

BAB II

TINJAUAN 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*, *M. 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. *M. elegans* termasuk kategori spesies yang seluruh hidupnya berada di muara sungai dengan salinitas rendah (Dudley, 2000). Dalam al-Qur'an surat An-Nahl (16): 14 Allah SWT berfirman:

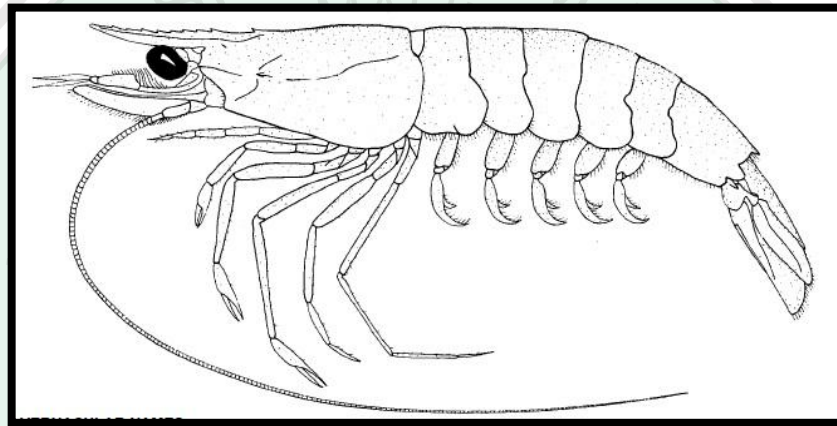
تَلْبَسُونَهَا حِلْيَةً مِنْهُ وَتَسْتَخْرِجُوهَا طَرِيقًا بِالْحِمَا مِنْهُ لَتَأْكُلُوا مِنَ الْبَحْرِ سَخْرًا الَّذِي وَهُوَ
تَشْكُرُونَ وَلَعَلَّكُمْ فُضِّلْتُمْ مِنْهُ وَلِتَبْتَغُوا فِيهِ مَوَازِيرَ الْفُلْكِ وَتَرَى

Artinya: “Dan Dia-lah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar, 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).

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 bermanfaat bagi kehidupan manusia (al Qurtubi, 2009). 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 *M. elegans* adalah sebagai berikut (Lovett, 1981) :

Filum Arthropoda

Class Krustasea

Ordo Decapoda

Famili Penaidae

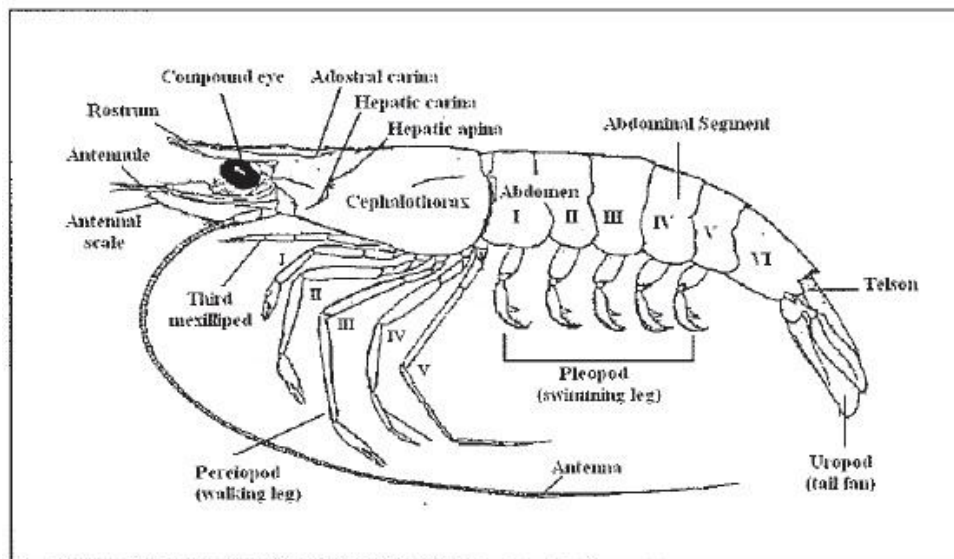
Genus *Metapenaeus*

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, berwarna kecoklatan seperti warna jahe. 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 pink (Hidayat, 2007).

