

## KONFIRMASI GEN PENYANDI TUMBUH CEPAT PADA BENIH DAN INDUK IKAN KERAPU SUNU (*Plectropomus leopardus*)

Sari Budi Moria Sembiring, Ketut Suwirya, Ida Komang Wardana, dan Haryanti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut  
Jl. Br. Gondol, Kec. Gerokgak, Kab. Buleleng, Kotak Pos 140, Singaraja, Bali 81101  
E-mail: moriasembiring@yahoo.co.id

(Naskah diterima: 5 Februari 2013; Disetujui publikasi: 2 April 2013)

### ABSTRAK

Keberlanjutan budidaya kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*) sangat ditentukan dari ketersediaan benih yang berkualitas secara fenotip maupun genotip. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi gen pengontrol tumbuh cepat sebagai indikator atau penyandi seleksi dalam produksi benih kerapu sunu *P. leopardus*. Penelitian dilakukan melalui tiga tahapan, meliputi: proses pemeliharaan larva, persiapan benih uji, dan evaluasi karakter kuantitatif sebagai gen penyandi tumbuh cepat pada benih kerapu sunu. Konfirmasi gen penyandi tumbuh cepat yang telah diperoleh pada lokus PL-03 dari mikrosatelit/SSRs (*Simple Sequence Repeats*), selanjutnya digunakan untuk penyandi dalam seleksi pada benih yang diproduksi melalui metode analisis amplifikasi PCR. Konfirmasi adanya gen penyandi yang digunakan sebagai indikator tumbuh cepat pada benih kerapu sunu selanjutnya dianalisis dengan metode SSCP (*Single Strand Confirmation Polyacrilamide*). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa gen penyandi tumbuh cepat pada benih kerapu sunu dapat ditunjukkan dengan lokus PL-03 dan terekspresi pada fragmen DNA 370 bp. Keakurasian ini juga ditunjukkan pada karakter fenotip (pertumbuhan) selama budidaya di keramba jaring apung (KJA). Calon induk kerapu sunu yang membawa gen tumbuh cepat yang dihasilkan sudah mencapai ukuran panjang rata-rata  $38,5 \pm 2,47$  cm dan bobot 968,0 g dengan jumlah ikan sebanyak 180 ekor. Dibandingkan dengan individu ikan yang tidak membawa gen penyandi DNA 370 bp mempunyai panjang dan bobot rata-rata sebesar  $34,6 \pm 2,0$  cm dan 734,4 g.

**KATA KUNCI:** gen penyandi, tumbuh cepat, mikrosatelit, kerapu sunu

**ABSTRACT:** *Confirmation of marker gene for fast growth on fry and broodstock of coral trout grouper (Plectropomus leopardus). By: Sari Budi Moria Sembiring, Ketut Suwirya, Ida Komang Wardana, and Haryanti*

*Sustainability of coral trout grouper (Plectropomus leopardus) culture is depends on the availability of good quality seed phenotypic and genetic traits. The present study was conducted to confirm a marker gene for controlling fast growth of selected P. leopardus. There are three steps activities in this study, started from larval rearing followed by preparation of samples and evaluation of quantitative traits as marker gene of fast growing on fish fry. Marker gene for fast growth at PL-03 locus that was found from mikrosatelit/SSRs (Simple Sequence Repeats) analysis, then was used as marker gene indicator of selection of fry production through analysis of PCR amplification. To confirm whether that marker gene can be used as indicator of fast growing fish fry, the analysis was followed by SSCP method. The results showed that marker gene for fast growth on coral trout grouper fry can be expressed at locus PL-03 on 370 bp DNA fragment. The accuration of this marker gene was also confirmed*

during grow-out periods in cage culture based on phenotypic trait. The candidate of broodstock of coral trout on this experiment is still keep in floating cage culture with average size of  $38.5 \pm 2.47$  cm total length and 968.0 g of body weight and total number of fish is 180. Compare to fish without having marker gene for fast growth DNA 370 bp which only growth to  $34.6 \pm 2.0$  cm and 734.4 g on average.

