

## BEBERAPA TEKNIK PENENTUAN VARIASI GENETIK PADA IKAN UNTUK PROSES PEMULIAAN

Mulyasari<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

### ABSTRAK

Penurunan keragaman genetik ikan dari hasil perbenihan dapat mengakibatkan lambatnya laju pertumbuhan dan rendahnya ketahanan ikan terhadap serangan penyakit serta perubahan lingkungan. Metode untuk mengetahui keragaman genetik pada ikan adalah melalui penentuan karakter morfologi dan karakter genotip. Penentuan berdasar karakter genotip dapat dilakukan dengan beberapa teknik antara lain: teknik alozim/izozim, DNA mitokondria, Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), dan DNA mikrosatelit. Penentuan karakter morfologi tekniknya mudah dikerjakan, biaya murah, dan hasilnya lebih cepat diketahui. Keterbatasan teknik ini yaitu akurasi lemah dan pada beberapa kasus tidak dapat dilakukan. Penentuan karakter genotip memiliki kelebihan yaitu akurasi dan sensitivitas yang lebih tinggi, mampu membedakan antara individu yang homozigot dan heterozigot dalam satu generasi tanpa melakukan tes progeni dan hasilnya tidak dipengaruhi lingkungan seperti fluktuasi musim dan asal geografis. Namun demikian metode ini memerlukan biaya dan peralatan yang lebih mahal.

**KATA KUNCI:** variasi genetik, karakter morfologi, karakter genotip

### PENDAHULUAN

Beberapa jenis komoditas perikanan di Indonesia yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan merupakan komoditas andalan sebagai sumber devisa negara dari sektor budi daya, namun mengalami kendala dalam produksinya antara lain udang windu (*Penaeus monodon*). Permasalahan penurunan produksi udang windu salah satu penyebab utamanya adalah serangan penyakit atau karena mutu genetik yang bervariasi akibat penggunaan induk yang berasal dari alam. Komoditas lain yang memiliki permasalahan serupa adalah rajungan (Moria *et al.*, 2005). Meskipun permintaan daging rajungan di pasar cukup

tinggi, potensi rajungan di Indonesia semakin menurun karena ekspor yang masih mengandalkan tangkapan dari alam (Juwana *dalam* Moria *et al.*, 2005). Usaha budi daya rajungan masih terkendala oleh penyediaan benih yang belum cukup dan tidak berkesinambungan. Dalam panti-panti benih muncul masalah yang disebabkan oleh banyak faktor antara lain teknik pembenihan yang belum mantap, induk yang secara genetik belum diketahui atau masalah teknis lainnya. Teknik pembenihan yang salah dapat menurunkan keragaman genetik suatu populasi pada turunan berikutnya.

Jenis-jenis ikan air tawar yang memiliki nilai jual cukup tinggi seperti ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan nila GIFT (*Oreochromis sp.*) juga mengalami masalah dalam kualitas genetiknya yang dicirikan oleh lambatnya laju pertumbuhan, matang kelamin pada usia muda, dan kematian tinggi akibat daya tahan tubuh ikan yang menurun. Hal ini diduga karena kurangnya pengetahuan petani akan pengelolaan kolam dan induk ikan yang benar seperti eksploitasi sumber benih untuk *hatchery* dari alam dan produksi benih buatan yang mengakibatkan menurunnya keanekaragaman genetik (Widiyati *et al.*, 2004). Penurunan keragaman genetik akibat hilangnya alel-alel ikan dari hasil perbenihan dapat mengakibatkan terhambatnya laju pertumbuhan dan rendahnya ketahanan ikan terhadap serangan penyakit serta perubahan lingkungan (Leary *et al.*, 1985 *dalam* Moria *et al.*, 2005).

