

Full Paper

PROFIL HETEROGENITAS GENETIK INDUK UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) TURUNAN F1 MELALUI ANALISIS DNA MITOKONDRIA-RFLP DAN RAPD

GENETIC HETEROGENEITY PROFILE OF GIANT TIGER PRAWN (*Penaeus monodon*) BROODSTOCK F1 REVEALED BY MITOCHONDRIA DNA-RFLP AND RAPD

Bambang W. Prastowo^{1)*}, Rahayu Rahardianti¹⁾, Evi Maftuti Nur²⁾ dan Arief Taslihan¹⁾

¹⁾Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara
 Jl. Cik Lanang PO.Box 1 Bulu – Jepara
 Divisi Genetika, Laboratorium Manajemen Kesehatan Hewan Akuatik
²⁾Penulis untuk korespondensi: e-mail: bambang_fds@yahoo.com

ABSTRACT

Production of high quality of shrimp broodstock needs proper domestication and improvement of their genetic quality. MCBAD Jepara has conducted research to evaluate genetic heterogeneity of *Penaeus monodon* broodstock F1 using *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) and *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) analysis. For RFLP analysis, amplification product of 16SrDNA of mitochondrial DNA was digested with restriction enzymes. According to the RFLP analysis, heterogeneity value of *P. monodon* F1 broodstock population was 0.0422; male F1 population was 0.0613 and female F1 population was 0.1252. The primer used in RAPD analysis was OPA2. According to the RAPD analysis, heterogeneity value of *P. monodon* F1 broodstock population was 0.0417; male F1 population was 0.0653 and female F1 population was 0.1104. The results from these researches have shown that either RFLP or RAPD can be used as a family specific marker for *Penaeus monodon*.

Key words: Genetic marker, Heterogeneity, *Penaeus monodon*, RFLP, RAPD

Pengantar

Beberapa jenis marker genetik dapat dipergunakan untuk melakukan analisa variasi genetik di dalam populasi induk udang windu. Diantara jenis marker genetik tersebut, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan jenis marker yang banyak digunakan, disebabkan oleh tingkat polimorfismenya yang memberikan hasil resolusi yang tinggi. Pemahaman mengenai marker genetik ini dapat memberikan kejelasan mengenai hubungan diantara perbedaan genetik dan *performance* induk udang yang berimplikasi terhadap daya adaptasinya di dalam suatu populasi. Penggunaan marker genetik tersebut sangatlah sesuai dengan seluruh program *breeding* tradisional yang didasarkan pada pendekatan fenotipnya. Penggunaan marker genetik untuk bidang perikanan sangatlah tertinggal apabila dibandingkan dengan sektor lainnya, seperti tanaman pangan, industri peternakan dan hewan vertebrata tingkat tinggi lainnya dalam kurun waktu 20 tahun terakhir ini. Baru akhir-akhir ini, teknologi ini dipergunakan untuk bidang perikanan seperti pada salmon dan oyster dengan tingkat keberhasilan yang sangat tinggi. Sebagai contoh, pada salmon, dengan penerapan seleksi genetik disertai dengan program fenotip

lainnya selama dua belas tahun terakhir ini telah dapat menghasilkan strain yang pertumbuhannya 30% lebih cepat sehingga dapat menurunkan biaya produksi (pakan, tenaga kerja, bahan bakar) hingga lebih dari 25% (Benzie, 2005). Prestasi yang telah dicapai, baik pada sektor akuakultur maupun pertanian ini, telah didokumentasikan dengan baik dan menunjukkan adanya suatu kematangan dan perkembangan yang baik didalam bisnis kedua sektor tersebut. Namun situasi yang terjadi industri budidaya udang sangat berbeda, walaupun mempunyai nilai ekonomi yang sangat tinggi di pasaran dunia tetapi penerapan teknologi genetik ini masih terfragmentasi, skalanya sangat terbatas dan penelitian yang dilakukan barulah pada permulaan saja. Teknologi awal dengan menggunakan variasi allozyme untuk melihat variasi genetik udang di alam dari beberapa sumber masih belum dapat memberikan hasil yang memuaskan yang disebabkan oleh kurangnya variasi genetik pada udang dari sumber yang berbeda, serta karena kurang sensitifnya teknik ini (Hedgecock, *et al.*, 1982; Benzie *et al.*, 1993). Kendala serupa terjadi pada penelitian dengan menggunakan marker mitokondria DNA walaupun telah melihat struktur genetik udang pada jarak geografis lebih dari 1000 km (Benzie, 2000). Penelitian mengenai struktur genetik udang dari

