

KERAGAMAN GENETIK IKAN CAKALANG (*Katsuwonus pelamis*) DARI KABUPATEN JEMBRANA DAN KARANGASEM, BALI

GENETIC DIVERSITY OF SKIPJACK TUNA (*Katsuwonus pelamis*) FROM JEMBRANA AND KARANGASEM REGENCIES, BALI

FAKHRURRASI FAKHRI¹, INNA NARAYANI¹, I.G.NGURAH KADE MAHARDIKA²

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

²Indonesian Biological Research Centre, Universitas Udayana

Email:in86narayani@yahoo.com

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) yang ada di Kabupaten Jembrana dan Karangasem, Bali. Sampel DNA diambil dari 30 ekor di kabupaten Jembrana dan 30 ekor di kabupaten Karangasem. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *chelex* 10% dan amplifikasi menggunakan metode PCR dengan konfigurasi HotStart pada *control region* DNA mitokondria, menggunakan primer *forward* CRK dan primer reverse CRE. Analisis filogenetika dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan model *Kimura 2-parameter*. Variasi dari setiap sekuen diperoleh dengan menghitung jumlah, persentase dari tiap haplotipe, keragaman haplotipe (*hd*) dan keragaman nukleotida (π) menggunakan program DnaSP 5.10. Analisis *Fst* (*Fixation Index*) berdasarkan frekuensi haplotipe menggunakan Arlequin 3.1. Haplotipe pada sampel Jembrana berjumlah 28 haplotipe dan sampel Karangasem berjumlah 15 haplotipe dengan nilai *hd* secara keseluruhan yaitu $0,997 \pm 0,006$ dan untuk keragaman nukleotida (π) sebesar $0,04694$. Nilai *Fst* yang diperoleh yaitu $-0,00334$ dan *Fst* P sebesar $0,90918 \pm 0,0100$, menunjukkan bahwa populasi ikan cakalang di Kabupaten Jembrana dan Karangasem berasal dari populasi induk yang sama.

Kata kunci : keragaman genetik, ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*), Jembrana, Karangasem, keragaman haplotipe.

ABSTRACT

This research aimed to determine the genetic diversity of skipjack (*Katsuwonus pelamis*) from Jembrana and Karangasem Regencies, Bali. DNA samples were collected from 30 individual fish in the Jembrana district and 30 individuals in the district of Karangasem. DNA extraction was conducted using *chelex* 10% and the amplification using PCR method with HotStart configuration on mitochondrial DNA control region, with CRK forward primer and CRE reverse primer. Phylogenetic analysis was performed in *Neighbor Joining* method with *Kimura 2-parameter* models. Variations of each sequences were obtained by calculating the number, the percentage of each haplotype, haplotype diversity (*hd*) and nucleotide diversity (π) analysed in DnaSP 5:10 program. Analysis *Fst* (*Fixation Index*) based on haplotype frequencies using Arlequin 3.1. There was 29 haplotypes identified from Jembrana population, and 15 from Karangasem. The haplotype diversity value was 0.997 ± 0.006 , and the nucleotide diversity value was of 0.04694 . *Fixation Index* confirmed that both populations were phylogenetically originated from the same descendant cannot be differentiated (*P* values of 0.90918 ± 0.0100).

Keywords: genetic variation, skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) haplotype diversity.

PENDAHULUAN

Kepulauan Indonesia terletak di antara Samudera Pasifik dan Samudera Hindia. Ikan cakalang merupakan salah satu komoditi ikan tangkap di perairan tersebut yang bernilai ekonomi tinggi setelah tuna sirip biru dan tuna sirip kuning dan sangat diminati terutama untuk industri ikan kaleng karena memiliki kandungan gizi yang tinggi dan lengkap serta dagingnya yang relatif lembut. Ikan cakalang juga banyak dijual dalam keadaan beku sebagai komoditi ekspor dan dijual dalam keadaan

segar maupun dikalengkan bahkan di beberapa daerah di Indonesia ada yang menggunakannya sebagai ikan asap.

