

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

APLIKASI TEKNIK *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA* (PCR-RAPD) SEBAGAI PENANDA GENETIK PADA IKAN BETUTU (*Oxyeleotris marmorata*)

Sri Sundari, Sudarmaji, dan Deni Irawan

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

E-mail: sri_sundari13@yahoo.co.id

ABSTRAK

Ikan betutu merupakan ikan yang memiliki nilai ekonomis tinggi untuk konsumsi lokal dan komoditas ekspor. Dalam rangka pelestarian dan pengembangan budidaya ikan betutu, maka perlu dilakukan evaluasi keragaman genetik. Kegiatan ini bertujuan untuk mendapatkan informasi aplikasi teknik PCR-RAPD sebagai penanda genetik pada ikan betutu sebagai dasar untuk analisis keragaman genetik ikan Betutu. Dalam kegiatan ini primer yang digunakan adalah OPC-4 dan OPC-8. Sampel yang digunakan adalah sirip ikan betutu yang berasal dari tiga populasi yaitu Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Primer OPC-4 menghasilkan amplifikasi 14-21 band/pita DNA dengan ukuran 300-2.100 bp, sedangkan primer OPC-8 menghasilkan amplifikasi 14-15 band dengan ukuran 330-2.100 bp.

KATA KUNCI: PCR; RAPD; ikan betutu

PENDAHULUAN

Ikan betutu (*Oxyeleotris marmorata*) merupakan salah satu jenis ikan liar air tawar yang mempunyai potensi cukup besar sebagai komoditas ekspor ke berbagai negara. Namun, hingga kini ketersediaannya masih terbatas karena masih bergantung kepada hasil penangkapan di alam (Nyuwan, 2000). Habitat atau tempat tinggal ikan betutu tersebar luas, meliputi perairan air tawar di daerah beriklim tropis atau subtropis. Ikan betutu menyukai tempat yang arusnya tenang dan agak berlumpur seperti rawa, danau, dan muara sungai.

Studi genetika pada suatu populasi organisme dimaksudkan untuk memberikan evaluasi mengenai variasi genetik populasi tersebut. Jika dibandingkan dengan variasi morfologi, data hasil studi variasi genetik relatif bebas dari pengaruh faktor lingkungan. Studi tentang variasi genetik merupakan aspek yang sangat penting dalam pelestarian dan juga pemanfaatan plasma nutfah. Penanda genetik yang digunakan untuk menganalisis genom adalah penanda morfologi, penanda protein, dan penanda DNA. Penanda morfologi dan penanda protein memiliki kelemahan karena ciri morfologi dan produk protein masih dapat dipengaruhi oleh lingkungan sehingga hasil analisisnya kurang akurat (Chao-zhi *et al.*, 2003). Keterbatasan tersebut teratasi melalui perkembangan penanda DNA salah satunya *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

Penanda DNA dapat menghitung efek seleksi, tidak terpengaruh oleh keadaan lingkungan, dan tersedia hampir dalam jumlah tak terbatas. Oleh karena itu, metode penanda DNA merupakan alat yang menjanjikan untuk evaluasi keanekaragaman genetik plasma nutfah (Chtourou-Ghorbel *et al.*, 2001).

PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara menyintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycler*. PCR terbagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap denaturasi, *annealing* (penempelan), dan *extension* (pengembangan) (Baker & Birt, 2000). Pada tahap denaturasi terjadi pemanasan yang mengakibatkan utas ganda DNA menjauh dan terpisah. Apabila DNA target banyak mengandung nukleotida G/C, suhu denaturasi dinaikkan. Denaturasi yang tidak lengkap dapat mengakibatkan DNA mengalami renaturasi yaitu membentuk DNA untai ganda lagi, hal ini akan menyebabkan proses PCR gagal. Kemudian terjadi proses penempelan primer pada kedua ujung DNA pada suhu *annealing*. Pada tahap akhir terjadi proses pemanjangan hingga membentuk pasangan basa pada DNA target. Sebagai penanda genetik, RAPD dikenal sebagai penanda yang relatif murah dan tidak memerlukan pengetahuan tentang sekuens DNA target. Di akhir PCR, akan ada sejumlah

besar band/pita DNA atau fragmen pendek DNA hasil amplifikasi. Polimorfisme hasil amplifikasi itu akan teramati melalui hasil elektroforesis (Chiari & Sodre, 2001).

