

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Udang Jari (*Metapenaeus elegans*)

Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) dalam dunia perdagangan internasional dikenal dengan nama *brown shrimp*, *fine shrimp* (Inggris), *crevette elegante* (Perancis), dan *camaron fino* (Spanyol) (Carpenter dan Neim, 1998). Di Indonesia, udang jari mempunyai beberapa nama lokal yaitu, udang jahe dan udang dogol hijau (Zarochman, 2003).

Berdasarkan klasifikasi, udang Jari (*Metapenaeus elegans*) dikelompokkan dalam (Lovett, 1981):

Phylum : Arthropoda
Class : Crustacea
Order : Decapoda
Family : Penaeidae
Genus : *Metapenaeus*
Species : *Metapenaeus elegans* De Man, 1907

Sebagai *family* penaeidae, udang jari masuk dalam kelompok udang peaneid yang umum hidup di perairan payau, yaitu perairan yang menjadi pertemuan antara air sungai dan air laut. Di daerah ini terdapat banyak makanan seperti detritus, *benthic amphipods*, *polychaeta* serta zat-zat hara yang dibutuhkan oleh udang (Naamin, 1984).

Udang Jari berasal dari daerah perairan barat Malaysia, yaitu di pantai barat dan selatan Sri Lanka (FAO, 1984; Silas dan Muthu, 1976). Distribusinya

meliputi wilayah Filipina, Malaysia, Kalimantan dan Papua New Guinea (FAO, 1984). Di Indonesia udang Jari terdapat di perairan Segara Anakan kabupaten Cilacap Jawa Tengah dan merupakan jenis udang yang paling banyak ditangkap oleh nelayan (Dudley, 2000a).

Hasil penangkapan perikanan, baik dari jenis udang ataupun yang lainnya, merupakan salah satu karunia Allah SWT, sebagaimana yang tertulis di dalam surat an-Nahl (16):14,

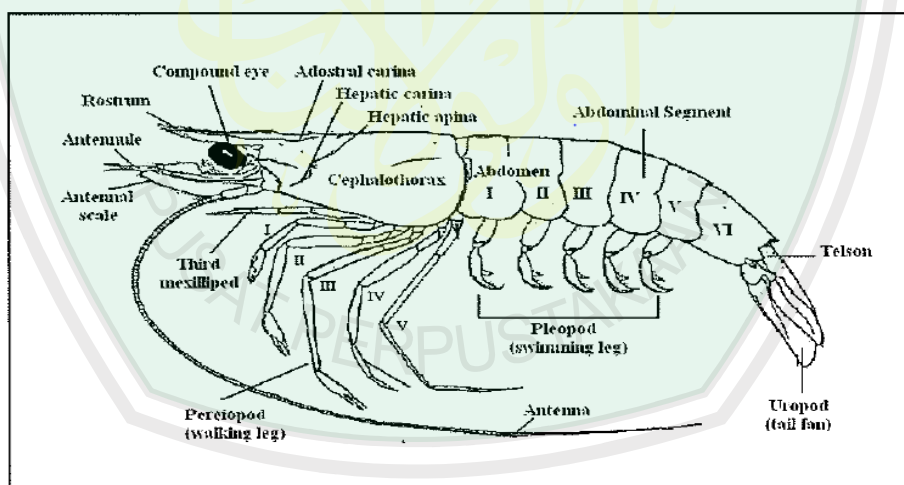
وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى
الْفُلَّكَ مَوَاحِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ﴿١٤﴾

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

Berdasarkan surat an-Nahl ayat 14 diatas, Allah SWT menyampaikan bahwa lautan beserta isinya telah dianugerahkan kepada umat manusia. Lautan dapat dimanfaatkan sebagai media transportasi dari satu tempat ke tempat lain dan juga sebagai sumber penghasilan, seperti penangkapan perikanan dan pengambilan perhiasan yang kemudian dapat diperdagangkan oleh manusia. Selain itu, lautan juga dianugerahkan oleh Allah SWT agar manusia dapat memakan daging yang segar, yaitu hasil tangkapan laut, baik dari jenis udang maupun jenis ikan, yang dapat bermanfaat bagi kehidupan manusia (al-Qurthubi, 2008).

2.1.1 Morfologi dan Anatomi Udang Jari

Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) merupakan salah satu jenis udang di dalam *family* penaeidae dengan panjang total udang Jari berkisar antara 38,5 mm-84,5 mm dengan bobot tubuh berkisar antara 1,8 – 36,5 gr (Hidayat, 2007). Secara umum udang dari *family* penaeidae mempunyai bagian tubuh yang sama, yang terdiri dari dua bagian yaitu bagian depan dan bagian belakang (**Gambar 2.1**). Bagian depan disebut *chepalothorax*, yang terdiri dari 5 ruas pada bagian kepala (*chepal*) dan 8 ruas pada bagian dada (*thorax*). Bagian belakang terdiri dari perut (*abdomen*) sebanyak 6 ruas dan ekor (*telson*) (Lytle, 2005).



Gambar 2.1 Morfologi udang Jari (FAO, 1984)

Pada bagian-bagian tersebut (kepala, dada dan perut) terdapat anggota-anggota tubuh yang mempunyai fungsi bermacam-macam (**Tabel 2.1**). Keseluruhan tubuh udang ditutupi oleh kerangka luar yang disebut dengan

eksoskeleton dan terbuat dari zat kitin. Kerangka tersebut mengeras kecuali pada sambungan-sambungan antar ruas (Pratiwi, 2008).

