

## SEGMENT RUAS BERULANG PADA DAERAH KONTROL (*d-loop*) DNA MITOKONDRIA IKAN BELIDA (*Chitala lopis*)

BP-18

Arif Wibowo\* dan Subagja

Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum, Mariana

\*e-mail: wibowo@kpk.go.id

### Abstrak

Ikan belida (*Chitala lopis*) merupakan ikan air tawar yang secara komersial di perdagangan secara luas di Sumatera dan metode budidaya dalam bentuk penangkaran dan pemuliaan ikan ini mulai dikembangkan. Oleh karena itu, dirasa sangat penting untuk mendokumentasikan struktur genetik spesies di alam untuk mendukung upaya pemuliaan. Dalam studi ini kami menganalisis variasi sekuens pada daerah kontrol mtDNA dari 48 ikan belida. Tujuannya adalah untuk mengungkapkan polimorfisme alami dalam kaitannya untuk menyediakan dasar bagi penggunaan bagian daerah kontrol untuk studi lanjutan keragaman pada level populasi. Pengambilan sampel ikan dilakukan sepanjang tahun 2009 dan 2010 di Sungai Kampar dan lokasi pembanding. Ikan sampel diambil secara acak dengan jumlah sampel berkisar antara 1 sampai 11 specimen setiap lokasi. Setiap specimen yang terpilih, dilakukan koleksi darah atau sebagian otot, diawetkan dalam alkohol absolut 99% untuk kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan ekstraksi dan isolasi, amplifikasi dan pengurutan mtDNA. Untuk mengeksplorasi hipotesis, pola ulangan dianalisis berdasarkan pengamatan yang hati-hati pola ulangan pada kelompok sekuense daerah kontrol MtDNA ikan belida yang sudah disejajarkan. Analisis daerah kontrol pada DNA mitokondria dari 48 urutan sekuens DNA dua arah ikan belida (768 pb) mengungkapkan terdapat segmen ruas berulang pada posisi 177–457 bp yang memiliki panjang 35 pb motif sekuens dan adanya 2 pb penyisipan/penghapusan (indel). keragaman sekuens ini mengungkapkan adanya struktur genetika diantara populasi ikan belida yang diamati dengan rata-rata perbedaan sekuens berpasangan adalah 0.1% dalam 629 pb.

**Kata kunci:** belida, daerah kontrol, ruas berulang

### Pengantar

Ikan belida (*C. lopis*) merupakan ikan air tawar yang bernilai ekonomi tinggi dan memiliki arti budaya penting. Spesies ini secara komersial di perdagangan secara luas di Sumatera dan metode budidaya dalam bentuk penangkaran dan pemuliaan ikan ini mulai dikembangkan. Oleh karena itu, dirasa sangat penting untuk mendokumentasikan struktur genetik spesies di alam untuk mendukung upaya pemuliaan dan sebelum struktur ini di ubah oleh kegiatan pemuliaan buatan.

Pengkajian variasi genetik di dalam dan di antara populasi dapat memberikan informasi yang berguna dalam menjelaskan tingkat interaksi antar populasi lokal dan memberikan penilaian terhadap kontribusi struktur meta-populasi kepada kelangsungan hidup spesies secara regional (Hanski and Gilpin, 1991). Penanda molekuler merupakan alat penting untuk mengidentifikasi unit populasi yang merupakan keterpaduan dari pola unit manajemen yang terpisah dan prioritas utama untuk konservasi. Unit manajemen unit (MUs) ini mewakili populasi yang secara demografis bersifat independen dan memiliki unit evolusi yang signifikan (ESUs), yang merupakan paket populasi yang secara sejarah terisolasi (Mandal *et al.*, 2012).

