

Analisis Keekerabatan Genetik Hibrid Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) dan Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) Menggunakan PCR-RAPD

Gilang Kusuma Mulyadi, Ibnu Dwi Buwono, dan Ujang Subhan
Universitas Padjadjaran

Abstrak

Penelitian ini bertujuan menganalisis kekerabatan generasi kedua hasil persilangan ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan hibrid ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) terhadap induknya dengan metode PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction*) menggunakan Primer jenis Operon, OPA-3 dan OPA-11. Metode penelitian dilakukan secara eksploratif dan dianalisis secara deskriptif kualitatif. Hasil dari penggunaan primer OPA-11 memunculkan pita lebih banyak jika dibandingkan dengan OPA-3. indeks kekerabatan generasi keduanya sangat beragam, hasil persilangan hibrid ikan Nilem jantan dengan ikan mas betina sebesar 70,5% mengarah kepada ikan mas. Hasil persilangan hibrid ikan Nilem jantan dengan ikan Nilem betina memiliki nilai kekerabatan sebesar 26% mengarah kepada hibrid ikan Nilem. Fenotip yang dimunculkan dari generasi kedua ini mengarah pada induk betina seperti persilangan hibrid ikan Nilem jantan dengan ikan mas betina lebih menyerupai ikan mas dibandingkan ikan Nilem. Sedangkan Hasil persilangan hibrid ikan Nilem jantan dengan ikan Nilem betina menyerupai ikan Nilem.

Kata kunci : Keturunan Kedua, Keekerabatan, Hibrid, Mas, Nilem, PCR-RAPD.

Abstract

This research aims to analyze kinship second generation of crossbred carp (*Cyprinus carpio*) and hybrid fish Nilem (*Osteochilus hasselti*) to its parent by PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction*) using Primer kind Operon, OPA 3 and OPA -11. Research method is explorative and descriptive analysis qualitative. The results of the use of primer OPA-11 raises the tape more than the OPA-3. index kinship second generation is very diverse, the result of crossing hybrid Nilem male fish with female carp amounted to 70.5% leading to a goldfish. Results hybrid crosses Nilem male fish with female Nilem fish have the value of kinship by 26% leading to a hybrid fish Nilem. Phenotype that is raised from the second generation of this leads to female broodstock fish Nilem like a cross hybrid males with females more resemble goldfish carp fish compared Nilem. While the results of hybrid crosses Nilem male fish with female Nilem fish resembling fish Nilem

Keywords : Second Generation, Kinship, Hybrid, Goldfish, Nilem, PCR-RAPD.

Pendahuluan

Dewasa ini tingkat kemajuan teknologi dalam budidaya sangat berkembang pesat dalam upaya pemenuhan permintaan pasar. Diperlukan terobosan baru khususnya dalam produksi telur ikan nilam yang diharapkan bisa menjadi alternatif permintaan caviar dipasar ekspor. Ikan nilam memiliki pertumbuhan relatif lambat jika dibandingkan dengan ikan mas yang memiliki pertumbuhan lebih cepat sehingga diperlukan upaya untuk meningkatkan keturunan ikan nilam yang memiliki pertumbuhan lebih cepat seperti ikan mas dengan cara perkawinan silang (hibridisasi).

Persilangan antara genus dalam satu famili atau berbeda famili telah banyak dilakukan, misalnya persilangan antara ikan nilam mangot jantan dengan ikan mas majalaya betina menghasilkan hibrid F1 dengan bentuk tubuh yang mengarah pada ikan nilam (Abidin, 2014). Penelitian lanjutan antara hibrida F1 nilam jantan dengan ikan mas majalaya betina melalui silang balik (*backcrossing*) menghasilkan generasi F2 yang diharapkan memiliki pertumbuhan lebih cepat dari generasi F1.

Berdasarkan latar belakang diatas diperlukan deteksi kekerabatan keturunan hibrid ikan nilam F1 jantan dan ikan mas majalaya betina. Uji kekerabatan ini dilakukan pada ikan hibrid F2 berumur 3 bulan hasil persilangan hibrid ikan nilam F1 jantan dan ikan mas majalaya betina yang diharapkan penelusuran ini dapat menjelaskan jalur pewarisan keturunan ini berasal dari induk jantan F1 atau induk betina F1. Uji progeni memerlukan marka genetik untuk mendeteksi fragmen monomorfik yang menggambarkan jalur kekerabatan sehingga dapat di telusuri jalur pewarisan dari induk F1 sebagai tetuanya. Metode RAPD-PCR merupakan teknik yang dapat mendeteksi fragmen monomorfik DNA genom dari progeni F2 dan tetua F1 yang dapat di interpretasikan dalam pohon filogenetik yang memetakan kekerabatan dari induk dan keturunan.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksploratif deskriptif kualitatif. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak 6 (enam) ikan, yaitu ikan nilam normal, ikan mas normal, f1 nilam hibrid, F2 persilangan nilam hibrid dengan

ikan mas, F2 persilangan nilam hibrid dengan ikan nilam dan F2 persilangan ikan nilam fungsional dengan nilam hibrid.