Pada penelitian ini akan dilakukan uji RAPD pada ikan betutu dengan tujuan untuk mendapatkan informasi hasil aplikasi teknik PCR-RAPD sebagai penanda genetik pada ikan betutu. Data dasar ini nantinya dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik dan jarak genetik antar populasi ikan betutu.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Ikan betutu yang dianalisis berasal dari tiga populasi yang berbeda yaitu Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Masing-masing populasi diambil 10 ekor. Sampel ikan dipotong bagian siripnya, kemudian disimpan dalam larutan alkohol 70%. Bahan yang digunakan adalah: TNES urea, proteinase K, natrium asetat, *master mix PCR*, etanol, *phenol chloroform isoamylalcohol*, TBE buffer, TE buffer, primer OPC, *aga-rose*, dan *Ethidium bromide*.

Alat yang diperlukan adalah sebagai berikut: *waterbath*, mesin PCR, geldoc, mikropipet, pipet tips, timbangan, vortex, sentrifus, elektroforesis mupid-2, magnetic stirrer, *hot plate*.

Metode

Ekstraksi DNA

Bagian dari badan ikan yang diekstraksi adalah potongan sirip dengan bobot 5-10 mg. Selanjutnya, sirip dibilas dengan akuades sebanyak dua kali kemudian dikeringkan dengan tisu. Sirip dimasukkan ke dalam mikrotube kemudian ditambahkan 500 μ L larutan TNES urea dan 10 μ L proteinase k lalu di-vortex hingga homogen dan diinkubasi selama \pm 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, campuran tersebut di-vortex dan ditambahkan dengan larutan *phenol chloroform isoamylalcohol* sebanyak 1.000 μ L lalu di-vortex sampai homogen dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke tabung yang baru lalu ditambahkan 10 μ L natrium asetat dan 1.000 μ L etanol. Setelah itu, tabung dikocok hingga terlihat benang halus berwarna putih. Selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi maka akan terbentuk endapan DNA. Endapan DNA dipisahkan dari larutan dan dikering-anginkan. Setelah itu, DNA ditambahkan 50 μ L TE buffer (Nugroho *et al.*, 1997).

Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi PCR dilakukan dengan komposisi bahan sebagai berikut: 1 μ L DNA; 0,5 μ L primer; 10 μ L *master mix PCR*; dan 8,5 μ L akuades sehingga total volume menjadi 20 μ L. Primer yang digunakan adalah OPC-4 dan OPC-8. Setelah itu, dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan satu siklus denaturasi pada suhu 94°C selama dua menit, 40 siklus penggandaan yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 36°C selama satu menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama dua menit. Kemudian satu siklus elongasi akhir pada suhu 72°C selama tujuh menit dan proses penstabilan pada suhu 4°C selama tiga menit (Nugroho *et al.*, 1997).

Elektroforesis

Gel agarosa dibuat terlebih dahulu dengan konsentrasi 1,5% dengan mencampurkan bubuk agarosa dengan larutan TBE yang diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan pada suhu 150°C sampai homogen. Selanjutnya ditambahkan etidium bromida sebanyak 3 μ L. Agarosa dituang dalam cetakan yang berlubang. Gel agarosa diletakkan pada alat elektroforesis sampai gel terendam. Sekuen DNA sebanyak 9 μ L ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 3 μ L kemudian dimasukkan ke dalam lubang cetakan gel. Elektroforesis berlangsung selama \pm 45 menit pada tegangan 100 volt dan suhu ruang. Selanjutnya gel agarosa diamati menggunakan geldoc.

HASIL DAN BAHASAN

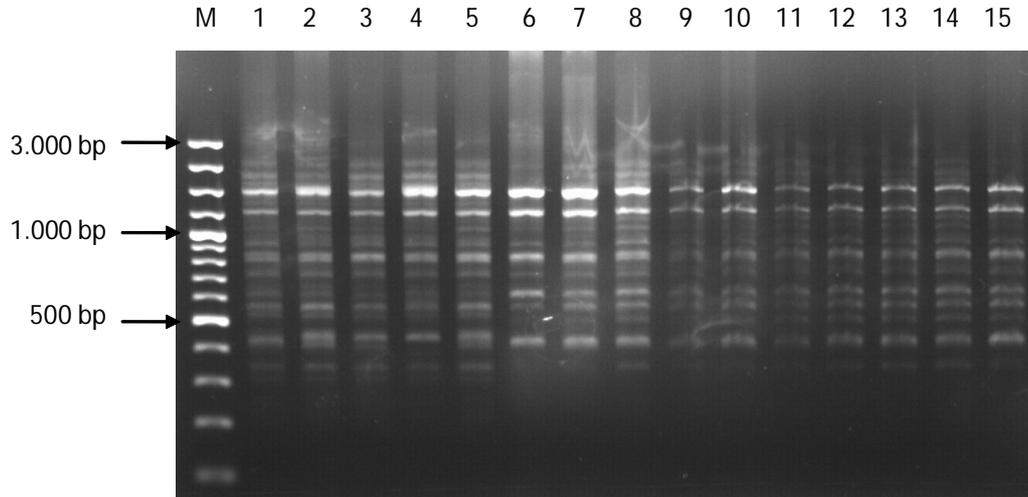
Profil RAPD meliputi jumlah dan ukuran band DNA. Hasil amplifikasi dengan menggunakan dua primer (OPC-4 dan OPC-8) menunjukkan hasil yang bervariasi (Tabel 2-3). Amplifikasi DNA pada tiga populasi ikan betutu dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

