

PENURUNAN KERAGAMAN GENETIK PADA F-4 IKAN NILA MERAH “CANGKRINGAN” HASIL PEMULIAAN DIDETEKSI DENGAN MARKER GENETIK

Estu Nugroho^{*)}, Rustadi^{**)}, Dwijo Priyanto^{***)}, Hery Sulisty^{***)}, Susila^{***)},
Sunaryo^{***)}, dan Bagus Wasito^{***)}

^{*)} Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya
Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540
E-mail: *engroho@yahoo.com*

^{**)} Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada
Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

^{***)} Balai Pengembangan Teknologi Kelautan dan Perikanan, Dinas Kelautan dan
Perikanan
Jl. Argomulyo, Cangkringan, Sleman, Yogyakarta

(Naskah diterima: 20 Februari 2013; Disetujui publikasi: 6 November 2013)

ABSTRAK

Variasi genetik ikan nila merah “Cangkringan” hasil pemuliaan dimonitor dengan menggunakan marker d-Loop DNA untuk mengetahui pembawa keragaman genetik yang dihasilkan karena kegiatan seleksi. DNA diekstraksi dari sirip ikan nila generasi 1 (F-0) hingga generasi ke-5 (F-4) dan diamplifikasi daerah d-Loop pada mitokondria menggunakan primer LH 1509 dan FH 1202. Secara statistik tidak terdapat perbedaan genotipe yang nyata antara ke-5 generasi ikan nila yang diuji. Terdapat penurunan variasi genetik dan kehilangan haplotipe sebesar 25% dari generasi pertama ke generasi 5 akibat seleksi berdasarkan komposisi haplotipe dengan empat enzim restriksi *Mbo*-I, *Hae*-III, *Rsa*-I, dan *Alu*-I.

KATA KUNCI: monitoring variasi genetik, nila merah “Cangkringan”, seleksi

ABSTRACT: *Lost of genetic variation of genetically improved strain of “Cangkringan” red tilapia monitored in F-4 detected by DNA Marker. By: Estu Nugroho, Rustadi, Dwijo Priyanto, Hery Sulisty, Susila, Sunaryo, and Bagus Wasito*

*Genetic variations of five subsequent generations F-1-F-4 genetically improved red tilapia were monitored by using mtDNA marker to know the change of genetic variation obtained by selection. Genome DNA was extracted from the finclip of red tilapia from generation 1 (F-0) to generation 5 (F-4) and amplified the d-Loop regions of mitokondria using primer LH 1509 and FH 1202. There are statistically not significant genotype differences among five generations analyzed. There are declining genetic variability of 25% and lost of some composite haplotype from the first to the fifth generations of red tilapia based on the composite haplotype with four restriction enzymes i.e. *Mbo*-I, *Hae*-III, *Rsa*-I, and *Alu*-I.*

KEYWORDS: *genetic variation monitoring, red tilapia, selection*

PENDAHULUAN

Ikan nila adalah salah satu jenis ikan unggulan Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia baik untuk komoditas ekspor maupun kebutuhan lokal. Ikan ini juga menjadi ikan unggulan dunia untuk pengamanan pangan (*food security*) karena kemampuan beradaptasi dalam lingkungan yang luas, jenis makanannya bervariasi dan tidak bersaing dengan manusia. Ikan nila adalah pemakan plankton dan bentos sehingga sangat ideal dipelihara dalam kolam yang dipupuk organik ataupun anorganik, juga sangat efisien menggunakan pakan buatan. Ikan nila hidup dalam air tawar dan tahan hidup dalam air asin sehingga potensial untuk dipelihara di tambak. Ikan ini juga tumbuh cepat dan mudah berkembang biak sehingga mudah dalam penyediaan benihnya, tahan hidup dalam air berkualitas rendah, dan tahan terhadap penyakit (Rustadi, 2000).

Ikan nila merah (*Oreochromis* sp.) merupakan komoditas ekspor pengganti ikan laut *red sea bream* (*Chrysophrys major*), disukai oleh konsumen dunia karena memiliki warna daging yang menarik, lezat rasanya dan tidak memiliki duri antar muskular (Behrends *et al.*, 1982). Permintaan nila merah terus meningkat mencapai 30 ton/hari, tetapi belum terpenuhi karena produksinya masih rendah. Oleh karena itu, pengembangan budidaya nila merah diharapkan dapat meningkatkan produksi ikan untuk memenuhi kebutuhan pasar benih untuk ekspor, konsumsi ikan masyarakat, membuka lapangan kerja, dan meningkatkan pendapatan pembudidaya.

