

Keragaman genetik ikan nilem (*Osteochilus sp.*) budi daya berdasarkan penanda *random amplified polymorphism* DNA

Muh. Nadjmi Abulias✉, Dian Bhagawati

Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman
Kampus UNSOED Karangwangkal Purwokerto 53122
e-mail : amie_star05@yahoo.co.id

Abstrak

Identifikasi molekuler telah dilakukan terhadap tiga macam ikan nilem yang dibudidayakan di Kabupaten Banyumas, dengan maksud untuk mendapatkan informasi tentang keragaman dan kekerabatan genetiknya, guna mendukung penelusuran status spesiesnya. Karakterisasi DNA dilakukan dengan teknik RAPD dan dari hasil seleksi terhadap 20 primer, hanya primer OPA-02 yang mampu menghasilkan amplifikasi terbaik. Hasil amplifikasi diperoleh 2 – 8 fragmen dengan ukuran berkisar antara 200 – 1000 bp. Di samping itu, diperoleh informasi bahwa ikan nilem mangut mempunyai nilai heterozigositas dan polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan dua jenis lainnya. Antara ikan nilem seruni dan nilem gunung menunjukkan kekerabatan yang lebih dekat dibandingkan antara nilem gunung dengan nilem mangut maupun antara nilem seruni dengan nilem mangut.

Kata kunci: keragaman genetik, *Osteochilus sp.*, RAPD.

Pendahuluan

Ikan nilem merupakan salah satu ikan ekonomis air tawar yang telah umum dibudidayakan oleh sebagian besar pembudidaya di wilayah Kabupaten Banyumas. Masyarakat di wilayah Kabupaten Banyumas selama ini mengenal tiga jenis ikan nilem (*Osteochilus sp.*) budi daya, yaitu nilem seruni, mangut, dan gunung. Antara ketiganya dapat dibedakan berdasarkan warna tubuhnya. Ikan nilem seruni berwarna coklat kehitaman dengan spot merah, nilem mangut berwarna hitam kehijauan dan nilem gunung berwarna kemerahan (Bhagawati *et al.*, 2009).

Ikan nilem hidup tersebar di berbagai perairan dan kehidupannya tidak terlepas dari pengaruh lingkungan, maka dimungkinkan struktur dan morfologinya akan menyesuaikan diri terhadap lingkungan sekitarnya. Hal ini memungkinkan munculnya variasi-variasi morfologi ikan. Perbedaan warna tubuh merupakan salah satu bagian dari karakter morfologi yang sangat penting untuk identifikasi. Menurut Yatim (1986), pola warna dasar pada individu bisa menjadi sangat penting untuk identifikasi karena merupakan karakter kualitatif yang diatur secara genetis dan sedikit sekali dipengaruhi lingkungan.

Umumnya karakter morfologi menggambarkan sebagian besar sifat genotif. Karakter morfologi sering digunakan untuk melengkapi dan menambah luas karakter lain. Untuk lebih memperjelas sebab perbedaan-perbedaan pada karakter morfologi, perlu digunakan karakter taksonomi lain seperti karakter molekuler, kromosom, tingkah laku dan lain-lain (Mayr & Ashlock, 1991).

Pada tingkatan molekuler, diperoleh informasi bahwa, tidak pernah terdapat dua individu yang memiliki karakter genetik yang persis sama, bahkan pada individu yang terlahir kembar sekalipun. Terdapat keragaman dalam tingkatan individu, populasi spesies, bahkan sampai pada tingkatan takson yang lebih tinggi. Keragaman bentuk, baik morfologik maupun molekuler ini dikenal dengan *polimorfisme*. Polimorfisme dapat dijadikan sebagai acuan untuk menelusuri keragaman suatu organisme dan responnya terhadap proses-proses evolusi yang dialami organisme itu di masa yang lalu dan memprediksi keadaan organisme ini pada masa yang akan datang (Solihin, 2005). Dinyatakan pula bahwa DNA sebagai sumber informasi dasar organisme tentunya memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi dibandingkan dengan molekul-molekul lainnya. Oleh karena itu, informasi yang dibawa oleh DNA relatif besar dan kompleks

serta memiliki peran sentral dalam ekspresi genetik yang dihasilkan, maka eksplorasi polimorfisme pada tingkat DNA sangat berarti.

