

Variasi Biokimia Genetik Populasi Ikan Betutu (*Oxyeleotris marmorata*, BLKr.) di Waduk Penjalin Brebes

Biochemical Genetic Variation of Sand Goby (*Oxyeleotris marmorata*, BLKr.) Population in Penjalin Water Reservoir Brebes

Agus Hery Susanto* dan Suhestri Suryaningsih

*Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Kampus Karangwangkal Purwokerto
Telp. (0281) 638794 Fax. (0281) 631700 E-mail: susanto1408@yahoo.co.id *Penulis untuk korespondensi*

Abstract

Penjalin water reservoir in Brebes Regency, Central Java, is one of the habitats of the sand goby. A study on its genetic diversity using approaches of isozyme analysis was needed to support domestication of the fish in this area. This study was aimed at the biochemical-genetic variation of sand goby population in Penjalin water reservoir based on esterase (EST), peroxidase (PER), malate dehydrogenase (MDH), aspartate amino-transferase (AAT), and acid phosphatase (ACP) polymorphisms. Visualization of the isozymes was carried out employing horizontal electrophoretic technique with potato starch gel and buffer system of L-histidin monohydrate. Of the five isozymes, ACP was not well-visualized in all samples tested while the remaining four showed no polymorphisms. It could be concluded that there is no biochemical-genetic variation of sand goby population in Penjalin water reservoir based on isozymes of EST, PER, MDH, and AAT.

Key words: sand goby, isozyme, biochemical-genetic variation, horizontal electrophoresis

Diterima: 28 Oktober 2005, disetujui: 03 Juli 2006

Pendahuluan

Ikan betutu (*Oxyeleotris marmorata*, BLKr.) merupakan salah satu jenis ikan liar air tawar dari familia Gobiidae yang mempunyai potensi cukup besar sebagai komoditas ekspor ke berbagai negara. Namun, hingga kini ketersediaannya belum dapat memenuhi peluang tersebut karena sepenuhnya masih bergantung kepada hasil penangkapan di alam (Nyuwan, 2000). Waduk Penjalin di Kabupaten Brebes, Jawa Tengah, dengan luas areal sekitar 125 ha merupakan salah satu habitat ikan betutu. Dalam keseharian masyarakat di sekitarnya melakukan penangkapan ikan betutu secara liar (Anonim, 1989). Guna menanggulangi berlanjutnya praktek penangkapan liar tersebut perlu dilakukan upaya domestikasi. Menurut Gaffar dan

Nasution (1990) ikan betutu termasuk salah satu spesies ikan liar yang berpotensi untuk didomestikasi. Dalam menunjang upaya domestikasi ikan betutu diperlukan kajian biologi, yang antara lain meliputi aspek genetika populasi.

Studi genetika pada suatu populasi spesies organisme dimaksudkan untuk memberikan evaluasi mengenai variasi genetik populasi tersebut. Menurut Suryadi (2002) studi tentang variasi genetik merupakan aspek yang sangat penting dalam pelestarian dan juga pemanfaatan plasma nutfah. Indriani *et al.*, (2002) menyatakan bahwa semakin tinggi variasi genetik plasma nutfah, semakin besar peluang untuk memperoleh organisme dengan sifat yang diinginkan.

Salah satu pendekatan yang dapat ditempuh dalam melakukan estimasi tingkat

variasi genetik pada populasi alami adalah aplikasi teknik biokimia berupa analisis isozim sehingga pendekatan ini sering disebut sebagai studi variasi biokimia genetik. Menurut Adams dalam Mansyah, *et al.*, (1999) studi variasi genetik atas dasar polimorfisme sejumlah lokus isozim dapat dengan cepat memberikan gambaran variasi genetik populasi yang dipelajari. Keuntungan lainnya dalam penggunaan isozim adalah bahwa alel yang berbeda akan diwariskan secara kodominan sehingga individu homozigot dapat dibedakan dengan individu heterozigot berdasarkan atas penampilan pola pita yang dihasilkan. Selain itu, secara teknis peralatan dan bahan yang diperlukan relatif tidak terlalu mahal dan percobaan dapat dilakukan dengan mudah di laboratorium (Brar dalam Hadiati *et al.*, 2002).

