CATATAN SINGKAT

Depik, eas, dan relo; yang manakah *Rasbora tawarensis*?

[Depik, eas, and relo; which one is *Rasbora tawarensis*?]

Z.A. Muchlisin

Jurusan Budi Daya Perairan, Koordinatorat Perikanan
dan Ilmu Kelautan, Universitas Syiah Kuala
✉ Jln. T. Nyak Arief Darussalam, Banda Aceh 23111
e-mail: muchlisinza@yahoo.com

Diterima: 9 Desember 2010; Disetujui: 17 Mei 2011

Abstrak

Tiga kumpulan ikan *Rasbora* yang dikenali sebagai eas, depik, dan relo ditemukan di Danau Laut Tawar. Secara morfologi ketiga kumpulan ikan tersebut sangat mirip dan sepintas sulit dibedakan. Hal itu telah menyebabkan ketidakpastian taksonomik yang mana diantara ketiganya disebut *Rasbora tawarensis*. Identifikasi yang tepat perlu dilakukan dalam rangka konservasi ikan endemik ini. Pendekatan komprehensif digunakan dengan menggabungkan analisis morfometrik dengan analisis genetik untuk mendiskriminasikan tiga kumpulan *Rasbora.* Dalam penelitian ini digunakan morfometrik tradisional dan sekuen DNA dari sitokrom mitokondria *c oxidase* subunit I (COI). Hasil analisis menunjukkan adanya dua spesies *Rasbora* dalam kelompok. Data morfometrik dan genetik memperlihatkan bahwa eas dan depik adalah spesies yang sama, yaitu *Rasbora tawarensis*, sedangkan relo adalah spesies kriptik.

Kata penting: Danau Laut Tawar, morfometrik, genetik, sitokrom mitokondria *c oxidase* subunit I (COI).

Abstract

There are at least three species of *Rasbora* known locally as depik, eas, and relo in Lake Laut Tawar. Morphological traits of the three species of *Rasbora* are very similar and difficult to distinguish. Therefore, there remains a great deal of taxonomic uncertainty as to which of three is *Rasbora tawarensis* the endemic fish in the lake, not only among the locals but also local fisheries agency and researchers. The precise identification of *R. tawarensis* is crucial to develop a better strategy for conservation effort of this endemic and threatened species. Here, we utilized a comprehensive approach by combining morphometric and genetic methods to discriminate among these group as defined by their local names in Lake Laut Tawar. Traditional morphometric and DNA sequencing of the mitochondrial cytochrome *c oxidase* subunit I (COI) were applied. The results showed that there are only two valid species of *Rasbora* among the group. The morphometrics and genetic data strongly indicated that eas and depik should be regarded as the same species of *Rasbora tawarensis* and relo may be considered as a cryptic species.

Keyword: genetic, mitochondrial cytochrome *c oxidase* subunit I (COI), Lake Laut Tawar, traditional morphometric.

Pendahuluan

Berdasarkan hasil penelitian terdahulu, penulis mencatat sebanyak 114 spesies ikan air tawar dan payau hidup di beberapa kawasan Provinsi Aceh dan empat spesies diantaranya tergolong dalam genus *Rasbora* (Muchlisin & Siti Azizah, 2009). Menurut informasi dari nelayan, di Danau Laut Tawar terdapat tiga kumpulan ikan *Rasbora* yang dikenali sebagai eas, depik, dan relo. Secara morfologi ketiga kumpulan ikan tersebut sangat mirip dan sepintas sulit dibedakan, hal itu telah menyebabkan ketidakpastian di kalangan peneliti dan lembaga terkait lainnya bahwa secara taksonomi salah satu dari ketiganya disebut *Rasbora tawarensis,* ikan endemik di Danau Laut Tawar.

Rasbora tawarensis adalah ikan endemik di Danau Laut Tawar dan telah ditetapkan sebagai ikan dengan status terancam (*threatened species*) oleh IUCN dan berdasarkan hasil evaluasi terbaru oleh CBSG, ikan ini telah masuk kategori *critical endangered* (CBSG, 2003). Namun de-

mikian, sampai saat ini belum ada upaya nyata yang dilakukan oleh pihak terkait untuk mengantisipasi fenomena ini.