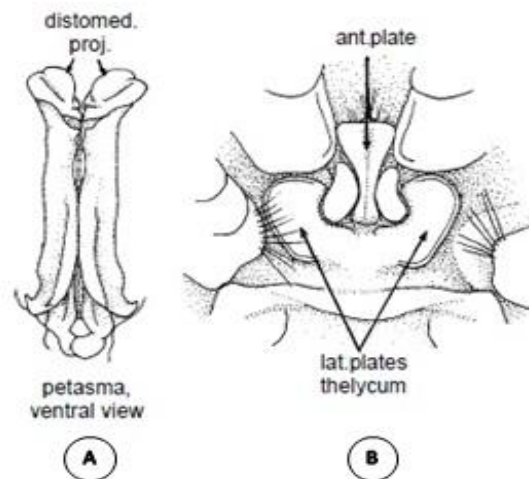
Udang jari memiliki rostrum yang kuat, cenderung lurus dengan ujung yang tajam. Pada bagian atas rostrum terdapat 9 – 12 gerigi tetapi yang terbanyak 9 gerigi. Pada bagian bawahnya tidak terdapat gerigi, tetapi banyak ditemukan bulu-bulu halus (Motoh, 1981). Gigi bagian depan terletak di dekat ujung rostrum. *Adrostral carina* berakhir di antara gigi *epigastric* dan gigi berikutnya. *Salcus adrostral epigastric*, mencapai $\frac{1}{3}$ anterior dari panjang karapas. *Postrostral 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 *antennular penducle*. *Postantenna inferior* mencapai ujung segmen I melampaui ujung kornea, $\frac{2}{5}$ 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 CO_2 berdifusi dengan arah berlawanan. O_2 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. Ulang Penaeid termasuk ke dalam kelompok heteroseksual, sehingga dapat dibedakan antara jantan dan betina secara morfologis (*sexual dimorphisme*). Ulang jantan mempunyai alat kelamin sekunder yang disebut *petasma*, yang terletak diantara pasangan kaki renang (*pleopod*) pertama. Ulang 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).

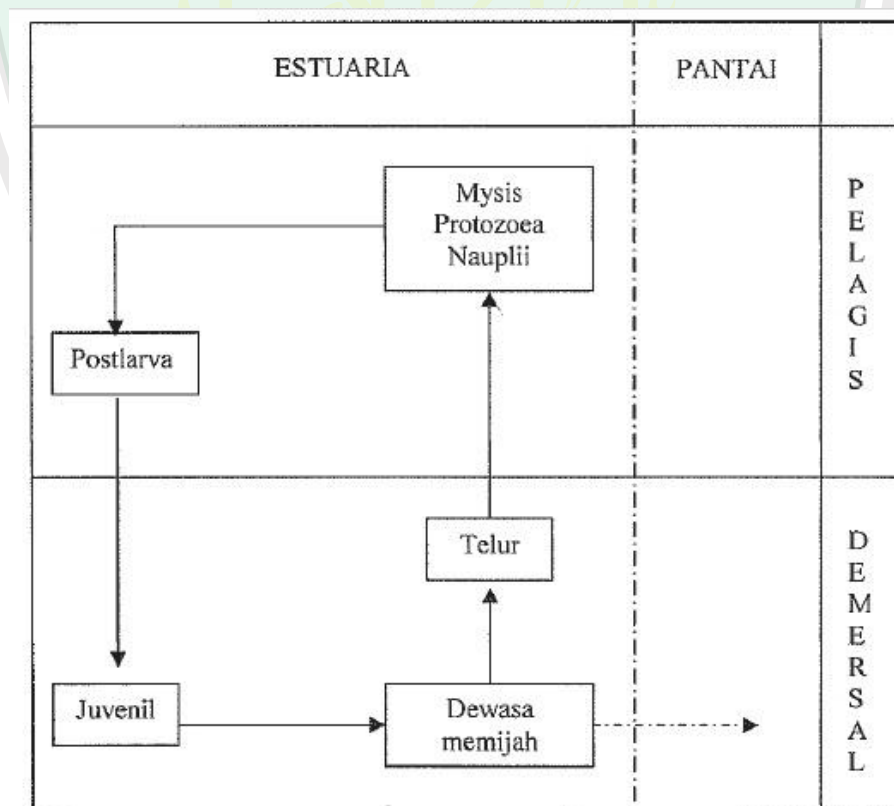
Organ reproduksi udang betina juga terdiri atas organ internal dan eksternal. Organ internal terdiri atas sepasang ovarium yang memanjang di tengah-tengah bagian dorsal karapas, tepatnya di bagian ventral jantung dan di bagian dorsal hepatopankreas sampai ke bagian pangkal ekor (*telson*). Saluran telur (*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 goncangan 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. Perkawinan atau malting pada udang biasanya terjadi sebelum dan sesudah matahari terbenam, dan terjadi antara 3-16 detik. Ugang 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).