Beberapa isozim yang lazim digunakan dalam studi variasi genetik, khususnya pada ikan, antara lain esterase (EST), peroksidase (PER), malat dehidrogenase (MDH), aspartat amino transferase (AAT), dan *acid phosphatase* (ACP) (Permana *et al.*, 2001). Pada ikan sidat isozim EST, PER, dan AAT dilaporkan dapat divisualisasikan dengan baik, sementara MDH tidak memunculkan pita yang jelas (Susanto *et al.*, 2004a). Sebaliknya, pada ikan bandeng EST dan PER tidak tervisualisasikan, sedangkan MDH, AAT, dan ACP menghasikan pola pita yang jelas (Susanto *et al.*, 2004b).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi biokimia genetik populasi ikan betutu di Waduk Penjalin Kabupaten Brebes berdasarkan atas polimorfisme isozim esterase, peroksidase, malat dehidrogenase, aspartat amino transferase dan *acid phosphatase*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai landasan dalam evaluasi potensi genetik plasma nutfah ikan betutu yang diperlukan bagi penentuan strategi konservasi dan juga upaya domestikasinya.

Metode Penelitian

Bahan penelitian berupa 11 ekor ikan betutu Waduk Penjalin Brebes dengan kisaran panjang tubuh antara 15 dan 20 cm.

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel pati kentang (Sigma S-5116).

Bufe gel dibuat dengan melarutkan 1,048 g L-histidin monohidrat 5mM ke dalam akuades hingga mencapai volume 1000 ml. Larutan ini dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan diatur pHnya agar menjadi 6 dengan cara menambahkan tris atau NaOH secukupnya. Untuk pembuatan gel pati, 100 ml pati kentang dilarutkan ke dalam 330 ml bufe gel. Sementara itu, 670 ml bufe gel lainnya dididihkan dalam *microwave*. Setelah mendidih, bufe gel dicampur dengan larutan pati dan dididihkan kembali sampai terlihat jernih, kemudian bufe gel disambungkan dengan selang desikator sampai gelembung udara dalam larutan pati terangkat. Larutan pati yang telah homogen tersebut dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah diolesi parafin dan diberi selotip. Setelah dingin, gelembung yang terbentuk dari larutan pati ditutup dengan plastik yang telah diolesi parafin cair dan disimpan pada suhu 5°C.

Pembuatan bufe ekstraksi dilakukan dengan melarutkan 70,45 mg L-asam askorbat 10 mM, 193,9 mg L-sistein 40 mM, 0,12 mg triton X-100, dan 250 mg PVP-40 ke dalam akuades hingga diperoleh volume 40 ml. Larutan ini dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan diatur pHnya agar menjadi 8 dengan penambahan 0,1 M Na₂HPO₄.2H₂O atau HCl.

Sementara itu, bufe elektroda dibuat dengan melarutkan 10,55 g asam sitrat monohidrat 50 mM dan 18,16 g trihidroksimetil aminometan 150 mM ke dalam akuades hingga diperoleh volume 1.000 ml. Larutan ini dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan diatur pH nya agar menjadi 6 dengan penambahan HCl atau NaOH.

Setelah gel pati dan semua bufe yang diperlukan selesai dibuat, dilakukan ekstraksi isozim dari jaringan otot ikan betutu. Jaringan otot diambil dari bagian dorsal tubuh ikan betutu segera setelah ikan tersebut dimatikan. Jaringan ini diambil menggunakan skalpel kemudian dimasukkan ke dalam mortar yang telah diberi pasir kuarsa dan bufe ekstraksi sebanyak 0,5 ml. Selanjutnya, jaringan digerus sampai halus. Setelah jaringan halus dan homogen, dimasukkan kertas saring seukuran

lebar sumuran gel elektroforesis untuk menyerap cairan ekstrak jaringan otot sampel yang diperoleh.

Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 Volt selama 30 menit sebagai fase awal dan dilanjutkan pada tegangan 150 Volt selama 3 jam. Jarak migrasi enzim dikontrol dengan memasukkan *bromophenol blue* pada sumuran paling tepi (yang tidak berisi sampel). Setelah elektroforesis selesai, gel diambil dari bejana elektroforesis dan dibelah ke arah horizontal hingga menjadi lima lembaran gel, sesuai dengan jumlah pewarna isozim yang telah disiapkan. Tiap lembaran gel direndam dalam masing-masing larutan pewarna selama 24 jam.

Pewarna esterase terdiri atas 0,05 g 1-naftil asetat; 0,05 g 2-naftil asetat; 5 ml aseton; dan 0,1 g *fast blue RR salt*; dengan pelarut dan pengatur pH berupa 100 mM sodium fosfat pH 7 hingga mencapai volume 100 ml. Pewarna peroksidase terdiri atas 0,05 g CaCl_2 ; 0,5 ml H_2O_2 3%; 0,05 g 3-amino 9-etil karbasol; 5 ml aseton/N-dimetilformamid; dengan pelarut dan pengatur pH berupa 50 mM natrium asetat pH 5 hingga mencapai volume 100ml. Pewarna malat dehidrogenase terdiri atas 0,01 g NAD; 0,15 g asam malat; 0,01 g NBT; 0,002 g PMS; dengan pelarut dan pengatur pH berupa 50 mM tris HCl pH 8,5 hingga mencapai volume 50 ml. Pewarna aspartat amino transferase terdiri atas 0,0292 g α -asam keto glutarat; 1,07 g L-asam aspartat; 4 g PVP-40; 0,4 g *EDTA Na₂ salt*; 11,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; dengan pelarut akuades hingga mencapai volume 800 ml. Pewarna *acid phosphatase* terdiri atas 50 ml Na-1-naftil; 50 g MgCl_2 ; 50 g *fast garmet GBC salt*; 50 ml aseton; dengan pelarut dan pengatur pH berupa 50 mM natrium asetat pH 5 hingga mencapai volume 200 ml.

Gel yang telah diwarnai dan memperlihatkan pola migrasi pita enzim, dicuci dengan air mengalir dan segera difoto untuk dianalisis hasil visualisasinya. Data yang diperoleh dari hasil elektroforesis ditransfer ke dalam zimogram untuk selanjutnya dilakukan perhitungan frekuensi alel dan heterozigositas menurut Suryani *et al.*, (2001) sebagai berikut.

$$p = P + \frac{1}{2} H$$

p = frekuensi alel

P = fekuensi salah satu genotipe homozigot

H = frekuensi genotipe heterozigot

Jika nilai $p \geq 0,95$, maka lokus yang bersangkutan dikatakan bersifat monomorfik, sedangkan jika nilai $p < 0,95$, maka lokus yang bersangkutan dikatakan polimorfik. Sementara itu, heterozigositas dihitung atas dasar frekuensi alel pada setiap lokus dengan rumus:

$$He = 1 - \sum Xi^2$$

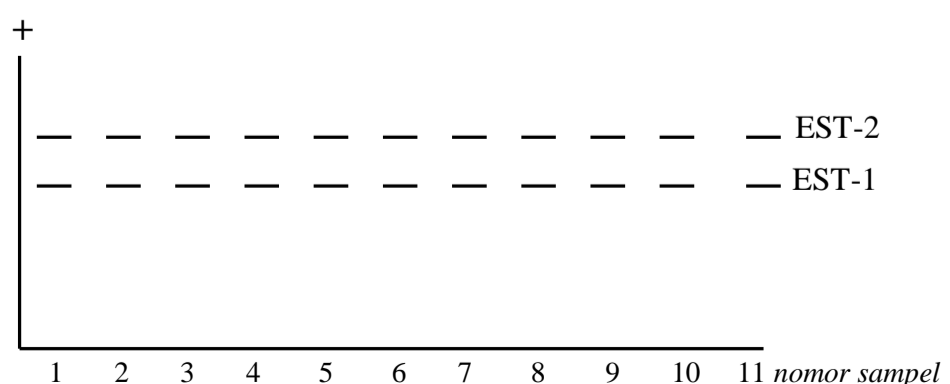
He = heterozigositas

Xi = frekuensi alel ke-i

Data hasil perhitungan frekuensi alel dan heterozigositas dianalisis secara deskriptif untuk memberikan gambaran mengenai variasi biokimia genetik populasi ikan betutu di Waduk Penjalin.

