

## SCREENING PRIMER PADA ANALISA RAPD GENETIK IKAN UCENG (*Nemachilus* sp.) POPULASI TEMANGGUNG, PURWOKERTO, CIJERUK, DAN CIAMPEA

Sri Sundari dan Bambang Priadi

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

E-mail: [sri\\_sundari13@yahoo.co.id](mailto:sri_sundari13@yahoo.co.id)

### ABSTRAK

Ikan uceng termasuk ikan yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi di beberapa daerah di Indonesia. Dalam rangka pelestarian dan pengembangan budidaya ikan uceng maka dilakukan evaluasi keragaman genetik. Kegiatan ini bertujuan untuk mendapatkan primer yang tepat untuk analisis Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) genetik ikan uceng sebagai dasar untuk analisis keragaman genetik ikan uceng. Dalam penelitian ini primer yang digunakan adalah primer OPA-01—10. Sampel yang digunakan adalah sirip ikan uceng yang berasal dari Temanggung, Purwokerto, Cijeruk, dan Ciampea. Berdasarkan hasil *screening* terhadap 10 jenis primer, maka didapatkan primer OPA-08 yang dapat mengamplifikasi DNA ikan uceng dengan jumlah fragmen antara 5-16 dan ukuran band/pita DNA 220-3.000 bp.

**KATA KUNCI:** genetik; ikan uceng; amplifikasi

### PENDAHULUAN

Ikan uceng sebagai sumber daya perikanan di perairan umum dapat dibagi dalam dua bagian yaitu yang dimanfaatkan untuk dikonsumsi sebagai sumber protein hewani dan diperdagangkan sebagai ikan hias (Sinaga, 1995). Keberadaan ikan uceng di perairan umum sudah semakin jarang ditemukan, padahal ikan uceng ini sangat digemari di berbagai kalangan masyarakat karena rasanya sangat gurih dan mengandung banyak asam lemak tidak jenuh, juga berkalori tinggi (Supangat, 1995). Ikan uceng merupakan ikan liar dan termasuk salah satu ikan yang tahan hidup pada kandungan oksigen rendah dan dapat hidup pada kekeruhan air yang tinggi. Ikan uceng hidup di bebatuan dan air yang mengalir agak deras sebagai perlindungan hidupnya (Sinaga, 1995).

Keberhasilan upaya domestikasi ikan uceng harus ditunjang teknologi dari berbagai disiplin ilmu, sehingga pengembangan dapat berkelanjutan dan terjaga kelestarian sumber daya genetik di lingkungan alamnya. Salah satu aspek yang mempunyai peranan penting dalam pengembangan domestikasi adalah penyediaan benih maupun persiapan induk yang berkualitas baik untuk budidaya. Langkah awal yang perlu dilakukan adalah mengkarakterisasi secara genetik stok ikan uceng.

*Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan metode yang banyak digunakan untuk

mengidentifikasi keragaman genetik pada tingkat intraspesies maupun antarspesies berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Qian *et al.*, 2001). Teknik ini mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak. Umumnya masing-masing primer menyebabkan amplifikasi beberapa lokus (Williams *et al.*, 1990). Teknik RAPD tidak memerlukan informasi awal mengenai urutan genom organisme yang diuji. Walaupun metode RAPD relatif cepat, murah, dan gampang dilaksanakan dibandingkan metode marka lain, konsistensi atau *reproducibility* hasil PCR menjadi perhatian sejak dipublikasikannya teknik ini. Primer RAPD dapat tidak cocok secara sempurna pada urutan penempelan primer, akibatnya amplifikasi pada beberapa siklus mungkin tidak terjadi, sehingga band/pita DNA tetap samar atau bahkan amplifikasi tidak terjadi jika primer tidak berhasil menempel pada DNA cetakan (Lambooy, 1994).

Tujuan kegiatan ini untuk mencari primer yang sesuai sehingga dapat mengamplifikasi DNA ikan uceng.