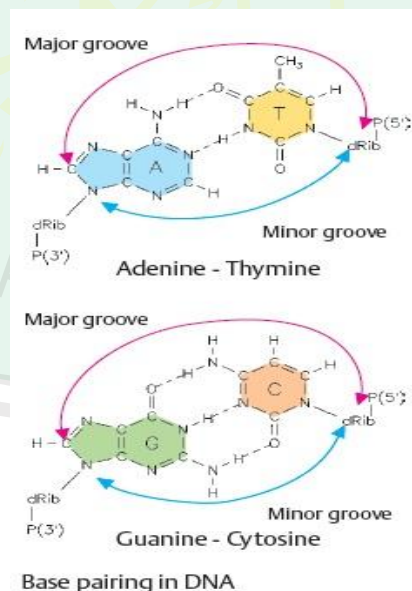
2.2 Gen dan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

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).

Fatchiyah *et al.*, (2011) menyatakan bahwa gen adalah unit hereditas suatu organisme hidup. Gen ini dikode dalam materi genetis 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 genetis (ekson), daerah yang tidak mengkode informasi genetis (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)

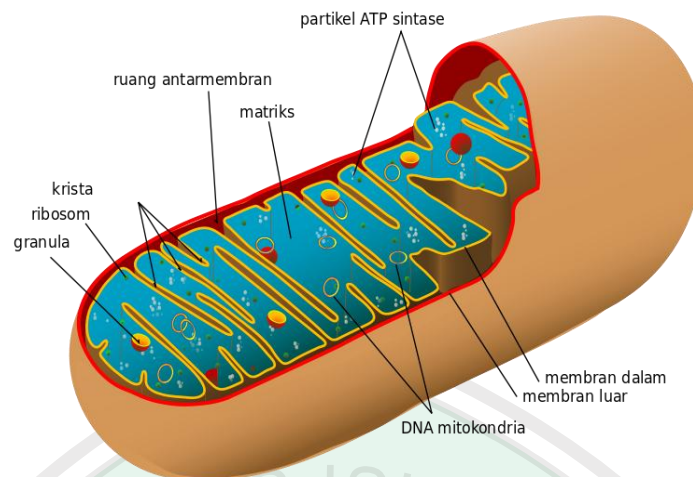
Secara umum DNA dapat ditemukan di dalam nukleus, mitokondria, kloroplas, dan plasmid. Pada sel hewan DNA hanya bisa ditemukan di dalam nukleus dan mitokondria. DNA yang terdapat pada nukleus berperan sebagai materi genetik yang diwariskan dari kedua orang tua dan mengatur segala aktivitas sel. DNA yang 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).

2.2.1 Mitokondria dan DNA mitokondria

2.2.1.1 Struktur Mitokondria

Mitokondria adalah organel sel eukariot yang berfungsi sebagai organ respirasi pembangkit energi dengan menghasilkan *adenosin triphosphat* (ATP). Mitokondria ditemukan dalam jumlah banyak pada sel yang aktivitas metabolismenya tinggi yaitu sel-sel kontraktile seperti sperma pada bagian ekornya, sel otot jantung, dan sel yang aktif membelah seperti epitelium, akar rambut, dan epidermis kulit (Toha, 2001).

Jumlah mitokondria dalam satu sel bervariasi dari ratusan sampai ribuan tergantung kebutuhan sel terhadap energi. Ukuran dan bentuk mitokondria berbeda-beda, beberapa diantaranya hanya berdiameter beberapa ratus milimikron dengan bentuk globular, sedangkan yang lain, diameternya mencapai 1-7 mikron dengan bentuk filamen (Campbell, 2007).



Gambar 2.6 Struktur Mitokondria (Albertset *al.*, 2008)

Mitokondria terdiri dari bagian seperti membran luar, membran dalam, ruang antarmembran, matriks. Membran luar dan dalam merupakan lapisan molekul lipoprotein. Membran luar lebih tipis daripada membran dalam, tebalnya kurang lebih $6\mu\text{m}$, membran ini bersifat permeabel akibat kandungan protein porin yang dimilikinya, sehingga molekul-molekul kecil dapat menembus membran ini. Membran dalam memiliki tebal sekitar $6-8\mu\text{m}$ dan bersifat kurang permeabel jika dibandingkan dengan membran luar serta tersusun atas 80% protein dan 20% lipid. Selain itu, membran ini juga mengandung ATP sintase yang berperan dalam membentuk ATP pada matriks serta mengandung protein transpor yang berfungsi mengatur masuk dan keluarnya metabolit. Membran dalam bentuknya berlipat-lipat dan masuk ke dalam matriks, sehingga mempunyai permukaan yang lebih luas. Lipatan-lipatan tersebut disebut krista (Albertset *al.*, 2008).

Ruang antarmembran adalah tempat dimana terjadi reaksi-reaksi vital bagi sel. Sedangkan di dalam matriks mengandung air, enzim-enzim yang terlibat

dalam reaksi siklus Krebs, oksidasi-fosforilasi, dan transport elektron. Di dalam matriks juga ditemukan granula-granula fosfolipid, ribosom, dan DNA-mitokondria (mtDNA) (**Gambar 2.6**). Fungsi mitokondria adalah untuk transkripsi tRNA, rRNA, mRNA yang diperlukan untuk translasi beberapa protein tertentu. Ribosom mitokondria berukuran 60S. Adanya DNA dan ribosom di dalam matriks mitokondria menyebabkan mitokondria dapat mensintesis sendiri kebutuhan proteinnya (Albert *et al.*, 2008).

