

**KERAGAMAN GENETIK IKAN SEMAH (*Tor tambroides* BLEKER 1854)
DI SUNGAI MANNA, BENGKULU DAN SUNGAI SEMANKA, LAMPUNG**

***GENETIC DIVERSITY OF MASHER (*Tor tambroides* BLEKER 1854) IN
MANNA RIVER, BENGKULU AND SEMANKA RIVER, LAMPUNG***

Arif Wibowo

Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum, Palembang

Teregistrasi I tanggal: 2 April 2012; Diterima setelah perbaikan tanggal: 9 Agustus 2012;

Disetujui terbit tanggal: 10 Agustus 2012

ABSTRAK

Ikan semah adalah ikan air tawar Indonesia yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan jarang ditemukan, hidup di hulu sungai dengan kondisi perairan yang jernih dan kebutuhan oksigen tinggi. Untuk mempertahankan keberlanjutan ikan semah diperlukan informasi keragaman genetik sampai pada penanda molekuler. Molekul DNA dapat berfungsi menjadi penanda molekuler yang mampu mengidentifikasi perbedaan genetik langsung pada level DNA sebagai komponen genetik. Penelitian tentang keragaman genetik ikan semah dilakukan pada tahun 2011 di Sungai Manna, Bengkulu dan Sungai Semanka, Lampung. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui keragaman genetik dan penanda molekuler ikan semah dari Sungai Manna, Bengkulu dan Sungai Semanka, Lampung. Contoh diambil secara acak, darah dan jaringan otot ikan semah dari masing-masing spesimen dikoleksi dan diekstraksi menggunakan "Geneaid DNA ekstraksi kit". Bagian gen mtDNA yang digunakan adalah gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI). Analisis keragaman genetik yang meliputi penanda genetik dan hubungan kekerabatan ikan semah berdasarkan runutan nukleotida dan asam amino, dilakukan menggunakan program MEGA versi 4.0 dengan metode *bootstrapped Neighbor Joining* dengan 1000 kali pengulangan. Hasil penelitian menunjukkan komposisi basa nukleotida untuk ikan semah dari Sungai Manna dan Semanka mengidentifikasi 4 situs nukleotida yang bervariasi dan semuanya *parsimoni informatif*. Basa nukleotida dari gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) dapat dijadikan penanda genetik spesifik antara ikan semah, spesies *Tor tambroides* dengan genus *Tor* yang lain. *Tor tambroides* yang berasal dari Bengkulu dan Lampung (Indonesia) juga memiliki basa nukleotida spesifik yang membedakannya dengan *Tor tambroides* dari luar Indonesia, bahkan bisa menjadi penanda genetik spesifik lokasi Bengkulu dan Lampung.

KATA KUNCI : Keragaman genetik, *Tor tambroides*, Sungai Manna & Semanka, Bengkulu dan Lampung

ABSTRACT:

*Masher is Indonesian fresh water fish species, has a high economic value and is rarely found in nature. This species inhabit river upstream with clear water conditions and has high oxygen demand. In order to maintain the sustainability of masher fish information on the genetic diversity include molecular markers is required. DNA molecules can also serve as molecular markers that can identify genetic differences directly at the level of DNA as a genetic component. Research on the genetic diversity of masher fish was conducted in 2011 at the Manna River, Bengkulu and Semanka River, Lampung. The research objective was to determine the genetic diversity and molecular markers of masher fish from Manna River, Bengkulu and Semanka River, Lampung. Samples were collected at random, blood and muscle tissue of each specimen was collected and extracted using the "Geneaid DNA extraction kit". The parts of mtDNA used is gene cytochrome oxidase subunit gene is I (COI). Analysis of genetic diversity, including genetic markers and kinship relations based on the sequence of nucleotide and amino acid from the collected masher fish, was conducted using the MEGA program version 4.0 with bootstrapped Neighbor Joining method with 1000 repetitions. The results showed that nucleotide base composition of masher fish from Manna and Semanka river identified four variable nucleotide sites and all parsimony informative. Nucleotide bases of the gene cytochrome oxidase subunit I (COI) can serve as specific genetic markers between masher fish species, genus *Tor* spp with others. *Tor Tambroides* from Bengkulu and Lampung (Indonesia) also have has a specific nucleotide bases that distinguish them from *Tor tambroides* outside Indonesia, moreover it can be location-specific genetic markers from Bengkulu and Lampung.*

KEYWORDS: Genetic diversity, *Tor tambroides*, Manna & Semanka River, Bengkulu & Lampung

Korespondensi penulis:

Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum

Jl. Beringin No. 308, Mariana Palembang, Sumatera Selatan, Email : wibarf@yahoo.com

PENDAHULUAN

Ikan semah (*Tor tambroides*) digolongkan dalam ikan cyprinid, hidup di hulu sungai dengan kondisi perairan yang jernih dan kebutuhan oksigen tinggi. Ikan ini adalah salah satu ikan air tawar Indonesia yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan sudah jarang ditemukan di alam (Nurdawati *et al.*, 2007). Kerabat ikan sapan (*Tor spp.*) di dunia telah diketahui sebanyak 20 jenis yang tersebar di kawasan Asia, sedangkan di Indonesia terdapat empat jenis, yaitu: *Tor tambroides* Blkr., *T. tambra* (C.V.), *T. douronensis* (C.V.), dan *T. soro* (C.V.). Sinonim dari genus *Tor* adalah *Labeobarbus*; untuk membedakan keempat jenis kerabat ikan tambra yang berasal dari Indonesia sementara ini masih berdasarkan ada tidaknya cuping pada bibir bawah dan ukuran cuping itu sendiri (Roberts, 1999).

Tor tambroides memiliki penyebaran yang luas di Pantai Barat Sumatera (Lampung dan Bengkulu) (Wibowo *et al.*, 2012) dan sangat potensial untuk dikembangkan dimasa yang akan datang, namun demikian informasi tentang ikan ini masih terbatas. Haryono (2006) menginformasikan aspek biologi ikan semah (*Tor tambroides*), selanjutnya Haryono & Tjakrawidjaja (2006) mengidentifikasi kerabat ikan semah berdasarkan karakter morfologi, penelitian yang terkait aspek keragaman genetik dan penanda molekuler belum pernah dilakukan. Informasi data runutan basa nukleotida yang ada untuk ikan semah (*Tor tambroides*) baru terbatas pada ikan semah dan kerabatnya yang ada di luar Indonesia (Yang *et al.*, 2010; Lakra & Verma, 2008; Sade & Biun, 2011).

Keragaman genetik memiliki pengertian keragaman struktur maupun fungsi dari kehidupan pada tingkat komunitas dan ekosistem, populasi, spesies dan molekul DNA. Molekul DNA dapat pula berfungsi menjadi penanda molekuler yang mampu mengidentifikasi perbedaan genetik langsung pada level DNA sebagai komponen genetik. Karakteristik penanda molekuler ini dapat menanggulangi keterbatasan penggunaan penanda morfologi karena penanda ini bebas dari pengaruh-pengaruh epistasi, lingkungan dan fenotipe, sehingga dapat menyediakan informasi yang lebih akurat (Muladno, 2006).

Informasi keragaman genetik dan penanda genetik dapat diperoleh dengan melakukan analisis terhadap sekuense mtDNA. Hal ini karena mtDNA bersifat maternal dan diturunkan oleh parentalnya tanpa rekombinasi (Harrison, 1989; Amos & Hoelzel, 1992), molekulnya kompak dan ukuran panjangnya relatif pendek (antara 16000–20000 nukleotida), tidak sekompleks DNA inti

sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan utuh. Kecuali itu mempunyai tingkat evolusi yang tinggi (5-10 kali lebih besar dari DNA inti) sehingga dapat memperlihatkan dengan jelas perbedaan antar populasi dan hubungan kekerabatan (Brown *et al.*, 1979; Brown, 1983). mtDna memiliki jumlah copy yang besar antara 1000-10000 serta lebih cepat dan mudah untuk mendapatkan hasil dari jaringan yang telah diawetkan sebelumnya (Brown, 1983).

Gen penyandi protein dari DNA mitokondria adalah bagian yang sering digunakan untuk mendapatkan informasi keragaman genetik dan sebagai penanda genetik suatu spesies. Diantara gen penyandi protein yang sering digunakan untuk mempelajari keragaman genetik adalah gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)*. Selain itu, *Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* dapat pula digunakan sebagai penanda genetik untuk mempelajari keragaman jenis dan hubungan kekerabatan diantara kelompoknya (intraspesies) maupun kelompok lainnya (interspesies) (Ping *et al.*, 2007).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui keragaman genetik dan penanda molekuler ikan semah dari Sungai Manna, Bengkulu dan Sungai Semanka, Lampung. Informasi ini sangat diperlukan untuk memberikan arah bagi upaya konservasi maupun domestikasinya untuk mempertahankan keberlanjutan ikan semah.

BAHANMETODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada tahun 2011 dengan lokasi pengambilan sampel di Sungai Manna, Bengkulu dan Sungai Semanka, Lampung (Tabel 1 dan Gambar 1).