Mitokondria hewan mengandung suatu rantai sirkular 16 kb molekul DNA, mengkode 13 protein, 22 RNA transfer (tRNA) and two ribosomal RNA gene (Anderson *et al.*, 1981). Ukuran yang kecil dan organisasi yang kompak dari genom DNA mitokondria (mtDNA) merupakan hasil seleksi dari replikasi organel yang cepat (Rand, 1993). Daerah kontrol mtDNA adalah satu-satunya segmen utama yang tidak menyandikan (*non coding*) pada genom miokondria hewan vertebrata. Bagian gen ini telah banyak digunakan sebagai penanda molekuler untuk melakukan studi populasi pada banyak organisme termasuk juga ikan, hal ini karena pola pewarisan yang bersifat maternal dan tingkat evolusi yang cepat (Takagi *et al.*, 2006). Tiga

sampai lima kali lebih cepat dibandingkan dengan gen lain di dalam genom mitokondria (Shui *et al.*, 2008).

Segmen sekuens berulang yang berlokasi di bagian daerah kontrol mtDNA memiliki ukuran basa yang bervariasi dari 10 basa sampai 1.5 kb, sangat bervariasi baik ukuran, urutan dan jumlah salinannya diantara individual (Shui *et al.*, 2008). Namun demikian adanya penyisipan segmen ruas berulang mengakibatkan sulitnya membuat desain primer yang tepat untuk reaksi berantai polimerase (PCR) dan penjejajaran urutan sekuens DNA menjadi lebih kompleks. Oleh karena itu, sebelum melakukan analisa struktur genetik pada suatu populasi, dirasa perlu untuk mengkarakterisasi wilayah kontrol spesies untuk meminimalkan biaya dan waktu pengerjaan.

Dalam studi ini kami menganalisis keberadaan variasi sekuens pada daerah kontrol mtDNA dari 48 ikan belida. Tujuannya adalah untuk mengungkapkan polimorfisme alami dalam kaitannya untuk menyediakan dasar bagi penggunaan bagian daerah kontrol untuk studi lanjutan keragaman pada level populasi pada ikan ekonomis ini.

## **Bahan dan Metode**

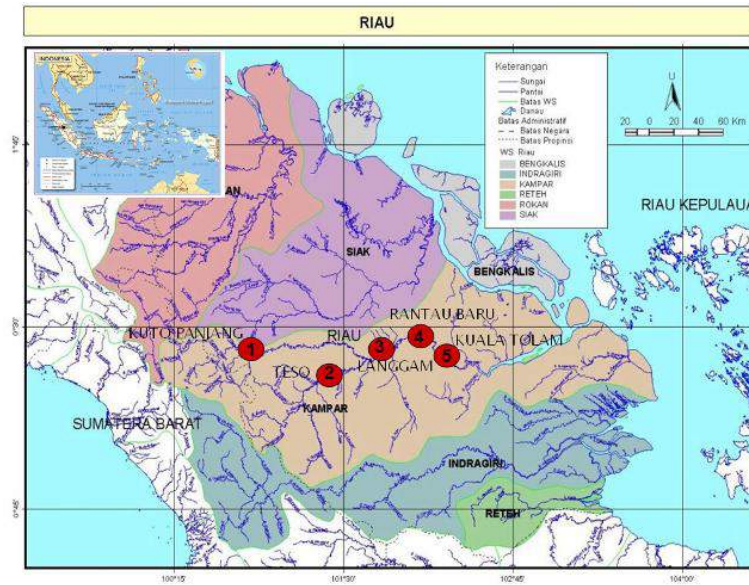
### *Pengambilan dan Penanganan Ikan Sampel*

Pengambilan sampel ikan dilakukan sepanjang tahun 2009 dan 2010 pada lima stasiun pengambilan sampel dengan menggunakan alat pancing, lukah, serok dan sempirai yang dibantu oleh nelayan setempat. Lima stasiun pengambilan sampel di Sungai Kampar tersebut adalah Waduk Kutopanjang, Teso, Langgam, Rantau Baru dan Kuala Tolam (Gambar 1). Sebagai pembandingan dilakukan pengambilan sampel ikan belida dari Sungai barito (Prov. Kalimantan Selatan), Sungai Indragiri Hilir (Prov. Riau), Sungai Penyak (Prov. Bangka Belitung) dan Sungai Mahakam (Prov. Kalimantan Timur) (Gambar 2). Ikan sampel diambil secara acak dengan jumlah sampel untuk pengamatan molekuler berkisar antara 1 sampai 11 specimen pada setiap lokasi.

