

## **Analisis keragaman genetik lima populasi nila hitam dan tiga populasi nila merah (*Oreochromis* sp.) dengan analisa sidik ragam random amplified polymorphism DNA (RAPD)**

Iskandariah<sup>✉</sup>, Irin Iriana Kusmini, Otong Zenal Arifin, Rudhy Gustiano

Balai Riset Perikanan Budi Daya Air Tawar, Balitbang KP  
Jln. Sempur Raya No. 1 Bogor

### **Abstrak**

Penelitian mengenai variasi genetik lima populasi nila hitam dan tiga populasi nila merah telah dilakukan di Laboratorium Molekuler Biologi, Balai Riset Perikanan Budi Daya Air Tawar (BRPBAT) Bogor. Populasi yang diamati meliputi lima jenis nila hitam yakni: BEST, Nirwana, Gesit, lokal Kuningan, dan lokal Bogor dan tiga populasi nila merah yaitu: Red NIFI, nila merah Danau Lido, dan nila merah petani Bogor. Penelitian menggunakan metode analisis Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), dengan menggunakan primer OPA-03, OPA-04, OPC-14, dan OPC-15. Hasil pengamatan menunjukkan hanya OPA-03 yang dapat menghasilkan amplifikasi dalam jumlah contoh yang memadai. Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase polimorfik berkisar antara 11,7647-41,1765%, dengan nilai heterozigositas 0,0310-0,1722 dan jarak genetik antar populasi 0,1414-0,6553.

Kata kunci: genetik, ikan nila, populasi, *Oreochromis*, RAPD.

### **Pendahuluan**

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan ikan asal Afrika yang sudah banyak diperkenalkan di banyak negara. Ikan ini tahan terhadap penyakit, mudah berkembang biak dan toleran terhadap kualitas air yang rendah termasuk kadar oksigen terlarut yang rendah. Dewasa ini, ikan nila merupakan salah satu ikan ekonomis penting di dunia yang dikenal sebagai *freshwater chicken*. Ikan ini dipelihara secara komersial di berbagai belahan dunia baik di kolam atau keramba jaring apung (KJA) di air payau maupun air tawar serta perairan pantai (Gustiano *et al.*, 2008). Budi daya intensif ikan nila telah dilakukan di keramba jaring apung di Waduk Saguling, Cirata, dan Jatiluhur (Jawa Barat); Waduk Kedungombo dan Gajah Mungkur (Jawa Tengah); dan beberapa waduk di Jawa Timur dan Sumatera (Nugroho & Maskur, 2002).

Ikan nila merah merupakan ikan introduksi asal Filipina (1981) dan Thailand (1989). Beberapa keunggulan yang dimiliki seperti mudah berkembang biak, pertumbuhan relatif cepat, tahan terhadap hama penyakit dan toleransi yang cukup luas terhadap perubahan lingkungan menyebabkan teknologi budidaya ikan ini berkembang cukup luas di beberapa daerah di Indonesia bahkan produksinya telah diekspor ke beberapa negara Eropa, Singapura, Jepang, dan Amerika Serikat. Selain dapat diekspor dalam bentuk *fillet* segar juga dapat diekspor dalam keadaan hidup. Budi daya ikan nila merah dapat dilakukan di kolam, sawah, tambak, keramba, jaring apung, baik di perairan tawar, payau, maupun di tepi pantai.

Penggunaan ikan nila sebagai komoditas budi daya yang telah meliputi sebagian besar wilayah di Indonesia menyebabkan pengendalian kualitas yang tidak terkontrol dan cenderung terjadi penurunan (Arifin *et al.*, 2007). Penurunan kualitas genetik ikan secara umum ditandai dengan sifat-sifat seperti pertumbuhan lambat, tingkat kematian tinggi, kematangan gonad pada usia dini, dan ukuran individu yang kecil. Rendahnya keragaman genetik akan mengakibatkan munculnya sifat-sifat negatif, antara lain menurunnya pertumbuhan, keragaman ukuran, kestabilan perkembangan organ, tingkat kelangsungan hidup, dan adaptasi terhadap perubahan lingkungannya (Leary *et al.*, 1985).

