

ANALISIS KEKERABATAN IKAN MAS KOI (*Cyprinus carpio koi*) DAN IKAN MAS MAJALAYA (*Cyprinus carpio carpio*) MENGGUNAKAN METODE RAPD

Elvin Giantara Muharam*, Ibnu Dwi Buwono** dan Yuniar Mulyani**

*) Alumni Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

**) Staf Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan strain ikan Koi dan ikan Mas Majalaya menggunakan metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). DNA dari sampel ikan Koi (Kohaku, Tancho, Ogon, Asagi, dan Shiro), Majalaya, dan Patin diisolasi menggunakan metode CTAB. Amplifikasi DNA menggunakan primer OPA-2 (5'-TGCCGAGCTG -3') dan OPA-3 (5'-AGTCAGCCAC -3') setelah optimasi dari beberapa primer. Hasil penelitian menunjukkan kekerabatan ikan Koi dengan ikan Mas Majalaya relatif dekat (indeks kesamaan 62%). Kekerabatan ikan Koi strain Kohaku, Tancho, Shiro menurut indeks kesamaan berkisar 48-55% dan Strain Koi Ogon dan Asagi memiliki hubungan kekerabatan terdekat (indeks kesamaan 84%). Primer OPA-2 lebih sensitif untuk mendeteksi hubungan kekerabatan ikan Koi dan ikan Mas Majalaya.

Kata kunci : indeks kesamaan, ikan Koi, ikan mas Majalaya, kekerabatan

ABSTRACT

ANALYSIS OF GENETIC RELATIONSHIP BETWEEN KOI (*Cyprinus carpio koi*) AND MAJALAYA CARP (*Cyprinus carpio carpio*) USING RAPD PCR

Research head for identify the relationship level between Koi and Majalaya carp using RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). DNA of Koi (Kohaku, Tancho, Ogon, Asagi, dan Shiro), Majalaya carp, and pangasius were isolated based on CTAB method. DNA amplification was using two selected primer from many primer, the selected primer are OPA-2 (5'-TGCCGAGCTG -3') and OPA - 3 (5'-AGTCAGCCAC -3'). The result indicate genetic relationship between Koi and Majalaya carp similarity index 62%. Kohaku, Tancho, and shiro with low genetic relationship similarity index about 48-55%. Ogon and Asagi with higher genetic relationship (similarity index 84%). OPA-2 primer more sensitive to identify relationship level between Koi and Majalaya carp.

Keyword : genetic relationship, Koi fish, Majalaya carp, similarity index

PENDAHULUAN

Keragaman jenis dan warna, memang menjadi daya tarik tersendiri bagi penggemar ikan Koi. Nama ikan ini bentuknya serupa ikan mas. Keduanya memang berasal dari genetik yang sama, yakni ikan karper (*Cyprinus carpio carpio*). Penamaan ikan koi di Jepang adalah nishikigoi (*Cyprinus carpio Koi*) menunjukkan ikan berwarna-warni. Istilah tersebut sudah digunakan sejak 2.500 tahun lalu, pada zaman pemerintahan Raja Shoko dan sampai kini dipakai para peminatnya di seluruh dunia (Effendy 1993).

Ikan Koi dan ikan mas konsumsi strain Majalaya adalah satu spesies yaitu *Cyprinus carpio*. Suseno (2000) mengemukakan, berdasarkan fungsinya, strain – strain ikan karper yang ada di Indonesia dapat digolongkan menjadi dua kelompok. Kelompok pertama merupakan strain ikan konsumsi dan kelompok kedua adalah strain ikan hias.

Hubungan kekerabatan pada ikan mas konsumsi dan ikan mas hias perlu untuk diteliti untuk mencegah terjadinya *inbreeding* pada spesies ikan mas. Strain ikan Koi dapat diketahui dengan melihat morfologi ikan Koi, namun pembuktian perbedaan strain tersebut secara jelas dapat dilihat dari polimorfisme ikan Koi dengan melakukan uji molekuler pada tingkat DNA. Menurut Haymer (1994) hubungan kekerabatan pada organisme dapat dianalisis dengan melihat DNA. Mengetahui dan membandingkan tingkat polimorfisme DNA maka dapat diketahui tingkat kekerabatannya. Analisis polimorfisme DNA merupakan materi yang akurat dalam menganalisis genetik beberapa tipe organisme.

