

DETEKSI GEN *MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX* (MHC) PADA BEBERAPA STRAIN IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.) DENGAN MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Supriyanto dan Listio Dharmawantho

Teknisi Litkayasa Pelaksana pada Balai Penelitian Pemuliaan Ikan Sukamandi
Jl. Raya 2 Sukamandi, Patokbeusi, Subang, Jawa Barat 41263
E-mail: elevenaprilofcharlotte@yahoo.com

ABSTRAK

Wabah penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) di Indonesia yang terjadi sejak tahun 2002 merupakan salah satu faktor yang memicu kemerosotan produksi ikan mas budidaya. Dalam rangka pembentukan strain unggul ikan mas tahan KHV, salah satu caranya yaitu dengan mendeteksi keberadaan gen *Major Histocompatibility Complex* (MHC). Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan gen MHC pada beberapa strain ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) koleksi Balai Penelitian Pemuliaan Ikan Sukamandi, yaitu strain Rajadanu, Sinyonya, Sutisna, dan Wildan. Metode deteksi gen MHC dilakukan dengan teknik PCR dan sampel yang digunakan adalah organ sirip. Hasil deteksi menunjukkan bahwa persentase tertinggi keberadaan gen MHC terdapat pada populasi ikan mas Rajadanu yaitu sebesar 60%, diikuti oleh Wildan 44,4%, Sutisna 38,5%, dan Sinyonya 0%.

KATA KUNCI: ikan mas, KHV, daya tahan, PCR, gen MHC

PENDAHULUAN

Ikan mas merupakan salah satu komoditas andalan pembudidaya ikan air tawar. Wabah penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) yang terjadi sejak tahun 2002 merupakan kendala dalam kegiatan budidaya ikan mas sehingga produksinya mengalami kemerosotan yang sangat signifikan. Penyakit KHV tersebar dengan cepat ke seluruh perairan tawar Indonesia sehingga berbagai upaya dilakukan untuk menangani dan mencegah mewabahnya penyakit tersebut. Pencegahan yang dilakukan terhadap penyakit infeksi KHV sampai saat ini masih meliputi penambahan sistem pertahanan atau sistem imun dari luar yang biasa disebut *inducible*. Sementara, pada umumnya ikan teleostei memiliki dua macam sistem imun yaitu sistem imun yang bersifat bawaan atau alamiah (*innate*) dan dapatan (*acquired*). Sistem imun pada ikan mirip dengan sistem imun pada mamalia, meskipun akibat perkembangan evolusi menyebabkan ikan memiliki aspek imunitas yang spesifik (Iriyanto, 2005).

Sistem pertahanan spesifik berfungsi untuk melawan penyakit yang memerlukan

rangsangan terlebih dahulu, sementara pertahanan non spesifik berfungsi untuk pertahanan terhadap patogen dan bersifat permanen (Ellis, 1988). *Major Histocompatibility Complex* (MHC) termasuk sistem imun spesifik yang bersifat adaptif. MHC merupakan karakter daya tahan badan terhadap penyakit yang dapat dideteksi keberadaannya secara genotip.

Dalam rangka pembentukan strain unggul ikan mas tahan KHV, salah satu caranya yaitu dengan mendeteksi keberadaan gen MHC. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mendeteksi keberadaan gen MHC pada beberapa strain ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) koleksi Balai Penelitian Pemuliaan Ikan Sukamandi dengan menggunakan metode PCR.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Kegiatan ini dilakukan di laboratorium Balai Penelitian Pemuliaan Ikan Sukamandi, Subang, Jawa Barat, pada bulan Februari tahun 2015. Bahan utama yang digunakan adalah

ikan mas strain Rajadanu, Sinyonya, Sutisna, dan Wildan dengan bobot ikan 2-3 kg/ekor. Jumlah sampel ikan sebanyak 32 ekor yang terdiri atas ikan mas Rajadanu 5 ekor, Sinyonya 5 ekor, Sutisna 13 ekor, dan Wildan 9 ekor. Bahan analisis molekuler diambil dari organ sirip pada masing-masing sampel ikan.

