

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

ANALISIS FRAGMENT DNA IKAN LAIS POPULASI SUMATERA SELATAN

Sri Sundari, Deni Irawan, dan Sudarmaji

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

E-mail: sri_sundari13@yahoo.co.id

ABSTRAK

Ikan lais merupakan salah satu komoditas perikanan air tawar yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan prospektif untuk dikembangkan. Eksplorasi informasi genetik diperlukan untuk menunjang budidaya ikan lais. Tujuan kegiatan ini untuk mengetahui fragmen hasil amplifikasi DNA ikan lais melalui PCR-RAPD dengan primer OPA-06, OPA-08, dan OPA-12 sebagai data dukung informasi keragaman genetik. Visualisasi amplifikasi DNA ikan lais populasi Sumatera Selatan dari empat titik pengambilan dengan tiga primer menghasilkan 50 fragmen dengan pola dan ukuran fragmen yang bervariasi yaitu 180-2.800 bp.

KATA KUNCI: fragmen DNA; ikan lais; PCR-RAPD

PENDAHULUAN

Ikan lais yang termasuk kelompok *catfish* ini, tergolong dalam kelas Osteichthyes, subkelas Actinopterygii, ordo Siluriformes, famili Siluridae, genus *Ompok*, dan *Kryptopterus* (Nelson, 1984; Kottelat *et al.*, 1993). Di Indonesia, ikan lais umumnya dimanfaatkan sebagai ikan konsumsi dan diperdagangkan terutama di wilayah Sumatera dan Kalimantan, bahkan hingga ke Thailand dan India (Pagdee *et al.*, 2007; Elvyra, 2009; Handayani *et al.*, 2009). Selain sebagai ikan konsumsi, ikan lais dari spesies *Kryptopterus bicirrhis* (glass catfish) dan *K. macrocephalus* (marbled glass catfish) dimanfaatkan sebagai ikan hias dan diekspor ke kawasan Asia Tenggara (Ng & Tan, 1997). Ikan lais tersebar di Eropa hingga Asia, di kawasan Asia Tenggara dapat ditemukan di perairan tawar Indochina, Semenanjung Malaya, dan Paparan Sunda (*Sundaland*) terutama pada sungai-sungai yang bermuara ke arah Laut Cina Selatan dan Selat Malaka. Di Indonesia ikan lais tersebar di Sumatera dan Kalimantan, lebih dari 32 spesies telah dilaporkan (Kottelat *et al.*, 1993; Bornbusch, 1995).

Potensi pengembangan ikan ini terlihat dari terus meningkatnya nilai produksi ikan lais. Tingginya produksi tersebut hanya didukung oleh benih yang berasal dari alam. Kondisi ini dikhawatirkan akan menyebabkan penurunan populasi ikan lais di alam. Sehingga perlu dilakukan langkah nyata untuk mengantisipasi masalah tersebut yaitu dengan budidaya ikan lais. Domestikasi ikan lais merupakan langkah awal untuk bisa memasuki level budidaya. Mengingat potensinya yang tinggi, maka perlu

dilakukan eksplorasi informasi genetik yang mendalam mengenai ikan ini guna menunjang usaha konservasi dan perlindungan sumber daya genetik.

Studi tentang variasi genetik merupakan aspek yang sangat penting dalam pelestarian dan juga pemanfaatan plasma nutfah. *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspecies maupun antarspecies (Qian *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002; Jena & Das, 2006). Teknik ini mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak. Pada reaksi PCR-RAPD, sebuah primer menempel pada DNA genomik pada dua tempat berbeda dari DNA komplementer. Jika tempat penempelan primer ini berada pada daerah yang dapat diamplifikasi, maka DNA tertentu dapat dihasilkan melalui amplifikasi siklus termal.

Berat molekul suatu fragmen DNA target dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen DNA standar yang telah diketahui ukurannya sebagai penanda (*DNA marker* atau *DNA ladder*) (Martin, 1996). Fragmen-fragmen DNA yang memiliki ukuran molekul sama akan memiliki elektromobilitas yang sama dan menempuh jarak migrasi yang sama pula (Gilbert, 2016). Berdasarkan hal tersebut, maka kegiatan ini dilakukan bertujuan untuk mendapatkan informasi ukuran fragmen DNA ikan lais populasi Sumatera Selatan menggunakan teknik RAPD.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Kegiatan ini dilakukan pada bulan September 2019 di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ikan, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan, Bogor.