Variasi genetik menggambarkan adanya keragaman pada satu spesies. Adanya keragaman terlihat dari karakteristik ikan, baik dari dalam (genotipe) maupun dari luar (fenotipe). Bila dilihat secara genotipe, variasi genetik yang terdapat pada ikan hasil persilangan memiliki variasi yang berbeda-beda. Untuk melihat variasi genetik tersebut dan mengetahui kekerabatannya antara individu satu dan individu lainnya, maka dilakukan pendekatan molekuler yaitu dengan metode RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Sehingga dapat melihat polimorfik dari masing –

masing ikan (Salam, 1994; Abdullah, et.al, 2004).

Variasi genetik yang telah diketahui berdasarkan pita-pita DNA polimorfisme pada strain-strain ikan Koi dan ikan mas dapat memudahkan pembenih (*Breeder*) merancang persilangan yang tepat diantara kedua strain dalam satu spesies untuk menghasilkan individu baru yang unggul. Persilangan juga dapat menghasilkan plasma nutflah yang baik untuk pembenihan ikan mas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara strain ikan Koi (Kohaku, Tancho, Ogon, Asagi, dan Shiro) dan ikan Mas Majalaya.

METODE DAN BAHAN PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sirip ekor ikan Koi Kohaku, Tancho, Asagi, Utsiro Usuri, Yamabuki Ogon, dan Ikan Mas Majalaya. Sampel yang diambil pada ikan adalah sirip, karena tidak menyebabkan ikan mati.

Tahapan-tahapan isolasi DNA Ikan Koi Kohaku, Tancho, Asagi, Utsiro Usuri, Yamabuki Ogon, dan Ikan Mas Majalaya. Menggunakan metode CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Mulyani 2003 dalam Rafsanjani 2011) yang telah mengalami modifikasi.

Prinsipnya adalah memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. DNA diambil dari sirip ekor ikan Koi. Membran sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan organel-organel sel, kemudian pada ekstrak sel tersebut ditambahkan protease (yang berfungsi mendegradasi protein) sehingga yang tinggal adalah DNA. Selanjutnya ekstrak tersebut dipanaskan sampai suhu 65°C untuk menginaktivasi enzim yang mendegradasi DNA (DNase). Larutan DNA kemudian dipresipitasi dengan etanol dan bisa dilarutkan lagi dengan air.

Penelitian ini menggunakan lima macam *arbitrary primer* berukuran 10 nukleotida yang diproduksi oleh Operon Technology untuk proses amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR. Kelima macam primer tersebut adalah RAPD OPA-02, OPA-03, OPA-05, OPA-12, OPA-13 (Yoon dan park, 2001).

Tahap denaturasi DNA 94°C selama 1 menit, tahap penempelan

(annealing) 36°C selama 1 menit, dan tahap pemanjangan (ekstensi) 72°C selama 2 menit. Saat annealing, homologi sekuens antara primer dan utas DNA turut berperan menentukan keberhasilan reaksi. Tahap – tahap yang ada akan berulang sebanyak 45 siklus hingga diperoleh sejumlah produk amplikon yang memiliki sekuens acak.

Sampel DNA yang telah diamplifikasi divisualisasi dengan melakukan elektroforesis menggunakan gel agarose. Gel agarose berkonsentrasi 1,4% diperoleh dengan mencampurkan bubuk agarose dan larutan TBE 0,5X (Tris-Bonate EDTA). Gel agarose direndam secara *sub marine* dalam *running buffer* yaitu TBE 0,5X. 8 µl DNA hasil PCR dan penanda berat molekul yang terdiri dari 5 µl buffer pemuat (*loading buffer*) serta 3 µl *loading dye* sebagai pemberat larutan dimasukan ke dalam sumur-sumur gel. Beda potensial yang digunakan pada proses elektroforesis adalah 75 volt, dengan kuat arus 100 mA selama 90 menit. Tahap pertama dalam proses elektroforesis adalah pembuatan gel agarose dengan konsentrasi 1,4%.

