

repository.ub.ac.id

**KERAGAMAN GENETIK LIMA STRAIN IKAN MAS
(*Cyprinus carpio* L.) BERDASARKAN MARKA
DNA MIKROSATELIT**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam Bidang Biologi**

oleh
INDAH NUR CHOMSY
14509010111021



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

UNIVERSITAS
BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

KERAGAMAN GENETIK LIMA STRAIN IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.) BERDASARKAN MARKA DNA MIKROSATELIT

Indah Nur Chomsy, Agung Pramana Warih Marhendra
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2018

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis heterozigositas alel dari lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) berdasarkan marka DNA mikrosatelit dan mengetahui hubungan kekerabatan antara kelima strain ikan Mas berdasarkan heterozigositas alel menggunakan marka tersebut. Metode penelitian ini isolasi DNA sesuai protokol kit TIANGEN menggunakan sampel jaringan otot dari lima strain ikan Mas lokal Indonesia, yaitu strain Sinyonya, Punten, Majalaya, Koi, dan Najawa. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan sepuluh primer mikrosatelit. Pita yang teramat pada hasil uji kualitatif gel agarosa 1% dikonversikan jaraknya menjadi panjang fragmen (bp) berdasarkan kurva standar marker 100-3000bp DNA Ladder. Heterozigositas alel dianalisis menggunakan GenAlex 6.503. Panjang fragmen tiap lokus diuji menggunakan uji analisis varian. Hubungan kekerabatan dianalisis menggunakan POPGENE 1.32 untuk mengkonstruksi dendrogram UPGMA yang dimodifikasi dari *NEIGHBOR Procedure of PHYLIP 3.5* dan divisualisasi dengan MEGA7. Heterozigositas alel dari kelima strain ikan Mas di Indonesia diketahui signifikan dan merepresentasikan variasi alel yang cukup baik. Strain Punten diketahui memiliki karakter lokus paling polimorfik (90%). Hubungan kekerabatan berdasarkan hasil analisis heterozigositas alel DNA mikrosatelit menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok strain yang dipisahkan oleh jarak genetik yang signifikan. Kelompok pertama terdiri dari tiga strain yakni Koi, Majalaya, dan Punten, sementara kelompok kedua terdiri dari strain Sinyonya dan Najawa. Pengelompokan tersebut dipengaruhi oleh proses budidaya lokal intensif, dan dalam jangka waktu lama.

Kata kunci : alel, *Cyprinus carpio* L., DNA mikrosatelit, heterozigositas, hubungan kekerabatan

repository.ub.ac.id

Genetic Diversity of Five Strains Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) based on Microsatellite DNA Marker

Indah Nur Chomsy, Agung Pramana Warih Marhendra
Biology Department, Mathematics and Natural Sciences Faculty
University of Brawijaya
2018

ABSTRACT

The purpose of this research was to analyze the heterozygosity of alleles from five strains of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on microsatellite DNA markers and to know the relationship between those common carp's strain using heterozygosity of alleles based on the marker. The method of this research were DNA isolation according to TIANGEN protocol kit using sample of the muscle tissue from five local Indonesian Common carp strains, namely Sinyonya, Punten, Majalaya, Koi, and Najawa. Amplification was performed using ten primers for DNA microsatellites. Bands observed in the qualitative test on 1% agarose gel were converted into fragments length (bp) based on 100-3000bp DNA Ladder's standard curve. Heterozygosity alleles were analyzed using GenAlex 6.503. Variation of fragment length of each locus was analyzed using variance analysis test. The relationship among strains was analyzed using POPGENE 1.32 to construct a UPGMA dendrogram modified from *NEIGHBOR Procedure of PHYLIP 3.5* and visualized using MEGA7 software. Heterozygosity of alleles among strains of Indonesian common carp shows a significant and represent as good alleles of the population. Punten strain has the most polymorphic locus character (90%). The relationship based on heterozygosity analysis of DNA microsatellite alleles shows that there are two groups separated by significant genetic distances. The first group consisted of three strains: Koi, Majalaya, and Punten, while the second group consisted of Sinyonya and Najawa strains. The strains grouping is caused by intensive and local culture systems over long time.

Keywords: allele, *Cyprinus carpio* L., microsatellite DNA, heterozygosity, phylogenetic

repository.ub.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI
KERAGAMAN GENETIK LIMA STRAIN IKAN MAS
(*Cyprinus carpio* L.) BERDASARKAN MARKA
DNA MIKROSATELIT

INDAH NUR CHOMSY
145090100111021

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 2 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui,
Pembimbing

Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si
NIP. 196506161991111001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 197001281994122001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Indah Nur Chomsky
NIM : 145090100111021
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul : Keragaman Genetik Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L.) Berdasarkan Marka DNA Mikrosatelit

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai referensi,
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2 Juli 2018
Yang menyatakan

Indah Nur Chomsky
145090100111021

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan pada Allah SWT, atas rahmat dan petunjuk-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar dan tepat waktu. Penulis ingin mengucapkan terima kasih dengan segala kerendahan hati kepada :

1. Bapak Nurwachid dan Ibu Wati Kusuma atas segala doa, nasihat, dukungan, kasih sayang serta motivasi kepada penulis.
2. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku dosen pembimbing yang memberikan kritik dan saran untuk penelitian.
3. Bapak Nia Kurniawan, S.Si, MP, D.Sc., selaku penguji I yang turut memberikan saran, arahan, motivasi, dan bantuan dalam menunjang kelancaran penelitian ini dan Dr. Bagyo Yanuwadi selaku dosen penguji II, serta kepada seluruh dosen dan karyawan di Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya.
4. Pardina Y. W., dan Pradipta H. E. yang sangat membantu penulis dalam teknis penelitian, proses perijinan dan pengumpulan sampel di lapang.
5. Tim peneliti *NK Research* (Andri M., Agung S. K., Mulyadiane M. P., Erintha E. W., dkk) yang memberikan saran pengembangan penelitian dan membantu selama penelitian berlangsung.
6. Joice A. H. G., Meylinda K., Kartika P., Satria W. B., Radityo A.N., selaku tim peneliti di Laboratorium Molekuler Diversitas Hewan.
7. Hamdani D. P. dan Aby L. R. untuk segala bentuk bantuan, saran, dan motivasi.
8. Sahabat seperjuangan Biologi angkatan 2014 (AMINO) yang selalu memberikan semangat kepada penulis.

Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis untuk menjadikan skripsi ini lebih baik.

Malang, Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Karakteristik Umum Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	4
2.2 Diversitas Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) di Indonesia	7
2.3 Keragaman Genetik pada DNA.....	10
2.3.1 DNA (<i>Deoxiribonucleic Acid</i>).....	10
2.3.2 Marka molekuler pada DNA.....	12
2.4 Studi Genomik Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) berdasarkan Marka Molekuler DNA Mikrosatelit.....	15
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Tahapan Penelitian.....	17
3.3 Preservasi Sampel Jaringan Lima Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	17
3.4 Isolasi DNA Mikrosatelit.....	18
3.4.1 Ekstraksi DNA.....	18
3.4.2 Uji kualitatif sampel DNA.....	19
3.4.3 Amplifikasi sampel DNA mikrosatelit.....	20
3.5 Analisis Data.....	21
3.5.1 <i>Scoring alleles</i>	21

3.5.2 Analisis jumlah, frekuensi, dan heterozigositas alel.....	22
3.5.3 Analisis hubungan kekerabatan.....	22

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Heterozigositas Alel Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	23
4.1.1 Nilai variasi alel (Na), jumlah alel efektif (Ne), heterozigositas observasi (Ho) dan ekspektasi (He).....	23
4.1.2 Frekuensi alel dan koefisien <i>inbreeding</i> (Fis) pada ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) berdasarkan marka DNA mikrosatelit.....	27
4.2 Hubungan Kekerabatan antar Lima Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) berdasarkan Heterozigositas DNA Mikrosatelit.....	35
4.2.1 Nilai jarak genetik (<i>Genetic Distance</i>) lima strain ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	35
4.2.2 Nilai diferensiasi genetik (<i>Genetic Difference</i>) lima strain ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	36
4.2.3 Rekonstruksi dendogram kekerabatan lima strain ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	37

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran.....	42

DAFTAR PUSTAKA.....	43
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	50
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Primer Mikrosatelit untuk Analisis Keragaman Genetik pada Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	21
2. Heterozigositas Alel pada Lima Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	30
3. Frekuensi Alel pada Lima Strain Ikan Mas di Indonesia.....	32
4. Nilai F-stat Alel untuk Lima Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.).....	32
5. <i>Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance</i> untuk Lima Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) berdasarkan 10 Locus DNA Mikrosatelit.....	35
6. <i>Pairwise Population Matrix of Nei's Standard Pairwise F_{st} distance</i> untuk Lima Strain Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) berdasarkan 10 Locus DNA Mikrosatelit.....	37



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Morfologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	5
2. Lima strain ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i> L.) lokal di Indonesia.....	10
3. Variasi Panjang Fragmen Alel pada Lima Strain Ikan Mas di Indonesia berdasarkan uji <i>one-way</i> ANOVA Menggunakan Marka Sepuluh Locus DNA Mikrosatelit.....	31
4. Heterozigositas Locus Polimorfik dari Lima Strain Ikan Mas berdasarkan Marka DNA Mikrosatelit.....	34
5. Rekonstruksi dendogram dengan metode <i>UPGMA</i> untuk kekerabatan antar strain ikan Mas berdasarkan marka DNA mikrosatelit.....	38



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Hasil Uji Kualitatif Amplifikasi pada Gel Agarose 1%.....	50
2. Data Alel Kodominan pada <i>software</i> POPGENE 1.32.....	56
3. Rekonstruksi Dendrogram UPGMA menggunakan <i>software</i> POPGENE 1.32.....	57



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Lambang/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
µl	Mikroliter
%	Persen
-	Sekitar
A	Adenin
bp	<i>Base pair</i>
C	Sitosin
cm	sentimeter
ddH ₂ O	<i>double distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dsDNA	<i>Double Stranded Deoxyribonucleic Acid</i>
EtBr	Etidium Bromida
G	Guanin
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	mililiter
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	<i>Rotation Per Minute</i>
STR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
T	Timin
TBE	<i>Tris Boric EDTA</i>
TE	<i>Tris-Cl dan Asam Borat</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) merupakan salah satu ikan budidaya air tawar unggulan di Indonesia dan di seluruh dunia. Ikan yang termasuk ke dalam famili Cyprinidae ini merupakan ikan dari famili terbesar setelah Gobiidae (Kershaw, 2002). Ikan Mas telah dibudidayakan sejak masa lampau, diawali dengan proses pelepasannya ke ekosistem perairan tawar buatan. Budidaya ikan Mas di Indonesia telah dilakukan sejak akhir tahun 1999. Adaptasi ikan Mas yang relatif cepat terhadap ekosistem barunya, menjadi salah satu alasan ikan tersebut menjadi salah satu komoditas budidaya terbesar di Indonesia. Ikan Mas cukup mudah untuk dikembangkan di ekosistem buatan sederhana seperti kolam, keramba jaring apung, maupun minapadi. Perkembangan ikan Mas yang cukup mudah pada ekosistem buatan ini kemudian menjadi pertimbangan penting dan mempengaruhi pada proses pemilihan atau seleksi karakter ikan Mas budidaya (Froese & Pauli, 2002). Ikan Mas menjadi sumber protein hayati yang terjangkau bagi masyarakat, selain karena mudah beradaptasi di ekosistem buatan, juga dikarenakan kemampuan reproduksi dan pertumbuhan yang relatif cepat dan cukup baik. Ikan ini biasanya mengalami masa kawin sekitar awal musim semi hingga awal musim panas untuk negara subtropis, sementara di negara tropis ikan Mas dapat kawin sepanjang tahun (Smith, 2001). Perkawinan ikan Mas di ekosistem buatan seringkali menyebabkan ikan Mas mengalami perubahan kualitas baik secara kuantitatif dan genetik akibat berubahnya alel-alel bawaan yang dimiliki oleh induk ikan Mas (Grimholt dkk., 2003).

Perkawinan silang dari beberapa varietas ikan Mas telah menghasilkan banyak strain-strain ikan Mas lokalitas di berbagai daerah di Indonesia. Beberapa strain ikan Mas yang mudah dijumpai di pulau Jawa antara lain Koi, Majalaya, Sinyonya, Najawa, dan Punten (Sumantadinata, 1995). Peminatan konsumen terhadap ikan Mas yang menjanjikan di Indonesia, mendorong para petani ikan untuk terus melakukan budidaya ikan tersebut baik dengan metode pemeliharaan alami maupun kawin silang dengan harapan

mendapatkan kualitas ikan Mas dengan karakter yang diinginkan. Ikan Mas yang dipilih oleh para petani ikan melalui serangkaian seleksi karakter, merupakan salah satu penyebab menurunnya variabilitas genetik dari ikan Mas yang diperkirakan telah terjadi secara berkepanjangan (Balon, 1995b) dan variabilitas dari strain hasil budidaya belum banyak diketahui secara pasti. Persilangan ikan Mas baik di habitat aslinya maupun di kolam budidaya telah menghasilkan banyak perbedaan morfologis yang nyata pada keturunannya, namun hubungan kekerabatan antar varietas atau strain masih belum jelas dan memerlukan studi genetika populasi lebih lanjut.

Studi genetika populasi merupakan kajian penting terkait dengan keragaman suatu spesies. Studi ini dapat dilakukan dengan beberapa cara, salah satunya menggunakan marka molekuler. Analisis marka molekuler menjadi tren populer dalam berbagai kajian dan bidang penelitian di Indonesia, salah satunya di bidang budidaya ikan. Studi populasi biologis terhadap populasi ikan Mas dapat dilakukan secara sederhana dengan memanfaatkan marka molekuler yang spesifik terhadap suatu polimorfisme. Salah satu marka molekuler yang dapat digunakan adalah *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR). Sekuen VNTR diperkirakan cukup sensitif terhadap perubahan yang terjadi pada suatu populasi berkaitan dengan ukuran, struktur, dan laju persebaran (Scribner dkk., 1994). Salah satu bagian dari VNTR yang dapat digunakan untuk studi populasi ikan Mas adalah mikrosatelit. Mikrosatelit dikembangkan sebagai marka molekuler yang dapat berperan dalam rekonstruksi dan pemetaan genetik pada suatu populasi organisme. Pemetaan genetik dari suatu populasi dapat disusun berdasarkan analisis polimorfisme pada lokus tunggal dengan alel heterozigot yang terkeksresi secara kodominan (Muneer dkk., 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah heterozigositas alel dari lima strain ikan Mas budidaya berdasarkan marka DNA mikrosatelit?
2. Bagaimanakah hubungan kekerabatan antara kelima strain ikan Mas berdasarkan heterozigositas alel menggunakan marka DNA mikrosatelit?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis heterozigositas alel dari lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) budidaya berdasarkan marka DNA mikrosatelit, serta untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara kelima strain ikan Mas berdasarkan heterozigositas alel menggunakan marka tersebut.