pembenihan juga belum banyak dilakukan penelitian. Namun demikian terdapat dua hasil penelitian yang cukup memberikan informasi mengenai hal ini, yang pertama oleh Sbordon *et al.*, (1986) yaitu mengenai adanya penurunan produktivitas induk di pembenihan yang disebabkan oleh berkurangnya variabilitas genetik berdasarkan varian-varian allozyme yang diamati pada induk *P. japonicus* yang dibudidayakan di Italia. Informasi kedua berasal dari Malecha and Hedgecock (1989) yang menuliskan mengenai usaha-usaha yang dilakukan untuk mempertahankan jumlah populasi efektif yang lebih besar di dalam suatu program *breeding* untuk mempertahankan variabilitas genetik keturunannya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi keragaman genetik induk udang windu keturunan F1 yang dihasilkan dari panti pembenihan melalui pengamatan mtDNA-RFLP dan RAPD.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan : sampel udang windu, 10% Chelex-100 (Bio-Rad), Proteinase K (20 mg/l; Roche), enzim restriksi: *Nde* II (GATC; Roche), primer untuk RFLP: 16SrDNA-1 (5'-CGC CTG TTT AAC AAAAAC AT-3') 16SrDNA-2 dan (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T-3'; Sigma), serta primer untuk RAPD: OPA 2 (5'-TGC CGA GCT G-3'; Sigma), reagensia PCR kit (Roche), gel untuk elektroforesis, 1x buffer TBE, DNA ladder 100 bp, ethidium bromide

Metode Sampling

Sampel untuk uji coba diperoleh dari bagian terbesar proksimal pleopod induk udang windu keturunan F1 yang didapatkan dari kegiatan NSBC BBPBAP Jepara. Sampel yang diambil sebanyak 27 sampel dari induk udang windu yang terdiri dari 18 sampel induk jantan dan 9 sampel induk betina. Induk udang windu ini tetuanya berasal dari induk alam yang diambil dari daerah Selat Sunda. Sampel-sampel tersebut dibawa kembali ke laboratorium dalam es dan disimpan dalam freezer -70°C hingga diperlukan.

Ekstraksi DNA dan amplifikasi PCR

Total DNA diekstraksi dari sampel dengan mempergunakan 10% chelex-100 dan Proteinase K, sesuai dengan prosedur Ovenden (2000).

mtDNA-RFLP pada udang windu (*P. monodon*)

Daerah 16S rDNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer 16SrDNA-1 dan 16SrDNA-

2. Amplifikasi dilakukan dalam 25 µl volume akhir yang terdiri dari : 2,5 µl genome, 11 µl H₂O, 2,625 µl 10 x buffer, 2,625 µl dNTP (2,5 mM), 0,625 µl untuk masing-masing primer-1 (10 mM) dan primer-2 (10 mM), 5,25 µl MgCl₂ (25 mM), dan 0,25 µl Taq (10 mM). PCR thermocycler diatur sebagai berikut *hot start* 93°C selama 2 menit diikuti oleh 30 siklus dari denaturasi 93°C selama 30"; *annealing* 50°C selama 30" dan ekstension 72°C selama 45" dan final ekstension 72°C selama 5' serta temperatur penyimpanan pada 4°C. Produk amplifikasi PCR tersebut kemudian dipotong dengan menggunakan 6 enzim restriksi yaitu *Nde* II, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Eco* RV dan *Bam* HI. Pemotongan dilakukan dalam 6 µl volume akhir yang terdiri dari 0,6 µl H₂O, 1,2 µl Buffer, 0,2 µl RE; dan 4,0 µl produk PCR. Kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 3,5 jam.