Daftar Primer RAPD Dengan Urutan Basa (Yoon and Park 2001)

Nama Primer	Urutan Basa
OPA – 03	AGT CAG CCAC
OPA – 11	CAA TCG CCGT

Komponen larutan yang digunakan untuk reaksi PCR yaitu GoTaq® *master mix 2G fast* 12,5 µl, *Nuclease Free Water (NFW)* 8,5 µl, Primer RAPD 2,0 µl (OPA-03 dan OPA-11), DNA template ikan uji 2,0 µl. Seluruh bahan dimasukkan kedalam tabung *microtube* steril berukuran 50 µl. Reaksi PCR dilakukan menggunakan *thermal cycler* sebanyak 45 siklus. Setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 36°C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit. Setelah 45 siklus tersebut diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk amplifikasi ini kemudian di elektroforesis selama 65 menit pada tegangan 75V pada gel agarose 1,4%.

Hasil Dan Pembahasan

Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom dilakukan sesuai dengan metode dan prosedur menggunakan Kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Bagian tubuh ikan yang akan digunakan menjadi sampel ialah pada bagian ekor. Ekor adalah bagian tubuh ikan yang selalu digunakan untuk bergerak aktif didalam air dan membutuhkan energi untuk meregenerasi sel-sel otot. pengambilan pada bagian tersebut bertujuan untuk mendapatkan bagian yang dapat merepresentasikan sel pada tubuh ikan sampel dalam kondisi yang baik. Selain itu bagian sampel dapat diambil tanpa harus membunuh ikan tersebut.

DNA genom hasil isolasi dilakukan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer untuk melihat kemurnian DNA sampel. Tingkat kemurnian isolat DNA murni memiliki nilai yang berkisar antara 1,8-2,0 dan uji kualitatif menggunakan metode standar berupa identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA yaitu elektroforesis gel agarose. Jika

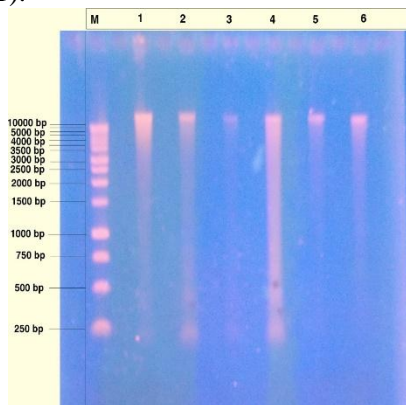
tingkat kemurniannya rendah maka akan mempengaruhi pada penempelan primer

terhadap situsnya dan akan menghambat aktivitas enzim polimerase DNA.

Tabel 3. Nilai Kemurnian Isolat DNA Sampel Ikan Uji

No	Sampel	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Result	Konsentrasi (ng/µl)
1	F0 Ikan Nilem Normal ♀	0.016	0.007	2.286	4,00
2	F0 Ikan Mas Normal ♀	0.098	0.051	1.922	24,50
3	F1 Ikan Nilem Hibrid ♂	0.182	0.110	1.655	45,50
4	F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Nilem Normal ♀	0.097	0.050	1.941	24,25
5	F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Mas Normal ♀	0.099	0.502	1.971	24,75
6	Ikan Nilem Fungsional ♂ x F1 Ikan Nilem Hibrid ♀	0.114	0.048	2.375	28,50

Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA genom hasil isolasi dengan menggunakan elektroforesis. Langkah pertama dalam proses ialah pembuatan gel Agarose dengan Konsentrasi 1% (lampiran 3). Seluruh sampel dimasukan kedalam gel Agarose, selanjutnya gel di elektroforesis dengan daya 75 volt selama 45 menit. Hasil tersebut kemudian direndam kedalam larutan Etidium Bromida (EtBr) dengan konsentrasi 0,5% selama 25 menit. Perendaman ini bertujuan untuk memberikan pewarnaan pada DNA sehingga saat pemaparan sinar UV oleh transuliminator DNA dapat tervisualisasikan (Gambar 1).