Setiap spesimen yang terpilih, dilakukan koleksi darah dan sebagian otot (kurang lebih berukuran 1 x 1 cm), selanjutnya dimasukkan atau disimpan dalam *vial tube* yang telah berisi alkohol absolut 99%. *Vial tube* diberi kode dan asal specimen, untuk kemudian disimpan dalam suhu kamar. *Scapel* dan sarung tangan untuk koleksi darah dan otot hanya digunakan sekali untuk setiap specimen dan langsung dibuang. *Vial tube* hanya berisi darah atau otot dari hanya satu specimen sampel. Selanjutnya *vial tube* dibawa ke laboratorium untuk dilakukan ekstraksi dan isolasi mtDNA.

### *Ekstraksi dan Isolasi mtDNA*

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA mini kit for blood (Geneaid)* yang dimodifikasi. Sel-sel darah ikan belida yang disimpan dalam alkohol 70% dicuci dengan air destilata dua kali kemudian disuspensikan dalam bufer STE (NaCl 1M, Tris-HCL 10mM, EDTA 0.1mM, pH 8) hingga volume 350 $\mu$ l. Sel-sel darah dilisis dengan SDS 1% dan proteinase K 0.125 mg/ml pada suhu 55 $^{\circ}$ C selama 1 jam sambil dikocok pelan. Metode ekstraksi DNA selanjutnya mengikuti petunjuk *Genomic DNA mini kit for fresh blood (Geneaid)*.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel ikan belida di Sungai Kampar, Prov. Riau.

Keterangan:

- |                    |           |            |
|--------------------|-----------|------------|
| 1. Kampar          | 3. Penyak | 5. Mahakam |
| 2. Indragiri Hilir | 4. Barito |            |



Gambar 2. Lokasi pembandingan pengambilan sampel ikan belida.

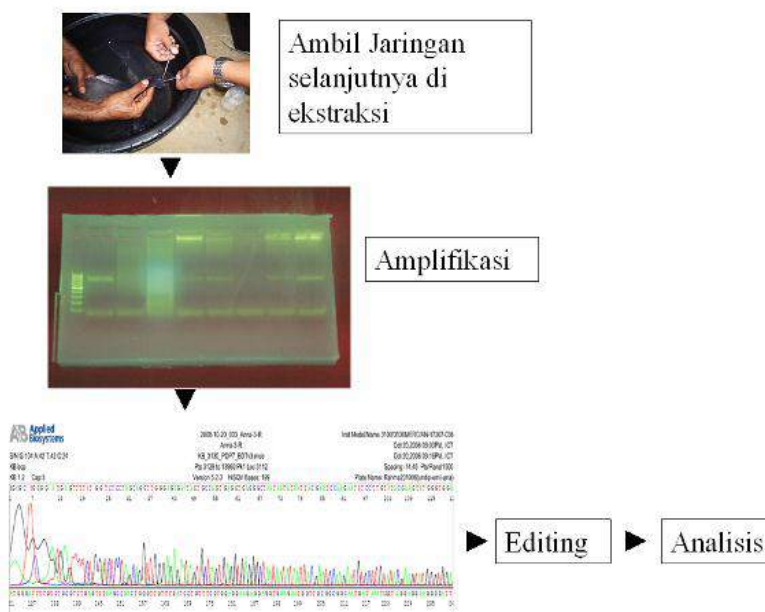
#### *Amplifikasi dan Visualisasi Fragmen mtDNA*

Amplifikasi sebagian fragmen D-Loop mtDNA menggunakan primer L-15 940-Thr (Forward): 5'-AAG GTG TAA TCC GAA GAT TG-3' dan CR-H (reverse): 5'-TAA CGA ACT TAT GTA CGA CG-3' (Takagi *et al.* 2006). Komposisi reaksi PCR dilakukan dengan volume akhir 50 µl terdiri atas sampel DNA 5 µl, DW steril 16 µl, primer masing-masing 2 µl dan *Taq ready mix* 25 µl. Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin *thermocycler BIOER* dengan kondisi sebagai berikut: tahap pradenaturasi 95°C selama 10 menit, tahap kedua yang terdiri dari 35 siklus yang masing-masing mencakup tahap denaturasi 94°C selama satu menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 48°C selama satu menit, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72 °C selama 1,5 menit dan tahap terakhir yaitu pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72 °C selama 7 menit. Produk PCR diuji menggunakan PAGE 6% dalam bufer 1x TBE (10 Mm Tris-