### BAHAN DAN METODE

#### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan sebagai sampel adalah sirip ikan uceng yang berasal dari empat populasi yaitu Temanggung, Purwokerto, Cijeruk, dan Ciampea

masing-masing diambil sebanyak 10 ekor. Sampel disimpan dalam larutan alkohol 70%. Pengerjaan sampel dilakukan selama bulan September 2016 di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar, Bogor. Bahan yang digunakan adalah: TNES urea, proteinase K, natrium asetat, etanol, *Phenol Chloroform Isoamylalcohol*, TBE *buffer*, TE *buffer*, primer OPA-01—10, *ethidium bromide*, KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kit, *agarose*, *loading dye*, dan *marker*.

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

### Ekstraksi DNA

Potongan sirip sebanyak 5-10 mg dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 mL yang telah berisi 500  $\mu$ L larutan TNES urea. Proteinase K sebanyak 10  $\mu$ L ditambahkan ke dalam larutan sampel kemudian di-vortex sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama  $\pm$  24 jam. Larutan *Phenol Chloroform Isoamylalcohol* sebanyak 1.000  $\mu$ L ditambahkan dalam larutan sampel dan di-vortex sampai homogen dan disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke dalam mikrotube yang baru, kemudian ditambahkan 1.000  $\mu$ L larutan *ethanol* 90% dan 10  $\mu$ L larutan natrium asetat. Larutan di-vortex, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan DNA dipisahkan dari larutan dan dikeringkan pada suhu ruang. Pelet DNA dilarutkan dalam 50  $\mu$ L *Tris-EDTA* (TE) *buffer*. Pelet DNA dapat disimpan pada suhu 4°C. Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan metode *Phenol-Chloroform* (Nugroho *et al.*, 1997).

### Optimasi Primer

Optimasi primer dilakukan melalui *screening* 10 primer yaitu OPA-01—10 pada proses PCR sampel dengan komposisi bahan sebagai berikut: 1  $\mu$ L DNA; 0,5  $\mu$ L primer; 10  $\mu$ L *master mix*; dan 8,5  $\mu$ L *aquadest*. Setelah itu, dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan satu siklus denaturasi pada suhu 94°C selama dua menit, 40 siklus pengandaan 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. Selanjutnya satu siklus terakhir pada suhu 72°C selama tujuh menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel *agarose* 1,5% dalam *Tris-Boric-EDTA* (TBE) *buffer*. Hasilnya diamati dengan *geldoc*.

### Amplifikasi Sampel

Proses amplifikasi sampel pada keempat populasi ikan uceng dilakukan menggunakan primer hasil *screening*. Proses PCR dilakukan dengan rangkaian seperti pada saat penentuan optimasi primer.

### HASIL DAN BAHASAN

Hasil elektroforesis dari tahapan optimasi primer dapat dilihat pada Gambar 1. Nomor 1 sampai dengan 10 menunjukkan penggunaan primer OPA-01 sampai OPA-10. Nomor 11 adalah *marker DNA ladder*. Berdasarkan hasil elektroforesis maka terpilih OPA-08 sebagai primer yang digunakan untuk amplifikasi ikan uceng. Adapun susunan basa primer OPA-08 adalah GTG-ACG-TAG-G.

Hasil elektroforesis ikan uceng populasi Temanggung dapat dilihat pada Gambar 2.