Ikan cakalang atau *skipjack tuna* termasuk ke dalam famili *Scombridae* dan digolongkan sebagai ikan tuna. Ikan cakalang akan menjadi tangkapan alternatif ketika tuna sirip biru terancam punah dan stok tuna sirip kuning mulai menurun akibat penangkapan yang berlebihan (IOTC Report, 2013). Menurut data Kementerian Kelautan dan Perikanan RI tahun 2013, hal ini disebabkan karena terjadi kelebihan tangkap pada beberapa spesies tuna (Berita Negara Republik

Indonesia 2013)

Variasi genetik dari suatu populasi merupakan gambaran adanya perbedaan intraspecies. Dengan berkembangnya teknologi, muncul berbagai macam metode baru di bidang molekuler. Berdasarkan hasil studi yang telah dilakukan secara meristik, morfometrik dan elektroforesis karakter dari ikan cakalang yang berada di Samudera Pasifik, bahwa variasi genetik ikan cakalang sangat kecil dan menunjukkan sedikit perbedaan antarindividu dari kedalaman laut yang berbeda (Argue, 1981). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui variasi DNA ikan cakalang di wilayah Bali.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel ikan cakalang dilakukan di Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Pengambangan, di Kabupaten Jembrana pada bulan November 2013 dan Pasar Karangasem pada bulan Januari 2014 masing-masing sebanyak 30 sampel. Sampel yang diambil adalah sirip punggung berukuran 1x1 mm dan disimpan dalam tabung yang sudah diisi etanol 96%.

Ekstraksi DNA

Potongan sirip punggung (sekitar 1x1 mm) tersebut dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* yang sudah berisi 250 µl larutan *chelex* 10% dalam ddH_2O (Walsh *et al.*, 1991) lalu diuraikan dengan vortex selama 1 menit. Kemudian, campuran disentrifuge (8000 rpm) selama 1 menit menggunakan *microcentrifuge*, dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 95°C menggunakan *heating block*. Sampel diuraikan kembali dengan vortex selama 1 menit dan disentrifuge selama 1 menit (8000 rpm). Sampel DNA berupasupernatan diambil dan disimpan dalam lemari es pada suhu 2°-8°C sampai digunakan lebih lanjut.

Amplifikasi

Amplifikasi daerah *control region* pada DNA mitokondria dilakukan menggunakan primer CRK (5'-AGCTC AGCGC CAGAG CGCCG GTCTT GTAAA) dan CRE (5'-CCTGA AGTAG GAACC AGATG) (Lee, *et al.*, 1995) Proses amplifikasi diawali dengan pembuatan 2 buah mastermix. Master mix I terdiri dari 5,5 µl ddH_2O , 1,5 µl 10x PCR Buffer (PE-II), 2,5 µl dNTPs (8 mM), 2,0 µl $MgCl_2$ solution (25 mM), 1,25 µl primer CRK (10 µM), 1,25 µl primer CRE (10 µM) (Lee *et al.*, 1995). Master mix II terdiri dari 9 µl ddH_2O , 1 µl 10X PCR Buffer (PE-II), 0,125 µl PE Amplitaq (5 units/µl). Master mix I dimasukkan ke dalam tabung PCR yang sudah berisi 1 µl DNA template. Setelah itu 14 µl mastermix I dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* khusus untuk PCR. Tabung tersebut dimasukkan ke dalam mesin penyiklus DNA (*Thermal Cycler, Applied Biosystem*[®], Massachusetts, USA). Suhu dinaikkan hingga 80°C dan dimasukkan master mix II ke dalam masing-masing tabung PCR. Konfigurasi suhu amplifikasi yang digunakan adalah sebagai berikut: fase pra-denaturasi (15 detik pada suhu 94°C), denaturasi (30 detik pada suhu 94°C), penempelan primer (30 detik pada suhu

50°C), pemanjangan fragmen (45 detik dengan suhu 72°C). Semua siklus diulang sebanyak 38 kali. Untuk penyempurnaan, tahap akhir pemanjangan dilakukan selama 10 menit pada suhu 72°C) dan tahap penyimpanan pada suhu 24°C selama 1 menit.