Berkaitan dengan upaya mendapatkan informasi tentang karakter genetik tiga jenis ikan nilem budidaya tersebut, maka telah dilakukan karakterisasi DNA dengan metode *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD).

Bahan dan metode

Bahan yang dikaji adalah ikan nilem seruni, mangut dan nilem gunung hasil budidaya asal Kabupaten Banyumas. Bagian tubuh ikan yang diambil sebagai sampel adalah sirip dan pengambilan sampel dilakukan dengan kondisi ikan dalam keadaan hidup. Sampel sirip yang diperoleh disimpan dalam larutan alkohol PA 70% hingga dilakukan proses lebih lanjut.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Phenol-Chloroform (modifikasi Nugroho *et al.*, 2002). Potongan sirip seberat 5-10 mg, dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml yang telah berisi 500 ul larutan TNES urea, kemudian ditambahkan 10 ug/ml protein kinase dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 jam. Didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan larutan Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol sebanyak 1000 ul, disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru, ditambahkan 1000 ul larutan etanol 90% dan 10 ul larutan natrium asetat (CH₃COONa), divortex sampai terlihat adanya endapan putih. DNA diendapkan dengan cara mensentrifus campuran tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan DNA dikeringkan pada suhu kamar. DNA di simpan dalam 100 ul larutan Tris-EDTA (TE) buffer pada suhu 4°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

Primer yang digunakan dalam RAPD adalah OPA-01 sampai dengan OPA-20 (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) dan dilakukan seleksi terhadap 20 jenis primer tersebut, untuk memilih primer yang dapat memberikan hasil amplifikasi yang baik terhadap DNA target. Proses amplifikasi menggunakan metode *Polymerize Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi reaksi, yaitu: 10 ug DNA, 10 pmol primer dan “*pure taq DNA*” (Promega) dengan total volume keseluruhannya 25 ul. Siklus PCR yang digunakan dalam amplifikasi adalah satu siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit. 35 siklus penggandaan yang terdiri dari 94 °C selama 1 menit, 36°C selama 1 menit dan 72°C selama 2,5 menit. Satu siklus terakhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil PCR dipisahkan secara elektroforesis menggunakan gel agarose 2-3% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE) buffer dan diamati dengan illuminator (UV) serta didokumentasikan dengan kamera polaroid. Berdasarkan hasil visualisasi pita DNA yang diperoleh, kemudian dilakukan analisis perbandingan berpasangan Fst (Sokal and Rohlf, 1995) dan dihitung jarak genetik menurut Wright (1978) modifikasi dari Rogers (1972) dengan menggunakan program *Tools for Population Genetic Analysis* (TFPGA).

Hasil dan pembahasan

Seleksi yang telah dilakukan terhadap 20 jenis primer (OPA-01 sampai dengan OPA-20), menunjukkan bahwa hanya primer OPA-02 yang mampu memberikan hasil PCR terbaik. Primer OPA-02 mampu menghasilkan fragmen-fragmen yang dapat digunakan sebagai pembeda diantara ketiga jenis ikan

nilem tersebut. Primer OPA-02 menghasilkan amplifikasi dengan jumlah fragmen 2-8 dengan ukuran berkisar antara 200 – 1000 bp dan jumlah lokus sebanyak 15.

Karakterisasi genetik pada suatu populasi mencakup proporsi lokus polimorfik, jumlah rata-rata alel per lokus, heterozigositas, dan jarak genetik. Jarak genetik diukur atas dasar frekuensi alel rata-rata untuk semua lokus pada suatu populasi (Nei, 1978).