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan adalah sirip ikan lais yang berasal dari populasi Sumatera Selatan, diambil dari empat titik pengambilan, yaitu Mariana Ulu, Mariana Ilir, Plaju, dan Meritai (masing-masing 10 sampel). Bahan yang digunakan adalah: kit ekstraksi DNA, proteinase K, *ethanol absolute*, *TBE Buffer*, *nucleic acid gel stain*, *agarose*, *aquadest*, *loading dye 6x*, *PCR master mix*, dan *marker DNA*.

Alat yang diperlukan adalah: *centrifuge*, *waterbath*, mesin PCR, mikropipet, *spin down*, timbangan, vortex, pinset, gunting, elektroforesis set, *hot plate*, *stirrer*, dan *geldoc*.

METODE

Ekstraksi DNA

Tahapan ekstraksi DNA mengikuti metode *spin column protocol* dari Tiangen. Kit DNA yang digunakan adalah *TIANamp Marine Animals DNA Kit cat no. DP 121221*. Isolasi DNA diawali dengan menimbang sampel sebanyak 5 mg dan dimasukkan dalam *microtube* 1,5 mL. Selanjutnya ke dalam sampel tersebut ditambahkan 200 μ L buffer GA dan 20 μ L proteinase K (20 mg/mL) lalu dihomogenisasi dengan vortex selama 15 detik dan disentrifus. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama satu jam. Setelah disentrifus, sampel kemudian ditambahkan 200 μ L buffer GB, lalu dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi kembali pada suhu 70°C selama 10 menit. Sampel selanjutnya ditambahkan dengan 200 μ L etanol (96%-100%), kemudian dihomogenisasi dengan vortex dan disentrifus. Larutan dipindahkan ke dalam *tube spin column* yang dilapisi *microtube* baru dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Kemudian ditambahkan 500 μ L buffer GD, lalu disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Setelah itu ditambahkan 600 μ L buffer PW dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Kemudian ditambahkan 600 μ L buffer PW dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama dua menit. Setelah itu *tube spin column* dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL yang baru, kemudian ditambahkan 100 μ L buffer TE, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 menit, kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm

selama dua menit, sehingga diperoleh genom DNA sampel.

Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi PCR dilakukan dengan komposisi bahan sebagai berikut: 1 μ L DNA; 0,5 μ L primer; 10 μ L *master mix* PCR; dan 8,5 μ L *aquadest* sehingga total volume menjadi 20 μ L. Primer yang digunakan adalah OPA-06, OPA-08, dan OPA-12. Pemilihan primer dilakukan berdasarkan tahapan seleksi dari 20 jenis primer (OPA-01—OPA-20). Kondisi PCR yang digunakan adalah pra PCR pada suhu 94°C selama dua menit, denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, penempelan pada suhu 36°C selama satu menit, pemanjangan pada suhu 72°C selama dua menit (40 siklus) dan post PCR pada suhu 72°C selama tujuh menit, serta proses penstabilan pada suhu 4°C selama tiga menit.

Elektroforesis

Proses elektroforesis menggunakan gel *agarose* 1,5%. Pembuatan gel dilakukan dengan cara menimbang *agarose* sebanyak 0,45 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 30 mL Tris-Boric EDTA (TBE) 1x, dipanaskan sampai larutan menjadi bening, kemudian ditambahkan 3 μ L *nucleic acid gel stain*. Selanjutnya dilakukan pencetakan pada pencetak gel menggunakan sisir pembentuk sumur gel. Elektroforesis dijalankan pada voltase 100 volt selama sekitar 45 menit. Visualisasi pita DNA hasil elektroforesis dilakukan dengan *geldoc*.

HASIL DAN BAHASAN

DNA teramplifikasi pada setiap lokus populasi dan bervariasi dalam jumlah situs amplifikasinya. Pemilihan primer pada RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme fragmen yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan sendiri sehingga fragmen dari DNA yang diamplifikasi oleh primer berbeda menghasilkan polimorfik dengan jumlah fragmen dan berat molekul berbeda. Urutan basa pada primer OPA-06, OPA-08, dan OPA-12 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan basa primer OPA-06, OPA-08, dan OPA 12

Primer	Urutan basa
OPA-06	5'- GGT CCC TGA C-3'
OPA-08	5'- GTG ACG TAG G-3'
OPA-12	5'- TCG GCG ATA G-3'