Perbaikan mutu genetik untuk meningkatkan produksi dan produktivitas pada ikan nila dapat dilakukan dengan berbagai cara. Pertama dengan melakukan introduksi jenis unggul dari luar negeri sebagai

material dasar/genetik untuk memperbaiki keragaan ikan lokal. Kedua dengan melakukan persilangan/hibridisasi untuk mendapatkan sifat unggul yang lebih baik dari populasi asal. Ketiga dengan memanfaatkan keunggulan jenis kelamin jantan. Keempat dengan melakukan seleksi terhadap karakter penting. Kelima dengan DNA *recombinant*/gene transfer/transgenik. Sejak nila diintroduksi dari Taiwan tahun 1969, upaya perbaikan mutu genetik hanya dilakukan dengan cara mendatangkan varietas unggul dari luar. Khusus nila bewarna hitam, jenis-jenis dari luar negeri didatangkan dari Thailand tahun 1989 (Chitralada), Filipina tahun 1994, dan GIFT tahun 1997 (Gustiano *et al.*, 2008).

Beberapa penelitian yang berkaitan dengan tingkat keragaman genetik ikan nila di Indonesia telah dilakukan oleh Sudarto (1990), Nugroho *et al.* (2002), Nugroho & Maskur (2002), Widiyati (2003), Arifin (2005), Arifin & Kurniasih (2007), Arifin *et al.* (2007), dan Nuryadi *et al.* (2007).

Ada beberapa metode yang dapat dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik pada ikan. Salah satunya menggunakan teknik *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjelaskan keragaman genetik delapan populasi ikan nila yang terdiri dari lima populasi nila hitam, yaitu nila BEST, Nirwana, Gesit, lokal Kuningan, dan lokal Bogor serta tiga populasi nila merah yaitu Red NIFI, Merah Lido, dan Merah petani dengan menggunakan metode *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD), sebagai informasi dasar dalam meningkatkan mutu genetik ikan nila.

## **Bahan dan metode**

### *Ikan uji*

Ikan uji yang digunakan adalah lima populasi ikan nila hitam yang terdiri dari nila BEST, Nirwana, Gesit, lokal Kuningan, dan lokal Bogor serta tiga populasi nila merah yaitu Red NIFI, Merah Lido, dan Merah petani masing-masing 10 ekor. Contoh ikan nila yang digunakan berupa sirip yang dipotong dan disimpan dalam larutan alkohol 70% untuk digunakan dalam proses analisis.

### *Ekstraksi DNA*

DNA ikan diekstraksi dari potongan sirip dengan menggunakan metode *Phenol Chloroform* (Nugroho, 1997). Potongan sirip sebanyak 5-10 mg dimasukkan dalam *mikrotube* 1,5 ml yang telah diisi dengan 500  $\mu$ l TNES Urea, kemudian ditambah 10  $\mu$ l protein kinase. Setelah *divortex* selama 1 menit contoh diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya ditambah larutan *Phenol Chloroform* sebanyak 1000  $\mu$ l dan *divortex* selama 1 menit. Contoh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. *Supernatan* diambil dan dimasukkan dalam mikrotube baru, lalu ditambah dengan 1000  $\mu$ l ethanol 90% dan 10  $\mu$ l CH<sub>3</sub>COONa. Contoh lalu *divortex* selama 1 menit sampai terlihat gumpalan bewarna putih. DNA diendapkan dengan cara mensentrifugasinya dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, lalu cairannya dibuang dan dikeringkan pada suhu kamar. *Pellet* DNA dilarutkan dengan 100  $\mu$ l Tris-EDTA (TE) *buffer* dan disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

