

EVALUASI KERAGAMAN GENETIK IKAN KANCRA DENGAN MENGGUNAKAN MARKER Mt DNA D-loop DAN RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA (RAPD)

Estu Nugroho¹⁾, Jojo Subagja¹⁾, Sidi Asih¹⁾, dan Titin Kurniasih¹⁾

ABSTRAK

Variasi genetik ikan kancra yang dikoleksi dari daerah Kuningan (Pesawahan, Gandasoli, dan Ragawacana) dan Sumedang di Jawa Barat telah diteliti dengan menggunakan polimorfisme Mitokondria DNA D-loop dan Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). Berdasarkan analisis Mt DNA tidak terdapat perbedaan yang nyata antara ras ikan kancra dari empat lokasi tersebut. Sedangkan analisis RAPD menunjukkan perbedaan yang nyata. Panjang daerah Mt DNA D-loop ikan kancra berkisar antara 700-800 bp. Satu komposit haplotype terdeteksi dengan menggunakan 4 enzim restriksi yaitu *Rsa* I, *Nde* II, *Taq* I, dan *Sac* I pada sekuens D-loop. Dua dari 20 primer RAPD menunjukkan perbedaan yang nyata di antara keempat populasi ikan kancra. Jarak genetik berdasarkan polimorfisme dua primer tersebut adalah 0,349.

ABSTRACT: *Genetic divergence of Tor soro analyzed by mitochondria D-loop and Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). By: Estu Nugroho, Jojo Subagja, Sidi Asih, and Titin Kurniasih*

The aim of this research was to evaluate genetic variability of Tor soro. The genetic variability of Tor soro collected from Kuningan (Pesawahan, Gandasoli, and Ragawacana) and Sumedang, West Java were examined using polymorphism of the mitochondria DNA (MtDNA) D-loop and RAPD markers. Based on MtDNA D-loop analysis, there was no significant different among collection. The length size of MtDNA D-loop region was approximately 700-800 bp. A composite haplotype was detected using four endonuclease i.e. Rsa I, Nde II, Taq I, and Sac I. Two of 20 RAPD primers showed significantly different among collections. Average genetic distance based on the polymorphism of two primers was 0.349.

KEYWORDS: *genetic divergence, Tor soro, Mt. DNA D-loop, RAPD*

PENDAHULUAN

Plasma nutfah ikan air tawar asli di Indonesia cukup besar. Di Pulau Sumatera terdapat 30 jenis, Kalimantan 149 jenis, Jawa 12 jenis, dan Sulawesi 149 jenis (Kottelat *et al.*, 1993). Beberapa spesies telah dimanfaatkan sebagai ikan budi daya. Salah satu di antaranya yang sedang dalam taraf domestikasi untuk dimanfaatkan sebagai komoditas budi daya nantinya adalah ikan kancra.

Ikan kancra merupakan ikan endemik di danau Toba dikenal sebagai ikan Batak dan

beberapa reservat di Jawa, di daerah Kuningan dan Sumedang. Ikan ini mempunyai nilai ekonomis yang tinggi, khususnya di Sumatera Utara yang disebabkan mempunyai nilai religius tersendiri dalam upacara adat. Ikan Kancra atau ikan Batak di kalangan masyarakat Sumatera Utara dikenal sebagai Ihan, sedangkan di daerah Kuningan dan Sumedang dikenal sebagai ikan Dewa. Keberadaan ikan tersebut sangat jarang ditemui lagi di Sumatera akibat penangkapan yang berlebih, serta desakan lingkungan tempat ikan-ikan tersebut berkembang biak menjadi rusak. Menurut Hardjamulia *et al.*

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

(1995), terdapat 4 spesies yang biasa disebut sebagai ikan Batak yaitu *Neolisochillus theinemani*, *Neolisochillus longipinis*, *Neolisochillus sumatranus*, dan *Tor soro*.

Upaya pengembangan ikan kancra telah dilakukan sejak 10 tahun yang lalu oleh Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor. Teknologi pembenihan, baik secara alami maupun buatan, telah berhasil dilakukan. Dalam rangka menunjang upaya pengembangan budi daya ikan tersebut melalui proses domestikasi diperlukan informasi genetik dari ras-ras yang ada. Pengaksesan informasi dasar genetik dari suatu spesies merupakan syarat awal yang diperlukan untuk menentukan variasi genetik atau kekerabatan yang dimiliki. Variasi genetik merupakan suatu informasi penting yang dapat digunakan untuk mengevaluasi fitness individu jangka pendek dan sintasan dari suatu populasi untuk jangka panjang (Ferguson *et al.*, 1995). Dengan diketahuinya variasi genetik dari masing-masing ras ikan Kancra akan sangat membantu untuk menentukan program pengembangan yang tepat.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kancra yang berasal dari Kabupaten Kuningan (Kecamatan Pesawahan, Kecamatan Gandasoli, dan Kecamatan Ragawacana) dan Kabupaten Sumedang di Jawa Barat. Jumlah sampel per populasi yang digunakan untuk pengamatan DNA adalah 10 ekor.

