

IDENTIFIKASI DNA DENGAN MENGGUNAKAN PCR: MARKER DNA SEBAGAI ALAT BANTU DALAM PENGELOLAAN STOK INDUK UNTUK KEGIATAN BUDI DAYA DAN KONSERVASI

Estu Nugroho¹⁾

¹⁾ Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

ABSTRAK

Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) telah banyak digunakan dalam membantu pengelolaan bidang perikanan, baik untuk kegiatan budi daya maupun konservasi. Berdasarkan data yang dihasilkan maka masalah-masalah dalam pengelolaan suatu stok, *depresi inbreeding*, variasi genetik suatu populasi maupun penelusuran garis keturunan segera dapat diatasi dengan baik.

KATA KUNCI: marker DNA, budi daya, konservasi

PENDAHULUAN

Dewasa ini penggunaan marker DNA dalam bidang perikanan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kesadaran akan pentingnya data genetik untuk dimanfaatkan dalam upaya peningkatan produktivitas perikanan. Beberapa jenis marker DNA yang umum adalah, Allozyme yang digunakan untuk menganalisis DNA secara tidak langsung dan mitokondria DNA, RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), minisatelit serta mikrosatelit yang digunakan untuk mengobservasi DNA secara langsung.

Marker-marker DNA tersebut, masing-masing mempunyai keunggulan dan kelemahan tersendiri. Keberhasilan penggunaan marker DNA dalam menunjang suatu program dipengaruhi oleh ketepatan atau kesesuaian pemilihan marker dan tujuan yang ingin dicapai dari program itu sendiri. Secara umum penggunaan marker DNA dalam bidang perikanan ditujukan antara lain adalah untuk mendapatkan data dasar genetik pada ikan-ikan budi daya maupun pada ikan-ikan untuk kepentingan konservasi. Ukuran populasi efektif (*Effective Population Size*) dan koefisien silang dalam (*inbreeding coefficient*) merupakan salah satu aspek yang dapat diukur dengan menggunakan bantuan marker DNA tersebut. Monitoring fluktuasi genetik yang dapat digunakan dalam menentukan prosedur pengelolaan adalah merupakan hal yang dapat pula diamati dengan bantuan marker DNA.

Dalam tulisan ini akan dipaparkan beberapa kajian tentang beberapa hal yang berkaitan dengan manfaat penggunaan marker DNA dalam bidang perikanan.

STRATEGI DALAM PENGELOLAAN STOK INDUK

Strategi dalam perbaikan genetik stok ikan dapat diklasifikasikan dalam dua kategori utama yaitu strategi aktif dan pasif. Strategi aktif adalah strategi dalam perbaikan genetik yang dilakukan dengan menggunakan program pemuliaan selektif yang konvensional serta program bioteknologi. Sedangkan strategi pasif dilakukan dengan menjaga ukuran populasi efektif (N_e) tertentu untuk memelihara variasi genetik dan mencegah depresi sebagai akibat dari silang dalam yang disebabkan oleh kehilangan gen. Kepentingan atau manfaat strategi pasif harus diketahui karena keberhasilan perbaikan genetik oleh strategi aktif mungkin kurang bermanfaat atau hilang oleh *inbreeding depression* melalui beberapa generasi. Strategi pasif merupakan strategi yang efektif jika digunakan pada program perbaikan sumber daya dari ikan-ikan laut di perairan bebas, di mana persamaan genetik dari benih ikan di populasi bebasnya diperlukan. Dengan menggunakan marker genetik maka kita akan dapat mengukur variasi dan perbedaan genetik dari ikan-ikan tersebut serta akan dapat menentukan cara memelihara variasi genetik yang lebih tinggi.

PENCEGAHAN PENURUNAN VARIASI GENETIK DAN DEPRESI SILANG DALAM MELALUI UKURAN POPULASI EFEKTIF (N_e)

Sebagai dasar untuk *fitness* dari individu dan populasi, pemeliharaan variasi genetik dari suatu spesies merupakan hal penting yang berkaitan dengan pengelolaan induk. Variasi genetik dari suatu populasi berfluktuasi atau menurun secara cepat jika ukuran populasi efektif induknya menurun. Nilai N_e ini umumnya jauh lebih kecil jika dibandingkan dengan jumlah aktual (N_a) yang ada dalam populasi budi daya. Ukuran populasi efektif (N_e) secara langsung berkaitan dengan variabilitas genetik yang diperlukan untuk memperkirakan nilai koefisien *inbreeding*. Karena peningkatan koefisien *inbreeding* untuk satu generasi, F , dapat diperkirakan dari nilai N_e , dan bukan dari nilai N_a ($F = 1/2N_e$) maka kita dapat menduga N_e suatu

populasi induk secara tidak langsung dengan menduga tingkat variabilitas genetik menggunakan marker genetik, seperti misalnya DNA mikrosatelit.