Hasil dan Pembahasan

Dari kelima isozim yang dicoba, ACP tidak dapat divisualisasikan dengan baik pada semua sampel yang diuji. Sementara itu, PER hanya tervisualisasi pada sampel nomor 7, 8, 10, dan 11, sedangkan AAT hanya muncul pada sampel nomor 1 hingga 6. Masing-masing zimogram isozim yang tervisualisasi dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, dan 4.



Gambar 1. Zimogram isozim esterase pada ikan betutu di Waduk Penjalin

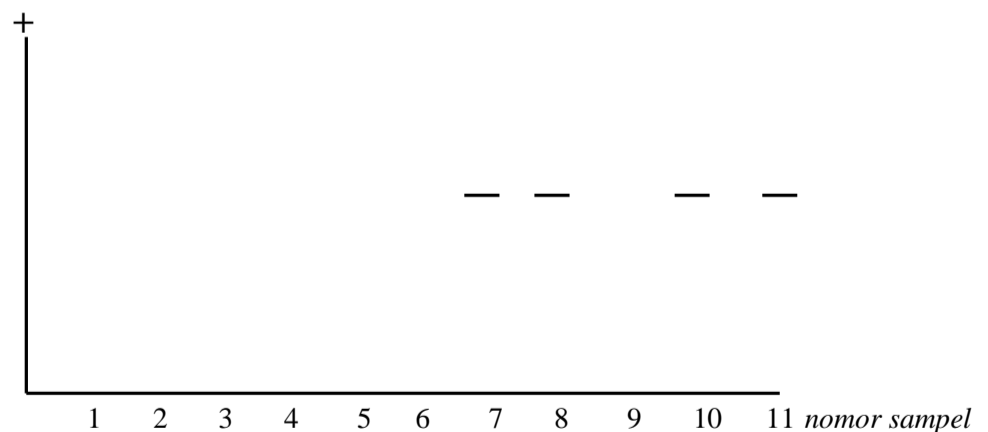
Pada zimogram EST nampak bahwa isozim ini diatur oleh dua lokus, yakni EST-1 dan EST-2, yang masing-masing homozigot. Hal ini berbeda dengan EST pada *featherback fish* (familia Noptopteridae) yang diatur oleh satu lokus dan mempunyai struktur monomer (Sodsuk dan Sodsuk, 2000). Begitu pula, pada ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) EST diatur oleh satu lokus (Permana *et al.*, 2001).

Isozim PER pada ikan betutu ternyata tidak diekspresikan oleh semua individu. Empat individu yang mengekspresikannya hanya memperlihatkan satu pola pita yang terdiri atas sebuah pita dengan arah dan jarak migrasi yang sama. Pola pita yang muncul ini mengindikasikan bahwa PER pada ikan betutu diatur oleh sebuah lokus homozigot. Hal ini berbeda dengan beberapa penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya. Bader (1998) mengatakan bahwa kontrol genetik isozim PER terdistribusi secara multilokus dengan struktur subunit monomer atau dimer. Prentice (1984) melaporkan bahwa pada *Silene diclinis* isozim PER diatur oleh dua lokus, masing-masing dengan struktur subunit monomer.