Tabel 2.1 Fungsi-fungsi anggota tubuh udang (Lytle, 2005)

Bagian	Anggota Tubuh	Fungsi
Kepala	Antenula	Keseimbangan, menyentuh, merasa
	Antena	Menyentuh dan merasa
	Mandibula	Menggigit makanan
	Maxila ke-1 dan ke-2	Memegang makanan
Dada	Pes maxilaris ke-1 sampai 3	Memegang makanan, merasa
	Chelipes	Menyerang, bertahan, menangkap makanan dan memegang
	Kaki jalan ke-2 dan ke-3	Berjalan, menggengam
	Kaki jalan ke-4 dan ke-5	Berjalan
Perut	Kaki renang ke-1 dan ke-2	Reproduksi (jantan)
	Kaki renang ke-3 sampai 5	Sirkulasi H ₂ O, membawa telur
	Uropod	Berenang, menjaga telur

Ciri yang paling menonjol dari udang Jari adalah memiliki kulit yang keras, berwarna kecoklatan seperti warna jahe dengan bintik-bintik kecil berwarna coklat kehitaman. Pada udang yang telah matang gonadnya, bintik tersebut akan berwarna coklat kemerahan, terutama pada bagian *dorsal cephalothorax*. Kaki jalan berwarna jernih sampai berwarna pink, dan pada kaki renang belang-belang

warna pink. Pada tepi dan bagian ujung upopoda serta kedua antena berwarna pink (Hidayat, 2007).

Rostrum udang Jari kuat, cenderung lurus dengan ujung yang tajam. Pada bagian atas terdapat 9 – 12 gerigi. Gigi dorsal terdepan terletak di ujung rostrum. *Adrostral carina* berakhir antara gigi epigastric dan gigi berikutnya. *Sulcus adrostral epigastric* mencapai $\frac{1}{3}$ anterior dari panjang karapas. *Post rostral carina* berlanjut ke posterior $\frac{1}{10}$ - $\frac{1}{12}$ dari panjang karapas. Flagela luar lebih panjang dari dalam, $\frac{2}{5}$ dari panjang karapas dan $\frac{3}{5}$ dari *antenula penducle*. *Post antenna inferior* mencapai ujung segmen I melampaui ujung kornea, $\frac{2}{5}$ dari segmen pertama (Saputra, 2005a).

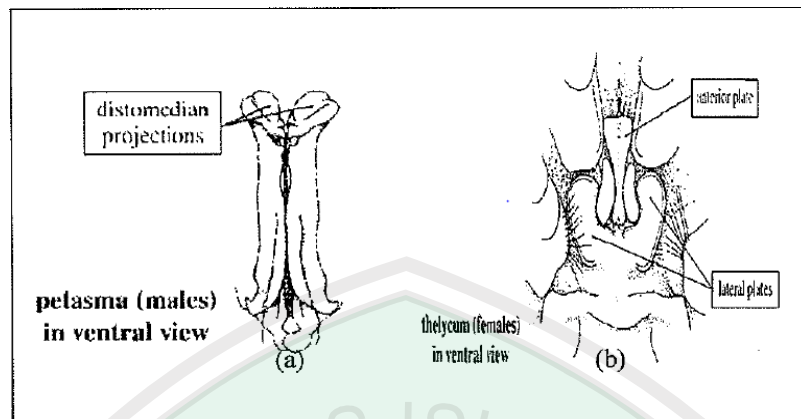
Sistem pencernaan, syaraf dan pernapasan udang Jari sama seperti udang pada umumnya. Sistem pencernaan udang dimulai dari mulut, kerongkongan, lambung, usus dan anus. Makanan udang adalah udang-udang kecil gastropoda atau larva serangga atau bahan-bahan lainnya yang rapuh. Sistem syaraf udang terdiri atas ganglion yang disebut otak dan dua circum penghubung oesophagus. Mata udang adalah mata majemuk yang bertangkai terletak pada bagian rostrum. Permukaan mata yang konveks dilindungi oleh kutikula yang transparan disebut kornea (lensa). Sistem pernapasan udang menggunakan insang yang melekat pada anggota tubuhnya (Jasin, 1984).

Alat peredaran darah terdiri dari darah dan pembuluh-pembuluhnya. Jantung berupa kantong berbentuk pelana yang terletak di dalam dada. Tiga pasang lubang yang dilengkapi dengan katup, disebut ostia, memungkinkan darah masuk kembali dari sinus yang melingkungnya. Darah dipompa ke seluruh

bagian tubuh melalui arteri, dimana setiap pangkal arteri terdapat katup untuk mencegah darah kembali. Alat-alat ekskresi berupa sepasang bentukan yang lebar, disebut kelenjar antenna atau kelenjar hijau, terletak dibagian ventral bagian kepala. Setiap kelenjar terdiri atas bagian glandular (berwarna hijau), vesika urinaria, dan saluran yang bermuara keluar melalui pori di ujung papila pada segmen basal antenna (Radiopoetra, 1996).

Organ reproduksi pada udang merupakan salah satu kunci utama yang cepat untuk membedakan dengan spesies lain secara morfologi. Pada udang Jari jantan, *distolateral projection* pipih dan biloped, tumpang tindih dengan *distomedian projection*. Jarak diantara *distomedian projection* lebih dari $\frac{1}{2}$ dari panjang total petasma, dan jarak di antara *distolateral projection* sekitar $\frac{1}{3}$ dari total. *Appendix masculine* dengan ujung pipih, pipih memanjang ke arah posterior berbentuk seperti *pear*. Pada udang betina, telikum dengan lempeng anterior seperti lidah, dengan bagian posterior lebih kecil/sempit. Bagian median tertekan ke dalam ke arah posterior, dan dengan lempeng lateral berbentuk L dan secara keseluruhan menyerupai mangkok (Hidayat, 2007).