2.2.2 mtDNA (Asam Deoksiribo Nukleat Mitokondria)

2.2.2.1 Struktur mtDNA

DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk sirkuler serta memiliki untai ganda yang terdiri dari untai *heavy* (H) dan *light* (L) yang terdapat di dalam matriks dan dapat melakukan replikasi secara autonom. Dinamakan untai *heavy* karena untai H memiliki berat molekul yang lebih besar dari untai L. mtDNA memiliki laju mutasi yang lebih tinggi yaitu sekitar 10-17 kali dari DNA inti. Selain itu mtDNA terdapat dalam jumlah banyak (lebih dari 1000 kopi) dalam tiap sel, sedangkan DNA inti hanya berjumlah dua kopi (Brown, 1992). Berbeda dengan DNA inti yang diturunkan dari kedua induk, mtDNA hanya diwariskan secara maternal atau dari induk betina tanpa mengalami rekombinasi. Besar genom pada DNA mitokondria relatif kecil apabila dibandingkan dengan genom DNA inti. Ukuran genom DNA mitokondria pada tiap-tiap organisme sangatlah bervariasi. Pada mamalia ukuran DNA mitokondria adalah 16,6 kb. Invertebrata memiliki ukuran DNA mitokondria kurang lebih sekitar 18,4 kb (Passarge, 2007). Sedangkan pada genus *Metapenaeus* ukuran DNA mitokondria sekitar 200- 1.900 bp (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2013). Secara eksplisit perbedaan ukuran DNA

mitokondria pada tiap-tiap organisme dalam al Qur'an dijelaskan dalam surat al-Furqaan (25): 2,

لَمْ يَخْلُقْ الْمَلِكُ فِي شَرِيكَ لَهُ يَكُنْ وَلَمْ يَلِدْ أَيَّتْخِذْ وَلَمْ يُولَدْ أَرْضِ السَّمَوَاتِ مُلْكُهُ الَّذِي
تَقْدِيرُ أَفَقَدَّ رَهُ شَيْءٍ كَ

Artinya: "Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu baginya dalam kekuasaan(Nya), dan dia Telah menciptakan segala sesuatu, dan dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya" (Q.S al-Furqaan:2).

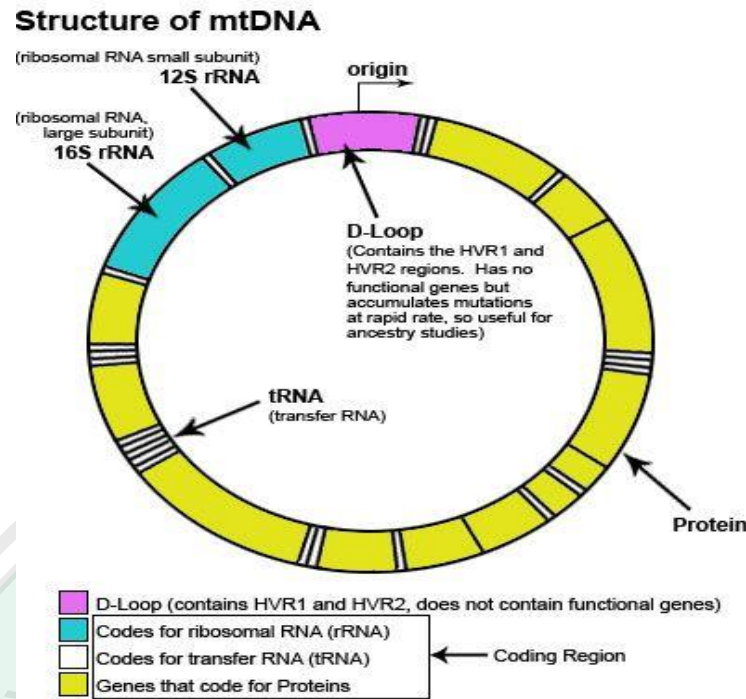
Berdasarkan ayat di atas, menjelaskan bahwa yang dimaksud dengan "فَقْدَرَهُ, تَقْدِيرُ" (Dan Dia menetapkan ukuran ukurannya dengan serapi-rapinya) adalah menetapkan segala sesuatu dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah yang diinginkan-Nya, dan bukan karena suatu kelalaian, melainkan segala sesuatu berjalan dengan ketentuan-Nya. Hal ini menegaskan bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT memiliki ukuran yang pasti, baik sifat-sifatnya maupun fungsinya masing-masing dalam hidup (al Qurthubi, 2009). Fungsi ukuran-ukuran tersebut berkaitan erat dengan materi genetik (DNA inti dan DNA mitokondria) dalam setiap makhluk hidup. Dalam ilmu genetika ukuran-ukuran itu dapat dinilai sebagai ukuran pasang basa dalam setiap makhluk hidup yang merupakan suatu penanda atau ciri khas yang dimiliki oleh setiap makhluk ciptaan Allah, kemudian ciri khas itulah yang saat ini banyak digunakan oleh ahli genetika untuk menganalisa tingkat kekerabatan dan diversitas genetik suatu makhluk hidup.