### *Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)*

Primer yang digunakan adalah OPA-03, OPA-04, OPC-14 dan OPC-15. Proses amplifikasi dilakukan dengan metode *Polymerize Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi reaksi: 1  $\mu$ l DNA; 1,5  $\mu$ l primer; 12,5  $\mu$ l 2X PCR Master Mix dan 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O; dengan total volume 25  $\mu$ l. Selanjutnya dimasukkan dalam *thermocycler* dengan satu siklus denaturasi pada suhu 94 °C selama 2 menit, 35 siklus penggandaan

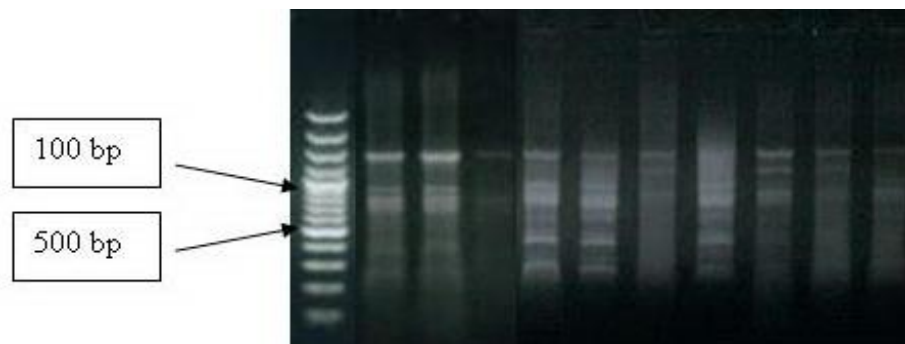
yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 36 °C selama 1 menit dan elongasi pada suhu 72 °C selama 2,5 menit; dan elongasi akhir pada suhu 72 °C selama 7 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan *gel agarose* 1% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE) buffer 1%. Hasilnya diamati dengan UV illuminator dan dicetak gambarnya dengan Polaroid.

*Analisis data*

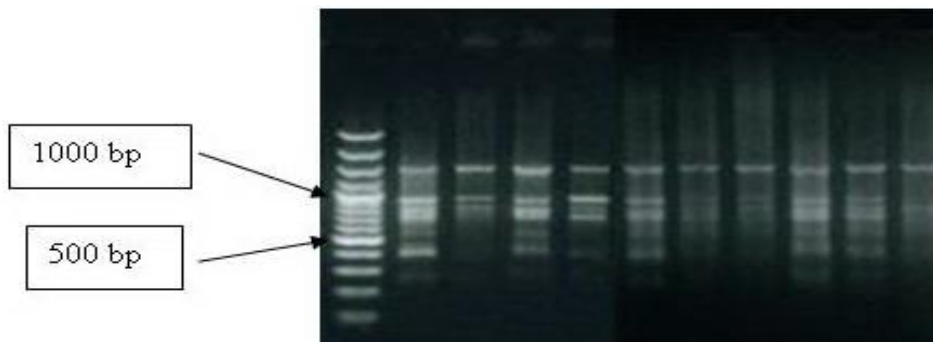
Nilai polimorfisme dan heterozigositas dianalisis dengan menggunakan *descriptive statistics* (Miller, 1997). Analisis statistik menggunakan *exact test for population differentiation* (Raymond & Rousset, 1995 in Miller, 1997) dan kekerabatan antar populasi dianalisa dengan menggunakan jarak genetik menurut Wright (1978) modifikasi Rogers (1972) in Miller (1997).