Salah satu cara (alternatif) terbaik untuk mengatasi masalah penurunan keragaman genetik atau kualitas genetik adalah dengan melakukan pemuliaan melalui teknik seleksi. Seleksi individu hasil persilangan merupakan tahapan penting dalam program pemuliaan untuk memilih spesies yang membawa gen dari sifat yang diinginkan. Seleksi didahului dengan mengumpulkan informasi mengenai data dasar genetik dari suatu spesies yang merupakan syarat awal untuk menentukan variasi genetik atau kekerabatan yang dimiliki. Tulisan ini dimaksudkan untuk menguraikan beberapa teknik penentuan variasi genetik yang dapat digunakan untuk tujuan pemuliaan tersebut disertai beberapa contoh keberhasilan teknik ini pada beberapa spesies yang pernah dicoba.

### Teknik Penentuan Variasi Genetik

Penentuan variasi genetik pada ikan dapat menggunakan beberapa metode antara lain berdasar karakter morfologi dan genotipnya. Karakter morfologi bisa ditentukan dengan metode *trussmorphometric* sedangkan untuk melihat karakter genotip bisa melalui pendekatan molekuler.

#### Penentuan berdasar karakter morfologi

Pengukuran keragaman genetik dengan pengukuran morfologi lebih mudah dilakukan dan biayanya jauh lebih murah dibandingkan dengan pengukuran karakter genotip. Pengukuran berdasarkan karakter morfologi sebenarnya dapat dilakukan dengan cara pengukuran meristik, fluktuasi asimetri, dan morfometrik. Namun *trussmorphometric* adalah satu metode yang lebih baik untuk membedakan bentuk tubuh pada populasi ikan. Metode ini telah berhasil cukup baik diterapkan pada beberapa spesies ikan antara lain ikan gurami (*Osphronemus gouramy*), nila (*Oreochromis niloticus*) (Widiyati *et al.*, 2004), udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) (Hadi *et al.*, 2002), baung (*Mystus nemurus*) (Nugroho *et al.*, 2005) dan ikan mas. Metode *trussmorphometric* dilaksanakan dengan menggunakan titik-titik tanda untuk mengukur jarak yang dibuat pada kerangka tubuh ikan. Jarak dibuat pada tubuh ikan meliputi panjang, lebar, dan diagonal. Sebagai contoh adalah ikan nila, tubuh dibagi menjadi 4 bagian yaitu A = bagian kepala, B = awal sirip punggung-awal sirip anal, C = awal sirip punggung lunak-akhir sirip anal, dan D = akhir sirip punggung lunak-pangkal ekor yang masing-masing membentuk karakter A1 sampai dengan A6, B1, sampai B6 dan seterusnya sehingga dari 10 titik *truss* diperoleh 21 karakter. Pengukuran setiap karakter *truss* disajikan pada Gambar 1. Analisis data dilakukan dengan penyesuaian

data mengingat pengukuran sampel, umur, dan ukuran ikan tidak sama. Untuk mengevaluasi variasi morfologi digunakan analisis pembeda (*Discriminant analysis*) dan analisis komponen utama (*Principle component analysis*) dengan program SAS atau SPSS.

Penentuan variasi genetik menggunakan karakter morfologi meskipun murah dan mudah tetapi mempunyai kelemahan yaitu tidak dapat digunakan dalam klasifikasi suatu spesies karena karakter morfologi suatu individu dipengaruhi oleh lingkungan dan habitatnya yang mengakibatkan klasifikasi sulit dilakukan.

#### Penentuan berdasar karakter genotip

Perkembangan di bidang biologi molekuler telah memberikan alternatif dalam proses seleksi dengan menggunakan marka molekuler yang dapat meningkatkan efisiensi program pemuliaan. Seleksi dengan cara ini dilakukan berdasarkan pada pola pita potongan DNA yang dapat menunjukkan keberadaan segmen kromosom pembawa gen atau alel yang diinginkan. Penggunaan marka molekuler mempunyai beberapa keunggulan antara lain:

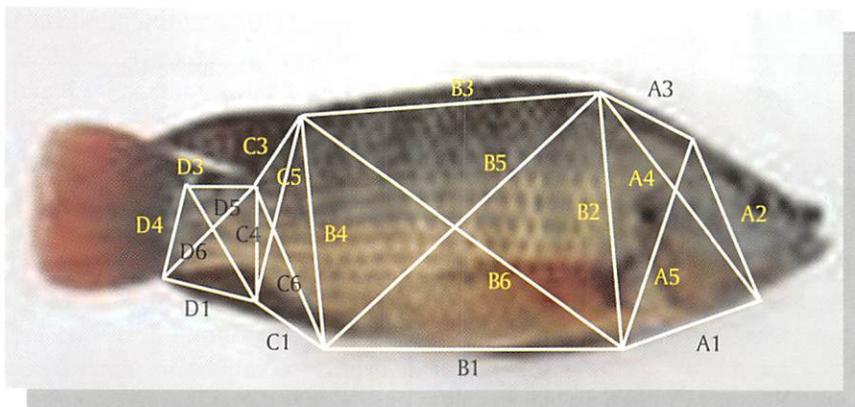
- Memiliki akurasi yang lebih tinggi dibanding metode morfologi dalam proses seleksi ikan
- Mampu membedakan antara individu yang homozigot dan heterozigot dalam satu generasi tanpa melakukan tes progeni
- Tidak dipengaruhi lingkungan seperti fluktuasi musim dan asal geografis

Penentuan variasi genetik menggunakan karakter genotip dapat dilakukan dengan berbagai macam metode antara lain adalah alozim/isozim, DNA mitokondria, *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD), DNA mikrosatelit dan lain-lain.

#### Teknik Alozim/Isozim

Alozim atau isozim adalah bentuk multipel molekuler dari suatu enzim individu. Bentuk multipel ini dapat berupa pasangan alel pada suatu lokus (alozim) atau bisa juga merupakan produk dari loki yang berbeda dimana ada banyak gen yang memiliki enzim atau sub unit enzim yang sama.

Isozim/alozim banyak digunakan dalam identifikasi struktur populasi dan strain dari berbagai jenis ikan seperti pada ikan nila tilapia (Eknath *et al.*, 1991 dalam Ariyanto



Gambar 1. Contoh pengukuran karakter morfologi dengan metode *trussmorphometric* pada ikan nila (Brzeski & Doyle, 1988 dalam Widiyati *et al.*, 2004)

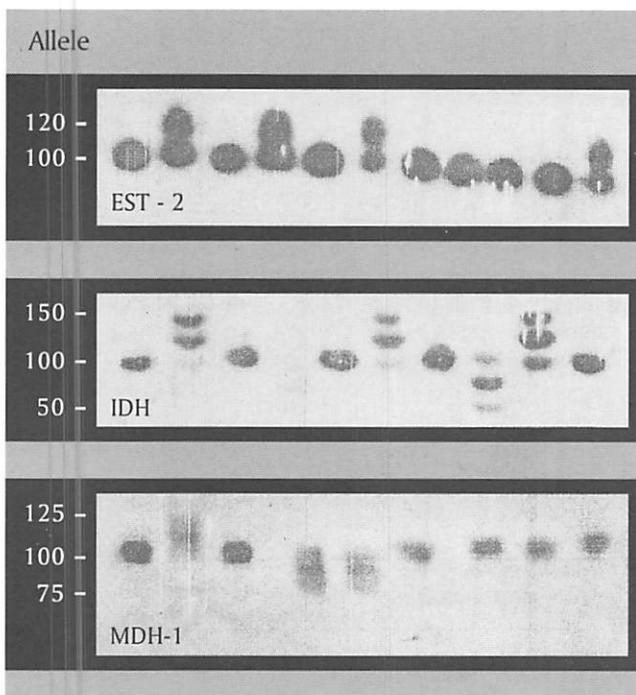
et al., 2003), gurami (Soewardi, 1995 dalam Ariyanto et al., 2003) dan pada spesies *threespine stickleback* (*Gasterosteus aculatus*) dari Jepang (Ariyanto et al., 2003), bandeng (*Chanos chanos*) (Sugama & Prijono, 1998), dan udang windu (Sugama et al., 1996; 2002) (Gambar 2). Teknik ini berguna untuk monitoring variabilitas genetik dan struktur populasi dari stok alam, perubahan genetik dan pemuliaan stok di *hatchery*, dan sebagai marka biokimia pada teknik seleksi dari program pemuliaan.

