



**Analisis Keragaman Sekuens Nukleotida Gen *D-loop* pada Itik Tegal**

**Skripsi**

sebagai salah satu syarat

untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Biologi

Oleh  
**Retno Ika Sari**  
4411412045

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

**2016**

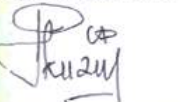
## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Analisis keragaman sekuens nukleotida gen *D-loop* pada itik Tegal” disusun berdasarkan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka di bagian akhir skripsi. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.



Semarang, 20 Juli 2016





Retno Ika Sari

4411412045

**UNNES**  
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

## PENGESAHAN

Skripsi dengan judul :

“Analisis keragaman sekuens nukleotida gen *D-loop* pada itik Tegal”

Disusun oleh :

Nama : Retno Ika Sari

NIM : 4411412045

Telah dipertahankan dihadapan sidang Panitia Ujian Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang pada tanggal 26 Juli 2016.



Prof. Dr. Zaenuri, S.E., M.Si., Akt.

NIP 196412231988031001

Panitia Ujian

Sekretaris

Dra. Endah Peniati, M.Si.

NIP 196511161991032001

Penguji Utama

Dr. Ari Yuniastuti, S.Pt, M.Kes

NIP. 196806021998032002

Anggota Penguji I/

Pembimbing I

Dr. drh. R. Susanti, M.P.

NIP. 196903231997032001

Anggota Penguji II/

Pembimbing II

Dr. Retno Sri Iswari, S.U.

NIP. 195202071979032001

## MOTTO DAN PERSEMBAHAN

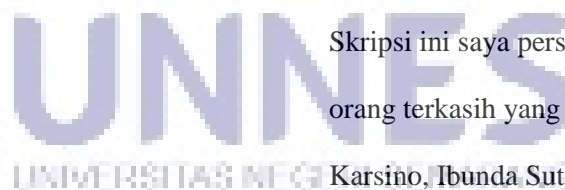
### MOTTO

Tak ada do'a dan usaha yang percuma.

Lakukanlah yang terbaik dengan sepenuh hati.

Karena keajaiban Allah itu nyata adanya.

### PERSEMBAHAN



Skripsi ini saya persembahkan untuk orang-orang terkasih yang selalu hebat. Ayahanda Karsino, Ibunda Sutarni, dan Adikku Niki Nur Laila Sari. Mas Wigar Fatriawant serta sahabat-sahabatku Intan Rachmawati, Rizqi Amalia, Ida Fitriani, dan Siti Rofi'atus S.

## ABSTRAK

**Sari, Retno Ika. 2016. Analisis Keragaman Sekuens Nukleotida Gen *D-loop* pada Itik Tegal. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Dr. drh. R. Susanti, M.P. dan Dr. Retno Sri Iswari, S.U.**

Itik Tegal yang dipelihara selama ini berasal dari bibit yang belum diketahui asal-usul genetiknya. Identifikasi secara molekuler dapat digunakan untuk studi keragaman genetik. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) mitokondria (mtDNA) dipilih sebagai marker genetik, karena mtDNA mempunyai *copy number* yang tinggi, mtDNA diturunkan secara maternal, dan mtDNA mempunyai laju polimorfisme yang tinggi. *D-loop* adalah gen *non-coding* pada mtDNA yang memiliki tingkat polimorfisme tinggi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman sekuens nukleotida gen *D-loop* pada itik Tegal. Sampel yang digunakan adalah itik Tegal sebanyak 8 ekor dari empat jenis itik Tegal (Branjangan, Jarakan, Blorong, dan Lemahan) dari Kota Tegal. Amplifikasi DNA menggunakan primer DL-*Anas*PF (L56) dan DL-*Anas*PR (H773) menghasilkan pita sebesar 718 bp. Hasil analisis ditemukan 6 haplotipe dari 12 situs polimorfisme nukleotida. Haplotipe yang terbentuk adalah A (Branjangan 1), B (Branjangan 2), C (Jarakan 1), D (Jarakan 2 dan Blorong 1), E (Blorong 2 dan Lemahan 1), dan F (Lemahan 2). Hasil analisis kemiripan sekuens nukleotida gen *D-loop* seluruh sampel itik Tegal menunjukkan homologi 99% dengan *Anas platyrhynchos* (GenBank Acc Number KJ833587.1) dan *Anas zonorhyncha* (GenBank Acc Number AY506969.1). Berdasarkan pohon filogenetik, populasi itik Tegal berkerabat erat dan memiliki garis keturunan induk (*maternal inheritance*) yang sama dengan itik *Anas platyrhynchos* dan *Anas zonorhyncha* yang didukung jarak genetik 0.00 dan nilai *bootstrap* 100%.

**Kata kunci: DNA mitokondria, gen *D-loop*, Itik Tegal, Keragaman genetik**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Analisis keragaman sekuens nukleotida gen *D-loop* pada itik Tegal”. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung Dr. drh. R. Susanti, M.P. Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kesulitan dan hambatan, namun berkat bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Atas selesainya skripsi ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk dapat menimba ilmu di Universitas ini.
2. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberi izin penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.
3. Ketua Jurusan Biologi yang memudahkan jalan penulis dalam menyusun skripsi.
4. Ibu Dr. drh. R. Susanti, M.P. sebagai dosen pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan pengetahuan baru kepada penulis.
5. Ibu Dr. Retno Sri Iswari, S.U. selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberi banyak bimbingan dan motivasi kepada penulis.
6. Ibu Dr. Ari Yuniastuti S.Pt., M.Kes. selaku dosen penguji yang memberikan banyak motivasi dan bimbingan kepada penulis.
7. Bapak Andin Irsadi, S.Pd., M.Si. selaku dosen wali yang selalu mengarahkan dan membimbing penulis dalam menyusun jadwal perkuliahan yang dulu sempat tertinggal satu semester (cuti kuliah), sehingga penulis dapat menyelesaikan studi tepat waktu.
8. Bapak Ir. Tyas Agung Pribadi, M.Sc. beserta keluarga yang telah banyak member motivasi dan bantuan kepada penulis saat kuliah di Unnes.
9. Ibu Indriawati (Bu Rere) M.Si., bapak M. Ridwan M.Si., mbak Diyah M.Si. dan mbak Evi M.Si. selaku keluarga besar Laboratorium Genetika Molekuler Hewan LIPI yang telah membantu dan member bimbingan dalam penelitian ini.
10. Ayahanda Karsino serta Ibunda Sutarni dan Adikku Niki Nur Laila Sari tersayang sebagai penuntun dan penyemangat dalam kehidupanku dengan kesederhanaan,

memberikan semangat dan dukungan dalam melanjutkan kehidupan dengan penuh semangat dan tanggung jawab.