**KEYWORDS:** marker gene, fast growth, microsatelite, coral trout grouper

## PENDAHULUAN

Komoditas ikan laut jenis kerapu merupakan komoditas andalan dan permintaan dari pasar ekspor (Singapura dan Hongkong) dari tahun ketahun terus meningkat (Nurjana, 2006). Permintaan pasar internasional yang cenderung terus meningkat, maka pengembangan budidaya kerapu menjadi alternatif solusi dalam permasalahan penurunan populasi di alam akibat penangkapan yang intensif dan kerusakan terumbu karang sebagai habitat ikan kerapu (Nurdjana, 2010).

Kerapu sunu dalam budidayanya memiliki prospek pengembangan yang sangat baik karena teknik produksi benih secara massal telah dikuasai dan dapat diterapkan di hatcheri skala rumah tangga (Aslianti *et al.*, 2009). Dalam melaksanakan budidaya ikan berkelanjutan, ketergantungan pada induk-induk dari alam harus dikurangi secara bertahap dan digantikan dengan induk-induk produksi hatcheri hasil domestikasi yang dilanjutkan dengan program *selective breeding* (Aliah *et al.*, 2006).

Upaya peningkatan produksi ikan kerapu dapat dilakukan melalui peningkatan produktivitas. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan produktivitas budidaya ikan kerapu sunu melalui proses seleksi. Seleksi merupakan salah satu kegiatan yang dilakukan dalam program pemuliaan dan melalui seleksi konvensional telah terbukti berhasil meningkatkan produksi, namun seleksi konvensional tersebut memiliki keterbatasan terutama dalam hal waktu yang diperlukan untuk mengintrogresikan gen-gen yang diinginkan. Sehingga perlu adanya pemecahan masalah tersebut melalui penggunaan penanda molekular karena dengan penanda molekular dapat memberikan hasil yang lebih cepat, efektif, dan akurat (Prasetyono & Tasliah, 2004).

Dewasa ini pengembangan ikan kerapu sunu tumbuh cepat menjadi sangat menarik untuk diuji, mengingat baik dalam seleksi atau

produksi pada budidaya, karakter tersebut akan menguntungkan. Penelitian produksi benih ikan kerapu sunu dengan menseleksi karakter gen tumbuh cepat menggunakan gen penyandi telah dilakukan dan sudah diperoleh gen penyandi tumbuh cepat pada lokus PL-03 dengan bobot molekul 370 bp (Sembiring *et al.*, 2012).

Penggunaan penyandi gen tumbuh cepat tersebut perlu diaplikasikan lebih lanjut dalam penelitian seleksi calon induk sehingga akhirnya akan diperoleh benih dan induk ikan kerapu sunu dengan sifat fenotip dan genotip yang lebih baik. Dari keberhasilan tersebut diharapkan dapat memotivasi praktisi untuk menggunakan ikan kerapu sunu sebagai spesies andalan dalam bisnis budidaya perikanan. Dampak lanjut adalah memberikan peluang industri hatcheri skala komersial untuk memasok kebutuhan benih pada budidaya di keramba jaring apung (KJA).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap penelitian meliputi proses pemeliharaan larva, penyiapan hewan uji dan evaluasi karakter pertumbuhan dengan gen penyandi tumbuh cepat. Pada awal kegiatan adalah mempersiapkan induk kerapu sunu F-0 dan induk generasi pertama (F-1). Induk kerapu sunu dipelihara secara terkontrol di dalam bak beton volume 100 m<sup>3</sup>. Semua induk di-tagging dengan menggunakan *AVID microchip tag* sebagai identitas individu dan setiap induk tersebut.