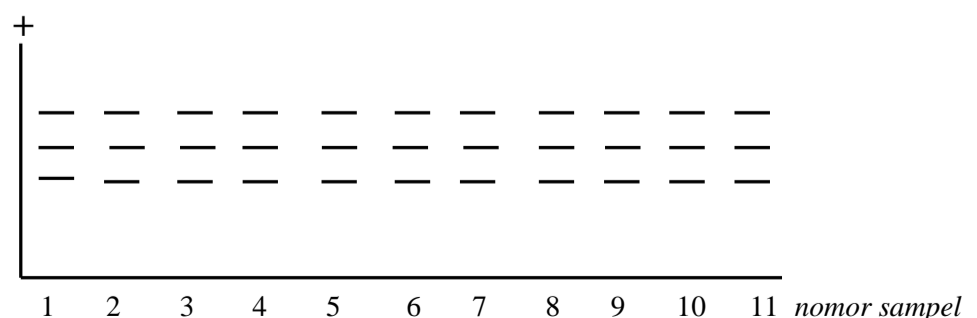
Semua individu sampel yang diuji nampak mengekspresikan isozim MDH berupa

satu pola pita yang terdiri atas tiga buah pita dengan arah dan jarak migrasi yang sama (Gambar 3). Beberapa hasil penelitian lainnya menunjukkan bahwa MDH memiliki jumlah lokus yang bervariasi tetapi struktur subunitnya selalu dimer, misalnya pada *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri*, dan *Diapterus auratus* terdapat satu lokus (Caruz dan Alcocer, 2003), pada *featherback fish* terdapat dua lokus (Sodsuk dan Sodsuk, 2000), pada *Aphanius fasciatus* terdapat empat lokus (Maltagliati, 1998), dan pada ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) terdapat tiga lokus (Permana *et al.*, 2001).

Sementara itu, isozim AAT seperti terlihat pada Gambar 4 juga hanya memperlihatkan satu pola pita yang sama pada individu nomor 1 hingga 6. Pada beberapa penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa isozim AAT memiliki struktur dimer dengan jumlah lokus yang bervariasi. *Featherback fish* diketahui mempunyai empat lokus AAT (Sodsuk dan Sodsuk, 2000), sedangkan ikan *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri*, dan *Diapterus auratus* diketahui mempunyai satu lokus isozim AAT (Caruz and Alcocer, 2003).



Gambar 2. Zimogram isozim peroksidase pada ikan betutu di Waduk Penjalin



Gambar 3. Zimogram isozim malat dehidrogenase pada ikan betutu di Waduk Penjalin

Populasi Ikan Betutu (*Oxyeleotris marmorata*) di Waduk Penjalin Brebes

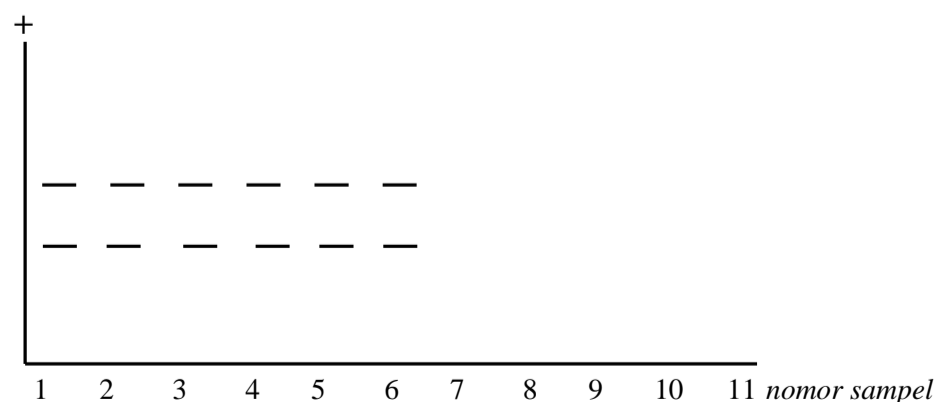
Semua lokus isozim yang tervisualisasi dapat dikatakan bersifat monomorfik karena frekuensi alelnya 1 dan 0 dengan heterozigositas sama dengan 0. Hal ini berarti bahwa tidak terdapat variasi genetik pada populasi ikan betutu di Waduk Penjalin apabila dilihat dari isozim EST, PER, MDH, dan AAT. Hal ini diduga berkaitan dengan menurunnya ukuran populasi dan adanya isolasi geografi yang menghalangi berlangsungnya aliran gen (*gene flow*) dari sumber genetik lain. Menurut Smedbol *et al.*, (2002) suatu populasi dapat terbagi menjadi beberapa subpopulasi oleh adanya isolasi reproduksi. Namun, hal ini hanya dijumpai pada spesies yang sangat terlokalisasi dengan peluang penyebaran larva yang terbatas. Kenchington dan Heino (2003) menyebutkan tiga faktor yang dapat menjadi ancaman bagi keanekaragaman hayati pada tingkat gen, yaitu (1) kepunahan atau musnahnya gen secara total, (2) hibridisasi yang mengakibatkan hilangnya kemampuan beradaptasi terhadap kondisi lokal, dan (3) menurunnya variasi genetik di dalam populasi. Faktor yang ketiga ini dapat disebabkan oleh penurunan ukuran populasi yang berpotensi meningkatkan peluang terjadinya silang dalam (*inbreeding*), yang akan meningkatkan homozigositas atau menurunkan heterozigositas. Selain itu, penurunan variasi genetik dapat juga disebabkan oleh pemancingan selektif (*selective fishing*) yang dapat berpengaruh terhadap dinamika populasi ikan.