Berdasarkan atas pita-pita yang tervisualisasikan pada gel agarose dapat dihitung heterozigositas serta polimorfisme lokus pada ikan nilem seruni, mangut, dan gunung. Nilai heterozigositas dan polimorfisme yang dimiliki ketiga jenis ikan nilem hasil budidaya tersebut, tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Heterozigositas dan polimorfisme

No	Jenis ikan	Heterozigositas	Polimorfisme (%)
1.	Nilem seruni	0,0356	6,6667
2.	Nilem mangut	0,1778	33,3333
3.	Nilem gunung	0,1067	20,0000

Dari hasil yang tertera pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa diantara ketiga jenis ikan nilem tersebut, maka ikan nilem mangut memiliki nilai polimorfisme lokus yang tertinggi dan nilai yang diperoleh menggambarkan tingkat keragaman genetik ikan tersebut.

Untuk mengetahui perbedaan genetik diantara ketiga jenis ikan nilem budidaya tersebut, maka telah dilakukan uji perbandingan berpasangan F_{st} (Tabel 2). Hasil uji menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan genetik antara nilem seruni, nilem mangut serta nilem gunung. Hasil yang diperoleh mengindikasikan bahwa ketiga jenis ikan nilem budidaya tersebut kemungkinan merupakan spesies yang sama. Namun demikian, secara performa ketiga jenis ikan nilem tersebut terdapat perbedaan, sehingga kemungkinan ikan nilem gunung dan nilem seruni merupakan subspecies atau strain dari nilem mangut (*Osteochilus hasseltii*).

Tabel 2. Nilai P dari uji perbandingan berpasangan F_{st}

No	Jenis ikan	Nilem seruni	Nilem mangut	Nilem gunung
1.	Nilem seruni	-		
2.	Nilem mangut	1.0000	-	
3.	Nilem gunung	1.0000	1.0000	-

Hasil karakterisasi DNA ini juga memperkuat hasil karakterisasi morfologi dan dugaan yang dikemukakan oleh Bhagawati dan Abulias (2009), bahwa ikan nilem seruni, mangut dan nilem gunung, kemungkinan merupakan jenis yang berbeda. Hasil identifikasi yang diperkuat dengan hasil verifikasi dari laboratorium Iktiologi LIPI, diperoleh informasi bahwa ikan nilem seruni, mangut, dan nilem gunung tersebut, ketiganya merupakan anggota genus *Osteochilus*. Ikan nilem yang selama ini dikenal sebagai nilem mangut memiliki nama ilmiah *Osteochilus hasseltii* (Valenciennes, 1842), sedangkan untuk ikan nilem seruni dan nilem gunung belum diketahui nama speciesnya. Namun demikian, berdasarkan kunci identifikasi (Weber & de Beaufort, 1916; Roberts, 1989; Karnasuta, 1993; Kottelat *et al.*, 1993; Nelson,

1994), ikan nilem seruni termasuk dalam jenis *O. sarawakensis*, tetapi dari deskripsi spesies tidak semuanya cocok. Distribusi *O. sarawakensis* hanya di daerah pegunungan Sarawak, Malaysia, sedangkan ikan nilem gunung termasuk anggota genus *Osteochilus*, tetapi tidak masuk dalam kategori spesies apapun. Berdasarkan kunci identifikasi (Weber & de Beaufort, 1916; Roberts, 1989; Karnasuta, 1993; Kottelat *et al.*, 1993; Nelson, 1994), ikan nilem gunung mengarah ke *Osteochilus lini*. Namun dari deskripsi species, tidak semuanya cocok, karena pada *O. lini* terdapat spot di atas sirip dada serta di atas dan di bawah garis rusuk, sedangkan pada nilem gunung tidak memiliki tanda tersebut. Di samping itu, *O. lini* hanya dijumpai di Thailand.

Hasil perhitungan jarak genetik (D) berdasarkan fragmen RAPD dari primer OPA-02 yang dilakukan menurut Wright (1978) modifikasi dari Rogers (1972) dengan program TFGA, terangkum pada Tabel 3.