**Hasil dan pembahasan**

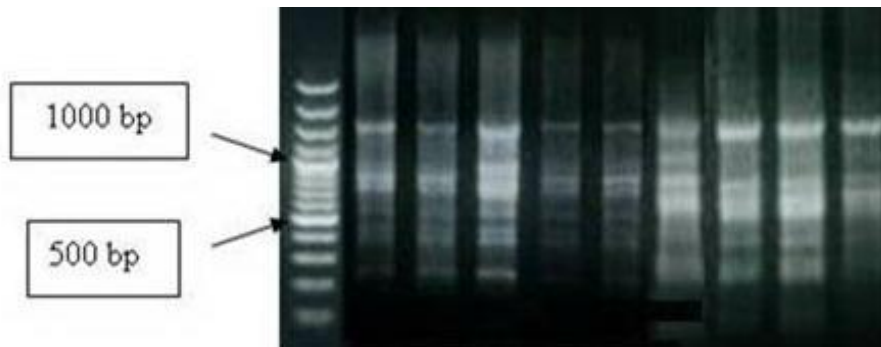
Empat jenis primer yang dicobakan, yakni: OPA-03, OPA-04, OPC-14 dan OPC-15, hanya OPA-03 yang dapat menghasilkan amplifikasi dalam jumlah contoh yang banyak. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada populasi nila BEST menghasilkan 8-9 fragmen dengan kisaran ukuran 250-1600 bp, pada populasi Nirwana delapan fragmen ukuran 275-1600 bp, pada populasi nila Gesit 8-9 fragmen ukuran 250-1600 bp, pada populasi lokal Kuningan 9-10 fragmen ukuran 200-1600 bp dan pada populasi lokal Bogor 9-11 fragmen ukuran 200-1600 bp, pada populasi Red NIFI 9-11 fragmen ukuran 275-1600 bp, pada populasi nila merah Danau Lido 8-10 fragmen ukuran 275-1600 bp dan pada populasi nila merah petani 8-10 fragmen ukuran 200-1600 bp. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada kedelapan populasi ikan uji disajikan pada Gambar 1- 8.



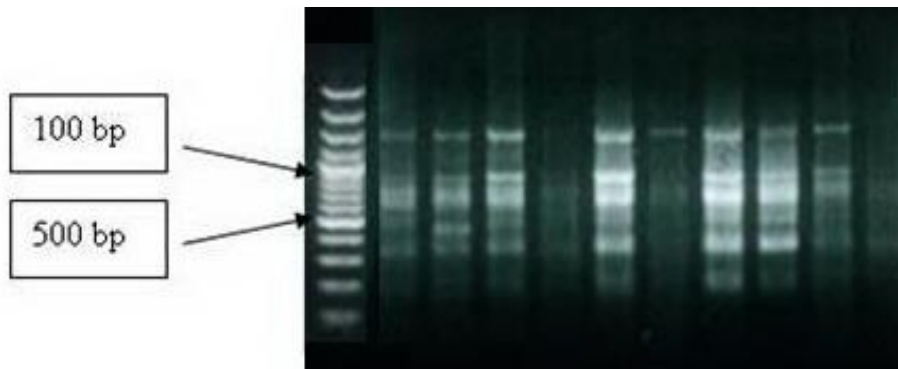
Gambar 1. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila Best



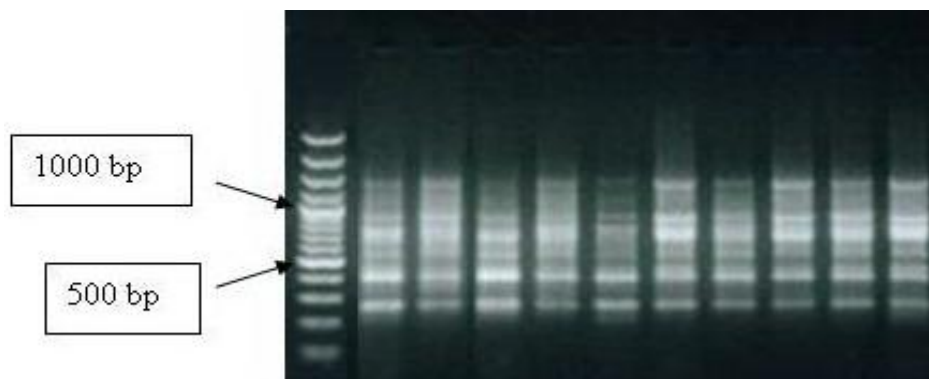
Gambar 2. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila Nirwana