Sekuens mtDNA terdiri dari daerah pengkode (*coding region*) dan daerah yang tidak mengkode (*non-coding*). mtDNA pada spesies udang mengandung 2 RNA ribosomal (rRNA), 22 RNA transfer (tRNA) dan 13 polipeptida

(protein) yang merupakan subunit kompleks enzim yang terlibat dalam fosforilasi oksidatif, sintesis ATP dan reaksi biokimia lainnya dalam tubuh. Kebanyakan gen pada daerah pengkode (*coding region*) ini merupakan titik awal transkripsi untai H, yaitu 2 rRNA, 14 dari 22 tRNA, dan 12 polipeptida (Wolstenholme, 1992 dalam Wilson *et al.*, 2000).

Sedangkan daerah yang tidak mengkode (*non-coding*) dari mtDNA berukuran 1122 bp dan terletak antara tRNA^{Pro} dan tRNA^{Phe}. Daerah ini terdiri dari tiga daerah penting, yakni daerah pengontrol karena mempunyai *origin of replication* untuk untai H (OH) dan promotor transkripsi untuk untai H dan L, daerah lestari yang disebut dengan *conserved sequence block* (CSB) I, II, III. Daerah lestari ini diduga memiliki peranan penting dalam replikasi mtDNA, serta mengandung daerah yang memiliki variasi sekuens tinggi yang disebut daerah kontrol atau *displacement loop* (D-loop). D-loop memiliki tingkat mutasi dan polimorfisme yang paling tinggi dibandingkan dengan daerah pengkode (*coding*) dan terdiri dari dua daerah yaitu Hipervariabel 1 (HVR1) dan Hipervariabel 2 (HVR2) (**Gambar 2.7**) (Guyton, 1996 dalam Annisa, 2008).

Daerah Hipervariabel 1 (HVR1) bersifat sangat variabel dan mempunyai laju evolusi yang lebih cepat dibandingkan dengan daerah Hipervariabel 2 (HVR2) (Palit *et al.*, 2012). Oleh karena sifatnya tersebut, daerah ini sangat beragam antar individu tetapi sama untuk kerabat yang satu garis keturunan ibu. Laju mutasi sejauh ini diketahui 1:33 generasi, jadi perubahan urutan nukleotida hanya akan terjadi setiap 33 generasi. Oleh karena itu, daerah ini sering dianalisis dan sangat penting untuk digunakan dalam proses identifikasi individu (Passarge, 2007).



Gambar 2.7 Struktur mtDNA (Asam Deoksiribo Nukleat Mitokondria)(Alberts *et al.*, 2008).

2.2.2.2 Sifat-sifat mtDNA

mtDNA diwariskan secara maternal. Sel telur memiliki jumlah mitokondria yang lebih banyak dibandingkan sel sperma, yaitu sekitar 100.000 molekul sedangkan sel sperma hanya memiliki sekitar 100-1500 mtDNA. Dalam sel sperma mitokondria banyak terkandung dalam bagian ekor karena bagian ini yang sangat aktif bergerak sehingga membutuhkan banyak ATP. Pada saat terjadi pembuahan sel telur, bagian ekor sperma dilepaskan sehingga tidak ada mtDNA yang masuk ke dalam sel telur (Lewis, 2005).

DNA mitokondria juga memiliki sifat unik lainnya yaitu laju mutasinya yang sangat tinggi sekitar 10-17 kali dari DNA inti. Hal ini dikarenakan mtDNA tidak memiliki mekanisme perbaikan (*repair*) yang efisien, tidak memiliki protein histon, dan terletak berdekatan dengan membran dalam mitokondria tempat

berlangsungnya reaksi fosforilasi oksidatif yang menghasilkan radikal oksigen sebagai produk samping. Selain itu, DNA polimerase yang dimiliki oleh mitokondria adalah DNA polimerase γ yang tidak mempunyai aktivitas *proofreading* (suatu proses perbaikan dan pengakuratan dalam replikasi DNA). Tidak adanya aktivitas ini menyebabkan mtDNA tidak memiliki sistem perbaikan yang dapat menghilangkan kesalahan replikasi. Replikasi mtDNA yang tidak akurat ini akan menyebabkan mutasi mudah terjadi (Guyton, 1996 dalam Annisa, 2008).