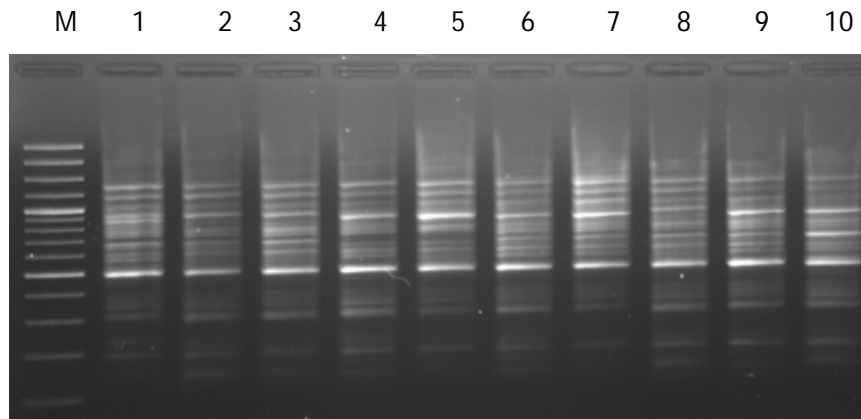
DNA genom ikan lais yang teramplifikasi menggunakan primer OPA-06, OPA-08, dan OPA-12 pada populasi Sumatera Selatan dari empat titik

pengambilan menunjukkan variasi jumlah dan ukuran fragmen. Hasil ampifikasi dari tiga primer yang digunakan yakni OPA-06, OPA-08, dan OPA-12; ketiganya memberikan hasil yang tidak jauh berbeda.

Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan lais populasi Plaju, Sumatera Selatan; dengan primer OPA-06 dapat dilihat pada Gambar 1. Amplifikasi DNA ikan lais dengan primer OPA-06 menghasilkan jumlah fragmen 13-20 dengan ukuran antara 200-1.400 bp. Hasil pembacaan fragmen DNA ikan lais lokasi pengambilan area Plaju dengan primer OPA-06 dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan lais populasi Mariana Ilir dengan primer OPA-08 dapat dilihat pada Gambar 2. Amplifikasi DNA ikan lais dengan primer OPA-08 menghasilkan jumlah fragmen 10-24 dengan ukuran antara 230-2.800 bp. Hasil pembacaan fragmen DNA ikan lais lokasi pengambilan area Mariana ilir dengan primer OPA-08 dapat dilihat pada Tabel 3.

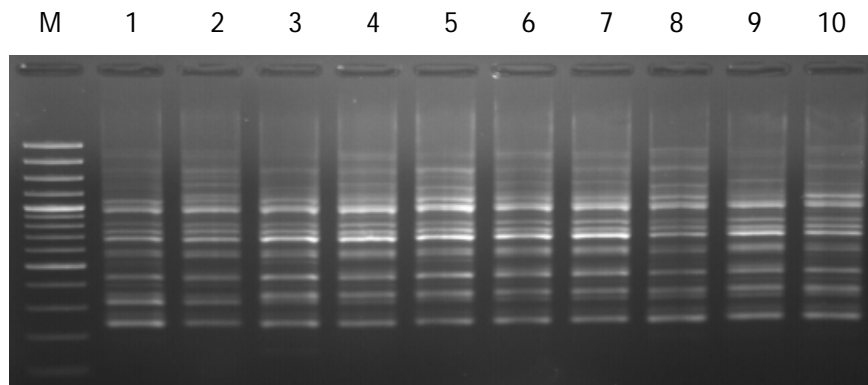
Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan lais dengan primer OPA 12 dapat dilihat pada Gambar 3. Amplifikasi DNA ikan lais dengan primer OPA 12 menghasilkan jumlah fragmen 15-24 dengan ukuran antara 180-2000 bp. Hasil pembacaan fragmen DNA



Gambar 1. Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan lais populasi Plaju dengan primer OPA-06 (M= marker, 1-10= sampel).

Tabel 2. Hasil pembacaan fragmen DNA ikan lais dengan primer OPA-06

No	Ukuran band (bp)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400
2	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200	1.200
3	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050
4	900	900	900	880	880	880	880	900	880	900
5	880	820	820	780	780	820	820	820	820	880
6	820	780	780	730	650	780	780	780	780	820
7	780	730	730	650	600	750	750	730	750	780
8	730	680	680	600	550	730	730	680	730	730
9	680	650	650	580	380	680	680	650	680	680
10	650	600	600	380	350	650	650	600	650	650
11	600	550	550	350	330	600	600	550	600	600
12	580	380	380	330	300	580	580	380	580	580
13	380	350	350	300	200	380	380	350	380	330
14	350	330	330	200		350	350	330	350	300
15	330	300	300			330	330	300	330	200
16	300	200	200			300	300	200	300	380
17	200					200	200		200	350
18										330
19										300
20										200



Gambar 2. Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan lais populasi Mariana Ilir dengan primer OPA-08 (M= marker, 1-10= sampel).