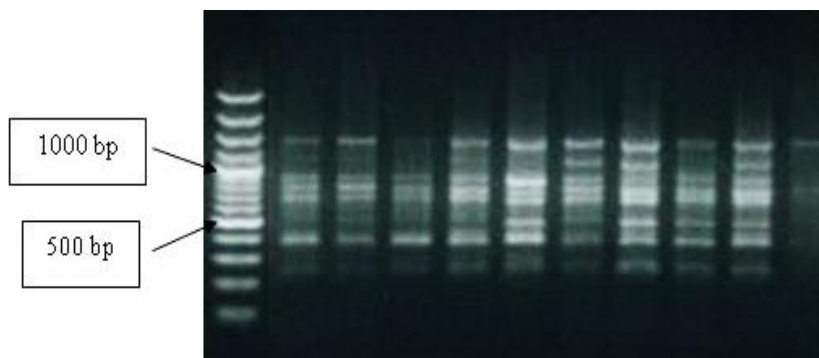
Gambar 3. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila Gesit



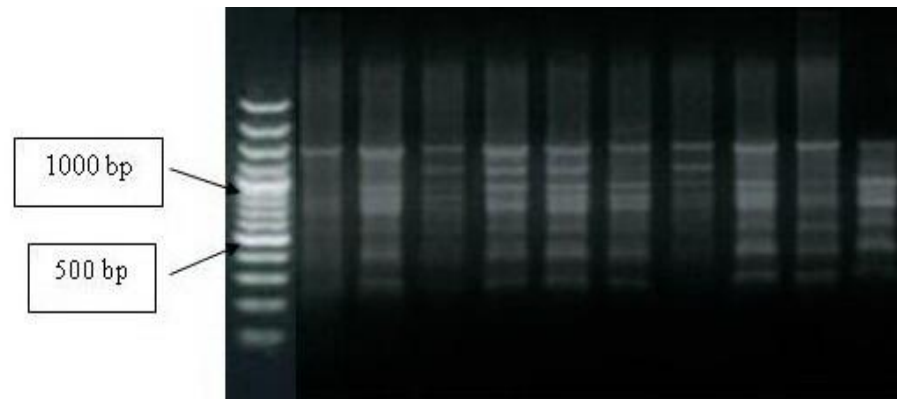
Gambar 4. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila lokal Kuningan



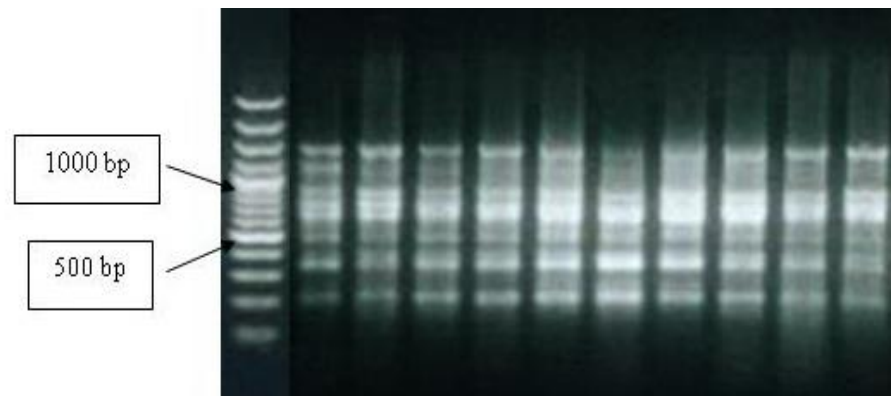
Gambar 5. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila lokal Bogor



Gambar 6. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila Red NIFI



Gambar 7. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila merah D. Lido



Gambar 8. Hasil amplifikasi primer OPA-03 pada nila merah Petani Bogor

Jumlah fragmen yang berbeda diakibatkan oleh frekuensi kemunculan alel yang berbeda dalam setiap lokus. Frekuensi kemunculan alel pada penggunaan primer OPA-03 ini berkisar antara 0,0000-1,0000. Frekuensi alel yang semakin besar mengindikasikan bahwa kemunculan fragmen semakin dominan pada lokus tertentu (monomorfik). Adanya fragmen yang spesifik (polimorfik) berpotensi untuk meningkatkan nilai heterozigositas, yang mengindikasikan semakin tingginya keragaman genetik.

