

IDENTIFIKASI KANDIDAT MARKA MOLEKULER PADA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*) RENTAN STRES MENGGUNAKAN TEKNIK RAPD-PCR

IDENTIFICATION OF CANDIDATE MOLECULAR MARKERS ON HARD-LIPPED BARB (*Osteochilus hasselti*) SUSCEPTIBLE STRESS USING THE RAPD-PCR TECHNIQUE

Amalia Hayati¹⁾, Odang Carman⁽²⁾, dan Alimuddin⁽²⁾

¹Mahasiswa Program Studi Teknologi dan Manajemen Perikanan Budidaya, Institut Pertanian Bogor

²Program Studi Teknologi dan Manajemen Perikanan Budidaya, Institut Pertanian Bogor

Jl. Raya Dramaga, Babakan, Kecamatan Dramaga, Kota Bogor, Jawa Barat. 16680

amalia.hayati62@gmail.com

ABSTRAK

Ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) merupakan ikan budidaya air tawar di Indonesia, khususnya Jawa Barat. Transportasi menyebabkan ikan stres, dan perubahan respons fisiologis. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi kandidat marka molekuler menggunakan teknik RAPD-PCR pada ikan nilem yang rentan stres. Ikan berukuran panjang total 4.82 ± 0.54 cm, ditransportasikan selama 4 jam dengan jarak tempuh sekitar 76 km. Kepadatan ikan dibedakan menjadi 100, 300, dan 500 ekor per lima liter air, dengan tiga ulangan. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengambil masing-masing dua ekor dari tiap kepadatan ikan yang sehat dan *moribund*, kemudian sirip ekor dipotong 10-20 mg. Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan lima primer (OPA08, OPA11, OPB06, OPC03, dan OPC09), amplikon dielektroforesis dengan gel agarosa 1.5%. Pasca transportasi kualitas air parameter suhu, CO₂, amonia, nitrit, dan suhu mengalami peningkatan, sementara parameter DO dan pH mengalami penurunan pada setiap kepadatan. Persentase ikan nilem sehat kepadatan 100 (99.33 ± 0.57) lebih tinggi dari kepadatan 500 ekor (96.27 ± 0.80). Persentase ikan nilem *moribund* pada kepadatan 100 (0.67 ± 0.58) lebih rendah dari kepadatan 500 ekor (1.93 ± 0.12). Primer OPA11 menghasilkan pita berukuran 1250 bp yang terdapat pada ikan yang *moribund*, dengan peluang kemunculan pita sebesar 67%. Pita tersebut menjadi pembeda antara ikan nilem yang sehat dengan *moribund* dan dapat menjadi kandidat marka molekuler penanda ikan yang rentan stres.

KATA KUNCI: ikan nilem, *moribund*, RAPD, stres, transportasi

ABSTRACT

Hard-lipped barb (Osteochilus hasselti) is a cultivated freshwater fish, especially in West Java area. Transportation can cause fish stress, and changes in physiological responses. The study aimed to identify candidates for molecular markers using the RAPD-PCR technique in hard-lipped barb that are susceptible to stress. The fish are used measuring 4.82 ± 0.54 cm in body length, transported for 4 hours with a distance of about 76 km. Fish density is divided into 100, 300 and 500 /five liter water, with three replications. Genomic DNA extraction by taking each of two fish from healthy and moribund fish density, then the caudal fin was cut 10-20 mg. PCR amplification was performed using five primers (OPA08, OPA11, OPB06, OPC03, and OPC09), then the amplicon were electrophoresis in 1.5% agarosa gel. Post-transportation water quality parameters namely temperature, CO₂, ammonia, nitrite, and temperature increased and DO and pH decreased at each density. The percentage of health nilem fish density 100 (99.33 ± 0.57) is higher than the density of 500 fish (96.27 ± 0.80). The percentage of moribund nilem fish at density 100 (0.67 ± 0.58) is lower than the density of 500 fish (1.93 ± 0.12). OPA11 primers produce a 1250 bp band found in moribund fish,

probability appearance of the band which is 67%. These bands become the difference between healthy hard-lipped barb fish and moribund and can be candidates for molecular markers of stress-prone fish.