Data kualitatif didapatkan dari pita-pita yang tervisualisasi dan tidak tervisualisasi. Pita yang terlihat memiliki arti numerik satu (1) dan pita yang tidak terlihat memiliki arti numerik nol (0). Pita yang dapat dianalisis merupakan pita yang dapat dibedakan secara nyata dengan menggunakan bantuan komputer. Pita-pita

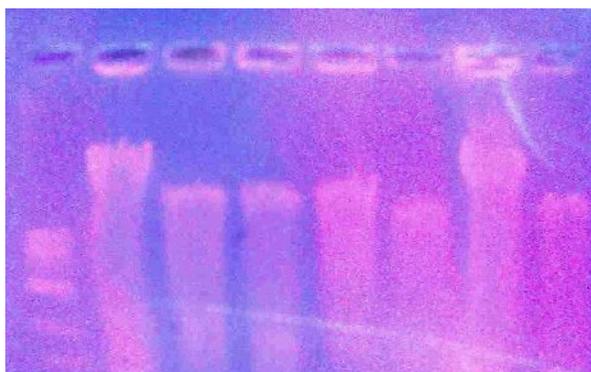
tersebut ditampilkan dalam matriks biner dan selanjutnya akan dianalisis untuk mencari hubungan kekerabatan sampel ikan Koi.

Hubungan kekerabatan dapat diketahui dengan menghitung indeks kesamaan berdasarkan data numerik pita yang teramplifikasi. Perhitungan indeks kesamaan menggunakan program NTSYS pc pada komputer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Visualisasi DNA setelah elektroforesis selesai menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang sebesar 312nm. Tahap sebelumnya agarose direndam pada larutan *etidium bromida* 0,5% selama 20 menit. Selama perendaman berlangsung Br (bromida) pada larutan *etidium bromida* akan berikatan dengan DNA pada agarose, sehingga pada saat terkena sinar UV DNA pada agarose akan berpendar. Setelah perendaman *etidium bromida* selesai agarose direndam kembali pada *aquades* steril selama 15 menit bertujuan untuk mencuci agarose sebelum dilakukan visualisasi menggunakan sinar UV.

Kemunculan pita setelah dilakukan amplifikasi DNA menunjukkan bahwa isolat tersebut mempunyai urutan basa yang sesuai dengan urutan basa primer yang diberikan. Selanjutnya dilakukan optimasi pada seluruh sampel yang menghasilkan pita dan mengambil sampel dengan hasil pita terbanyak. DNA genom hasil optimasi terdapat pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolat DNA *Template*

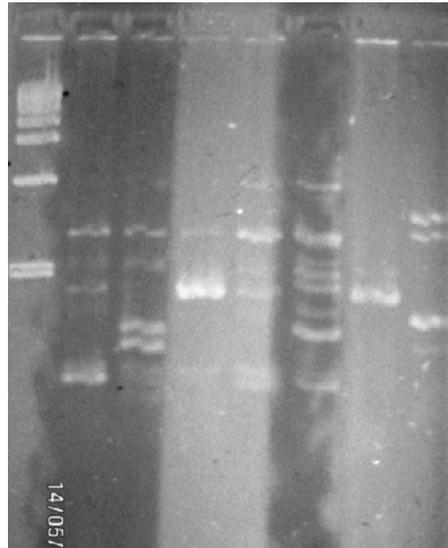
Keterangan :

λ : Marker Lambda EcoR1
 K4 : Sampel 4 Koi strain Kohaku
 T1 : sampel 1 Koi strain Tancho
 O3 : Sampel 3 Koi strain Ogon

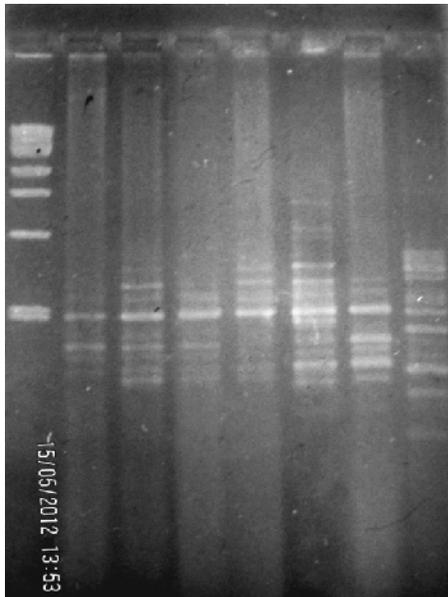
A1 : Sampel 1 Koi strain Asagi
 S2 : Sampel 2 Koi strain Shiro
 M4 : Sampel 4 Mas Majalaya
 P1 : Sampel 1 ikan Patin

