ferguson *et al.*, 1995). Keragaman genetik yang rendah akan berakibat negatif terhadap sifat penting dalam makhluk hidup seperti kecilnya kelangsungan hidup suatu organism, berkurangnya pertumbuhan dan keragaman ukuran serta turunnya kemampuan adaptasi (Leary *et al.*, 1985). Hal ini disebabkan karena setiap gen memiliki respon yang berbeda-beda terhadap kondisi lingkungan, sehingga dengan dimilikinya berbagai macam gen dari individu-individu di dalam populasi maka berbagai perubahan lingkungan yang ada akan dapat direspon lebih baik (Smith dan Chesser, 1981).

Ada beberapa metode untuk mengukur keragaman genetik antar populasi. Menurut Imron (1998), ada tujuh cara yaitu pengukuran asam inti, protein sekuensing, elektroforesis, imunologi, kromosom, hubungan antar lokus, morfometrik dan studi breeding. Sedangkan Powers (1991) mengajukan cara protein pengkode lokus (elektroforesis) dan pendeteksian keragaman genetik melalui metode asam inti. Metode-metode yang dimaksud adalah DNA

mitokondria, DNA fingerprinting, amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan sekuensing DNA.

2.2.1 Keragaman Fenotip dan Genotip

Istilah fenotip dan genotip muncul untuk memahami interaksi gen dan lingkungan terhadap organisme. Suatu organisme dikatakan mirip atau menyerupai induknya karena adanya beberapa persamaan ciri-ciri yang dapat dilihat. Dalam hal ini ciri-ciri tadi disebut diwariskan. Ditinjau dari sudut ilmu keturunan, ciri-ciri yang diwariskan tadi disimpan sebagai informasi genetik dalam gen-gen yang secara molekuler tersusun atas asam nukleat DNA (Sofro, 1994).

Yatim (1986) mengemukakan bahwa salah satu cara untuk mengetahui genetik adalah dengan mempelajari fenotipnya. Fenotip ialah bentuk luar atau karakter yang dikandung oleh suatu individu. Karakter merupakan sifat fisik bagian-bagian tubuh atau jaringan. Karakter bisa diatur oleh banyak macam gen atau hanya satu gen saja. Oleh karena itu dengan banyaknya gen yang menumbuhkan karakter, maka dibuat dua kelompok karakter yaitu karakter kualitatif dan karakter kuantitatif. Karakter kualitatif adalah karakter yang dapat dilihat ada atau tidaknya suatu karakter. Fenotip kualitatif pada udang merupakan salah satu keragaman individu yang kebanyakan digambarkan oleh bentuk tubuh, warna dan jenis kelamin yang disebabkan oleh aksi beberapa pasangan gen. Fenotip kuantitatif merupakan fenotip dengan satu kategori yang dapat diukur berdasarkan distribusi secara berkelanjutan dalam bentuk kurva dari panjang tubuh, bobot tubuh dalam perbedaan usia, jumlah telur, bobot induk betina, dan konservasi pakan atau efisiensi pemberian pakan (Tave, 1995). Karakter kualitatif

ditentukan oleh banyak gen sedangkan pada karakter kuantitatif ditentukan oleh satu atau dua gen saja. Selain itu fenotip merupakan hasil interaksi antara genotip dan lingkungan serta merupakan bentuk luar atau sifat-sifat yang tampak.

Informasi genetik yang disimpan dalam DNA selamanya akan tetap tersimpan dalam kodon-kodon kalau tidak diekspresikan dalam molekul protein. Molekul protein yang terbentuk untuk selanjutnya akan menjadi ciri-ciri yang dapat dilihat, baik dalam bentuk sebagai protein itu sendiri atau faktor-faktor lain yang merupakan suatu gambaran bentuk anatomis, fisiologis, biokimia atau bahkan perilaku tertentu. Dalam kaitan ekspresi ciri-ciri ini, bila suatu ciri-ciri masih dinyatakan dalam perangkat genetiknya, maka ciri-ciri ini disebut genotip. Genotip dimiliki oleh setiap individu karena tiap individu terdapat perangkat genetik (Sofro, 1994).