RAPD pada udang windu (*P. monodon*)

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer OPA 2 (5'-TGC CGA GCT G-3') dalam 25 µl volume akhir yang terdiri dari : 1,25 µl genome; 11,75 µl H₂O; 2,625 µl 10 x Buffer; 2,625 µl dNTP (2,5 mM); 1,25 µl primer (10 mM); 5,25 µl MgCl₂ (25 mM); dan 0,25 µl Taq (10 mM). PCR thermocycler diatur sebagai berikut *initial denaturation* 94°C, 4 menit, diikuti oleh 35 siklus denaturasi 94°C, 1 menit; *annealing* 36°C, 1 menit dan ekstension 72°C, 2 menit dan final extension 72°C, 5 menit serta temperatur penyimpanan pada 4°C.

Analisa data

Pola-polapemotongan yang diperoleh dari enzim restriksi *Nde* II untuk pemotongan segmen DNA mitokondria udang windu kemudian disusun secara alfabet A, B, C dan seterusnya sesuai dengan frekuensinya. Pola pemotongan yang telah diperoleh tersebut merupakan data utama untuk penghitungan nilai heterogenitas di dalam populasi keseluruhan, di dalam populasi induk jantan dan induk betina udang windu turunan F1.

Hasil dan Pembahasan

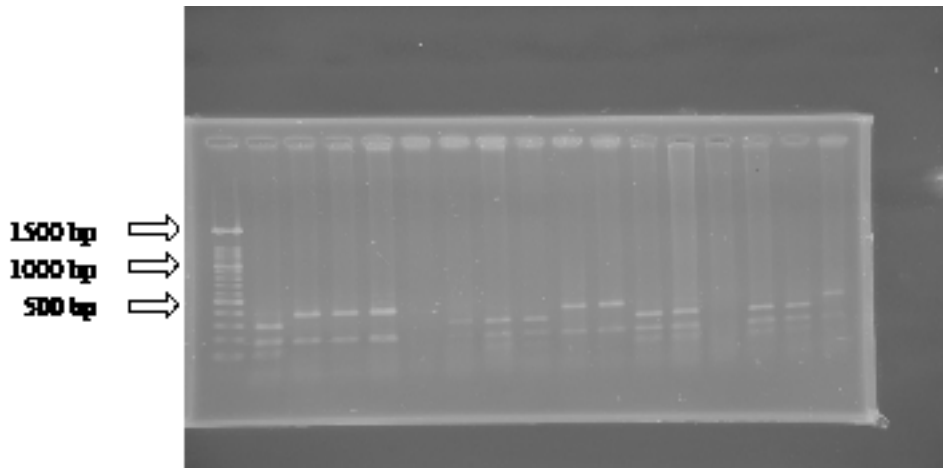
Hasil

Pengukuran fragmen DNA

Pada uji coba ini dilakukan pengukuran fragmen DNA dengan menggunakan 2 jenis genetik marker yang berbeda yaitu dengan marker *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dengan menggunakan primer 16SrDNA dan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dengan menggunakan primer OPA 2 untuk induk udang windu. Pengukuran fragmen DNA pada masing-masing genetik marker tersebut dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Ukuran fragmen (bp) berdasarkan analisa dengan marker RFLP pada udang windu (*P. monodon*) F1.

Spesies	Ukuran Fragmen	Enzim Restriksi					
		<i>Nde</i> II	<i>Hae</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Bam</i> HI
<i>P. monodon</i>	125	-					
	175	-					
	300	-					
	400	-					
	425	-					
	500		-	-	-	-	-



Gambar 1. Profil pemotongan DNA mitokondria induk udang windu F1 dengan menggunakan marker RFLP pada lokus *Nde* II. (Keterangan: lajur 1 : Marker, lajur 2-17 : profil pemotongan DNA mitokondria).

Tabel 2. Ukuran fragmen berdasarkan analisa dengan marker RAPD pada udang windu (*P. monodon*) F1.

Spesies	Ukuran fragmen (bp)
	OPA 2
<i>P. monodon</i>	700
	825
	1100
	1200
	1400

Tabel 1 memperlihatkan hasil pemotongan dengan genetik marker RFLP pada udang windu yang menggunakan 6 enzim restriksi yaitu *Nde* II, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Eco* RV dan *Bam* HI. Dari ukuran awal DNA mitokondria udang windu sebelum dipotong sebesar 500 bp, maka hanya 1 enzim restriksi yaitu *Nde* II yang menunjukkan adanya pemotongan pada DNA mitokondria induk udang windu tersebut pada 125, 175, 300, 400 dan 425 bp (Gambar 1). Kelima enzim restriksi lainnya tidak menunjukkan adanya pemotongan pada DNA mitokondria induk windu tersebut dan terlihat adanya satu pita DNA dengan ukuran 500 bp.