11. Mas Wigar Fatriawant selaku orang terkasih yang selalu member arahan, semangat, cinta kasih dan bantuan di setiap kesulitan penulis, sehingga penulis mampu menjalani kehidupan dengan nyaman dan penuh pendampingan.
12. Sahabatku tercinta Intan Rachmawati, Rizqi Amalia, Ida Fitriani, Siti Rofiatu S, yang selalu member semangat, nasehat, kegalauan, kebersamaan, dan canda tawa kepada penulis. Serta teman-teman angkatan 2012 yang banyak memberikan kenangan yang tak terlupakan.
13. Mbak Fitri Arum Sasi, Mbak Dani, Mbak Ita, Mbak Ria, dan seluruh laboran Biologi Unnes yang selalu member bantuan dan motivasi kepada penulis.
14. Keluarga Besar Asisten Biokimia dan Kimia Organik yang selalu member inspirasi dan kekuatan kepada penulis untuk tetap tangguh.
15. Keluarga besar HimaBio 2013-2014 yang member banyak pengalaman-pengalaman berharga kepada penulis.
16. Seluruh sahabatku Prizty Kos (Anggi, Uswah, Dyah, Sup, Mbak Ratna, Mbak Rina, Mbak Nisa, Eka) yang selalu membantu penulis untuk menjalani kehidupan di Semarang.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu kritik dan saran sangat diharapkan. Atas segala bimbingan dan bantuan dari semua pihak, penulis berdoa semoga mendapat balasan pahala dari Allah SWT.

**UNNES**  
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

Semarang, 20 Juli 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI .....	ii
PENGESAHAN .....	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN .....	iv
ABSTRAK ... ..	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	4
C. Penegasan Istilah .....	4
D. Tujuan Penelitian .....	4
E. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Itik .....	6
B. DNA Mitokondria .....	7
C. Daerah <i>D-loop</i> DNA Mitokondria .....	9
D. Kerangka Berpikir .....	12
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b>	
A. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	13
B. Populasi dan Sampel Penelitian .....	13



C. Rancangan Penelitian .....	13
D. Alat dan Bahan Penelitian .....	13
E. Prosedur Penelitian .....	14
F. Analisis Data .....	17
<b>BAB IV. HASIL PEMBAHASAN</b>	
A. Isolasi DNA dan Amplifikasi mtDNA pada Daerah <i>D-loop</i> .....	18
B. Analisis Hasil Sekuen DNA .....	19
<b>BAB V. PENUTUP</b>	
A. Simpulan .....	30
B. Saran .....	30
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	31
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b> .....	35



## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
1. Alat penelitian .....	14
2. Bahan penelitian .....	14
3. Komposisi <i>cocktail</i> PCR .....	16
4. Primer <i>D-loop</i> .....	16
5. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST sekuen DNA gen <i>D-loop</i> .....	20
6. Polimorfisme nukleotida yang dianalisis pada segmen <i>D-loop</i> DNA mitokondria yang diselaraskan dengan referensi <i>GenBank Anas platyrhynchos</i> (Acc.Number KJ833587.1).....	23
7. Hasil <i>pairwise distance calculation</i> .....	26



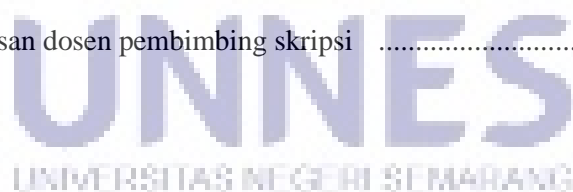
## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
1. Posisi <i>D-loop</i> dalam mtDNA pada <i>Egretta garzetta</i> (kuntul kecil) .....	10
2. Kerangka Berpikir Penelitian Analisis Keragaman Sekuens Nukleotida Gen <i>D-loop</i> pada Itik Tegal .....	12
3. Hasil elektroforesis optimasi enam suhu <i>annealing</i> gen <i>D-loop</i> pada 1,2% gel agarose .....	18
4. Hasil elektroforesis produk PCR gen <i>D-loop</i> pada 1.2% gel agarose .....	19
5. Elektroforegram hasil sekuensing DNA .....	20
6. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Branjangan 1 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	22
7. Distribusi situs polimorfik sekuen fragmen <i>D-loop</i> mitokondria .....	24
8. Pohon filogenetik gen <i>D-loop</i> pada empat jenis itik Tegal dan itik lain di dunia .....	28

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
1. Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian .....	36
2. Dokumentasi penelitian .....	37
3. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Branjangan</i> 1 pada sekuen <i>forward</i> .....	38
4. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Branjangan</i> 1 pada sekuen <i>reverse</i> .....	39
5. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Branjangan</i> 2 pada sekuen <i>forward</i> .....	40
6. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Branjangan</i> 2 pada sekuen <i>reverse</i> .....	41
7. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Jarakan</i> 1 pada sekuen <i>forward</i> .....	42
8. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Jarakan</i> 1 pada sekuen <i>reverse</i> .....	43
9. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Jarakan</i> 2 pada sekuen <i>forward</i> .....	44
10. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Jarakan</i> 2 pada sekuen <i>reverse</i> .....	45
11. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Blorong</i> 1 pada sekuen <i>forward</i> .....	46
12. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Blorong</i> 1 pada sekuen <i>reverse</i> .....	47
13. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Blorong</i> 2 pada sekuen <i>forward</i> .....	48
14. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Blorong</i> 2 pada sekuen <i>reverse</i> .....	49
15. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Lemahan</i> 1 pada sekuen <i>forward</i> .....	50
16. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal <i>Lemahan</i> 1 pada sekuen <i>reverse</i> .....	51

17. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Lemahan 2 pada sekuen <i>forward</i> .....	52
18. Hasil elektroforegram sekuen gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Lemahan 2 pada sekuen <i>reverse</i> .....	53
19. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Branjangan 2 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	54
20. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Jarakan 1 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	55
21. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Jarakan 2 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	56
22. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Blorong 1 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	57
23. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Blorong 2 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	58
24. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Lemahan 1 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	59
25. Hasil <i>alignment</i> pada program BLAST gen <i>D-loop</i> Itik Tegal Lemahan 2 dengan <i>GenBank Anas platyrhynchos Acc Number KJ833587.1</i> .....	60
26. Pensejajaran berganda nukleotida dari <i>D-loop</i> antara itik Tegal Branjangan, Jarakan, Blorong, Lemahan dan referensi dari <i>GenBank Anas platyrhynchos (KJ833587.1)</i> .....	61
27. Surat keputusan dosen pembimbing skripsi .....	66