2.3 Gen dan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

Sifat genetik yang ada pada udang jari (*Metapenaeus elegans*) sampai saat ini hanya diketahui berdasarkan pada sifat fenotipnya sedangkan sifat genotipnya belum banyak diketahui. Sifat fenotip udang jari dilaporkan oleh Hidayat (2007) dimana panjang total udang jari berkisar antara 38,5 – 84,5 mm dan bobot tubuh berkisar antara 1,8 – 36,5 gram. Sifat fenotip merupakan ciri-ciri yang diekspresikan dalam bentuk anatomis, fisiologis atau bahkan perilaku tertentu yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Sedangkan, sifat genotip merupakan ciri-ciri yang disimpan sebagai informasi genetik dalam gen-gen yang secara molekular tersusun atas asam nukleat DNA yang akan tersimpan dalam kodon-kodon. Sifat genotip inilah yang nantinya akan mempengaruhi perkembangan sifat fenotip suatu individu dalam beradaptasi dengan lingkungannya (Sofro, 1994).

Bagian terkecil dari makhluk hidup atau DNA yang mempengaruhi sifat fenotip setiap individu juga dijelaskan dalam Al-Qur'an surat Yunus (10) ayat 61:

قُلْ لَوْ شَاءَ اللَّهُ مَا تَلَوْتُهُ عَلَيْكُمْ وَلَا أَدْرَاكُمْ بِهِ ۖ فَقَدْ لَبِثْتُ فِيكُمْ عُمُرًا مِّن قَبْلِهِمْ ۗ أَفَلَا تَعْقِلُونَ ﴿٦١﴾

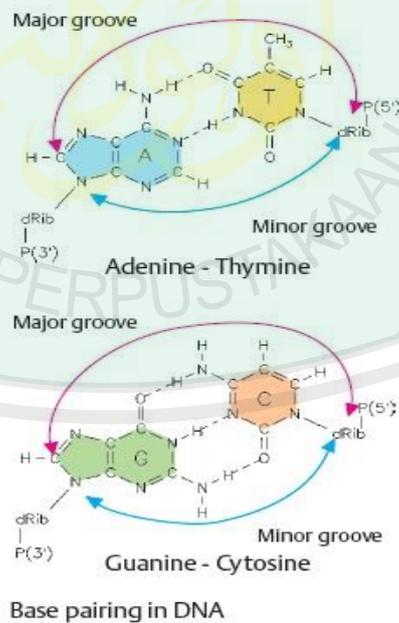
Artinya: “Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah (atom) di bumi ataupun di langit. tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam Kitab yang nyata (Lauh mahfuzh)”.

Berdasarkan ayat di atas, dijelaskan bahwa proses penciptaan makhluk hidup di bumi hanya Allah yang lebih tahu detailnya. Umatnya hanya diperbolehkan mengetahui sebagian kecil dari proses penciptaan tersebut. Tidak hanya itu bagian terkecil dari makhluk hidup (DNA, RNA, dan protein) pun ada dan tertulis dalam Al-Qur'an, sehingga membantu dalam hal menganalisis urusan yang kecil atau besar dengan tempat dan menghasilkan data yang akurat (Quthb, 2004).

Fatchiyah *et al.*,(2011) menyatakan bahwa gen adalah unit hereditas suatu organisme hidup. Gen ini dikode dalam materi genetik organisme yang dikenal sebagai molekul DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). Ekspresi gen dipengaruhi oleh lingkungan internal atau eksternal seperti perkembangan fisik atau perilaku dari organisme itu. Gen tersusun atas urutan basa nukleotida (Adenin-Thymin, Guanin-Cytosin) (Gambar 2.5), yang terdiri dari daerah yang mengkode suatu informasi genetik (ekson), daerah yang tidak mengkode informasi genetik (intron) dan bagian yang mengatur ekspresi gen yaitu sekuens pengontrol ekspresi gen (*regulatory sequens*).