Ukuran fragmen yang dihasilkan (200-1600 bp) hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Arifin *et al.* (2007) kisaran ukuran fragmen yang dihasilkan 275-1600 bp dengan menggunakan primer OPA-03. Pada ikan diskus ukuran fragmen yang muncul berkisar antara 200-1500 bp yang dihasilkan dengan menggunakan primer OPA-03 dan OPA-04 (Koh *et al.*, 1999). Menurut Liu *et al.* (1999) ukuran fragmen pada ikan berkisar antara 200-1500 bp.

Persentase polimorfisme berkisar antara 11,7647-41,1765% dan heterozigositas antara 0,0310-0,1722. Nilai polimorfisme dan heterozigositas tertinggi pada populasi nila BEST, kemudian Red NIFI, lokal Bogor, Merah Danau Lido, Merah petani, lokal Kuningan, Nirwana, dan terendah nila Gesit (Tabel 1).

Berdasarkan data yang diperoleh di atas, tingkat keragaman genetik ikan uji tergolong rendah jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian oleh Arifin *et al.* (2007) terhadap ikan nila hasil seleksi dengan menggunakan metode RAPD, dengan persentase polimorfisme berkisar antara 33,33-87,5% dan heterozigositas 0,0926-0,3542. Rendahnya tingkat keragaman genetik ini disebabkan karena ikan air tawar mempunyai tingkat migrasi yang lebih rendah sehingga peluang terjadinya persilangan dengan jenis dan ras lainnya juga semakin kecil (Kirpichnikov, 1981; Tave, 1991). Disamping itu rendahnya tingkat

keragaman genetik ini juga dikarenakan ikan uji yang digunakan (kecuali nila BEST) merupakan ikan koleksi yang belum banyak mengalami persilangan dengan jenis-jenis lainnya, sedangkan populasi nila BEST yang mempunyai tingkat keragaman genetik tertinggi dibanding populasi lainnya membuktikan bahwa pengaruh persilangan dapat meningkatkan tingkat keragaman genetik dari suatu populasi.

Tabel 1. Nilai polimorfisme dan heterozigositas delapan populasi ikan uji

No.	Populasi	Polimorfisme (%)	Heterozigositas
1.	BEST	41,1765	0,1722
2.	Nirwana	11,7647	0,0520
3.	Gesit	11,7647	0,0310
4.	Kuningan	17,6471	0,0421
5.	Bogor	35,2941	0,1028
6.	Red NIFI	35,2941	0,1337
7.	Lido	23,5294	0,0817
8.	Petani	17,6471	0,0533

Hasil analisis statistik dengan menggunakan uji  $F_{st}$  berpasangan menunjukkan perbedaan genetik secara nyata antar populasi kecuali antara populasi BEST dengan Gesit, Nirwana dengan Merah Danau Lido dan Merah petani, lokal Kuningan dengan lokal Bogor, serta Merah Danau Lido dengan Merah petani. Perbedaan yang nyata menunjukkan adanya perbedaan karakter genetik maupun asal-usul dari induknya.