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan dua primer yaitu OPA-2 dan OPA-3 yang telah dipilih dari lima primer yang sebelumnya telah dipilih berdasarkan kemunculan pita pada ikan *crusian carp (Carrasius carassius)* (Yoon dan Park 2001). Lima primer yang diseleksi adalah OPA-2, OPA-3, OPA-5, OPA-12, dan OPA-13 dari Operon Technology. Dua primer OPA-2 dan OPA-3 digunakan dalam analisis RAPD karena pita muncul pada semua sampel. Hasil amplifikasi DNA *template* oleh OPA-2 dan OPA-3 ditunjukkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan dua primer yaitu OPA-2 dan OPA-3 yang telah dipilih dari lima primer yang sebelumnya telah dipilih berdasarkan kemunculan pita pada ikan *crusian carp (Carrasius carassius)* (Yoon dan Park 2001). Lima primer yang diseleksi adalah OPA-2, OPA-3, OPA-5, OPA-12, dan OPA-13 dari Operon Technology. Dua primer OPA-2 dan OPA-3 digunakan dalam analisis RAPD karena pita muncul pada semua sampel. Hasil amplifikasi DNA *template* oleh OPA-2 dan OPA-3 ditunjukkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 2. Hasil Amplifikasi DNA oleh OPA-2



Gambar 3. Hasil Amplifikasi DNA oleh OPA-3

Pola-pola pita tersebut dapat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu pita polimorfik dan pita monomorfik. Pita polimorfik adalah gambaran pita DNA yang muncul pada ukuran tertentu, tetapi pada sampel lain tidak ditemukan pita DNA pada ukuran tersebut. Pita monomorfik adalah pita yang mempunyai satu bentuk sehingga tidak memiliki variasi (Williams dan Ronald 1990).

Penentuan pita polimorfik dengan melihat pita DNA pada suatu ukuran tertentu dan tidak ditemukan pada sampel lain. Penentuan pita monomorfik dengan melihat pita yang timbul pada beberapa sampel. Kemunculan pita yang teramplifikasi oleh primer OPA-2 berkisar antara 177-2000 bp ditunjukkan oleh Tabel 1.

Tabel 1. Kemunculan pita polimorfik dan monomorfik Koi oleh OPA-2

<i>Bands</i>	K4**	T1**	O3**	A1**	S2**	M4	P2
A02 - 2000				--	--		
A02 - 1329							--
A02 - 1076	--	--	--	--	--		--
A02 - 757					--*		
A02 - 648	--	--			--		
A02 - 547					--*		
A02 - 489	--		--	--		--	
A02 - 402					--*		
A02 - 359							--
A02 - 307		--			--		
A02 - 282							--
A02 - 256		--*					
A02 - 177	--	--	--	--	--		

Keterangan : -- pita yang muncul pada agarose

--* pita polimorfik

** sampel ikan Koi

Terdapat tiga variasi pita DNA yang teramplifikasi oleh primer OPA-2 pada sampel S2. Ketiga pita DNA tersebut tidak ditemukan pada sampel ikan Koi lainnya, ukuran pita terbesar terdapat pada posisi 757 bp, 547 bp, dan 402 bp. Sampel S2 merupakan ikan Koi strain Shiro yang mempunyai warna hitam dan putih dengan corak hitam tersebar merata pada seluruh bagian tubuh. Variasi genetik tersebut diinterpretasikan dengan munculnya pita-pita berbeda. Secara morfologi sampel S2 mempunyai corak dan warna sisik yang berbeda dengan sampel lainnya, namun pita-pita yang berbeda tersebut belum tentu pita penentu sifat corak dan warna pada sampel S2.

Pada sampel T1 hanya satu variasi genetik ditemukan pada ukuran pita 256

bp yang tidak ditemukan pada sampel ikan Koi lainnya.. Ciri khas Pada sampel T1 (Tancho) adalah corak berwarna merah berbentuk lingkaran pada bagian kepala. Variasi genetik yang timbul pada sampel T1 tidak dapat ditentukan oleh keberadaan satu pita polimorfik tersebut, karena pita tersebut bukan penentu sifat corak dan warna pada sampel K1.