1.4 Manfaat Penelitian

Data molekuler yang diperoleh dari penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk upaya pemuliaan ataupun penelitian di masa yang akan datang. Data molekuler tersebut merupakan bentuk pengayaan dari upaya konservasi genetik dari ikan Mas lokal di Indonesia yang dilakukan dengan marka molekuler mikrosatelit serta upaya inventarisasi keanekaragaman strain ikan Mas yang dibudidayakan di Indonesia.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

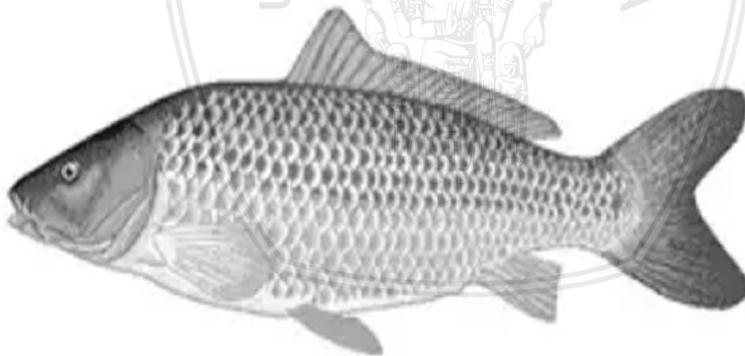
2.1 Karakteristik Umum Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) merupakan salah satu ikan yang persebarannya telah mencapai ke hampir seluruh perairan tawar di dunia. Ikan Mas telah mengalami domestikasi sejak masa lampau dengan cara dilepaskan ke ekosistem perairan tawar buatan. Ikan Mas termasuk ke dalam ikan yang cukup mudah dibudidayakan. Ikan ini mulai dikenal sebagai ikan konsumsi sejak pertengahan hingga akhir kerajaan Romawi di Eropa. Ikan Mas yang diambil dari sungai, awalnya diletakkan pada kolam sederhana oleh para bangsa Romawi, hingga kemudian para penduduk Kristen Romawi merancang konstruksi kolam yang memungkinkan untuk budidaya ikan Mas tersebut secara monokultur (Alikhuni, 1966). Pertengahan abad ke-12 hingga ke-14 sesudah Masehi, seleksi artifisial mulai dilakukan dengan hanya mengawinkan ikan Mas bertubuh besar, kemudian didomestikasi.

Morfologi ikan Mas memiliki karakteristik yang khas. Tubuh ikan Mas memanjang secara longitudinal. Panjang tubuh ikan Mas adalah 30-60 cm dengan massa tubuh sekitar 0,5 – 4 kg. Meskipun tidak biasa ditemukan, adapula ukuran ikan Mas terbesar yang pernah dicatat dunia adalah ikan Mas yang mencapai massa tubuh 15-20 kg. Ikan Mas memiliki bibir yang tebal dan sepasang sungut (*barbel*) pada ujung mulutnya. Mulut ikan Mas termasuk ke dalam mulut terminal pada ikan dewasa, sementara ikan Mas muda memiliki bentuk mulut yang subterminal. Ikan jantan memiliki sirip ventral yang lebih lebar dari betina. Sirip dorsal terdiri dari 17-22 ruas atau spina lunak, sementara spina keras berada di dekat kepala. Sirip anal terdiri dari 6-7 ruas, dengan ujung posterior dari sirip dorsal dan analnya dilengkapi dengan spina yang tajam. Linea lateralis dari ikan Mas dewasa terdiri dari 32-38 sisik. Proporsi warna dari ikan Mas sangat beragam, namun sisik dari ikan ini selalu tebal dan lebar (Kershaw, 2002).

Ikan Mas melakukan fertilisasi secara eksternal dan dapat dengan jelas dibedakan antara betina dan jantannya. Perbedaan ikan jantan dan betina dapat diamati secara fisik. Ikan Mas betina dewasa

biasanya memiliki panjang tubuh sekitar 45 cm dan memiliki kemampuan bertelur hingga 300.000 telur. Inkubasi telur dilakukan pada air dengan suhu 25°C hingga 32°C selama tiga hingga lima hari. Tukik ikan Mas berukuran panjang 5 -5,5 mm. Pertumbuhan ikan sangat dipengaruhi oleh suhu air, kerapatan plankton dan makrofita, serta ketersediaan pangan di air. Ikan Mas yang telah mencapai ukuran 8 mm akan kehilangan *yolk*-nya sehingga dapat memulai aktivitas makan. Ikan Mas jantan akan mencapai kedewasaan setelah berusia 3-5 tahun, sementara betina sekitar 4-5 tahun (Chumchal, 2002). Ikan Mas betina akan meletakkan telur pada makrofita air dengan cara atau pergedakan yang sangat aktif. Oleh karena itu, sebagai pengganti makrofita, pada budidaya ikan mas artifisial, perlu dibuat substrat sehingga telur ikan dapat menempel pada permukaan substrat tersebut. Substrat biasanya terbuat dari sabut kelapa, sementara telur-telur yang telah difertilisasi dapat disebar. Ikan ini biasanya mengalami masa kawin sekitar awal musim semi hingga awal musim panas untuk negara subtropis, sementara di negara tropis ikan Mas dapat kawin sepanjang tahun (Smith, 2001).



(FAO, 2006)

Gambar 1. Morfologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Ikan Mas lebih menyukai perairan yang tidak terlalu dangkal, dimana perairan tersebut memiliki kerapatan makrofita yang tinggi. Ikan Mas memiliki kebiasaan mencari makan di tengah hingga dasar

perairan dan dapat berkembang dengan baik pada habitat perairan yang berlumpur. Ikan Mas diketahui memiliki spektrum ekologis yang luas. Pertumbuhan terbaik ikan Mas diketahui pada daerah tropis yang memiliki suhu air sekitar 23°C-30°C dengan toleransi salinitas hingga 5%. Keasaman atau pH untuk pertumbuhan optimal ikan ini adalah 6,5-9.0 dengan kandungan *dissolved oxygen* (DO) sebesar 0,3-0,5 mg/liter (De Silva, 2003). Ikan Mas merupakan ikan omnivora dengan tendensi utamanya adalah zooplankton, serangga air, larva serangga, moluska, maupun cacing. Sebagai makanan tambahan, ikan Mas juga mengonsumsi tumbuhan seperti batang lunak, daun, biji, dan bagian lain dari tanaman air maupun terestrial yang jatuh ke dalam air.

Perkembangan ikan Mas cukup cepat, dibandingkan dengan ikan budidaya yang lain. Perkembangan cepat ini seringkali dianggap sebagai spesies invasif terhadap organisme lain pada ekosistem yang sama (Froese & Pauly, 2002). Pertumbuhan harian dari ikan Mas dapat mencapai 2-4% dari total berat tubuhnya. Bahkan, ikan Mas dapat mengalami pertambahan massa tubuh dari 0,6-1 kg berat tubuh dalam satu musim pada sistem budidaya kolam polikultur. Namun, hal ini berbeda dengan ikan Mas yang tumbuh pada daerah tropis, yang diketahui lebih lambat. Penelitian yang dilakukan di Eropa menunjukkan bahwa ikan mas memiliki tingkat kematangan gonad sekitar 11.000-12.000 hari, sementara jantan 25-35% lebih cepat dibandingkan indukan betina. Meskipun ikan Mas Asia diketahui memiliki pertumbuhan yang lambat, ikan Mas yang dibudidayakan di Asia lebih cepat mengalami kematangan gonad (Varadi dkk., 2002).

Ikan Mas termasuk ke dalam ikan bertulang sejati atau Teleostei. Berdasarkan karakteristik morfologinya, ikan Mas dikelompokkan dalam famili Cyprinidae, yaitu famili ikan air tawar terbesar kedua setelah Gobiidae. Berikut sistematika ikan Mas menurut Linnaeus (1758):

- Phyllum* : Chordata
- Subphyllum* : Vertebrata
- Superclass* : Pisces
- Class* : Osteichthyes
- Subclass* : Actinopterygii
- Ordo* : Cypriniformes

Subordo : Cyprinoidea
Family : Cypridae
Subfamily : Cyprinidae
Genus : Cyprinus
Species : *Cyprinus carpio*

2.2 Diversitas Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) di Indonesia

Ikan Mas merupakan komoditas utama hampir di seluruh dunia. Ikan ini sangat digemari baik untuk konsumsi maupun sebagai ikan hias yang dapat dibudidayakan secara ekstensif secara monokultur. Sistem polikultur pada budidaya ikan Mas diketahui telah banyak dilakukan di Cina dengan menggunakan strain lokalnya. Persebaran alami dari ikan Mas saat ini dibagi menjadi dua yaitu bagian barat yang terdiri dari Kaspian, Aral, dan Semenanjung Laut Hitam, dan bagian timur yang terdiri dari daerah Asia Timur dan Tenggara. Pembagian dua wilayah persebaran ikan Mas ini didasarkan pada hipotesis terisolasinya ikan Mas selama berlangsungnya glasiasi di era Pleistosen (Kirpitchenkov, 1999). Persilangan ikan Mas baik di habitat aslinya maupun di kolam budidaya telah menghasilkan banyak perbedaan morfologis yang nyata pada keturunannya, namun hubungan kekerabatan antar varietas atau strain masih belum jelas dan memerlukan studi lebih lanjut.

Budidaya ikan Mas di Indonesia juga telah menjadi salah satu komoditas sumber protein yang cukup pesat sejak dilakukan di akhir tahun 1999. Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2013, produksi ikan Mas di Indonesia mencapai sekitar tiga ratus ton dalam setahun. Produksi terbesar tepatnya di Jawa Barat sebesar 167 ton, Sumatra Barat 61.658 ton, Sulawesi Utara 41.789 ton, Riau 26.411 ton, dan Sumatra Utara sebesar 21.897 ton. Hal ini membuktikan bahwa ikan Mas di Indonesia merupakan sumber protein hayati utama. Ikan Mas menjadi spesies budidaya penting di Indonesia dikarenakan ikan tersebut mudah untuk dikembangkan di ekosistem buatan sederhana seperti kolam, keramba jaring apung, maupun minapadi sehingga harganya terjangkau bagi masyarakat. Ikan Mas merupakan salah satu spesies air tawar yang sangat mudah beradaptasi dengan lingkungannya, serta melakukan perkawinan sehingga pembenihan cukup mudah dilakukan. Perkawinan silang

dari beberapa varietas ikan Mas telah menghasilkan banyak strain-strain ikan Mas baru di Indonesia. Strain ikan Mas tersebut sesuai dengan lokalitas di berbagai daerah di Indonesia. Strain yang banyak ditemukan di Indonesia adalah Sinyonya, Punten, Majalaya, Karper Merah, Karper Kaca, Karper Taiwan, Koi, Kumpai Sirip Panjang, Domas, Kacra Domas, Wildan, dan Sutisna (Hardjamulia & Suseno (1976) dan Sumantadinata (1995).

Sejarah panjang budidaya ikan Mas di Asia diperkirakan dilakukan pada waktu yang hampir sama dengan benua Eropa. Awal abad ke-19, *wild carp* mulai diambil dari sungai-sungai dan dipelihara pada kolam atau disebut dengan *reservoirs*. Pada saat bersamaan pula diketahui negara Jepang membudidayakan ikan Mas hias yang memiliki warna tubuh bermacam-macam, yang kemudian dikenal sebagai strain Koi. Sejarah ini tercatat oleh seorang pembudidaya ikan Mas di prefektur Niigata (Balon, 1995b). Varian dari ikan Mas Koi tersebut dibudidayakan secara spesifik berdasarkan pemilihan warna dengan tujuan agar keturunan memiliki pola warna tertentu. Ikan Mas Koi menjadi primadona ikan Mas ornamental hingga ke seluruh dunia. Ikan Mas Koi memiliki warna tubuh yang bervariasi dan dikelompokkan berdasarkan warna tubuhnya (Gambar 2a).

Ikan Mas Majalaya pertama kali diketahui dipelihara oleh petani ikan pada tahun 1975. Strain ini diperoleh dari hasil seleksi ikan massal yang dilakukan oleh petani ikan H.Ayub, yaitu seorang yang berasal dari daerah Majalaya, Jawa Barat. Ikan strain ini kemudian menjadi strain yang populer di daerah Jawa Barat. Ikan Mas strain ini memiliki ciri khusus yaitu tubuh yang memanjang dengan ukuran kepala yang lebih kecil daripada tubuhnya. Tubuh berwarna hijau tua hingga kehitaman dengan gradasi warna yang semakin cerah ke arah abdomen. Abdomen membulat. Sirip berwarna senada dengan tubuh, dengan variasi warna keemasan pada ujung siripnya (Sumantadinata, 1995) (Gambar 2b).

Ikan Mas Sinyonya merupakan strain ikan Mas yang populer di Padeglang. Ikan Mas ini diketahui memiliki ciri khas berupa mata bulat cekung sehingga terlihat sipit (Sumantadinata, 1995). Warna tubuh kuning muda atau sitrus dengan persebaran warna yang hampir merata. Abdomen membulat. Sirip berwarna senada dengan tubuh atau lebih cerah. Punggung lebih rendah tetapi ukuran kepala

proporsional dengan tubuhnya. Belum secara jelas diketahui asal ikan Mas ini, tetapi diperkirakan merupakan hasil persilangan ikan Mas yang terjadi secara alami di sungai-sungai di Jawa Barat. Petani ikan Mas strain Sinyonya biasa menyebut ikan Mas strain ini sebagai ikan Mas Putri Yogya (Gambar 2c).

Ikan Mas Najawa merupakan jenis ikan Mas yang mempunyai karakteristik berupa tubuh merah menyala. Ikan Mas Najawa ini telah dikoleksi sejak tahun 1940 sebagai salah satu plasma nutfah yang kemudian didomestikasi dengan program seleksi selama sekitar 40 tahun dengan keturunan 87,1% tubuh dengan warna merah menyala, 2,7% albino, dan 10,2% merah berbintik hitam. Karakter genetik yang diuji pada ikan Mas Najawa menggunakan teknik RAPD menggunakan enam primer yaitu OPA18, OPB10, OPG5, OPZ2, OPZ5, dan OPZ13. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ikan Mas Najawa memiliki karakteristik genetik yang nyata dibandingkan dengan lima varietas ikan lokal lainnya yaitu Rajadanu, Majalaya, Wildan, Sinyonya, dan Sutisna (DKP Yogyakarta, 2013). Ikan Mas Najawa diketahui memiliki kestabilan genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan lima jenis ikan tersebut, sehingga dapat dibudidayakan sebagai galur murni dan secara resmi dirilis oleh Balai Pengembangan Teknologi Perikanan Budidaya (BPTPB) pada tahun 2014 sebagai strain baru ikan Mas khas daerah Cangkringan, Yogyakarta (Gambar 2d).