Namun demikian pengembangan usaha budidaya ikan nila merah saat ini terdapat permasalahan yaitu adanya indikasi *inbreeding* yang menyebabkan terjadinya penurunan kualitas genetik (Ariyanto, 2002). Turunnya kualitas genetik dicirikan dengan pertumbuhan lambat, matang kelamin di usia muda, kematian tinggi akibat penurunan daya tahan terhadap penyakit, dan perubahan lingkungan (Sumawijaya *et al.*, 1986). Alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan upaya pemuliaan, khususnya melalui program seleksi.

Keberhasilan program seleksi selain didukung dari sisi fenotifnya, juga dibutuhkan informasi dari sisi genotipenya untuk melihat keragaman genetik yang dihasilkan akibat kegiatan seleksi. Informasi ini akan memengaruhi langkah berikutnya yang akan

diambil dalam menjalankan program seleksi. Penelaahan data dasar genetik ini dapat digunakan untuk mengevaluasi *fitness* individu jangka pendek dan sintasan suatu populasi untuk jangka panjang (Ferguson *et al.*, 1995).

Salah satu metode yang banyak digunakan untuk analisis keragaman genetik adalah RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) pada daerah mitokondria. Menurut Dunham (2004), analisis variasi genetik DNA mitokondria merupakan alternatif untuk mempelajari genetika populasi disebabkan laju mutasi DNA mitokondria lebih cepat dibandingkan dengan DNA genom. Daerah *control region* salah satunya d-Loop bersifat hipervariabel yang memungkinkan penelusuran evolusi yang lebih cepat. Hasil analisis ini juga seringkali digunakan untuk mengungkapkan keragaman genetik intrapopulasi ikan dalam rangka program perbaikan mutu genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi secara genetik keragaman ikan nila merah yang dihasilkan dari kegiatan seleksi dengan menggunakan marker mtDNA d-Loop.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan nila merah "Cangkringan" (yang dirilis dengan nama NILASA pada tahun 2012) mulai dari generasi 1 (F-0) hingga generasi ke-5 (F-4) dalam program seleksi di Balai Pengembangan Teknologi Kelautan dan Perikanan (BPTKP), Yogyakarta. Jumlah total sampel yang digunakan adalah 25 ekor.

Program seleksi yang dilakukan di BPTKP Yogyakarta adalah seleksi individu. Kegiatan diawali dengan pembentukan populasi sintetik dengan mengawinsilangkan empat strain ikan nila merah sebagai bahan populasi yaitu: ikan nila Chitralada, Filipina, NIFI, dan Singapura. Seleksi dilakukan dengan memilih 10% populasi terbaik pada ikan yang telah mencapai ukuran konsumsi pada setiap generasi. Kegiatan ini diulang hingga mencapai generasi kelima (F-4).

Ekstraksi DNA

DNA ikan diekstraksi dari potongan sirip dengan menggunakan metode fenol-kloroform sebagai berikut: 5-10 mg potongan sirip ikan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL yang telah berisi 500 μ L larutan TNES Urea. Kemudian

ditambahkan 10 µg/mL protein kinase dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 12 jam.

Sebanyak 500 µL larutan fenol-kloroform ditambahkan ke dalam tabung di atas untuk selanjutnya dihomogenasi dengan vortex selama satu menit dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama sepuluh menit. Lapisan supernatnya diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru, dan ditambahkan 600 µL larutan propanol dan di-vortex sampai terlihat endapan putih.

DNA diendapkan menggunakan sentrifugasi campuran tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama sepuluh menit, kemudian larutan bagian atas dibuang dan DNA dikeringkan pada suhu ruangan. Kemudian dilarutkan kembali dalam 50-100 µL buffer Tris-EDTA (TE) buffer dan disimpan dalam 4°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

Amplifikasi Daerah D-Loop

Amplifikasi d-loop mt-DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer forward LH 1509 (5'-CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT-3') dan primer reverse FH 1202 (5'-ATA ATA GGG TAT CTA ATC CTA GTT T-3'). Komposisi bahan untuk amplifikasi DNA adalah 3 µL DNA, primer *forward* 10 µM, primer *reverse* 10 µM, dan 18 µL H₂O yang dicampurkan pada 1 unit *taq* (*ready to go*) sehingga volume totalnya menjadi 25 µL. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus.