Ekson didefinisikan sebagai kodon yang memiliki arti dan dapat ditranslasi menjadi protein (asam amino). Kodon adalah daerah coding yang menyandi asam amino tertentu dan terdiri dari nukleotida yang tersusun atas 3 basa. Sedangkan Intron adalah daerah non coding yang tidak menyandi asam amino tertentu sehingga tidak dapat ditranslasi menjadi protein. Untuk posisinya, intron diapit oleh dua ekson. Ini menandakan bahwa jumlah intron lebih sedikit dari jumlah ekson (Agoes dan Suryadi, 2005).

Kontrol ekspresi gen (*regulatory sequens*) merupakan sekuen DNA yang berperan dalam translasi informasi genetik menjadi protein. Informasi genetik yang diterjemahkan menjadi protein kemudian akan mempengaruhi sifat fenotip suatu organisme. Oleh karena itu, informasi genetik tidak bermakna apa pun bagi suatu organisme apabila tidak diekspresikan menjadi fenotip (Toha, 2001).



Gambar 2.5 Struktur basa DNA (Passarge, 2007)

Secara umum DNA dapat ditemukan di dalam nukleus, mitokondria, kloroplas, dan plasmid. Pada sel hewan DNA hanya bisa ditemukan di dalam nukleus dan mitokondria. DNA yang terdapat pada nukleus berperan sebagai materi genetik yang diwariskan dari kedua orang tua dan mengatur segala aktivitas sel. DNA yang ditemukan di dalam mitokondria berperan menyandi kompleks protein tertentu yang sangat diperlukan untuk produksi ATP, selain itu juga sebagai materi genetik yang diwariskan secara maternal (Susminarsih, 2010).

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) menurut definisi adalah reaksi memperbanyak DNA secara *in vitro* dengan memanfaatkan cara replikasi DNA dengan bantuan enzim DNA polymerase dan perubahan sifat fisik DNA terhadap suhu (Lisdiyanti, 1997). Sedangkan menurut Erlich (1989), PCR adalah suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis sekuens tertentu DNA dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibrid pita yang berlawanan dan mengapit daerah target DNA. Menurut Saiki (1996), PCR adalah sebuah metode *in vitro* yang memperbanyak sekuens nukleotida (DNA dan RNA) tertentu melalui suatu rangkaian inkubasi pada suhu yang berbeda. Sebagaimana telah dijelaskan dalam Al-Qur'an surat An-Nuur (24) ayat 35 yaitu:

﴿ اللَّهُ نُورُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ ۖ مِثْلُ نُورِهِ ۖ كَمِشْكَاةٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ ۚ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ ۚ الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ شَجَرَةٍ مُبْرَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا يُضِيءُ ۖ وَلَوْ لَمْ تَمْسَسْهُ نَارٌ ۖ نُورٌ عَلَى نُورٍ ۗ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ ۗ مَنْ يَشَاءُ ۖ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَلَ لِلنَّاسِ ۚ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴿٣٥﴾