Kemunculan pita yang teramplifikasi oleh primer OPA-3 berkisar antara 147 bp-2703 bp terdapat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2, sampel S2 (13 pita) adalah sampel yang mempunyai pita DNA paling banyak dibandingkan sampel ikan Koi lainnya K4 (Kohaku) 3 pita DNA, T1 (Tancho) 7 pita DNA, O3 (Ogon) 6 pita DNA, dan A1 (Asagi) 6 pita DNA. Sebanyak lima variasi gen yang

ditunjukkan oleh pita DNA pada sampel S2 teramplifikasi dengan primer OPA-3. Pita-pita polimorfisme tersebut tidak terdapat

pada sampel ikan Koi strain lainnya (posisi 2703 bp, 1934 bp, 1782 bp, 1434 bp, dan 618 bp).

Tabel 2. Kemunculan pita polimorfik dan monomorfik Koi oleh OPA-3

Bands	K4**	T1**	O3**	A1**	S2**	M4	P2
A03 - 2703					--*		
A03 - 1934					--*		
A03 - 1782					--*		
A03 - 1434					--*		
A03 - 1298							--
A03 - 1241				--	--		
A03 - 1165							--
A03 - 1035			--	--	--	--	--
A03 - 972		--*					
A03 - 833		--	--	--	--		
A03 - 689	--	--	--	--	--	--	--
A03 - 618					--*		
A03 - 554							--
A03 - 497		--			--	--	
A03 - 454	--	--	--				
A03 - 418	--				--	--	
A03 - 362		--	--	--	--	--	
A03 - 328							--
A03 - 296		--	--	--	--	--	
A03 - 252							--
A03 - 147							--

Keterangan : -- pita yang muncul pada agarose

--* pita polimorfik

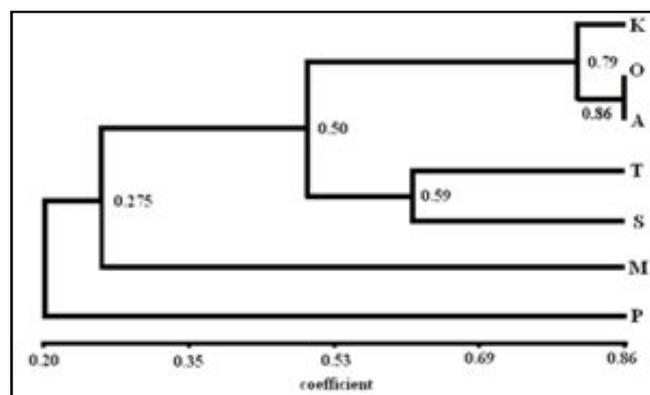
** sampel ikan Koi

Pada sampel T1 ditemukan satu pita DNA polimorfisme yang tidak dimiliki oleh sampel ikan Koi strain lainnya (posisi 72 bp).

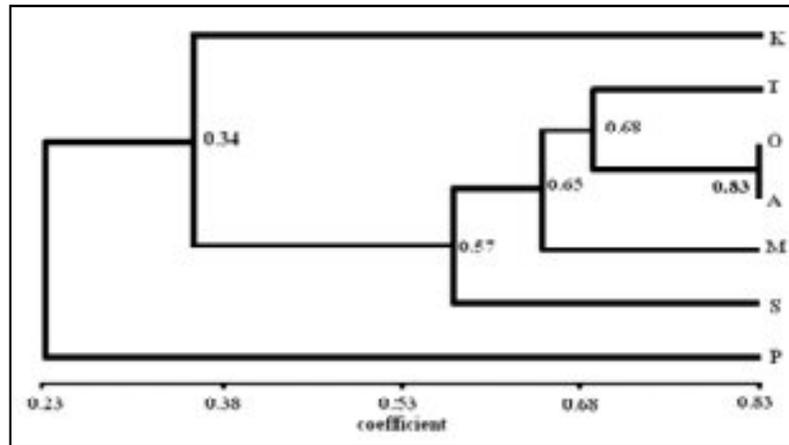
Fenogram dibangun untuk menghasilkan pohon filogeni yang dapat menggambarkan indeks kesamaan secara umum. Nilai *simple matching* dibangun dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair*

Group Method with Arithmetic Averages). Metoda UPGMA dapat menggunakan *software* computer NTSYS pc.