Pengaruh silang dalam sangat terasa, sebagaimana dapat diamati pada beberapa spesies ikan budi daya, yaitu terhadap keragaan dan parameter-parameter reproduksinya. Pengaruh silang dalam terhadap beberapa trait *fitness* seperti toleransi salinitas juga telah diteliti pada beberapa hewan uji. Apabila depresi silang dalam cukup besar dan serius, maka program perbaikan genetik yang telah dilakukan, baik dengan metode konvensional maupun metode bioteknologi akan menjadi kurang berarti, sehingga masalah-masalah yang ditimbulkan oleh depresi silang dalam ini harus diperhatikan dengan sungguh-sungguh. Karena marker DNA efektif untuk menduga berbagai parameter seperti heterozigositas (H_e), koefisien silang dalam (F), dan ukuran populasi efektif (N_e), maka kita dapat mengendalikan depresi *inbreeding* ini dengan cara memonitor perubahan genetik dan penurunan variasi genetik dengan menggunakan marker tersebut.

PENGAJIAN VARIASI GENETIK DENGAN MENGGUNAKAN MARKER DNA (Mikrosatelit DNA)

Dibandingkan dengan marker genetik konvensional semacam isozyme, marker DNA adalah hipervariabel dan efektif untuk mengevaluasi variabilitas genetik pada berbagai populasi ikan. DeWoody & Avise (2000) menemukan bahwa populasi ikan air tawar di perairan bebas memiliki variabilitas genetik yang relatif lebih rendah dibandingkan populasi ikan laut dengan menggunakan marker mikrosatelit. Pengujian kemampuan marker mikrosatelit untuk mengkaji variasi genetik berbagai populasi ikan yang hidup pada berbagai habitat juga telah dilakukan.

Jumlah rata-rata alel dan heterozigositas yang diuji pada berbagai populasi ikan, seperti ikan yang bermigrasi luas, ikan yang bermigrasi pantai, ikan bermigrasi dasar, ikan karang dan bebatuan, ikan amphidromous, ikan air tawar dan ikan budi daya air tawar. Di antara populasi-populasi bebas tersebut, nilai-nilai variabilitas genetik berbeda tergantung pada spesies ikan dari ekosistem yang berbeda, misalnya ekosistem air tawar atau air laut, lokasi sampling (subpopulasi), dan populasi budi daya atau perairan bebas. Parameter-parameter tersebut cenderung lebih tinggi pada spesies air laut dan populasi bebas, dan lebih rendah pada populasi budi daya dan air tawar. Penurunan variabilitas genetik secara nyata ditemukan pada populasi ikan ayu yang hampir punah. Jumlah alel dan heterozigositas sepertinya dapat digunakan sebagai

indikator yang efektif bagi variabilitas genetik dan perubahan-perubahannya.

ESTIMASI UKURAN POPULASI EFEKTIF DARI BERBAGAI EKOSISTEM

Jumlah populasi efektif (N_e) umumnya diestimasi dari nilai heterozigositas (H_e) atau jumlah alel efektif (N_{ea}), untuk populasi bebas diukur sesuai formula berikut ini:

$$N_e = (H_e / (1 - H_e)) / 4U \text{ (Kimura \& Crow, 1964)}$$

$$U = 4 \times 10^{-4} \text{ adalah laju mutasi untuk DNA mikrosatelit (Garcia et al., 1997)}$$

Penghitungan nilai N_e dari berbagai populasi ikan telah dilakukan dengan menggunakan nilai H_e yang diperoleh dari marker MS. Nilai-nilai ini pada dasarnya diper-timbangkan sebagai konsekuensi dari adanya perbedaan ukuran populasi efektif dari masing-masing populasi. Ukuran populasi efektif tampaknya jauh lebih rendah daripada jumlah populasi yang sesungguhnya pada sampel ikan yang dikoleksi baik dari populasi budi daya maupun perairan bebas. Nilai N_e kakap merah yang diestimasi dari perairan laut sebanding dengan yang dari perairan bebas.

Spesies ikan laut seperti tuna (Takagi *et al.*, 1999), ekor kuning (Nugroho *et al.*, 2001), dan kakap merah (Perez-Enriquez & Taniguchi, 1999) memiliki nilai N_e yang relatif tinggi, tetapi grouper sebaliknya. Ikan mas *nishikigoi* yang terkenal di Jepang sebagai ikan hias memiliki nilai N_e yang amat rendah dibandingkan spesies ikan mas budi daya (Aliah *et al.*, 2000). Efek *bottle neck* yang amat kuat telah terjadi sepanjang periode seleksi ikan *nishikigoi* yang berlangsung lama.