Primer OPC-4 menghasilkan amplifikasi dengan jumlah band antara 14-21 dan ukuran 300-2.100 bp (Gambar 1). Primer OPC-8 menghasilkan amplifikasi dengan jumlah band antara 14-15 dan ukuran 330-2.100 bp (Gambar 2).

Hasil amplifikasi setiap primer memiliki karakter yang berbeda sehingga jumlah dan ukuran band yang muncul pun berbeda. Pemilihan primer pada RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme band yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan sendiri sehingga band dari DNA yang diamplifikasi oleh primer berbeda menghasilkan polimorfik dengan jumlah band dan berat molekul berbeda (Roslim, 2001). Ukuran band yang muncul berada pada kisaran 300-2.100 bp, merupakan ukuran yang pada umumnya muncul pada amplifikasi DNA ikan

Tabel 1. Deskripsi primer yang digunakan pada analisis RAPD ikan betutu

Primer	Urutan basa (5'-3')
OPC-4	CCGCATCTAC
OPC-8	TGGACCGGTG

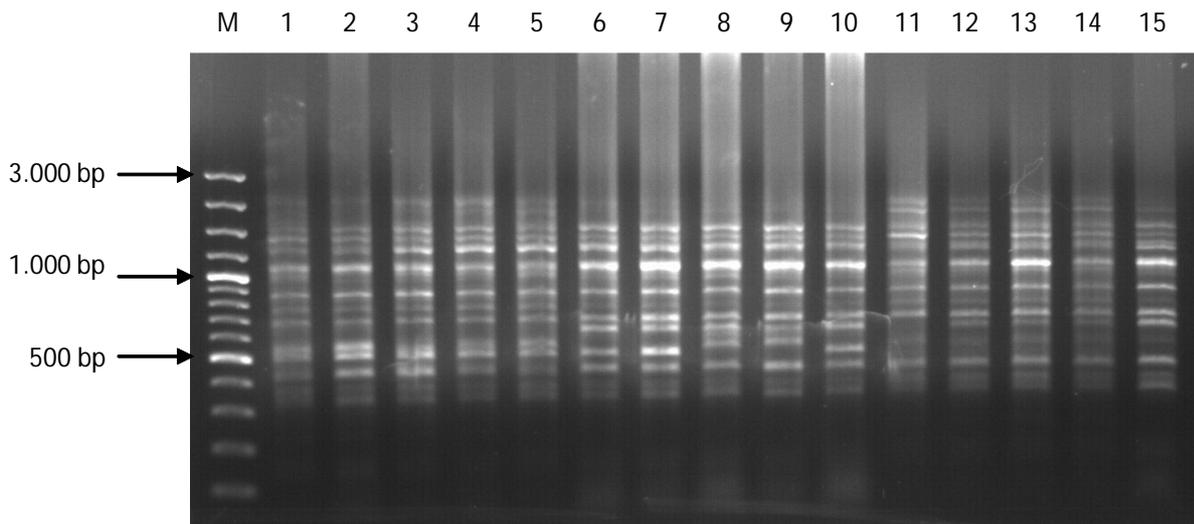


Gambar 1. Hasil amplifikasi OPC-4 pada DNA ikan betutu populasi Sumatera (1-5), Jawa (6-10), dan Kalimantan (11-15); M = marker DNA ladder.

Tabel 2. Ukuran band berdasarkan hasil amplifikasi ikan betutu dengan primer OPC-4

Baris ke-	Ukuran band (bp)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100
2	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.500	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800
3	1.600	1.500	1.600	1.500	1.600	1.150	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600
4	1.500	1.350	1.500	1.350	1.500	1.150	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
5	1.350	1.250	1.350	1.250	1.350	1050	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250
6	1.250	1.150	1.250	1.150	1.250	950	1.150	1.150	1.150	1.150	1.150	1.150	1.150	1.150	1.150
7	1.150	1.050	1.150	1.050	1.050	850	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050	1.050
8	1.050	1.000	1.050	1.000	1.050	800	1.000	1.000	1.000	1.000	950	950	1.000	1.000	950
9	1.000	950	1.000	950	1.000	730	950	950	950	950	850	850	950	950	850
10	950	850	950	850	950	625	850	850	850	850	800	800	850	850	800
11	850	800	850	800	850	575	800	800	800	800	780	780	800	800	780
12	800	730	800	730	800	500	730	780	780	780	730	730	780	780	730
13	730	675	730	675	730	420	625	730	730	730	625	625	730	730	625
14	675	625	675	625	675	330	575	625	625	625	575	575	625	625	575
15	625	575	625	575	625		500	575	575	575	500	500	575	575	500
16	575	525	575	525	575		420	500	500	500	420	420	500	500	420
17	525	440	525	440	525		330	420	420	420	330	330	420	420	330
18	420	400	440	330	440			330	330	330			330	330	
19	330	330	400	300	400										
20	300	300	330		330										
21			300		300										