HCL, 1 M asam borat, dan EDTA 0.1 Mm) yang dijalankan pada kondisi 200 Mv selama 30 menit. Selanjutnya DNA diwarnai dengan pewarnaan sensitif perak.

#### Perunutan Produk PCR

Produk PCR di atas gel poliakrilamid yang berukuran sesuai dengan desain primer dimurnikan dengan metode *agarose-gel-cutting* yang diikuti dengan *spin-coloumn DNA extraction from gel*. Produk PCR yang sudah dimurnikan dijadikan cetakan dalam *PCR for sequencing* dengan menggunakan pasangan primer yang sama dengan amplifikasi awal. Pekerjaan ini dilakukan di *First Base DNA Sequencing Service* Singapura. Ilustrasi pekerjaan dalam tahapan analisis mtDNA terlihat pada Gambar 3.



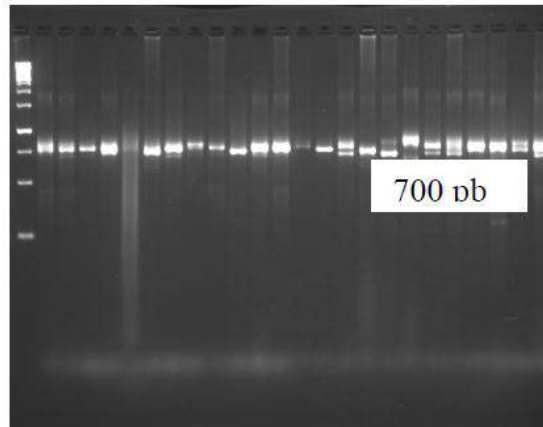
Gambar 3. Tahapan analisis DNA secara ringkas.

#### Analisa Data

Hasil perunutan nukleotida diedit secara manual berdasarkan kromatogram. Runutan nukleotida yang sudah diedit kemudian saling disejajarkan antara bagian *forward* dan *reverse* menggunakan Clustal W yang tertanam dalam MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura *et al.* 2007). Untuk mengeksplorasi hipotesis, pola repeat/ulangan diketahui berdasarkan pengamatan yang hati-hati pola ulangan pada kelompok sekuense daerah kontrol MtDNA ikan belida yang sudah disejajarkan. Istilah tandem repeat memiliki arti pengulangan yang berlanjut tidak terpotong oleh basa atau urutan basa tertentu.

#### Hasil dan Pembahasan

Semua individu ikan diidentifikasi sebagai *C. lopis* berdasarkan karakter morfologi dengan merujuk Kottelat *et al.* (1993). Analisis daerah kontrol pada DNA mitokondria dari 48 urutan sekuense DNA dua arah ikan belida menggunakan primer L-15 940-Thr dan CR-H diperoleh fragmen teramati dari urutan MtDNA pada ikan belida, membentang dari ujung sitokrom b gen sampai pada bagian pusat dari yang di duga daerah kontrol dan termasuk gen tRNA<sup>Phe</sup> gen. Urutan sekuense yang diperoleh, yang merupakan sekuense target (768 pb, Gambar 4), di sejajarkan dan dibandingkan dengan kelompok *C. lopis* (Inuoe *et al.*, 2009) untuk mengkonfirmasi posisinya. Primer didesain untuk menempel pada bagian tengah dari gen tRNA<sup>thr</sup> dan bagian tengah yang diduga daerah kontrol. Variabilitas panjang ekstensif mtDNA teramati pada 5' urutan akhir. Variabilitas panjang ini disebabkan adanya variasi jumlah segmen ruas berulang, yang memiliki panjang 35 pb motif sekuense (5'-ATATTACATATATGTACTAGTACATATTATGCATT3'). Panjang segmen ini berkisar pada posisi basa diantara 177 – 457 pb (Gambar 5).