Pada tahap pertama, dilakukan proses pemeliharaan larva dari telur hasil pemijahan induk kerapu sunu yang telah dipersiapkan. Dalam kegiatan ini, larva kerapu sunu dipelihara dengan pemberian pakan berupa rotifer, pakan buatan dan *nauplii Artemia* yang disesuaikan dengan perkembangan dan pertumbuhan larva. Pakan alami, *Nannochloropsis* sp. diberikan setiap hari dengan kepadatan 100.000-200.000 sel/mL dalam bak peme-

lihaaran untuk menstabilkan warna media pemeliharaan sekaligus sebagai pakan rotifer. Selain diberi *Nannochloropsis* sp., rotifer juga diperkaya dengan bahan pengkaya komersial. Pergantian air mulai dilakukan pada hari ke-8 dan persentase pergantian air meningkat dengan bertambahnya umur larva. Sebagai agen pengurai (*bioremediation*) bahan-bahan yang berbahaya dalam media pemeliharaan, maka selama pemeliharaan larva diberi probiotik yang berasal dari kultur murni *Bacillus* sp. *strain Bio-colony* di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut (BBPPBL), Gondol.

Pada tahap kedua, dilakukan penyiapan sampel ikan melalui pemeliharaan larva ikan hingga yuwana (d-36) dan diseleksi pada variabilitas pertumbuhan (ukuran kecil dipisahkan) dan diukur untuk mengetahui percepatan tumbuh ikan tersebut.

Tahap ketiga adalah evaluasi karakter lokus kuantitatif yang terdapat dalam gen benih ikan kerapu sunu tersebut sebagai gen pengontrol tumbuh cepat. Gen penyandi tumbuh cepat yang telah diperoleh dari penelitian pada tahun 2010 melalui metode mikrosatelit (*SSR/Simple Sequence Repeats*), selanjutnya digunakan untuk seleksi populasi benih. Gen penyandi tersebut sebagai indikator pada benih yang diproduksi dengan mengekspresikan gen tumbuh cepat. Untuk konfirmasi keberadaan gen tumbuh cepat pada benih, aplikasi penyandi gen tumbuh cepat pada lokus PL-03 diawali dengan amplifikasi PCR pada target region 370 bp.

Dalam penelitian ini, ekstraksi DNA benih dan induk ikan kerapu sunu dilakukan menggunakan kit *Nucleospin tissue* (Machery-Nagel). Genom DNA selanjutnya diamplifikasi dengan PCR konvensional. Reagen amplifikasi (*Go Taq Polymerase kit/Qiagen*) terdiri dari 10x *Buffer*, 2,5 mM dNTP, 10 mM primer PL-03 (F) yang sudah dilabel dengan fluorescent dan (R) tanpa dilabel dengan fluorescent dan *taq* polimerase. *Thermal cycle* untuk amplifikasi digunakan suhu denaturasi awal 95°C selama 300 detik (1 siklus). Siklus berikutnya adalah sebanyak 35 kali dengan suhu denaturasi 94°C (30 detik), suhu *annealing* 60°C (30 detik) dan suhu ekstensi 72°C (30 detik). Amplifikasi PCR diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Separasi amplicon menggunakan elektroforesis. Selain menggunakan 1,5% agarose (1 x *TBE buffer*), digunakan pula separasi elektroforosis dengan polyacrilamid

dan *silver staining* (*SSCP/Single Strand Conformation Polymorphism*). Konfirmasi separasi elektroforesis juga menggunakan mesin *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer* yang dilaksanakan di laboratorium Genetika Molekuler Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPBPTH - Jogjakarta).

Hasil separasi yang menunjukkan ekspresi gen tumbuh cepat (pita gen 370 bp) selanjutnya dievaluasi untuk menentukan bahwa populasi benih diprediksi akan tumbuh cepat setelah dipelihara di KJA, sedangkan yang tidak mempunyai gen tumbuh cepat dijadikan kontrol.

## HASIL DAN BAHASAN

Hasil pengamatan terhadap pemijahan yang diindikasikan dari daya tetas telur induk ikan kerapu sunu, diperoleh hasil seperti pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa daya tetas telur sangat bervariasi antara 40-70%. Dari tiga kali penebaran, ternyata hanya 2 kali penebaran yang berhasil memperoleh yuwana walaupun tingkat sintasan masih rendah.