Tabel 2. Nilai P dari uji  $F_{st}$  berpasangan dari delapan populasi ikan uji

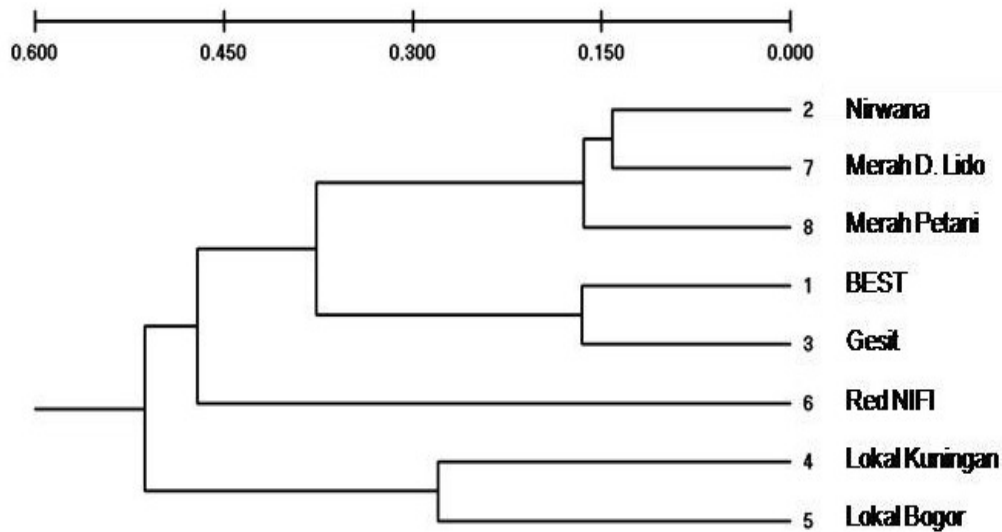
Populasi	BEST	Nirwana	Gesit	Kuningan	Bogor	RedNIFI	Lido	Petani
BEST	*****							
Nirwana	0,0019	*****						
Gesit	0,8360 <sup>@</sup>	0,0229	*****					
Kuningan	0,0000	0,0000	0,0000	*****				
Bogor	0,0215	0,0000	0,0001	0,4170 <sup>@</sup>	*****			
Red NIFI	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	*****		
Lido	0,0008	0,9998 <sup>@</sup>	0,0193	0,0000	0,0000	0,0012	*****	
Petani	0,0000	0,9970 <sup>@</sup>	0,0193	0,0000	0,0000	0,0000	0,9981 <sup>@</sup>	*****

Ket: @ = tidak berbeda nyata

Jarak genetik tertinggi antara populasi lokal Kuningan dengan Red NIFI dan terendah antara Nirwana dengan Merah Danau Lido (Tabel 3). Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik tersebut menunjukkan bahwa antara populasi Nirwana dengan Merah Danau Lido dan Merah petani terdapat hubungan kekerabatan yang dekat, demikian pula antara populasi nila BEST dan Gesit (Gambar 6). Kedekatan hubungan kekerabatan ini menunjukkan adanya kesamaan asal-usul induk. Jarak genetik merupakan ukuran perbedaan genetik antar famili yang dihitung berdasarkan frekuensi alel (Nei, 1987). Semakin kecil jarak genetik antar individu dalam satu famili, maka famili tersebut semakin seragam (Koh *et al.*, 1999).

Tabel 3. Jarak genetik delapan populasi ikan uji

Populasi	BEST	Nirwana	Gesit	Kuningan	Bogor	RedNIFI	Lido	Petani
BEST	*****							
Nirwana	0,3755	*****						
Gesit	0,1658	0,3622	*****					
Kuningan	0,3968	0,5445	0,4672	*****				
Bogor	0,3150	0,5070	0,4187	0,2797	*****			
Red NIFI	0,5128	0,4270	0,5631	0,6553	0,6169	*****		
Lido	0,3793	0,1414	0,3670	0,5841	0,5396	0,3941	*****	
Petani	0,4073	0,1627	0,3678	0,5599	0,5488	0,4570	0,1663	*****