Udang penaeidae termasuk ke dalam kelompok heteroseksual, sehingga antara jantan dengan betina dapat dibedakan secara morfologi (**Gambar 2.2**). Organ reproduksi udang jantan ataupun udang betina terdiri atas organ internal dan eksternal.



Gambar 2.2 Organ reproduksi udang jari (FAO, 1984)

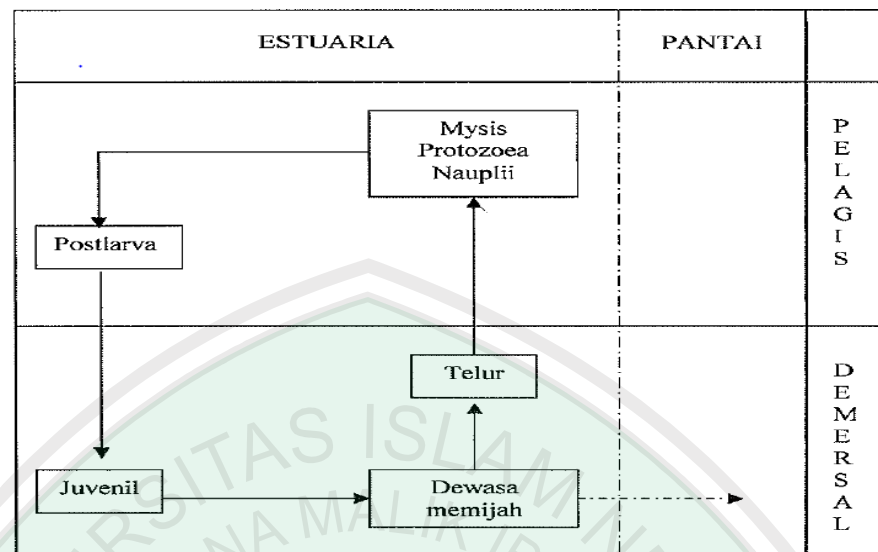
Organ internal udang jantan terdiri atas sepasang testis, sepasang *vas deferens* dan sepasang terminal ampul. Testis terletak di tengah-tengah bagian dorsal *cephalothorax*, tepatnya di bagian ventral jantung. *Vas deferens* merupakan saluran testis yang membentuk banyak gulungan berkelok-kelok, terletak 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 ke lima. Organ eksternalnya yaitu petasma yang berfungsi untuk menyalurkan sperma dan meletakkannya pada alat kelamin betina. Petasma merupakan modifikasi dari bagian endopodit kaki renang pertama. Organ eksternal lainnya adalah *appendix masculine* yang terletak pada kaki renang ke dua (Motoh, 1981).

Organ internal udang betina terdiri atas sepasang ovarium yang memanjang di tengah-tengah bagian dorsal karapas, tepatnya di bagian ventral

jantung dan di bagian dorsal hepato-pankreas sampai ke bagian pangkal ekor (*telson*). Saluran telur oviduk keluar dari tengah-tengah kedua sisi ovarium, bermuara pada suatu lubang dalam koksapodit dari sepasang kaki jalan yang ke tiga. Organ eksternalnya adalah telikum. Pada bagian dalam telikum terdapat seminal reseptakel yang berfungsi untuk menyimpan sperma setelah terjadi kopulasi (Motoh, 1981).

2.1.2 Daur Hidup Udang Jari

Dudley (2000a) menyatakan bahwa seluruh daur hidup udang Jari berada di muara sungai atau estuaria dengan salinitas rendah, sehingga dari fase telur hingga menjadi udang dewasa berada di kawasan estuaria (**Gambar 2.3**). Jasin (1984) menjelaskan bahwa perkawinan udang dilakukan di luar tubuh. Udang jantan mengeluarkan sperma dari petasma dan diletakkan pada telikum betina. Setelah itu, induk betina akan menyemprotkan seluruh telurnya dari ovarium. Selama telur dikeluarkan, induk betina dengan cepat akan mencampurkan telur dengan sperma yang melekat pada bagian telikum dengan bantuan kaki renang, sehingga telur dapat terbuahi.



Gambar 2.3 Daur hidup udang jari (Blaxter dan Southward, 1990).

Menurut Naamin (1984) telur akan menetas menjadi larva tingkat pertama (*nauplius*) setelah 24 jam dibuahi. Chan (1998) menambahkan, setelah delapan kali mengalami pergantian kulit (*molting*), *nauplius* akan berubah menjadi protozoa. Protozoa akan berubah menjadi *mysis* setelah mengalami *molting* sebanyak tiga kali, lalu *mysis* akan berubah menjadi pascalarva setelah mengalami 3 kali *molting*. Blaxter dan Southward (1990) menyebutkan pada fase ini udang sudah mulai berenang dan bermigrasi ke bagian hulu sungai yang memiliki salinitas rendah dan mulai menuju ke dasar perairan. Di bagian hulu sungai tersebut pascalarva secara bertahap akan berubah menjadi juvenil setelah mengalami beberapa kali *molting*. Setelah menjadi juvenil, maka akan bergerak kembali ke muara sungai dengan salinitas yang lebih tinggi. Selama 3 – 4 bulan juvenil menjadi udang muda sampai menjelang dewasa, kemudian akan mulai bermigrasi ke arah perairan terbuka di daerah tersebut (estuaria, laguna, teluk).