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Itik mempunyai beberapa keunggulan dari pada unggas lain diantaranya: (1) mampu mempertahankan produksi telur lebih lama dibandingkan dengan ayam, (2) mampu berproduksi dengan baik meskipun pemeliharaan dengan sistem pengelolaan yang sederhana, dan (3) lebih tahan penyakit sehingga memiliki tingkat kematian yang rendah (Suharno & Amri 2010). Itik banyak dimanfaatkan secara luas baik sebagai penghasil daging maupun telur (Wu *et al.* 2011). Produksi telur itik lokal sebesar 20% dan merupakan produksi telur terbesar kedua di Indonesia setelah ayam petelur sebesar 65% (Yudohusodo 2003).

Jenis itik lokal di Indonesia diberi nama sesuai dengan lokasinya dan mempunyai ciri-ciri morfologi yang khas. Di Pulau Jawa dikenal dengan nama itik Tegal dan itik Magelang yang berada di Provinsi Jawa Tengah, itik Mojosari di Provinsi Jawa Timur, itik Cihateup di Provinsi Jawa Barat dan itik Turi di Daerah Istimewa Yogyakarta. Di Pulau Sumatera tepatnya di Provinsi Sumatera Barat, itik yang berkembang sebagai sumber daya genetik adalah itik Pitalah, itik Kamang, dan itik Bayang. Di Pulau Bali, itik diberi nama itik Bali dan di Provinsi Kalimantan Selatan adalah itik Alabio (Purwanto 2012).

Itik Tegal (*Anas platyrhynchos javanicus*) berkembang di Kabupaten Tegal, tepatnya di Karesidenan Pekalongan mulai dari Kabupaten Batang sampai Kabupaten Brebes, bahkan telah berkembang sampai di Kabupaten Cirebon dan Indramayu Jawa Barat (Subiharta *et al.* 2013). Menurut Susanti & Prasetyo (2005), itik Tegal mempunyai ciri-ciri yang mirip dengan itik *Indian Runner* antara lain kepala kecil, leher langsing, panjang dan bulat, sayap menempel erat pada badan, berdiri hampir tegak lurus, tubuh langsing bulat seperti botol, dan ujung bulunya menutup di atas ekor. Umur awal

bertelur itik Tegal lebih cepat daripada itik lokal lainnya, berkisar antara 132-162,4 hari (Subiharta *et al.* 2013).

Pamungkas *et al.* (2013) melaporkan bahwa pada umur 4 minggu, itik Tegal memiliki bobot badan yang relatif lebih tinggi yaitu  $380,16 \pm 8,08$  g sedangkan itik Magelang  $350,38 \pm 30,21$  g dan itik Mojosari  $317,80 \pm 17,11$  g. Sopiyan *et al.* (2006) melaporkan ada sembilan warna bulu penutup pada itik Tegal dewasa, yaitu Branjangan, Lemahan, Jarakan, Putih, Jalen, Blorong, Jambul, Pudak, dan Irengan.

Kemurnian dan keunikan dari masing-masing jenis itik lokal merupakan bagian dari plasma nutfah. Strategi konservasi sulit ditentukan karena pada umumnya itik yang dipelihara selama ini berasal dari bibit yang belum diketahui asal-usul genetiknya dan tidak mempunyai catatan silsilah (Purwantini *et al.* 2013). Identifikasi secara molekuler dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk mengungkap perbedaan intra spesies, filogeografi dan mengetahui hubungan kekerabatan antar rumpun sehingga dapat digunakan untuk studi keragaman genetik (Sulandari *et al.* 2007).

Pendekatan molekuler berdasarkan polimorfisme DNA memungkinkan untuk memilih itik dengan genetik unggul, karena setiap individu memiliki susunan genetik yang berbeda-beda (Purwantini *et al.* 2013). *Deoxyribonucleic acid* (DNA) mitokondria (mtDNA) dipilih sebagai penanda atau marker genetik, karena mtDNA mempunyai *copy number* yang tinggi, meskipun di dalam sel yang tidak mengandung inti. Jumlah *copy* per sel yaitu 1000-10.000 sehingga mtDNA dapat digunakan untuk analisis pada sampel dengan jumlah DNA yang sangat terbatas, atau apabila analisis DNA inti tidak dapat dilakukan. Kedua, mtDNA diturunkan secara maternal sehingga setiap individu pada garis keturunan ibu yang sama akan mempunyai tipe mtDNA yang identik. Ketiga, mtDNA mempunyai laju polimorfisme yang tinggi dengan laju evolusinya sekitar 5-10 kali lebih cepat dari DNA inti (Ratnayani *et al.* 2007).

Pada mtDNA antara lain mengandung daerah kontrol atau *D-loop* (*Displacement Loop*) yang tidak mengkode protein, sehingga mutasi yang

terjadi tidak mempengaruhi fungsi protein. Toleransi yang tinggi pada daerah *D-loop* terhadap mutasi menyebabkan daerah ini menjadi sangat bervariasi dibanding daerah lain. Oleh karena itu, *D-loop* mempunyai tingkat polimorfisme yang paling tinggi pada mtDNA.

Penelitian keragaman genetik secara molekuler menggunakan mtDNA telah banyak dilakukan pada manusia yaitu untuk penentuan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi global manusia modern, bidang forensik, populasi dan identifikasi penyakit genetik maupun genetika medis (Yang *et al.* 2013). Urutan nukleotida daerah *D-loop* mtDNA juga berhasil digunakan sebagai penanda genetik yang paling populer untuk mendukung konservasi spesies yang terkait erat dengan itik liar (*Mallard*) dan itik Serati (*Muscovy*) serta untuk memahami asal-usul, proses domestikasi, keragaman genetik serta diferensiasi itik domestik (Wu *et al.* 2011).

Daerah *D-loop* mtDNA berhasil digunakan untuk penelusuran filogenetik itik lokal di Thailand. Diperoleh petunjuk bahwa terdapat kesamaan nenek moyang antara dua itik asli Thailand yaitu *Nakorn-Pathom* (NP) dan *Park-Nam* (PN) dengan itik *Mallard* (*Anas platyrhynchos*) (Leekaew *et al.* 2008). Penelitian pada daerah *D-loop* telah dilakukan untuk mengetahui asal-usul ayam Indonesia (Zein & Sulandari 2009), serta mengetahui hubungan genetik itik Magelang dengan itik lokal lainnya (Purwantini *et al.* 2013).

