

TEKNIK *Restriction Fragment Length Polimorphism* (RFLP) PADA IKAN NAPOLEON (*Cheilinus undulatus*)

Ni Luh Tati Aryani, Sri Suratmi, dan Saifuddin

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

ABSTRAK

Ikan napoleon (*Cheilinus undulatus*) merupakan jenis ikan laut yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Tujuan dari percobaan ini untuk mengetahui tata cara analisis DNA menggunakan enzim pemotong sehingga dapat menunjukkan polimorfisme genetik pada ikan napoleon. *Restriction Fragment Length Polimorfism* (RFLP) merupakan salah satu metode analisis DNA dengan menggunakan primer target tertentu dan selanjutnya dipotong menggunakan enzim pemotong untuk menghasilkan polimorfisme DNA. Sebanyak 20 sampel, ikan napoleon yang digunakan untuk analisis berasal dari Labuhan Bajo (Nusa Tenggara Timur). Dari hasil analisis terlihat bahwa primer 16 SrDNA mampu mengamplifikasi fragmen DNA ikan napoleon dengan bobot molekul 700 bp. Penggunaan empat enzim pemotong yaitu *Hae III*, *Hinf I*, *Hha I*, dan *Mbo I* dapat memotong pita DNA secara sempurna. Pemotongan menggunakan enzim pemotong *Hha I* mampu memperlihatkan polimorfisme.

KATA KUNCI: enzim pemotong, ikan napoleon, polimorfisme, RFLP-DNA

PENDAHULUAN

Ikan napoleon atau disebut juga ikan lambe, lemak, dan siomae (*Cheilinus undulatus*) merupakan jenis ikan konsumsi yang termahal di pasaran Asia terutama di Hongkong dan Singapura. Untuk memenuhi permintaan ekspor yang tinggi, sementara stok di alam sudah menipis maka jalan keluar yang paling tepat adalah dengan melakukan pembenihan dan budidaya ikan napoleon secara berkesinambungan. Upaya perbenihan ikan napoleon telah dirintis oleh Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali. Teknik pematangan gonad hingga pemijahan telah berhasil dilakukan dengan cara manipulasi pakan dan hormonal (Slamet *et al.*, 1999; Slamet & Sutarmat, 2001). Namun untuk menghasilkan benih ikan napoleon secara kontinu masih belum dapat dicapai oleh karena sintasan larva yang masih rendah dan hanya bertahan hidup hingga hari ke-7 sampai 10 setelah penetasan telur (Hutapea & Slamet, 2005). Dengan rendahnya sintasan larva ikan napoleon, salah satu aspek yang perlu dievaluasi adalah keragaman genetiknya

dalam mendukung pembenihan dan untuk menghindari hilangnya sebagian karakter genetik pada benih turunannya (Sugama *et al.*, 1998).

Penurunan karakter genetik akan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan, rentan terhadap serangan penyakit, dan perubahan lingkungan (Leary *et al.*, 1985). DNA dapat digunakan sebagai *marker*, karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan organisme dapat dianalisis dari hampir semua jaringan sebagai sumber material genetik (Hallerman & Beckman *dalam* Thorgaard, 1992). Analisis mt-DNA di bidang perikanan sudah banyak digunakan untuk mengetahui variabilitas genetik suatu populasi, analisis mtDNA lebih sensitif dibandingkan dengan analisis protein yang sudah banyak dilakukan (Iguchi *et al.*, 1997). Tujuan dari percobaan ini untuk mengetahui tentang analisis DNA dengan menggunakan enzim pemotong sehingga dapat menunjukkan polimorfisme genetik pada ikan napoleon. Metode analisis pada tingkat mt-DNA ini biasanya disebut metode *Restriction Fragment Length Polymorfism* (RFLP).

BAHAN DAN TATA CARA

Bahan dan alat

Sampel ikan napoleon yang digunakan berasal dari perairan Labuan Bajo (Nusa Tenggara Timur). Jumlah sampel sebanyak 20 ekor.

Alat yang diperlukan adalah sebagai berikut: thermoblock, stirer, centrifus, autoclave, mikropipet, *effendorf tube*, tip, mesin PCR, elektroforesis mupid-2, gel kamera dan UV transsiluminator, dan inkubator. Sedangkan bahan yang digunakan adalah: ikan napoleon, Primer 16 Sr DNA (F), 16 Sr DNA (R), Chelex 100 10% dalam TE Buffer pH 8,0; Proteinase K, TBE Buffer 1 x pH 8,0; RTG, Agarose 1%; Agarose 1,5%; dan enzim restriksi.