2.2 DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

Kemampuan dan ketahanan hidup organisme dalam beradaptasi dengan lingkungan sangat dipengaruhi oleh molekul DNA. Molekul DNA merupakan materi genetik yang mengkode semua informasi yang dibutuhkan untuk perkembangan makhluk hidup mulai dari peleburan sel sperma dan sel telur hingga menjadi satu organisme. DNA diwariskan dari induk ke anaknya. Molekul DNA pada hewan terletak di bagian organel inti dan mitokondria, sedangkan pada tumbuhan selain di inti sel dan mitokondria juga terdapat di kloroplas (Campbell, 2010).

Pada hewan, perbedaan letak DNA baik di dalam mitokondria ataupun inti sel memberikan fungsi yang berbeda bagi sel itu sendiri. DNA yang terletak di dalam inti sel berperan sebagai materi genetik yang diwariskan dari kedua induk dan mengatur segala aktivitas sel. DNA yang terdapat di dalam mitokondria berperan menyandi kompleks protein yang diperlukan untuk produksi ATP dan diwariskan hanya dari garis keturunan induk betina saja (Susminarsih, 2010).

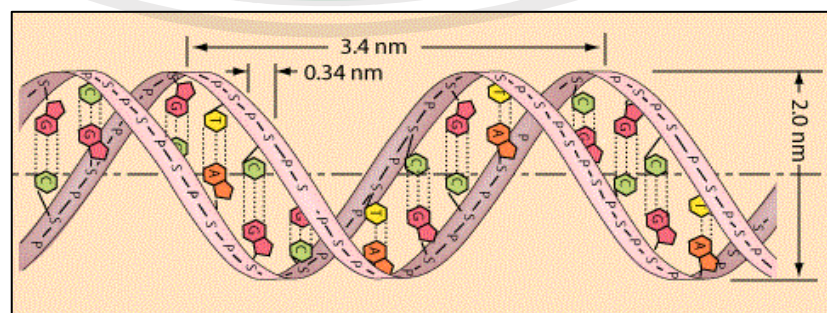
Molekul DNA terbentuk dari empat nukleotida yang berikatan secara kovalen membentuk rantai polinukleotida dengan rangka gula fosfat sebagai tempat melekatnya basa-basa. Dua rantai polinukleotida saling berikatan melalui ikatan hidrogen antara basa-basa nitrogen dari rantai yang berbeda. Semua basa berada dalam bentuk heliks ganda dan rangka gula fosfat berada di bagian luar. Purin selalu berpasangan dengan pirimidin (**Gambar 2.4**) (Fatchiyah *dkk*, 2011).

Perpasangan basa purin dengan basa pirimidin ini sebenarnya telah tersirat di dalam al-Quran melalui surat Yasin (36):36,

سُبْحَنَ الَّذِي خَلَقَ الْأَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْأَرْضُ وَمِنْ أَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُونَ ﴿٣٦﴾

Artinya: “Maha Suci Allah yang telah menciptakan semuanya berpasangan baik dari apa yang ditumbuhkan di bumi dan dari diri mereka dan dari apa yang mereka tidak ketahui” (Q.S Yasin: 36).

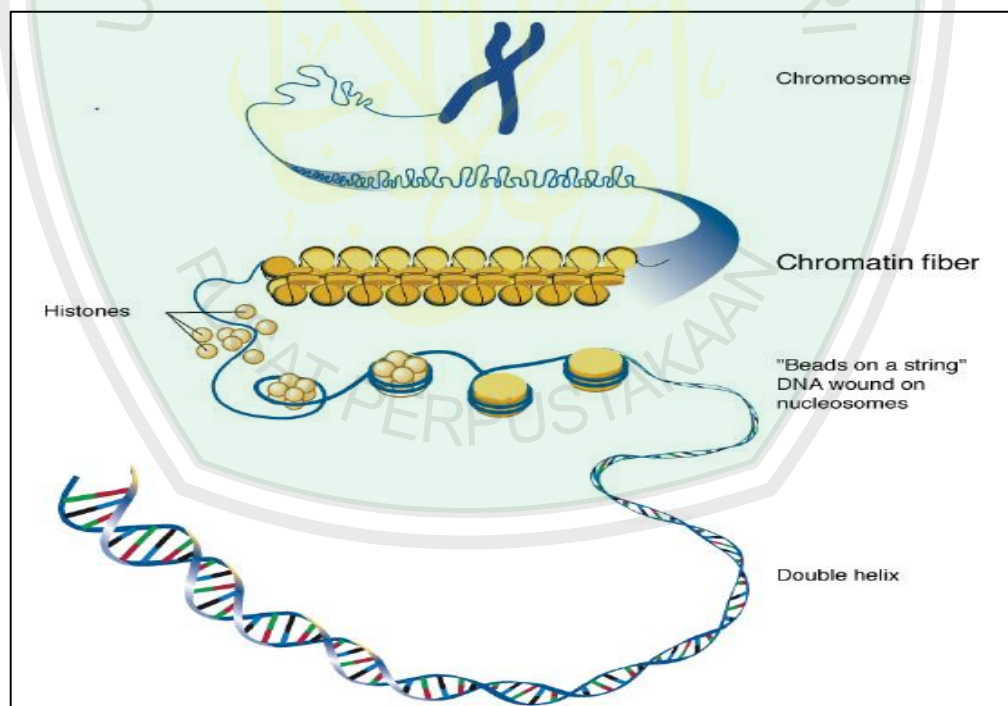
Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu dengan berpasang-pasangan. Di bumi, Allah SWT menumbuhkan berbagai macam buah-buahan dan biji-bijian. Allah SWT juga menjadikan manusia berpasang-pasangan, laki-laki dan perempuan (Zadah, 2006). Hal-hal yang tidak tampak oleh pandangan manusia pun Allah SWT menciptakannya berpasang-pasangan. Allah SWT menciptakan manusia dan makhluk hidup yang lain termasuk hewan udang dari dua sel yang bertemu, yaitu sel sperma dan sel telur, lalu dari keduanya Allah SWT telah menetapkan bentuk dan sifat melalui kode-kode yang dibentuk oleh basa-basa DNA. Basa-basa DNA ini pun membentuk pasangan yang khas, dimana perpasangan basa ini selalu tepat, yaitu antara basa purin dengan pirimidin. Adenin (A) selalu berpasangan dengan timin (T) dan guanin (G) dengan sitosin (C).