Keragaman genetik suatu spesies merupakan sumber daya biologi primer di dalam reproduksi sehingga untuk mengembangbiakkan suatu spesies perlu diketahui variasi genetiknya. Selain itu, keragaman genetik juga berguna dalam strategi konservasi dan pemurnian serta pengembangan perbaikan mutu genetik untuk lebih memanfaatkan sumber daya plasma nutfah itik lokal (Purwantini *et al.* 2013). Oleh karena itu, analisis keragaman genetik itik lokal Indonesia menggunakan *D-loop* mitokondria diharapkan dapat membantu melengkapi data sebagai usaha konservasi.



## B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka rumusan masalah yang dikaji dalam penelitian ini adalah bagaimana keragaman sekuens nukleotida gen *D-loop* pada itik Tegal?

## C. Penegasan Istilah

Penegasan istilah dalam penelitian ini, adalah:

### a. Gen *D-loop*

*D-loop* adalah gen *non-coding* pada mtDNA yang memiliki tingkat polimorfisme tinggi. *D-loop* berukuran 1812 bp pada *Egretta garzetta* (kuntul kecil), dimulai dari nukleotida 15550 bp sampai 17361 bp (Zou *et al.* 2015). Pada penelitian ini gen *D-loop* diamplifikasi menggunakan primer DL-*Anas*PF (L56) dan DL-*Anas*PR (H773) menghasilkan amplicon sebesar 718 bp (Purwantini *et al.* 2013).

### b. Itik Tegal

Itik Tegal (*Anas platyrhynchos javanicus*) berkembang di Kabupaten Tegal, tepatnya di Karesidenan Pekalongan mulai dari Kabupaten Batang sampai Kabupaten Brebes. Pada penelitian ini menggunakan jenis itik Tegal dengan empat warna bulu penutup yang berbeda, yaitu Branjangan, Jarakan, Blorong, dan Lemahan yang diambil dari Kota Tegal.

## D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman sekuens nukleotida gen *D-loop* pada itik Tegal.

## E. Manfaat Penelitian

### a. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk menambah bahan referensi dan sebagai ilmu pengetahuan terbaru yang berhubungan dengan objek yang dikaji.

b. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi bagi para peternak itik Tegal mengenai keragaman genetik itik tersebut yang nantinya dapat digunakan sebagai strategi konservasi dan pemurnian serta pengembangan perbaikan mutu genetik untuk lebih memanfaatkan sumber daya plasma nutfah itik Tegal.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Itik

Itik lokal di Indonesia merupakan domestikasi dari itik liar (*mallard*) keturunan Indian Runner. Hal ini didasarkan pada itik-itik yang memiliki “*sex feather*” yaitu beberapa bulu yang mencuat ke atas pada ekor itik jantan seperti pada itik *mallard* (Susanti & Prasetyo 2005). Taksonomi itik menurut Puspitasari (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Aves
Ordo	: Anseriformis
Famili	: Anatidae
Genus	: Anas
Spesies	: <i>Anas platyrhynchos</i>

Itik Jawa merupakan itik lokal Indonesia yang memiliki karakteristik tipe petelur paling baik yaitu 200-250 butir/ekor/tahun. Itik Jawa umumnya mulai bertelur pertama kali pada usia 22-24 minggu dan tidak mempunyai sifat mengerami telurnya. Itik ini dapat dipelihara secara insentif maupun ekstensif, karena memiliki ketahanan hidup yang tinggi. Itik Jawa memiliki tubuh kecil, paruh pipih dan tipis, leher relatif panjang dengan tubuh bulat memanjang dan tegak lurus ke atas menyerupai botol. Itik jantan mempunyai 2-3 bulu ekor yang mencuat melengkung ke atas arah depan, sedangkan itik betina tidak memilikinya. Kulit telurnya cukup tebal dan berwarna hijau agak kebiruan, jenis itik ini adalah itik Tegal, Magelang, dan Mojosari (Murtidjo 2010).

Pada tahun 2010, populasi itik di Jawa Tengah mencapai 4.848.263 ekor dan terus meningkat mencapai 5.006.163 ekor pada tahun 2011 (BPS & Bappeda Jawa Tengah 2012). Ada sekitar 15 bangsa itik lokal di wilayah Indonesia, dua diantaranya berasal dari Jawa Tengah. Di Provinsi Jawa Tengah dikenal dengan nama itik Tegal dan itik Magelang (Purwanto 2012).

Kedua bangsa itik lokal Jawa Tengah tersebut salah satunya adalah itik Tegal (*Anas platyrhynchos javanicus*). Karakteristik dari itik Tegal, antara lain:

- a. Secara morfologi itik Tegal mempunyai ciri-ciri fisik sama dengan itik *Indian Runner* yang produksi telurnya tinggi yaitu kepala kecil, leher langsing, panjang dan bulat, sayap menempel erat pada badan dan ujung bulunya menutup di atas ekor, tubuh langsing bulat seperti botol (Setioko *et al.* 2004; Susanti & Prasetyo 2005).
- b. Umur awal bertelur itik Tegal lebih cepat daripada itik lokal lainnya, berkisar antara 132-162,4 hari (Subiharta *et al.* 2013).
- c. Secara kuantitatif pada umur 4 minggu itik Tegal memiliki bobot badan yang relatif lebih tinggi daripada itik Magelang dan itik Mojosari (Pamungkas *et al.* 2013).
- d. Terdapat sembilan warna bulu penutup pada itik Tegal dewasa yaitu: Branjangan, Lemahan, Jarakan, Putih, Jalen, Blorong, Jambul, Pudak, dan Irengan (Sopiyana *et al.* 2006).

## B. DNA Mitokondria

Mitokondria adalah organel sel yang bertanggung jawab untuk reaksi dalam siklus asam trikarboksilat, pemindahan elektron, dan metabolisme energi di dalam sel. Fungsi utama dari mitokondria adalah penghasil energi melalui proses fosforilasi oksidatif yang menghasilkan produk samping radikal oksigen yaitu *reactive oxygen spesies* (ROS). Mitokondria mempunyai suatu material genetik tersendiri yang disebut *mitochondrial genome* (mtDNA) (Wandia 2001).