Ikan Mas Punten merupakan strain ikan Mas yang saat ini dibudidayakan di Punten, Kota Batu. Seleksi budidaya terhadap ikan Mas strain ini dimulai sejak tahun 1919 dan diperkirakan berakhir pada tahun 1930. Tujuan dari seleksi ini adalah untuk mendapatkan ikan Mas budidaya dengan ciri khas berupa kepala yang kecil, punggung tinggi, pertumbuhan cepat, dan tubuhnya berwarna kehijauan (Ardiwinata, 1981). Galur murni dari ikan ini diketahui telah lama menghilang di habitat aslinya. Ikan yang saat ini dianggap sebagai ikan Mas Punten, meskipun tidak sebenarnya, memiliki tubuh membusur pendek. Ikan Mas Punten tubuh berwarna kehijauan dengan persebaran warna yang hampir merata di seluruh tubuh. Abdomen ikan ini membulat. Sirip berwarna senada dengan tubuh (Gambar 2e). Menurut Yashouv (1955), ikan Mas Punten pernah dikoleksi oleh seorang peneliti Israel pada tahun 1952 untuk kepentingan budidaya ikan tersebut. Usaha pemurnian galur ikan

Mas Punten menjadi penting untuk dilakukan mengingat upaya konservasi di masa yang akan datang.



Gambar 2. Lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) lokal di Indonesia: (a) Koi dan (b) Majalaya (Sumantadinata, 1995), (c) Sinyonya, (d) Najawa (Nugroho dkk., 2015), (e) Punten (Sumantadinata, 1995).

2.3 Keragaman Genetik pada DNA

2.3.1 DNA (*Deoxiribonucleic Acid*)

Deoxyribonucleic acid atau yang sering dikenal sebagai DNA merupakan molekul yang membawa informasi genetik yang menginstruksikan pembentukan protein untuk pertumbuhan, perkembangan, fungsi fisiologis, reproduksi, dan semua aktivitas sel yang lain pada semua jenis organisme dan beberapa jenis virus. Sebagai materi genetik, DNA maupun RNA (*Ribose Nucleic Acid*) termasuk sebagai makromolekul esensial untuk kehidupan suatu sel. Molekul DNA terdiri dari dua pita biopolimer yang menggulung satu sama lain membentuk struktur yang disebut heliks (Alberts dkk., 2014). Pita DNA disebut sebagai polinukleotida karena disusun oleh

repository.ub.ac.id

satuan monomer yang disebut nukleotida (Purcell, 2014). Setiap nukleotida tersusun dari empat basa nukleotid yang terdiri dari Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C), dan Timin (T), rantai ribosa atau gula dan kelompok fosfat. Nukleotida terikat satu sama lain oleh ikatan kovalen antara molekul gula pada satu jenis basa nukleotida dan satu gugus fosfat, yang keduanya membentuk kerangka gula-fosfat. Masing-masing pita akan menempel dengan satu pita DNA dengan aturan perngikatan basa nukleotida (A berikatan dengan T dan C berikatan dengan G) satu sama lain dengan memanfaatkan adanya ikatan hidrogen untuk membentuk *double stranded* DNA (dsDNA) (Russel, 2001).

Untai DNA berperan dalam menyimpan berbagai informasi genetik yang dikemas dalam bentuk sekuen basa nukleotida yang unik. Kerangka dari DNA merupakan molekul yang resisten terhadap proses degradasi oleh protein di dalam sel, dan dua pita *double stranded* masing-masing menyimpan informasi genetik yang sifatnya sama. Informasi genetik tersebut akan mengalami replikasi ketika pita saling terpisah satu sama lain. Meskipun menyimpan informasi genetik yang penting, DNA pada manusia khususnya, merupakan *non coding sequences* yang tidak menghasilkan protein apapun pada saat terjadinya transkripsi dan translasi. Proses transkripsi pada akhirnya akan menghasilkan pita RNA yang dapat diterjemahkan di luar nukleus menjadi asam amino spesifik oleh ribosom dengan tujuan utama yaitu pembentuk protein (Mashaghi dan Katan, 2013).

Materi genetik pada sel-sel eukariotik terorganisir rapi membentuk struktur yang disebut kromosom. Selama berlangsungnya pembelahan sel, kromosom mengalami duplikasi pada proses yang disebut replikasi DNA. Proses ini menghasilkan jumlah materi genetik yang sama pada sel baru (Mashaghi & Katan, 2013). Organisme eukariotik (sel hewan, tumbuhan, fungi, dan protista) menyimpan sebagian besar dari materi genetiknya di dalam inti sel dan beberapa organel lain seperti kloroplas dan mitokondria. Hal tersebut kontras dengan sel-sel prokariotik yang menyimpan materi genetiknya pada sitoplasma. Protein lain di dalam sel sangat berperan terhadap kontrol dari DNA yaitu histon. Histon membantu mengontrol segmen DNA yang sedang melakukan transkripsi (Irobaileva dkk., 2015).

repository.ub.ac.id

Isolasi DNA pertama kali dilakukan oleh Friedrich Miescher pada tahun 1869. Struktur molekul ini kemudian diidentifikasi oleh James Watson dan Francis Crick pada Laboratorium Cavendish di Universitas Cambridge pada tahun 1953 dengan sebuah model yang diperoleh dari penembakan sinar-X terdifraksi. Data diperoleh dari Raymond Gosling yang mempublikasikannya secara detail. DNA sat ini telah banyak digunakan oleh peneliti sebagai alat untuk mempelajari teori penurunan sifat, manipulasi genetik, pembuatan obat, dan identifikasi spesies (Gregory dkk., 2006).

2.3.2 Marka molekuler pada DNA

Ilmu pengetahuan dan teknologi sebagai ilmu empiris saat ini mengalami perkembangan sangat pesat. Perkembangan tersebut menghasilkan suatu tren analisis yang lebih akurat dan menyeluruh, yaitu secara molekuler. Analisis yang dilakukan secara molekuler kini merupakan suatu era genomik dengan berbagai manfaat aplikatif serta memiliki presisi tingkat tinggi. Perkembangan analisis tersebut juga meningkatkan kemampuan dalam studi komparasi variasi antar organisme atau disebut juga sebagai polimorfisme. Teknik amplifikasi DNA yang dikembangkan sejak tahun 1985 yaitu Thermacycler mengalami puncak popularitas bersama dengan dikembangkannya mesin DNA *sequencer*. Teknologi tersebut dirancang untuk memudahkan juga untuk menekan biaya penelitian, sehingga para peneliti pada saat itu mulai mencari marka molekuler yang dapat dengan mudah, efektif, dan spesifik untuk menggali informasi genetik. Inovasi tersebut kemudian digunakan untuk melakukan pengujian genom yang dilakukan berdasarkan suatu struktur molekul spesifik atau yang lebih dikenal sebagai marka molekuler (*molecular marker*).

Marka molekuler pada dasarnya terdiri dari dua jenis yaitu DNA nukleus dan mitokondria (mtDNA), dilihat berdasarkan dari dinamika evolusioner dari kedua molekul tersebut (Park & Mooran, 1994). Penggunaan marka molekuler pada dasarnya merupakan proses karakterisasi menggunakan molekul pada sel yang dikembangkan lebih lanjut untuk proses identifikasi, klasifikasi, kontrol, serta eksploitasi suatu organisme (Dorado dkk., 2015). Awal dari penggunaan teknologi ini adalah karakterisasi berdasarkan

peptida yaitu isoenzim yang dilakukan oleh Allison pada tahun 1954. Perkembangan ini selanjutnya dilakukan dengan penggunaan molekul DNA (DNA *fingerprinting*) yang dianalisis dengan menggunakan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) hingga saat ini berkembang pada penggunaan miRNA dan siRNA untuk mendapatkan *full genome* dari suatu organisme yang kemudian dikembangkan dalam analisis suatu kelainan, penyakit, serta keragaman genetik dari suatu populasi biologi.

Teknologi analisis molekuler saat ini telah mampu meningkatkan jumlah marka-marka molekuler yang dapat digunakan untuk memecahkan permasalahan berkaitan dengan variasi di tingkat mikroevolusioner pada sekuen DNA. Salah satu marka molekuler yang cukup menyita perhatian pada peneliti di bidang genomik adalah polimorfisme yang sangat tinggi pada sejumlah sekuen DNA di lokus kromosom. Marka molekuler tersebut dikenal sebagai *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR). VNTR merupakan segmen dari DNA yang berulang dan mampu menunjukkan variasi pada jumlah perulangan sekuen tersebut pada DNA (Burke dkk., 1991). Sebelumnya, penelitian terhadap sekuen VNTR hanya dilakukan pada populasi manusia. Namun, seiring berjalannya waktu penelitian dikembangkan pada populasi vertebrata. Sekuen VNTR memiliki laju mutasi yang cukup tinggi sehingga lokus-lokusnya kaya akan alel yang dapat dipergunakan sebagai marka molekuler. Sekuen VNTR diperkirakan cukup sensitif terhadap perubahan yang terjadi pada suatu populasi berkaitan dengan ukuran, struktur, dan laju persebaran (Scribner dkk., 1994). Sekuen tersebut kemudian digunakan sebagai marka molekuler yang berguna dalam menjawab pertanyaan dan permasalahan di tingkat ekologi dan evolusi suatu populasi. Sekuen yang termasuk ke dalam kelompok marka VNTR adalah minisatelit dan mikrosatelit.

Sekuen VNTR telah menyita banyak perhatian peneliti di bidang biologi molekuler. Sekuen VNTR banyak diteliti karena memiliki perulangan segmen dari DNA yang kemudian dikelompokkan menjadi tiga macam berdasarkan penurunan ukurannya, yaitu satelit, minisatelit, dan mikrosatelit (Tautz, 1989). Satelit merupakan segmen DNA yang berisi ratusan pasang basa nukleotida dan diulang ratusan hingga jutaan kali. Minisatelit berisi sekuen DNA yang terdiri dari 9-100 bp yang diulang sebanyak 2-100 kali pada suatu

lokus. Minisatelit pertama kali ditemukan pada lokus gen insulin manusia dengan berat molekul antara 10-64 bp dan sekuen ini dikenal juga sebagai *simple sequence repeat* (SSR) (Tautz, 1989) atau disebut juga *short tandem repeat* (STR) (Edwards dkk., 1991). Namun, diantara ketiga jenis VNTR tersebut, mikrosatelit merupakan sekuen yang paling banyak digunakan untuk studi genetika populasi.

Mikrosatelit merupakan pola perulangan basa nukleotida yang berat molekulnya 1-6 bp dengan perulangan beberapa kali di dalam genom. Mikrosatelit dapat tersusun atas di-, tri-, maupun tetranukleotida yang unik dan bersifat *nonrepetitive* (Tautz, 1989). Mikrosatelit berada di dalam genom sel dalam jumlah yang melimpah. Sekuen pada mikrosatelit sangat mudah mengalami mutasi dan prosesnya diyakini bukan merupakan mutasi basa tunggal atau *point mutation* (Ellegren, 2004). Laju mutasi yang tinggi pada mikrosatelit menunjukkan bahwa mutasi pada sekuen tersebut bukan merupakan kejadian yang spesial atau hanya terjadi karena simultan tertentu (Pennings & Hermisson, 2006), melainkan lebih mengarah kepada mutasi yang sifatnya netral.

Mikrosatelit dikenal sejak lama sebagai variasi genetik yang mayoritas tidak fungsional. Namun, beberapa peneliti menyakini bahwa meskipun tidak berperan sebagai gen fungsional, mikrosatelit tetap menunjukkan adanya sifat yang berkorelasi dengan ekspresi suatu gen (Rockman & Wray, 2002). Variasi basa nukleotida pada mikrosatelit diketahui berpengaruh pada ekspresi gen pada beberapa studi, misalkan pada bakteri patogenik dengan mutasi pada mikrosatelit suatu *open reading frame* (ORF) akan menghasilkan perbedaan fenotif (Moxon dkk., 1994), kemudian toleransi kekeringan pada tanaman Barley (Nevo dkk., 2005). Beberapa mikrosatelit juga menghasilkan varian yang bersifat membahayakan sehingga dihilangkan dengan serangkaian regulasi di dalam sel. Misalkan pada variasi mikrosatelit yang menyebabkan beberapa kelainan saraf pada manusia (Orr & Zoghbi, 2007). Mikrosatelit dikembangkan sebagai marka molekuler yang dapat berperan dalam rekonstruksi dan pemetaan genetik pada suatu populasi organisme. Pemetaan genetik dari suatu populasi dapat disusun berdasarkan analisis polimorfisme pada lokus tunggal dengan alel heterozigot yang terekspresi secara kodominan (Muneer dkk., 2009).

2.4 Studi Genomik Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Berdasarkan Marka Molekuler DNA Mikrosatelit

Budidaya ikan Mas merupakan komoditas yang menjanjikan di perairan Indonesia. Hal ini mendorong para petani ikan untuk terus melakukan budidaya baik dengan metode pemeliharaan alami maupun domestikasi dan kawin silang dengan harapan mendapatkan kualitas ikan Mas dengan karakter yang diinginkan. Ikan Mas yang dipilih oleh para petani ikan melalui serangkaian seleksi karakter. Hal ini merupakan salah satu penyebab menurunnya variabilitas genetik dari ikan Mas yang diperkirakan telah terjadi secara berkepanjangan (Balon, 1995b) dan variabilitas dari strain hasil budidaya belum banyak diketahui secara pasti.

Variabilitas genetik pada ikan Mas sudah sejak lama menjadi topik penelitian yang menarik. Beberapa marka molekuler dipergunakan untuk mengetahui polimorfisme dari materi genetik yang dimiliki oleh organisme tersebut, misalkan pada usaha pemuliaan ikan Mas yang dilakukan seleksi berdasarkan gen pengkode protein *Major Histocompatibility Complex* (MHC). Penelitian dan analisis menggunakan marka molekuler ini dikembangkan berdasarkan pengetahuan mengenai sistem pertahanan ikan budidaya terhadap serangan suatu penyakit. Polimorfisme gen dan molekul MHC menyebabkan diversitas alel yang sangat tinggi pada populasi ikan. Tingginya polimorfisme gen MHC pada kelompok ikan tersebut diperkirakan sebagai bukti evolusioner terjadinya seleksi akibat serangan parasit (Penn dkk., 2002; Mays & Hill, 2004; dan Milinski, 2006).