Salah satu bentuk keunikan lainnya dari mitokondria adalah perbedaan kode genetik mitokondria menunjukkan perbedaan dalam hal pengenalan kodon universal. Pada mitokondria invertebrata, UGA tidak dibaca sebagai “berhenti” (stop) melainkan sebagai triptofan, AUA tidak dibaca sebagai isoleusin melainkan sebagai metionin, dan AGA atau AGG tidak dibaca sebagai arginin melainkan sebagai serin (**Tabel 2.1**). Stop kodon pada invertebrata ialah UAA/UAG, sedangkan start kodonnya ialah UUG/AUU yaitu kode genetik yang menyandi asam amino Leusin/Isoleusin (www.ncbi.nlm.gov/taxonomy/2013).

Tabel 2.1. Perbedaan antara kode genetik universal dan kode genetik pada mitokondria (Passarge, 2007).

Codon	Universal code	Mitochondrial codes			
		Mammals	Invertebrates	Yeasts	Plants
UGA	Stop	Trp	Trp	Trp	Stop
AUA	Ile	Met	Met	Met	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu
AGA/AGG	Arg	Stop	Ser	Arg	Arg

Keunikan lain dari mitokondria ialah terbentuknya komposit haplotipe dalam analisa DNA mitokondria yang dapat digunakan untuk mempelajari

keragaman genetik. Haplotipe adalah sekelompok gen dalam organisme yang diwariskan dari salah satu orang tua. Pada antar individu yang berbeda, haplotipe akan menunjukkan urutan DNA yang bervariasi. Urutan DNA tersebut disebabkan karena adanya mutasi. Variasi basa atau polimorfisme yang disebabkan oleh mutasi tersebut pada mtDNA disebut dengan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dan informasi terkait SNP dapat digunakan untuk membedakan suatu individu dengan individu lain (Zhao *et al.*, 2003). Dalam analisis variasi genetik, haplotipe dapat diketahui dengan memotong fragmen DNA menggunakan enzim restriksi (Tarwinangsih, 2011).

Keragaman pola haplotipe yang dihasilkan dari pemotongan situs restriksi dapat mengindikasikan karakter genetik suatu organisme. Pola haplotipe yang biasanya dihasilkan ialah pola haplotipe polimorfik dan monomorfik. Pola haplotipe polimorfik ialah pola yang terjadi dimana pola situs restriksi menghasilkan posisi sekuens yang berbeda. Pola polimorfik ini mengindikasikan tingkat karakter genetik yang tinggi. Sedangkan, pola haplotipe monomorfik ialah pola yang terjadi jika pola situs restriksi menghasilkan posisi sekuens yang sama dan mengindikasikan tingkat karakter genetik yang rendah.

Karakter genetik yang tinggi dapat dicirikan dengan sifat heterozigositas yang tinggi dalam suatu populasi. Suatu populasi dengan sifat heterozigositasnya yang semakin tinggi maka variasi genetiknya juga semakin tinggi. Populasi dengan variasi genetik yang tinggi memiliki peluang hidup yang lebih baik untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Heterozigositas yang tinggi juga memungkinkan perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksplorasi gen-gen yang menguntungkan (Toha, 2001).

2.3 Metode Karakterisasi Genetik

Keragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotip suatu organisme yang dipantau dengan mata telanjang, atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain. Beberapa teknik yang bisa digunakan untuk melihat keanekaragaman organisme pada tingkat molekuler tergantung dari tujuan dan sasaran yang ingin dicapai (Sumantri, 2012).

Beberapa teknik yang biasanya digunakan untuk melihat keanekaragaman hayati pada tingkat molekuler DNA didasarkan pada polimorfisme gen secara langsung seperti *Random Amplified polymorphic DNA (RAPD)*, *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*, *Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, dan Analisis sekuen (*sequencing DNA*) (Sudarmono, 2006).

Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) merupakan salah satu teknik molekuler berupa penggunaan penanda tertentu untuk mempelajari keragaman genetik. Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi sekuens DNA secara *in vitro*. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai dengan kebutuhan. Tiap primer boleh jadi berbeda untuk menelaah keragaman genetik kelompok yang berbeda. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer,

terutama karena amplifikasi DNA secara *invitro* dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR (Sumantri, 2012).

Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi. Teknik ini juga memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Selain itu, teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relatif tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya. Namun demikian, teknik ini juga mempunyai keterbatasan salah satunya adalah tidak dapat membedakan individu homozigot dan heterozigot karena bersifat sebagai penanda dominan dan sangat sensitif terhadap perubahan kondisi reaksi PCR. Sifatnya yang dominan, dapat memberikan hasil yang kurang akurat. Penggunaan RAPD juga dapat memberikan hasil yang berbeda apabila diulang (Suryanto, 2003).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) digunakan untuk analisis perbedaan genetik antar individu, populasi dan spesies. Seperti halnya RAPD, teknik AFLP relatif murah dan handal untuk mengidentifikasi ratusan penanda genetik tanpa membutuhkan informasi sekuen DNA untuk mengembangkan primer. Kelemahan dari teknik ini adalah sulit untuk mengidentifikasi penanda yang homolog. Sehingga teknik ini tidak dapat digunakan untuk individu yang heterozigot. Dibandingkan dengan teknik RAPD, teknik AFLP lebih mudah direplikasi tetapi lebih sulit digunakan dan dikembangkan (Suryanto, 2003).

Analisis *Restricted Fragment Length Polymorphism* (RFLP) adalah salah satu teknik pertama yang secara luas digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens 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 domestika asal dan evolusi suatu spesies, aliran gen (*genetic drift*) dan seleksi, pemetaan keseluruhan genom, pengamanan gen-gen target yang akan diekspresikan (*tagging gene*), mengisolasi gen-gen yang berguna dari spesies liar, serta mengkonstruksi pustaka DNA. Kekurangan dalam teknik RFLP ini diantaranya ialah teknik ini membutuhkan DNA dengan kemurnian tinggi dalam jumlah banyak. Selain itu pada beberapa spesies mempunyai level polimorfisme yang rendah. Teknik ini memerlukan pustaka probe yang sesuai dan membutuhkan biaya yang besar (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Analisis sekuen merupakan teknik yang dianggap paling baik untuk melihat keragaman hayati suatu kelompok organisme. Pada prinsipnya teknik ini melihat polimorfisme dari urutan atau sekuens DNA dari fragmen tertentu dari suatu genom organisme. Teknik ini berkembang setelah orang menciptakan mesin *DNA sequencer*, sehingga teknik ini membutuhkan preparasi yang matang dengan

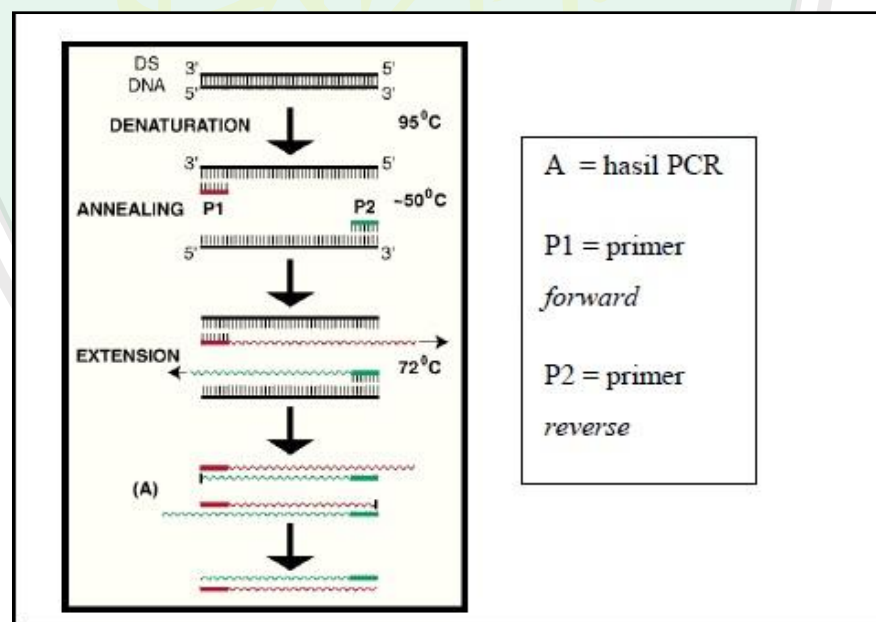
tingkat kemurnian DNA yang tinggi, membutuhkan waktu yang banyak dan membutuhkan biaya yang sangat besar (Toha, 2001).

2.4 Polymerase Chain Reaction - Restricted Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Genom mitokondria merupakan salah satu penanda molekular yang sering digunakan untuk mempelajari keragaman genetik. Keragaman genetik mtDNA dapat diketahui melalui kombinasi analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan pemotongan produk PCR dengan enzim restriksi atau *Restricted Fragment Length Polymorphism* (RFLP). PCR atau reaksi polimerase berantai merupakan cara untuk mengamplifikasi suatu fragment DNA secara *in vitro*. Metode ini menggunakan urutan nukleotida tertentu sebagai cetakan pada proses replikasi DNA. Proses amplifikasi diawali oleh sepasang primer sebagai titik-titik awal sintesis (Taylor *et al.*, 1995).

PCR merupakan teknik mengamplifikasi (melipatgandakan) 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).