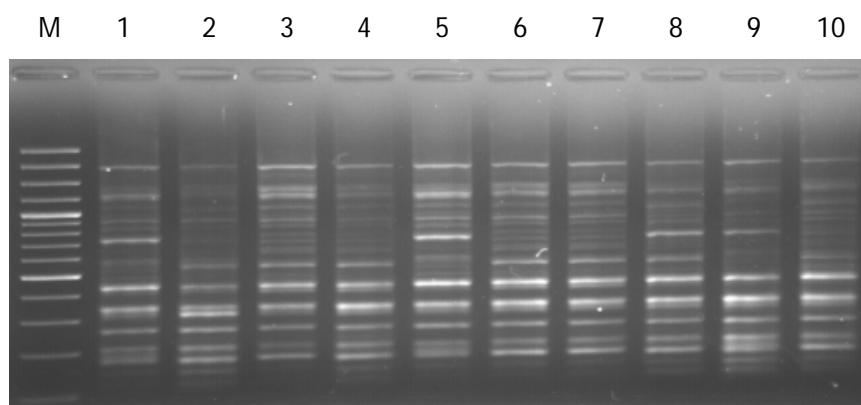
Tabel 3. Hasil pembacaan fragmen DNA ikan lais dengan primer OPA-08

No	Ukuran band (bp)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2.800	2.800	2.800	2.400	2.400	2.400	2.400	2.800	2.400	2.800
2	2.400	2.400	2.400	2.000	2.000	2.000	2.000	2.400	2.000	2.400
3	1.700	1.700	1.700	1.700	1.700	1.700	1.700	2.000	1.700	1.700
4	1.500	1.500	1.300	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.300
5	1.400	1.400	1.100	1.400	1.300	1.400	1.400	1.300	1.400	1.200
6	1.300	1.200	1.000	1.300	1.100	1.300	1.300	1.200	1.200	1.100
7	1.200	1.100	980	1.200	1.000	1.200	1.200	1.100	1.100	1.000
8	1.100	1.000	900	1.100	980	1.100	1.100	1.000	1.000	980
9	1.000	980	800	1.000	900	1.000	1.000	980	980	900
10	980	900	750	980	800	980	980	900	900	800
11	900	800	700	900	750	900	900	800	800	750
12	800	750	600	800	700	800	800	750	750	700
13	750	700	580	750	600	750	750	700	700	600
14	700	600	520	700	580	700	700	600	600	580
15	600	580	480	600	520	600	600	580	580	520
16	580	430	430	580	480	580	580	520	450	480
17	520	400	400	450	430	450	450	480	430	430
18	480	350	350	430	400	430	430	430	400	400
19	430	330	330	400	350	400	400	400	350	350
20	400	280	280	350	330	350	350	350	330	330
21	350	250	250	330	280	330	330	330	280	280
22	330			280	250	280	280	280	250	250
23	280			250		250	250	250		
24	250									

ikan lais lokasi pengambilan area Mariana ulu dengan primer OPA-12 dapat dilihat pada Tabel 4.

Jumlah dan intensitas fragmen DNA yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung bagaimana primer mengenal urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA (*DNA template*) yang digunakan (Tingey *et al.*, 1994). Hasil amplifikasi DNA ikan lais dengan tiga primer tersebut tidak selalu

memperoleh pita dengan intensitas yang sama. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi cetakan DNA. Cetakan DNA yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik, serta konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas (Weeden *et al.*, 1992).



Gambar 3. Hasil visualisasi amplifikasi DNA ikan lais populasi Mariana Ulu dengan primer OPA-12 (M = marker).