Studi genetika populasi ikan Mas sebagian besar dilakukan menggunakan marka molekuler tradisional seperti allozim (Macarans dkk., 1986; Sumantadinata & Taniguchi, 1990) dan DNA mitokondria yang baru dilakukan pada tahun 1999 oleh Davis hingga tahun 2003 oleh Bartfai. Beberapa dari penelitian lain berusaha menganalisis hubungan kekerabatan antar strain dari ikan Mas yang telah berhasil dibudidayakan di setiap daerah yang dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis marka molekuler, yaitu AFLP, dan PCR-RLFP untuk mengamplifikasi gen-gen yang berasal dari mitokondria. Studi populasi menggunakan marka molekuler yang

spesifik kemudian dikembangkan lebih lanjut, salah satunya menggunakan mikrosatelit oleh Kohlman pada tahun 1997.

Marka molekuler mikrosatelit dikembangkan untuk penelitian pada berbagai organisme dengan tujuan yang beragam. Mikrosatelit diturunkan dari induk ke keturunan selanjutnya mengikuti hukum Mendel dan secara kodominan. Penelitian menggunakan marka molekuler telah banyak dilakukan pada zebrafish (*Brachydanio rerio*; Knapik dkk., 1998), *Japanese pufferfish* (*Fugu rubripes*; Edwards dkk., 1998), Nila (*Oreochromis niloticus*, Kocher dkk., 1998), Salmon (*Oncorhynchus* spp.; Slettan dkk., 1993), dan Lele (*Ictalurus* spp.; Liu dkk., 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Croojimans sejak 1997 hingga 2003, diketahui telah berhasil mengembangkan 32 mikrosatelit pada ikan Mas (David dkk., 2001). Mikrosatelit pada studi populasi ikan Mas diketahui dapat digunakan untuk mempelajari *mapping and monitoring* diversitas genetik antar varietas ikan Mas (Tanck dkk., 2000; David dkk., 2001; Lehoczky dkk., 2002; Bartfai dkk., 2003; Kohlmann dkk., 2003).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian “Keragaman Genetik Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) berdasarkan Marka DNA Mikrosatelit” dilaksanakan pada bulan November 2017 – Mei 2018. Pengambilan sampel lima strain ikan Mas dilakukan di Unit Pengelola Budidaya Ikan Air Tawar, Punten, Kota Batu pada bulan Oktober 2017. Ekstraksi, amplifikasi mikrosatelit, dan analisis data dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Studi literatur dilakukan untuk memperoleh dan mempelajari informasi yang berhubungan dengan karakter fenotip maupun genotip dari ikan Mas, metode preservasi sampel dan DNA, ekstraksi mikrosatelit, dan uji kualitatif yang diperlukan setelah ekstraksi dilakukan.
2. Pengambilan sampel jaringan dari lima strain ikan Mas, serta pengumpulan data urutan basa nukleotida pada primer yang akan digunakan untuk mengamplifikasi mikrosatelit pada ikan tersebut.
3. Preservasi sampel jaringan dari lima strain ikan Mas yang diperoleh saat *sampling* di Unit Pengelola Budidaya Ikan Air Tawar, Punten, Kota Batu, bertujuan untuk mendapatkan jaringan yang mengandung mikrosatelit dari ikan Mas yang dibudidayakan di lokasi tersebut.
4. Ekstraksi DNA dari sampel jaringan dari lima strain ikan Mas bertujuan untuk mendapatkan DNA murni dari ikan Mas yang digunakan sebagai sampel.
5. Amplifikasi segmen DNA yang termasuk sebagai mikrosatelit menggunakan sepuluh primer spesifik. Efektifitas dari proses ini dibantu dengan metode PCR gradien.
6. Analisis data.

3.3 Preservasi Sampel Jaringan Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Ikan Mas diambil dari Unit Pengelola Budidaya Ikan Air Tawar, Punten, Kota Batu pada bulan Oktober 2017. Ikan Mas hasil *sampling* diambil jaringan ototnya kemudian dimasukkan pada *microtube* 1,5 ml berisi etanol absolut untuk menjaga keutuhan selnya hingga ekstraksi DNA dilakukan. Sampel jaringan otot tersebut disimpan pada suhu -20°C di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan, Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya.

3.4 Isolasi DNA Mikrosatelit

3.4.1 Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan kit ekstraksi TIANGEN sesuai dengan standar protokol kit. Langkah pertama adalah persiapan sampel dari jaringan ikan yaitu otot ikan Mas. Sampel jaringan otot diambil sebanyak 10 mg menggunakan gunting dan pinset yang telah dibersihkan dari residu dengan menggunakan etanol absolut. Sampel jaringan dimasukkan pada *tube* 1,5ml. Tahapan selanjutnya yaitu persiapan lisis membran sel, yaitu dengan ditambahkan ke dalam *tube* buffer GA sebanyak 200 μl dan Proteinase K ditambahkan sebanyak 20 μl , dihomogenkan dengan vortex selama 15 detik. Penambahan Proteinase-K bertujuan untuk mendegradasi protein dan RNA. Larutan kemudian diinkubasi pada *waterbath* suhu 56°C hingga lisis secara keseluruhan. Proses tersebut berlangsung selama satu jam dengan setiap 30 menit inkubasi, sampel dihomogenasi dengan vortex. Sampel jaringan yang telah lisis kemudian dimasukkan pada alat *spindown*.

Tahapan selanjutnya yaitu proses untuk menyesuaikan kondisi optimal pengikatan DNA. Tahapan ini dilakukan dengan penambahan *buffer* GB sebanyak 200 μl pada larutan sampel, dihomogenasi dengan vortex selama 15 detik. Sampel larutan kemudian diinkubasi pada *waterbath* suhu 70°C selama 10 menit. Sampel kemudian dimasukkan pada alat *spindown*. Sampel selanjutnya ditambahkan dengan etanol 96-100% sebanyak 200 μl dan dihomogenasi dengan menggunakan vortex selama 15 detik.

Tahapan selanjutnya adalah penempelan dan pengikatan DNA. Semua sampel pada *tube* dipindahkan ke *Spin Column CB3* dan dipasang pada *collection tube* 1,5 ml. *Tube* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik.

Tahapan selanjutnya dari proses ini adalah pencucian membran silika. Pencucian dilakukan dengan membuang *collection tube* hasil sentrifugasi dan diganti dengan *collection tube* yang baru. *Wash buffer* PW ditambahkan sebanyak 600 μ l pada *spin column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Proses ini diulang sebanyak dua kali dengan sentrifugasi akhir yakni pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dan *collection tube* kemudian dibuang. *Spin column* diletakkan pada *collection tube* 1,5 ml baru. *Wash buffer* TE ditambahkan sebanyak 200 μ l, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 menit. Larutan tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Proses tersebut akan menyebabkan DNA tersaring pada membran *spin column*, sementara kontaminan akan terkumpul pada *collumn tube*.

Supernatan sebagai hasil dari proses ini kemudian disimpan pada suhu -20°C dan digunakan pada proses amplifikasi sekuen DNA mikrosatelit. Kit TIANGEN diketahui memiliki nilai absorbansi purifikasi DNA pada panjang gelombang 260nm/280nm dengan rasio kemurnian 1,7-1,9.

3.4.2 Uji kualitatif sampel DNA

Uji kualitatif dilakukan melalui metode elektroforesis *whole genome* dengan gel agarosa 1%. Bubuk agarosa 1% diambil 0,35 gram dan *buffer Tris-Boric-EDTA* (TBE) 35 ml kemudian dicampurkan pada tabung erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup *plastic wrap* dan dilubangi kemudian dipanaskan pada *microwave* sampai larutan mendidih, ditunggu hingga suhu turun, kemudian Etidium Bromida (EtBr) dimasukkan sebanyak 2 μ l pada larutan agarosa yang suhunya telah mencapai kurang lebih 40°C. Larutan agar dituang pada cetakan dengan sisir terpasang, ditunggu hingga mengeras. Sisir dilepas, gel dimasukkan pada *chamber* yang terendam *buffer* TE pH 8. Parafilm dipasang pada meja yang telah steril, dicampurkan *loading dye* dengan DNA (1:1) kemudian dimasukkan

kedalam masing-masing sumuran sesuai dengan *running map*. *Marker* yang digunakan adalah *DNA ladder* 100 bp yang diletakkan pada sumuran pertama. Elektroda dipasang dengan daya 90V selama 30 menit.

Gel hasil elektroforesis diambil dari *chamber* elektroforesis untuk dilakukan dokumentasi hasil elektroforesis *whole genome*. Hasil gel diamati dan didokumentasikan pada Gel Doc UV-Transluminator. Gel Doc dibersihkan dengan alkohol sebelum digunakan, dilap dengan tisu kemudian gel diletakkan di atas plat dengan diusahakan tidak menyebabkan terbentuknya gelembung di dasar gel. Tombol ON ditekan dan didokumentasikan menggunakan kamera.

3.4.3 Amplifikasi Sampel DNA Mikrosatelit

Isolat DNA yang telah diekstraksi sebelumnya kemudian diamplifikasi dengan menggunakan PCR. Primer *forward* dan *reverse* yang digunakan diadaptasi dari beberapa literatur yang dapat dilihat pada Tabel 1. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *thermocycling*. PCR *mix* yang digunakan adalah *Go Taq Green 2x*. Komposisi sampel PCR adalah ddH₂O 3,6 µl; *Go Taq Green 2x* 5µl; primer forward 0,2 µl, primer reverse 0,2 µl, dan sampel DNA sebanyak 1 µl.

Mikrosatelit diamplifikasi sebanyak 35 siklus. Program PCR yang digunakan adalah predenaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealling* sesuai pada tabel masing-masing, selama 45 detik, ekstensi 72°C selama 90 detik, dan post ekstensi 72°C selama 10 menit. Siklus tersebut diulang sebanyak 35 kali. Uji kualitatif kembali dilakukan untuk mengetahui hasil amplifikasi. Uji kualitatif dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarose 2% sehingga segmen DNA akan terpisah berdasarkan berat molekulnya.

Efektifitas dari pengerjaan metode ini dibantu dengan metode PCR gradien. PCR gradien dilakukan dengan mengamplifikasi setiap marka molekuler menggunakan delapan suhu *annealling* berbeda dalam satu kali *running* (35 kali dalam satu siklus). PCR *mix* yang digunakan adalah *Go Taq Green 2x*. Komposisi sampel PCR adalah ddH₂O 3,6 µl; *Go Taq Green 2x* 5µl; primer forward 0,2 µl, primer reverse 0,2 µl, dan sampel DNA sebanyak 1 µl. Sampel DNA yang digunakan dalam proses PCR gradien merupakan sampel DNA dari kelima strain ikan Mas yang digunakan, masing-masing sampel

digunakan untuk satu kali PCR gradien. Delapan suhu *annealing* yang digunakan antara lain 61°C, 604°C, 59.3°C, 57.3°C, 54.9°C, 53°C, 51.7°C, dan 51°C. Hasil amplifikasi DNA mikrosatelit dari sampel yang digunakan dapat diamati dengan uji kualitatif dilakukan melalui metode elektroforesis pada gel agarosa 1%.

Tabel 1. Primer mikrosatelit untuk analisis keragaman genetik pada ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Lokus	Sekuen Primer (5'-3')	Motif	Ukuran Produk (bp)	Suhu <i>Annealing</i> (°C)
MFW1*	F: GTCCAGACTGTCATCAGGAG R: GAGGTGTACTGAGTCACGC	(CA) _n ^a	212	55
MFW2*	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	(CA) _n ^a	200	55
MFW9*	F: GATCTGCAAGCATATCTGTCTG R: ATCTGAACCTGCAGCTCCTC	(CA) _n ^a	117	55
MFW15*	F: ATGATGAGAACATTGTTTACAG R: TGAGAGACAATGTGGATGAC	(CA) _n ^a	184	50
MFW16*	F: GTCCATTGTGTCAAGATAGAG R: TCTTCATTTCAAGCTGCAAAG	(CA) _n ^a	171	55
CCA30**	F: CTGCCTTCTTCTACTCTACAC R: TTGCCTCTAAGCTTGATTTT	(GT) ₁₈ (GA) ₂₀	260-318	50
Cca02***	F: ATGCAGGGCTCATGTTGCTCATA R: GCAGACAGACACGTTGCTCTCG	(TA) ₂₀	173-194	50
Cca04***	F: ATCCCTTACCGCCTGTGT R: AGCTGAAAAACGCTGTACGC	(TA) ₂₄	224-258	50
Cca24***	F: AAATTTTCAAGACTGGGTGGTT R: ACAGCAAGATGACAAAATGAGTG	(TA) ₃₄	210-252	50
Cca72***	F: CAGGCCAGATCTATCATCATCAA R: CTGCTGTTGGATGCACTACATC	(GATA) ₉	244-299	55

Keterangan:

* : Primer didesain oleh Crooijmans, dkk. (1997)

** : Primer didesain oleh David dkk. (2001) dan Aliah, dkk. (1999)

*** : Primer didesain oleh Yue dkk. (2003)

3.5 Analisis Data

3.5.1 Scoring alleles

Proses *genotyping* diawali dengan menentukan panjang fragmen pita yang teramati pada agarosa 1%. Pita tersebut merepresentasikan alel hasil amplifikasi lokus mikrosatelit. Sumuran gel dianggap sebagai titik nol dari panjang fragmen pertama yang muncul pada

pita *marker*. *Marker DNA Ladder* yang digunakan memiliki panjang 100-3000 bp, terdiri dari 12 fragmen atau pita dengan panjang fragmen spesifik. Pita yang teramati pada gel agarosa 1% dicatat dan diukur jaraknya dari sumuran gel, dan dikonversikan menjadi panjang fragmen (bp) menggunakan kurva standar dari *marker DNA Ladder*.

3.5.2 Analisis jumlah, frekuensi, dan heterozigositas alel

Heterozigositas dari alel dianalisis berdasarkan parameter: alel yang teramati (N_a) dari lokus-lokus yang diamplifikasi, bersama dengan jumlah alel efektif (N_e), dan jumlah nilai heterozigositas yang diharapkan (H_e) dihitung menggunakan software GenAlex 6.503 (Peakall dkk., 2012). Panjang fragmen tiap lokus diuji menggunakan uji analisis varian. Uji ini dilakukan untuk membandingkan panjang fragmen rata-rata dari DNA mikrosatelit yang dimiliki oleh setiap strain ikan Mas yang digunakan dalam penelitian ini. Analisis variasi molekuler dari DNA mikrosatelit dianalisis menggunakan *software* GenAlex 6.503 yang menggunakan parameter F_{st} (diantara populasi), F_{is} (antar strain diantara populasi) dan F_{it} (antar strain).