Gambar 9. Dendrogram dari delapan populasi ikan uji

**Simpulan**

Persentase polimorfisme berkisar antara 11,7647-41,1765% dan heterozigositas antara 0,0310-0,1722, tertinggi pada populasi nila BEST, kemudian Red NIFI, Lokal Bogor, Merah Danau Lido, Merah petani, lokal Kuningan, Nirwana dan terendah nila Gesit. Terdapat perbedaan genetik secara nyata antar populasi kecuali antara populasi BEST dengan Gesit, Nirwana dengan Merah Danau Lido dan Merah petani, lokal Kuningan dengan lokal Bogor, serta Merah Danau Lido dengan Merah petani. Jarak genetik tertinggi antara populasi nila lokal Kuningan dan Red NIFI dan terendah antara populasi Nirwana dan Merah Danau Lido.

**Senarai pustaka**

Arifin, O.Z. 2005. Polimorfisme mtDNA keturunan pertama (F1) dalam seleksi famili ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di BPBI Wanayasa Jawa Barat. *Tesis*. IPB. Bogor. 43 p.

Arifin, O.Z. dan T. Kurniasih. 2007. Variasi genetik tiga populasi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan polimorfisme mt-DNA. *J. Ris. Akuakultur*, 2(1): 67-75.

Arifin, O.Z., E. Nugroho dan R. Gustiano. 2007. Keragaman genetik populasi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dalam program seleksi berdasarkan RAPD. Genetic variability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) population in selection program based on RAPD. *Berita Biologi*, 8(6): 465-471.

- Gustiano, R., Arifin, O.Z. dan Nugroho, E. 2008. Perbaikan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan seleksi famili. *Media Akuakultur*, 3(2): 98-106.
- Kirpichnikov, V.S. 1981. *Genetic based of fish selection*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 410 p.
- Koh, T.L., Khoo, G., Li Qun Fan, Phang, V.P.E. 1999. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of discus (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*, 173: 485-497.
- Leary, R.F., Allendorf, F.W. and Knudsen K.L. 1985. Development instability and high meristic counts in interspecific hybrid of salmonid fishes. *Evolution*, 39(6): 1318-1326.
- Liu, Z.J., Li, P. Argue, B.J., Dunham R.A. 1999. Random Amplified Polymorphic DNA Markers: Usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174: 59-68.
- Miller, M.P. 1997. Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) version 1.3. Department of biological science. Northern Arizona University, Arizona, USA, 30 p.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York. 512 p.
- Nugroho, E., Takagi, M, Taniguchi N. 1997. Practical manual on detection of DNA polymorphism in fish population study. Bulletin of marine sciences and fisheries, Kochi University. pp. 109-129.
- Nugroho, E. dan Maskur. 2002. Benarkah ikan nila merah adalah hasil hybrid? (melacak asal usul nila merah dengan menggunakan molecular genetic markers). *Warta penelitian perikanan Indonesia*, 8(1): 8-11.
- Nugroho, E., Widiyati, A., Kadarini, T. 2002. Keragaan genetik ikan nila GIFT berdasarkan polimorfisme mitokondria DNA D-loop. *J. Pen. Perik. Indonesia*. 8: 1-6.
- Nuryadi, O.Z. Arifin, Mulyasari, Gustiano, R. 2007. Evaluasi keragaan dan keragaman genetik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) hasil program seleksi berdasarkan karakter morfometrik dan DNA. Laporan Hasil Riset TA 2007 Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. pp. 94-110.
- Sudarto. 1990. Pengamatan elektroforesis terhadap ikan tilapia (*Oreochromis* sp). *Buletin Penelitian Perikanan Darat*, 9: 19-24.
- Tave, D. 1993. *Genetics for fish managers*. The AVI Publ. Comp. Inc. NY, USA, 418 p.
- Widiyati, A. 2003. Keragaman fenotipe dan genotipe (*Oreochromis niloticus*) dari Danau Tempe (Sulawesi Selatan) dan beberapa sentra produksi di Jawa Barat. *Tesis*. Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.