Gambar 2.4 Struktur DNA inti (Karp, 2008)

DNA sepanjang ratusan pasang basa akan mengulir dan mengelilingi protein-protein histon. Satu set protein histon disebut nukleosom yang terdiri dari 8 protein histon. Susunan unit-unit nukleosom tersebut membentuk struktur kromatin dan saat memasuki tahapan mitosis sel, unit nukleosom akan semakin menggulung membentuk kromosom (**Gambar 2.5**) (Elrod dan Stansfield, 2007).

Kromatin yang diwarnai biasanya terlihat sebagai massa yang tidak jelas, baik menggunakan mikroskop cahaya maupun mikroskop elektron. Akan tetapi, ketika sel bersiap-siap untuk membelah, serat kromatin yang tipis menggulung, sehingga cukup tebal untuk dibedakan sebagai struktur tersendiri dikenal sebagai kromosom (Campbell, 2010).



Gambar 2.5 Kompleks protein dan DNA yang membentuk kromatin dan kromosom

(<http://www.genome.gov>)

Jumlah kromosom haploid udang yang pernah diteliti adalah *Macrobrachium villosimanus* (n=62) (Choudhary dkk, 2013), *Parapenaopsis styliifera* (n=37) (Mukesh dkk, 2000) dan *Macrobrachium rosenbergii* (n=59) (Damrongphol dkk, 1991). Kebanyakan udang dari *family* penaeidae memiliki jumlah 88 kromosom diploid, diantaranya adalah *Penaeus merguensis*, *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus californiensis*. Beberapa udang penaeidae juga mempunyai 90-92 kromosom, yaitu *P. setiferus* dan *P. japonicus* (Chow dkk, 1990; Campos, 1997 dalam Warren dkk, 2006; Mansouri dkk, 2011; Kumar dan Lakra, 1996).

2.2.1 DNA Mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria terletak di dalam mitokondria, mempunyai bentuk sirkuler, diwariskan hanya oleh induk betina (Rane, 2011). Secara umum DNA mitokondria udang mengkode 13 polipeptida (beberapa belum diketahui fungsinya), 22 RNA transfer, dan 2 RNA ribosom (Uriarte dkk, 2009).

Urutan basa mtDNA dapat dibedakan menjadi urutan basa pengkode protein (*coding*) dan bukan pengkode protein (*noncoding*) atau disebut daerah *D-loop* atau daerah kontrol. Sebagian besar daerah pada mtDNA eukariot merupakan daerah dengan urutan basa bukan pengkode protein (*noncoding*) dan merupakan DNA repetitif (Campbell, 2010). DNA repetitif merupakan rangkaian urutan basa DNA yang berulang-ulang. Pengulangan basa DNA bervariasi ukurannya, dari dua basa saja sampai lebih dari seribu basa. Frekuensi pengulangan basa itu dapat mencapai beberapa juta kali (Yuwono, 2005).

Campbell (2010) menjelaskan bahwa DNA repetitif berperan secara struktural bagi kromosom. Banyak DNA repetitif, terletak pada bagian telomer dan sentromer kromosom. Pada bagian sentromer, DNA repetitif berperan dalam pemisahan kromatid bersaudara dalam proses pembelahan sel. Selain itu, DNA repetitif pada sentromer juga berperan dalam mengatur kromatin pada nukleus saat interfase. Pada bagian telomer, DNA repetitif mengikat protein yang melindungi ujung kromosom dari degradasi, serta mencegah gen hilang ketika DNA memendek setelah satu putaran replikasi.

Daerah-daerah yang terdapat pada DNA mitokondria telah terpetakan, yaitu terdiri dari daerah 12SrRNA, 16SrRNA, ND1, ND2, COI, COII, ATPase, COIII, ND3, ND4, ND5, ND6, Cyt b dan *D-loop* (*displacement loop*). Daerah *D-loop* atau dikenal dengan nama daerah kontrol (*control region*) merupakan bagian yang paling bervariasi pada genom mitokondria. Pada bagian inilah replikasi dimulai. Laju mutasi pada daerah ini diperkirakan sekitar lima kali lebih cepat dibandingkan dengan daerah lainnya (Ferris dan Berg, 1987).

