

VARIASI GENETIK IKAN BAUNG, *Mystus nemurus* DARI BEBERAPA WADUK DI JAWA YANG DIANALISIS DENGAN MARKER MITOKONDRIA D-LOOP

Estu Nugroho, Wartono Hadie, dan Sudarto

ABSTRAK

Variasi genetik beberapa ras ikan baung yang dikoleksi dari Jatiluhur, Cirata, Wonogiri, dan Wadaslintang telah diteliti dengan menggunakan polimorfisme mitokondria DNA D-loop. Sembilan komposit haplotipe terdeteksi dengan menggunakan 4 enzim restriksi yaitu *Rsa* I, *Hae* III, *Mbo* I, dan *Alu* I pada sekuens D-loop. Diversitas haplotipe rata-rata adalah 0,606. Terdapat perbedaan nyata secara genetik yang diamati antara populasi baung yang diuji.

ABSTRACT: *Genetic divergence of catfish, **Mystus nemurus**, collected from several reservoirs of Java analyzed by mitochondria D-loop markers. By: Estu Nugroho, Wartono Hadie, and Sudarto*

*Aim of this research is to evaluate genetic variability of catfish, **Mystus nemurus**. Collected from Jatiluhur, Cirata, Wonogiri, and Wadaslintang reservoirs, which was examined using polymorphism of the mitochondria DNA (MtDNA) D-loop markers. Nine composite haplotypes were detected following digestion of D-loop sequences with four endonucleases: **Rsa** I, **Hae** III, **Mbo** I, and **Alu** I. Average haplotype diversity was 0.606, showing a significant genetic difference among **Mystus nemurus** populations.*

KEYWORDS: *genetic divergence, **Mystus nemurus**, Mt DNA D-loop*

PENDAHULUAN

Ikan baung merupakan salah satu jenis plasma nutfah air tawar yang didomestikasikan dari perairan umum. Keberhasilan upaya domestikasi ikan baung, *Mystus nemurus* ini harus ditunjang teknologi dengan penerapan berbagai disiplin ilmu, sehingga untuk pengembangan selanjutnya dapat pula menjaga 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 budi daya (Royce, 1984). Langkah awal yang perlu dilakukan adalah mengarakterisasi secara genetik stok ikan baung. Pengumpulan informasi/data dasar genetik dari suatu spesies merupakan syarat awal yang diperlukan untuk menentukan variasi genetik atau kekerabatan yang dimiliki. Variasi genetik merupakan suatu informasi penting untuk evaluasi, dalam jangka pendek, mengenai *fitness* individu maupun untuk jangka panjang, sintasan dari suatu populasi (Ferguson *et al.*, 1995). Dengan diketahuinya variasi genetik dari masing-masing ras akan sangat membantu untuk menentukan program pemuliaan yang tepat dalam tahapan berikutnya.

Variasi genetik dapat dievaluasi dengan dua cara yaitu dengan *allelic diversity* dan *heterozygosity*. Beberapa metode dapat digunakan untuk mengestimasi tingkat variasi genetik yaitu penggunaan *molecular markers* (Carvalho & Pitcher, 1995), termasuk di antaranya adalah DNA mitokondria (Park & Morgan, 1995; Martin *et al.*, 1992). Pengumpulan secara langsung variasi DNA ditemukan bersama dengan isolasi tentang enzim restriksi. Penerapan langsung teknik ini diawali dengan DNA mitokondria. Teknik ini dapat dilakukan dengan menggunakan sampel dalam keadaan segar, beku, ataupun yang disimpan dalam alkohol (Nugroho *et al.*, 1997; Ward & Grewe, 1995). Penelitian ini bertujuan mengevaluasi variasi genetik dari beberapa populasi ikan baung yang akan digunakan sebagai bahan dasar untuk pemuliaan.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan baung yang telah dikoleksi sejak tahun 1999 berasal dari Waduk Jatiluhur, Cirata, Wonogiri, dan Wadaslintang. Jumlah sampel per populasi yang digunakan adalah 20 ekor, dengan ukuran panjang total ikan berkisar antara 15--25 cm.