Terdapat bukti bahwa ukuran populasi efektif menurun secara drastis pada populasi ikan dari panti benih, yang nilainya jauh lebih rendah dibandingkan populasi bebas (Fiumera *et al.*, 2000). Namun parameter variabilitas genetik seperti frekuensi alel, jumlah rata-rata alel per lokus dan heterozigositas rata-rata tidak menurun secara drastis. Untuk kepentingan budi daya, penggunaan formula Kimura dan Crow tidak disarankan untuk mengestimasi N_e untuk induk, karena N_e akan menjadi terlalu tinggi untuk populasi propagasi buatan ini.

ESTIMASI KOEFISIEN SILANG DALAM

Strain kakap merah untuk budi daya telah dikembangkan oleh Universitas Kinki-Jepang setelah diseleksi selama 20 tahun (Murata *et al.*, 1996). Pada permulaan proyek seleksi ini tahun 1972, rata-rata bobot tubuh ikan umur 4 tahun adalah 2 kg. Pada tahun 1994, pada generasi ke-8, bobot tubuh rata-rata ikan umur 4 tahun menjadi 5 kg (250% dari nilai awal). Perubahan peningkatan bobot

tubuh yang dicapai selama 20 tahun seleksi amat mengejutkan. Selanjutnya, Taniguchi *et al.* (1998) mencoba mengevaluasi faktor-faktor genetik yang mempengaruhi bobot tubuh pada suatu galur yang terseleksi. Mereka membandingkan keragaan pertumbuhan antara suatu galur yang terseleksi dengan galur yang tak diseleksi yang berumur 150 hari di bawah kondisi eksperimen di tahun 1994. Galur yang terseleksi ternyata memiliki rata-rata bobot tubuh 50% lebih tinggi daripada galur yang tak diseleksi. Hasil ini menunjukkan bahwa peningkatan bobot tubuh selama 20 tahun periode seleksi itu tidak semata-mata disebabkan oleh proses seleksi itu tetapi juga oleh perbaikan kondisi pemeliharaan seperti teknik produksi benih, kualitas pakan, dan fasilitas pemeliharaan.

Pada sisi lain, para ilmuwan juga berusaha memecahkan masalah yang ditimbulkan oleh efek *inbreeding* yang muncul pada galur terseleksi. Mereka mencoba menguji koefisien silang dalam (F) induk dengan menggunakan marker DNA. Nilai F dapat diestimasi menggunakan formula berikut ini:

$$F_t = (H_o - H_t) / H_o$$

di mana H_o dan H_t adalah heterozigositas rata-rata dari generasi ke-0 dan ke-t, berturut-turut.

Koefisien silang dalam kakap merah strain budi daya adalah $F = 0,230$; dihitung berdasarkan tingkat penurunan heterozigositas hasil marker mikrosatelit. Hibridisasi di antara strain budi daya kakap merah merupakan cara efektif untuk menghindari depresi silang dalam terhadap parameter-parameter penampilan.

ANALISIS KETURUNAN PADA BENIH IKAN UNTUK MENENTUKAN UKURAN EFEKTIF INDUK UNTUK KEPENTINGAN BUDI DAYA

Dalam kasus pembenihan buatan, kita dapat memperoleh nilai N_e dan F secara langsung menggunakan analisis keturunan yang didapat dengan menggunakan marker DNA. Masing-masing ikan induk dan keturunannya ditandai oleh mikrosat dengan mengambil potongan kecil jaringan sirip sebagai sampel.

Usaha menganalisis keturunan pada kakap merah dengan cara membandingkan genotip keturunan dengan genotip induk menggunakan piranti lunak komputer (Perez-Enriquez & Taniguchi, 1999). Berdasarkan analisis genotip dari 200 ekor ikan keturunan, teridentifikasi sebanyak 91 ekor induk yang memijah dari 250 ekor induk dalam tangki pemijahan. Setelah dikompensasi dengan nilai ketidakseimbangan seksual dan ketidakseimbangan ukuran famili, N_e didapatkan sebesar 63,7. Konsekuensinya, nilai koefisien *inbreeding* menjadi kurang dari

0,8%. Nilai N_e yang didapat ini hampir sama dengan ukuran populasi minimum, $N_e = 50$, yang mengindikasikan bahwa suatu populasi tidak akan menjadi punah dalam jangka pendek. Nilai N_e yang diperoleh di sini jauh lebih kecil daripada $N_e = 500$, sebuah angka yang menunjukkan bahwa suatu populasi secara genetika stabil dalam jangka waktu lama.

FLUKTUASI JUMLAH ALEL DAN DIVERSITAS HAPLOTYPE

Kita dapat mempertahankan nilai N_e dari suatu populasi benih jika kita membuat '*multiple propagation*' sepanjang musim pemijahan. Produksi benih kakap merah secara artifisial seringkali menggunakan telur dari tangki pemijahan yang dipanen pada satu waktu dalam setahun.