KEYWORDS: *hard-lipped barb fish, moribund, RAPD, stress, transportation.*

PENDAHULUAN

Kegiatan budidaya ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) menghadapi kendala diantaranya, sensitivitas ikan nilem yang tinggi terhadap berbagai tekanan sehingga menyebabkan stres (Asma, *et al.* 2016). Ketersediaan benih yang berkualitas baik juga masih terbatas dan menjadi salah satu faktor rendahnya produksi. Stres pada ikan dapat terjadi pada saat transportasi. Solusi dalam penanggulangan stres pada ikan dapat dilakukan dengan seleksi berbasis marka molekuler (Mulyasari, 2007). Penelitian terkait marka molekuler pada ikan nilem terkait stres belum pernah dilakukan. Teknik yang dapat dilakukan untuk seleksi marka molekuler diantaranya, adalah *random amplification polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction (PCR)* (Oktaviani, 2013). Primer yang digunakan untuk teknik RAPD berukuran pendek, sehingga primer dapat menempel pada daerah penempelan yang tersebar secara acak pada DNA genom (Partis dan Wells, 1996).

Pemilihan primer penting dilakukan untuk menentukan variasi genetik yang diidentifikasi, optimasi primer dan program PCR perlu dilakukan untuk menghasilkan polimorfisme (Liu, *et al.* 1999) dengan pita DNA yang jelas (Diakou dan Dovas, 2001). Primer yang digunakan pada teknik RAPD tidak spesifik untuk gen tertentu, primer akan menempel (*annealing*) dengan arah yang berlawanan agar terjadi amplifikasi (Kumar dan Gurusubramanian, 2011). Polimorfisme DNA yang muncul dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan antar populasi, spesies, atau suatu individu (Anggereini, 2008). Polimorfisme adalah ukuran keragaman genetik yang didasarkan pada proporsi lokus polimorfik terhadap total lokus yang teridentifikasi (Oktaviani, 2013).

METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai bulan Juli 2019 bertempat di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Organisme Akuatik, dan Laboratorium Lapangan Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Benih ikan nilem yang digunakan berasal dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi, Jawa Barat. Ikan uji berukuran panjang total 4.82 ± 0.54 cm. Transportasi ikan selama 4 jam dengan jarak tempuh sekitar 76 km. Plastik yang digunakan untuk *packing* berukuran 40×60 cm, dengan volume air lima liter. Ikan dalam plastik kemas terdiri atas tiga kepadatan berbeda, yaitu: 100, 300, dan 500 ekor, masing-masing dengan tiga ulangan. Perlakuan kepadatan saat transportasi digunakan untuk mendapatkan ikan yang rentan terhadap stres. Kualitas air diukur pra dan pasca transportasi, parameter yang diukur adalah suhu, *dissolved oxygen* (DO), pH, total amonia nitrogen (TAN), nitrit dan CO₂ dengan mengambil sampel air pra dan pasca transportasi.

Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengambil masing-masing dua ekor ikan yang sehat dan *moribund* dari tiap kepadatan. Bagian sirip ekor dipotong sebanyak 10-20 mg. Optimasi pertama dilakukan dengan menguji lima primer RAPD-PCR (OPA08, OPA11, OPB06, OPC03, dan OPC09) dengan satu sampel DNA ikan nilem dengan tiga konsentrasi berbeda, yaitu: 1, 2, dan 3 µL dengan tujuan untuk menganalisis kemampuan primer dalam mengamplifikasi dan menghasilkan polimorfisme. Perbedaan konsentrasi primer bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi primer yang dapat menghasilkan pita terang dan jelas. Selanjutnya, dilakukan amplifikasi dengan primer RAPD-PCR satu per satu dengan sampel DNA *template* dari masing-masing dua ekor ikan yang sehat dan *moribund* dari tiap kepadatan untuk mendapatkan pita yang menjadi pembeda antara ikan nilem yang sehat dan *moribund*.

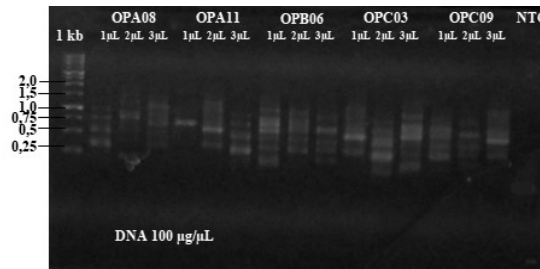
Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume akhir 10 μ L yang terdiri atas *Taq* DNA polymerase, primer RAPD-PCR, *nuclease free water* (NFW), dan *template* DNA. Program amplifikasi PCR yang digunakan adalah denaturasi pada suhu 95°C selama 40", *annealing* pada suhu 32°C selama 40", dan ekstensi pada suhu 72°C selama 40". Primer β -actin digunakan sebagai kontrol internal *loading* DNA, dan *no template control* (NTC) sebagai kontrol negatif. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 1.5% pada tegangan 120 V. Pita DNA divisualisasi menggunakan *UV transilluminator*.