¹⁾ Peneliti pada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

Ekstraksi DNA

DNA ikan diekstraksi dari potongan sirip dengan menggunakan kit "Wizard Genome DNA Purification" (Promega), sebagai berikut; 5--10 mg potongan sirip ikan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL yang telah berisi 500 μ L larutan lisis DNA + 120 μ L larutan 0,5 M EDTA pH 8,0. Kemudian ditambahkan 10 μ g/mL protein kinase dan diinkubasikan pada suhu 55°C selama 3 jam. Sebanyak 3 μ L larutan Rnase ditambahkan ke dalam campuran tersebut, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan ke dalamnya larutan *Protein precipitation* sebanyak 200 μ L dan disimpan dalam es selama 5 menit. Kemudian disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan supernatannya diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru, dan ditambahkan 600 μ L larutan propanol dan divortex sampai terlihat endapan putih. DNA diendapkan dengan cara mensentrifus campuran tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian larutan di atasnya dibuang dan DNA dikeringkan pada suhu ruangan. Setelah kering ditambahkan 50--100 μ L Tris-EDTA (TE) *buffer* dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

Mitokondria D-loop

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuens mitokondria D-loop dan sebagian cytochrome B adalah primer V-gluce (CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT) dan primer HN-20 (ATA ATA GGG TAT CTA ATC CTA GTT T). Pengamplifikasian dilakukan menggunakan metode Polymerize Chain Reaction (PCR) dengan komposisi reaksi yang terdiri atas: 10 μ g, 10 pmol setiap primer dan "pure taq DNA" (Promega) dengan total volume keseluruhannya 25 μ L. Siklus PCR yang digunakan dalam amplifikasi adalah satu siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, 35 siklus penggandaan yang terdiri atas 95°C selama 1 menit, 45°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2,5 menit. Selanjutnya satu siklus terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Sekuens MtDNA yang didapat direstriksi dengan menggunakan endonuklease sesuai dengan prosedur standar perusahaan. Hasil restriksi kemudian dipisahkan secara elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2%--3% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE) *buffer* dan diamati dengan *illuminator* (UV) serta dicetak gambarnya dengan polaroid.

Analisis Data

Untuk mengevaluasi variasi DNA antar populasi ikan baung, susunan haplotipe untuk masing-masing enzim restriksi dikumpulkan sebagai komposit haplotipe dan dianalisis dengan menggunakan analisis

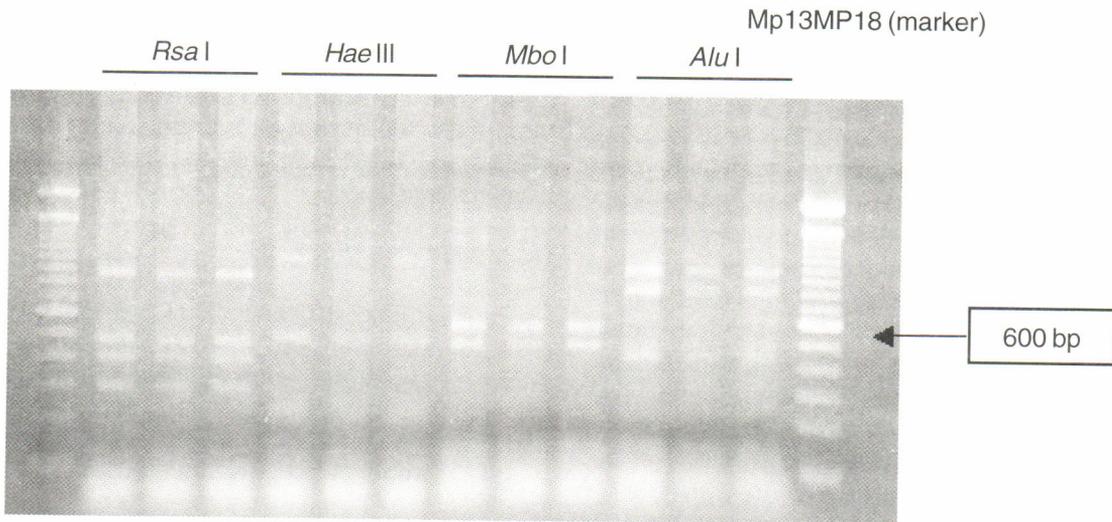
molekuler varians (AMOVA) dan Fst dalam program ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 1996). Diversitas haplotipe atau diversitas gene dihitung berdasarkan Nei & Tajima (1981) untuk mengamati tingkat variasi genetik yang ada. Keekerabatan antar populasi dianalisis dengan menggunakan Jarak Genetik, Da, dari Takezaki & Nei (1996).