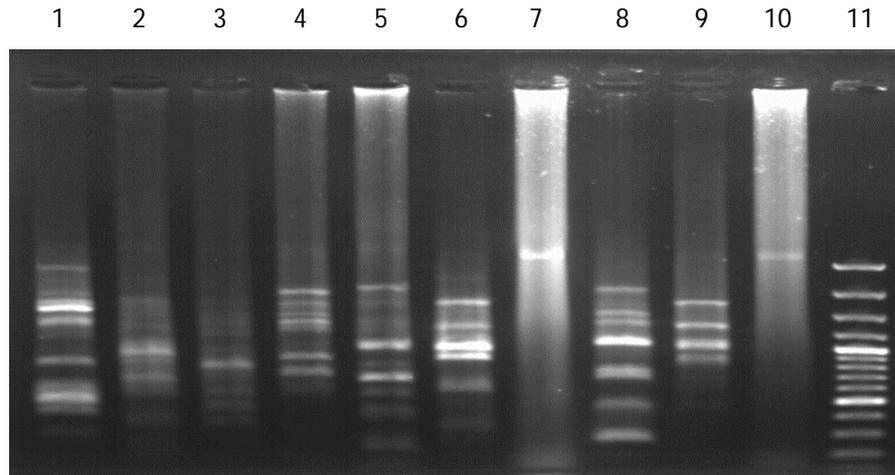
Berdasarkan Gambar 2 diperoleh data ukuran pita/band DNA untuk ikan uceng Temanggung seperti pada Tabel 1.

Hasil elektroforesis ikan uceng populasi Purwokerto dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3 diperoleh data ukuran band untuk ikan uceng Purwokerto seperti pada Tabel 2.

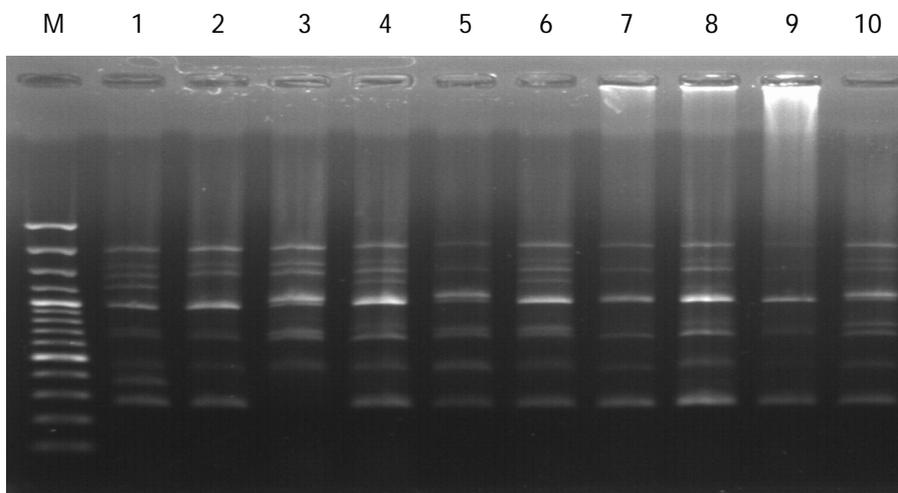
Hasil elektroforesis ikan uceng populasi Cijeruk dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan Gambar 4 diperoleh data ukuran pita DNA untuk ikan uceng Cijeruk seperti pada Tabel 3.

Hasil elektroforesis ikan uceng populasi Ciampea dapat dilihat pada Gambar 5. Berdasarkan Gambar 5 diperoleh data data ukuran pita DNA untuk ikan uceng Ciampea seperti pada Tabel 4.

DNA teramplifikasi pada setiap lokus populasi dan bervariasi dalam jumlah situs amplifikasinya. Pemilihan primer pada RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme fragmen yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan sendiri sehingga fragmen dari DNA yang diamplifikasi oleh primer berbeda menghasilkan polimorfik dengan jumlah fragmen dan berat molekul berbeda (Roslim, 2001). Ikan uceng populasi Temanggung menghasilkan amplifikasi dengan jumlah fragmen 5-10 dengan ukuran fragmen 280-2.000 bp (Tabel 1). Ikan uceng populasi Purwokerto menghasilkan amplifikasi dengan jumlah fragmen 6-12 dengan ukuran fragmen 280-2.000 bp (Tabel 2). Ikan uceng populasi Cijeruk menghasilkan amplifikasi dengan jumlah fragmen 11-16 dengan ukuran fragmen 220-3.000 bp (Tabel 3). Sedangkan ikan uceng populasi Ciampea menghasilkan amplifikasi