Analisis keragaman genetik ikan semah berdasarkan gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* dilakukan di laboratorium Biologi molekuler, Departemen Biosains Hewan.

Ikan semah di tangkap dengan menggunakan pancing, tajur dan jaring dengan ukuran mata jaring 0,75 inci (untuk juvenil) dan 2 inci (untuk dewasa). Tahap penelitian keragaman genetik, sampel otot dan darah ikan semah diawetkan dengan alkohol absolut, selanjutnya sampel tersebut dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi dan purifikasi DNA totalnya. Jumlah sampel untuk setiap stasiun sampling dan data runutan nukleotida yang diperoleh dari *Genebank* secara detail terlihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Stasiun pengambilan contoh ikan
 Table 1. Sampling stations

No	Stasiun	No	Stasiun
1	Kerinjing, Bengkulu (04 ⁰ 07.054'S, 103 ⁰ 05.529'E)	6	Air Sebilo, Bengkulu (04 ⁰ 23.800'S, 102 ⁰ 57.936'E)
2	Air Tenam, Bengkulu (04 ⁰ 15.856'S, 103 ⁰ 03.771'E)	7	Kotabumi, Bengkulu (04 ⁰ 22.541'S, 102 ⁰ 7.752'E)
3	Batu Aji, Bengkulu (04 ⁰ 15.188'S, 103 ⁰ 00.033'E)	8	Kutopadang, Bengkulu (04 ⁰ 28.122'S, 102 ⁰ 55.600'E)
4	Merabung, Bengkulu (04 ⁰ 07.226'S, 103 ⁰ 01.597'E).	9	Melebuy, Lampung (05 ⁰ 08.926'S, 104 ⁰ 14.870'E)
5	Bandar Agung, Bengkulu (04 ⁰ 20.282'S, 102 ⁰ 57.306'E).		



Gambar 1a. Stasiun pengambilan contoh di Sungai Manna (Husnah et al., 2012)
 Figure 1a. Sampling station in Manna River (Husnah et al., 2012)



Gambar 1b. Stasiun pengambilan contoh di Sungai Semangka (Husnah et al., 2012)
 Figure 1b. Sampling station in Semangka River (Husnah et al., 2012)

Tabel 2. Daftar contoh yang digunakan dalam penelitian
 Table 2. List of samples used in this study

Jenis (Species)	Lokasi (Location)	Jumlah (Number)
<i>Tor tambroides</i>	Kerinjing, Air Tenam, Batu Aji, Merabung, Bandar Agung, Air Sebilo, Kotabumi, Kutopadang (Bengkulu) dan Melebuy (Lampung) JQ665787 – JQ665837 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	37
<i>Tor duorensis</i>	Genbank kode akses HM536923 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1
	Genbank kode akses JM646100.1(www.ncbi.nlm.nih.gov)	2
	Genbank kode akses JM646100.3(www.ncbi.nlm.nih.gov)	
<i>Tor tor</i>	Genbank kode akses EU714115.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1
<i>Tor malabaricus</i>	Genbank kode akses HM585024.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1
<i>Tor putitora</i>	Genbank kode akses GQ469826.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1
<i>Tor macrolepis</i>	Genbank kode akses GQ469832.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1
<i>Tor khudree</i>	Genbank kode akses GQ469796.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1
<i>Tor sinensis</i>	Genbank kode akses HM536900.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov)	1

Isolasi, Ekstraksi dan Purifikasi DNA Total

Ekstraksi DNA menggunakan *Genomic DNA mini kit for blood (Geneaid)* yang dimodifikasi. Bagian yang dimodifikasi adalah dalam penghancuran jaringan, penambahan SDS dan Proteinase K (Muladno, 2006). Sel-sel darah ikan semah yang disimpan dalam alkohol 70% dicuci dengan air destilata (*molecular grade*) sebanyak dua kali kemudian disuspensikan dalam bufer STE (NaCl 1M, Tris-HCL 10mM, EDTA 0.1mM, pH 8) hingga volume 350 µl. Sel-sel darah dilisis (dipecah/dikeluarkan) dengan SDS 1% dan proteinase K 0.125 mg/ml pada suhu 55°C selama 2 jam sambil dikocok perlahan dalam *rotary*. Untuk jaringan, sebelum dicuci dengan air destilata, otot ikan semah diambil dalam bentuk potongan kecil dan di cacah halus untuk mempermudah melisis sel otot. Sampel otot yang sudah diperlakukan dengan SDS 1% dan proteinase K 0.125 mg/ml dihomogenasi dengan *rotary* dan diinkubasi pada suhu 55°C selama semalam. Metode ekstraksi DNA selanjutnya mengikuti petunjuk *Genomic DNA mini kit for fresh blood (Geneaid)* (Petunjuk perusahaan). Sampel DNA yang didapat, disimpan pada suhu 4°C