Sintasan yang dicapai pada pemeliharaan larva kerapu sunu masih relatif rendah dibandingkan dengan komoditas jenis kerapu lainnya. Kendala utama yang dihadapi dalam pemeliharaan larva adalah karena perbedaan fluktuasi suhu yang tinggi dan pada bulan puncak musim penghujan yang menyebabkan produksi fitoplankton (*Nannochloropsis* sp.) rendah bahkan sering terjadi kematian. Akibatnya larva mudah stres dan terserang VNN (*Virus Nervous Necrosis*) yang mengakibatkan terjadinya kematian massal.

Analisis gen penyandi tumbuh cepat pada induk dan benih ikan kerapu sunu kelompok tumbuh cepat dan lambat dengan metode mikrosatelit sudah dilakukan. Jumlah sampel induk yang dianalisis sebanyak 40 sampel, sedangkan untuk benih masing-masing ukuran dianalisa sebanyak 20 sampel. Ukuran panjang dan bobot sampel benih ikan kerapu sunu yang tumbuh cepat sebesar  $2,01 \pm 0,24$  cm dan  $0,129 \pm 0,021$  g, sedangkan benih ikan yang tumbuh lambat sebesar  $1,28 \pm 0,1$  cm dan  $0,03 \pm 0,006$  g. Selanjutnya amplicon dipisahkan menggunakan mesin *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer* (Gambar 1).

Dari 40 sampel induk yang dianalisis dengan lokus SSR PL-03 (F/R) ternyata 55,0% dari induk tersebut (22 ekor) membawa gen

Tabel 1. Pemeliharaan larva kerapu sunu, *P. leopardus* pada tahun 2011

Table 1. Larval rearing trials of coral trout grouper, *P. leopardus* at year of 2011

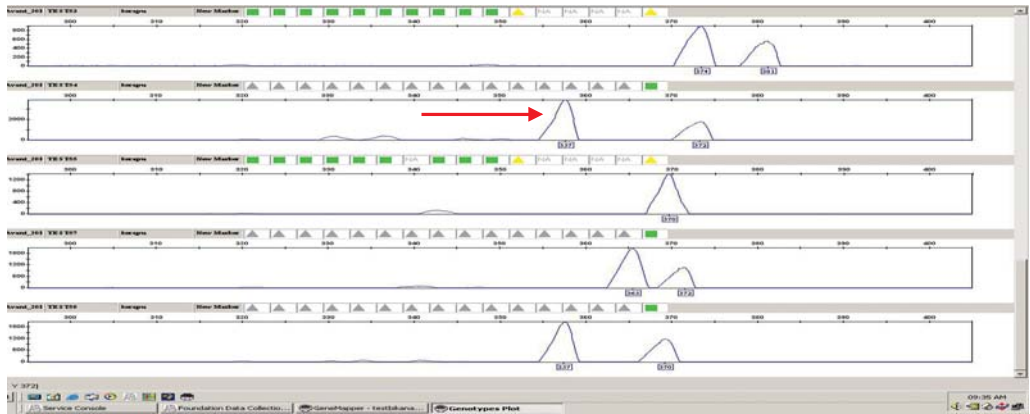
Bulan Month	Induk Broodstock	Bak Tank	Jumlah telur No. of eggs	Daya tetas Hatching rate (%)	Kematian/ Panen Mortality/ Harvest	Jumlah (ekor) Number (fish)	Sintasan Survival rate (%)
Maret March	F-0	B	75,000	70.0	D-29	-	-
		C	75,000	70.0	D-29	-	-
		A	75,000	70.0	D-36	105	0.20
		G	75,000	70.0	D-36	587	1.12
		H	75,000	70.0	D-36	942	1.79
		D	75,000	70.0	D-36	164	0.30
		E	75,000	70.0	D-36	44	0.08
Agustus August	F-1	G	151,000	61.0	D-03	-	-
		H	151,000	95.0	D-03	-	-
September September	F-1	C	127,000	60.0	D-07		
		H	127,000	60.0	D-35	58	0.10
Oktober October	F-1	A	100,000	60.0	D-38	650	1.08
		F	80,000	40.0	D-37	32	0.10
	F-0	D	100,000	50.0	D-37	406	0.80
		G	100,000	50.0	D-35	1,039	2.08
		C	100,000	60.0	D-04	-	-