Variasi genetik yang sangat rendah pada populasi ikan betutu di Waduk Penjalin dapat juga disebabkan oleh sifat-sifat yang berkaitan dengan *fitness* seperti pertumbuhan, daya hidup (viabilitas), dan kesuburan (fertilitas). Korelasi positif yang sangat signifikan antara variasi genetik dan sifat-sifat yang berkaitan dengan *fitness* dilaporkan oleh Knaepkens *et al.*, (2002) pada ikan *bullhead* (*Cottus gobio* L.) di Belgia, tetapi pada ikan *bullhead* di Jerman tidak terlihat adanya korelasi tersebut.

Dalam beberapa generasi, rendahnya variasi genetik populasi ikan betutu di Waduk Penjalin sangat mungkin menyebabkan terjadinya tekanan silang dalam (*inbreeding depression*). Hal ini seperti dinyatakan oleh Larson *et al.*, (2002) bahwa penurunan variasi genetik pada *Enhydra lutris* dapat mengarah kepada terjadinya tekanan silang dalam sehingga pemantauan yang ketat diperlukan untuk mencegah timbulnya berbagai dampak negatif.

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa dilihat dari isozim esterase, peroksidase, malat dehidrogenase, dan aspartat aminotransferase tidak terdapat variasi genetik pada populasi ikan betutu di Waduk Penjalin Brebes. Adapun saran yang dapat diajukan adalah perlunya pembatasan yang ketat terhadap segala aktivitas yang berdampak pada penurunan ukuran populasi ikan betutu di Waduk Penjalin.



Gambar 4. Zimogram isozim aspartat amino transferase pada ikan betutu di Waduk Penjalin

Ucapan Terima Kasih

Disampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Proyek Anggaran Rutin Universitas Jenderal Soedirman Tahun 2004 atas dukungan dana yang diberikan.