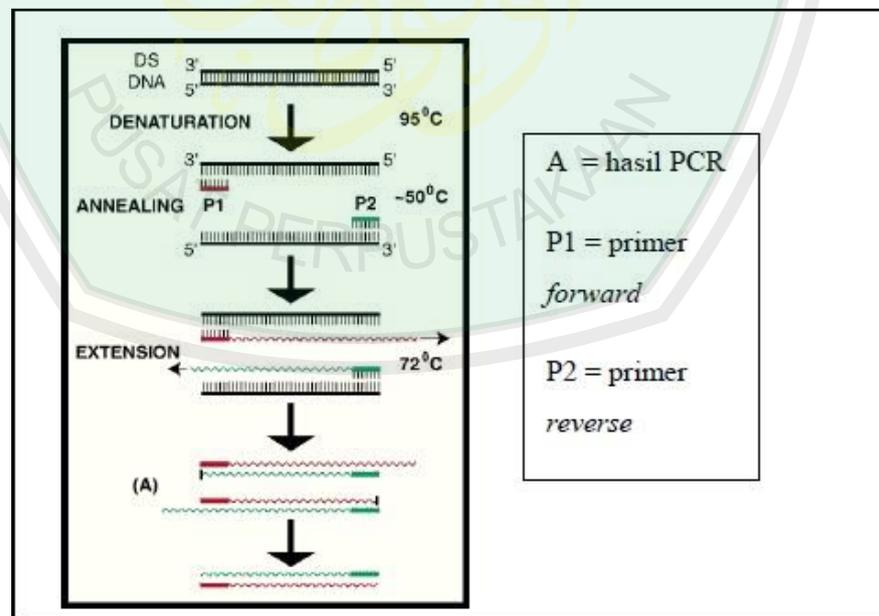
Artinya: "Allah (Pemberi) cahaya (kepada) langit dan bumi. perumpamaan cahaya Allah, adalah seperti sebuah lubang yang tak tembus[1039], yang di dalamnya ada Pelita besar. Pelita itu di dalam kaca (dan) kaca itu seakan-akan bintang (yang bercahaya) seperti mutiara, yang dinyalakan dengan minyak dari pohon yang berkahnya, (yaitu) pohon zaitun yang tumbuh tidak di sebelah timur (sesuatu) dan tidak pula di sebelah barat(nya)[1040], yang minyaknya (saja) hampir-hampir menerangi, walaupun tidak disentuh api. cahaya di atas cahaya (berlapis-lapis), Allah membimbing kepada cahaya-Nya siapa yang dia kehendaki, dan Allah memperbuat perumpamaan-perumpamaan bagi manusia, dan Allah Maha mengetahui segala sesuatu".

Allah yang mengadakan segala sesuatu, dan Dia adalah cahaya segala sesuatu. Dari Allah-lah cahaya itu bermula dan dari Allah pula cahaya itu bersumber, karena Allah dan kekuasaan-Nyalah cahaya-cahaya itu dapat terpancar dan hasilnya dapat tewujud. Firman Allah itu merupakan sebuah upaya untuk mendekatkan pengertian tersebut ke dalam logika manusia (Qurtubhi, 2009).

Ayat di atas menjelaskan bahwa cahaya atau suhu (panas) merupakan sumber kehidupan sama halnya dalam suatu rangkaian PCR berperan dalam melipat gandakan rangkaian nukleotida (DNA) dengan bantuan suhu. PCR merupakan teknik mengamplifikasi molekul DNA pada bagian tertentu yang ukuran panjangnya ditentukan oleh posisi sepasang primer yang mengapitnya. Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam proses amplifikasi adalah sepasang primer oligonukleotida berukuran antara 18-24 bp. Pada spesies udang, sepasang primer yang digunakan biasanya berukuran 20-27 bp yang berkomplemen dengan rangkaian basa tertentu dari DNA target (Folmer *et al.*, 1994), dNTP (sumber nukleotida dalam proses PCR), enzim DNA polimerase, larutan penyangga, $MgCl_2$ atau $MgSO_4$, DNA *template* dan *sterile destilated water* (SDW) (Fatchiyah *et al.*, 2011)

2.4.1 Langkah PCR

Proses PCR secara garis besar terdiri dari *pra*-PCR, amplifikasi molekul DNA dan *pasca*-PCR. *Pra*-PCR yang juga disebut *initial denaturation* ialah denaturasi awal selama 4 menit pada suhu 94°C. Selanjutnya dibutuhkan 25-35 siklus untuk amplifikasi dengan program perubahan suhu yang terdiri atas denaturasi, *annealing*, dan *extention* (Gambar 2.6). Pada spesies udang siklus yang dibutuhkan ialah 35 siklus (Folmer *et al.*, 1994). Pada tahap denaturasi, rantai utas ganda DNA akan terpisah secara sempurna dan menghasilkan utas tunggal yang merupakan cetakan bagi pembentukan utas baru DNA. Penyebab kegagalan PCR yang paling umum adalah pada proses denaturasi yang tidak sempurna. DNA utas ganda pada umumnya terdenaturasi sempurna pada suhu 94°– 95°C (Taylor *et al.*, 1995). Pada udang, Suhu denaturasi yang biasa digunakan ialah 95°C selama 1 menit (Folmer *et al.*, 1994).