Tabel 4. Hasil pembacaan fragmen DNA ikan lais dengan primer OPA-12

No	Ukuran band (bp)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
2	1.450	1.450	1.750	1.750	1.750	1.750	1.750	1.450	1.450	1.450
3	1.300	1.400	1.450	1.450	1.450	1.450	1.450	1.400	1300	1.400
4	1.200	1.300	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.300	1.200	1.300
5	1.100	1.100	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.100	1.100	1.050
6	1.000	1.050	1200	1.100	1.200	1.100	1.100	1.050	900	900
7	900	1.000	1.100	1.000	1.100	1.000	1.000	1.000	850	850
8	850	900	1.000	900	1.000	900	900	900	730	700
9	730	850	900	850	900	850	850	850	680	680
10	680	780	850	780	850	780	780	730	630	630
11	630	730	780	700	730	700	700	680	600	600
12	600	700	700	680	680	680	680	630	580	550
13	580	680	680	630	630	630	630	550	530	500
14	530	630	630	550	600	550	550	500	500	450
15	500	600	550	500	580	500	500	450	450	350
16	450	550	500	450	530	450	450	420	350	330
17	420	500	450	420	500	420	420	350	330	270
18	350	450	420	350	450	350	350	330	270	220
19	330	420	350	330	420	330	330	270	220	180
20	270	350	330	270	350	270	270	220	180	
21	220	330	270	220	330	220	220	180		
22	180	270	220	180	270	180	180			
23		220	180		220					
24		180			180					

KESIMPULAN

Berdasarkan visualisasi, amplifikasi DNA ikan lais populasi Sumatera Selatan dengan primer OPA-06, OPA-08, dan OPA-12 menghasilkan 50 fragmen yang berukuran antara 180-2.800 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Nurhidayat, S.Pi., M.Si. selaku Kepala Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Bogor, Ir. Anang Hari Kristanto, M.Sc., Ph.D. selaku ketua kelompok peneliti perbenihan dan genetika populasi, serta seluruh peneliti dan teknisi litkayasa atas bantuan dan kerja samanya.

DAFTAR ACUAN

Adam, R.P., Hsieh, C., Murata, J., & Pandey, R.N. (2002). Systematics of *Juniperus* from Eastern Asia based on *Random Amplified Polymorphic DNAs* (RAPDs). *Biochemical Systematic and Ecology*, 30(3), 231-241.

- Bornbusch, A.H. (1995). Phylogenetic relationships within the eurasian catfish family Siluridae (Pisces: Siluriformes), with comments on generic validities and biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 115(1), 1-46.
- Elvyra, R. (2009). Kajian keragaman genetik dan biologi reproduksi ikan lais di sungai Kam par Riau. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor, 126 hlm.
- Gilbert, S.F. (2016). Development biology. Eleventh edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, 810 pp.
- Handayani, T., Buchar, T., & Anang, N. (2009). Aspek biologi ikan lais/sheat fish (*Siluridae*) di Danau Batu dan Danau Tehang. *Journal of Tropical Fisheries*, 3(2), 35-46.
- Jena, S.N. & Das, A.B. (2006). Inter-population variation of chromosome and RAPD markers of *Suaeda nudiflora* (Willd.) Moq. a mangrove species in India. *African Journal of Agricultural Research*, 1(4), 137-142.
- Kottelat, M., Whitten, A.J., Kartikasari, S.N., & Wirjoatmodjo, S. (1993). Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Hong Kong: Periplus Editions, 221 pp.
- Martin, R. (1996). Gel electrophoresis: Nucleid acids. Oxford: Bios Scientific Publisher, 175 pp.
- Ng, P.K.L & Tan, H.H. (1997). Freshwater fishes of Southeast Asia: Potential for the aquarium fish trade and conservation issues. *Aquarium Science and Conservation*, 1(2), 79-90.
- Pagdee, A., Homchuen, S., Sangpradab, N., Hanjavanit, C., & Uttharak, P. (2007). Biodiversity and economic value of wetland resources at Nong Han, Udonthani Province, Northeast Thailand. *Natural History Bulletin of The Siam Society*, 55(2), 323-339.
- Qian, W., Ge, S., & Hong, D.Y. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 440-449.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A., & Williams, J.G.K. (1992). Genetics analysis with RAPD markers. In: *Application of RAPD technology to plant breeding*. Joint Plant Breeding Symposium Series, Minneapolis, Minnesota. 1 Nov. 1992. CSSA. Am.Soc. Horticult. Sci., and Am. Genet. Assoc., p. 3-8.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E., & Lodhi, M.A. (1992). Inheritance and reliability of RAPD markers. In: *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Plant Breeding Symposium Series, November 1, 1992, Minneapolis, MN. Crop Science Society of America, Madison, WI.