Gambar 1 . Hasil Elektroforesis DNA Genom ikan sampel uji

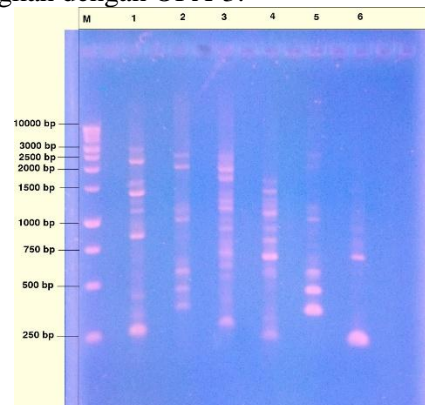
Keterangan :

- M : Marker DNA Ladder 1kb
- 1 : F0 Ikan Nilem Normal ♀
- 2 : F0 Ikan Mas Normal ♀
- 3 : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂
- 4 : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Nilem Normal ♀
- 5 : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Mas Normal ♀
- 6 : Ikan Nilem Fungsional ♂ x F1 Ikan Nilem Hibrid ♀

6 : Ikan Nilem Fungsional ♂ x F1 Ikan Nilem Hibrid ♀

Hasil Amplifikasi dan Deteksi Keragaman Genetik

Pemilihan primer yang akan dilakukan pada proses amplifikasi sampel DNA berdasarkan referensi yaitu dengan menggunakan Primer OPA (*Operon Primer set-A*). Penggunaan primer dalam proses amplifikasi ini berjumlah 2 (dua) diantaranya adalah OPA-3 dan OPA- 11. Ada sebanyak 6 (enam) sampel ikan uji dan metode yang akan digunakan dalam amplifikasi ialah RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction*). Setelah melewati proses prosedur pengerjaan amplifikasi (lampiran 4) selanjutnya dilakukan Elektroforesis (lampiran 3) untuk mengetahui hasil dari amplifikasi pada sampel uji. Menunjukkan bahwa primer OPA-11 lebih banyak menghasilkan fragmen DNA jika dibandingkan dengan OPA-3.



Gambar 15 . Hasil Amplifikasi Primer OPA-11

Gilang Kususma: Analisis Kekeabatan Genetik Hibrid Ikan.....

Keterangan :

- M : Marker DNA *Ladder* 1kb
 - 1 : F0 Ikan Nilem Normal ♀
 - 2 : F0 Ikan Mas Normal ♀
 - 3 : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂
 - 4 : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Nilem Normal ♀
 - 5 : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Mas Normal ♀
 - 6 : Ikan Nilem Fungsional ♂ x F1 Ikan Nilem Hibrid ♀
- Hasil dari amplifikasi DNA dengan menggunakan Primer OPA-11 yang tertera

pada gambar diatas menunjukkan variasi pita monomorfik dan polimorfik. Munculnya Fragmen pita dihasilkan oleh sekuen DNA *template* yang berkomplemen dengan urutan basa primer. Banyaknya pita yang terekpresikan dari hasil amplifikasi menunjukkan kesesuaian pemilihan Primer terhadap DNA *template* serta kesesuaian terhadap pengaturan suhu denaturasi, annealing, dan ekstensi pada mesin PCR (*Thermal Cycler*). Kemunculan pita – pita tersebut disajikan pada (Tabel 1).

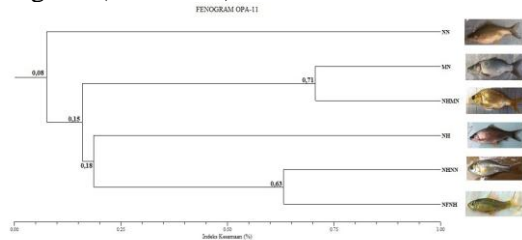
Tabel 1. Pita Polimorfik dan Monomorfik menggunakan Primer OPA-11

Jarak Fragmen (bp)	NN ♀	MN ♀	NH ♂	F1 NH ♂ x NN ♀	F1 NH ♂ x MN ♀	NF ♂ x F1 NH ♀
2646	--*					
2532		--			--	
2259	--*					
2188	--*					
2093		--	--		--	
2015			--*			
1856			--*			
1787			--	--		
1698	--*			--		
1554				--		--
1497	--*					
1379			--	--		
1315				--*		
1258			--		--	
1215	--			--	--	
1158				--*		
1098		--			--	
973			--	--		--
876	--*					
830				--		--
726			--*			
684				--		--
640		--		--		
605			--*			
556		--		--	--	--
513			--*			
450		--			--	
430					--*	
405	--*					
357		--			--	
338					--*	
314	--*					
294			--*			
273	--*					
259	--			--		--
238						--*