PCR secara garis besar terdiri atas tiga tahap, yaitu: 1) tahap denaturasi untuk memisahkan DNA menjadi utas tunggal pada suhu 95°C selama dua menit; 2) tahap *annealing* yang merupakan penempelan primer pada DNA utas tunggal pada suhu 50°C selama satu menit; 3) tahap ekstensi yang merupakan proses pemanjangan DNA baru pada suhu 72°C selama dua menit (Baker & Birt, 2000).

Pemotongan dengan Enzim Restriksi

Proses pemotongan DNA hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan empat jenis enzim restriksi, yaitu: *Mbo*-I, *Hae*-III, *Rsa*-I dan *Alu*-I. Pemotongan mt-DNA dilakukan dengan mencampurkan 1 µL enzim restriksi, 1 µL buffer enzim, 3 µL DNA hasil PCR, dan 5 µL H₂O, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hasil pemotongan kemudian dipisahkan secara elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2%-3% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE)

buffer dan diamati dengan illuminator (UV) serta dicetak gambarnya dengan polaroid.

Analisa Data

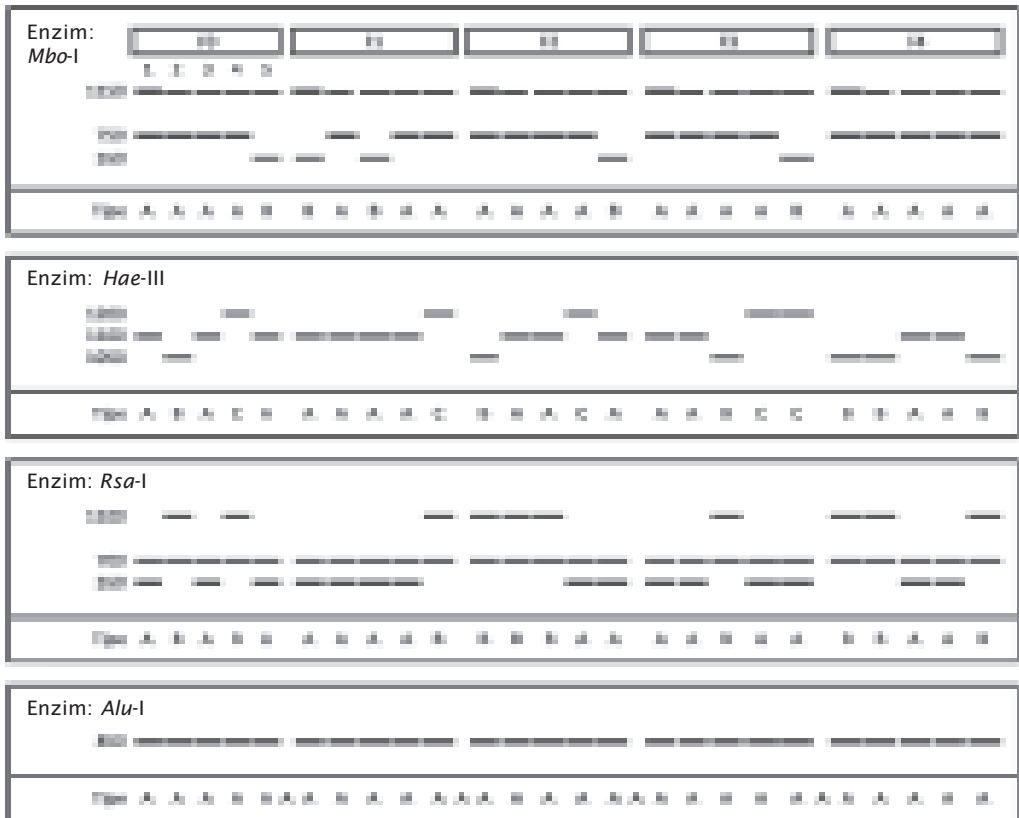
Untuk mengevaluasi variasi DNA ikan nila merah dilakukan dengan menggunakan analisa molekuler varians (AMOVA) dan Fst dalam program TFPGA (Miller, 1997). Kekeabatan antar ras dianalisis dengan menggunakan Jarak Genetik, Modified Roger.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa daerah d-Loop mt-DNA ikan nila merah memiliki panjang sekitar 1.800 bp. Hal ini setara dengan ikan nila hitam yang mempunyai ukuran sekitar 1.800-2.000 bp (Nugroho & Maskur, 2002) dan ikan kancra dengan ukuran panjang d-Loop sekitar 1.800-2.000 bp (Nugroho *et al.*, 2006). Pola hasil pemotongan dengan menggunakan empat enzim tercantum pada Gambar 1.