Ekstraksi DNA

DNA ikan diekstraksi dari potongan sirip dengan menggunakan metode phenol-chloroform, 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 larutan 0,5M EDTA pH 8,0. Kemudian ditambahkan 10 mg/mL Protein kinase dan diinkubasikan pada suhu 55°C selama 3 jam. Sebanyak 3 mL larutan Rnase ditambahkan ke dalam campuran tersebut, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan kedalamnya larutan *Protein precipitation* sebanyak 200 mL dan disimpan dalam es selama 5 menit. Kemudian disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan supernatannya diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru, dan ditambahkan 600 mL

larutan propanol dan divortex sampai terlihat endapan putih. DNA diendapkan dengan cara sentrifugasi campuran tersebut pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian larutan di atasnya dibuang dan DNA dikeringkan pada suhu ruangan. Kemudian dilarutkan kembali dalam 50-100 mL Tris-EDTA (TE) buffer dan disimpan dalam 4°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

Amplifikasi daerah D-loop

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuens mitokondria D-loop dan sebagian cytochrome B adalah primer LH 1509 (CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT) dan primer FH 1202 (ATA ATA GGG TAT CTA ATC CTA GTT T). Pengamplifikasian dilakukan menggunakan metode *Polymerize Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi reaksi yang terdiri: 10 mg, 10 pmol setiap primer dan "pure taq DNA" (Promega) dengan total volume keseluruhannya 25 mL. Siklus PCR yang digunakan dalam amplifikasi adalah satu siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit. 35 siklus penggandaan yang terdiri dari 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 di restriksi dengan menggunakan endonuklease yaitu, *Rsa I*, *Nde II*, *Taq I*, dan *Sac I* sesuai dengan prosedur standar. 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.

Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

Primer yang digunakan dalam RAPD adalah OPC 1—OPC20 dengan urutan basa tertera pada Tabel 1.

Pengamplifikasian dilakukan menggunakan metode *Polymerize Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi reaksi yang terdiri: 10 μ g, 10 pmol 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 4 menit. 35 siklus penggandaan yang terdiri dari 95°C selama 1 menit, 36°C selama 1 menit dan 72°C selama 2,5 menit. Selanjutnya satu siklus terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dipisahkan secara elektroforesis dengan menggunakan gel agar-

Tabel 1. Primer RAPD yang digunakan untuk analisis DNA ikan *Tor soro*
 Table 1. RAPD primer amplified for *Tor soro* DNA analyzed

Nama Name	Urutan Basa 5'-3' Basa
OPC-01	TTC GAG CCA G
OPC-02	GTG AGG CGT C
OPC-03	GGG GGT CTT T
OPC-04	CCG CAT CTA C
OPC-05	GAT GAC CGC C
OPC-06	GAA CGG ACT C
OPC-07	GTC CCG ACG A
OPC-08	TGG ACC GGT G
OPC-09	CTC ACC GTC C
OPC-10	TGT CTG GGT G
OPC-11	AAA GCT GCG G
OPC-12	TGT CAT CCC C
OPC-13	AAG CCT CGT C
OPC-14	TGC GTG CTT G
OPC-15	GAC GGA TCA G
OPC-16	CAC ACT CCA G
OPC-17	TTC CCC CCA G
OPC-18	TGA GTG GGT G
OPC-19	GTT GCC AGC C
OPC-20	ACT TCG CCA C

ose 2%--3% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE) buffer dan diamati dengan illuminator (UV) serta dicetak gambarnya dengan polaroid.