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 *extension* (**Gambar 2.8**). 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 2.8 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*). Sedangkan proses *annealing* pada udang biasanya berlangsung selama 1 menit pada suhu 40°C (Folmer *et al.*, 1994). 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*. Hasil produk PCR yang telah berbentuk *single strand* kemudian akan digunakan dalam teknik RFLP.

Sudarmono (2006) menyatakan bahwa teknik RFLP merupakan teknik yang digunakan untuk melihat polimorfisme dalam genom organisme dengan menggunakan suatu enzim pemotong tertentu (*restriction enzymes*). Karena sifatnya yang spesifik, maka enzim ini akan memotong situs tertentu yang dikenali oleh enzim ini. Situs pemotong dari genom suatu kelompok organisme yang kemudian berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetik rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini

menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukurannya dari satu organisme ke organisme lainnya.

Sejauh ini metode RFLP lebih banyak diaplikasikan untuk menganalisa keragaman D-loop mtDNA. Metode RFLP merupakan suatu cara yang digunakan dalam menganalisis sekuens DNA yang berfungsi sebagai penanda DNA. Penanda DNA ini dapat bergantung kepada ada tidaknya mutasi pada sekuens DNA. Untuk mendeteksi ada tidaknya mutasi digunakan enzim restriksi atau enzim pemotong endonuklease (*restriction endonuklease*) (Irmawati, 2003).

Enzim restriksi mampu memotong DNA pada situs pengenalan dengan sekuensi DNA yang sangat spesifik (*Recognition site*). Dengan cara memecahkan ikatan fosfodiester penghubung satu nukleotida dengan nukleotida lain suatu molekul DNA. Enzim ini terdiri atas eksonuklease dan endonuklease. Eksonuklease dapat mendegradasi polinukleotida DNA satu per satu dari ujung molekul DNA. Sementara endonuklease dapat memecahkan ikatan fosfodiester internal pada molekul DNA (Toha, 2001). Dengan demikian enzim ini mampu memproses DNA menjadi potongan-potongan yang lebih pendek dari asal DNA tersebut.

Jumlah tempat yang dipotong oleh enzim restriksi pada setiap molekul DNA ditentukan oleh banyaknya urutan pengenalan yang dimiliki oleh DNA tersebut. Bila enzim mempunyai urutan pengenalan dengan 4 nukleotida, maka tempat pemotongan enzim restriksi diperkirakan sebanyak 4^4 (256) nukleotida. Meskipun tidak terlalu tepat, perhitungan ini dapat digunakan untuk memprediksi banyaknya hasil potongan enzim tersebut. Hasil pemotongan fragmen DNA yang

dihasilkan dapat dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarose. Ukuran fragmen dapat ditentukan dengan menggunakan marka standar. Profil fragmen hasil pemotongan menggambarkan variasi lokasi dari situs pemotongan pada DNA suatu individu atau menunjukkan haplotipe DNA (Melnick *et al.*, 1992 dalam Irmawati, 2003).

Enzim-enzim yang digunakan untuk analisis karakter genetik pada spesies udang dilaporkan dalam penelitian Mandayasa (2007) tentang Studi Keragaman Genetik Populasi Udang Galah (*Macrobrachiumrossenbergii*) dengan menggunakan tujuh enzim restriksi (*Hae* III, *Rsa* I, *Mbo* I, *Taq* I, *Alu* I, *Sac* I, dan *Hin6* I) ternyata hanya empat enzim restriksi yang dapat menghasilkan 12 komposit haplotipe yakni enzim *Hae* III, *Rsa* I, *Mbo* I, dan *Taq* I dengan ukuran mtDNA antara 700-1500 bp. Ariyanto (2008) melaporkan tentang hasil Studi Karakteristik Genetik Populasi Induk Udang Windu (*Penaeus monodon*) F1 dan F2 Asal Selat Sunda dengan Teknik RFLP-mtDNA dan PCR menggunakan enzim *Nde* II sebagai enzim restriksi yang menghasilkan 1 komposit haplotipe. Sedangkan penelitian Andhikka (2011) tentang Keanekaragaman Genetik Populasi Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) Florida F2 yang dibesarkan di Panti Pembenihan dan di Tambak BBPBAP Jepara dan penelitian Annisa (2008) tentang Studi Karakteristik Genetik Populasi Induk Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) F1 dan F2 Asal Hawaii Berdasarkan Metode RFLP masing-masing menggunakan enzim *Nla* III sebagai enzim restriksinya. Hasil penelitian Andhikka (2011) menghasilkan 2 komposit haplotipe dengan ukuran mtDNA antara 175-500 bp, sedangkan hasil penelitian Annisa (2008) menghasilkan 4 komposit haplotipe dengan ukuran mtDNA 125-500 bp.