Para ilmuwan mengamati bahwa pada ikan kakap merah, variabilitas genetik berfluktuasi tajam tergantung pada hari pengumpulan telur sepanjang periode pemijahan. Fluktuasi yang berbeda baik pada jumlah alel maupun heterozigositas marker MS akibat perbedaan hari sampling. Jika data digabung, maka diharapkan jumlah alel akan meningkat. Ini berarti bahwa N_e juga akan meningkat. Variasi genetik diharapkan akan meningkat ketika populasi benih-benih ikan yang diproduksi pada hari yang berbeda dicampur.

Diversitas haplotype dan jumlah haplotype berfluktuasi tergantung pada waktu sampling telur. Jika benih dikumpulkan dari waktu penetasan yang berbeda maka kedua nilai tadi akan meningkat setara dengan level yang teramati pada polulasi bebas. Produksi benih yang berasal dari pengumpulan telur pada beberapa hari, dapat digunakan untuk memelihara variasi genetik dari spesies ikan laut pada stok alam.

PROGRAM MANAJEMEN INDUK PADA BUDI DAYA DENGAN BANTUAN MARKER DNA

Produksi benih yang digunakan dalam budi daya dan program pelestarian sumber daya harus berdasarkan pada strategi pengelolaan induk yang terorganisasi dengan baik. Pemantauan perubahan genetik yang diketahui ataupun tidak diketahui dan hilangnya variasi genetik pada benih dan induk harus dilakukan, sebab pengaruh yang ditimbulkan seringkali tidak dapat diduga dan tidak diharapkan yang diakibatkan oleh kerusakan populasi.

Marker DNA diharapkan menjadi salah satu alat pemantauan yang efektif untuk pengelolaan induk dalam rangka mempertahankan variasi genetik dan ukuran populasi efektif yang lebih besar pada benih dan induk. Evaluasi tersebut akan menjadi berguna dalam upaya

penyediaan benih yang bermutu bagi program budi daya dan pelestarian sumber daya.

Secara ringkas dapat dijelaskan bahwa, jika benih-benih yang dihasilkan dari panti benih ditujukan untuk keperluan budi daya maka seyogyanya induk-induk yang digunakan berasal dari populasi dasar yang mempunyai variasi genetik besar sehingga keberhasilan program seleksi akan besar pula. Selanjutnya jika benih-benih ditujukan untuk keperluan pelestarian maka induk-induk yang digunakan harus mempunyai pola latar belakang genetik yang sama atau mirip dengan pola yang dipunyai oleh populasi-populasi alam yang akan ditebar kembali, sehingga peluang terjadinya kerancuan genetik dapat diperkecil.

PENUTUP

Marker DNA dapat digunakan sebagai salah satu alat bantu dalam program pemuliaan untuk mempercepat produksi varietas-varietas ikan yang unggul, antara lain memberi arah yang tepat untuk tujuan/sasaran pemuliaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aliah, R.S., S. Sato, and N. Taniguchi. 2000. An evaluation of genetic variability on Nishikigoi, *Cyprinus carpio*, stock from Nigata Prefecture based on microsatellite DNA markers. 2000. *Suisanzoshoku*, 48: 25—31.
- DeWoody, J.A. and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fish compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461—473.
- Fiumera, A.C., P.G. Parker, and P.A. Fuerst. 2000. Effective population size and maintenance of genetic diversity in captive-bred populations of lake Victoria cichlid. *Conservation Biology*, 14: 886—892.
- Garcia de Leon, F.J., L. Chikhi, and F. Bonhomme. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology*, 6: 51—62.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetic*, 49: 725—738.
- Murata, O., T. Harada, S. Mayashita, K. Izumi, S. Maeda, K. Kato, and H. Kumai. 1996. Selective breeding for growth in red sea bream. *Fisheries Science*, 62: 845—849.
- Nugroho, E., D.J. Ferrel, P. Smith, and N. Taniguchi. 2001. Genetic divergence of kingfish from Japan, Australia and New Zealand inferred by microsatellite DNA and mtDNA control region markers. *Fisheries Science*, 67: 843—850.
- Perez-Enriques, R. and N. Taniguchi. 1999. Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream. *Fish Science*, 65: 374—379.
- Taniguchi, N., M. Takagi, and K. Mikita. 1998. Microsatellite DNA markers for monitoring genetic change in hatcheries stock of red sea bream: a case study. In Mustafe, S. (ed.) *Genetics and sustainable fisheries management*. Fishing News Books Oxford, p. 206—218.
- Takagi, M., T. Okamura, S. Chow, and N. Taniguchi. 1999. PCR primers for microsatellite loci in tuna species of the genus *Thunnus* and its application for population genetic study. *Fisheries Science*, 65: 571—576.