Oleh karena itu, diperlukan langkah nyata dan segera dalam rangka konservasi ikan endemik ini. Penetapan sebagai ikan yang dilindungi dan penetapan kawasan perlindungan adalah salah satu upaya yang dapat dilakukan. Guna mencapai tujuan tersebut, maka perlu ditentukan jenis ikan yang merupakan *R. tawarensis*, agar upaya konservasi yang akan dilakukan tidak salah sasaran.

Bahan dan metode

Analisis morfometrik dan meristik

Sebanyak 12 karakter morfologi digunakan untuk mendiskriminasikan tiga kumpulan *Rasbora*. Jumlah ikan yang digunakan pada setiap kumpulan adalah 43 ekor. Pengukuran dilakukan pada sisi sebelah kiri menggunakan *digital caliper* dengan ketelitian 0,01 mm. Data morfometrik yang diperoleh selanjutnya ditransformasi mengikuti Schindler & Schmidt (2006):

$$M_{trans} = M \times \frac{100}{TL}$$

dengan M = nilai pengukuran asal, M_{trans} = nilai pengukuran hasil transformasi, dan TL adalah panjang total ikan contoh.

Sebanyak 31 ekor ikan dari setiap kumpulan digunakan untuk menghitung karakter meristiknya. Karakter meristik yang digunakan adalah jumlah sisik pada gurat sisi, jumlah sisik kuduk, jumlah sisik antara sirip dorsal dan sirip perut, jumlah jari-jari sirip dorsal, jumlah jari-jari sirip anus, dan jumlah jari-jari sirip perut.

Analisis genetik

Koleksi contoh dan ekstraksi

Jumlah contoh yang digunakan sebanyak 10 individu untuk setiap kumpulan. Jaringan sirip ekor sepanjang 1-2 cm diambil dengan gunting yang telah disterilkan, selanjutnya dimasukkan dalam botol contoh yang berisi TNES-Urea *buffer* dan disimpan selama dua minggu pada suhu kamar sebelum diekstrak. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *Aqua-genomic* DNA *solution* mengikuti kaidah yang direkomendasikan oleh produsen. Hasil ektraksi DNA selanjutnya diuji dengan metode elektroforesis dengan menggunakan jel agar (*agarose gel*) pada konsentrasi 0,8% dan diwarnai dengan etidium bromida dan selanjutnya jel diamati dengan *gel documentation system* (GENEFLASH® Syngene Bio), ekstraksi berhasil bila terdapat pita warna terang pada jel.

PCR Amplifikasi

Lebih kurang 655-bp gen COI diamplifikasi dengan menggunakan sepasang primer (Fish F1 dan Fish R1). Komposisi reagen PCR dan suhu berpedoman pada Ward *et al*. (2005).

Fish F1

5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3'

Fish R1

5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'

Setelah diamplifikasi, hasilnya diuji kembali dengan menggunakan metode elektroforesis pada konsentrasi jel1,2%, diwarnai dengan etidium bromida kemudian diamati menggunakan GENEFLASH® Syngene Bio. Amplifikasi DNA berhasil bila terdapat pita terang pada jel. Contoh yang telah berhasil diamplifikasi selanjutnya dimurnikan (*purification*) dengan reagen PCR *Clean-up System Promega* mengikuti panduan umum yang disediakan oleh produsen. Selanjutnya DNA yang telah dimurnikan diuji kembali dengan elektroforesis pada konsentrasi jel 1,2%; hanya contoh yang menghasilkan pita terang dan bersih saja digunakan untuk proses sekuen yang dilakukan secara terpusat di Centre for Chemical Biology, Universiti Sains Malaysia (CCB-USM).