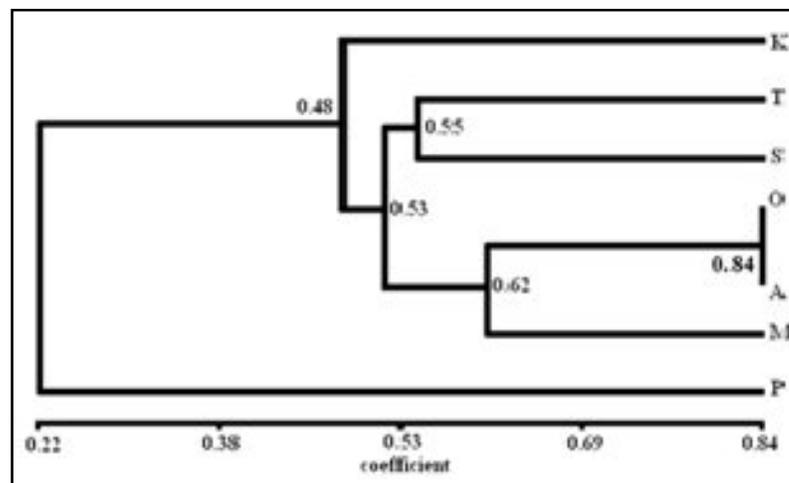
Terdapat tiga fenogram yang dihasilkan pada penelitian ini berdasarkan primer OPA-2, OPA-3, dan gabungan biner OPA-2 dan OPA-3. Gambar 4, 5 dan 6.



Gambar 4. Fenogram keasaman hasil analisis UPGMA menggunakan Primer OPA-2 (Sumber: Dokumentasi pribadi)



Gambar 5. Fenogram keasaman hasil analisis UPGMA menggunakan Primer OPA-3 (Sumber: Dokumentasi pribadi)



Gambar 4. Fenogram keasaman hasil analisis UPGMA menggunakan Primer OPA-2 dan OPA 3 (Sumber: Dokumentasi pribadi)

Sampel O dan A adalah sampel yang memiliki nilai indeks kesamaan paling tinggi sebesar 84 %. Nilai indeks kesamaan yang hampir mendekati 100 % menunjukkan bahwa sampel O dan A memiliki tingkat kekerabatan dekat. Nilai indeks kesamaan sampel O dan A konstan pada fenogram primer OPA-2, primer OPA-3, dan fenogram gabungan. Nilai indeks kesamaan yang konstan pada seluruh hasil fenogram menunjukkan sampel O dan A berkerabat dekat.

Berdasarkan bentuk morfologi kedua sampel mempunyai kesamaan pada bentuk tubuh, sirip, kepala, dan warna mata. Bentuk morfologi sampel O dan A sama seperti sampel K (Kohaku), T (Tancho), S (Shiro), dan M (Majalaya), hal ini menyebabkan sampel O dan A berada dalam kelompok besar yang sama pada fenogram. Selain bentuk morfologi sampel

O dan A, gen pada sampel O dan A yang menjadikan kedua sampel ini berkerabat dekat dengan indeks kesamaan tertinggi. Menurut V. S. Kirpichnikov (1981) pembentukan pigmen warna pada ikan *Common carp* dipengaruhi oleh gen resesif dan lingkungan. Gen resesif yang terdapat pada sampel O dan A menjadikan kedua sampel berkerabat dekat dan pita hasil amplifikasi DNA oleh primer OPA-2, OPA 3 dan gabungan terdapat banyak pita monomorfik pada kedua sampel O dan A. Gen resesif pada sampel O yang menyebabkan warna sampel O menjadi keemasan terdapat pada sampel A yang menyebabkan warna sampel A kebiru-biruan. Hal ini yang mungkin dapat menjelaskan mengapa sampel O dan A yang mempunyai warna berbeda, secara genetik merupakan sampel yang paling berkerabat dekat.