Tabel 3. Jarak genetik tiga jenis ikan nilem

No	Jenis Ikan	Nilem seruni	Nilem mangut	Nilem gunung
1.	Nilem seruni	-		
2.	Nilem mangut	0.2434	-	
3.	Nilem gunung	0.1491	0.2277	-

Jarak genetik yang tersaji pada Tabel 3 menunjukkan bahwa jarak terjauh adalah antara ikan nilem mangut dengan nilem seruni yaitu sebesar 0,2434, kemudian antara ikan nilem mangut dengan ikan nilem gunung yaitu 0,2277. Jarak genetik terdekat adalah antara ikan gunung dengan ikan nilem seruni yaitu 0,1491. Keadaan ini menunjukkan bahwa antara ikan nilem gunung dengan nilem seruni memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dibanding antara ikan nilem mangut dengan nilem gunung maupun antara nilem seruni dengan nilem mangut.

Adanya dugaan bahwa ketiga jenis ikan nilem budidaya tersebut merupakan subspecies atau strain yang berbeda, masih perlu didukung oleh kajian yang lebih mendalam dari berbagai aspek agar dapat memperkaya informasi untuk penelusuran status spesiesnya.

Simpulan

1. Tidak terdapat perbedaan karakter genetik pada ketiga jenis ikan nilem budidaya asal Kabupaten Banyumas dan ikan nilem mangut memiliki nilai keragaman genetik tertinggi.
2. Ikan nilem gunung dengan nilem seruni memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dibanding antara ikan nilem mangut dengan nilem gunung maupun antara nilem seruni dengan nilem mangut.

Persantunan

Penulis mengucapkan terima kasih yang mendalam kepada DP2M DIKTI selaku penyandang dana penelitian STRANAS BATCH IV, yang dilaksanakan sesuai dengan Surat Perjanjian Kerja Penelitian Nomor: 4453.6/H23.6/PL/2009, tanggal 6 Agustus 2009. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ibu Iskandariyah SP., atas bantuan serta kerjasamanya dan para penelaah atas masukan yang diberikan untuk perbaikan naskah ini.

Senarai pustaka

- Bhagawati, Abulias D. M. N., dan Nuryanto A. 2009. Penelusuran status species tiga jenis ikan nilem hasil budi daya di Kabupaten Banyumas berdasarkan karakter morfologi. Makalah disampaikan pada Seminar Nasional III Taksonomi Fauna Indonesia dan Kongres II MTFI, LIPI, Cibinong Bogor, 10-11 November 2009
- Karnasuta, J. 1993. Systematic revision of Southeastern Asiatic cyprinid fish genus *Osteochilus* with description of two new species and a new subspecies. *Kasetsart University Fishery Research Bulletin* no.19.
- Kottelat, M., Whitten T., Kartikasari S. N. & Wirjoatmodjo S. 1993. *Freshwater fishes of Western Indonesia & Sulawesi*. Periplus Edition, EMDI Project
- Mayr, E. & Ashlock P. D. 1991. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, Inc., New York, San Fransisco, New Delhi, Singapore, Paris, Sydney, Tokyo, Toronto
- Nugroho, E., Widiyati A., Imron & Kadarini K. 2002. Keragaan genetik ikan nila gift berdasarkan polimorfisme mitokondria DNA D-L-Loop. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 8(3): 1-6
- Nei, M. 1978. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the world*. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. NY, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Roberts, T. 1989. *The freshwater fishes of western Borneo*. The California Academy of Sciences, USA.
- Solihin, D. D. 2005. *Prinsip-prinsip dalam teknologi biologi molekuler*. Modul Pelatihan Singkat Teknik Biologi Molekuler. Pusat Studi Ilmu Hayati, IPB. Bogor.
- Weber, M. & de Beaufort, L. F. 1916. *The fishes of the Indo-Australian Archipelago III*. E.J Brill, Leiden.
- Yatim, W. 1986. *Genetika dasar*. Penerbit Transito. Bandung