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah larutan *sodium hypoklorit*, *Proteinase K Solution* (Thermo), *kit ekstraksi DNA* (Thermo), etanol *absolute 50%*, dan *RNase A Solution* (Thermo). Bahan yang digunakan untuk menghitung konsentrasi DNA yaitu *Nuclease Free Water* (AppliChem) dan *TE Buffer* (Vivantis). Kemudian bahan yang digunakan untuk metode PCR terdiri atas *DreamTaq Green Master Mix* (Thermo), *primer forward* (CTAATGGATACTACTGG), *primer reverse* (ATCGCTGACTGTCTGTT), primer β -actin (panjang fragmen 300 bp, F: 5'-CCCTGGCCCCCAGCACAAATG-3' dan R: 5'-TCTGCGCAGTTGAGTCGGCG-3'), dan H₂O (Thermo). Bahan yang digunakan untuk uji elektroforesis adalah aquades, *TAE Buffer* (Vivantis), *agarose* (Vivantis), *GelRed Nucleid Acid Stain* (Biotium), dan *DNA Ladder* (Vivantis).

Alat yang digunakan untuk mengambil sampel sirip adalah gunting dan pinset. Kemudian alat yang digunakan untuk ekstraksi DNA terdiri atas tube 1,5 mL, mikrotube rak, pulpen *marker*, mikropipet (2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L), *tips*, *vortex*, *pelampung*, *tisu*, *incubator*, *timer*, *sentrifuge*, *collection tubes* 2 mL, *spin coloumn & collection tube* 2 mL. Alat yang digunakan untuk menghitung konsentrasi DNA adalah *spectrophotometer* DNA GeneQuant 1300 dan *cuvette*. Kemudian alat yang digunakan untuk metode PCR adalah tube 0,2 mL, tube 1,5 mL, *tips*, *chiller*, mikropipet (0,5-10 μ L, 1-100 μ L, 100-1000 μ L), dan mesin PCR Thermal *cycler*. Sedangkan alat yang digunakan untuk elektroforesis adalah gelas ukur, tabung Erlenmeyer, timbangan analitik, aluminium foil, *hot plate*, *stirrer*, spatula, cetakan agar, UV transiliminasi, *gel doc*, kamera digital, dan komputer.

Metode

Ekstraksi DNA

Sampel sirip ikan mas ditimbang seberat 0,1 g dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 mL. Tube tersebut kemudian ditandai dengan pulpen *marker* dan disusun di atas mikrotube rak. Mikropipet yang akan

digunakan disemprot terlebih dahulu dengan *sodium hypoklorit* dan dikeringkan dengan *tisu*. Tube-tube yang berisi sampel tersebut kemudian ditambahkan *Digestion Solution* sebanyak 180 μ L dan *Proteinase K Solution* sebanyak 20 μ L, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik dan diinkubasi semalaman pada suhu 56°C. Setelah sampel terlihat lisis, ditambahkan *RNase A Solution* sebanyak 20 μ L, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan *Lysis Solution* sebanyak 200 μ L dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik, lalu ditambahkan etanol *absolute 50%* sebanyak 400 μ L dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik.

Supernatan/larutan dari sampel dipindah pada *spin coloumn & collection tube* 2 mL, kemudian *sentrifuge* pada kecepatan 6.000 g selama 1 menit, lalu *collection tube* dibuang dan *spin coloumn* dipindah pada *collection tubes* 2 mL yang baru. Lalu ditambahkan *Wash Buffer I* sebanyak 500 μ L dan *sentrifuge* pada kecepatan 8.000 g selama 1 menit, cairan pada *collection tubes* dibuang dan ditempatkan kembali *collection tubes* tersebut dengan *spin coloumn*. Kemudian ditambahkan *Wash Buffer II* sebanyak 500 μ L, *sentrifuge* pada kecepatan maksimum 12.000 g selama 3 menit. Lalu buang bagian *collection tube* dan tempatkan *spin coloumn* pada tube 1,5 mL yang baru. Kemudian ditambahkan *Elution Buffer* sebanyak 200 μ L dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang, lalu *sentrifuge* pada kecepatan 8.000 g selama 1 menit. Sampel DNA hasil ekstraksi lalu disimpan di dalam *freezer*, untuk selanjutnya dilakukan proses perhitungan konsentrasi DNA.