Elektroforesis

DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam SB (sodium borat) buffer yang mengandung etidium bromida pada tegangan 100 Volt, dengan arus 400 mA selama 30 menit. Selanjutnya visualisasi fragmen DNA menggunakan *transluminator ultraviolet (UV)* dan didokumentasi dengan kamera digital.

Sekuensing

Sekuensing fragmen DNA hasil amplifikasi dilakukan di UC Berkeley DNA Sequencing Facility, USA.

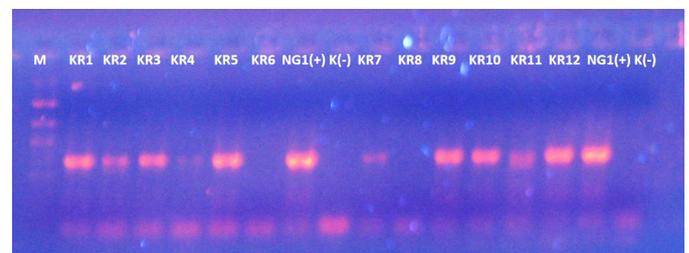
Analisis Data

Sekuen hasil penjabaran dianalisis dengan menggunakan *Clustal W* dalam program *MEGA 5* (Tamura *et al.*, 2011) kemudian dibandingkan dengan sekuen yang ada di *Gen Bank* menggunakan fasilitas *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* yang terdapat dalam situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analisis filogenetika dilakukan dengan menggunakan metode Neighbor Joining (Tamura *et al.*, 2011).

Variasi dari setiap sekuen dihitung untuk mengetahui jumlah dan persentase dari tiap haplotipe, keragaman haplotipe (*haplotype diversity, hd*) dan keragaman nukleotida (π) yang diolah menggunakan program DnaSP 5.10 (Rozas *et al.*, 2003). Selanjutnya dilakukan analisis *Fst (Fixation Index)* untuk melihat perbedaan antarpopulasi berdasarkan frekuensi haplotipe menggunakan program Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

HASIL

Hasil amplifikasi produk PCR dari 60 sampel yang diperoleh dari kabupaten Jembrana dan Karangasem, Bali, dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 1. Visualisasi hasil elektroforesis sampel kabupaten Karangasem (KR1-KR12) dan kabupaten Jembrana (NG1). M: DNA 100 bp ladder Pita dibawah 400 bp adalah primer dimer

Dari hasil elektroforesis, 60 sampel sirip cakalang hanya 44 sampel yang tampak pada Gambar 1. Hasil sekuensing dapat terbaca dengan baik berkisar antara 508-532) bp. Hasil analisis dengan fasilitas BLAST

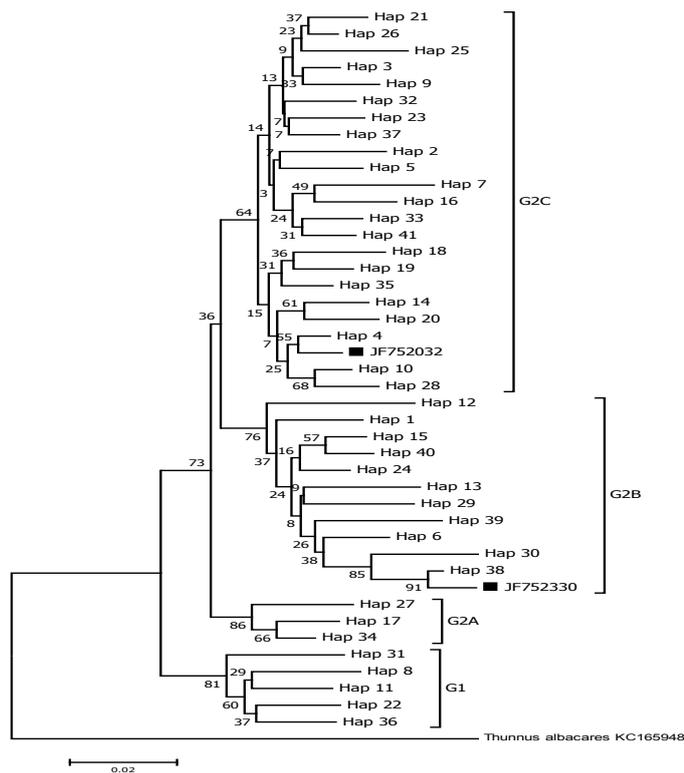
menunjukkan bahwa ikan cakalang yang diperoleh di Kabupaten Jembrana dan Karangasem dikonfirmasi sebagai spesies *Katsuwonus pelamis*. Semua data diregistrasi di GenBank dengan kode akses KMO94130-KMO94173.