Variasi genetik dipengaruhi oleh tingkat generasi ikan. Tercatat pada awal generasi (F-0) ikan nila merah mempunyai nilai haplotipe diversitas sebesar 0,64 dan turun menjadi 0,48 pada generasi kelima (F-4) (Tabel 1). Jumlah alel dari empat pada F-0 turun menjadi dua pada F-4. Fenomena ini menjelaskan bahwa kegiatan seleksi merupakan upaya untuk mempersempit atau menurunkan variasi sifat tertentu agar lebih stabil dengan memanfaatkan pengaruh dari *inbreeding*. Sesuai dengan pendapat Sonesson *et al.* (2005) yang menjelaskan bahwa *inbreeding* atau *genetic drift* akan menurunkan heterozigositas yang terkait dengan variasi genetik.

Selanjutnya tercatat bahwa nilai keragaman pada awalnya naik terlebih dahulu yaitu menjadi 0,72 pada F-2 dan F-3 sebelum turun pada F-4, menunjukkan kemungkinan masih adanya efek heterosis pada populasi yang diamati mengingat populasi sintetik terbuat dari persilangan antara 4 strain. Sonesson *et al.* (2005) berpendapat bahwa jika satu atau beberapa individu yang tidak mempunyai kekerabatan digunakan sebagai induk dalam program seleksi maka *inbreeding* pada benihnya bisa berkurang sampai nol. Hal ini berarti pula efek heterosisnya masih dapat muncul. Sebaliknya pada F-4, nilai keragaman genetiknya sudah turun hingga 25% dari awal generasi memperlihatkan bahwa program seleksi dengan memanfaatkan *inbreeding* mulai berdampak pada generasi kelima (F-4).



Gambar 1. Pola pemotongan hasil amplifikasi daerah d-Loop dengan menggunakan empat enzim restriksi

Figure 1. Restriction patterns of amplified d-Loop regions using four restriction enzymes

Tabel 1. Variasi genetik ikan nila merah dari lima generasi

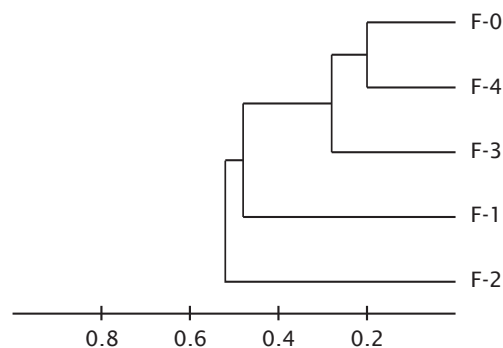
Table 1. Genetic variation of five generations of red tilapia

Haplotype Haplotype	Populasi (Population)				
	F-0	F-1	F-2	F-3	F-4
AAAA	0.400	0.400	-	0.400	0.400
ABBA	0.200	-	0.200	0.200	0.600
ACBA	0.200	0.200	-	-	-
BAAA	0.200	0.400	0.200	-	-
AABA	-	-	0.400	-	-
ACAA	-	-	0.200	0.200	-
BCAA	-	-	-	0.200	-
N-sampel (Sample-N)	5	5	5	5	5
N-allele	4	3	4	4	2
Keragaman haplotipe Haplotype diversity	0.640	0.640	0.720	0.720	0.480

Secara statistik tidak terdapat perbedaan genetik (genotipe) yang nyata antar kelima generasi ikan nila merah yang diuji (Tabel 2). Hal ini dimungkinkan semua strain yang digunakan sebagai populasi sintetik telah berbaur dengan baik sehingga sama-sama berkontribusi alel pada generasi berikutnya. Jika tidak sama-sama berkontribusi maka akan timbul satu atau lebih alel yang bersifat spesifik dengan persentase yang besar sehingga menimbulkan perbedaan yang nyata. Selang kepercayaan pada uji FST berpasangan ini berkisar antara 0,1298 (F-1 x F-4) hingga 1,0 (F-0 x F-3 dan F-0 x F-4). Nilai ini juga menandakan bahwa turunan pada F-3 dan F-4 lebih berkaitan dengan F-0, dibandingkan antara F-1 dan F-2 dengan F-0.