Contoh sistem enzim dan protein yang sering digunakan antara lain ADH, AAT, EST, GPI, GPD, IDH, LDH, MDH, ME, PGM, 6-PGD, SP, dan SDH sedangkan jenis jaringan yang dianalisis adalah hati, jantung, daging, atau mata ikan. Isozim dipisahkan dengan muatan listrik yang dikenal sebagai proses elektroforesis melalui matriks seperti gel pati, selulosa asetat, dan poliakrilamid tergantung dari bentuk, ukuran, dan muatan. Irisan matriks kemudian direndam dalam pewarna histokimia tertentu untuk menampakkan jenis enzim yang diinginkan. Biasanya warna akan muncul pada sisi aktif enzim, meskipun adapula yang bersifat terbalik seperti enzim *superoxidase dismutase* (SOD). Hasil yang berupa zymogram kemudian diinterpretasi sehingga didapatkan data frekuensi alel yang selanjutnya digunakan untuk menghitung beberapa

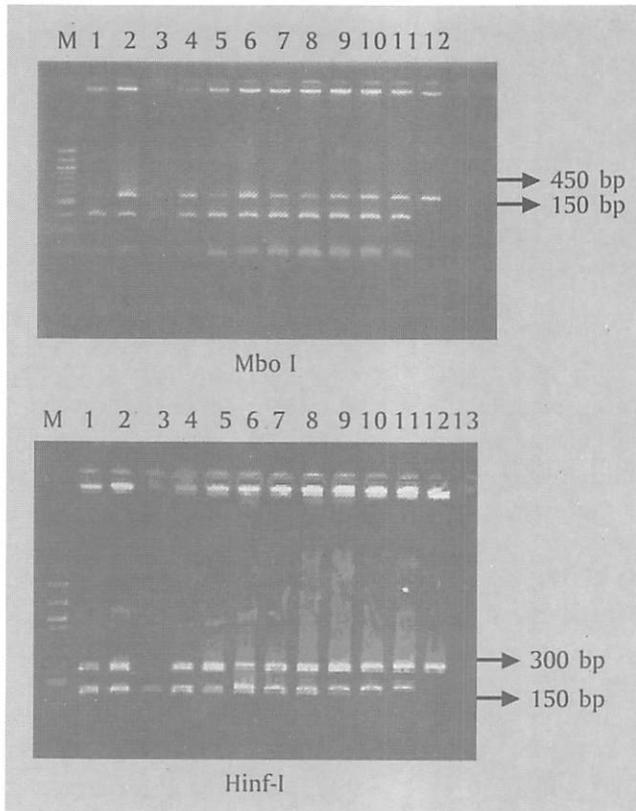
parameter struktur populasi genetik yang meliputi derajat polimorfisme, heterozigositas rata-rata, dan jarak genetik. Apabila dibandingkan dengan metode yang menggunakan karakter morfologi, teknik ini lebih akurat. Meskipun demikian, teknik ini mempunyai kelemahan yaitu sensitivitasnya kurang, tingkat polimorfismenya yang rendah dan harus menggunakan jaringan mati sebagai bahan analisis.