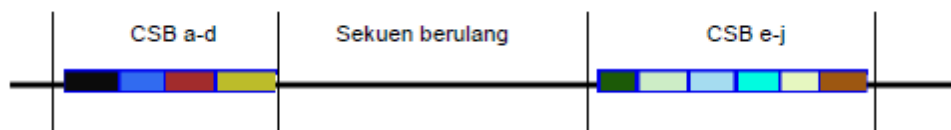
Gambar 4. Foto gel hasil amplifikasi gen target (daerah control) sepanjang 768 pb.

```

1 CAGAGAAAGGAGATTTTAACTCCCACCCCTTAACTCCCAAAGCTAAGATTCTAACTAAAAC
tRNA-Pro ← | → daerah kontrol
61 TATTCTCTGCCGTACATAGCCTAATATATGTCCATTTACACCACATACTGTACTGTGGGC
Indel 2 pb
121 AATACATATTATGTACTAGACCATGTATACATATA--CTTATTAATTTGTATGTATCATA
181 TTACATATATGTACTAGTGCATATTATGCATTATATTACATATATGTACTAGTGCATATT
sekuen berulang
241 ATGCATTATATTACATATATGTACTAGTACATATTATGCATTATATTACATATATGTACT
301 AGTACATATTATGCATTATATTACATATATGTACTAGTACATATTATGCATTATATTACA
361 TATATGTACTAGTACATATTATGCATTATATTACATATATGTACTAGTACATATTATGCA
akhir dari 402 pb untuk studi populasi
421 TTATATTACATATATGTACTAGTACATATTATGCATTATATTACATATATGTCTTAATA
481 CATACCATGAATGGAGCCAAACACAGATTTCAAATCAGCTACGAACCCATCAGACAAACG
541 AAATTGTAGACTCAAATAACTTGTCCATGCTTCCTTGCCTTATCAACACTTCTTGC
601 CCCAGTACAAAAATGTAGTAAGAGACCACCAACGATTTAGGCAAGAAATACACTCTTAATG
661 ATGGGTCAGGGACAAATATCGTGGGGGTTGCACAAGTGAACATTTACTGGCATCTGGTTC
mungkin belum lengkap
721 CTTTGTCCAGGGGCGGTAATCTAAATATTCCCCTGTCCCTCACATTCTAC
    
```

Gambar 5. Urutan sekuens nukleotida mtDNA dari akhir gen sitokrom b ke gen tRNA<sup>Phe</sup> Ikan belida (*C. lopis*) dibandingkan dengan *C. lopis* dari luar Indonesia. Sekuense ini berjalan dari 3' akhir gen sitokrom b untuk transfer gen fenilalanin RNA. Garis putus-putus menunjukkan *gap* dan garis hitam mengindikasikan area tandem repeat dan beberapa region basa yang tetap.

Elemen sekuens yang kekal yang dilaporkan pada daerah kontrol *invertebrate* lain juga diamati pada ikan belida. Elemen ini (CSBa-d) dan CSBe-f mengapit segmen berulang pada daerah kontrol pada DNA mitokondria (mtDNA) (Gambar 6). Segmen sekuens yang berulang tersebut terlibat dalam keberadaan heteroplasmity mitokondria yang tinggi. Karena lokasi sekuens ini berada pada daerah pengaturan dan propertinya dalam istilah komfirmasi yang bervariasi, mereka dapat memberikan pengaruh pada inisiasi replikasi rantai berat DNA (*H-stand DNA*) dan selanjutnya dapat mempengaruhi efisiensi replikasi DNA (Dijfresne *et al.*, 1996).



Gambar 6. Letak segmen sekuens berulang yang berada diantara dua blok sekuens kekal.