3.5.2 Analisis hubungan kekerabatan

Hubungan kekerabatan berdasarkan nilai jarak genetik (*genetic distance*) dan diferensiasi genetik (*genetic differentiation*) pada kelima strain ikan Mas dianalisis menggunakan *software* POPGENE 1.32 (Yeh dkk., 1999) dengan simulasi 1000 data sampel. Nilai yang diperoleh digunakan untuk mengkonstruksi dendrogram dengan metode UPGMA. Rekonstruksi dendrogram dengan metode *UPGMA based Nei's (1978) Genetic distance* yang dimodifikasi dari *software NEIGHBOR Procedure of PHYLIP 3.5* divisualisasi dengan bantuan *software* MEGA7.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Heterozigositas Alel Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

4.1.1 Nilai variasi alel (N_a), jumlah alel efektif (N_e), heterozigositas observasi (H_o) dan ekspektasi (H_e)

Sepuluh pasang primer mikrosatelit yang digunakan dalam penelitian ini diketahui dapat merepresentasikan dengan baik keragaman lokus ataupun heterozigositas alel pada lima strain ikan Mas di Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini. Lokus-lokus penunjuk yang digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai heterozigositas merupakan lokus yang spesifik dan sangat direkomendasikan sebagai marka mikrosatelit untuk menganalisis diversitas genetik dari populasi ikan Mas (Yue dkk., 2004). Semua lokus mikrosatelit yang teramplifikasi pada sampel DNA ikan Mas bervariasi untuk setiap strain. Alel tersebut dapat diamati pada setiap fragmen DNA yang memiliki berat molekul berbeda untuk masing-masing lokus yang diamplifikasi (Lampiran 1).

Heterozigositas genetik yang ditunjukkan oleh banyaknya alel yang teramplifikasi merupakan salah satu parameter untuk analisis keragaman genetik dan menjadi target utama dalam penelitian ini. Secara singkat, heterozigositas dapat dijelaskan berdasarkan banyak sedikitnya variasi genetik yang muncul dalam suatu populasi. Pengukuran heterozigositas dilakukan berdasarkan variasi alel atau *fragmen size* dari DNA mikrosatelit yang diamplifikasi sesuai dengan sepuluh lokus yang digunakan. Heterozigositas alel pada penelitian ini dapat diamati untuk setiap strain. Heterozigositas alel pada penelitian ini dilihat berdasarkan beberapa karakter, yaitu banyaknya variasi alel (N_a), jumlah alel efektif atau unik antar strain/populasi (N_e), heterozigositas observasi (H_o), dan heterozigositas ekspektasi (H_e).

Keragaman genetik pada ikan Mas strain Sinyonya berdasarkan sepuluh lokus yang digunakan, menunjukkan bahwa pada strain tersebut terdapat beberapa variasi alel yang khas (Tabel 2). Variasi tersebut adalah jumlah variasi alel tertinggi terdapat pada lokus MFW1, sementara nilai terendah pada lokus CCA30 dan Cca72. Lokus tersebut menunjukkan bahwa pada strain Sinyonya, variasi

alelnya tidak cukup tinggi. Berdasarkan nilai heterozigositas observasi lokus MFW16, menunjukkan nilai 0,8 yang merupakan nilai tertinggi dari sepuluh lokus yang digunakan dalam penelitian ini. Nilai tersebut tidak berbanding lurus dengan nilai heterozigositas tertinggi yang ditunjukkan pada lokus MFW1. Hal ini diketahui berbeda untuk strain kedua, yakni strain Punten. Ikan Mas strain Punten memiliki nilai Na, Ne, Ho, dan He yang tertinggi pada lokus MFW1. Variasi alel efektif pada strain Punten dinilai cukup tinggi yakni sebesar 3,85 dan merupakan nilai tertinggi diantara lima strain tersebut.

Variasi alel yang terdapat pada strain ketiga, Majalaya, menunjukkan nilai yang lebih rendah. Strain ini memiliki nilai Na tertinggi pada lokus MFW1 dan MFW15 dengan nilai 4,00. Variasi alel efektif tertinggi pada lokus MFW1 dengan nilai 2,94. Nilai ini menunjukkan bahwa strain Majalaya memiliki variasi alel terendah diantara kelima strain. Hal ini juga dapat dibuktikan dengan lebih rendahnya nilai heterozigositas observasi pada nilai heterozigositas ekspektasi tertinggi, yaitu pada lokus MFW15. Strain keempat yakni Koi, menunjukkan variasi alel yang baik, dengan perbandingan lurus untuk nilai tertinggi pada jumlah variasi alel, alel efektif, heterozigositas observasi, maupun ekspektasi. Variasi alel tertinggi tersebut ditemukan pada lokus MFW9. Strain ini menunjukkan bahwa nilai heterozigositas observasi dan ekspektasi berada pada nilai yang hanya berselisih 0,2. Nilai tersebut merepresentasikan variasi alel yang cukup baik pada lokus dan strain yang digunakan pada penelitian. Lokus MFW9 juga menjadi lokus dengan nilai variasi alel tertinggi pada strain kelima, Najawa. Strain tersebut menunjukkan bahwa variasi alel efektif sebesar 3,85 dengan nilai maksimal heterozigositas sebesar 1,00 pada lokus yang berbeda, yaitu MFW16. Namun, nilai heterozigositas ekspektasi sebesar 0,74 ditunjukkan oleh lokus MFW9.

Heterozigositas merupakan karakter penting dalam menganalisis keragaman genetik dari suatu individu di dalam populasi. Heterozigositas mendefinisikan bahwa suatu individu cenderung memiliki genotip variatif dan dapat dinyatakan cenderung heterozigot. Heterozigositas yang berhasil diamati dari kelima strain ikan Mas dalam penelitian ini memiliki nilai yang dapat digunakan untuk memprediksi kondisi atau struktur populasi ikan Mas yang

selama bertahun-tahun dibudidayakan di Indonesia. Secara teori, diberikan contoh bahwa pada nilai heterozigositas yang rendah untuk populasi *cheetah* berdasarkan lokus alloenzim, mengindikasikan bahwa populasi fauna tersebut terlalu kecil sehingga sangat beresiko mengalami reduksi variasi genetik yang dapat berdampak kepunahan apabila berlangsung dalam jangka waktu yang lama (Pennings & Hermisson, 2006). Meskipun demikian, pernyataan tersebut tidak sepenuhnya dapat dikorelasikan dengan variasi genetik pada kelompok fauna secara umum, dikarenakan stabilitas komponen materi genetik pada kelompok mamalia jauh lebih baik dibandingkan dengan fauna pada taksa yang lebih rendah.

Penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa nilai heterozigositas observasi diketahui lebih tinggi nilainya dibandingkan dengan heterozigositas ekspektasi. Nilai heterozigositas observasi pada strain Punten, Majalaya, dan Koi memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan heterozigositas ekspektasinya. Hal ini berbeda dengan dua strain lainnya yaitu Sinyonya dan Najawa yang merupakan strain ikan Mas budidaya khas di daerah Jawa Tengah. Kedua strain tersebut memiliki nilai heterozigositas observasi yang lebih rendah dibandingkan dengan heterozigositas ekspektasinya. Hal ini diperkirakan dipengaruhi oleh jumlah populasi strain tersebut yang tidak terlalu banyak populasinya di alam, dibandingkan dengan strain Punten, Majalaya, dan Koi. Kedua strain tersebut secara berkelanjutan dibudidayakan di daerah Jawa Tengah sebagai komoditi konsumsi, namun diketahui tidak terlalu diminati dibudidayakan karena cukup sulit dalam pembenihan. Hal ini juga dipengaruhi oleh adanya ketidakcocokan ikan Mas strain Sinyonya dan Najawa untuk dibudidayakan di kawasan lain. Najawa, sebagai strain baru dan hingga saat ini masih menjadi penelitian dalam upaya pemuliaan.

Menurut Tambasco (2003), apabila suatu populasi memiliki nilai heterozigositas observasi yang lebih tinggi dari heterozigositas ekspektasinya, maka perlu dicermati bahwa populasi tersebut dapat terindikasi telah mengalami *inbreeding*. Analisis populasi genetik mengindikasikan terjadinya *inbreeding* karena defisiensi heterozigot dan deviasi dari *Hardy-Weinberg Equilibrium* yang tinggi, diimbangi dengan nilai *Fis* ($Fis = (\text{rerata } H_e - \text{rerata } H_o) / \text{rerata } H_e$) yang positif, adalah parameter yang cukup jelas untuk menggambarkan

konsekuensi dari peristiwa *bottleneck* dan menurunkan kecocokan reproduktif dalam populasi tersebut (Padhi & Mandal, 2000). Tambasco (2003) juga menambahkan bahwa pada suatu populasi dengan nilai heterozigositas observasi yang lebih rendah dari heterozigositas ekspektasi, dengan perbedaan nilai yang signifikan, dapat mengindikasikan adanya potensi ketidakseimbangan baik struktur maupun jumlah populasi tersebut.

Heterozigositas genetik lima strain ikan Mas berdasarkan marka mikrosatelit pada penelitian ini menunjukkan hasil yang kurang polimorfik. Hal ini dikarenakan beberapa lokus yang diperkirakan sebagai lokus polimorfik, yakni menghasilkan beberapa alel, teramati hanya menunjukkan alel dalam jumlah sedikit, sementara lokus lainnya hanya menghasilkan satu alel setelah diamplifikasi (monomorfik). Penanda lokus yang baik diketahui apabila nilai rata-rata H_e adalah 0,5-0,7 dan/atau 0,7 (Lynch & Walsh, 1998). Nilai H_e yang kurang dari 0,5 dianggap kurang representatif untuk suatu populasi. Variasi alel pada lima strain ikan Mas dapat dilihat dari uji beda rata-rata panjang fragmen alel ($\alpha=0,05$) yang menunjukkan perbedaan signifikan dari seluruh alel yang muncul setelah diamplifikasi menggunakan sepuluh primer DNA mikrosatelit tersebut (Gambar 3).

Setiap lokus yang diamplifikasi untuk masing-masing strain menghasilkan panjang alel yang berkisar 200-400 bp. Variasi alel yang dapat teramati pada penelitian ini tertinggi pada lokus MFW1 dan MFW15 yakni sebanyak 10 alel sementara itu variasi terendah pada lokus Cca02 dan Ccca72 yaitu 3 alel. Lokus MFW1 dan MFW2 merupakan lokus dengan alel yang berkisar antara 100bp hingga 433bp. Lokus tersebut merupakan lokus utama mikrosatelit dengan motif pengulangan yang terdiri dari basa sitosin dan adenin dalam pola penurunan yang bervariasi untuk masing-masing individu. Namun, pola ini sangat sering dijumpai sehingga hingga saat ini dipergunakan untuk menganalisis lokus mikrosatelit pada ikan air tawar yang termasuk ke dalam famili Cyprinidae. Lokus Cca02 dan Cca72 merupakan lokus spesifik dengan pengulangan basa berupa tirosin-adenin dan guanin-adenin-tirosin. Lokus ini merupakan lokus mikrosatelit baru yang digunakan oleh Yue dkk. (2004) berdasarkan *flanking sequence* untuk memperkaya marka mikrosatelit yang selama ini hanya berkisar antara basa sitosin dan adenin.

repository.ub.ac.id

Berdasarkan studi sebelumnya dan penelitian ini, diketahui bahwa lokus tersebut cukup baik digunakan sebagai salah satu marka mikrosatelit spesifik, sehingga marka ini tidak menghasilkan variasi alel yang tinggi.

4.1.2 Frekuensi Alel dan Koefisien *Inbreeding* (Fis) pada Lima Strain Ikan Mas di Indonesia berdasarkan Marka DNA Mikrosatelit

Heterozigositas alel dapat diketahui dengan menganalisis banyaknya alel yang dijumpai untuk setiap lokus yang diamplifikasi menggunakan primer spesifik, atau disebut sebagai frekuensi alel. Lokus yang menghasilkan alel terbanyak yakni MFW1, MFW2, MFW9, dan MFW16. Frekuensi alel pada lima strain ikan Mas yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan nilai yang berkisar 100-333 bp. Lokus pertama, MFW1, menghasilkan sembilan alel dengan frekuensi tertinggi adalah sebesar 167 bp, dengan nilai 0,8 pada strain Najawa. Lokus kedua, MFW2, menghasilkan tujuh alel berkisar 100 bp hingga 267 bp. Alel pada lokus ini memiliki frekuensi alel terbesar yakni 0,6 pada panjang fragmen 133 bp dan 200 bp. Alel tersebut diketahui muncul pada strain Punten dan Majalaya. Lokus MFW9 dan MFW15 memiliki panjang fragmen yang hampir mirip, dengan frekuensi terbesar 0,6 untuk strain Sinyonya, Punten, dan Majalaya. Lokus yang menghasilkan alel paling sedikit yakni Cca02 dengan hanya dua alel dengan panjang fragmen 167 bp dan 200 bp. Frekuensi alel tertinggi pada lokus tersebut bernilai 1.00 pada strain Koi dan Najawa (tabel 3). Nei (1987) mengungkapkan bahwa suatu alel dapat dinyatakan polimorfik apabila memiliki nilai frekuensi $\leq 0,99$. Variasi alel mikrosatelit yang teramati pada penelitian ini menunjukkan bahwa keragaman alel yang dimiliki oleh lima strain ikan Mas di Indonesia cukup tinggi, terutama untuk strain Punten.

Analisis heterozigositas antar strain dilakukan dengan menggunakan parameter *F-stat* (tabel 4). Parameter tersebut merupakan salah satu analisis yang dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan genetik (*genetic differentiation*) dari subpopulasi (Desvignes dkk., 2001). Analisis nilai F_{st} dapat digunakan pula untuk mendapatkan informasi mengenai diversitas

ikan Mas dalam suatu subpopulasi atau strain yang digunakan dalam penelitian ini. Tingginya nilai F_{st} dihasilkan dari kesamaan alel yang ditemukan pada lokus-lokus mikrosatelit yang berhasil diamplifikasi. Seluruh strain menunjukkan perbedaan genetik yang signifikan, yakni nilai F_{st} yang lebih dari 0.01. *Inbreeding coefficient* (F_{is}) merupakan koefisien yang digunakan untuk merepresentasikan kemungkinan adanya dua gen pada suatu lokus untuk tiap individu dari suatu keturunan (Bongers dkk., 1998). Untuk analisis secara keseluruhan, tanpa membedakan antar strain, nilai F_{is} rata-rata yang diperoleh bernilai positif. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar dari strain memiliki kecenderungan *inbreeding*.