Perhitungan konsentrasi DNA genom

Persiapkan *cuvette* dan ditambahkan *Nuclease Free Water* (NFW) sebanyak 100 μ L dan dimasukkan ke dalam *spektrophotometer*. Konsentrasi DNA dikalibrasi terlebih dahulu lalu *cuvette* dikeluarkan. Kemudian disiapkan *cuvette* kosong dan ditambahkan NFW sebanyak 98 μ L dan sampel sebanyak 2 μ L, lalu diaduk dengan menggunakan pipet (*pipetting*) dan dimasukkan ke dalam *spektrophotometer*.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA sampel pada mesin PCR dilakukan dengan kit *DreamTaq Green PCR Master Mix* (2X). Primer yang digunakan

merupakan primer spesifik untuk MHC. Komposisi pereaksi PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Program PCR terdiri atas denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, 40 siklus selanjutnya terdiri atas denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Program diakhiri dengan *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit dan pengkondisian akhir pada suhu 4°C. Hasil PCR dapat langsung dielektroforesis atau disimpan dalam *freezer*.

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan pada gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Sebanyak 6 µL produk PCR dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Deretan produk PCR di-*running* bersamaan dengan *leader marker* ukuran 100 bp sebanyak 1 µL. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan arus

listrik 60 V selama 60 menit. Selanjutnya divisualisasikan menggunakan *gel doc* UV transiluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Berdasarkan hasil kegiatan, didapatkan nilai konsentrasi DNA yang bervariasi pada tiap sampelnya. Tabel 2 adalah hasil perhitungan konsentrasi DNA pada beberapa sampel ikan mas.

Hasil deteksi gen MHC dengan metode PCR pada kegiatan ini sudah baik, yaitu dengan munculnya kontrol positif dan tidak munculnya kontrol negatif yang menunjukkan bahwa selama kegiatan PCR tidak terkontaminasi.

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu *deoksiribonukleotida triphospat* (dNTP), *oligonukleotida primer*, *DNA template* (cetakan), komposisi larutan *buffer*, jumlah siklus reaksi, enzim yang

Tabel 1. Komposisi mix reaksi PCR yang digunakan untuk deteksi gen MHC

PCR MHC	Komposisi		
		1 sampel	34 sampel
<i>DreamTaq Green</i> (MM)	12,5 µL	12,5 µL	425 µL
Water, nuclease-free	8 µL	8 µL	272 µL
Forward primer	1,0 µM	1,25 µL	42,5 µL
Reverse primer	1,0 µM	1,25 µL	42,5 µL
template DNA	2 µL	2 µL	-
Total			782 µL

Tabel 2. Hasil perhitungan konsentrasi DNA genom

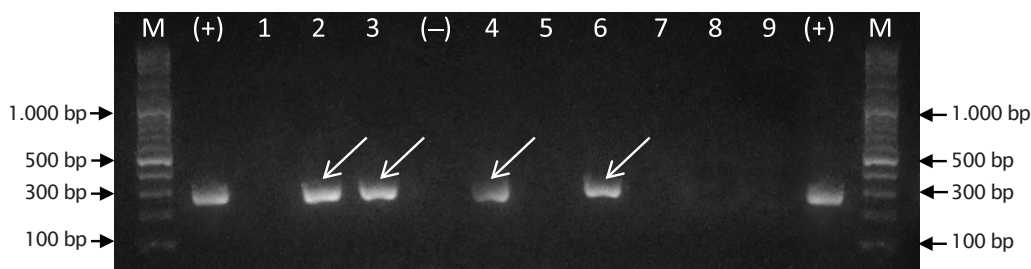
Rajadanu (µg/mL)	Sinyonya (µg/mL)	Sutisna (µg/mL)	Wildan (µg/mL)
30	30	150	35
38	32	38	38
15	13	690	440
58	-	615	638
20	40	20	28
		-	20
		20	15
		23	45
		13	45
		20	
		32	
		40	
		15	

digunakan, serta faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi (Yuwono, 2006). Sedangkan faktor yang bisa mempengaruhi kegagalan hasil deteksi antara lain disebabkan oleh suhu, kit yang rusak, proses *mixing* (homogenisasi) kurang sempurna dan langkah kerja ada yang terlewatkan.