Gambar 2.6 Siklus tunggal PCR (Cowrie Genetic Database Project, 2010)

Setelah DNA cetakan terdenaturasi, selanjutnya pada suhu yang lebih rendah terjadi proses penempelan primer (*annealing*) pada DNA utas tunggal yang komplemen dengan urutan nukleotida primer. Suhu dan lamanya waktu *annealing* bergantung pada komposisi, panjang dan konsentrasi primer, namun biasanya berlangsung selama 45 detik hingga 1 menit pada suhu 50°-68°C proses penempelan primer (*annealing*) (Folmer *et al.*, 1994). Sedangkan proses *annealing* pada udang biasanya berlangsung selama 1 menit pada suhu 40°C. Pada suhu 72°C, primer akan mengalami perpanjangan (*extention*) dengan bantuan enzim polimerase selama 1 menit sehingga terbentuk DNA untai ganda. DNA untai ganda yang baru terbentuk, kemudian didenaturasi lagi, ditemplei primer lagi dan mengalami perpanjangan lagi dan seterusnya secara berulang-ulang. Satu ulangan dari proses ini disebut satu siklus. Penentuan lama waktu untuk setiap tahap dalam satu siklus bergantung pada panjang molekul DNA yang akan digandakan. Proses PCR diakhiri dengan *final extention* atau tahapan pemanjangan akhir selama 7 menit yang disebut *pasca-PCR*.

2.4.2 Siklus PCR

2.4.2.1 Denaturasi

Proses denaturasi DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusny ikatan hydrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini seluruh reaksi enzim tidak berjalan (Gaffar, 2007). Suhu denaturasi dibuat sedemikian rupa sehingga bisa mendenaturasi DNA *template* secara sempurna tanpa harus menghilangkan aktivitas enzim polimerase. Secara normal pada sebuah siklus PCR tahap pemisahan DNA (denaturasi) memakan waktu 15 sampai

60 detik. Pengulangan pembukaan (denaturasi) pada suhu 94°C mengakibatkan deaktivasi enzim yang bisa menghambat produk hasil pada siklus berikutnya. Sedangkan menurut Lisdiyanti (1997), tidak sempurnanya denaturasi dapat menyebabkan utas DNA terputus dan tahap denaturasi yang terlalu lama mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim polimerase. Waktu paruh aktivitas enzim *Taq* polimerase adalah lebih dari 2 jam pada suhu 92,5°C, atau 40 menit pada 95°C dan 5 menit pada suhu 97°C.

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh sekuen target. Jika sekuen target kaya akan G-C maka diperlukan suhu yang lebih tinggi. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya aktifitas enzim *Taq* polimerase (Muladno, 2010).

2.4.2.2 Primer dan *Annealing*

PCR atau reaksi polimerase berantai merupakan cara untuk mengamplifikasi (melipat gandakan) suatu fragmen DNA secara *in vitro* dengan menggunakan suatu primer tertentu (Taylor *et al.*, 1995). Primer merupakan rantai tunggal pendek yang mengandung nukleotida dan bersifat spesifik. Primer akan melekat pada sekuen yang komplemen dan mengapit sekuen spesifik yang akan diamplifikasi. Primer yang umum digunakan adalah primer *forward* dan *reverse* (Wolfe, 1995). Beberapa syarat primer yang baik adalah berkomplemen dengan DNA cetakan spesifik yang diinginkan, memiliki panjang basa 18-28 basa, memiliki *temperature melting* (T_m) 50-60°C, mengandung 40-60% basa guanine (G) dan sitosin (C), tidak membentuk dimer antar primer (Sambrook dan Russell, 2001).

Pada penelitian ini amplifikasi PCR mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*) menggunakan primer COIL (5'-TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA-3') dan COIH (5'-ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA-3'). Primer COIL mempunyai 20 panjang basa, sedangkan primer COIH mempunyai 21 panjang basa (Williams dan Benzie, 1997). Primer COI (Cytochrome *c* oxydase subunit I) merupakan primer universal yang digunakan untuk amplifikasi fragmen gen mitokondria pada daerah sitokrom *c* oksidase yang berperan sebagai gen penyandi protein dalam genom mitokondria hewan (Folmer *et al.*, 1994).