HASIL DAN BAHASAN

Sekuens MtDNA D-loop ikan baung hasil PCR mempunyai panjang sekitar 2.000 bp. Dari empat enzim restriksi yang digunakan untuk memotong sekuens tersebut (*Rsa* I, *Hae* III, *Mbo* I, dan *Alu* I), semuanya mempunyai situs pemotongan. Polimorfisme pola pemotongan didapatkan pada enzim *Hae* III dan *Hinf* I. Pemotongan sekuens MtDNA D-loop dengan menggunakan enzim *Rsa* I dan *Mbo* I menghasilkan tiga jenis pola, sedangkan enzim *Hae* III dan *Alu* I hanya mempunyai 2 pola restriksi. Salah satu contoh dari pola pemotongan oleh masing-masing enzim tercantum pada Gambar 1. Panjang sekuens MtDNA D-loop ini setara dengan panjang sekuens daerah yang sama pada beberapa ikan lainnya seperti: nila, *kingfish*, *yellow tail*, dan *red seabream* (Nugroho, 2001).

Tingkat variasi haplotipe dipengaruhi oleh asal koleksi ikan baung. Secara keseluruhan terdapat 9 komposit haplotipe yang diidentifikasi berdasarkan 4 jenis enzim restriksi pada sekuens MtDNA D-loop ikan baung yang diamati. Jumlah komposit haplotipe yang dimiliki oleh masing-masing koleksi berkisar antara 3--4. Jumlah yang terkecil diamati pada ikan baung dari Wonogiri, sedangkan jumlah yang tertinggi terdapat pada ikan baung dari 3 lokasi lainnya. Lebih jauh tercatat bahwa ikan baung dari Waduk Jatiluhur, Cirata, dan Wadaslintang didominasi oleh komposit haplotipe #1, sedangkan ikan baung dari Wonogiri lebih didominasi oleh komposit haplotipe #7. Diversitas haplotipe atau gen bervariasi nilainya dari 0,460 pada ikan baung dari Wonogiri hingga 0,700 pada ikan baung dari Cirata (Tabel 1).

Tingkat atau level variasi genetik (yang ditunjukkan dengan jumlah haplotipe maupun diversitas haplotipe) yang ditemui pada ikan baung yang diamati tidak jauh berbeda dibandingkan dengan polimorfisme pada ikan laut yang mempunyai jumlah haplotipe berkisar 6--17 dengan nilai diversitas haplotipe antara 0,6--0,9 (Nugroho, 2001). Nilai ini termasuk di atas rata-rata yang biasa dijumpai pada ikan budi daya air tawar, misalnya ikan nila (Nugroho *et al.*, 2002). Relatif tingginya variasi genetik pada ikan baung ini dimungkinkan karena budi daya komoditas ini masih belum banyak dilakukan, sehingga keadaan populasi alam masih belum banyak terganggu. Selain itu,



Gambar 1. Pola restristik daerah mtDNA D-loop pada ikan baung dengan menggunakan enzim *Rsa I*, *Hae III*, *Mbo I*, dan *Alu I*

Figure 1. Restriction patterns of mtDNA D-Loop region of *Mystus nemurus* generated by *Rsa I*, *Hae III*, *Mbo I*, and *Alu I* -

keadaan ini juga menunjukkan bahwa ikan baung mempunyai tingkat migrasi yang lebih tinggi dibandingkan ikan air tawar lainnya, sehingga peluang untuk adanya persilangan dengan populasi (*stock*) yang lainnya semakin besar pula.