tumbuh cepat, sedangkan benih dari kelompok yang berukuran besar sebanyak 60% (12 ekor) membawa gen tumbuh cepat dan pada kelompok ikan kerapu sunu yang berukuran kecil hanya 10% (2 ekor) yang membawa gen tumbuh cepat. Hal ini menunjukkan bahwa lokus PL-03 dapat diaplikasikan sebagai gen penyandi tumbuh cepat pada ikan kerapu sunu. Separasi amplicon sampel ikan kerapu sunu ukuran besar, kecil dan induk di samping menggunakan *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer*, juga dielektroforesis dengan gel polyacrilamid (SSCP/*Single Strand Confirmation Polyacrilamide*) (Gambar 2) agar dalam aplikasi seleksi dapat dilaksanakan secara cepat.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fragment DNA pada 370 bp pada induk dan benih ikan kerapu sunu yang dianalisis, dapat terekspresi pita gen yang disinyalir mengontrol tumbuh cepat. Dari 40 ekor induk yang dianalisis terlihat bahwa 45% menunjukkan fragment DNA 370 bp, sedangkan benih yang

pertumbuhannya lambat hanya terekspresi 13%. Hal ini memberikan gambaran yang mendekati kesesuaian dengan hasil separasi amplicon menggunakan *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer*. Metode SSCP dapat memberikan gambaran yang mendekati kesesuaian dengan hasil separasi menggunakan *ABI 3100 Aviant Genetic Analyzer*. Hal ini sesuai dengan pendapat Wu & Tanskley (1993) dan Panaud *et al.* (1996) dalam Santoso *et al.* (2006) yang mengemukakan bahwa Mikrosatelit/SSR dapat dideteksi dengan pewarnaan menggunakan teknik *Silver staining PAGE*. Dengan demikian, penggunaan SSCP dapat memberikan polimorfisme DNA dan variasi urutan gen spesifik dapat dipisahkan dan hasilnya juga lebih sensitif.

Hasil analisis aplikasi penyandi gen tersebut, juga dapat dilihat berdasarkan karakter morfologi (panjang dan bobot) dari benih ikan kerapu yang masih dipelihara di KJA. Pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap bulan dan saat ini benih sudah berumur 19