Hipotesis fenomena perkawinan tertutup (*inbreeding*) ini muncul berdasarkan aktivitas seleksi karakter para pembudidaya ikan Mas yang hanya menginginkan suatu strain unggulan yang berasal dari perkawinan satu strain yang sama. Kegiatan tersebut dilakukan selama bertahun-tahun dengan tujuan untuk memenuhi komoditas ikan Mas yang paling diminati oleh konsumen domestik maupun manca negara.

Perkawinan tertutup dapat diartikan sebagai proses kawin yang melibatkan individu yang berkerabat dekat dalam satu populasi. Perkawinan tertutup pada ikan merupakan fenomena yang dapat bersifat menguntungkan sekaligus merugikan. Selama proses budidaya, perkawinan tertutup ditujukan untuk mendapatkan keturunan yang memiliki karakter yang diinginkan. Sistem perkawinan tertutup yang dilakukan pada populasi ikan dapat ditujukan untuk mendapatkan karakter fenotip yang seragam dalam satu populasi. Hal ini apabila tidak dikontrol akan secara terus menerus menurunkan heterozigositas suatu gen atau keragaman genetik, meningkatkan kemungkinan alel dengan karakter tidak menguntungkan muncul dan terekspresi secara dominan (Lande, 1994; Lynch & Walsh, 1995) dan dalam keadaan homozigot (Vrijenhoek, 1994).

Nilai rata-rata F_{st} dari seluruh lokus dan lima strain yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 0,43. Nilai ini menunjukkan bahwa variasi molekuler DNA mikrosatelit dari kelima strain ikan Mas tersebut sangat tinggi. Hal ini dapat dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh David dkk. pada tahun 2001 yang menggunakan 41 lokus pada strain ikan Mas hias (Koi) dan

konsumsi yang menghasilkan nilai F_{st} sebesar 0.37. Nilai tersebut dapat menjadi kemungkinan bahwa dalam penelitian ini dihasilkan nilai yang tinggi karena dipengaruhi oleh beberapa kemungkinan dan faktor yang berpengaruh selama penelitian berlangsung. Faktor tersebut dapat berupa jumlah sampel yang digunakan terlalu sedikit dan rendahnya alel polimorfik yang muncul sehingga menyebabkan adanya munculnya nilai tersebut.

Heterozigositas lima strain ikan Mas di Indonesia menggunakan parameter variasi dan frekuensi alel, pada penelitian ini, menunjukkan bahwa diantara kelima strain tersebut, strain Punten memiliki persentase lokus paling polimorfik (Gambar 4). Persentase lokus polimorfik berdasarkan marka DNA mikrosatelit dari strain Punten mencapai 90%, diikuti dengan strain Sinyonya dan Majalaya dengan persentase sebesar 80%.



Tabel 2. Heterozigositas alel pada lima strain ikan Mas di Indonesia

Lokus	Sinyonya (n=5)				Punten (n=5)				Majalaya (n=5)			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
MFW1	5.00	3.13	0.60	0.68	5.00	3.85	1.00	0.74	4.00	2.94	0.60	0.66
MFW2	3.00	2.78	0.00	0.64	3.00	2.27	0.00	0.56	3.00	2.27	0.00	0.56
MFW9	2.00	1.92	0.00	0.48	3.00	2.27	0.40	0.56	2.00	1.92	0.80	0.48
MFW15	3.00	2.27	0.00	0.56	3.00	2.78	0.00	0.64	4.00	3.57	0.00	0.72
MFW16	4.00	2.78	0.80	0.64	4.00	3.33	0.60	0.70	2.00	2.00	1.00	0.50
CCA30	1.00	1.00	0.00	0.00	2.00	1.47	0.00	0.32	2.00	1.47	0.00	0.32
Cca02	2.00	1.47	0.00	0.32	2.00	2.00	1.00	0.50	2.00	1.22	0.20	0.18
Cca04	2.00	1.92	0.80	0.48	2.00	1.72	0.60	0.42	2.00	1.22	0.20	0.18
Cca24	3.00	2.27	0.00	0.56	2.00	1.92	0.00	0.48	1.00	1.00	0.00	0.00
Cca72	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Koi (n=5)				Najawa (n=5)							
MFW1	4.00	2.38	0.20	0.58	2.00	1.47	0.00	0.32				
MFW2	3.00	2.78	0.00	0.64	4.00	3.57	0.00	0.72				
MFW9	5.00	4.55	0.80	0.78	5.00	3.85	0.60	0.74				
MFW15	2.00	1.47	0.00	0.32	4.00	3.57	0.00	0.72				
MFW16	3.00	1.85	0.60	0.46	2.00	2.00	1.00	0.50				
CCA30	2.00	1.92	0.00	0.48	1.00	1.00	0.00	0.00				
Cca02	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00				
Cca04	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00				
Cca24	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00				
Cca72	1.00	1.00	0.00	0.00	2.00	1.47	0.00	0.32				

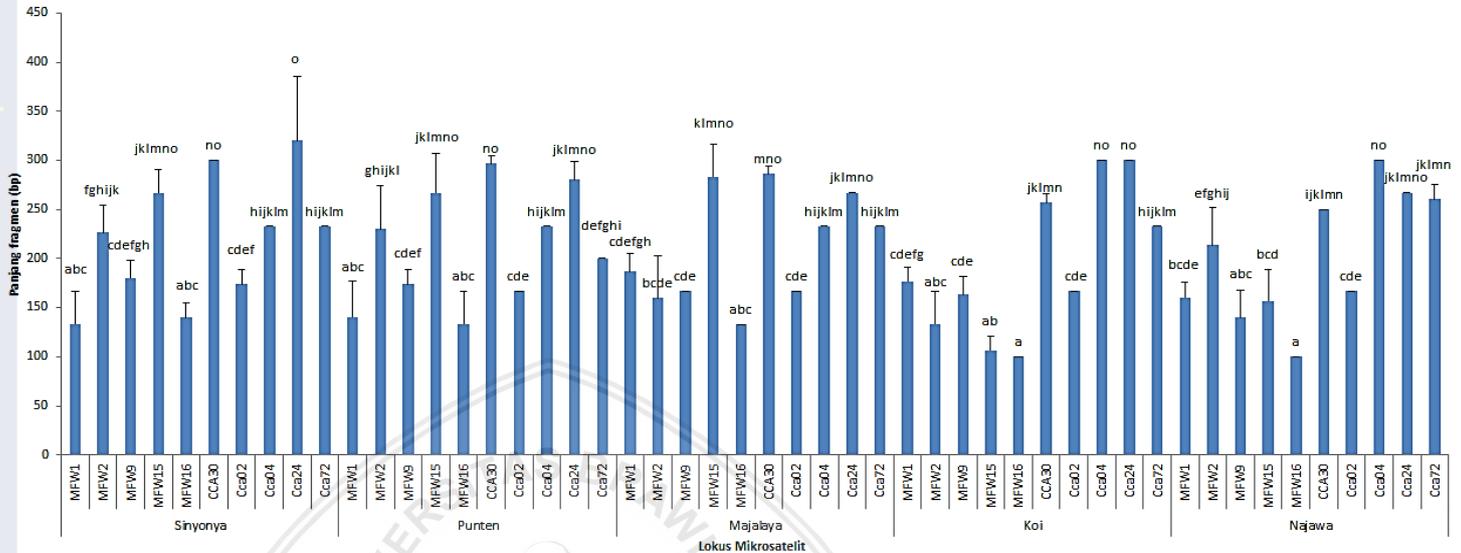
Keterangan:

Na :Jumlah variasi alel

Ne :Jumlah alel efektif atau unik antar strain/populasi

Ho :Heterozigositas observasi

He :Heterozigositas ekspektasi



Gambar 3. Variasi Panjang Fragmen Alel pada Lima Strain Ikan Mas di Indonesia berdasarkan uji *one-way* ANOVA Menggunakan Marka Sepuluh Locus DNA Mikrosatelit

Tabel 3. Frekuensi Alel pada Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

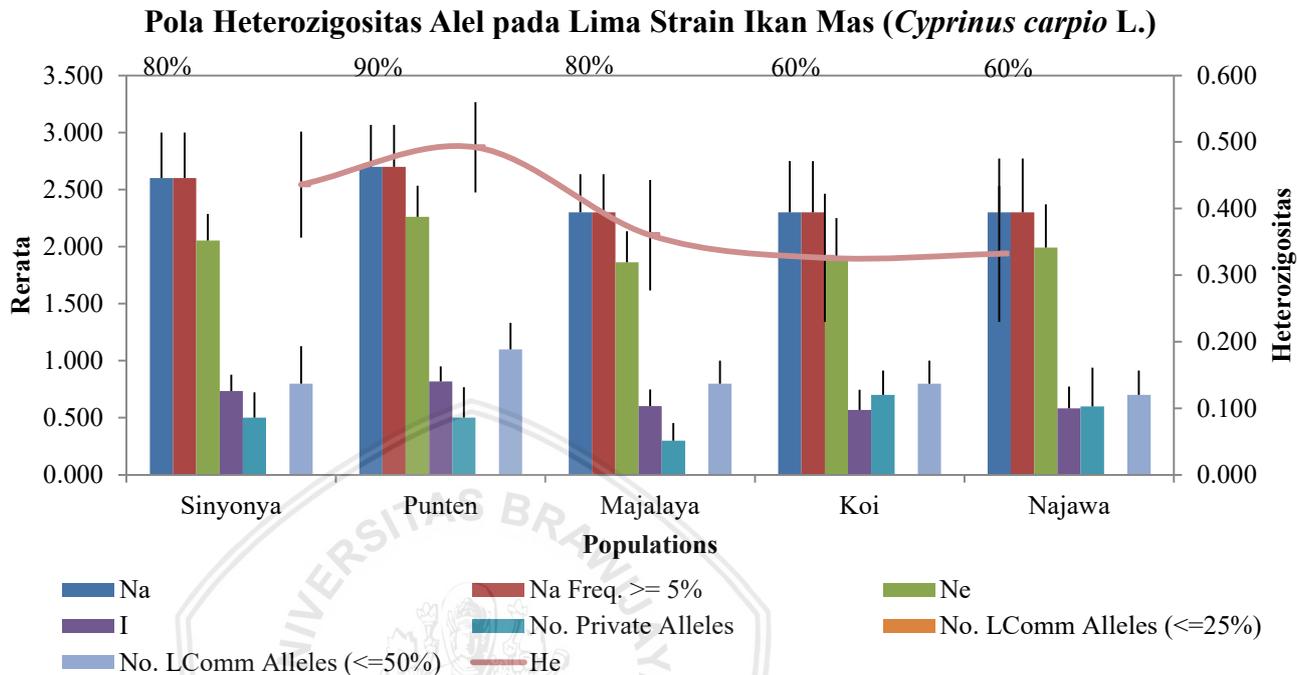
Lokus	Ni (bp)	S 5	P 5	M 5	K 5	N 5	Lokus	Ni (bp)	S 5	P 5	M 5	K 5	N 5
MFW 16	100	0,00	0,20	0,00	0,70	0,50	Cca04	233	0,60	0,70	0,90	0,00	0,00
	133	0,50	0,10	0,50	0,00	0,00		300	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00
	167	0,10	0,40	0,00	0,10	0,50		367	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00
	200	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	Cca24	233	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	233	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00		267	0,20	0,60	1,00	0,00	1,00
	267	0,10	0,30	0,00	0,00	0,00		300	0,00	0,40	0,00	1,00	0,00
CCA 30	250	0,00	0,00	0,00	0,60	1,00	Cca72	200	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
	267	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00		233	1,00	0,00	1,00	1,00	0,20
	283	0,00	0,20	0,80	0,00	0,00		267	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80
Cca02	167	0,80	0,50	0,90	1,00	1,00	Keterangan:						
	200	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	Ni : Alel Observasi	P : Punten	K : Koi				
							S : Sinyonya	M : Majalaya	N : Najawa				

Tabel 4. Nilai *F-stat* Alel untuk Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Lokus	MFW1	MFW2	MFW9	MFW15	MFW16	CCA30	Cca02	Cca04	Cca24	Cca72	Rerata	SE
Fis	0,19	1,00	0,14	1,00	-0,43	1,00	-0,20	-0,48	1,00	1,00	0,42	0,20
Fit	0,32	1,00	0,26	1,00	0,00	1,00	0,14	0,49	1,00	1,00	0,62	0,13
Fst	0,15	0,25	0,14	0,30	0,30	0,68	0,28	0,66	0,65	0,88	0,43	0,08

Tabel 3 (lanjutan). Frekuensi Alel pada Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Lokus	Ni (bp)	S	P	M	K	N	Lokus	Ni (bp)	S	P	M	K	N
		5	5	5	5	5			5	5	5	5	5
MFW1	100	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00	MFW9	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
	133	0,10	0,00	0,00	0,00	0,20		133	0,00	0,00	0,00	0,20	0,40
	150	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00		167	0,60	0,60	0,60	0,30	0,00
	167	0,50	0,40	0,20	0,60	0,80		183	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
	183	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00		200	0,40	0,20	0,00	0,00	0,20
	200	0,10	0,00	0,50	0,20	0,00		267	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
	300	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00		300	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
	333	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00		333	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
367	0,00	0,20	0,20	0,00	0,00								
MFW2	100	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	MFW15	100	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00
	133	0,00	0,00	0,60	0,20	0,00		117	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
	167	0,00	0,00	0,20	0,40	0,20		133	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20
	200	0,40	0,60	0,00	0,00	0,40		167	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40
	233	0,40	0,00	0,20	0,00	0,20		200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
	250	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00		233	0,20	0,40	0,00	0,00	0,00
	267	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20		250	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
							300	0,20	0,00	0,20	0,00	0,00	



Gambar 4. Heterozigositas Lokus Polimorfik dari Lima Strain Ikan Mas berdasarkan Marka DNA Mikrosatelit

4.2 Hubungan Kekerabatan antar Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) berdasarkan Heterozigositas DNA Mikrosatelit

4.2.1 Nilai jarak genetik (*genetic distance*) lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Frekuensi alel sebagai salah satu parameter heterozigositas genetik dari lima strain ikan Mas yang digunakan dalam penelitian ini, dapat dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui *genetic distance* (GD) atau jarak genetik antar strain. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance*, yakni perbedaan dilihat pada matriks yang membandingkan setiap strain dengan strain lainnya secara berpasangan. Nilai dari jarak genetik dalam satu spesies ikan Mas ini dapat digunakan untuk menentukan hubungan secara genetik (*genetic relationship*) antar strain tersebut (David dkk, 2001). Jarak genetik yang dianalisis berdasarkan heterozigositas DNA mikrosatelit pada lima strain ikan Mas dapat dilihat pada tabel 5. Nilai jarak genetik yang diperoleh dari kelima strain ikan Mas tersebut berkisar dari 0.46-1.36. Nilai jarak genetik terendah merupakan antara strain Sinyonya terhadap Majalaya, sementara nilai tertinggi yakni 1,36 diperoleh antara strain Punten dengan Koi. Jarak genetik kedua tertinggi adalah antara Sinyonya dengan Najawa, yakni sebesar 1,03. Kedua strain tersebut memiliki jarak genetik paling jauh diantara strain lainnya.