Analisis data elektroforegram RAPD dan kualitas air dilakukan menggunakan uji deskriptif. Data ikan mati dan *moribund* dianalisis menggunakan SPSS IBM 22 dengan selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN BAHASAN

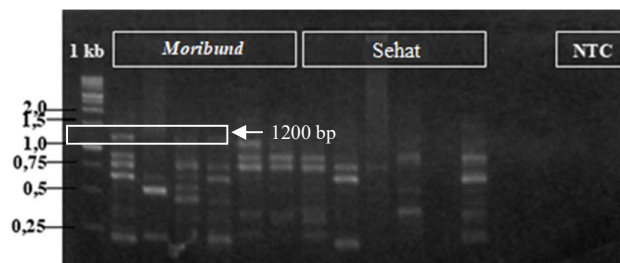
Profil RAPD

Amplifikasi DNA genom menggunakan lima primer dengan tiga konsentrasi berbeda disajikan pada Gambar 1. Kelima primer RAPD dapat mengamplifikasi dan menghasilkan polimorfisme. Konsentrasi primer 3 μ L menghasilkan banyak pita DNA yang terang dan jelas. Tidak adanya pita DNA produk amplifikasi pada NTC (Gambar 1) menunjukkan tidak terdapat kontaminasi dalam proses amplifikasi



Gambar 1 Elektroforegram pengujian lima jenis primer RAPD dengan tiga konsentrasi yang berbeda

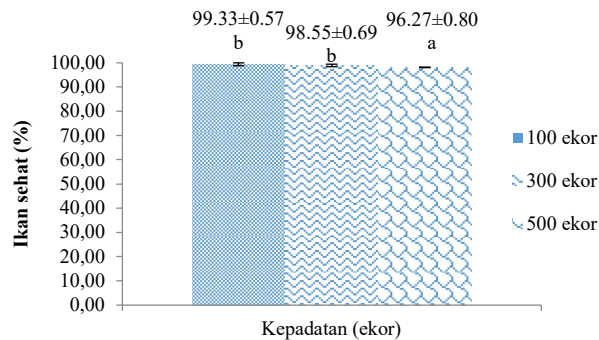
Primer OPA11 menghasilkan pita berukuran 1200 bp yang terdapat pada ikan yang *moribund* (Gambar 6A), sedangkan empat primer RAPD lainnya (OPA08, OPB06, OPC03, dan OPC09) tidak menghasilkan pita pembeda antara ikan nilem sehat dan *moribund*. Persentase ikan yang mempunyai pita DNA tersebut adalah 67%.



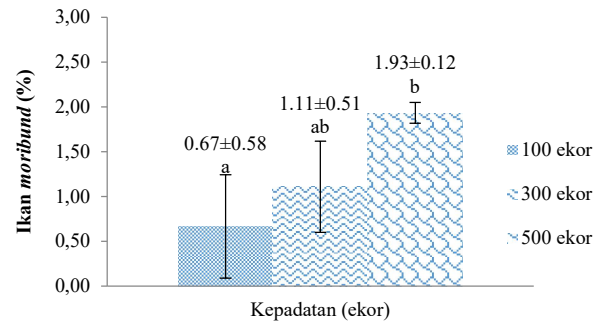
Gambar 2 Elektroforegram hasil amplifikasi ikan nilem sehat dan *moribund* pasca transportasi menggunakan primer OPA11 dengan waktu elektroforesis selama 50 menit

Jumlah ikan nilem sehat dan *moribund* pasca transportasi

Persentase benih ikan nilem sehat disajikan pada Gambar 7. Persentase tertinggi diperoleh pada kepadatan 100 ekor (99.33 ± 0.57), sedangkan terendah pada kepadatan 500 ekor (96.27 ± 0.72). Persentase ikan sehat kepadatan 100 dan 300 ekor berbeda nyata dengan kepadatan 500 ekor ($P < 0.05$). Persentase benih ikan nilem yang *moribund* pasca transportasi pada kepadatan 100 ekor berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kepadatan 500 ekor (Gambar 8). Sementara, pada kepadatan 300 ekor persentase ikan nilem *moribund* tidak berbeda nyata dengan kepadatan 100 dan 500 ekor. Persentase benih ikan nilem *moribund* pasca transportasi yang tertinggi pada kepadatan 500 ekor (1.93 ± 0.12), sedangkan terendah pada kepadatan 100 ekor yaitu (0.67 ± 0.58).