DNA mitokondria memiliki beberapa sifat khusus yang tidak dimiliki oleh DNA inti. Sifat khusus tersebut antara lain: DNA mitokondria hanya diwariskan dari garis keturunan induk betina tanpa proses rekombinasi, memiliki laju mutasi yang tinggi, dan mempunyai banyak salinan (Galtier *dkk*, 2009).

Pewarisan DNA mitokondria secara maternal berakitan dengan proses peleburan antara sel sperma dengan sel telur. Mitokondria pada sel sperma banyak terdapat pada bagian ekor, karena bagian ini yang paling banyak membutuhkan energi untuk pergerakan (Lewis, 2005). DNA mitokondria sel sperma yang

terletak di bagian ekor sperma dibuang sebelum, saat, atau setelah fertilisasi (Galtier *dkk*, 2009). Hasilnya dapat diperkirakan bahwa DNA mitokondria yang akan diwariskan kepada individu baru merupakan DNA mitokondria yang hanya berasal dari sel telur induk betina saja.

Sifat khusus lainnya adalah DNA mitokondria memiliki laju mutasi yang lebih tinggi daripada DNA inti. DNA mitokondria tidak mempunyai sistem perbaikan (*proofreading*) pada saat proses replikasi DNA. Hal ini dikarenakan, DNA polimerase yang dimiliki oleh DNA mitokondria adalah DNA polimerase γ , tipe enzim yang tidak mempunyai aktivitas perbaikan (Guyton, 1996). Perbandingan urutan basa DNA pada berbagai organisme berbeda menunjukkan bahwa laju substitusi nukleotida selama evolusi ternyata sepuluh kali lebih tinggi pada genom-genom mitokondria dibandingkan dengan genom-genom nukleus. Hal tersebut disebabkan tidak adanya mekanisme perbaikan DNA mitokondria pada saat replikasi (Alberts *dkk*, 2008).

Selain itu, salinan DNA mitokondria per sel lebih banyak daripada salinan DNA inti. Banyaknya salinan DNA mitokondria di dalam sel semakin memudahkan untuk diisolasi dan dipelajari (Kosinski *dkk*, 2008). Ukuran genom DNA mitokondria pun relatif kecil (16.000-20.000 bp), tidak sekompleks DNA inti sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh (Ferris dan Berg, 1987).

Berdasarkan beberapa sifat khusus di atas, maka banyak penelitian yang berbasis molekuler sedang menggunakan DNA mitokondria. Diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Khamnamtong *dkk* (2005), Klinbunga *dkk* (1998),

Khamnamtong *dkk* (2009), Grabowski *dkk* (2004), Jackson dan Bert (2004), Tzeng (2007), Annisa (2008), Ariyanto (2008) dan Suhartini (2014). Ferris dan Berg (1987) juga menambahkan bahwa analisis DNA mitokondria memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan analisis protein karena dapat mendeteksi semua keragaman genetik yang bernilai bagi pemahaman identifikasi stok.

Ukuran DNA mitokondria pada tiap-tiap spesies bervariasi. Pada mamalia ukuran DNA mitokondria sekitar 16,6 kb, dan pada invertebrata 18,4 kb (Passarge, 2007). Pada udang *Litopenaeus vannamei* dan *Fenneropenaeus chinensis* mempunyai genom DNA mitokondria berukuran 15.989 bp dan 16.004 bp (Shen *dkk*, 2007). Pada udang *Triops cancriformis* berukuran 15.101 bp (Umetsu *dkk*, 2002), udang *Penaeus monodon* berukuran 15.984 bp (Wilson *dkk*, 2000), dan udang *Pandalus borealis* berukuran 15.905 bp (Viker *dkk*, 2006). Hasil penelitian Suhartini (2014) menunjukkan bahwa genom DNA udang Jari hasil isolasi adalah 992 bp. DNA hasil amplifikasi daerah kontrol pada DNA mitokondria menggunakan primer COIL dan COIH adalah 495 bp.

2.3 Teknik Analisis Molekuler *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Keragaman genetik merupakan tingkat keragaman yang paling rendah dalam organisasi makhluk hidup. Keragaman genetik sangat penting peranannya bagi suatu populasi untuk mempertahankan mutu genetik dan stabilitas populasi. Keragaman genetik muncul akibat dari perubahan urutan basa DNA baik karena mutasi, rekombinasi dan lainnya. Informasi keragaman genetik perlu diketahui

sebagai informasi dasar dalam menyusun strategi konservasi, pemuliaan, dan pembudidayaan. Informasi keragaman genetik dapat ditelusuri berdasarkan penanda morfologi dan molekuler.

Teknik penanda berdasarkan morfologi sudah banyak ditinggalkan karena teknik ini membutuhkan waktu yang lama, dipengaruhi oleh lingkungan dan hasilnya kurang akurat. Sedangkan teknik penanda molekuler tidak membutuhkan waktu yang lama, tidak dipengaruhi oleh lingkungan serta informasi keragaman yang diperoleh lebih akurat (Zulfahmi, 2013).

Analisis RFLP adalah salah satu teknik yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat urutan basa DNA. Deteksi RFLP dilakukan berdasarkan adanya kemungkinan untuk membandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan oleh enzim restriksi terhadap DNA target atau dari individu yang berbeda. Berbagai mutasi yang terjadi pada suatu organisme mempengaruhi molekul DNA dengan berbagai cara serta menghasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah dilakukan elektroforesis pada gel, hibridisasi, dan visualisasi (Tarwinangsih, 2011).