#### DNA Mitokondria

Metode lain yang bisa digunakan untuk menentukan keragaman genetik adalah DNA mitokondria (mt-DNA) atau dikenal juga dengan nama DNA-D-Loop. Penggunaan metode DNA mitokondria untuk penentuan gen marker diasumsikan oleh karena Mt-DNA mempunyai variabilitas yang lebih tinggi 5 sampai 10 kali daripada kopi tunggal gen kromosom dan lebih jelas membedakan gen yang bersifat fungsional. Metode ini berguna untuk mendeteksi keragaman populasi berdasarkan sifat maternal haplotipenya. Teknik Mt-DNA telah digunakan dalam penelitian mendapatkan marka gen dari ikan hiu (*A vulpinus* dan *P glauca*) (Nugroho, 2001), ikan nila GIFT (Nugroho et al., 2002), ikan baung (Nugroho et al., 2005), udang windu (Moria et al., 2002), dan rajungan (*P. pelagicus*) (Moria et al., 2005). Dalam pengerjaannya teknik ini menggunakan beberapa jenis enzim restriksi endonuklease untuk memotong DNA menjadi fragmen (Gambar 3). Contoh enzim yang umum digunakan adalah Eco R V, Bam HI, Taq I, Hind III, Hae III, Mbo I, RsaI, Alu I, Hinc I, dan lain-lain. Pada ikan, jenis jaringan yang biasa digunakan untuk analisis adalah daging dan sirip. DNA diperoleh dari hasil ekstraksi jaringan ikan yang kemudian diperbanyak dengan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang telah diketahui sekuensnya. Sekuens tersebut kemudian direstriksi menggunakan enzim endonuklease dan hasilnya dapat dilihat dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2-3%. Untuk mengevaluasi variasi DNA suatu atau antar populasi susunan haplotipe untuk masing-masing enzim restriksi dikumpulkan sebagai komposit haplotipe dan dianalisis dengan *Analysis Molecular Variance* (AMOVA). Sedangkan untuk mengkonfirmasi frekuensi genotip dilakukan analisis chi-square dari Hukum Hardy-Weinberg. Berdasarkan hasil analisis tersebut akan diperoleh karakter genetik meliputi susunan berat molekul fragmen DNA, heterozigositas dan jarak genetik. Diversitas gen dihitung berdasarkan Nei-Tajima (1981) dalam Nugroho et al., 2002) untuk mengamati tingkat variasi genetik yang ada. Kekerbatan antar populasi dianalisis dengan jarak genetik.



Gambar 2. Contoh pola pita DNA yang dianalisis menggunakan metode isozim atau allozim pada udang windu, *Penaeus monodon* (Sugama et al., 1996)



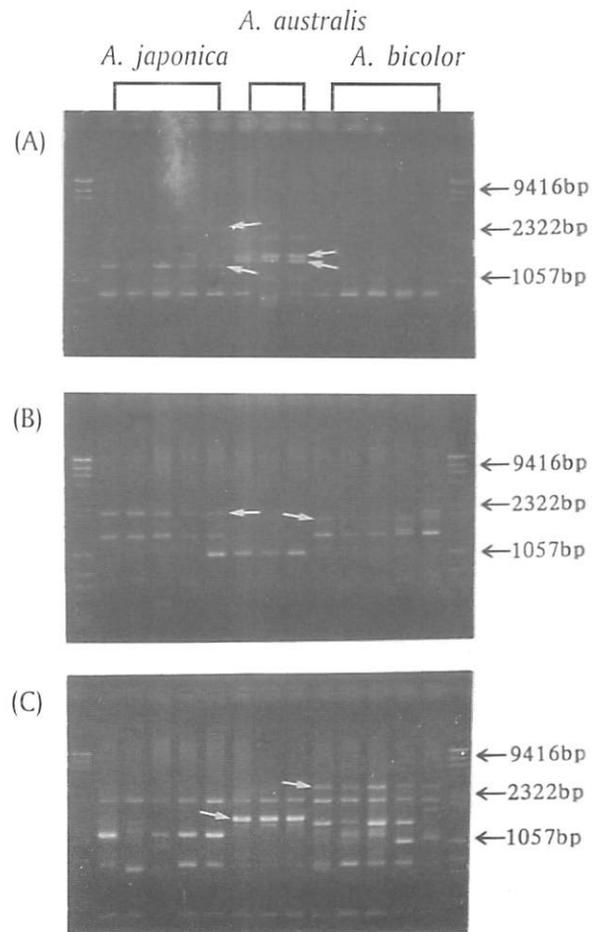
Gambar 3. Contoh pola pita DNA yang direstriksi dengan enzim endonuklease (Moria *et al.*, 2003)

**Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)**

Marka RAPD adalah sekuens DNA polimorfik yang dipisahkan oleh gel elektroforesis setelah proses PCR menggunakan satu atau sepasang primer oligonukleotida pendek secara acak. RAPD sangat baik digunakan untuk mendeteksi polimorfik dalam jumlah besar karena primer oligonukleotida bisa menda semua genom yang memiliki situs ikatan dalam reaksi PCR. Saat dua situs ikatan berjarak cukup dekat (3.000 bp atau kurang), pita RAPD akan terlihat pada gel. Biasanya setiap primer RAPD mampu mengamplifikasi beberapa pita. Marka RAPD yang muncul dihitung sebagai alel dominan. Produk DNA yang diamplifikasi dihitung berdasarkan ukuran dan penampakannya. Polimorfik dikatakan ada jika suatu pita muncul pada satu jenis parental tapi tidak muncul di parental yang lain. Meskipun suatu fragmen homolog ada pada parental lain tersebut dan tampak sebagai suatu pita dengan ukuran yang berbeda akan dihitung sebagai marka yang berbeda, meskipun sebenarnya mewakili lokus yang sama atau lokasi umum yang sama dari sekuens DNA (Gambar 4).

Marka RAPD berguna untuk DNA *fingerprinting* yang efisien, ekonomis dan tidak mengandung radioaktif dalam

menentukan hubungan genetik dan pembuatan petanya. RAPD tidak membutuhkan *probe* atau informasi sekuens seperti untuk analisis RFLP dan DNA satelit. RAPD memiliki kriteria sebagai sistem marka yang ideal karena polimorfiknya yang tinggi, mudah, dan cepat, ekonomis serta bisa di reproduksi kembali, di samping merupakan turunan Mendel yang normal. Namun kelemahan analisis secara RAPD pertama adalah dari pola pita dominan yang muncul tidak bisa dibedakan antara individu yang heterozigot dan homozigot walaupun turunan dari marka bisa diverifikasi dengan tes progeni, tapi hal ini tidak mudah dilakukan karena banyaknya jumlah pita yang ada. Kedua, perlu dilakukan uji coba primer dalam jumlah besar untuk mendapatkan marka dalam jumlah banyak pula (Dunham, 2004).

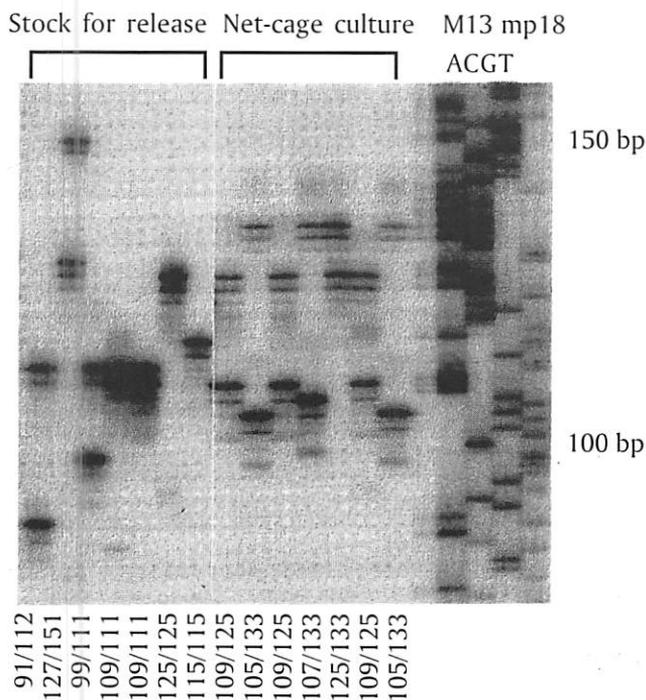


Gambar 4. Contoh pola pita DNA yang dianalisis menggunakan metode RAPD-PCR pada ikan sidat *Anguilla* sp. (Takagi & Taniguchi, 1996 dalam Nugroho *et al.*, 1997)