Analisis data DNA

Hasil sekuen yang diperoleh, selanjutnya diedit dan dianalisis dengan menggunakan program MEGA 4,0 (Tamura *et al*., 2007). Haplotipe dianalisis dengan menggunakan program DnaSP dan haplotipe yang dihasilkan dikirim dan disimpan di GenBank (nomor akses HM10 0243-HM100250, dan HM345923-HM345928). Divergensi nukleotida dihitung dengan menggunakan metode *Neighbour-Joining* (NJ) berdasarkan Kimura 2 Parameter (K2P). Hubungan genetik antar sekuen dianalisis dengan pohon filogenetik melalui metode NJ. Tingkat kepercayaan dianalisis dengan menggunakan prosedur *bootstrap* (Felsentein, 1985). Dua sekuen di luar kelompok ikan kawan (*Poropuntius tawarensis*) dan dua sekuen dari kelompok ikan *Rasbora* yang berasal dari luar wilayah studi dan satu sekuen ikan *Rasbora sumatrana* dari GenBank (nomor akses EF452882) juga digunakan sebagai pembanding.

Hasil

Morfometrik

Hasil analisis DFA menghasilkan dua fungsi dan keduanya mempunyai *eigenvalues* (EV) lebih besar dari 1. Fungsi 1 dengan EV 8,23 menjelaskan 87,4% dari total ragam, dan fungsi memiliki nilai enam karakter muatan (*loading*) tertinggi, yaitu tinggi kepala, tinggi badan, tinggi batang ekor, panjang batang ekor, panjang kepala, dan diameter mata, yang secara umum berkaitan dengan bagian kepala dan ekor. Fungsi 2 dengan *eigenvalue* 1,18 menjelaskan 12,6% dari total ragam dan juga memiliki enam karakter dengan nilai muatan tertinggi yaitu pan-jang dasar sirip punggung, panjang baku, pan-jang sirip dada, tinggi sirip dorsal, dan panjang moncong (Tabel 1). Kedua fungsi ini menjelaskan 100% total ragam.

Diagram pencar (*scatter plot*) fungsi 1 dan 2 menunjukkan bahwa ketiga kelompok ikan uji dibagi menjadi tiga kelompok berbeda. Depik dan eas menunjukkan jarak yang saling berdekatan dengan beberapa karakter yang saling bertindih, sedangkan relo terletak pada kelompok yang terpisah jauh (Gambar 1 dan 2).

Tabel 1. *Eigenvalues*, ragam dan muatan DFA untuk data morfometrik tradisional

Fungsi	1	2
Eigenvalues	8,23	1,18
Persentase ragam	87,4	12,6
Tinggi kepala	**0,718(*)**	0,296
Tinggi badan	**0,613(*)**	-0,082
Tinggi batang ekor	**0,402(*)**	-0,080
Panjang kepala	**0,259(*)**	-0,194
Panjang batang ekor	-0,258(*)	0,157
Diameter mata	**0,245(*)**	0,153
Tinggi sirip dorsal	**0,417**	-0,475(*)
Panjang standar	-0,168	**0,463(*)**
Panjang sirip dada	0,062	-0,318(*)
Panjang dasar sirip dorsal	0,087	-0,298(*)
Panjang sirip perut	-0,082	-0,165(*)
Panjang mocong	-0,026	**0,102(*)**

* Korelasi nyata terbesar di antara setiap variabel dan fungsi diskriminan
Karakter yang memiliki muatan yang tinggi ditandakan dengan angka cetak tebal.

Tabel 2. *Eigenvalues*, ragam dan muatan DFA untuk data meristik

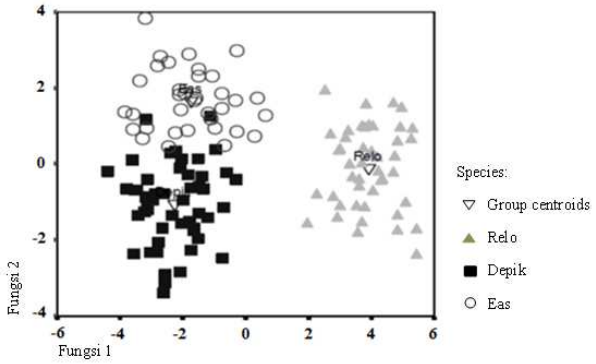
Fungsi	1	2
Eigenvalues	5,03	0,49
Persentase ragam	91,1	8,9
Jumlah sisik lateral	**0,924(*)**	-0,256
Jumlah sisik kuduk	**0,330(*)**	-0,051
Jumlaj jari-jari sirip perut	0,298	0,351(*)
Jumlah jari-jari sirip dorsal	0,068	-0,032
Jumlah sisik antara dasar sirip dorsal dan dasar sirip perut	-0,036	**0,626(*)**
Jumlah jari-jari sirip anus	0,177(*)	0,136