Molekul *mtDNA* berbentuk untai ganda sirkuler yang pada mamalia memiliki kisaran ukuran 15.000-17.000 bp. Molekul *mtDNA* terbagi atas dua untai, yaitu untai berat atau *heavy strand* (H) yang banyak mengandung basa guanin dan untai ringan atau *light strand* (L) yang mengandung basa guanin lebih sedikit (Sharma *et al.* 2005; Hou *et al.* 2006; Fritsch 2009). Setiap genom DNA mitokondria terdiri atas daerah *coding* dan *noncoding*. Daerah *coding* mengambil proporsi 90% dari total genom sedangkan sisanya

merupakan daerah *noncoding*. Daerah *coding* mengandung 37 gen penyandi yang terdiri atas 22 gen penyandi transfer RNA (tRNA), dua gen penyandi ribosomal RNA (rRNA), dan 13 gen penyandi protein. Protein yang disandi pada *mtDNA* terdiri atas tiga subunit sitokrom oksidase (sitokrom oksidase I-III), tujuh subunit NADH-dehidrogenase, dua subunit ATPase, dan sitokrom-b (cyt-b). Protein-protein tersebut terlibat dalam transpor elektron dan reaksi fosforilasi oksidatif dari mitokondria (Wibowo *et al.* 2010). Gen-gen tersebut umumnya lebih banyak tersebar di untai berat. Daerah *noncoding* terletak pada daerah intergenik COI/tRNA Tyr, daerah intergenik COII/tRNA Lys, dan daerah kontrol atau disebut juga daerah *D-loop* (Rogaev *et al.* 2006).

Molekul *mtDNA* memiliki beberapa karakteristik dibandingkan dengan DNA inti. Pertama, *mtDNA* mengandung *copy* per sel lebih banyak dibandingkan *copy* DNA inti, yaitu sekitar 1000-10.000. Karakteristik *mtDNA* ini sangat berguna jika jumlah DNA sampel sangat terbatas, seperti sampel-sampel yang diambil dari kasus kriminal yaitu rambut, tulang, gigi, cairan tubuh (air liur, air mani, dan darah) (Morin *et al.* 2001; Tapio & Grigaliunaite 2003; Hoong & Lex 2005; Pakendorf & Stoneking 2005; Ratnayani *et al.* 2007).

Kedua, *mtDNA* tidak memiliki protein histon serta tidak memiliki enzim untuk perbaikan kesalahan replikasi atau kerusakan DNA sehingga lebih mudah terjadi mutasi. Laju mutasi yang tinggi mengakibatkan *mtDNA* mampu mengakumulasi polimorfisme 5-10 kali lebih cepat dari DNA inti sehingga dapat menunjukkan variasi yang tinggi pada berbagai level, baik antar individu maupun populasi (Ratnayani *et al.* 2007). Mutasi yang terjadi umumnya berupa mutasi titik, namun dapat pula berupa delesi atau insersi. Laju mutasi yang tinggi disebabkan karena *mtDNA* rentan terhadap peristiwa mutagenik serta produksi *Radical Oxydative Species* (ROS) dari proses fosforilasi oksidatif di organel tersebut (Rose *et al.* 2007).

Ketiga, molekul *mtDNA* diwariskan secara maternal karena mitokondria dari sel sperma tidak ikut menembus sel telur pada saat fertilisasi. Dengan kata lain, *mtDNA* yang diwariskan bukan merupakan hasil

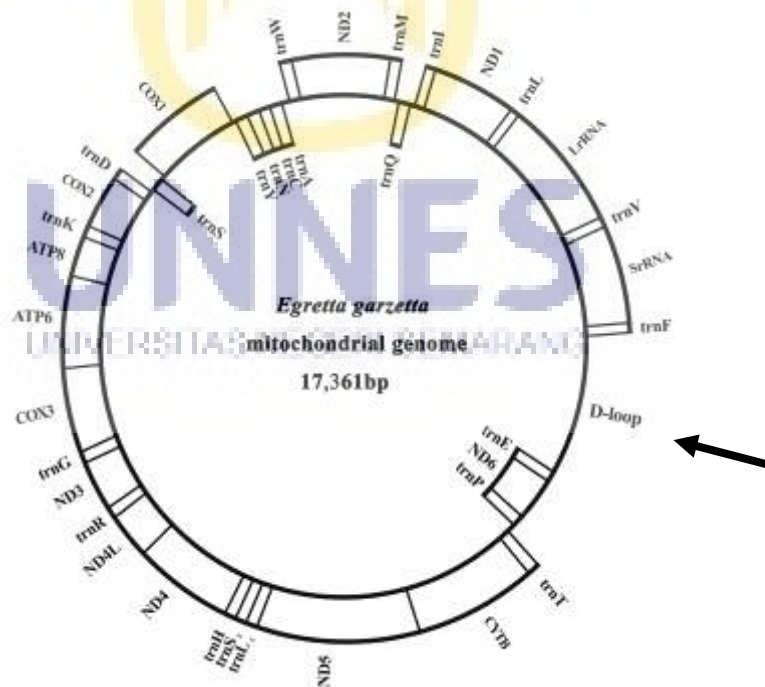
rekombinasi, sehingga diversifikasi genetik hanya terjadi melalui mutasi. Setiap individu pada garis keturunan ibu yang sama akan mempunyai tipe *mtDNA* yang identik. Pewarisan uniparental yang demikian akan memudahkan mengungkap silsilah kekerabatan di masa lalu berdasarkan garis keturunan maternal, tanpa harus dibaurkan dengan pengaruh yang muncul akibat rekombinasi dan pewarisan biparental (Pakendorf & Stoneking 2005; Ratnayani *et al.* 2007; Galtier *et al.* 2009).

DNA mitokondria (*mtDNA*) mewakili unsur genomik yang paling informatif untuk menguraikan asal ternak. Hingga kini, sekuen mitokondria secara luas telah dipelajari pada sapi, babi, domba, kuda, anjing, keledai, dan kambing. Studi identifikasi kambing domestik menggunakan *mtDNA* menghasilkan sedikitnya empat garis keturunan utama (Chen *et al.* 2005). Garis keturunan A adalah yang paling berbeda dan secara luas penyebarannya ke semua benua. Garis keturunan B dari timur dan Asia Selatan, mencakup Mongolia, Laos, Malaysia, Pakistan, dan India. Garis keturunan C dengan frekuensi rendah di Mongolia, Switzerland, Slovenia, Pakistan, dan India. Garis keturunan D jarang dan hanya diamati di Pakistan dan kambing lokal India (Chen *et al.* 2005). Selain itu, analisis *mtDNA* juga telah dilakukan pada *Egretta garzetta* (kuntul kecil) yang memiliki ukuran 17.361 bp serta menganalisis kekerabatan antara *Egretta garzetta* dengan spesies lain dari famili Ardeidae (Zou *et al.* 2015).