Tabel 2 memperlihatkan hasil pemotongan dengan genetik marker RAPD pada udang windu dengan

menggunakan 2 spesies-spesifik primer yaitu OPA2 dan B20, dimana hanya satu primer yaitu OPA2 yang menunjukkan adanya pemotongan pada DNA induk udang windu tersebut sebesar 700, 825, 1100, 1200 dan 1400 bp (Gambar 2).

Pola fragmentasi dan nilai heterogenitas induk udang

Pemotongan 16SrDNA pada DNA mitokondria induk udang windu dengan menggunakan enzim restriksi *Nde* II menghasilkan 3 fragmen restriksi. Pola fragmentasi DNA induk udang windu menggunakan marker RAPD dengan primer OPA juga menghasilkan 3 pola fragmentasi. Kisaran ukuran DNA yang didapatkan dari penelitian ini berbeda disebabkan karena RFLP dianalisa pada daerah DNA mitokondria

Tabel 3. Pola fragmen restriksi DNA mitokondria berdasarkan analisa dengan marker RFLP serta pola fragmentasi DNA udang windu dengan marker RAPD pada induk udang windu F1.

Marker Genetik	Spesies	Primer / Enzim Restriksi	Pola Fragmentasi
RFLP	<i>P. monodon</i>	16SrDNA <i>Nde</i> II	C : 125, 175, 400 D : 125, 175, 300, 400 E : 125, 175, 400, 425
RAPD	<i>P. monodon</i>	OPA2	C : 700, 825, 1200 D : 700, 825, 1100, 1200 E : 700, 825, 1100, 1200, 1400

sedangkan RAPD dianalisa pada daerah DNA inti. Secara lengkap pola fragmentasi DNA mitokondria dan DNA induk udang windu F1 dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan pola fragmentasi tersebut kemudian dapat dilakukan penghitungan nilai heterogenitas di dalam populasi, diantara induk jantan dan betina di dalam populasi pada induk udang windu dan vanamei keturunan F1 pembenihan (Tabel 4).

Tabel 4. Nilai heterogenitas di dalam populasi induk udang windu F1 dengan marker RFLP dan RAPD.

Spesies	Marker	Nilai Heterogenitas		
		Populasi	Jantan	Betina
<i>P. monodon</i>	RFLP	0,0422	0,0613	0,1252
<i>P. monodon</i>	RAPD	0,0417	0,0653	0,1104

Tabel 4 memperlihatkan tidak adanya perbedaan nilai heterogenitas di dalam populasi, maupun diantara populasi induk jantan serta induk betina udang windu tersebut diantara dua marker genetik RFLP dan RAPD. Tabel tersebut juga memperlihatkan bahwa nilai heterogenitas induk jantan jauh lebih rendah apabila dibandingkan dengan nilai heterogenitas induk betina berdasarkan analisis dua marker genetik yang berbeda.

Pembahasan

Berdasarkan hasil uji coba ini dapat dilihat potensi dari genetik marker RFLP dan RAPD sebagai marker spesifik famili berdasarkan variasi genetik yang didapatkan. Keuntungan penggunaan RFLP sebagai marker genetik pada beberapa spesies ikan karena sifatnya yang sebagai kodominan marker, yaitu masing-masing alel pada suatu individu diamati pada saat analisis dilakukan. Kondisi ini menyebabkan terjadinya perbedaan ukuran DNA yang seringkali cukup besar dan memudahkan dalam melakukan

skoring. Namun salah satu kekurangannya ialah didapatkannya level polimorfisme yang relatif rendah. Marker RAPD sendiri merupakan marker genetik yang relatif lebih baru dibandingkan dengan RFLP. Salah satu kelebihan adalah karena dipergunakannya primer dengan pasangan basa yang pendek (8-10 bp). Primer dengan jumlah pasangan basa yang pendek ini menyebabkan temperatur untuk annealing pada saat PCR menjadi rendah (antara 36-40°C) sehingga amplifikasi produk DNA menjadi sangat tinggi, dimana masing-masing produk amplifikasi tersebut mewakili lokus yang berbeda. Mengingat sifat dari primer yang akan mencari lokasi penempelan yang sesuai (kompatibel), maka produk amplifikasi yang banyak akan memudahkan primer untuk menemukan pasangan basa yang kompatibel dan akan memunculkan polimorfisme yang tinggi (Liu & Cordes, 2004).