Amplifikasi dan Visualisasi Fragmen mtDNA

Amplifikasi sebagian fragmen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* mtDNA menggunakan primer universal Ivanova *et al.* (2009) COI F (5' – TCT ACC AAC CAC AAA GAC ATC GG 3') dan COI R (5' – TAC TTC TGG GTG TCC RAA GAA TCA 3'). Komposisi reaksi PCR dilakukan dengan volume akhir 50 µl terdiri atas sampel DNA 5 µl, DW steril 16 µl, primer masing-masing 2 µl dan *Taq ready mix* 25 µl. Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin *thermocycler BIOER* dengan kondisi sebagai berikut: tahap pradenaturasi 95°C selama 10 menit, tahap kedua yang terdiri dari 30 siklus yang masing-masing mencakup tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 48°C selama 1 menit, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 1,5 menit dan tahap terakhir yaitu pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72 °C selama 7 menit. Produk PCR diuji menggunakan PAGE 6% dalam bufer 1x TBE (10 Mm Tris-HCL, 1 M asam borat, dan EDTA 0.1 Mm) yang dijalankan pada kondisi 200 Mv selama 50 menit. Selanjutnya DNA diwarnai dengan pewarnaan sensitif perak (Tegelstrom, 1986).

Amplifikasi dan Visualisasi Fragmen mtDNA

DNA produk *PCR* dipurifikasi dengan kit purifikasi, kemudian digunakan sebagai cetakan untuk perunutan. Amplifikasi untuk perunutan menggunakan primer universal Ivanova *et al.* (2009) dengan kondisi *PCR* yaitu *pra PCR* (denaturasi) dengan suhu 95°C selama 10 menit; *PCR*: denaturasi dengan suhu 94°C selama 1 menit, penempelan dengan suhu 48°C selama 1 menit,

pemanjangan dengan suhu 72°C selama 1,5 menit (sebanyak 35 siklus) dan *post PCR* dengan suhu 72 °C selama 7 menit.

Perunutan sampel DNA dengan kit perunutan DNA, menggunakan mesin perunut DNA otomatis *Bio Trace 3100* (USA). Semua pekerjaan ini dilakukan pada dua arah (*forward* dan *reverse*) di kerjakan di Macrogen, Korea Selatan (www.macrogen.com). Akhirnya sekuense setiap spesimen ikan semah dari Sungai Manna dan Sungai Semangka disimpan di dalam *GenBank* dengan kode akses JQ665787 - JQ665823.

Analisis Data Keragaman Genetik

Sisi homolog dari runutan-runutan basa nukleotida maupun runutan asam amino gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* DNA mitokondria ikan semah yang diperoleh, kemudian disejajarkan (*multiple alignment*) yang dibandingkan dengan runutan-runutan gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* kerabat semah (*Tor*) dari *Genbank* yang utuh maupun parsial. Runutan asam amino diterjemahkan mengikuti kode genetik DNA mitokondria untuk vertebrata.

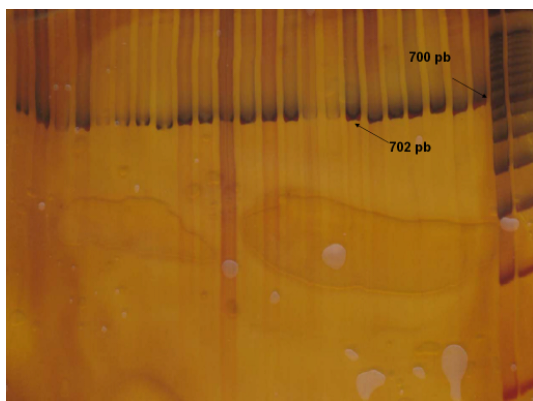
Analisis keragaman genetik yang meliputi penanda genetik dan hubungan kekerabatan ikan semah berdasarkan runutan nukleotida dan asam amino, dilakukan menggunakan program *MEGA* versi 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) dengan metode *Bootstrapped Neighbor Joining* dengan 1000 kali pengulangan.