### C. Daerah *D-loop* DNA Mitokondria

Molekul *mtDNA* memiliki daerah yang disebut *displacement loop* atau *D-loop*. Daerah *D-loop* mengandung pangkal replikasi untai berat (O), promoter transkripsi untai berat (H), dan promoter transkripsi untai ringan (L). Hal tersebut menunjukkan bahwa daerah *D-loop* berperan penting dalam replikasi dan transkripsi (Ruokonen 2001). Daerah *D-loop* mengandung sekuens DNA yang paling bervariasi dari keseluruhan genom *mtDNA* hewan. Hipervariabilitas tersebut disebabkan oleh laju mutasi yang tinggi, yaitu sekitar  $0,075-0,165 \times 10^{-6}$  substitusi/situs/tahun (Sumida *et al.* 2000).

Daerah ini bersifat sangat polimorfik dan memiliki tiga daerah hipervariabel yaitu Hipervariabel I (HVI), Hipervariabel II (HVII), dan Hipervariabel III (HVIII) dengan urutan sangat bervariasi antar individu. Daerah HVI terletak pada urutan nukleotida 57-372, sedangkan HVII terletak pada nukleotida 438-594, dan HVIII terletak pada nukleotida 16024-16383. Tiga daerah ini memiliki laju mutasi yang lebih tinggi dari daerah *coding*. Laju mutasi sejauh ini diketahui 1:33 generasi, artinya perubahan urutan nukleotida hanya akan terjadi setiap 33 generasi. Individu yang terkait hubungan maternal akan memiliki urutan sekuen yang sama dan yang tidak terkait hubungan maternal akan berbeda. Daerah HVI, HVII, dan HVIII terletak di daerah kontrol, yang juga bertanggung jawab terhadap replikasi dan transkripsi *mtDNA*. Daerah kontrol terletak antara gen tRNA yang masing-masing mengkode asam amino prolin dan fenilalanin (Hoong & Lex 2005). Oleh karena itu, daerah ini sering dianalisis dan sangat penting untuk digunakan dalam proses identifikasi individu. Daerah *D-loop* pada *mtDNA* dapat diamati pada Gambar 1.



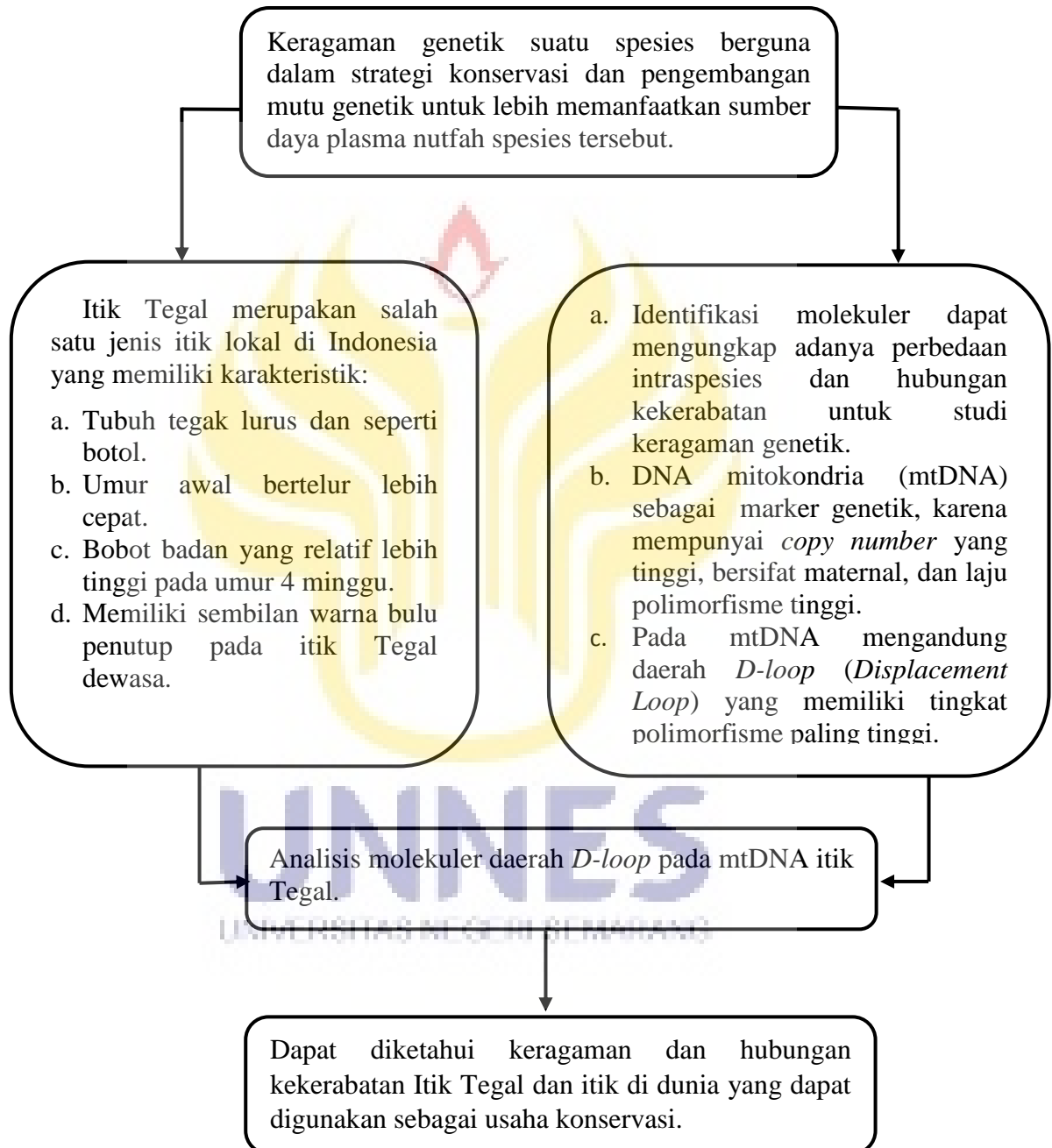
Gambar 1. Posisi *D-loop* dalam *mtDNA* pada *Egretta garzetta* (kuntul kecil) ditunjukkan oleh anak panah (Zou *et al.* 2015).