A



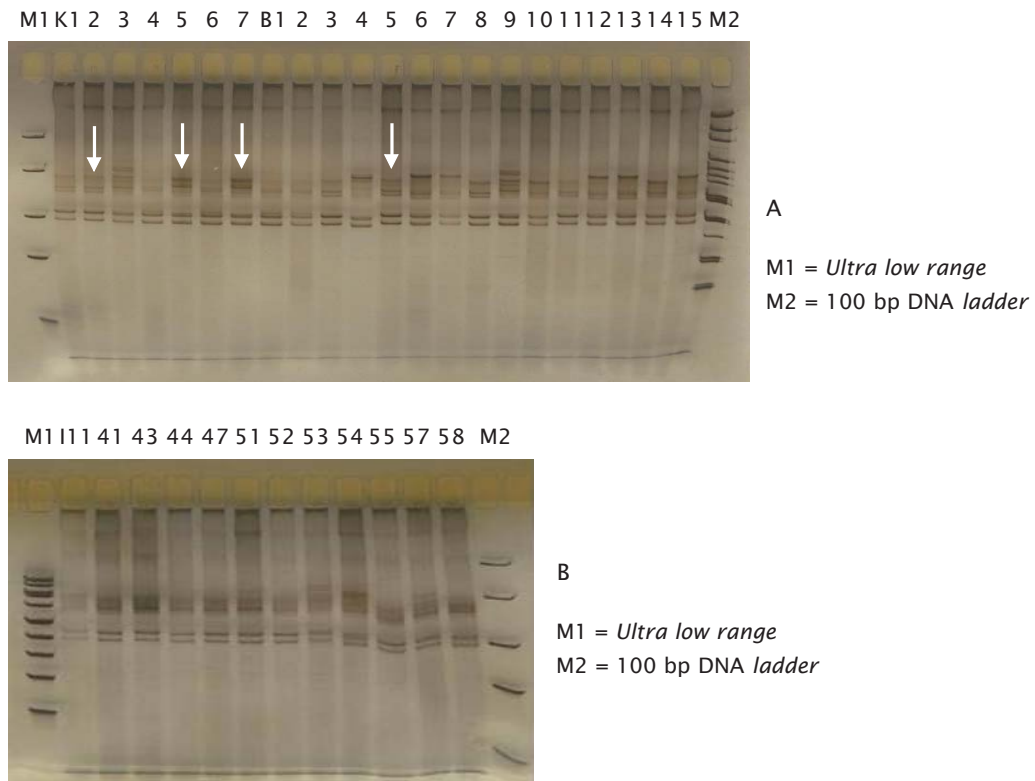
B



C

Gambar 1. Hasil separasi sekuens DNA dengan sequencer ABI 3100 pada ikan kerapu sunu, *P. leopardus*, benih tumbuh lambat (A); benih tumbuh cepat (B); dan induk (C)

Figure 1. Results of sequencer ABI 3100 separation of DNA sequence of coral trout grouper, *P. leopardus*, slow growth fry (A); fast growth fry (B); and broodstock (C)



Gambar 2. Hasil separasi gen dari benih tumbuh cepat dan lambat (A) dan induk (B) kerapu sunu, *P. leopardus* yang dianalisis menggunakan metode SSCP dengan lokus PL-03

Figure 2. Results of gene separation from fast and slow growths (A) and broodstock (B); of coral trout grouper, *P. leopardus*, analyzed by using SSCP method with PL-03 locus