Aplikasi teknik RFLP biasa digunakan untuk mendeteksi diversitas genetik, hubungan kekerabatan, sejarah domestikasi, asal dan evolusi suatu spesies, aliran gen (*genetic drift*) dan seleksi, pemetaan seluruh genom, pengamanan gen-gen target yang akan diekspresikan, mengisolasi gen-gen yang berguna dari spesies liar serta mengkonstruksi pustaka DNA (Fatchiyah dkk, 2011).

Keuntungan menggunakan teknik RFLP adalah hasil yang diperoleh mempunyai akurasi yang tinggi dan mudah ditransfer antar laboratorium. Selain itu, RFLP bersifat kodominan sehingga dapat mendeteksi adanya heterozigositas dan tidak diperlukan informasi urutan basa DNA target (Overturf, 2009).

2.3.1 Enzim Restriksi Endonuklease

Enzim restriksi (RE) atau disebut juga restriksi endonuklease merupakan protein yang dihasilkan oleh bakteri. Fungsi enzim restriksi adalah untuk menjaga sel bakteri dari DNA asing dari bakteriofage. Enzim restriksi mencegah DNA virus bereplikasi dengan cara memotong DNA virus menjadi beberapa potongan. DNA bakteri sendiri tidak terpotong oleh enzim restriksi karena mempunyai enzim DNA metiltransferase. Enzim tersebut mengenali urutan DNA yang sama dengan pengenalan enzim restriksi, namun DNA metiltransferase tidak memotong melainkan melindungi situs tersebut dengan memetilasi basa pada untai DNA (Liu, 2007).

Semua enzim restriksi dibagi menjadi 3 kelas, berdasarkan struktur molekul dan kebutuhan terhadap kofaktor yang spesifik. Enzim restriksi kelas I mempunyai berat molekul sebesar 300.000 dalton yang terdiri dari subunit identik serta membutuhkan Mg^{2+} , ATP (*adenosine triphosphate*) dan SAM (*S adenosyl methionine*) sebagai kofaktornya. Kelas II berukuran lebih kecil, yaitu sekitar 20.000 sampai 100.000 dalton dan hanya membutuhkan Mg^{2+} untuk melakukan aktivitas. Kelas III berukuran 200.000 dalton dan membutuhkan 2 kofaktor yaitu Mg^{2+} dan ATP (Sudjadi, 2008).

Ciri utama enzim restriksi adalah setiap enzim mengenal urutan spesifik pada molekul DNA yang akan dipotong (**Tabel 2.2**). Enzim restriksi tertentu akan memotong pada urutan pengenalan dan tidak memotong daerah urutan lainnya. Beberapa enzim mengenali urutan heksanukleotida BamHI yaitu GGATCC-, tetranukleotida AluI yaitu AGTC-, atau pentanukleotida dengan basa pengenalan umum misalnya HinfI yaitu GANCT- (Fatchiyah *dkk*, 2011).

Tabel 2.2 Urutan pengenalan beberapa enzim restriksi (Fatchiyah *dkk*, 2011)

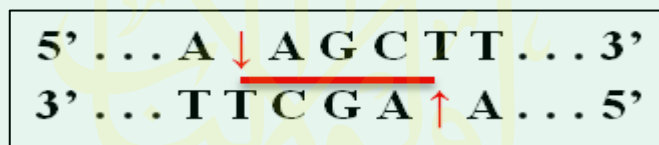
Enzim	Organisme	Urutan Pengenal	Ujung Potongan
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓AATTC	Ujung lancip
HindIII	<i>Haemophylus influenza</i> Rd	A↓AGCTT	Ujung lancip
HinfI	<i>Haemophylus influenza</i> Rf	GA↓NTC	Ujung lancip
HaeIII	<i>Haemophylus aegyptus</i>	GG↓CC	Ujung tumpul
AluI	<i>Arthribacter luteus</i>	AG↓CT	Ujung tumpul
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG	Ujung tumpul
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	T↓CTAGA	Ujung lancip

Hasil pemotongan enzim restriksi dapat menghasilkan ujung tumpul (*blunt end*) maupun ujung lancip (*sticky end*). Hal yang perlu diketahui adalah aktivitas enzim akan maksimal pada komposisi buffer yang spesifik, terkadang bagi enzim yang aktivitasnya rendah bisa dimaksimalkan dengan menambah *bovine serum albumin* (BSA) sebagai aktivator. Akan tetapi, untuk RE yang mempunyai

aktivitas tinggi seperti EcoRI, penambahan BSA akan menurunkan aktivitas enzim ini secara tajam (Fatchiyah *dkk*, 2011).

2.3.2 Enzim Restriksi *Hind*III

Enzim restriksi *Hind*III dihasilkan oleh *Haemophilus influenza* Rd dan memotong DNA pada urutan A/AGCT dengan bantuan Mg^{2+} . Gen yang mengkode enzim ini terletak pada bagian *upstream* dari gen yang mengkode metiltransferase. Urutan DNA yang mengkode enzim restriksi *Hind*III terdiri atas 903 bp. *Hind*III terdiri dari 300 asam amino dengan berat molekul sebesar 34.950 Da (Tang *dkk*, 2000; Watanabe *dkk*, 2009). Pola pemotongan enzim *Hind*III adalah *sticky end* (ujung lancip) seperti gambar berikut (Campbell, 2010):



Gambar 2.6 Pola pemotongan enzim restriksi *Hind*III

Secara umum cara penggunaan enzim restriksi *Hind*III sama dengan enzim restriksi lainnya. *Hind*III bekerja optimal pada suhu 37⁰ C dan dalam campuran jumlah DNA, enzim, buffer yang benar (Fatchiyah *dkk*, 2011). Salah satu prosedur yang telah digunakan adalah pemotongan DNA mitokondria dengan enzim restriksi *Nla*III (Suhartini, 2014), yaitu dengan mencampurkan 3,5 µl ddH₂O, 1 µl buffer enzim, 0,5 µl enzim restriksi dan 5 µl DNA hasil PCR lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 4 jam.