Ujung 3' primer penting dalam menentukan spesifisitas dan sensitivitas PCR. Ujung ini tidak boleh mempunyai 3 atau lebih basa G atau C, karena dapat menstabilisasi *annealing* primer non spesifik. Disamping itu ujung 3' kedua primer tidak boleh komplementer satu dengan yang lain, karena akan mengakibatkan pembentukan primer-dimer yang akan menurunkan hasil produk yang diinginkan. Ujung 5' primer tidak terlalu penting untuk *annealing* primer, sehingga memungkinkan untuk menambahkan sekuen tertentu misalnya sisi restriksi enzim, *start codon* ATG (Sulistyaningsih, 2007).

Menurut Erlich (1989) primer universal bisa didesain untuk memperbanyak sebuah partikel inti atau fragmen gen organel. Hal ini dapat digunakan untuk menentukan filogenetik pada analisa perbandingan sekuen untuk tingkatan taksonomi kelas atau filum. Sedangkan menurut Lisdiyanti (1997) primer universal mempunyai urutan basa (10- 25 basa) dan dibuat secara acak yang diharapkan akan menempel pada beberapa bagian genom sehingga membentuk visualisasi elektroforesis yang spesifik untuk satu jenis organisme.

Tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template. Penempelan primer sangat penting pada proses PCR karena jika suhu *annealing* terlalu rendah bisa membentuk hasil yang tidak spesifik begitu juga jika terlalu tinggi maka bisa menyebabkan penguraian utas tunggal primer DNA dupleks (Hsu *et al.* 1996). Sedangkan menurut Lisdiyanti (1997) suhu *annealing* sangat penting untuk mengurangi timbulnya pita elektroforesis yang tidak spesifik. Suhu *annealing* optimum untuk beberapa pasangan primer-*template* dan suhu optimumnya merupakan suatu fungsi dari *melting temperature* dari pasangan primer-*template* yang kurang stabil serta dari produk. Penempelan sebuah oligonukleotida pada sebuah *template* DNA dipengaruhi oleh 2 variabel yaitu tingkat disosiasi primer dari kompleks primer *template* sebelum awal polimerisasi dan tingkat pada DNA polimerase dalam memperpanjang primer sampai terbentuk primer-*template* yang stabil.

Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Primer yang terlalu pendek dapat menyebabkan primer sulit untuk menempel pada cetakan, sedangkan primer yang terlalu panjang dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak spesifik. Suhu penempelan ini sebaiknya sekitar 5°C di bawah suhu leleh. Secara umum suhu leleh (T_m) dihitung dengan rumus $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ C$ (Rybicky, 1996).

2.4.2.3 Ekstension

Setelah primer menempel pada utas tunggal DNA cetakan, maka DNA polimerase akan mensintesis utas DNA yang baru berdasarkan utas DNA cetakan. DNA polimerase mulai mensintesis DNA dengan mengikat deoksiribonukleotida pada ujung 3'-OH dari primer, sehingga arah pertumbuhan utas DNA yang baru adalah 5' - P ke 3'-OH. Sintesis DNA atau pemanjangan primer ini dilakukan pada suhu cukup tinggi, yaitu sekitar 72°C supaya tahap berikutnya (denaturasi protein) relatif lebih mudah dan enzim Taq DNA polimerase dapat bekerja optimal. Dalam tahap ekstension atau sintesis DNA, enzim polimerase bergabung bersama dengan nukleotida dan pemanjangan primer lengkap untuk sintesis sebuah DNA utas ganda. Reaksi ini akan berubah dari siklus ke siklus mengikuti perubahan konsentrasi DNA (Hsu *et al.*, 1996).