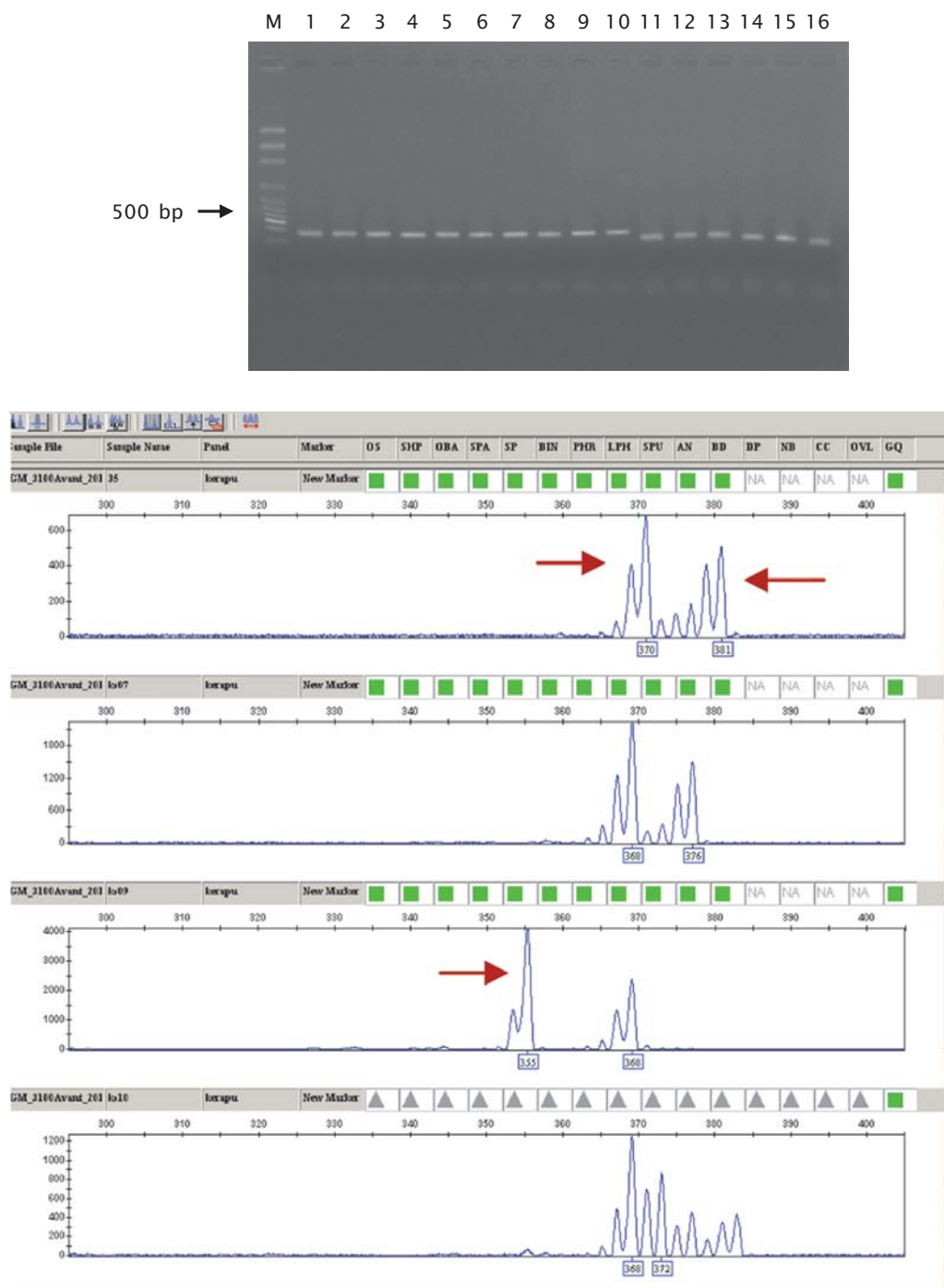
bulan dan sudah merupakan calon induk. Pada bulan Maret 2012 (ikan kerapu sunu berumur 11 bulan) dilakukan seleksi berdasarkan karakter morfologi berdasarkan kelompok ukuran yaitu ukuran di atas 28,5 cm; 27,0-28,0 cm dan ukuran di bawah 27,0 cm. Ikan yang mempunyai ukuran di atas 28,5 cm tetap dipelihara sampai menjadi induk dan yang mempunyai ukuran di bawah 27,0 cm (ikan yang pertumbuhannya lambat) diambil sebanyak 15% dari total keseluruhan 390 ekor (60 ekor) sebagai kontrol. Selanjutnya 20 ekor dari populasi calon induk yang tumbuh cepat dan 10 ekor dari calon induk yang tumbuh lambat diambil bagian sirip ekor untuk dianalisis menggunakan gen penyandi tumbuh cepat dengan lokus PL-03. Dari hasil analisis, terlihat bahwa calon induk yang tumbuh cepat hampir 85% (17 ekor) teridentifikasi pada alel 370 bp, sedangkan calon induk yang tumbuh lambat hanya 10% (1 ekor) yang muncul pada

alel 370 bp dan 90% (9 ekor) muncul pada alel 355 bp dan 380 bp. (Gambar 3).

Pertumbuhan panjang dan bobot rata-rata pada kelompok ikan yang pertumbuhan cepat sebesar  $38,5 \pm 2,47$  cm dan 968,0 g; sedangkan kelompok ikan yang tidak membawa gen tumbuh cepat mempunyai ukuran panjang dan bobot rata-rata sebesar  $34,6 \pm 2,0$  cm dan 734,4 g (Gambar 4). Berdasarkan hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa lokus PL-03 dari penanda mikrosatelit/SSR dapat dijadikan indikator gen untuk seleksi tumbuh cepat pada benih dan calon induk kerapu sunu.