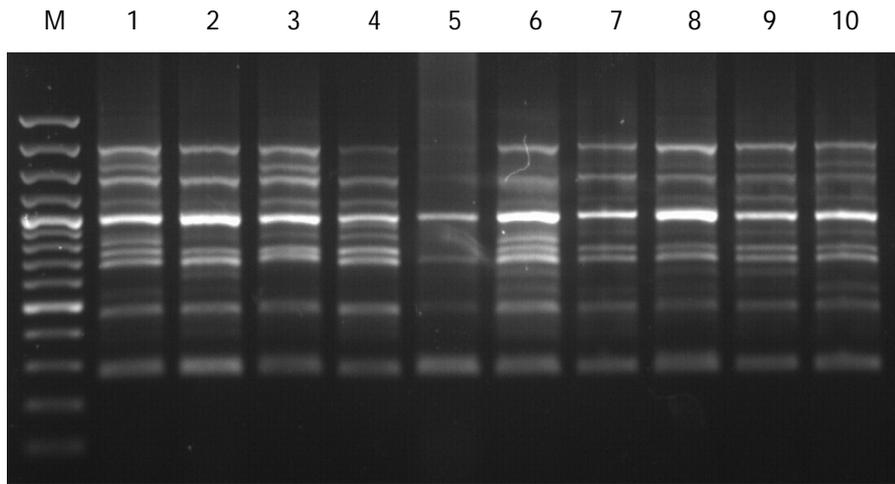
Gambar 1. Hasil elektroforesis optimasi primer OPA-01-10 pada ikan uceng.



Gambar 2. Hasil elektroforesis primer OPA-08 pada ikan uceng populasi Temanggung.

Tabel 1. Hasil pembacaan pita DNA ikan uceng Temanggung dengan primer OPA-08

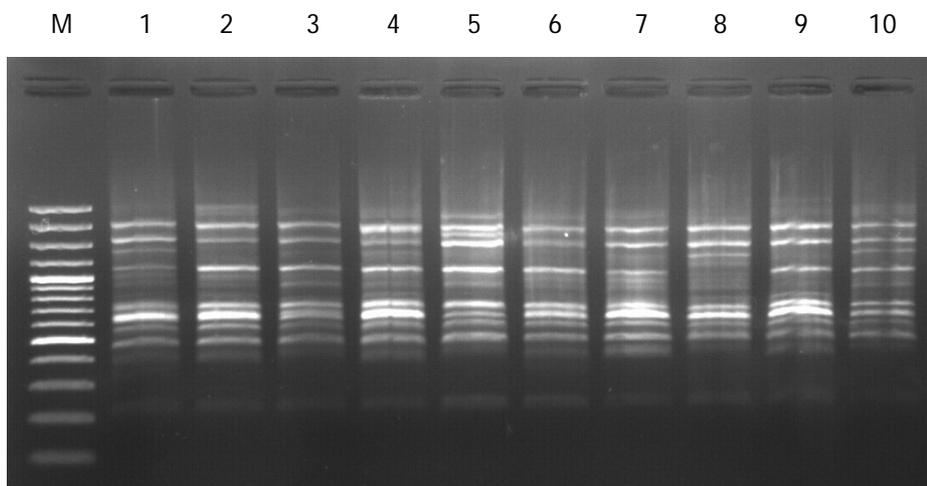
| Ukuran <i>band</i> (bp) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                       | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
| 2.000                   | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 |
| 1.650                   | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.450 | 1.650 | 1.450 | 1.650 | 1.450 | 1.650 |
| 1.450                   | 1.450 | 1.450 | 1.450 | 1.050 | 1.450 | 1.000 | 1.450 | 1.000 | 1.450 |
| 1.200                   | 1.000 | 1.050 | 1.200 | 1.000 | 1.200 | 680   | 1.100 | 680   | 1.050 |
| 1.000                   | 720   | 1.000 | 1.000 | 720   | 1.000 | 480   | 1.000 | 480   | 1.000 |
| 720                     | 680   | 800   | 750   | 680   | 720   | 280   |       | 280   | 750   |
| 680                     | 480   | 720   | 680   | 480   | 680   |       |       |       | 680   |
| 480                     | 280   | 680   | 480   | 280   | 480   |       |       |       | 480   |
| 380                     |       | 480   | 280   |       | 280   |       |       |       | 280   |
| 280                     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |



Gambar 3. Hasil elektroforesis primer OPA-08 pada ikan uceng populasi Purwokerto.

Tabel 2. Hasil pembacaan pita DNA ikan uceng Purwokerto dengan primer OPA-08

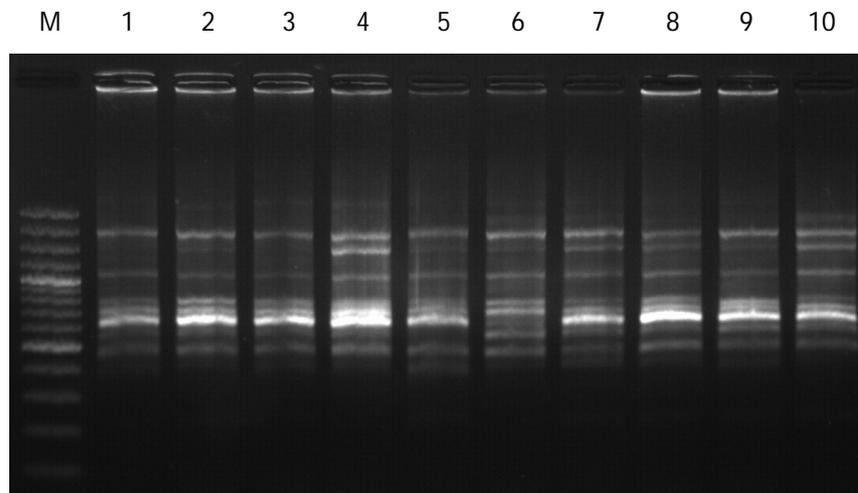
| Ukuran band (bp) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
| 2.000            | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 |
| 1.650            | 1.450 | 1.650 | 1.650 | 1.450 | 1.450 | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 |
| 1.450            | 1.150 | 1.450 | 1.450 | 1.000 | 1.150 | 1.450 | 1.450 | 1.450 | 1.450 |
| 1150             | 1.000 | 1.150 | 1.150 | 700   | 1.000 | 1.150 | 1.150 | 1.150 | 1.150 |
| 1.000            | 880   | 1.000 | 1.000 | 480   | 820   | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 880              | 780   | 880   | 950   | 280   | 780   | 880   | 880   | 880   | 880   |
| 820              | 700   | 780   | 880   |       | 700   | 780   | 780   | 780   | 780   |
| 780              | 630   | 720   | 780   |       | 630   | 700   | 700   | 700   | 700   |
| 700              | 530   | 480   | 700   |       | 550   | 550   | 630   | 630   | 550   |
| 550              | 480   | 280   | 480   |       | 480   | 480   | 550   | 550   | 480   |
| 480              | 280   |       | 280   |       | 280   | 280   | 480   | 480   | 280   |
| 280              |       |       |       |       |       |       | 280   | 280   |       |



Gambar 4. Hasil elektroforesis primer OPA-08 pada ikan uceng populasi Cijeruk.