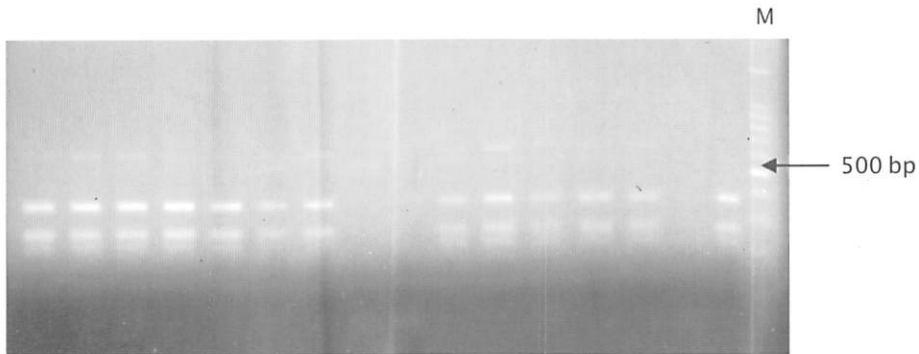
Analisis Data

Untuk mengevaluasi variasi DNA antar populasi ikan *Tor soro*, susunan haplotype untuk masing-masing enzim restriksi dikumpulkan sebagai komposit haplotype pada analisis mtDNA D-loop, sedangkan pada PCR masing-masing fragmen digunakan sebagai alele. Analisis yang digunakan adalah analisis molekuler varians (AMOVA) dan Fst dalam program ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 1996). Diversitas haplotype atau diversitas gene dihitung berdasarkan Nei & Tajima (1981) untuk mengamati tingkat variasi genetik yang ada. Kekeberatan antar populasi dianalisis dengan menggunakan Jarak Genetik (D) dari Takezaki & Nei (1996).

HASIL DAN BAHASAN

Mitokondria DNA D-loop

Sekuens mt DNA D-loop ikan *Tor soro* hasil PCR mempunyai panjang sekitar 700--800 bp. Empat dari tujuh enzim restriksi yang digunakan untuk memotong sekuens tersebut (*Rsa* I, *Nde* II, *Taq* I, dan *Sac* I), mempunyai situs pemotongan. Polimorfisme pola pemotongan tidak didapatkan pada keempat enzim restriksi tersebut. Pemotongan sekuens mtDNA D-loop dengan menggunakan enzim *Rsa* I, *Nde* II, *Taq* I, dan *Sac* I menghasilkan satu jenis pola saja. Salah satu contoh dari pola pemotongan oleh salah satu enzim tercantum pada Gambar 1. Ukuran sekuens mtDNA D-loop ini lebih pendek dengan panjang sekuens daerah yang sama pada beberapa ikan lainnya seperti, nila (Nugroho *et al.*, 2002), *kingfish*, *yellow tail*, dan *red sea bream* (Nugroho, 2001).



Gambar 1. Pola pemotongan daerah mtDNA D-loop ikan Kancra yang direstriksi dengan menggunakan enzim *Rsa I*. M= marker 100 bp ladder

Figure 1. Restriction site patterns of mtDNA D-loop *Tor soro* generated by *Rsa I*. M= marker 100 bp ladder

Tabel 2. Frekuensi haplotype dari mt DNA D-loop ikan kancra yang direstriksi dengan menggunakan 4 enzim restriksi, *Rsa I*, *Nde II*, *Taq I*, dan *Sac I*

Table 2. Haplotype frequency of mt DNA D-loop region of *Mystis nemurus* generated by 4 restriction enzymes, *Rsa I*, *Nde II*, *Taq I*, and *Sac I*

Haplotype	Pesawahan	Gondosoli	Ragawacana	Sumedang
1.AAAA	1,000	1,000	1,000	1,000
N-sample	10	10	10	10
N-allele	1	1	1	1
Haplotype diversity	0	0	0	0

Secara umum ikan *Tor soro* yang diteliti mempunyai tingkat keragaman yang rendah yaitu dengan nilai diversitas haplotype adalah 0 (Tabel 2). Rendahnya variasi genetik pada ikan *Tor soro* ini dimungkinkan karena budi daya komoditas ini masih belum banyak dilakukan. Hambatan pengembangan ikan *Tor soro* khususnya yang berasal dari Jawa adalah adanya aturan tidak tertulis bahwa ikan ini adalah ikan "Dewa" sehingga tidak ada masyarakat yang berani untuk membudidayakannya. Salah satu akibatnya adalah kemungkinan terjadinya persilangan (*crossing*) adalah kecil dan sebaliknya peluang perkawinan dalam keluarga atau *inbreeding* sangat besar. Keadaan ini jika terjadi dalam jangka waktu yang lama akan mengurangi tingkat keragaman dari populasi tersebut, bahkan tidak menutup kemungkinan akan menjadi populasi yang homogen.