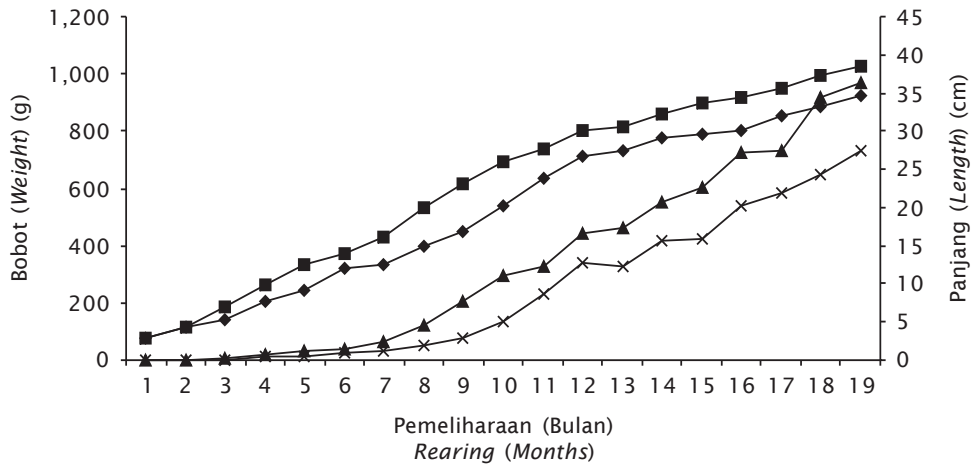
## KESIMPULAN

Dengan analisis mikrosatelit, lokus PL-03 dengan berat molekul 370 bp dapat dijadikan marka gen tumbuh cepat, yang selanjutnya dapat dijadikan indikator seleksi perbaikan pertumbuhan ikan kerapu sunu.



Gambar 3. Pola pita amplifikasi PCR calon induk kerapu sunu, *P. leopardus* yang tumbuh cepat (1-10) dan tumbuh lambat (11-16) dengan menggunakan lokus PL-03

Figure 3. Band pattern of PCR amplification of candidate broodstock of coral trout grouper, *P. leopardus* from fast (1-10) and slow growth (11-16) analyzed by using locus PL-03



Gambar 4. Panjang dan bobot rata-rata calon induk kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*  
 Figure 4. Mean length and weight of candidate broodstock of coral trout grouper, *Plectropomus leopardus*

Dari hasil penelitian ini sebanyak 180 ekor ikan kerapu sunu dijadikan induk yang membawa gen 370 bp untuk dimonitor lebih lanjut.

#### DAFTAR ACUAN

- Aliah, R.S., Wahidah, Sumantadinata, K., Nugroho, E., & Carman, O. 2006. Karakterisasi genetik ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) generasi pertama hasil program domestikasi. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 5(1): 87-95.
- Aslianti, T., Imanto, P.T., & Suastika, M. 2009. Dampak minyak buah merah, *Pandanus conoideus* Lam pada performansi yuwana kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*, *Jurnal Perikanan*, XI(1): 1-8.
- Benzie, J.A.H., Kenway, M., & Trott, L. 1997. Estimates for The Heritability of Size in Juvenile *P. monodon* from Half-sib Matings. *Aquaculture*, 152: 49-53.
- Nurjana, M.L. 2006. Indonesian Aquaculture Development. Innovative and Eco-friendly Technologies for the production of safe aquaculture food. Food & Fertilizer Technology Center for The Asian and Pacific region (FFTC-ASPAC)/RCA. *International Workshop*. Denpasar Bali, Indonesia, December 4-8, 2006, p. 81-100.
- Nurjana, M.L. 2010. Proyeksi produksi perikanan budidaya menurut komoditas utama 2009 s.d. 2014. *Materi presentasi pada acara Forum Inovasi dan Teknologi Akuakultur*. Puriskan Budidaya. Bandar lampung, 20-24 April 2010.
- Prasetyono, J. & Tasliah. 2004. Marka Mikro-satelit: Marka molekuler yang menjanjikan. *Buletin Agro Bio.*, 6(2): 41-47.
- Santoso, T.J., Dwinita, W., Utami, dan Endang M. Septiningsih. 2006. Analisis sidik jari DNA Plasma Nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Jurnal Agro Biogen*, 2(1):1-7.
- Sembiring, S.B.M., Haryanti, Suwiry, K., Wardana, I.K., Sutarmat, T., & Yudha, H.T. 2012. Penggunaan Penanda genetik tumbuh cepat untuk produksi calon induk kerapu sunu, *Plectropomus leopardus* dalam program seleksi. *J. Ris. Akuakultur*, 7(1): 01-09.