HASIL DAN BAHASAN

HASIL

Jenis ikan semah yang diperoleh dari Sungai Manna, Bengkulu dan Sungai Semangka, Lampung adalah *Tor tambroides* (hanya satu jenis). DNA total telah diisolasi dari cuplikan otot semua jenis ikan semah tersebut. Hasil isolasi DNA total ikan semah digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* DNA mitokondria dengan teknik PCR. Amplifikasi gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* menghasilkan fragmen gen COI berukuran 654 pb pada semua spesimen ikan semah. Profil DNA hasil amplifikasi disajikan pada Gambar 2.

Runutan DNA diperoleh dari hasil penjajaran berganda yaitu sepanjang 654, pada posisi 5559 – 6212 pb berdasarkan acuan *Genbank*. Dari 218 asam amino hasil translasi 654 nukleotida pada gen COI parsial *Tor spp*, terdiri dari 209 situs asam amino bersifat kekal, 5 situs asam amino bersifat variabel yang terdiri dari 1 situs asam amino parsimoni informasif dan 4 situs asam amino sinonimous.



Gambar 2. Profil DNA *Tor tambroides* hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer COI F dan COI R.

Figure 2. DNA profile of *Tor tambroides* amplicon using COI F and COI R primer.

Analisa komposisi basa nukleotida untuk ikan semah dari Sungai Manna dan Sungai Semanka mengidentifikasi 4 situs nukleotida yang bervariasi dan semuanya parsimoni informatif (sebuah karakter jika terdapat 2 atau lebih state yang berbeda, dan masing-masing state tersebut terdapat pada 2 atau lebih siku/gen/organisme yang sedang diuji). (Tabel 3). Komposisi empat basa nukleotida dari 654 nukleotida gen COI yang mentranslasikan 218 asam amino secara keseluruhan, rata-rata nukleotida *Timin* adalah yang paling banyak ditemukan (29,2%), sedangkan rata-rata yang paling sedikit ditemukan adalah *Guanin* (17,4%). Rata-rata komposisi basa nukleotida *Adenin+Timin* secara keseluruhan pada *Tor* adalah lebih banyak (55,4%) daripada rata-rata *Guanin+Cytosin* (45,5%).

Tabel 3. Situs basa nukleotida sebagai penanda genetik pada gen COI parsial (654 nt) yang membedakan ikan semah dan kerabatnya

Table 3. Base site of nucleotide as genetic marker using parsial Gen COI (654 nucleotide) distinguished masher and its relatives

Jenis Species	Basa nukleotida/nucleotide Base								
	270 (5828)	324 (5882)	342 (5900)	474 (6032)	495 (6053)	546 (6104)	552 (6110)	576 (6134)	591 (6149)
<i>Tor soro</i> (GenBank)	A	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor malabaricus</i> (GenBank)	A	G	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor putitora</i> (GenBank)	A	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor macrolepis</i> (GenBank)	A	A	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor khudree</i> (GenBank)	A	G	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor sinensis</i> (GenBank)	A	G	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor duoronensis</i> (GenBank)	A	G	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor duoronensis</i> (Malaya/GB)	A	G	T	T	T	G	T	T	C
<i>Tor tambroides</i> (GenBank)	A	A	T	T	T	G	T	T	T
<i>Tor tambroides</i> (Bengkulu 1-25 spesimen)	A	A	T	C	T	A	C	C	T
<i>Tor tambroides</i> (Bengkulu 2-12 spesimen)	G	A	T	C	C	A	C	C	T
<i>Tor tambroides</i> (Lampung- 2 spesimen)	A	G	C	C	T	A	C	C	T

Keterangan: Angka dalam tanda kurung () = urutan berdasarkan gen COI utuh ikan data GenBank.

Remarks: Figures in parentheses () = COI gene sequences based on the complete GenBank fish data

Berdasarkan posisi kodon, komposisi basa nukleotida pada posisi pertama triplet kodon, frekwensi yang paling banyak ditemukan adalah nukleotida *Guanin* (31,2%), sedangkan nukleotida *Adenin* mempunyai frekwensi yang paling sedikit yaitu 23,8%. Komposisi pada posisi kedua dari triplet kodon, frekwensi yang paling banyak ditemukan adalah nukleotida *Timin* (41,7%), sedangkan yang paling sedikit ditemukan adalah nukleotida *Guanin* (14,7%). Komposisi pada posisi ketiga triplet kodon, frekuensi yang paling banyak ditemukan adalah nukleotida *Adenin* (40,4%), sedangkan yang paling sedikit ditemukan adalah

nukleotida *Guanin* (6,4%). Keragaman terbesar komposisi basa nukleotida dari keseluruhan triplet kodon gen COI ikan semah terletak pada posisi kodon ketiga.