Tata cara

Ekstraksi sampel

Eksraksi sampel dengan menggunakan metode Ovenden (2000) yaitu daging atau sirip ikan napoleon diambil \pm 20 mg dan dimasukkan ke dalam *effendorf tube* yang telah berisi chelex 100 dengan konsentrasi 10% dalam TE buffer pH 8,0 sebanyak 250 μ L. Selanjutnya digerus dan diisi dengan Proteinase K (PK) sebanyak 5 μ L serta di *flushing*. Kemudian sampel diinkubasikan selama 2,5 jam pada suhu 55°C, dan diinkubasi lagi pada suhu 89°C selama 8 menit. Setelah inkubasi sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 7 menit. Supernatan yang terbentuk dilapisan atas diambil sebanyak \pm 200 μ L dan



Gambar 1. Peralatan yang digunakan pada analisis polimorfisme genetik ikan napoleon dengan teknik RFLP

supernatan ini yang merupakan genom DNA dan disimpan di freezer -20°C sebelum digunakan pada tahap berikutnya.

Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR menggunakan metode *Ready To Go (RTG) beads*. Pada metode ini komposisi reaksi terdiri atas bola bead YANG sudah ada dalam *effendorf* ditambahkan H₂O, Primer 16 SrDNA (F) (5'-CGCCTGTTTAACAAAA CAT-3'), 16 SrDNA (R) (5'-CCGGTCTGAACTCAG ATCATGT-3') dan genom DNA. Genom DNA yang telah dicampur dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan jumlah siklus sebanyak 32 dengan waktu amplifikasi selama \pm 2 jam. Hasil PCR amplifikasi kemudian difragmentasi dengan agarose gel 1% menggunakan elektroforesis Mupid-2 dengan arus listrik sebesar 50 volt selama 25 menit. Untuk memperjelas fragmen DNA yang dihasilkan, dilakukan pewarnaan dengan ethidium bromide melalui perendaman selama 15 menit kemudian dibilas dengan *aquades* dengan cara perendaman pula selama 5 menit. Hasil yang diperoleh kemudian didokumentasikan dengan polaroid gel kamera di bawah penyinaran UV transiluminator.

Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

Hasil amplifikasi PCR yang sudah difragmentasi dan menunjukkan pita tunggal dipotong dengan enzim pemotong *Hae III* dan *Hha I*, *Hinf I* dan *Mbo I* dengan komposisi larutan seperti terlihat pada Tabel 1.

Template DNA hasil amplifikasi PCR diambil sebanyak 4 μ L dan dimasukkan ke dalam *effendorf tube* volume 600 μ L, ditambahkan 2 μ L campuran larutan pemotong dan di *flushing* kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 3,5 jam dengan suhu 37°C. Setelah selesai proses inkubasi, *effendorf tube* dimasukkan ke dalam freezer -20°C untuk menghentikan aktifitas enzim dalam pemotongan. Untuk mengetahui hasil pemotongan, maka dilakukan fragmentasi dengan menggunakan agarose 1,5% di dalam elektroforesis yang telah berisi larutan TBE buffer 1 X selama 25 menit. Untuk memperjelas fragmen DNA, agarose tersebut direndam dalam ethidium bromide selama 15 menit, kemudian dibilas dengan *aquades* selama 5 menit. Hasil yang diperoleh selanjutnya didokumentasikan dengan polaroid gel kamera di atas UV transiluminator.

Tabel 1. Komposisi larutan enzim restriksi yang digunakan untuk pemotongan template DNA hasil amplifikasi PCR

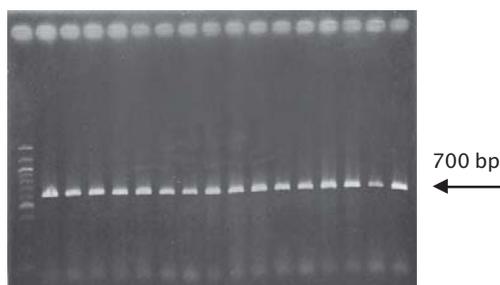
Bahan	Jenis enzim restriksi (pemotong)			
	<i>Hae III</i> (μL)	<i>Hha I</i> (μL)	<i>Hinf I</i> (μL)	<i>Mbo I</i> (μL)
H ₂ O	0,6	1,25	0,6	1,25
Buffer (NE 2)	1,2	-	1,2	0,5 (NE 3)
Buffer (C)	-	0,50	-	-
Enzim restriksi	0,2	0,25	0,2	0,25
Total larutan pemotong	2,0	2,0	2,0	2,0
Template DNA	4,0	4,0	4,0	4,0
Total larutan	6,0	6,0	6,0	6,0

HASIL DAN BAHASAN

Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer 16 SrDNA (F) dan 16 SrDNA (R) mempunyai panjang pita sekitar 700 bp (Gambar 2).