Manfaat yang dapat dipetik dari hasil deteksi kekerabatan dengan menggunakan penanda RAPD mencegah perkawinan sekerabat (*inbreeding*) pada setiap strain ikan Koi yang diuji. Semakin tinggi nilai indeks kesamaan maka potensi *inbreeding* pada sampel tersebut semakin tinggi, sedangkan semakin rendah nilai indeks kesamaan maka potensi *inbreeding* akan semakin rendah. Berdasarkan hasil yang didapatkan dari penelitian, potensi terbesar *inbreeding* terdapat pada ikan Koi strain Ogon dan Asagi. Kedua strain tersebut secara genetik mempunyai tingkat kesamaan yang tinggi dan konstan pada setiap primer yang digunakan. Pencegahan *inbreeding* dapat dilakukan dengan tidak melakukan persilangan antara ikan Koi strain Ogon dan Asagi.

Persilangan dapat dilakukan dengan mengawinkan strain Koi Kohaku, Tancho, dan Shiro karena mempunyai indeks kesamaan rendah. Indeks kesamaan yang rendah menunjukan Koi strain Kohaku, Tancho, dan Shiro memiliki kekerabatan yang relatif jauh dan mempunyai tingkat polimorfisme tinggi. Persilangan diantara strain Koi tersebut berpotensi menghasilkan warna dan corak Koi yang baru yang mempunyai heterozigositas yang tinggi. Berdasarkan fenogram dari gabungan OPA-2 dan OPA-3 dapat menunjukkan hubungan kekerabatan ikan Mas Majalaya dengan ikan Koi. Indeks kesamaan ikan Mas Majalaya sebesar 65% menunjukkan kekerabatan ikan Mas Majalaya dengan ikan Koi relatif dekat.

KESIMPULAN

1. Metode "Random Amplified Polymorphic DNA" dapat digunakan untuk melihat hubungan kekerabatan sampel ikan Koi (Kohaku, Tancho, Ogon, Asagi, dan Shiro) dan ikan mas Majalaya. Hubungan kekerabatan ikan Mas Majalaya dengan ikan Koi relatif dekat (indeks kesamaan 62%).
2. Koi strain Kohaku, Shiro, dan Tancho memiliki hubungan kekerabatan yang relatif jauh (indeks kesamaan berkisar 48-55%) dan berpotensi menghasilkan keturunan dengan heterozigositas tinggi. Koi strain Ogon dan Asagi memiliki hubungan kekerabatan yang dekat

(indeks kesamaan 84%) berpotensi besar menyebabkan *inbreeding*.

3. Primer OPA-2 dapat mendeteksi hubungan kekerabatan pada setiap strain Koi dan mampu membedakan kelompok ikan Koi dan ikan mas Majalaya, sedangkan primer OPA-3 tidak mampu membedakan kelompok ikan Koi dan ikan mas Majalaya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, H.H., Enaldy, M., Obeida, A., and Itri, H. 2004. Genetic Diversity of Nile Tilapia Populations Revealed by RAPD-PCR. *Aqua research*, 2(3) : 377-593.
- Dunham, RA. 2004. Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches. Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University Alabama USA.
- Effendi, H. 1993. Mengenal Beberapa Jenis Koi. Kanisius. Yogyakarta.
- Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137, 1121-1137. Stockton Press, NY.
- Haymer, D, S. 1994. Arbitrary (RAPD) Primer Sequences Used in Insect Studies. *Insect Mol Biol*, 3 (3) : 191-194.
- Kirpichnikov, V.S. 1981. Genetic Bases of Fish Selection, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mulyani, Y. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Mikrosatelit pada Mangga (*Mangifera indica L*). Tesis. Institut Teknologi Bandung.
- Salam, A.M.S. 1994. *Keanekaragaman genetic*. Andi Offset. Yogyakarta.
- Suseno D., 1994. Pengelolaan Usaha Pembenihan Ikan Mas. Penebar Swadaya, Bogor.

- Williams J. G, and Ronald I.A. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531-5.
- Yoon, J.M and Park, H.Y. 2001. Genetic Similarity and Variation In the Cultured and Wild Crucian Carp (*Carassius carassius*) Estimated with Random Amplified Polymorphic DNA. Departement of Marine Biomedical Science, University. Kunsan Korea.