Jarak genetik modifikasi Roger rata-rata adalah 0,414 (Tabel 3). Nilai terendah jarak genetik terdapat pada pasangan generasi F-0-F-4 yaitu 0,200 dan yang terbesar dengan nilai 0,529 terdapat pada pasangan generasi F-1-F-4 dan F-2-F-4. Keadaan ini memperkuat

hasil uji Fst berpasangan bahwa individu-individu pada generasi F-4 lebih serupa dengan individu-individu pada generasi awal F-0. Lebih jelas terlihat pada dendrogram jarak genetik (Gambar 2) yaitu F-0 dan F-4 berdekatan, sedangkan F-2 terletak paling jauh dengan posisi F-0 (populasi sintetik).



Gambar 2. Dendrogram ikan nila merah “Cangkringan” berdasarkan frekuensi haplotipe mt-DNA d-Loop dengan empat enzim restriksi

Figure 2. Dendrogram of “Cangkringan” red tilapia based on the haplotype frequency of d-Loop mt-DNA with four restriction enzymes

Tabel 2. Hasil uji Fst berpasangan

Table 2. Result of pairwise Fst test

	Populasi (Population)				
	F-0	F-1	F-2	F-3	F-4
F-0	-	-	-	-	-
F-1	0.419	-	-	-	-
F-2	0.305	0.299	-	-	-
F-3	1.000	0.452	0.623	-	-
F-4	1.000	0.129	0.140	0.716	-

Keterangan (Note):

P<0,05 berbeda nyata (Significant different)

Tabel 3. Jarak genetik modifikasi Roger

Table 3. Modified Roger genetic distance

	Populasi (Population)				
	F-0	F-1	F-2	F-3	F-4
F-0	-	-	-	-	-
F-1	0.400	-	-	-	-
F-2	0.489	0.489	-	-	-
F-3	0.283	0.400	0.477	-	-
F-4	0.200	0.529	0.529	0.346	-

KESIMPULAN

Secara statistik tidak terdapat perbedaan genotipe yang nyata antar ikan nila merah dari generasi 1 (F-0) sampai generasi 5 (F-4). Terdapat penurunan keragaman hingga 25% dari F-0 ke F-4 sebagai akibat dari seleksi.

DAFTAR ACUAN

- Ariyanto, D. 2002. Analisis keragaman bentuk tubuh ikan nila strain GIFT pada tiga tingkatan umur yang berbeda. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. *Jurnal Perikanan*, IV(1): 19-26.
- Behrends, L.L., Nelson, R.G., Smitherman, R.O., & Stone, N.M. 1982. Breeding and culture of the red-gold color phase of tilapia. *J. World Maricul. Soc.*, 13: 210-220.
- Baker, A.J. & Birt, P. 2000. *Polymerase Chain Reaction molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- Dunham, R.A. 2004. *Aquaculture and fisheries biotechnology. Genetic Approaches*. U.K. Cabi Publishing.

- Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodohl, P.A., Mc.Meel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., & Hynes, R.A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, 47: 103-126.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA). Version 1.3. Department of Biological Science, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Nugroho, E., Subagja, J., Asih, S., & Kurniasih, T. 2006. Evaluasi keragaman genetik ikan kancra dengan menggunakan marker mt-DNA d-Loop dan *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). 2006. *J. Ris. Akuakultur*, 1(2): 211-217.
- Nugroho, E. & Maskur. 2002. Benarkah ikan nila merah adalah hasil hibrid? *Warta Penelitian Perikanan Indonesia*, 8(1): 7-11.
- Rustadi. 2000. Pengembangan rancang bangun keramba jaring apung yang ramah lingkungan untuk budidaya nila merah (*Oreochromis* sp.) di perairan waduk. Laporan Penelitian DIK-S UGM. Yogyakarta, 20 hlm.
- Sumawijaya, K., Bari, A., & Wiratmadja, G. 1986. Teknik seleksi ikan. *Prosiding Loka Karya Nasional Teknologi Tepat Guna Bagi Pengembangan Perikanan Budidaya Air Tawar*. Balitkankar, hlm. 27-33.
- Sonesson, A.K., Woolliams, J.A., & Meuwissen, T.H.E. 2005. Kinship, Relationship and Inbreeding. *In* Selection and breeding programs in aquaculture. (Ed.) Gjedrem, T. Springer. AKVAFORKS, p. 73-84.