Keterangan: Arah horisontal menunjukkan nomor sampel (DNA ikan betutu populasi Sumatera (1-5), Jawa (6-10), dan Kalimantan 11-15). Arah vertikal menunjukkan nomor urut band/pita DNA



Gambar 2. Hasil amplifikasi OPC-8 pada DNA ikan betutu populasi Sumatera (1-5), Jawa (6-10), dan Kalimantan (11-15); M = marker DNA ladder.

Tabel 3. Ukuran band berdasarkan hasil amplifikasi ikan betutu dengan primer OPC-8

Baris ke-	Ukuran band (bp)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100
2	1.600	1.600	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800
3	1.400	1400	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600
4	1.300	1.300	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400
5	1.100	1.100	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300	1.300
6	1.000	950	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100
7	850	850	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	750	750	850	850	850	850	850	850	850	750	850	850	850	850	850
9	700	700	750	750	750	750	750	750	750	700	750	750	750	750	750
10	550	550	700	700	700	700	700	700	700	600	700	700	700	700	700
11	500	500	550	550	550	600	600	600	600	500	550	600	600	600	600
12	420	420	500	500	500	500	500	550	550	420	420	550	550	550	550
13	380	380	420	420	420	420	420	420	420	380	380	420	420	420	420
14	330	330	380	380	380	380	380	380	380	330	330	380	380	380	380
15			330	330	330	330	330	330	330			330	330	330	330

Keterangan: Arah horisontal menunjukkan nomor sampel (DNA ikan betutu populasi Sumatera (1-5), Jawa (6-10), dan Kalimantan (11-15)). Arah vertikal menunjukkan nomor urut band/pita DNA

air tawar menggunakan metode RAPD. Menurut Liu *et al.* (1999), ukuran fragmen pada jenis ikan air tawar antara 200-1.500 bp.

KESIMPULAN

Teknik PCR RAPD dapat diaplikasikan sebagai penanda genetik pada ikan betutu. Primer OPC-4 dan OPC-8 dapat mengamplifikasi DNA ikan betutu dengan jumlah band antara 14-21 dengan ukuran 300-2.100 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada bapak Prof. Dr. Brata Pantjara, selaku Kepala Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Bogor; Bapak Drs. Jojo Subagja, M.Si., selaku ketua kelompok peneliti perbenihan dan genetika populasi; Bapak Vitas Atmadi Prakoso, S.Pi., selaku kepala Laboratorium Biologi Molekuler, serta seluruh peneliti dan teknisi genetik atas bantuan dan kerja samanya.

DAFTAR ACUAN

- Baker, A.J. & Birt, P. (2000). *Polymerase chain reaction*. In *Molecular Methods in Ecology* (Ed.) Baker, A.J. Blackwell Science Ltd. Oxford, p. 50-63.
- Chao-Zhi, M.A., Ting-Dong, F., Tuevesson, S., & Gertsson, B. (2003). Genetic Diversity of Chinese and Swedish Rapeseed (*Brassica napus* L.) Analyzed by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRRs). *Agricultural Sciences in China*, 2(2), 137-143.
- Chiari, L. & Sodre, L.M.K. (2001). Study of Eight Species of the Anostomidae family (*Pisces, Characiformes*) by RAPD Analysis. *Maringa*, 23(2), 445-451.
- Chtourou-Ghorbel, N., Launga, B., Combes, D., & Marrakchi, M. (2001). Comparative studies in the genus *Lathyrus* using RFLP and RAPD markers. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2, 62-68.
- Liu, Z.J., Li, P., Argue, B.J., & Dunham, R.A. (1999). Random amplified polymorphic DNA makers: Usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174, 59-68.
- Nugroho, E., Takagi, M., & Taniguchi, N. (1997). Practical manual on detection of DNA polymorphism in fish population study. *Buletin of Marine Sciences and Fisheries*, 17, 109-129.
- Nyuwan, S.B. (2000). Ikan betutu masih menangkap dari alam. *Trubus* Juli 2000.
- Roslim, D.I. (2001). *Kemiripan genetik tiga populasi kelapa dari tiga pulau dengan penanda RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)*. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.