* Korelasi nyata terbesar diantara setiap variable dan fungsi diskriminan
Karakter yang memiliki muatan yang tinggi ditandakan dengan angka cetak tebal

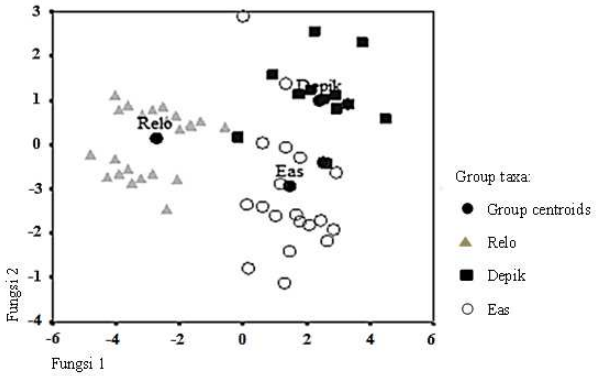
Genetika

Sebanyak 14 haplotipe dihasilkan dari 37 sekuen yang ada. Hasil analisis COI gen menun-

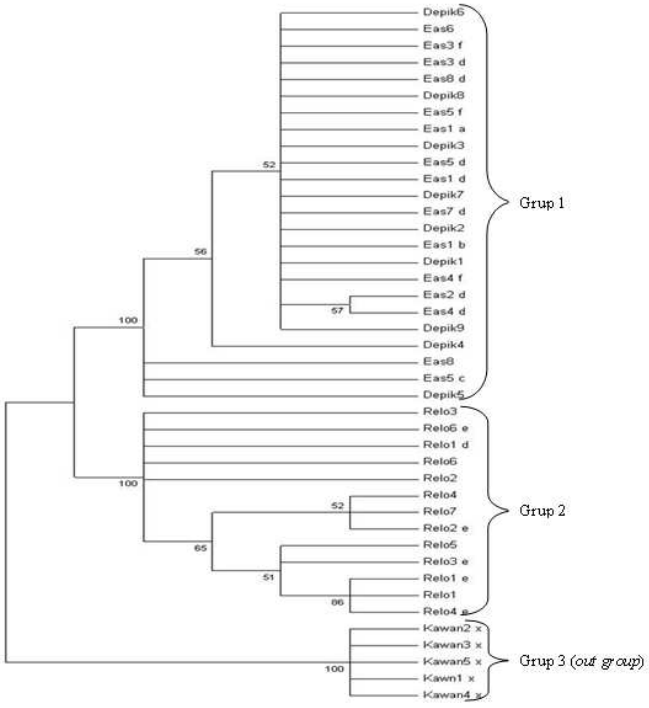
jukkan jarak genetik antar kelompok ikan berkisar 0,2-9,6%; nilai terendah adalah antara depik dan eas (0,2%) dan tertinggi antara eas dan relo (9,6%). Jarak genetik dalam grup (antar individu dalam grup yang sama) berkisar 0,2-0,5%.



Gambar 1. Sebaran plot fungsi 1-fungsi 2 untuk data morfometrik tradisional



Gambar 2. Sebaran plot fungsi 1-fungsi 2 untuk karakter meristik ikan eas, relo, dan depik



Gambar 3. Pohon genetik ikan eas, depik dan relo berdasarkan 613-bp gen COI

Gambar 3 menunjukkan hubungan antar sekuen yang diuji, sekuen dari ikan depik dan eas dikelompokkan dalam kelompok yang sama, sedangkan relo dikelompokkan dalam kelompok yang berbeda. Sebanyak delapan haplotipe yang dihasilkan dari 14 haplotipe terjadi andil haplotipe antara eas dan relo, sementara relo menghasilkan enam haplotipe.