Secara statistik dengan menggunakan AMOVA (*Analysis Molecular Variance*) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan genetik secara nyata antara populasi ikan baung yang diuji ($P < 0,05$) berdasarkan

frekuensi haplotipenya. Perbedaan ini disebabkan ikan baung dari Waduk Wonogiri mempunyai *major composite haplotype* yang berbeda dengan ikan baung dari ketiga lokasi lainnya yaitu Cirata, Wadaslintang, dan Jatiluhur. Ikan baung Wonogiri didominasi oleh haplotipe # 7, sedangkan ikan baung dari tiga lokasi lainnya didominasi oleh haplotipe # 1. Keadaan ini mengindikasikan bahwa ada kemungkinan struktur populasi ikan baung dari Wonogiri berasal dari subspecies baung yang lainnya.

Tabel 1. Frekuensi haplotipe dari mtDNA D-loop ikan baung yang direstriksi dengan menggunakan 4 enzim, *Rsa I*, *Hae III*, *Mbo I*, dan *Alu I*

Table 1. Haplotype frequency of mtDNA D-loop region of *Mystus nemurus* generated by 4 endonucleases, *Rsa I*, *Hae III*, *Mbo I*, and *Alu I*

Haplotype Haplotype	Jatiluhur	Cirata	Wonogiri	Wadaslintang
1. AABA	0.600	0.400	0	0.500
2. BABA	0.200	0	0.100	0
3. ABCB	0.100	0	0	0
4. BAAB	0.100	0.300	0	0.125
5. CABB	0	0.200	0	0
6. CAAB	0	0.100	0	0.125
7. BAAA	0	0	0.700	0
8. CABA	0	0	0.200	0.125
9. CAAA	0	0	0	0.125
<i>N-sample</i>	10	10	10	8
<i>N-allele</i>	4	4	3	4
Diversitas haplotipe Haplotype Diversity	0.580	0.700	0.460	0.687

Jarak genetik (D_a) yang dihitung menurut Takezaki & Nei (1996), berdasarkan situs restriksi dari 4 enzim antara koleksi ikan baung tertera pada Tabel 2. Jarak genetik rata-rata antara populasi ikan baung adalah sekitar 0,604. Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik tersebut menunjukkan bahwa koleksi baung dari Cirata, Jatiluhur, dan Wadaslintang memiliki jarak genetik lebih dekat dibandingkan jarak genetik antara koleksi ikan baung dari Wonogiri dengan salah satu koleksi dari ketiga populasi lainnya (Gambar 2). Nilai D_a pada ikan baung ini relatif lebih besar dibandingkan jarak genetik antara ikan dari populasi yang terdiri atas subspecies yang sama, seperti pada ikan nila (Nugroho *et al.*, 2002), *king fish* (Nugroho *et al.*, 2001), dan *greater amberjack* (Nugroho *et al.*, 2000). Lebih lanjut, nilai tersebut setara jika dibandingkan dengan jarak genetik pada perbandingan antara ikan *greater amberjack* (karang) dari subspecies yang berbeda (Nugroho, 1998). Keadaan ini mengindikasikan bahwa adanya kemungkinan ikan baung dari Wonogiri merupakan salah satu subspecies lainnya dari ikan baung. Hal ini perlu ditindaklanjuti lebih jauh lagi dengan dukungan informasi secara anatomi.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan genetik yang nyata antara ikan baung dari Waduk Wonogiri dengan Waduk Jatiluhur, Wadaslintang, dan Cirata.

SARAN

Untuk mendapatkan lokus gen yang berkaitan dengan sifat fenotipnya (pertumbuhan), maka diperlukan lebih banyak sampel untuk dianalisis khususnya ikan baung yang berasal dari berbagai lokasi lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

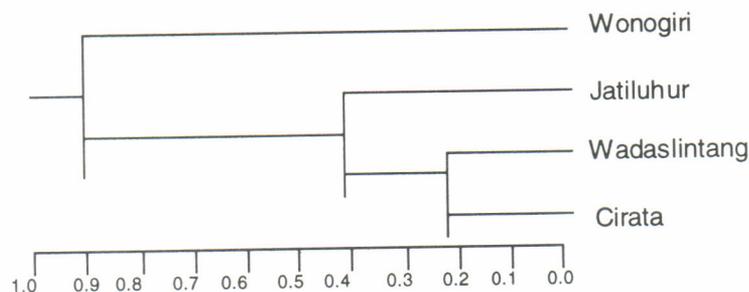
Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Riset Kelautan dan Perikanan atas dukungan dana dalam pelaksanaan penelitian ini. Penelitian ini merupakan salah satu bagian kegiatan yang didanai dari Proyek Riset Perikanan Air Tawar, Sukamandi yang bersumber dari APBN tahun 2002.