Gambar 3 Persentase ikan nilem sehat pasca transportasi



Gambar 4 Persentase ikan nilem *moribund* pasca transportasi

Kualitas Air

Hasil pengukuran kualitas air menunjukkan bahwa parameter kualitas air TAN, nitrit, CO₂, dan suhu mengalami peningkatan yang cukup signifikan pasca transportasi, peningkatan tertinggi pada kepadatan 500 ekor. Sementara, parameter pH dan DO mengalami penurunan pada pasca transportasi, penurunan yang cukup signifikan terdapat pada kepadatan 500 ekor.

Tabel 1 Hasil pengukuran kualitas air pada pra dan pasca transportasi ikan nilem

Kualitas air	Pra Transportasi			Pasca transportasi		
	100	300	500	100	300	500
Kepadatan (ekor)						
TAN (mg/L)	0.024	0.016	0.024	0.029	0.046	0.267
Nitrit (mg/L)	0.006	0.005	0.007	0.507	0.448	0.632
CO ₂ (mg/L)	20.30	21.30	25.23	28.96	37.28	66.88
Suhu (°C)	28.83	29.93	28.50	32.60	32.70	34.27
pH	7.17	7.30	7.17	6.93	6.97	6.76
DO (mg/L)	6.10	6.90	6.53	3.90	4.03	3.23

Kemunculan pita berukuran 1200 bp yang hanya terdapat pada ikan nilem yang *moribund* bisa menjadi kandidat marka molekuler penanda ikan nilem yang rentan stres, serta menyediakan informasi sekuens atau marka pada ikan yang rentan stres untuk kegiatan pemuliaan atau perbaikan genetik. Peluang kemunculan pita tersebut yaitu 67%, hal yang dapat menyebabkan variasi peluang kemunculan pita adalah perubahan variasi susunan dari kromosom seperti delesi/insersi yang menyebabkan produk amplifikasi akan berbeda pada hasil amplifikasi dan akan terdeteksi sebagai kemunculan suatu pita dalam profil RAPD (William, *et al.* 1990). Hayati. 2021

Aplikasi pada kegiatan pemuliaan yaitu ketika pita berukuran 1200 bp tidak terdapat pada suatu individu atau spesies ikan nilem, maka ikan nilem tersebut merupakan ikan yang tahan terhadap stres pada proses transportasi.

KESIMPULAN

Kandidat marka molekuler untuk ikan nilem yang rentan stres pada produk RAPD-PCR berukuran 1200 bp, dengan peluang kemunculan pita 67%. Pita khusus yang muncul pada sampel ikan yang *moribund* berkorelasi dengan ikan yang rentan stres yang kemudian dapat digunakan untuk kegiatan pemuliaan.

SARAN

Verifikasi kandidat marka molekuler dengan pemijahan untuk mengetahui fenotipe keturunannya perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggereini E. (2008). *Random amplified polymorphic DNA (RAPD)* suatu metode analisis DNA dalam menjelaskan berbagai fenomena biologi. *Biospecies*. 1:2, pp. 73-76.
- Asma N, Muchlisin ZA, Hasri I. (2016). Pertumbuhan dan kelangsungan hidup benih ikan peres (*Osteochilus vittatus*) pada ransum harian yang berbeda. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan dan Perikanan Unsyiah*. 1:1, pp.1-11.
- Diakou A, Dovas CI. (2001). Optimazation of random-amplified polymorphic DNA producing amplicons up to 8500 bp and revealing intraspecies polymorphism in *Leishmania infantum* isolates. *Analytical Biochemistry*. 288:10, pp. 195-200.
- Kumar NS, Gurusubramanian G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Mipograss*. 11:3, pp. 116-124.
- Liu ZJ, Li P, Argue BJ, Dunham RA. (1999). Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*. 174(1): 59-68.
- Mulyasari. (2007). Beberapa teknik penentuan variasi genetik pada ikan untuk proses pemuliaan. *Media Akuakultur*. 2:1, pp. 177-182.
- Oktaviani T. (2013). Analisis keragaman genotif RAPD dan fenotipe truss morfometrik tiga populasi ikan gabus [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Partis L, Wells RJ. (1996). Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes*. 10:1, pp. 435-441.
- William JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:22, pp. 6531-6535.