Analisis keragaman haplotipe menggunakan program DnaSP 5.10 menghasilkan 41 haplotipe, di mana sampel Jembrana berjumlah 28 haplotipe dan Karangasem 15 haplotipe dengan 2 haplotipe terdapat di kedua lokasi. Nilai hd secara keseluruhan adalah $0,997 \pm 0,006$ dan untuk keragaman nukleotida (π) sebesar $0,04694$.

Tabel 1. Jumlah sampel (n), jumlah haplotipe (h), keragaman haplotipe (hd) dan keragaman nukleotida (π) ikan cakalang (*K. pelamis*) dari populasi Jembrana dan Karangasem, Bali.

Lokasi	N	h	Hd	π
Jembrana	29	28	$0,998 \pm 0,010$	0,04684
Karangasem	15	15	$1,000 - 0,024$	0,04995
Keseluruhan	44	41	$0,997 \pm 0,006$	0,04694

Hasil analisis filogenetik untuk melihat kekerabatan antarhaplotipe menggunakan metode Neighbor Joining dengan model Kimura 2-parameter menyatakan bahwa terdapat dua grup (*clade*) ikan cakalang yaitu G1 dan G2 (Gambar 2).



Gambar 2. Pohon filogeni yang menunjukkan kekerabatan antarhaplotipe dalam populasi ikan cakalang dari Jembrana dan Karangasem, Bali, dengan metode Neighbor Joining dan model Kimura 2-parameter. Sampel dengan kode NG berasal dari Jembrana dan KR dari Karangasem. Sekuens standar *Katsuwonus pelamis* dari GenBank dengan kode akses ditandai dengan kotak persegi (□).

Data haplotipe dianalisis untuk mendapatkan nilai F_{st} dan P menggunakan program Arlequin 3.5. Nilai F_{st} yang diperoleh adalah $-0,00334$ dan nilai P dari F_{st} sebesar $0,90918 \pm 0,0100$.

PEMBAHASAN

Pada hasil penelitian ini, didapat nilai hd secara keseluruhan yaitu $0,997 \pm 0,006$, dengan nilai hd pada sampel Jembrana adalah $0,998 \pm 0,010$ dan Karangasem $1,000 - 0,024$ (nilai $hd \geq 0 < 0,5$ keragaman haplotipe rendah, sedangkan $hd > 0,5 \leq 1$ keragaman haplotipe tinggi). Nilai ini menunjukkan bahwa populasi ikan cakalang pada daerah Jembrana dan Karangasem memiliki tingkat keragaman haplotipe tinggi. Haplotipe yang beragam ini menunjukkan tingkat keragaman genetik yang tinggi dalam suatu populasi. Semakin beragam haplotipe dari dua daerah tersebut maka tingkat keragaman genetik akan semakin tinggi dan begitu juga sebaliknya (Smith dan Chesser, 1981). Nilai hd pada lokasi Jembrana (28 sampel) lebih rendah dibandingkan dengan Karangasem (15 sampel), yang berarti bahwa sampel dari Jembrana memiliki tingkat keragaman yang lebih rendah dibanding dengan sampel dari Karangasem.

Pada penelitian ini diperoleh hasil adanya kedekatan genetik dengan data genetik ikan cakalang dengan melihat hasil sekuen DNA dan diperoleh tingkat homologi 96-99%. Temuan ini serupa dengan pola umum genetik ikan tuna secara umum di dunia, yaitu bahwa populasi ikan tuna dunia sangat bervariasi dan terjadi pencampuran antarpopulasi pada saat migrasi dalam rentang laut yang luas yang disebut *panmictic species*. *Panmictic species* memiliki kemampuan individu dalam suatu populasi untuk bergerak bebas dalam habitatnya yang mencapai ribuan kilometer dan akan terjadi perkawinan bebas antar populasi (Dobzhansky, 1950).