Tabel 3. Hasil pembacaan pita DNA ikan uceng Cijeruk dengan primer OPA-08

| Ukuran <i>band</i> (bp) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                       | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
| 2.000                   | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 |
| 1.650                   | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 | 1.650 |
| 1.450                   | 1.150 | 1.450 | 1.450 | 1000  | 1.150 | 1.450 | 1.450 | 1.450 | 1.450 |
| 1.150                   | 1.000 | 1.150 | 1.150 | 700   | 1.000 | 1.150 | 1.150 | 1.150 | 1.150 |
| 1.000                   | 880   | 1.000 | 1.000 | 480   | 820   | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 880                     | 780   | 880   | 950   | 280   | 780   | 880   | 880   | 880   | 880   |
| 820                     | 700   | 780   | 880   |       | 700   | 780   | 780   | 780   | 780   |
| 780                     | 630   | 720   | 780   |       | 630   | 700   | 700   | 700   | 700   |
| 700                     | 530   | 480   | 700   |       | 550   | 550   | 630   | 630   | 550   |
| 550                     | 480   | 280   | 480   |       | 480   | 480   | 550   | 550   | 480   |
| 480                     | 280   |       | 280   |       | 280   | 280   | 480   | 480   | 280   |
| 280                     |       |       |       |       |       |       | 280   | 280   |       |



Gambar 5. Hasil elektroforesis primer OPA-08 pada ikan uceng populasi Ciampea.

Tabel 4. Hasil pembacaan pita DNA ikan uceng Ciampea dengan primer OPA-08

| Ukuran <i>band</i> (bp) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                       | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
| 2.000                   | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 2.800 | 2.800 | 2.500 | 2.000 | 2.800 |
| 1.100                   | 1.500 | 1.100 | 1.500 | 1.500 | 2.000 | 2.000 | 2.000 | 1.500 | 2.000 |
| 800                     | 1100  | 800   | 1.100 | 1.100 | 1.500 | 1.500 | 1.500 | 1.100 | 1.500 |
| 720                     | 800   | 720   | 1.050 | 800   | 1.100 | 1.100 | 1.100 | 800   | 1.100 |
| 650                     | 720   | 650   | 800   | 720   | 800   | 800   | 800   | 720   | 800   |
| 580                     | 650   | 580   | 720   | 650   | 720   | 720   | 720   | 650   | 720   |
| 480                     | 580   | 480   | 650   | 480   | 650   | 650   | 650   | 580   | 650   |
| 420                     | 480   | 420   | 580   | 420   | 580   | 580   | 580   | 480   | 580   |
|                         | 420   |       | 480   |       | 480   | 480   | 480   | 420   | 480   |
|                         |       |       | 420   |       | 420   | 420   | 420   |       |       |

dengan jumlah fragmen 8-10 dengan ukuran fragmen 420-2.800 bp (Tabel 4). Ukuran fragmen yang muncul berada pada kisaran 250-1.600 bp, merupakan ukuran yang pada umumnya muncul pada amplifikasi DNA ikan air tawar menggunakan metode RAPD.

#### KESIMPULAN

Screening primer untuk analisis RAPD menghasilkan primer OPA-08 yang dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik ikan uceng. Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer OPA-08 pada populasi ikan uceng populasi Temanggung, Purwokerto, Cijeruk, dan Ciampea menghasilkan jumlah fragmen antara 5-16 dan ukuran pita DNA 220-3.000 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 genetika populasi dan perbenihan, serta seluruh peneliti dan teknisi genetik atas bantuan dan kerja samanya.

#### DAFTAR ACUAN

Lamboy, W.F. (1994). Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: *The Effects of PCR Artifact. Genome Res.*, 4, 31-37.

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.

Qian, W., Ge, S., & Hong, D.Y. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *oryza granulate* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. App. Genet.*, 102, 440-449.

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.

Sinaga, T.P. (1995). *Bioekologi komunitas ikan di Sungai Banjaran Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah*. Tesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.

Supangat. (1995). *Studi analisis isi lambung, sifat pertumbuhan, fekunditas, indeks kematangan gonad dan rasio kelamin ikan uceng di Sungai Logawa, Purwokerto, Kabupaten Banyumas*. Skripsi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids. Res.*, 18, 6531-6535.