DAFTAR PUSTAKA

Carvalho, G.R. and Pitcher T.J. 1995. *Molecular Genetics in Fisheries*. Chapman & Hall, London. 255 pp.
 Ferguson, A.J., Taggart A.J., P.A. Prodohl, O. McMeel, C. Thompson, C. Stone, P. McGinnity, and Hynes R.A. 1995. The application of molecular markers to study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. of Fish Biol.*, 47: 103--126.
 Martin, A.P., R. Humphreys, and S.R. Palumbi. 1992. Population genetic structure of the armorhead, *Pseudopentaceros wheeleri*, in the North Pacific Ocean: Application of the polymerase chain reaction

Tabel 2. Jarak genetik, D_a , ikan baung (*Mystus nemurus*) dari 4 lokasi
 Table 2. Genetic distance of *Mystus nemurus* collected from four locations

Lokasi Location	Jatiluhur	Cirata	Wonogiri	Wadaslintang
Jatiluhur	xxxxxxxxxxx	0.336	0.859	0.340
Cirata		xxxxxxxxxxx	1	0.247
Wonogiri			xxxxxxxxxxx	0.842
Wadaslintang				xxxxxxxxxxx



Gambar 2. Dendrogram ikan baung (*Mystus nemurus*) dari 4 lokasi
 Figure 2. Dendrogram of *Mystus nemurus* collected from four locations

- to fisheries problems. *Canadian J. Fish. Aquatic Sci.*, 49: 2.386--2.391.
- Nei, M. and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Nat.* 106: 283--292.
- Nugroho, E., M. Takagi, and N. Taniguchi. 1997. Practical manual on detection of DNA polymorphism in fish population study. *Bull. Mar. Sci. and Fisheries*, Kochi University, 17: 109--130.
- Nugroho, E. 2001. *Population Genetic Studies on the Aquaculture Fish in Genus **Seriola** for Their Risk Management*. PhD Thesis. Tohoku University. 123 pp.
- Nugroho, E. 1998. *Studies on the Detection of Microsatellite DNA and Estimation of the Genetic Variability of Carangid-Genus **Seriola***. Thesis. Kochi University. 76 pp.
- Nugroho, E., D.J. Ferrell, P. Smith, and N. Taniguchi. 2001. Genetic divergence of kingfish from Japan, Australia, and New Zealand inferred by microsatellite DNA and mitochondrial DNA control region markers. *Fish. Sci.* 67: 843--850.
- Nugroho, E., N. Taniguchi, K. Kato, and S. Miyashita. 2000. Genetic difference among seed populations of greater amberjack used in aquaculture farm of Japan. *Suisanzoshoku*. 48(4): 665--674.
- Nugroho, E., A. Widiati, Imron, dan T. Kadarini. 2002. Keragaan genetik ikan nila gift berdasarkan polimorfism mitokondria DNA D-loop. *J. Pen. Per. Indonesia*. 8(3):1-6.
- Park, L.K. and P. Morgan. 1995. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In *Molecular Genetics in Fisheries* by Carvalho, G.R. and Pitcher, T.J. (Eds.) Chapman & Hall, London. p. 1-28.
- Royce, W.F. 1984. *Introduction to the Practise of Fishery Science*. Academic Press Inc. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
- Schneider, S., J.M. Kueffer, D. Roessli, and L. Excoffier. 1996. *Arlequin: A Software Package for Population Genetics*. Univ. of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Takezaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 144: 389--399.
- Ward, R.D. and P.M. Grewe. 1995. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In *Molecular Genetics in Fisheries* by Carvalho, G.R. and Pitcher, T.J. (Eds.) Chapman & Hall, London. p. 55-80.