Dari pola pita yang terekspresi menghasilkan pola pita yang jelas. Tingkat ekspresi pita hasil amplifikasi dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu: konsentrasi DNA sampel, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg⁺⁺, dan suhu hibridisasi primer harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita-pita DNA yang utuh dan baik. Keberhasilan teknik ini lebih didasarkan kepada kesesuaian primer dan efisiensi serta optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



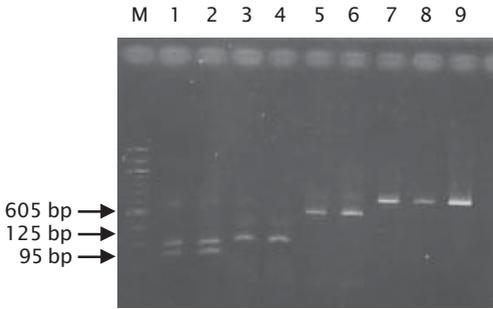
Gambar 2. Pola pita amplifikasi DNA dengan primer 16SrDNA pada ikan Napoleon (*C. undulatus*)

Optimasi PCR meliputi suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak dimungkinkan terjadinya polimerisasi DNA baru. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi yang sesuai, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan dan dipengaruhi oleh panjang serta susunan basa primer. Suhu penempelan ini sebaiknya sekitar 5°C di bawah suhu leleh (Yuwono, 2006).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Hasil pemotongan dari hasil amplifikasi 16SrDNA dengan menggunakan 4 macam enzim yaitu *Hae III*, *Hha I*, *Hinf I*, dan *Mbo I* semuanya mampu terpotong dengan sempurna. Enzim pemotongan *Hae III* dan *Hha I* menghasilkan 2-3 pola pita pemotongan, sedangkan enzim *Hinf I* dan *Mbo I* menghasilkan hanya 2 pola pita pemotongan saja (Gambar 3).

Untuk melihat polimorfisme dalam genom organisme digunakan enzim pemotong tertentu (*restriction enzymes*). Enzim pemotong mempunyai sifat yang spesifik, yaitu enzim ini akan memotong situs tertentu



Gambar 3. Pola pemotongan hasil amplifikasi PCR ikan napoleon (*C. undulatus*) dengan empat enzim restriksi (enzim *Hae III* (1-2); *Hha I* (3-4); *Hinf I* (5-6); dan *Mbo I* (7-8) dan nomor 9 adalah hasil amplifikasi yang tidak dipotong

yang dikenali oleh enzim ini. Situs enzim pemotong dari genom suatu kelompok organisme yang kemudian berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim, atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukurannya dari satu organisme terhadap organisme lainnya. Polimorfisme ini selanjutnya digunakan untuk menghitung keragaman genetik atau membuat pohon filogeni/dendrogram kekerabatan kelompok.

KESIMPULAN

Pemotongan fragmen DNA dengan enzim pemotongan *Hha I* mampu memperlihatkan polimorfisme sehingga dapat dipergunakan sebagai marker untuk melihat keragaman genetik ikan napoleon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Dr. Haryanti, M.S., APU dan Peneliti Kelompok Bioteknologi BBRPBL Gondol atas bimbingannya, dan seluruh rekan-rakan teknisi atas kerjanya.

DAFTAR ACUAN

- Hutapea, J.H., & Slamet, B. 2005. Development of napoleon wrasse, *Cheillinus undulatus* larvae. *World Aquaculture* 2005. Nusa dua Bali. Indonesia. May 9-13, 10 pp.
- Iguchi, K., Tanimura, Y., Takeshima, H., & Nishida, M. 1999. Genetic variation and geographic population structure of amphidromous ayu *Plecoglossus altivelis* as Examined by Mitochondrial DNA Sequencing. *Fisheries Science*, 65(1): 63-67.
- Leary, F.L., Allendorf, F.W., & Nudsen, K.L. 1985. Developmental instability as an indicator of reduced genetic variation in hatchery trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 114: 230-235.
- Slamet, B., Hersapto, & Tridjoko. 1999. Pematangan induk ikan Napoleon, *Cheillinus undulatus* dengan perbandingan pakan segar yang berbeda. *Seminar Nasional Penelitian dan Diseminasi Teknologi Budidaya Laut dan Pantai*. Jakarta. p. 253-256.
- Slamet, B., & Sutarmat, T. 2001. Pematangan gonad dan pemijahan induk ikan napoleon dengan rangsangan suntikan hormon LHRH-a. *Prosiding Simposium Pemuliaan VI*. Malang, p. 156-159.
- Sugama, K., Tridjoko, Haryanti, Moria, S.B., & Cholik, F. 1998. Genetic variation and population structure in the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* throughout its range in Indonesian waters. *Indonesian Fisheries Research Journal*, 5(1): 32-38.
- Thorgaard, G.H. 1992. Application of genetic technologies to rainbow trout. *Aquaculture*, 200: 85-97.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan aplikasi *Polymerase Chain Reaction*. Panduan Eksperimen PCR untuk Memecahkan Masalah Biologi Terkini. Penerbit Andi, Yogyakarta, 240 hlm.