**DNA mikrosatelit**

Marka DNA mikrosatelit adalah marka molekuler yang ideal karena memiliki polimorfik yang tinggi, secara merata terdistribusi dalam genom dan diturunkan secara

kodominan sehingga bisa dijadikan alternatif untuk studi populasi genetik (Dunham, 2004). Menurut Shikano & Taniguchi (2002), marker DNA satelit dijadikan suatu alternatif untuk studi populasi genetik karena jumlahnya yang melimpah dan heteroziositasnya yang tinggi pada hampir semua genom eukariot sehingga DNA satelit lebih baik dari teknik alozim dalam mendeteksi variasi genetik dan hubungannya dengan depresi yang terjadi karena proses perkawinan silang dalam. Karena jumlah nilai rata-rata heterozigositas yang diukur dengan DNA mikrosatelit seringkali diasumsikan sebagai refleksi dari semua variabilitas genetik. Perkiraan atau penjumlahan heterozigositas digunakan untuk mengambil keputusan dalam mengelola populasi dan spesies. Menurut Faisal *et al.* (1999), DNA mikrosatelit dapat dengan mudah mendeteksi polimorfisme DNA dengan mengisolasi ikan yang masih sekerabat. Setiap primer mewakili suatu lokus dan untuk setiap lokus pola pita yang dihasilkan identik dengan alelnya sehingga lebih mudah menganalisis keragaman genetiknya. Metode ini lebih sensitif mendeteksi polimorfisme DNA sampai pada tingkat sub spesies. Meskipun metode DNA satelit memiliki sensitivitas dan akurasi yang tinggi, namun secara teknis tidaklah mudah untuk dilakukan karena memakan banyak waktu dan biaya terutama dalam mendesain primernya (Gambar 5).



Gambar 5. Contoh pola pita DNA yang dianalisis menggunakan metode DNA mikrosatelit pada Red Seabream (*Pagrus major*) (Nugroho *et al.*, 1997)

## KESIMPULAN

Keragaman genetik suatu populasi dapat ditentukan dengan melihat karakter morfologi maupun karakter genotip spesies-spesiesnya. Penentuan karakter morfologi memiliki kelebihan yaitu tekniknya mudah dikerjakan, biaya murah, dan hasilnya lebih cepat diketahui. Namun demikian teknik ini memiliki beberapa keterbatasan seperti akurasinya yang lemah dan pada beberapa kasus tidak dapat dilakukan.