Perbedaan populasi kedua daerah tersebut dianalisa dengan uji F_{st} , hasil yang diperoleh yaitu $-0,00334$ (nilai $F_{st} \geq 0 < 0,5$ tidak berbeda nyata, $F_{st} > 0,5 \leq 1$ berbeda nyata). Nilai F_{st} dari penelitian ini ($-0,00334$) menunjukkan bahwa populasi Jembrana dan Karangasem tidak berbeda nyata. Walaupun keragaman haplotipenya tinggi dalam kedua populasi, namun nilai dari keragaman nukleotidanya rendah. Sebaran haplotipe pada kedua lokasi tidak memperlihatkan perbedaan struktur antarpopulasi. Pada sampel Karangasem hanya separuh dari sampel keseluruhan yang berhasil teramplifikasi sehingga menyebabkan nilai menjadi negatif. Nilai F_{st} dapat bernilai negatif ketika jumlah sampel sedikit (Bird *et al.*, 2011). Nilai P dari uji F_{st} yang diperoleh adalah $0,90918 \pm 0,0100$ (jika nilai $P \geq 0 < 0,05$ maka kedua populasi berbeda nyata, sedangkan jika $P > 0,5 \leq 1$ tidak berbeda nyata). Pada tingkat signifikan $0,05$ kedua populasi tidak berbeda nyata.

Hal ini mengindikasikan bahwa populasi ikan cakalang dari Jembrana dan Karangasem berasal dari populasi induk yang sama dan bermigrasi dengan pola yang sama.

SIMPULAN

Keragaman genetik ikan cakalang yang diperoleh di kabupaten Jembrana dan Karangasem, Bali, sangat tinggi, namun diyakini berasal dari populasi induk yang sama.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada *Indonesian Biodiversity Research Center (IBRC)* yang diketuai oleh kepada Prof. Gusti Ngurah Kade Mahardika, yang telah membantu mendanai dan membimbing selama penelitian, dan Dita Cahyani (*Indonesian Biodiversity Research Center-IBRC*) yang membantu selama proses analisis keragaman haplotipe.

DAFTAR PUSTAKA

- Argue, A.W., 1981. Report of the second skipjack survey and assessment programme workshop to review results from genetic analysis of skipjack blood samples. Tech. Rep. Skipjack Surv. Assessmt Progm. S. Pacif. Commn (Noumea. New Caledonia) 6, 1-37.
- Bird, C.E., A.K. Stephen., E.S. Peter and J.T. Robert. 2011. Detecting and Measuring Genetic Differentiation. *CrustIssues*19. 39:10-27
- Dobzhansky, T. 1950. Mendelian populations and their evolution. *American Naturalist*. 84:401-418
- Excoffier, L., G. Laval and S.Schneider. 2009. Arlequin ver 3.5, An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Zoology. University of Berne. Baltzerstrasse 6. 3012 Bern, Switzerland
- Ely, B., J. Vinas, J.R.A. Bremer, D. Black, L. Lucas, K. Covello, A.V. Labrie and E. Thelen. 2005. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *BMC Evolutionary Biology*. 5:19
- Lee, W.J., W.H. Howell, T.D. Kocher. 1995. Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *J Mol Evol*. 41:54-66
- Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor PER.29/MEN/2012 tentang Pedoman Penyusunan Rencana Pengelolaan Perikanan di Bidang
- Penangkapan Ikan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2013 Nomor 46)
- Report of the Sixteenth Session of the IOTC Scientific Committee. December 2013
- Rozas, J., J.C. Sanchez-DelBarrio., X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. *DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods*. *Bioinformatics* 19:2496-2497
- Smith, M.H., R.K. Chesser. 1981. Rationale for conserving genetic variation of fish gen poll. *Ecology Bulletin of Stockholm*, 23: 119-130.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA 5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol.Biol.Evol*.10.1093.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger, R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*. 10: 506-513.