Daftar Pustaka

- Anonim. 1989. *Buku Pedoman Dinas Pekerjaan Umum Perairan Pemali Hulu Ranting Bumiayu, Kabupaten Brebes*. DPU Dati II Brebes.
- Bader, J.M. 1998. *Measuring Genetic Variability in Natural Populations by Allozyme Electrophoresis*. Department of Biology, Case Western Reserve, University of Cleveland, Ohio.
- Caruz, R.R. and Alcocer, M.U. 2003. Phylogenetic Assessment of *Eucinostomus gula*, *Eugerres plumieri* and *Diapterus auratus* (Pisces : Gerreidae) based on Allozyme and mtDNA Analysis. *Caribbean Journal of Science* 39 (1) : 109 – 115.
- Gaffar, A.K. dan Nasution, Z. 1990. Upaya Domestikasi Ikan Perairan Umum Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian, Bogor* : 8 - 12.
- Hadiati, S., Murdaningsih, Baihaki, A. dan Rostini, N. 2002. Variasi Pola Pita dan Hubungan Kekerabatan Nanas Berdasarkan Analisis Isozim. *Zuriat*. 13 (2) : 65 – 72.
- Indriani, F.C., Soetopo, L., Sudjindro dan Sugiharto, A.N. 2002. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dan Beberapa Spesies yang Sekerabat Berdasarkan Analisis Isozim. *Biosains*. 2 (1): 29 – 39.
- Kenchington, E. and Heino, M. 2003. *Maintenance of Genetic Diversity: Challenges for Management of Marine Resources*. Interim Report. International Institute for Applied Systems Analysis, Luxenburg.
- Knaepkens, G., Knapen, D., Bervoets, L., Hanfling, B., Verheyen, E. and Eens, M. 2002. Genetic Diversity and Condition Factor : a Significant Relationship in Flemish but not in German Populations of the European Bullhead (*Cottus gobio* L.). *Heredity* 89 : 280 – 287.
- Larson, S., Jameson, R., Etnier, M., Flemings, M. and Bentzen, P. 2002. Loss of Genetic Diversity in Sea Otters (*Enhydra lutris*) Associated with the Fur Trade of the 18th and 19th Centuries. *Molecular Ecology* 11: 1899 – 1903.
- Maltagliati, F. 1998. A Preliminary Investigation of Allozyme Genetic Variation and Population Geographical Structure in *Aphanius fasciatus* from Italian Brackish-water Habitats. *Journal of Fish Biology* 52 : 1130 – 1140.
- Mansyah, E., Anwarudinsyah, M.J., Sadwiyanti, L. dan Susiloadi, A. 1999. Variabilitas Genetik Tanaman Manggis melalui Analisis Isozim dan Kaitannya dengan Variabilitas Fenotipik. *Zuriat* 10 (1) : 1 – 10.
- Nyuwan, S.B. 2000. *Ikan Betutu Masih Menangkap dan Alam*. Trubus. Juli, 2000.
- Permana, I.G.N., Moria, S.B., Haryati dan Sugama, K. 2001. Pengaruh Domestikasi terhadap Variasi Genetik pada Ikan Kerapu Bebe (*Cromileptes altivelis*) yang Dideteksi dengan Allozyme Electrophoresis. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 7 (1) : 25 – 29.
- Prentice, H.C. 1984. Enzyme Polymorphism, Morphometric Variation, and Population Structure in a Restricted Endemic *Silene diclinis* (Caryophyllaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 22 : 125 – 143.
- Smedbol, R.K., McPherson, A.A., Hansen, M.M. and Kenchington, E. 2002. Myths and Moderation in Marine ‘Metapopulations’. *Fish and Fisheries* 3 : 20 –35.
- Sodsuk, P.K. and Sodsuk, S. 2000. Genetic Diversity of Featherback Fish in Thailand. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)* 34 (2) : 227 – 239.
- Suryadi, H. 2002. Draft Dokumen IBSAP Bagian 3/8 Tinjauan : Keanekaragaman Hayati sebagai Aset Produktif Pembangunan Berkelanjutan. www.polarhome.com (Email: [nasionala@polarhome.com](mailto:nasional@polarhome.com)). 2 Mei 2002.
- Suryani, S.A.M.P., Sukoso dan Sugama, K. 2001. Hubungan Kekerabatan Tiga Spesies Ikan Kerapu Sunu (*Plectropomus* spp.) atas dasar Variasi Genetik. *Biosains* 1 (3) : 100 – 108.
- Susanto, A.H., Amurwanto, A. dan Nuryanto, A. 2004. Studi Keanekaragaman Genetik Ikan Anguilla di Kawasan Segara Anakan untuk Menunjang Upaya Konservasi Hayati. *Biosfera* 21 (1) : 9 – 16.
- Susanto, A.H., Amurwanto, A. dan Nuryanto, A. 2004. Studi Keanekaragaman Genetik Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forskal) di Tambak Pantai Cilacap dan Tegal untuk Menunjang upaya Konservasi Hayati. *Sains Akuatik* 7 (1) : 9 – 15.