*Hind*III merupakan enzim restriksi tipe II. Dibandingkan dengan enzim restriksi tipe I dan III, enzim restriksi tipe II lebih spesifik dalam memotong

urutan DNA, yaitu tepat pada urutan yang dikenali atau dekat dengan urutan yang dikenali. Sedangkan enzim restriksi tipe I dan III kurang spesifik dalam memotong DNA karena akan memotong jauh dari urutan yang dikenali oleh enzim tipe tersebut (Sudjadi, 2008).

Penelitian Suhartini (2014) tentang karakterisasi genetik udang jari (*Metapenaeus elegans*) menggunakan enzim *Nla*III menghasilkan pola pemotongan dari 7 sampel DNA udang Jari (*Metapenaeus elegans*) yang telah diamplifikasi. Tiga pola tersebut berukuran 97 bp, 198 bp dan 200 bp. Enzim *Nla* III juga telah digunakan pada penelitian Andhikka (2011) terhadap udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang mampu menghasilkan 2 pola pemotongan. Sementara itu, untuk enzim *Hind* III telah digunakan pada penelitian Klinbunga *dkk* (1998) terhadap udang *Penaeus monodon* yang mampu menghasilkan 6 pola pemotongan.

2.4. Pola Pemotongan dan Keragaman Genetik

Pola pemotongan atau haplotipe adalah urutan DNA atau kombinasi alel dari lokus yang berdekatan yang berasal dari kromosom induk. Haplotipe bisa diperoleh dengan memotong fragmen DNA menggunakan enzim restriksi (Tarwinangsih *dkk*, 2011).

Hasil pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi dapat berbeda-beda, baik pada spesies yang sama ataupun pada spesies yang berbeda. Perbedaan pola pemotongan tersebut disebabkan oleh perbedaan pada urutan nukleotida masing-masing spesies ataupun individu. Campbell (2010) menyatakan bahwa

jika perbedaan nukleotida antara dua alel terjadi dalam situs restriksi, maka akan menghasilkan campuran fragmen yang berbeda dan pola pita tersendiri dalam elektroforesis gel.

Hasil pemotongan pada satu individu spesies juga dapat menghasilkan beberapa pita DNA. Hal tersebut disebabkan karena disepanjang untai DNA terdapat pengulangan basa-basa nitrogen (DNA repetitif) pada daerah yang berbeda-beda. Oleh karena itu, enzim restriksi dapat memotong basa-basa yang dikenali pada daerah yang berbeda pula.

Pola pemotongan yang dihasilkan dari pemotongan fragmen DNA dapat tergolong polimorfik ataupun monomorfik. Polimorfik berarti fragmen-fragmen DNA yang dipotong oleh enzim restriksi berbeda-beda ukurannya sehingga mempunyai banyak bentuk pola pemotongan (Raven *dkk*, 2002). Sedangkan monomorfik adalah jika fragmen-fragmen DNA yang dipotong oleh enzim restriksi sama ukurannya. Pola pemotongan, baik polimorfik ataupun monomorfik dijadikan dasar dalam penyusunan komposit haplotipe untuk memperkirakan tingkat keragaman genetik.

Terbentuknya pola pemotongan yang bervariasi oleh enzim restriksi endonuklease disebabkan urutan basa DNA diantara beberapa individu berbeda-beda. Enzim restriksi akan memotong urutan basa DNA yang dikenali saja, sehingga pola pemotongan yang terbentuk diantara individu-individu yang diuji (baik sama ataupun berbeda) dapat dijadikan acuan dalam memperkirakan keragaman urutan DNA atau keragaman genetik.

Semakin banyak komposit haplotipe yang didapatkan maka semakin tinggi keragaman genetik suatu populasi. Begitu juga sebaliknya, jika semakin sedikit komposit haplotipe yang didapatkan maka semakin rendah tingkat keragaman genetik populasi tersebut. Tingkat keragaman genetik yang tinggi berhubungan dengan kualitas genetik seperti pencegahan homozigositas akibat *inbreeding*. Homozigositas menandakan adanya alel identik untuk gen tertentu (Campbell, 2010). Homozigositas dalam metode RFLP ditunjukkan oleh pita-pita yang monomorfik. Homozigositas akibat *inbreeding* harus dicegah karena dapat menurunkan kekebalan tubuh organisme dan kecepatan pertumbuhan (Murtidjo, 2001).

Keragaman genetik juga berhubungan dengan kemampuan populasi untuk beradaptasi terhadap lingkungannya. Haplotipe yang semakin beragam menunjukkan kemampuan adaptasi yang baik. Hal itu dikarenakan semakin beragamnya gen yang dimiliki oleh individu-individu di dalam populasi, sehingga dengan dimilikinya berbagai macam gen maka berbagai perubahan lingkungan yang terjadi akan dapat direspon lebih baik (Fahri, 2002).