Pembahasan

Hasil analisis morfometrik menunjukkan bahwa ikan eas dan depik memiliki kemiripan karakter morfologi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan relo. Hasil ini juga disokong oleh hasil analisis profil DNA (COI *gen*). Sekuen DNA ikan depik dan relo memiliki jarak genetik yang lebih kecil dibandingkan dengan ikan relo, bahkan beberapa haplotipe dari kedua ikan ini tumpang tindih atau berbagi haplotipe. Menurut Pamilo & Nei (1988), pohon filogenetik yang dihasilkan dari analisis divergensi genetik tidaklah selalu selaras dengan taksonomi yang dihasilkan dari analisis morfologi. Namun demikian, penelitian ini menunjukkan bahwa hasil analisis DNA selaras dengan hasil analisis morfologi. Hal ini merupakan indikasi kuat bahwa ikan eas dan depik adalah satu spesies yang sama sehingga dapat disimpulkan dari tiga nama lokal yang ada, sebenarnya hanya terdiri atas dua spesies yang berbeda. Pertanyaan selanjutnya yang belum terjawab adalah manakah diantara kedua spesies ini yang disebut *Rasbora tawarensis*, ikan endemik di Danau Laut Tawar? Menjawab pertanyaan ini, maka dibandingkan profil DNA kedua jenis ikan yang berasal dari danau ini dengan ikan dalam genus yang sama yang berasal dari luar kawasan dan sekuen haplotipe ikan *R. sumatrana* dari GenBank (nomor akses EF452882). Hasil perbandingan menunjukkan bahwa profil DNA ikan relo sangat mirip dengan ikan dari luar kawasan ini (jarak genetik 0,7%). Namun, ikan dari luar kawasan ini belum teridentifikasi sampai tingkat spesies dan profil DNA *R. sumatrana* agak mirip dengan kelompok ikan eas dan depik, tetapi diyakini keduanya bukan spesies yang sama karena nilai divergensi genetik lebih besar dari 3%. Menurut Hebert *et al*. (2003), dua kelompok ikan dapat dikatakan spesies yang sama jika memiliki nilai divergensi intraspesifik lebih kecil dari 3%. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ikan endemik Danau Laut Tawar adalah eas dan depik, keduanya memiliki nama ilmiah *Rasbora tawarensis*.

Adanya sedikit perbedaan morfologi terutama beberapa karekter di bagian kepala dan panjang sirip perut antara eas dan depik ini mungkin disebabkan oleh perbedaan umur dan kebiasaan makan. Diduga kelompok ikan ini mengalami perubahan bentuk kepala, terutama tinggi kepala dan lebar mata setelah dewasa. Hal ini selaras dengan Cadrin (2000) yang menyebutkan bahwa perbedaan morfologi antara spesies yang sama diduga disebabkan oleh perbedaan sejarah hidup (*life history*), aktifitas pemijahan dan migrasi, kebiasaan makan, dan pengaruh faktor-faktor lingkungan (misalnya suhu) pada tahap kritis (larva) dalam daur hidupnya.

Simpulan

Hasil analisis morfometrik dan genetik menunjukkan bahwa eas dan depik adalah spesies yang sama, yaitu *Rasbora tawarensis*, ikan endemik Danau Laut Tawar.

Persantunan

Penulis menyampaikan penghargaan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi-Kementerian Pendidikan Nasional RI yang telah menyediakan beasiswa bagi penulis pertama. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan ke-

pada semua anggota kelompok peneliti akuakultur di Universitas Syiah Kuala dan Universiti Sains Malaysia yang telah membantu selama penelitian ini.

Daftar pustaka

Cadrin SX. 2000. Advance in morphometric analysis of fish stock structure. *Review Fish Biology and Fisheries*, 10:91-112.

CBSG. 2003. Conservation assessment and management plan for Sumatra threatened species. Apple Valley, M.N. USA: IUCN-SSC Conservation Breeding Specialist Group. pp. 5-9.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences,* 270:313-321.

Muchlisin ZA & Siti Azizah MN. 2009. Diversity and distribution of freshwater fishes in Aceh waters, northern Sumatera, Indonesia. *International Journal of Zoological Research*, 5(2):62-79.

Pamilo P & Nei M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5(5):568-583.

Schindler I & Schmidt J. 2006. Review of the mouthbrooding *Betta* (Teleostei, Osphronemidae) from Thailand, with descriptions of two new species. *Zeitschrift fur Fischkunde*, 8:47-69.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution,* 24:1596-1599.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*., 36:1847-1857.