Keterangan: -- pita yang terekpresikan --* Pita Polimorfik

Analisis Kekerabatan Genetik

Pohon kekerabatan didapatkan dari pita-pita yang muncul dari OPA-11 dan diubah kedalam matrik biner kemudian diolah menggunakan program NTSYS untuk mendapatkan fenogram atau pohon kekerabatan pada sampel uji. Berikut hasil amplifikasi yang disajikan dalam bentuk fenogram (Gambar 2)



Gambar 16. Fenogram Kekerabatan Genetik Menggunakan Primer OPA-11

Keterangan :

- NN : F0 Ikan Nilem Normal ♀
- MN : F0 Ikan Mas Normal ♀
- F1 NH : Ikan Nilem Hibrid ♂
- F2 NHNN : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Nilem Normal ♀
- F2 NHMN : F1 Ikan Nilem Hibrid ♂ x Ikan Mas Normal ♀
- F2 NFNH : Ikan Nilem Fungsional ♂ x F1 Ikan Nilem Hibrid ♀

Terlihat pada (Gambar 15) hasil amplifikasi yang diterjemahkan kedalam bentuk pohon kekerabatan (fenogram) menggunakan Primer OPA-11 menunjukkan dari keenam sampel terbagi dalam 5 kelompok yakni, MN dan NHMN adalah keturunan kedua dari hasil persilangan ikan nilem hibrid dengan ikan mas normal sebagai kelompok pertama yang memiliki indeks kesamaan yang tinggi dibandingkan dengan kelompok yang lain sebesar 0,71 atau 71%, hal ini menunjukkan bahwa tingkat kekerabatan yang dimiliki oleh kedua sampel uji ini sangat dekat, secara fenotip NHMN memiliki banyak kesamaan dengan ikan mas normal seperti warna, bentuk tubuh, sirip, ukuran kepala.

Kelompok kedua NHNN dan NFNH adalah keturunan kedua dari hasil persilangan ikan nilem normal dan nilem hibrid, dikarenakan masih dalam indukan yang sama sampel ini memiliki indeks kesamaan yang tidak jauh berbeda dengan kelompok pertama yaitu, 0,63 atau 63%, persentasi nilai ini juga menunjukkan bahwa sampel ini memiliki kekerabatan yang tinggi terlihat dari fenotip

kedua sampel ini menyerupai ikan nilem normal.

Kelompok ketiga NH dengan NHNN dan NFNH adalah keturunan pertama dan kedua dari ikan mas normal dan ikan nilem normal yang memiliki nilai indeks kesamaan sebesar 0,18 atau 18%, jika dibandingkan dengan kedua kelompoknya NH memiliki nilai presentasi yang kecil hal ini menunjukkan bahwa NH memiliki kekerabatan yang jauh dibandingkan keturunannya yaitu NHNN dan NFNH, jika dilihat NH adalah indukan jantan dari keturunan kedua sampel, hal ini tidak menunjukkan kekerabatan yang dekat, namun secara fenotip NHNN dan NFNH banyak kesamaan seperti NH.

Kelompok keempat MN dan NHMN dengan NH, NHNN dan NFNH memperlihatkan bahwa presentasi nilai indeks kesamaan yang terbilang kecil sebesar 0,15 atau 15% hal ini menunjukkan bahwa kekerabatan yang ditunjukkan pada sampel kelompok empat ini semakin menjauh, jika dilihat kembali pada kelompok satu bahwa indeks kesamaan ini terjadi antara MN dan NHMN, dimana NHMN secara fenotip lebih cenderung menyerupai NH dan didukung dari hasil pengukuran indeks kesamaan antara kedua sampel tersebut sebesar 71%, sedangkan NH, NHNN dan NFNH secara fenotip menyerupai NH. Munculnya presentasi nilai 15% pada kelompok ini karena keturunan kedua cenderung sama kepada indukan yang secara taksonomi memiliki perbedaan. Masuk pada kelompok terakhir yaitu, NN dengan MN, NHMN, NH, NHNN, NFNH memiliki nilai indeks kesamaan sebesar 0,08 atau 8% hal ini menunjukkan bahwa NN memiliki kekerabatan yang jauh jika dibandingkan dengan semua sampel uji.