Selain contoh-contoh di atas ada beberapa metode analisis lain yang bisa digunakan untuk penelitian keragaman genetik. Metode-metode ini dapat dimanfaatkan untuk penentuan keragaman genetik hingga diperoleh suatu kumpulan informasi dasar mengenai keragaman genetik yang dimiliki oleh suatu populasi sebagai dasar untuk melakukan program pemuliaan dan *restocking* komoditas perikanan. Namun demikian karena masing-masing teknik memiliki kelebihan dan kekurangan, maka dalam penggunaannya dipilih teknik yang paling memungkinkan dan efisien untuk dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanto, D., E. Nugroho, dan Subagyo. 2003. Karakterisasi Biokimia Enzimatis Empat Populasi Ikan Mas Menggunakan Metode Elektroforesis. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 9(4): 1—6.
- Dunham, R.A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: genetic approaches*. CABI publishing UK, p. 85—99.
- Faisal, I., D. Irawan, R.S. Aliah, dan I.T. Makagiansar. 1999. Studi Pendahuluan Pengamatan Polimorfisme DNA ikan mas menggunakan teknik RAPD-PCR. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Genetik Ikan. Indonesian Network on Fish Genetic Research and Development* bekerja sama dengan Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Departemen Pertanian, p. 40—44.
- Hadi, W., K. Sumantadinata, O. Carman, dan L.E. Hadi. 2002. Pendugaan Jarak Genetik Populasi Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dari Sungai Musi, Sungai Kapuas dan Sungai Citanduy dengan *Truss Morphometric* untuk Mendukung Program Pemuliaan. *J. Pen. Perikanan Indonesia*, 8(2): 1—7.
- Moria, S.B., Haryanti, I G.N. Permana, dan K. Sugama. 2002. Marka Genetik untuk Variabilitas Pertumbuhan Udang Windu *Penaeus monodon* dari Sumber Induk Berbeda Melalui Analisis Mt-DNA RLFP. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 8(5): 1—9.
- Moria, S.B., Haryanti, I G.N. Permana, dan B. Susanto. 2005. Karakteristik Genetik Induk Rajungan *Portunus*

- pelagicus* dari Beberapa Perairan Melalui Analisis RFLP Mt-DNA. J. Pen. Perik. Indonesia, 11(5): 57—62.
- Moria, S.B., Haryanti, I G.N. Permana, K. Mahardika, and K. Sugama. 2003. Selective Breeding of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Spawner and Fry through mt-DNA Marker and Allozyme analysis for WSSV (White Spot syndrome virus) Diseases Resistance. Papers International Seminar for Marine and Fisheries research 2003, p. 79—87.
- Nugroho, E. 2001. Capability of Mitochondria DNA-D-Loop Markers from Shark Species Identification. IFR Journal, 7(1): 62—66.
- Nugroho, E., A. Widiyati, Imron, dan T. Kadarini. 2002. Keragaman Genetik Ikan Nila GIFT Berdasarkan Polimorfisme Mitokondria DNA-D-Loop. J. Pen. Perik. Indonesia, 8(3): 1—6.
- Nugroho, E., W. Hadie, J. Subagja, dan T. Kurniasih. 2005. Keragaman Genetik dan Morfometrik pada Ikan Baung *Mystus nemurus* dari Jambi, Wonogiri dan Jatiluhur. J. Pen. Perik. Indonesia, 11(7): 1—6.
- Nugroho, E., M. Takagi, and N. Taniguchi. 1997. Practical Manual on Detection of DNA Polymorphism in Fish Population Study. Bulletin of Marine Sciences and Fisheries, Kochi University, 17: 109—129.
- Shikano, T., dan N. Taniguchi. 2002. Relationships between Genetics Variation Measured by Microsatellite DNA Markers and a Fitness-Related Trait in the Guppy (*Poecilia reticulata*). Aquaculture 209, (1-4): 77—90.
- Sugama, K., Haryanti, and F. Cholik. 1996. Biochemical Genetics of Tiger Shrimp *Penaeus monodon*: Descriptor of Electrophoretic Detectable Loci. IFR Journal, 2(1): 19—28.
- Sugama, K., Haryanti, J.A.H. Benzie, and E. Ballment. 2002. Genetic Variation and Population Structure of the Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon* in Indonesia. Aquaculture, 205: 37—48.
- Sugama, K. and A. Prijono. 1998. Biochemical Genetic Differentiation among wild populations of milkfish (*Chanos chanos*) in Indonesia. IFR Journal, 4(1): 11—18.
- Widiyati, A., Subandriyo, K. Sumantadinata, W. Hadi, dan E. Nugroho. 2004. Keragaman Morfologi dan Fluktuasi Asimetri Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dari Danau Tempe (SulSel) dan Beberapa Sentra Produksi di Jawa Barat. J. Pen. Perik. Indonesia, 10(5): 47—53.