2.4.3 Komponen PCR

Menurut Lisdiyanti (1997) replikasi DNA yang dimanfaatkan dalam PCR bisa dijelaskan sebagai berikut, jika ada DNA utas tunggal yang bertindak sebagai *template* atau cetakan, dan ada energi pembangun basa yaitu dNTP, maka enzim DNA polimerase akan mengkatalis pembuatan utas lain DNA yang merupakan komplemen dari pada cetakan, reaksi ini harus dimulai dengan adanya primer atau pemula. Sedangkan syarat utama yang dibutuhkan dalam PCR adalah DNA murni, primer, dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), *Taq* DNA polimerase, buffer PCR, MgCl₂, pengaturan suhu yang sesuai untuk setiap tahap PCR.

Menurut Sambrook *et al.* (1989) komponen PCR terdiri dari (a) Oligonukleotida biasanya panjangnya tidak kurang dari 16 basa dan selalu digunakan pada konsentrasi 1 μM dalam PCR yang dapat digunakan paling sedikit

30 siklus amplifikasi. Keberadaan konsentrasi oligonukleotida yang tinggi bisa menyebabkan penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan akibatnya terjadi amplifikasi sekuen bukan target yang tidak diinginkan. Sebaliknya PCR akan sangat tidak efisien ketika konsentrasi primer terbatas (b) *Buffer* standar untuk PCR mengandung 50 mM KCL, 10mM Tris-Cl dan 1,5 mM MgCl₂ (c) *Tag* DNA Polimerase mempunyai dua bentuk *Tag* DNA polymerase yaitu enzim asli yang dimurnikan dari *Thermus aquaticus* dan bentuk rekayasa genetic dari enzim yang disintesis oleh *E.coli* (*Ampli Tag*) (d) *Deoxyribonucleotide Triphosphate* (dNTP) digunakan pada konsentrasi 200 µM (e) Sekuen target yang digunakan dalam PCR dalam bentuk DNA utas tunggal (f) DNA polymerase adalah enzim yang mensintesis utas baru berupa DNA komplemen kepada DNA atau RNA yang sudah ada sebagai cetaknya dan kebanyakan polymerase bisa berfungsi jika ada pembentukan DNA utas ganda pada daerah cetakan yang dilakukan oleh primer sebagai awal polimerisasi (g) Primer DNA yang digunakan adalah primer spesifik COIL *reverse* dengan untaian (5' TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA 3') dan COIH *forward* dengan untaian (5' ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA 3').

2.5 Metode Ekstraksi DNA

Kesulitan dalam mengekstraksi DNA diantaranya adalah dalam memisahkan DNA dari keterkaitannya dengan RNA dan protein serta dalam pengisolasiannya tanpa pemecahan ke dalam fragmen – fragmen yang lebih kecil sesuai panjangnya (Stine, 1973).

Beberapa prosedur telah banyak digunakan untuk mengekstraksi DNA dari mikroorganisme, pada umumnya melibatkan fenol, urea, nitrit, deterjen, dan

aerosol. Sedangkan Sambrook *et al.* (1989) menyatakan bahwa DNA dari mamalia biasanya diisolasi melalui penghancuran sel dari jaringan dengan proteinase-K dengan EDTA dan deterjen yang kemudian diekstraksi dengan fenol. Sama halnya dengan metode ekstraksi Tamayo (2006) membrane sel dipecahkan dengan lysis buffer, proteinase-K dan SDS. Setelah asam nukleat dikeluarkan dari sel kemudian ditambahkan garam buffer (NaCl). Kemudian larutan DNA tersebut disentrifugasi sehingga DNA yang berupa cairan akan terletak di atas larutan, garam *buffer* akan berada di bawah, sedangkan endapan protein akan terkontaminasi di antara kedua lapisan tersebut. Larutan cair tersebut kemudian dipindahkan dari tube dan proses deproteinasi di ulang dengan menambah isopropanol sampai tidak terlihat lapisan protein dibagian tengah larutan. Selanjutnya ekstrak DNA tadi dicampur dengan etanol dan didiamkan mengendap dalam freezer. Setelah disentrifugasi endapan DNA dilarutkan kembali dengan *buffer* yang mengandung EDTA untuk mencegah DNase dan larutan ini bisa disimpan pada suhu 4⁰C (penyimpanan jangka pendek) atau pada suhu -70⁰C (penyimpanan jangka panjang).