Tabel 5. *Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance* untuk Lima Strain Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) berdasarkan 10 Lokus DNA Mikrosatelit

	Sinyonya	Punten	Majalaya	Koi	Najawa
Sinyonya	0,00				
Punten	0,55	0,00			
Majalaya	0,46	0,68	0,00		
Koi	0,98	1,36	0,97	0,00	
Najawa	1,03	0,97	0,93	0,52	0,00

Marka DNA mikrosatelit merupakan salah satu marka yang masih diakui dan diterima sebagai marka *genotyping* yang valid (dibandingkan dengan metode AFLP) dan dapat digunakan baik pada ikan Mas hias

maupun konsumsi, meskipun secara fenotip berbeda-beda, namun genom mikrosatelit tetap terjaga (*conserved*). Hal ini cukup unik dikarenakan populasi ikan Mas di dunia telah meluas karena perkawinan acak di alam, kemudian secara massal mengalami seleksi karakter untuk mendapatkan strain unggulan yang melimpah. Marka DNA mikrosatelit diketahui cukup digunakan untuk mengetahui *genetic difference* secara spesifik karena tingkat konservasinya di dalam genom yang cukup tinggi. Marka tersebut bahkan dapat digunakan dalam proses *species genotyping*, seperti yang dilakukan oleh Schlotterer dkk., (1991). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa jarak genetik yang diperoleh dari marka mikrosatelit cukup baik yakni 49% pada ikan Mas, 100% pada paus dan 40% untuk sapi dan kambing. Hal ini membuktikan bahwa lokus mikrosatelit sangat terjaga dan spesifik untuk digunakan sebagai marka *species genotyping*.

4.2.2 Nilai diferensiasi genetik (*genetic difference*) lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Diferensiasi genetik (*genetic difference*) antara lima strain ikan Mas, dianalisis berdasarkan nilai F_{st} untuk masing-masing populasi. Nilai F_{st} telah digunakan secara luas dalam proses *genotyping* berdasarkan marka mikrosatelit (Singh dkk., 2015). Metode yang digunakan mengacu pada *Nei's standard pairwise F_{st} distance* yang dapat dilihat pada tabel 6. Nilai F_{st} terbesar didapatkan diantara strain Majalaya dan Koi. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua populasi strain tersebut mengalami divergensi yang cukup luas diantara ketiga strain lainnya. Pola umum dari diferensiasi genetik berdasarkan sepuluh lokus mikrosatelit dengan nilai paling konsisten adalah strain Koi dengan rata-rata nilai F_{st} sebesar 0,35. Matriks jarak genetik dalam satu spesies ikan Mas yang dikelompokkan berdasarkan strain dan marka DNA mikrosatelit dalam penelitian ini menunjukkan hubungan secara genetik (*genetic relationship*) dari kelima strain tersebut. Apabila dibandingkan dengan nilai *genetic differentiation* melalui nilai F_{st} (dengan nilai $P \leq 0,05$), maka dapat diketahui banyak perbedaan genetik antara strain ikan Mas berdasarkan marka DNA mikrosatelit ini cukup tinggi nilainya dan cukup signifikan dalam memberikan identitas genetik terhadap strain ikan Mas di Indonesia.

Analisis nilai F_{st} dapat digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai diversitas ikan Mas dalam suatu subpopulasi atau strain yang

digunakan dalam penelitian ini. Tingginya nilai F_{st} dihasilkan dari kesamaan alel yang ditemukan pada lokus-lokus mikrosatelit yang berhasil diamplifikasi.

Tabel 6. *Pairwise Population Matrix of Nei's Standard Pairwise F_{st} distance* untuk lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) berdasarkan 10 lokus DNA mikrosatelit

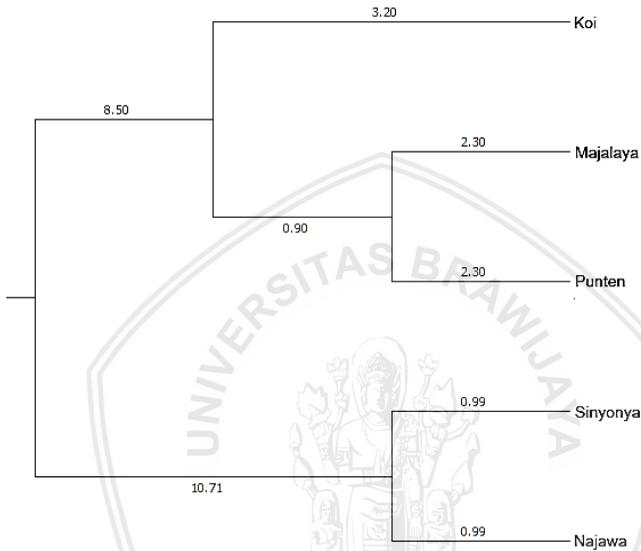
	Sinyonya	Punten	Majalaya	Koi	Najawa
Sinyonya					
Punten	0,20				
Majalaya	0,22	0,25			
Koi	0,34	0,35	0,37		
Najawa	0,34	0,31	0,36	0,29	

Rata-rata nilai F_{st} untuk kelima strain ikan Mas dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4. Nilai rata-rata F_{st} dari seluruh lokus dan lima strain yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 0.43. Nilai ini menunjukkan bahwa variasi molekul DNA mikrosatelit dari kelima strain ikan Mas tersebut sangat tinggi. Hal ini dapat dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh David dkk. pada tahun 2001 yang menggunakan 41 lokus pada strain ikan Mas hias (Koi) dan konsumsi yang menghasilkan nilai F_{st} sebesar 0.37. Namun, nilai dari jarak genetik dan F_{st} dalam penelitian ini berkorelasi negatif terhadap heterozigositas atau variasi alel yang telah sebelumnya dianalisis. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa kemungkinan dan faktor yang berpengaruh selama penelitian berlangsung. Faktor tersebut dapat berupa jumlah sampel yang digunakan terlalu sedikit dan rendahnya alel polimorfik yang muncul sehingga menyebabkan adanya korelasi negatif tersebut.

4.2.3 Rekonstruksi dendrogram kekerabatan lima strain ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Kombinasi antara jarak genetik dengan F_{st} dapat digunakan dalam rekonstruksi dendrogram yang merepresentasikan hubungan kekerabatan antar strain ikan Mas berdasarkan marka DNA mikrosatelit. Rekonstruksi dendrogram dari lima strain ikan Mas berdasarkan marka DNA mikrosatelit dilakukan dengan menggunakan metode *UPGMA*

Dendrogram Based Nei's (1978) Genetic distance Method yang dimodifikasi dari software *NEIGHBOR Procedure of PHYLIP 3.5*. Dendrogram yang dihasilkan dari metode tersebut memisahkan kelima strain menjadi dua kelompok (*cluster*). Urutan dari pengelompokan tersebut menunjukkan hubungan kekerabatan yang diukur berdasarkan jarak genetik dan diferensiasi antar strain.



Gambar 5. Rekonstruksi dendrogram dengan metode *UPGMA* untuk kekerabatan antar strain ikan Mas berdasarkan marka DNA mikrosatelit

Kelompok pertama terdiri dari tiga strain yakni Koi, Majalaya, dan Punten. Kelompok ini terpisah dari strain lainnya dengan jarak sebesar 8,50. Strain Koi terpisah oleh percabangan strain Majalaya dan Punten dengan nilai jarak genetik sebesar 2,30. Kelompok ini memisahkan Koi sebagai strain yang memiliki jarak genetik terbesar dari strain lainnya. Strain Koi diperkirakan memiliki perbedaan yang signifikan sehingga berada pada kluster pertama, terpisah dari strain Majalaya dan Punten. Strain Koi diketahui memiliki diversitas alel yang cenderung rendah dibandingkan dengan strain lain, namun variabilitas populasinya cukup tinggi akibat proses seleksi dan hibridisasi di tempat pembudidayaan

(Zou dkk., 2004). Hubungan kekerabatan yang terbentuk oleh strain Majalaya dan Punten mengindikasikan adanya beberapa kesamaan secara genetik maupun dugaan perkawinan silang di habitat liar. Secara morfologi, kedua strain tersebut memiliki kesamaan morfologis yang diperkirakan merupakan karakter fisik yang berasal dari nenek moyang. Kedua strain tersebut berasal dari dua daerah yang berbeda, yakni Majalaya yang berasal dari Jawa Barat, sementara ikan Mas Punten dibudidayakan di Punten, Batu, Jawa Timur. Kedua strain tersebut diambil dari lokasi budidaya yang berdekatan. Menurut Scribner dkk., (1986), populasi yang hidup secara berdekatan, memungkinkan terjadinya kesamaan identitas genetik (*genetic identity*) yang tinggi akibat aliran gen (*gene flow*). Adanya kesamaan yang identitas genetik berdasarkan marka DNA mikrosatelit inilah yang diperkirakan menjadikan kedua strain tersebut berada pada posisi yang berdekatan dengan nilai jarak genetik yang sama pada skema kekerabatan tersebut.

Penelitian yang dilakukan oleh Mondol dkk., (2006) terhadap strain ikan Mas yang dibudidayakan di Bangladesh, sedikit banyak menunjukkan hubungan kekerabatan antara strain Koi dan strain lain. Hubungan kekerabatan yang terjadi antara beberapa strain menunjukkan jarak yang tidak terlalu jauh dan mengelompok berdasarkan daerah asalnya sebelum diintroduksi. Strain yang diintroduksi dari Jepang, yaitu Koi, diketahui mengelompok bersama dengan *Red carp*. Hal ini diperkirakan bahwa strain Koi berasal dari perkawinan silang, yang salah satunya melibatkan *Red carp*. Studi terhadap haplotip dari ikan Mas strain Eropa menunjukkan suatu pengelompokan yang berbeda dengan Koi dan ikan Mas yang berasal dari Vietnam. Sementara itu, Koi dan strain Vietnam menunjukkan jarak atau diferensiasi yang sudah cukup tinggi, sementara jarak terendah ditemukan antara strain yang berasal dari Vietnam dan China (Thai dkk., 2007). Hal ini menunjukkan bahwa homogenitas antara strain-strain yang berasal dari Vietnam dan China tersebut cukup tinggi. Hal ini dianggap cukup membuktikan bahwa Koi dan strain lain tersebut mengelompok pada suatu dendrogram dikarenakan proses budidaya yang sifatnya lokal.

Kelompok kedua terdiri dari strain Sinyonya dan Najawa yang dipisahkan dari kelompok pertama dengan jarak genetik sebesar 10,71. Kedua strain ini merupakan strain yang dibudidayakan secara monokultur di daerah Jawa Tengah. Hal ini yang diprediksikan bahwa

identitas genetik yang dibentuk dari nilai jarak genetik dan F_{st} kedua strain tersebut cukup tinggi dibandingkan strain lain. Kedua strain ini merupakan strain yang memiliki karakteristik morfologis yang hampir sama. Berdasarkan karakter morfologis tersebut, diperkirakan bahwa strain tersebut berasal dari nenek moyang *Cyprinus carpio haematopterus* dan *Cyprinus carpio carpio* yang kemudian berkembang menjadi populasi hibrid dan mengalami sistem seleksi dan budidaya secara intensif hingga menghasilkan strain yang diakui sebagai strain domestik Indonesia tersebut. Daerah pembudidayaan yang berdekatan dari kedua strain ini, yakni Jawa Tengah, memungkinkan kuatnya dugaan terjadinya *gene flow*, sementara kedua strain tersebut terpisahkan oleh strain yang lain pada pohon kekerabatan (Gambar 5) akibat lokasi pembudidayaan yang berbeda. Isolasi geografis, kondisi lingkungan tempat budidaya, peristiwa *bottleneck* dan *gene flow* (Singh dkk., 2015) merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap identitas genetik dari suatu individu dan populasi ikan.

Heterozigositas alel dari lokus mikrosatelit pada lima strain ikan Mas budidaya yang digunakan pada penelitian ini menghubungkan sejarah panjang budidaya ikan Mas di Indonesia dengan kekerabatan yang terbentuk dari proses tersebut. Variasi alel yang tinggi dari beberapa strain telah memisahkan strain tersebut dengan strain lainnya. Variasi alel yang tinggi sebanding dengan heterozigositas dari gen-gen yang dimanifestasikan dari keturunan ke keturunan selanjutnya. Strain yang diketahui memiliki lokus paling polimorfik, yakni Punten, berdasarkan hasil analisis hubungan kekerabatannya diketahui memiliki jarak genetik yang dekat dengan Koi. Hal ini dapat diperkirakan bahwa ikan Mas Punten, telah mengalami proses pencampuran gen secara acak, namun beberapa gen yang berasal dari galur murninya masih terkonservasi dengan baik. Hal ini mengakibatkan terekspresinya karakter khas pada beberapa keturunan, dengan variasi yang acak. Strain Punten diketahui saat ini sedang menjalani proses seleksi budidaya yang sudah dimulai sejak tahun 1919 dan diperkirakan berakhir pada tahun 1930 (Ardiwinata, 1981). Proses kemudian dimulai kembali pada akhir tahun 2016. Jeda panjang inilah yang diduga menyebabkan strain Punten telah mengalami kawin acak dengan strain lain di habitatnya. Namun, gen yang mengkode karakter ikan tersebut yakni kepala yang kecil, punggung tinggi, pertumbuhan cepat, dan tubuhnya berwarna kehijauan

masih dapat dijumpai pada strain yang saat ini sedang digunakan dalam proses penelitian.