Dari 654 nukleotida gen COI ikan semah (*Tor tambroides*) dari Sungai Manna dan Semanka yang dibandingkan dengan data GenBank, beberapa basa nukleotida dapat dijadikan penanda genetik untuk membedakan ikan semah Indonesia dengan ikan semah dan kerabat ikan semah dari luar Indonesia (Tabel 3). Basa nukleotida yang dapat membedakan spesies *Tor*

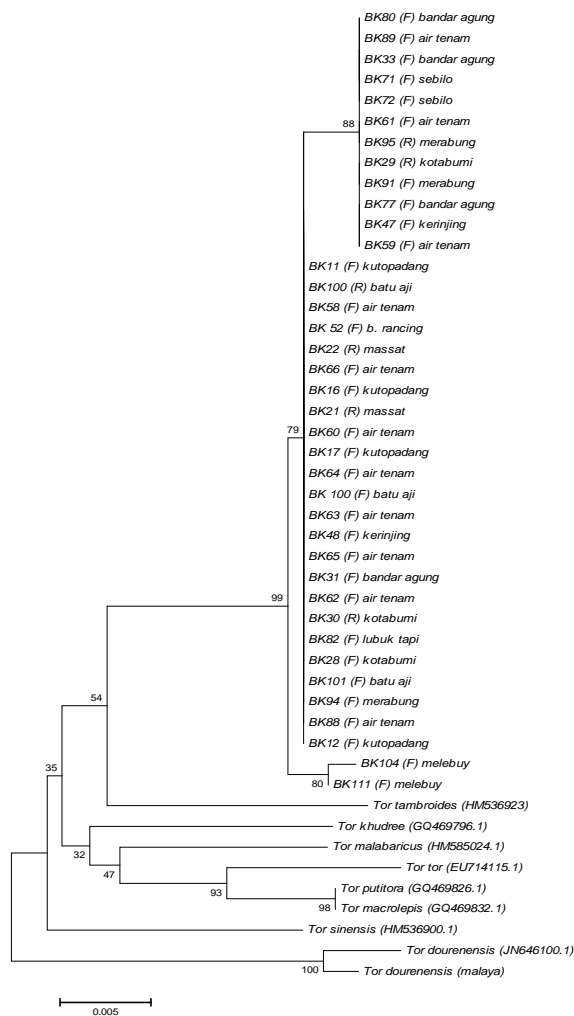
tambroides dengan kerabatnya adalah *Timin* yang berada pada posisi ke-591, untuk *Tor tambroides* yang berasal dari Bengkulu dan Lampung (Indonesia) secara spesifik memiliki penanda genetik *Cytocin* pada posisi basa nukleotida ke-474, 552 dan 576 dan basa nukleotida *Adenin* pada posisi ke-546 (Tabel 3). Semua sampel *Tor tambroides* asal Bengkulu (37 spesimen), memiliki penanda genetik *Timin* pada posisi basa nukleotida ke-342 dan basa nukleotida *Guanin* (270) dan *Cytosin* (495) yang merupakan variasi genetik penanda spesifik lokasi Bengkulu (ditemukan pada 12 spesimen). *Tor tambroides* asal Lampung memiliki penanda genetik *Cytosin* pada posisi basa nukleotida ke-342 dan memiliki penanda spesifik Indonesia asal Lampung, yaitu basa nukleotida *Guanin* pada posisi ke-324.

Rekonstruksi hubungan kekerabatan dari runutan basa nukleotida semah dan kerabatnya tersebut disajikan pada Gambar 3. Hasil filogram berdasarkan nukleotida gen COI memperlihatkan bahwa intraspesies ikan semah dari Sungai Manna dan Sungai Semanka masing-masing secara garis besar membentuk satu hubungan kekerabatan yang didukung oleh nilai *bootstrap* 99%. Kelompok ini memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *Tor tambroides*, di dukung dengan nilai *bootstrap* 54%. Hal ini dapat diartikan bahwa ikan semah yang digunakan dalam penelitian ini yang berasal dari Sungai Manna dan Semanka secara jelas merupakan spesies *Tor tambroides*.

BAHASAN

Pada ikan semah (*Tor tambroides*), perubahan asam amino yang terjadi sebagian besar adalah bersifat substitusi *silet*, sehingga pengamatan melalui asam amino tidak dapat mendeteksi adanya penanda genetik ikan semah asal Indonesia, asam amino hanya dapat dijadikan sebagai penanda genetik diantara kerabat semah walaupun tidak spesifik. Kondisi ini menurut Nei & Kumar (2000) karena adanya substitusi nukleotida yang dapat menyebabkan perubahan asam amino atau bersifat non sinonimous, namun ada pula yang tidak menyebabkan perubahan asam amino didalam hasil translasinya atau bersifat sinonimous. Oleh karena substitusi yang bersifat sinonimous lebih banyak terjadi daripada substitusi non sinonimous, atau dengan kata lain tidak semua substitusi nukleotida akan menyebabkan perubahan asam amino, maka lebih baik menggunakan basa nukleotida sebagai penanda genetik.