Berdasarkan hasil deteksi keberadaan gen MHC pada ikan mas, diperoleh hasil amplifikasi pada 300 bp. Pita berukuran 300 bp muncul pada beberapa sampel serta pada kontrol positif, hasil ini menunjukkan bahwa gen MHC terdeteksi pada tiap sampel tersebut. Sebaliknya pada beberapa sampel dan kontrol negatif, pita sama sekali tidak muncul, hasil ini menunjukkan bahwa gen

MHC tidak terdapat pada sampel tersebut. Kemunculan gen MHC pada setiap individu ditunjukkan pada Gambar 1.

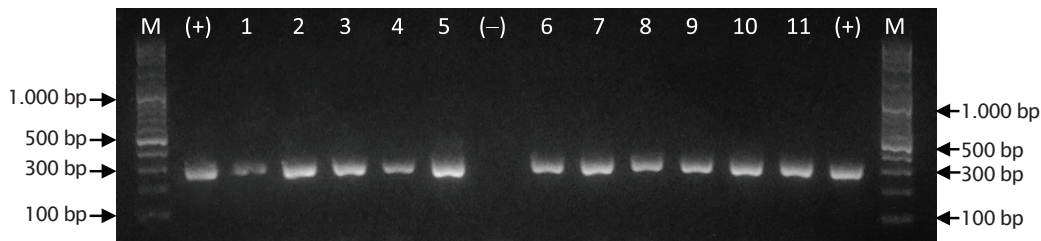
Hasil deteksi gen MHC ditunjukkan pada Tabel 3, di mana dari 5 ekor ikan mas Rajadanu yang diperiksa, ada 3 ekor (60%) yang positif membawa gen MHC. Pada ikan mas Sinyonya tidak ada satupun yang membawa gen MHC. Sedangkan pada ikan mas Sutisna dari 13 ekor yang diperiksa ada 5 ekor (38,5%) dan pada ikan mas Wildan dari 9 ekor yang diperiksa ada 4 ekor (44,4%). Berdasarkan hasil deteksi tersebut, diperoleh bahwa populasi strain ikan mas Rajadanu lebih tahan KHV apabila dibandingkan dengan strain-strain ikan mas lainnya.



Gambar 1. Amplifikasi gen MHC dengan metode PCR (M = *marker*; 2, 3, 4, 6 = sampel positif MHC; 1, 5, 7, 8, 9 = sampel negatif MHC; (-) = kontrol negatif; (+) = kontrol positif)

Tabel 3. Deteksi keberadaan gen MHC pada populasi ikan mas

Strain	Jumlah individu yang diperiksa (ekor)	Positif membawa gen MHC (ekor)	Negatif membawa gen MHC (ekor)	Hasil deteksi MHC (%)
Rajadanu	5	3	2	60
Sinyonya	5	0	5	0
Sutisna	13	5	8	38,5
Wildan	9	4	5	44,4



Gambar 2. Amplifikasi gen β -actin sebagai kontrol internal dengan PCR (M = *marker*, 1-11 = sampel, (-) = kontrol negatif, (+) = kontrol positif)

Konfirmasi dari ketidakhadiran gen MHC pada beberapa individu ikan mas, telah dilakukan PCR dengan menggunakan primer β -actin pada seluruh sampel uji dan hasilnya terlihat pada Gambar 2. Jika amplifikasi β -actin menghasilkan pita DNA pada 300 bp, maka genom DNA dari ikan yang negatif MHC terbukti genom dalam keadaan baik sehingga dapat dipastikan bahwa ketidakhadiran gen MHC bukan dikarenakan atau kualitas dan jumlah genom DNA yang tidak memadai.

KESIMPULAN

Populasi ikan mas Rajadanu mempunyai persentase tertinggi keberadaan gen MHC

pada sebesar 60%, diikuti oleh Wildan 44,4%, Sutisna 38,5%, dan Sinyonya 0%.

DAFTAR ACUAN

- Ellis, A.E. (1988). General principle of fish vaccinations. Academic Press. London, p. 1-19.
- Iriyanto, A. (2005). Patologi ikan teleostei. Gajah Mada University Press. Yogyakarta, 256 hlm.
- Yuwono, T. (2006). Teori dan aplikasi *polymerase chain reaction*. Andi. Yogyakarta, 17 hlm.