Merujuk substitusi nukleotida dan segmen sekuens berulang, semua 48 sekuens adalah haplotipe yang berbeda. Setelah menghilangkan segmen sekuens berulang, 629 pb set data tanpa insersi dan atau delesi pada daerah kontrol diperoleh dan 11 haplotipe ditemukan diantara 48 sekuens. Rata-rata perbedaan sekuens berpasangan adalah 0.1% dalam 629 pb. Walaupun nilai ini kecil, namun perbedaan sekuens pada daerah kontrol cukup untuk melakukan analisis populasi (Ishikawa *et al.*, 2001). Lebih jauh, salinan jumlah segmen sekuens berulang dapat digunakan sebagai suatu tanda genetik dan indikasi stabilisasi lipatan DNA (Shui *et al.*, 2008). Fenomena struktur dan tipe organisasi dari segmen ruas berulang ini mirip dengan ikan teleost dan *vertebrate* pada umumnya. Adanya variasi jumlah segmen ruas berulang tersebut menentukan polimorfisme (heteroplasmity) atau variasi genetik pada tingkat inter dan intra populasi.

## Kesimpulan

Keragaman sekuens segmen berulang diantara individual teramati pada ikan belida. Segmen ruas berulang, berada diantara posisi 177–457 pb yang memiliki panjang 35 pb motif sekuens dan adanya 2 pb penyisipan/penghapusan (indel). keragaman sekuens ini mengungkapkan adanya struktur genetik diantara populasi ikan belida yang diamati dengan rata-rata perbedaan sekuens berpasangan adalah 0.1% dalam 629 pb.

## Daftar Pustaka

- Andersons, A., T. Bannerb, G. Bmxi, M. H. I. de bruijna & R. coulson. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Dijfresne, C., E. Mignotte & M. Gueriiiif. 1995. The presence of tandem repeats and the initiation of replication in rabbit mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 23 (5): 593-600.
- Hanski, I. & M. Gilpin. 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biol J Linn Soc* 42 (1–2): 3–16.
- Inuoe, J. G., Y. Kumazawa, M. Miya & M. Nishida. 2009. The historical biogeography of the freshwater knifefishes using mitogenomic approaches: A Mesozoic origin of Asian notopterids (Actinopterygii: Osteoglossomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 486-499.
- Ishikawa S., J. Aoyama, K. Tsukamoto, M. Nishida. Population structure of the Japanese eel *Anguilla japonica* as examined by mitochondrial DNA sequencing. *Fish. Sci.* 67: 246–253.
- Kottelat, M., S. N. Kartikasari., A. J. Whitten & S. Wirjoatmodjo. 1993. *Freshwater fishes of western Indonesia and Sulawesi*. Ed. Dua bahasa. Periplus Editions Limited. Jakarta. 221 h.

- Mandal, A., V. Mohindra, R. K. Singh, P. Punia, A. K. Singh & K. K. Lal. 2012. Mitochondrial DNA variation in natural populations of endangered Indian Feather-Back Fish, *Chitala chitala*. *Mol Biol Rep* 39:1765–1775.
- Randd, M. 1993 Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *J. Mol. Evol.* 37: 281-295.
- Shui, B. N., Z. Q. Han, T. X. Gao & Z. Q. Miao. 2008. Tandemly repeated sequence in 5'end of mtDNA kontrol region of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*. *African Journal of Biotechnology* 7 (24): 4415-4422.
- Takagi, A.P., S. Ishikawa, T. Nao., S. Hort., M. Nakatani, M. Nishida & H. Kurokura. 2006. Genetic differentiation of the bronze featherback *Notopterus notopterus* between Mekong River and Tonle Sap Lake population by mitochondrial DNA analysis. *Fisheries Science* 72: 750-754
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

### Tanya Jawab

- Penanya : Namastra Probosunu
- Pertanyaan : Jembatan penghubung antara penelitian DNA dengan masyarakat?
- Jawaban : Penelitian DNA adalah penelitian dasar untuk mendorong dan memberikan rekomendasi kepada stake holder (Pemda atau DIRJEN) sehingga *policy* yang disampaikan memang valid dan bisa dipertanggungjawabkan misalnya, penentuan daerah konservasi menggunakan/ indicator TKG dan telur/ larva, identifikasi larva menggunakan DNA sehingga wilayah memang lokasi yang tepat.