Ikan semah dari Sungai Manna dan Sungai Semanka memiliki nilai *Guanin* yang rendah, nilai *Guanin* yang rendah, umum ditemukan pada DNA mitokondria ikan (Doadrio *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2004). Rata-rata komposisi basa nukleotida *Adenin+Timin* secara keseluruhan pada *Tor* adalah lebih banyak daripada rata-rata *Guanin+Cytosin*, komposisi basa nukleotida *Adenin+Timin* yang lebih banyak daripada *Guanin+Cytosin* juga ditemukan oleh Ketmaier *et al.* (2004). Keragaman terbesar komposisi basa nukleotida dari keseluruhan triplet kodon gen COI ikan semah terletak pada posisi kodon ketiga. Peng *et al.* (2004), Ketmaier *et al.* (2004), Doadrio & Perdices (2005) juga mendapatkan keragaman terbesar pada posisi kodon ketiga dari keseluruhan kodon gen penyandi protein pada DNA mitokondria. Substitusi sinonim seringkali terjadi di basa ke-1 dan ke-3 setiap kodon, sedangkan substitusi nonsinonim sering terjadi di basa ke-2 (Kumar & Nei, 2000). Substitusi nukleotida pada *protein coding region* yang menghasilkan kodon berbeda tetapi penyusun protein yang sama disebut dengan substitusi sinonim, sedangkan apabila menghasilkan kodon berbeda dan menyusun protein yang berbeda pula maka disebut substitusi nonsinonim.



Gambar 2. Filogram *bootstrapped Neighbor Joining* 1000 kali pengulangan berdasarkan 654 nukleotida gen COI ikan semah dan kerabat pembandingnya dari *Genbank*.

Figure 2. *Joining neighbor Filogram bootstrapped 1000 times based on 654 nucleotides repetition based on COI gene masher fish and its comparison relative from Genbank.*

Basa nukleotida COI dapat digunakan sebagai penanda genetik spesifik ikan semah. Penanda molekuler dapat diandalkan dan memiliki hasil yang konsisten untuk identifikasi diantara spesies (Ryan & Esa, 2006) dan tingkat keragaman genetik (Vrijenhoek, 1998). Lebih jauh, Smith & Wayne (1996) and Nguyet *et al.* (2006), mengatakan bahwa aplikasi teknik molekuler (seperti DNA sekuensing) menyediakan pemahaman baru dan yang lebih mendalam tentang taksonomi, struktur populasi dan manajemen dan konservasi *Tor tambroides*. Gen penyandi protein berdasarkan posisi kodon, memiliki region yang kekal (*conserve*) dan region yang beragam (Farias *et al.*, 2001). Region yang *conserve* dapat dijadikan sebagai penanda genetik (*barcoding*) untuk mengidentifikasi keaslian genetik suatu jenis secara akurat dan juga sebagai *barcoding* untuk mengetahui daerah asal suatu spesies; sedangkan region yang beragam dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan.

KESIMPULAN

1. Analisa komposisi basa nukleotida untuk ikan semah dari Sungai Manna dan Semangka mengidentifikasi 4 situs nukleotida yang bervariasi dan semuanya *parsimoni informatif*.
2. Basa nukleotida dari gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) dapat dijadikan penanda genetik spesifik antara ikan semah, spesies *Tor tambroides* dengan genus *Tor* yang lain. *Tor tambroides* yang berasal dari Bengkulu dan Lampung (Indonesia) juga memiliki basa nukleotida spesifik yang membedakannya dengan *Tor tambroides* dari luar Indonesia, bahkan bisa menjadi penanda genetik spesifik lokasi Bengkulu dan Lampung.

DAFTAR PUSTAKA

- Amos, B & A.R, Hoelzel. 1992. Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biological Conservation* 6. p. 133-144.
- Brown, W. M., M. George & A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 76: p. 1967-71.
- Brown, W.M. 1983. *Evolution of animal mitochondrial DNA*, pp 62-88. In: M. Nei & R.K. Koehn (eds). *Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Doadrio, I., J.A. Carmona & A. Machordom. 2002. Haplotype diversity and phylogenetic relationships among the Iberian Barbels (*Barbus*, Cyprinidae) reveal two evolutionary lineages. *J Hered.* 93:140-147.
- Farias, I.P., G. Orti, I. Sampaio, H. Schneider & A. Meyer. 2001. The Cytochrome b gene as phylogenetic marker:

the limits of resolution for analyzing relationships among Cichlid fishes. *J Mol Evol.* 53:89-103.