Penggunaan gen *D-loop* untuk identifikasi spesies, sudah dilakukan di Indonesia. Gumilar *et al.* (2007) melaporkan adanya variasi mutasi daerah *D-loop* mitokondria dari keempat populasi manusia di Indonesia yaitu Tasikmalaya, Padang, Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur. Jumlah mutasi yang terjadi berkisar antara 2 sampai 11 mutasi, namun tidak ditemukan mutasi yang spesifik untuk populasi tertentu. Zein & Sulandari (2009) melaporkan hasil investigasi asal usul ayam Indonesia menggunakan sekuens hypervariable-1 *D-loop* bahwa ayam lokal Indonesia berada dalam satu *clade* dengan ayam hutan merah yang berarti berdekatan secara geneologis (berbagai leluhur yang sama). Analisis gen *D-loop* itik Magelang menunjukkan adanya hubungan kekerabatan dengan itik lokal lainnya di Indonesia dan dengan itik *Anas* di dunia yang relatif beragam. Itik Magelang, Tegal, Mojosari, Bali dan Alabio mempunyai hubungan kekerabatan yang lebih erat dan memiliki garis keturunan induk (*maternal inheritance*) yang sama dengan *Anas platyrhynchos* dan *Anas zonorhyncha*. Hal ini ditunjukkan dengan jarak genetiknya sebesar 0,000-0,019 dibandingkan dengan *Anas* lainnya di dunia (0,055-0,076). Jarak genetik paling besar adalah dengan *Cairina moschata* (0,095-0,108) (Purwantini *et al.* 2013).



#### D. Kerangka Berpikir

Kerangka berpikir pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Kerangka Berpikir Penelitian Analisis Keragaman Sekuens Nukleotida Gen *D-loop* pada Itik Tegal

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **A. Simpulan**

Pada hasil penelitian ini, diperoleh pita gen *D-loop* berukuran 718 bp dari nukleotida urutan ke-56 sampai nukleotida urutan ke-774 gen *D-loop Anas platyrhynchos* GenBank Acc Number KJ833587.1 pada semua sampel itik Tegal Branjangan, Jarakan, Blorong dan Lemahan. Ditemukan adanya 12 polimorfisme nukleotida, yaitu pada urutan 56, 61, 68, 69, 71, 82, 84, 159, 160, 220, 273, dan 323. Haplotipe yang terbentuk adalah A (Branjangan 1), B (Branjangan 2), C (Jarakan 1), D (Jarakan 2 dan Blorong 1), E (Blorong 2 dan Lemahan 1), dan F (Lemahan 2).

Hasil analisis kemiripan sekuen nukleotida gen *D-loop* seluruh sampel itik Tegal menunjukkan homologi 99% dengan *Anas platyrhynchos* (GenBank Acc Number KJ833587.1) dan *Anas zonorhyncha* (GenBank Acc Number AY506969.1). Berdasarkan pohon filogenetik, populasi itik Tegal berkerabat erat dan memiliki garis keturunan induk (*maternal inheritance*) yang sama dengan itik *Anas platyrhynchos* dan *Anas zonorhyncha* yang didukung jarak genetik 0.00 dan nilai *bootstrap* 100%.

#### **B. Saran**

Berdasarkan penelitian ini peneliti menyarankan untuk menambah jumlah sampel jenis itik Tegal berdasarkan warna bulu penutupnya selain sampel yang digunakan pada penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- [BPS& Bappeda] Badan Perencanaan dan Pembangunan Daerah & Badan Pusat Statistik. 2012. *Jawa Tengah dalam Angka*. Semarang: Badan Pusat Statistik & Badan Perencanaan dan Pembangunan Daerah.
- Chen SY, Su YH, Wu SF, Sha T & Zhang YP. 2005. Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. *Molecular Phylogenetic Evolusi* 37:804-814.
- Christianti T, Sutarno, & Etikawati N. 2003. Identifikasi polimorfisme pada fragmen D-loop DNA mitokondria Sapi Benggala. *BioSMART* 5(2): 73-77.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S & Rahayu S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Fritsch G. 2009. Evolution of mitochondrial genomes and reconstruction of phylogenetic relationships. (Dissertation). Leipzig: Universitat Leipzig.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S & Hurst GDD. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541-4550.
- Gumilar GG, Siti HM, Natalia D & Noer AS. 2007. Tiga mutasi frekuensi tertinggi daerah *D-loop* DNA mitokondria empat populasi manusia Indonesia. Dalam: *Prosiding JSChem*. Bandung: FMIPA Institut Teknologi Bandung.
- Han J, Thompson LAJ, Reiss A, Mayorov V, Jia H, Biousse V, Newman NJ & Brown MD. 2006. OPA1 mutations and mitochondrial DNA haplotypes in autosomal dominant optic atrophy. *Genetics Medicine* 8(4): 217-225.
- Hoong LL & Lex KC. 2005. Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 13(2): 79-85.
- Hou WY, Chen X, Wu J, Hu Z, Peng J, Yang Z, Tang C, Zhou Y, Li S, Yan Y, Du L, Kong Z, Ren H, Zhang & Shui S. 2006. A Complete mitochondrial genome sequence of Asian black bear Sichuan subspecies (*Ursus thibetanus mupinensis*). *International Journal of Biological Sciences* 3(2):85-90.
- Leekaew P, Songserm T, Choothesa A & Boonyaparakob. 2008. A simple method to extract mitochondrial DNA in a non-invasive phylogenetic study of domestic native Thailand ducks. *Kasetsart Journal (Nat Sci)* 42: 41-50.
- Li HF, Zhu WQ, Song WT, Shu JT, Han W & Wei Chen K. 2010. Molecular genetic diversity and origin of Chinese domestic duck breeds. *Archiv Tierzucht* 53 (5): 609-617.