Simpulan

Berdasarkan hasil dari Penelitian yang sudah dilakukan maka, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Tingkat keragaman genetik pada sampel uji ikan mas, ikan nilem, F1 nilem hibrid dan generasi keduanya memunculkan pita polimorfik menggunakan primer OPA-11.
2. Indeks kesamaan genetik hasil persilangan F1 nilem hibrid jantan dengan ikan mas betina sebesar 71%, F1 nilem hibrid jantan dengan ikan nilem betina normal sebesar 26% dan

nilem fungsional jantan dengan F1 nilem hibrid betina sebesar 63%.

3. Primer OPA-11 dapat mendeteksi hubungan kekerabatan induk ikan nilem, ikan mas dan nilem hibrid terhadap keturunannya dan mampu memunculkan pita polimorfik namun tidak dapat memunculkan pita monomorfik

Daftar Pustaka

- Abidin, J. A. 2013. Efektivitas Penggunaan Sperma Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) terhadap keberhasilan ginogenesis dan hibridisasi ikan nilem (*Osteochilus hasselti*). Sripsi. Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Asih, Sidi.,E. Nugroho., Mulyasari.2006.*Penentuan Variasi Genetik Ikan Batak (Torsoro) Dari Sumatera Utara Dengan Metode Analisis Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)*.Bogor.Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar.
- Beardmore, J. J.; Mair, G. C. and Lewis, R. I. (1997), Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, 28, 829-839.
- Diani AF. 2013. Analisis Kekerabatan Strain Ikan Lele (*Clarias Spp*) Menggunakan Penanda Genetik berbasis RAPD-PCR. Skripsi. Universitas Padjadjaran. Jatinangor
- Dunham, R.A. 2002. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approach*. CABI.
- Freitas, P.D., P.M. Galleti Jr. 2005. Assessment of The Genetic Diversity in Five Generations of a Commercial Boodstock Line of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *African Journal of Biotechnology* 4 (12) : 1362 – 1367.
- Jewell C, Bennett P, Mutch E, Ackermann C, Williams FM. 2007b. Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochem Pharmacol* 74:932–939.
- Liu, Z J.Li, P., Argue, B., Dunham, R., 1998a.*Inheritance of RAPD Markers In Channel Catfish (Ictalurus punctatus), Blue Catfish (I.furcatus) and Their F1, F2 And Backcross Hybrids*. Anim.Genet.29:58-62.
- H.A. Erlich (ed.), 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press, 246 pp.
- Haliman, R.W. dan Adijaya, D. 2005.*Udang Vannamei*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Hardjamulia, A. 1979. *Budidaya Ikan Introduksi*. Departemen Pertanian. Balai Latihan Pendidikan dan Penyuluhan. SUPM Bogor. 49 hal.
- McPherson, M.J., and so. Moller. 2006. PCR: The Basics. 2nd Edition. Taylor and Francis Group. New York. pp: 9-29.
- Mandhasia, A. 2014. Perbandingan Analisis Kekerabatan Nilem Merah, Nilem Hijau, Nilem Mangot, Beureum Panon menggunakan RAPD dan Sekuen Penyandi GnRH II.Skripsi. Universitas Padjadjaran. Jatinangor
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polimerase chain reaction. *Scientific American* 3:56-65
- Murray RK. et.al. 2009. Harper's Illustrated Biochemistry 28th ed. New York : Lange Medical Publications, hlm. 155, 459
- Muharram,E.G.2012.*Analisis Kekerabatan Ikan Mas Koi (Cyprinus carpio koi) dan Ikan Mas Majalaya (Cyprinus carpio carpio) Menggunakan Metoda RAPD*.Skripsi.Program Studi Perikanan.Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran.
- Mulyani, Y. 2003.*Isolasi dan Karakterisasi Mikrosatelit pada Mangga (Mangifera indica L)*.Tesis.Institut Teknologi Bandung.
- Mulyasari. 2010. Karakteristik Fenotipe Morfomeristik dan Keragaman Genotipe RAPD (*Randomly Amplified Polymorphism DNA*) Ikan Nilem *Osteochilus hasselti* Di Jawa Barat. Tesis. Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mulyasari., D. T. Soelistyowati., A. H. Kristanto., dan I. I. Kusmini. 2010. Karakteristik Genetik Enam Populasi Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) di Jawa Barat. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5 (2): 175-182.