- GenBank. 2010. *Genomes*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (14 Februari 2012).
- Haryono. 2006. Aspek biologi ikan tambra (*Tor tambroides* Blkr.) yang eksotik dan langka sebagai dasar domestikasi. *Biodiversitas.* 7 (2): 195-198.
- Haryono & A.H. Tjakrawidjaja. 2006. Morphological study for identification improvement of tambra fish (*Tor spp.*: Cyprinidae) from Indonesia. *Biodiversitas.* 7 (1): 59-62.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Evolution and Ecology.* 4. p. 6-11.
- Ketmaier, V., P.G. Bianco, M. Cobolli, M. Krivokapic, R. Caniglia & E. De Matthaesis. 2004. Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae Cyprinids (*Telestes* and *Sardinius*) from the Peri-Mediterranean area based on Cytochrome-b data. *Mole Phylogenet Evol.* 32: 1061-1071.
- Kumar S & M. Nei. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Lakra, W.S & M.S Verma. 2008. *DNA Barcoding of Indian Fishes*. Unpublished. *GenBank* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Muladno. 2006. *Aplikasi Teknologi Molekuler dalam Upaya Peningkatan Produktivitas Hewan*. Pelatihan Teknik Diagnostik Molekuler untuk Peningkatan Produksi Peternakan dan Perikanan di Kawasan Timur Indonesia. Kerjasama Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat Institut Pertanian Bogor dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Depdiknas, Bogor.
- Nei, M & S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Nurdawati, S., D. Oktaviani., S. Makmur., S. Wargasmita., I. Rachmatika & Haryono. 2007. *Tata nama spesies ikan air tawar Indonesia di tinjau dari perkembangan taksonomi*. Pusat Riset Perikanan Tangkap. 97 p.
- Nguyen T.T.T., B. Ingram, S. Sungan, G. Gooley, S.Y. Sim, D. Tinggi & S.S. DeSilva. 2006. Mitochondrial DNA diversity of broodstock of two indigenous Mahseer species, *Tor tambroides* and *Tor douronensis* (Cyprinidae) cultured in Sarawak. *Aquaculture.* 253: 259-269.

- Peng, Z., S. Heng & Y. Zhang. 2004. Phylogenetic relationships of Glyptosternoid fishes (Siluriformes: Sisoridae) inferred from mitochondrial Cytochrome b gene sequences. *Mol Phyogenetic Evol.* 31: 979-987.
- Ping, Y., Z. Hao., C. Li-qiao., Y. Jin-yun., Y. Na., G. Zhi-min and S. Da-xiang. 2007. Genetic structure of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) from Yangtze and Lancang River, inferred from COI gene sequence. *Zoological Research.* 28 (2): 113-118.
- Ryan J.R.J & Y.B. Esa. 2006. Phylogenetic analysis of *Hampala* Fishes (Subfamily Cyprininae) in Malaysia inferred from partial mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. *Zool. Sci.* 23: 893-901.
- Roberts, T.R. 1999. Fishes of the Cyprinid genus *Tor* in the Nam Theun Watershed (Mekong basin) of Laos, with description of a new species. *The Raffles Bulletin of Zoology.* 47 (1): 225-236.
- Sade, A. & H. Biun. 2011. The Ichthyofauna of Maliau Basin Conservation Area, Sabah, Malaysia. Unpublished. *GenBank*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Smith T.B & R.K. Wayne. 1996. *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford Univ. Press.
- Tegelstrom H. 1986. Mitochondrial DNA in Natural Populations: an Improved Routine for the Screening of Genetic Variation Based on Sensitive Silver Staining. *Electrophoresis* 7: 226-229.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Vrijenhoek RC. 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *J. Fish. Biol.* 53: 394-412.
- Yang, L., R.L. Mayden, T. Sado, S. He, K. Saitoh. & M. Miya. 2010. Molecular phylogeny of the fishes traditionally referred to *Cyprinini sensu stricto* (Teleostei: Cypriniformes). *Zoologica Scripta.* 39: 527-550.
- Wibowo, A., A. Farajalah & Husnah. 2012. DNA barcoding of freshwater fish species of Manna River (Bengkulu) and Semangka River (Lampung). *Inpress*.