Secara statistik dengan menggunakan AMOVA (*Analysis Molecular Variance*)

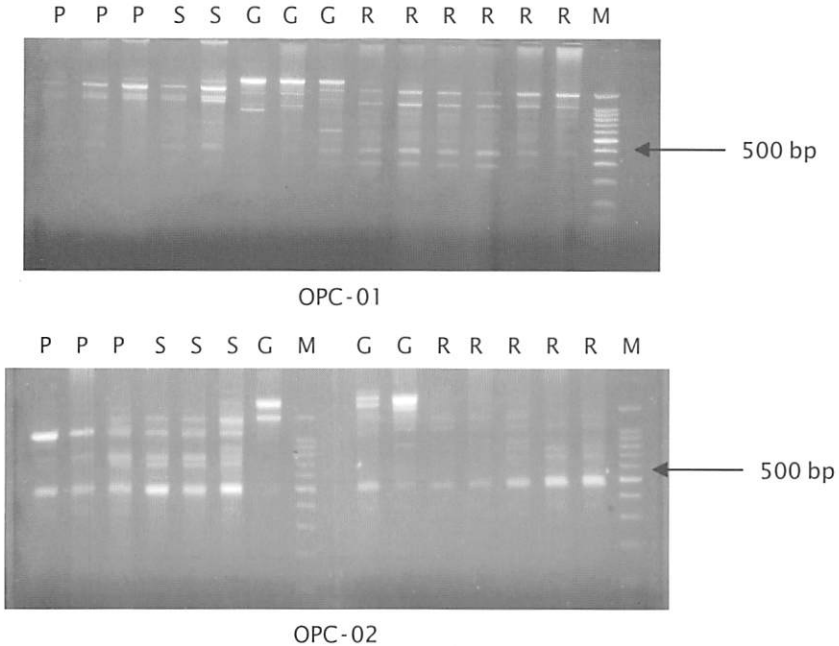
menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan genetik secara nyata antara populasi ikan Kancra yang diuji ($P > 0,05$) berdasarkan frekuensi haplotypenya. Keadaan ini mengindikasikan bahwa kemungkinan induk-induk ikan Kancra dari daerah yang diuji mempunyai kekerabatan yang dekat atau bahkan masih merupakan satu keturunan.

RAPD

Enam primer dari 20 primer yang dicoba menunjukkan hasil PCR yang baik. Dua primer di antaranya yaitu OPC-01 dan OPC-02 mempunyai fragmen yang dapat digunakan

sebagai pembeda di antara populasi ikan *Tor soro* yang diuji. Salah satu contoh hasil RAPD tertera pada Gambar 2.

Secara statistik dengan menggunakan AMOVA (*Analysis Molecular Variance*) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan genetik secara nyata antara populasi ikan *Tor*



Gambar 2. RAPD ikan kancra dengan menggunakan primer OPC-01 dan OPC-02 P= Pesawahan, S= Sumedang, G= Gandasoli, R= Ragawacana, M= Marker 100 bp ladder

Figure 2. RAPD of *Tor soro* amplified by primer OPC-01 and OPC-02 P= Pesawahan, S= Sumedang, G= Gandasoli, R= Ragawacana, M= Marker 100 bp ladder

soro yang diuji ($P < 0,05$) berdasarkan tipe restriksinya. Hasil ini berbeda dengan hasil analisis mtDNA D-loop. Perbedaan ini diduga karena adanya pengaruh dari induk jantan. Di mana, mitokondria hanya diturunkan dari induk betina sedangkan inti DNA merupakan perpaduan dari jantan dan betina. Untuk keperluan populasi genetik maka analisis RAPD lebih baik dibandingkan analisis mt-DNA.

Jarak genetik (D) yang dihitung menurut Takezaki & Nei (1996), berdasarkan fragmen RAPD dari 2 primer, OPC-01 dan OPC-02 antara koleksi ikan Kancra tertera pada Tabel 3. Jarak genetik rata-rata antara populasi ikan *Tor soro* adalah sekitar 0,349. Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik tersebut menunjukkan bahwa koleksi *Tor soro* dari Gandasoli terpisah dari kelompok *Tor soro* lainnya dari daerah Pesawahan, Ragawacana, dan Sumedang (Gambar 3). Nilai D pada ikan *Tor soro* ini relatif lebih kecil dibandingkan jarak genetik antara ikan dari populasi yang terdiri atas sub-spesies yang sama, seperti pada ikan nila (Nugroho *et al.*, 2002), *king fish* (Nugroho *et al.*, 2001) dan *greater amberjack* (Nugroho