- Liang Z, Wang C, Yu H, Peng X, Feng Y, Gong Y & Li S. 2010. Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of Duck Tyrosinase Related Protein-1. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9:2102-2108.
- Lindberg, G.L. 1989. *Sequence Heterogeneity of Bovine Mitochondrial DNA*. Iowa; Iowa State University.
- Morin PA, Chambers KE, Boesch C & Vigilante V. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10: 1835-1844.
- Mundy NI. 2005. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc. Biol Sci.* 272(1573): 1633-1640.
- Murtidjo BA. 2010. *Mengelola Itik*. Yogyakarta: Kanisius.
- Pakendorf B & Stokening M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6:165-83.
- Pamungkas RS, Ismoyowati & Santosa SA. 2013. Kajian bobot tetas, bobot badan umur 4 dan 8 minggu serta korelasinya pada berbagai itik lokal (*Anas platyrhynchos*) dan Itik Manila (*Cairina moscata*) Jantan. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 1(2): 488-500.
- Purwantini D, Yuwanta T, Hartatik T & Ismoyowati. 2013. Polymorphism of *D-loop* Mitochondrial DNA Region and Phylogenetic in Five Indonesian Native Duck Population. *International Journal of Poultry Science* 12 (1): 55-63.
- Purwanto H. 2012. Identifikasi DNA dan Gen Resisten Terhadap Virus AI (*Avian influenza*) pada Itik Pitalah Sebagai Sumber Daya Genetik Sumatera Barat dengan PCR (Polymerase Chain Reaction). (*Artikel*). Padang: Program Pascasarjana Universitas Andalas.
- Puspitasari D. 2010. Pengaruh penambahan tepung keong mas (*Pomacea canaliculata lamarek*) dalam ransum terhadap performan produksi itik petelur. (*Skripsi*). Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Ratnayani KIN, Wirajana & Laksmiwati. 2007. Analisis Variasi Nukleotida Daerah *D-loop* DNA Mitokondria pada Satu Individu Suku Bali Normal. *Jurnal Kimia* 1(1):7-14.
- Rogaev EI, Moliaka YK, Malyarchuk BA, Kondrashov FA, Derenko MV, Chumakov I & Grigorenko AP. 2006. Complete mitochondrial genome and phylogeny of pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PloS Biol* 4(3): 0403-0410.
- Rose G, Passarino G, Scornaienchi V, Romeo G, Dato S, Bellizzi D, Mari V, Feraco E, Maletta R, Bruni A, Franceschi C & Giovanna De Benedictis. 2007. The mitochondrial DNA control region shows genetically correlated

- levels of heteroplasmy in leukocytes of centenarians and their offspring. *BMC Genom* 8: 1-10.
- Ruokonen M. 2001. Phylogeography and conservation genetics of the lesser white-fronted goose (*Anser erythropus*). (Dissertation). Finland: Department of Biology University of Oulu.
- Schutz MM, Freeman AE, Lindberg GL, Koehler CM & Nbitz DC. 1993. The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livestock Production Science* 37: 283-295.
- Setioko AR, Prasetyo LH, Sopiyan S, Susanti T, Hernawati R & Widodo S. 2004. Koleksi dan Evaluasi karakterisasi biologik itik lokal dan Entog secara Exsitu. *Laporan Hasil-hasil Penelitian*. Bogor: Balitnak.
- Sharma H, Singh A, Sharma C, Jain SK & Singh N. 2011. Mutations in the mitochondrial DNA *D-loop* region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell International* 5(34): 1475-2867.
- Sopiyan S, Setioko AR & Yusnandar ME. 2006. Identifikasi sifat-sifat kualitatif dan ukuran tubuh itik Tegal, Magelang dan Damiaking. *Prosiding Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi dalam Mendukung Usaha Ternak Unggas Berdaya Saing*. Semarang 4 Agustus 2006. Kerjasama Puslitbangnak dengan Fak. Peternakan UNDIP.
- Subiharta, Yuwono DM & Sudrajad P. 2013. Karakteristik Itik Tegal (*Anas platyrhynchos Javanicus*) Sebagai Itik Petelur Unggulan Lokal Jawa Tengah dan Upaya Peningkatan Produksinya. *Seminar Nasional: Menggagas Kebangkitan Komoditas Unggulan Lokal Pertanian dan Kelautan*. Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura
- Suharno B & Amri K. 2010. *Panduan Beternak Itik Secara Intensif*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Sulandari S, Zein MSA, Paryanti S & Sartika T. 2007. *Taksonomi dan Asal-Usul Ayam Domestikasi. Keanekaragaman Sumber Daya Hayati Ayam Lokal Indonesia: Manfaat dan Potensi*. Jakarta: LIPI Press.
- Sumida M, Kaneda H, Kato Y, Kanamori Y, Yonekawa H & Nishioka M. 2000. Sequence variation and structural conservation of *D-loop* region and flanking genes of mitochondrial DNA from Japanese pond frogs. *Genes Genet Syst* 75: 79-92.
- Susanti T & Prasetyo LH. 2005. *Panduan karakterisasi ternak itik*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.
- Sutarno, Cummins JM, Greeff J & Lymbery AJ. 2002. Mitochondrial DNA polymorphism and fertility in beef cattle. *Theriogenology* 64(85): 1-8.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

- Tapio M & Grigaliunaite. 2003. Use of mitochondrial DNA as a genetic marker in domesticated mammals. *Ekologija (Vilnius)* 1:31-33.
- Wandia NI. 2001. Mitochondrial Genome. *Jvet* 2(4):1-8.
- Wibowo DA, Prasetyaningtyas WE & Djuwita I. 2010. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Gen Sitokrom B DNAMitokondria Dari Delapan Spesies Burung. Jurnal Hemera Zoa* 1(2): 29-36.
- Wu YZ, Zeng SC, Luo YZ & Han JL. 2011. A Mystery in Sequencing the Mitochondrial DNA *D-loop* from Blood Samples of Domestic Mallard Duck. *Journal of Biological Sciences* 11 (2): 181-188.
- Yang IS, Lee HY, Yang WI & Shin KJ. 2013. mtDNA profiler: A Web Application for the Nomenclature and Comparison of Human Mitochondrial DNA Sequences. *Journal of Forensic Sciences* 58: 972-980.
- Yudohusodo S. 2003. Agribisnis Berbasis Peternakan Menghadapi Era Perdagangan Bebas. *Makalah yang Disampaikan pada Acara Peringatan Hari Ulang Tahun ke 37. Fak. Peternakan. UNSOED.*
- Zein MSA & Sulandari S. 2009. Investigasi asal usul ayam Indonesia menggunakan sekuens hypervariable-1 *D-loop* DNA mitokondria. *Jurnal Veteriner* 10(1): 41-49.
- Zou Y, Jing M, Bi X, Zhang T & Huang L. 2015. The complete mitochondrial genome sequence of the little egret (*Egretta garzetta*). *Genetics and Molecular Biology* 38(2): 162-172.