Jarak genetik yang sama antara Punten dengan Koi, menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan bahwa strain tersebut mengalami divergensi strain dengan laju yang mirip dengan Koi, di tempat budidayanya masing-masing. Hal ini juga berlaku untuk beberapa strain yang memisah pada kelompok kedua, yakni Najawa dan Sinyonya, yang lokasi budidayanya berdekatan. Penelitian dalam bidang yang sama menunjukkan bahwa diversitas alel akan menurun akibat beberapa sistem budidaya intensif (Sekino dkk., 2002). Rendahnya diversitas alel tersebut dapat mengakibatkan peningkatan kemungkinan *inbreeding*, yang berdampak pada rendahnya variasi gen-gen tertentu, misalkan penurunan gen-gen yang berperan penting untuk ketahanan internal ikan budidaya terhadap patogen. Pertahanan internal ikan yang dianalisis melalui salah satu marka molekuler, yakni gen CycaDAB menjadi salah satu riset populer mengingat bahwa imunitas internal dapat diturunkan ke generasi selanjutnya. Penurunan ekspresi gen tersebut diketahui berperan terhadap ketahanan serangan patogen eksternal. Sifat tersebutlah yang diharapkan menjadi sifat yang muncul dan dominan dalam upaya seleksi populasi ketika dilakukan uji tantangan dengan paparan patogen tertentu. Liu dkk., (2013) mengungkapkan bahwa tingginya polimorfisme pada gen MHC berkaitan erat dengan kualitas bibit dengan daya tahan tinggi terhadap serangan wabah patogen yang menyerang ikan Mas sebagai salah satu ikan budidaya penting di Indonesia.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Keragaman genetik lima strain ikan Mas dapat dianalisis melalui karakter heterozigositas alel yang diperoleh berdasarkan marka DNA mikrosatelit. Heterozigositas alel dari kelima strain ikan Mas di Indonesia signifikan dan merepresentasikan variasi alel yang cukup baik, terutama pada lokus MFW1. Strain Punten diketahui memiliki karakter lokus paling polimorfik dengan persentase sebesar 90% . Tingginya persentase lokus polimorfik pada strain tersebut disebabkan akibat proses perkawinan acak di habitat alaminya.

Hubungan kekerabatan berdasarkan hasil analisis heterozigositas alel menggunakan marka DNA mikrosatelit pada kelima strain ikan Mas menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok strain yang dipisahkan oleh jarak genetik yang signifikan. Dendogram yang dihasilkan dari metode tersebut memisahkan kelima strain menjadi dua kelompok. Kelompok pertama terdiri dari tiga strain yakni Koi, Majalaya, dan Punten, sementara kelompok kedua terdiri dari strain Sinyonya dan Najawa. Strain Koi diketahui terpisah dari strain Majalaya dan Punten. Pengelompokan tersebut dipengaruhi oleh proses budidaya yang sifatnya lokal intensif, dan dalam jangka waktu yang lama.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai keragaman genetik strain domestik ikan Mas Indonesia yang dianalisis berdasarkan marka DNA mikrosatelit menjadi sangat penting dilakukan, dikarenakan meluasnya proses seleksi strain unggulan. Upaya seleksi karakter ikan Mas Punten perlu lebih selektif berkala untuk mendapatkan keturunan dengan galur murni. Sementara itu, perlu dilakukan *monitoring* pada proses budidaya untuk menghindarkan adanya *inbreeding depression*. Upaya tersebut diharapkan mampu mengkonservasi diversitas populasi ikan Mas lokal di Indonesia, sehingga mendukung program seleksi strain unggulan tanpa memusnahkan strain domestik lain dari ikan Mas di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2014. *Molecular Biology of the Cell*. Garland. London.
- Alikhuni, K.H. 1966. Synopsis of biological data of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus), 1758 (Asia and Far East). *FAO Fisheries Synopsis* No.31: 77
- Aliah, R.S., Takagi, M., Dong, S., Teoh, C.T., Taniguchi, N., 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish. Science* (65): 235–239.
- Ardiwinata, R.O., 1981. *Cultivation of Common Carp*. Sumur Bandung, Bandung.
- Balon, E.K., 1995a. The common carp, *Cyprinus carpio*: its origin, domestication in aquaculture, and selection as colored nishikigoi. *Guelph Ichthyology Reviews* 3: 3–54.
- Balon E.K.. 1995b. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers, *Aquaculture* (129): 3–48.
- Bárfai, R., Egedi, S., Yue, G.H., Kovács, B., Urbányi, B., Tamás, G., Horváth, L., Orbán, L., 2003. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture* 219, 157–167.
- Bongers, A.B. J., M. Sukkel, G. Gort, J. Komen. & J.J. Ritcher. 1998. Development and use of genetically uniform strain of common carp in experimental animal research. *Laboratory Animals* 32: 349-363
- Burke, T., O. Hannote, M.W. Brufrod & E. Carnis. 1991. **Multilocus and single locus minisatellite analysis in population biological sciences on DNA Fingerprinting : Approaches and Application**. Birkhauser. Basel.
- Crooijmans, R.P.M.A., V.A.F. Bierbooms, J. Komen, J.J. Van der Poel, M.A.M. Groenen. 1997. Microsatellite markers in common carp. *Animal Genetics*. Vol. 28: 129-134
- David L, Rajasekaran PJ, Fang J, Hillel J and Lavi U. 2001. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and new set of microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* 266:353-362

- Davis, K.M., Dixon, P.I., Harris, J.H., 1999. Allozyme and mitochondrial DNA analysis of carp, *Cyprinus carpio* L., from south-eastern Australia. *Mar. Freshwater Res.* 50, 253–260.
- De Silva, S. 2003. *Carps: farming aquatic animals and plants*. Blackwell Publishing. Oxford.
- Desvignes, Jean F., Jean Laroche, Jean D. D., Yvette B. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture* (194): 291-301
- Dinas Kelautan dan Perikanan (DKP) Jogjakarta. 2013. Naskah Permohonan Pelepasan Strain Ikan Mas Merah Cangkringan. Jogjakarta.
- Dorado, G., T. Unver, H. Budak, P. Hernandez. 2015. *Molecular Markers*. Elsevier. Kanada.
- Edwards, A., A. Civitello, H. A. Hammond, and C. T. Caskey. 1991. DNAtyping and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American Journal of Human Genetics*. Vol. 49 (4): 746–756.
- Edwards, J. K., g. Elgar, M. S. Clark, M. J. Bishop. 1998. The identification and characterization of microsatellite in the compact genome of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*). *Journal of Molecular Biology* 278: 843-854.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Na. Rev. Genet.* 5: 435–445.
- FAO. 2006. *Cyprinus carpio* Linnaeus (1758) : Cultured species information programme. <http://www.fao.org/fishery/cultured>. Diakses pada 9 Oktober 2018
- Froese, R., & D. Pauly. 2002. *Fish base: Species summary for Cyprinus carpio*. <http://www.fishbase.org>. Diakses pada 9 November 2016.
- Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, et al. 2006. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1". *Nature*. 441 (7091): 315–21
- Grimholt U., Larsen S., Nordmo R., Midtlyng P., Kjoeglum S., Storet A. 2003. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic

- salmon (*Salmo salar*), facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* 55: 210–9.
- Hardjamulia, A., dan Suseno D. 1976. Some aspect of freshwater fish genetics. Agriculture Genetic Workshop. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Irobalieva RN, Fogg JM, Catanese DJ, Catanese DJ, Sutthibutpong T, Chen M, Barker AK, Ludtke SJ, Harris SA, Schmid MF, Chiu W, Zechiedrich L. 2015. Structural diversity of supercoiled DNA. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC460802>. *Nature Communications*. 6:8440.
- Kershaw, Diana R. 2002. **Animal Diversity**. Chapman and Hall. London
- Kementrian Kelautan dan Perikanan tahun 2013. Sepuluh Produsen Ikan Mas Utama di Indonesia. <http://kkp.co.id>. Diakses pada 10 Oktober 2017.
- Kirpichnikov, V.S., 1999. **Genetics and Breeding of Common Carp**. Blackwell Publishing. Oxford.
- Knapik, E.W. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nat. Genet.* 18 (4): 338-343
- Kocher, T. D., W. J. Lee, H. Sobolewska, D. Penman, & B. McAndrew. 1998. A genetic linkage of cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232
- Kohlman, Klasus., Riho Gross, Asiya Murakeva, dan Petra Kersten. 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquat. Living Resour.* 16: 421–431
- Lande, R. 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution* (48): 1460-1469.
- Lehoczy I, Magyary I and Hancz C (2002) Study of the genetic variability of six domestic common carp strains using microsatellite DNA markers. *Allattenyesztes es Takarmanyozas* 51:8-19
- Linnaeus, Carl. 1758. *Cyprinus carpio*. *Systema Nature* 10: 1-4
- Liu S. P., Qiu S. L., Chen D. Q., & Huang M.G. 1999. Protection and utilization of guerrillas resources in 4 major Chinese Carps in

- Yangtze River. *Resources and Environment in the Yangtze River Basin* 6: 127-131.
- Liu, J., Z-Z Liu, X-J Zhao, & C-H Wang. 2013. MHC class I α alleles associated with resistance to *Aeromonas hydrophila* in purple red common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus). *Journal of Fish Disease* (Short communication)
- Lynch, M., & Walsh, B. 1998. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 980 pp.
- Macarans, J. M., Sato, J., Fujio, Y., 1986. Genetic characterization of cultured populations of Japanese common carp. *Tohoku J. Agric. Res.* 37, 21–29.
- Mashaghi A, Katan A. 2013. A physicist's view of DNA. *De Physicus.* 24e (3): 59–61. s/2013arXiv1311.2545M).
- Mays, H.L.J., Hill G.E. 2004. Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution* Vol. 29 : 564–570.
- Milinski M. 2006. The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic* Vol.37: 159–186.
- Mondol, K.R., Islam, S., & Alam, S. 2006. Characterization of different strains of common carp (*Cyprinus carpio* L.) (Cyprinidae, Cypriniformes) in Bangladesh using microsatellite DNA markers. *Genetics and Molecular Biology* Vol. 29(4): 626-633.
- Moxon E, Rainey P, Nowak M, Lenski R. 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol.* 4:24–33.
- Muneer, A. Gopalakrishnan, K. K. Musammilu dkk., 2009. Genetic variation and population structure of endemic yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* (Bagridae) among three populations of Western Ghat region using RAPD and microsatellite marker. *Molecular Biology Reports*, vol. 36,no. 7: 1779–1791
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York
- Nevo E, et al. 2005. Genomic microsatellite adaptive divergence of wild barley by microclimatic stress in “Evolution canyon”, *Israel. Biol J Linn Soc.*84:205–224.

- Nugroho, E., D. Priyanto, H. S. Hermawan, Sunaryo, & A. S. Prihadi. 2015. Karakter Fenotipe dan Genotipe Ikan Mas ‘Merah Menyala’ Najawa dari Cangkringan, Jogjakarta serta Potensi Ekonomisnya. *Media Akuakultur* Vol. 10 No. 1: 13-16
- Orr HT, Zoghbi HY. 2007. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci.* 30:575–621.
- Park, L. K. & P. Mooran. 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, vol. 4: 272–299
- Padhi, B. K. dan P. K. Mandal. 2000. *Applied fish Genetics*. Fishing Chimes. Visakhapatnam. India.
- Peakal, R. & Smouse O. 2012. GenAlex 6.503: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. *J. Bioinformatics.* Vol 28(19): 2537-2539
- Penn D.J., Damjanovich K., Potts W.K., 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.99: 11260–11264.
- Pennings P. S, & Hermisson J. 2006. Soft sweeps II—molecular population genetics of adaptation from recurrent mutation or migration. *Mol Biol Evol.* 23:1076–1084.
- Purcell A. 2014. Basic Biology : DNA. <http://basicbiology.net/micro/genetics/dna>. Diakses pada tanggal 19 Oktober 2017
- Rockman MV, & Wray GA. 2002. Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol.* 19:1991–2004
- Russel, P. 2001. **iGenetics**. Benjamin Cummings. New York.
- Schlotterer C. 1991. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Scribner, Kim T., J.W. Arntzen, dan Terry Burke. 1994. Comparative analysis of intra- and interpopulation genetic diversity in *Bufo bufo* using allozyme, single locus microsatellite, minisatellite, an multilocus minisatellite data. *Mol. Biol. Evol.* Vol 11(5): 737-748.
- Scribner, Kim T., Evans J.E., Morreale S.J., Smith M.H. 1986. Genetic divergence among populations of the yellowbellied slider turtle

- (*Pseudemys scripta*) separated by aquatic and terrestrial habitats. *Copeia* (3): 691–700
- Sekino, M., Hara, M., & Taniguchi, N., Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. Vol.213: 101–122.
- Singh E., O.P. Sharma, H.K. Jain, A. Sharma, M.L. Ojha, dan V.P. Saini. 2015. Microsatellite based genetic diversity and differentiation of common carp, *Cyprinus carpio* in Rajasthan (India). *Natl. Acad. Sci. Lett.* 38(3): 193–196
- Slettan, A., Olsaker, I. & Lie, O. 1993. Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Anim. Genet.*, 24, 195—197.
- Smith, R. 2001. **Social Behaviour : Cyprinid Fishes**. Chapman and Hall. London
- Sumantadinata, K. 1995. Present state of common carp (*Cyprinus carpio*) stock in Indonesia. *Aquaculture* 129 : 205-209.
- Sumantadinata, K., & Taniguchi, N., 1990. Comparison of electrophoretic allele frequencies and genetic variability of common carp stocks from Indonesia and Japan. *Aquaculture*
- Thai, B.T., Burridge, C.P., dan Austin, C.M. 2007. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture*, 269: 174-186.
- Tambasco, D. D. 2003. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. *Journal of Animal Breeding Genetics* (120): 51.
- Tanck M.W.T., Baars H.C.A., Kohlmann K., Komen J. & van der Poel. 2000. Genetic characterization of wild Dutch common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquac Res* 31:779-783.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 17: 6463–6471
- Varadi, L., Gorda, S., Bakos, J. & Jeney, Z. 2002. Management of Broodstock and Quality Control of Fish Seed in Hungary. *World Fish Center Quarterly* 25: 45-47.

- repository.ub.ac.id
- Vrijenhoek, R. C. 1994. **Genetic diversity and fitness in small populations.** In: **Conservation genetics.** Birkhäuser Verlag. Switzerland.
- Yashouv, A. 1955. The Punten carp and its attributes. *Bamidgeh*, 7: 46-55.
- Yeh F. C, Yang R. C. & Boyle T. 1999. POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based free software for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh>. Diakses pada tanggal 18 Oktober 2017
- Yue, Gen Hua, Mei Yin Hoa, Laszlo Orbana, Johannes Komenb. 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture* (234): 85–98
- Zou, J., Wu Q., Wang Z., Ye Y. 2004. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 40(10): 1144–1148.