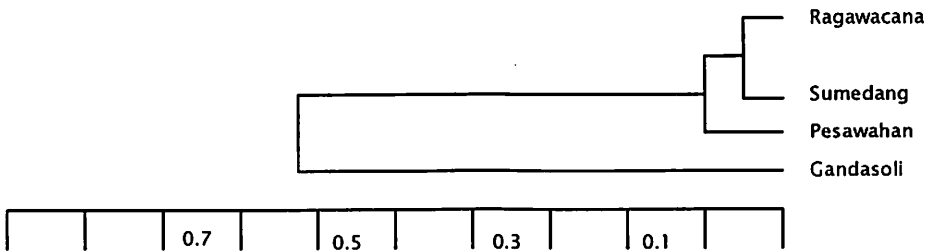
et al., 2000). Keadaan ini mengindikasikan bahwa adanya kemungkinan ikan *Tor soro* dari Jawa masih berasal dari satu populasi. Hal ini perlu ditindak lanjuti lebih jauh lagi dengan dukungan informasi secara anatomi.

Terpisahnya ikan Kancra dari daerah Gandasoli dengan populasi ikan lainnya dimungkinkan karena jumlah populasi ikan di tempat tersebut sangat terbatas, berdasarkan hasil pengamatan di lapangan ternyata populasi ini hanya terdiri atas beberapa ekor saja. Keadaan ini menimbulkan peluang bahwa terjadinya *inbreeding* sangat besar sehingga peluang hilangnya allele-allele tertentu juga besar dan pada akhirnya akan menimbulkan allele-allele spesifik yang berbeda dengan allele dari kelompok lainnya walaupun secara garis keturunan betina masih dalam satu kerabat. Mengingat keadaan ini, maka untuk menjaga keragaman genetik dari ikan kancra di Jawa melalui kegiatan penebaran hendaknya menggunakan ikan-ikan kancra dari 3 populasi yaitu Ragawacana, Pesawahan, dan Sumedang. Sedangkan ikan kancra dari Gandasoli perlu dipertimbangkan sebagai salah satu kandidat

Table 3. Jarak genetik ikan kancra dari Pesawahan, Ragawacana, Gandasoli, dan Sumedang

Table 3. Genetic distance of *Tor soro* collected from Pesawahan, Ragawacana, Gandasoli, and Sumedang

	Pesawahan	Ragawacana	Gandasoli	Sumedang
Ragawacana	0.058	xxxxxxx		
Gandasoli	0.673	0.615	xxxxxxx	
Sumedang	0.107	0.049	0.592	xxxxxxx



Gambar 3. Dendrogram ikan kancra dari Ragawacana, Sumedang, Pesawahan, dan Gandasoli
Figure 3. Dendrogram *Tor soro* from Ragawacana, Sumedang, Pesawahan, and Gandasoli

pure line jika digunakan dalam program pemuliaan, setelah pengevaluasian terhadap aspek-aspek biologi lainnya.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan genetik yang nyata antara ikan *Tor soro* dari daerah Gandasoli, Ragawacana, Pesawahan, dan Sumedang. Ikan *Tor soro* dari daerah Gandasoli terpisah secara kekerabatan terhadap kelompok ikan *Tor soro* 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 DIPA Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor tahun 2005.

DAFTAR PUSTAKA

Ferguson, A.J., A.J. Taggart, P.A. Prodohl, O. McMeel, C. Thompson, C. Stone, P. Mc

Ginnity, and R.A. Hynes. 1995. The application of molecular markers to study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, 47: 103-126.

Hardjamulia, A., N. Suhenda, dan E. Wahyudin. 1995. Pematangan gonad ikan semah (*Tor duoronensis*) dalam Keramba Jaring Apung. Ringkasan Hasil Penelitian Perikanan Air Tawar 1994/1995. Balitkantar Sukamandi.

Kottelat, M., A.J. Whitten, S.N. Kartikasari, and S. Wirjoatmodjo. 1993. Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Berkely Books, Pte. Ltd. Forrer Road, P.O. Box 115, Singapore 9128.

Nei, M. and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.

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. 2001. Population genetic studies on the aquaculture fish in genus *Seriola*

- for their risk management. PhD Thesis. Tohoku University. 123 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. *Fisheries Science*, 67: 843--850.
- Nugroho, E., A. Widiati, Mirón, dan T. Kadarini. 2002. Keragaan genetik ikan nila gift berdasarkan polimorfism mitokondria DNA D-loop. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 8(3): 1—6.
- 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.