Saat ini, mtDNA-RFLP sangat umum dipergunakan untuk penentuan struktur populasi intraspesifik. Hal ini didasarkan pada alasan bahwa dua materi dari genom mitokondria, evolusi yang cepat tanpa pengaturan ulang secara besar-besaran dan pewarisan maternal yang dominan dalam sebagian besar spesies, memungkinkan keturunan betina untuk dilacak dalam periode waktu yang relatif pendek (Avise, 1994). Berdasarkan sifat haploid dan mode pewarisan, ukuran populasi efektif yang diperlukan untuk analisis mtDNA adalah lebih kecil dibandingkan yang berasal dari gen-gen inti, kecuali terdapat heteroplasmia secara ekstensif atau rasio jenis kelamin menjadi sangat bias karena adanya hewan betina. Peningkatan ini sangat mudah terpengaruh oleh aliran genetik, *inbreeding* dan kejadian mutasi (Ward and Grewe, 1994 dalam Klinbunga *et al.*, 1998). Namun demikian publikasi yang berhubungan dengan struktur genetik yang didasarkan pada variabilitas mtDNA udang windu, *P. monodon* masih sedikit sekali. Publikasi pertama dari spesies ini ditulis oleh Benzie *et al.*, (1993) yang menentukan struktur populasi *P. monodon* di Australia

yang dikoleksi dari Cairns (n=6) dan Townsville (n=6) dari pantai timur dan sungai De Grey (n=3) dari pantai barat. Keseluruhan mitokondria DNA diisolasi dan dianalisa dengan *Bam* HI, *Eco* RV, *Sac* I dan *Eco* O109. Frekuensi genotip mtDNA sangat berbeda diantara populasi dibagian timur dan dibagian barat ($P < 0,05$). Sebuah publikasi juga melaporkan mengenai variasi genetik dalam strain udang windu yang dipelihara di laboratorium di Fiji yang berasal dari Australia dan Malaysia (Bouchon *et al.*, 1994 dalam Klinbunga *et al.*, 1998). Meskipun demikian, data mtDNA RFLP dari kedua studi tersebut diperoleh dari jumlah sampel yang sedikit jumlahnya.

Penentuan struktur populasi intraspesifik udang windu dengan menggunakan marker RAPD juga telah banyak dipergunakan akhir-akhir ini. Penelitian yang dilakukan oleh Klinbunga *et al.*, (2001) mengindikasikan hasil RAPD-PCR tentang adanya diversitas genetik yang tinggi dengan *P. monodon* di Thailand. Didapatkan 88 genotip RAPD dan adanya perbedaan genetik yang tinggi diantara Trat dan sampel lainnya (sampel Chumphon dan Andaman) dengan hanya mempergunakan 3 primer oktanukleotida. Garcia dan Benzie (1995) dalam Klinbunga *et al.*, (2001) mengidentifikasi 3 polimorfik hasil RAPD marker dari tetua dan turunan 6 keluarga *P. vannamei* dengan mempergunakan 14 primer yang berbeda. Marker-marker tersebut bersifat spesifik-famili, dan berguna untuk program selektif *breeding* pada level famili. Identifikasi dari sejumlah besar genotip dan marker genetik yang memungkinkan pada uji coba ini melalui teknik RAPD menunjukkan nilai dari pendekatan ini untuk monitoring polimorfisme genetik di dalam stok *P. monodon* di *hatchery*. Tassanakajon *et al.*, (1998) dalam Klinbunga *et al.*, (2001) menemukan bahwa primer UBC428 merupakan marker RAPD spesifik-populasi (950 bp) untuk *P. monodon* asal Satun. Dalam uji coba ini dipergunakan marker UBC428 digabung dengan UBC268 untuk memverifikasi pertumbuhan dan kelangsungan hidup diantara stok *P. monodon* yang berbeda pada program budidaya secara komersial.

Data yang ditampilkan dari berbagai penelitian, baik dengan penggunaan marker RFLP serta RAPD, serta beberapa kelebihan dan kekurangan dari masing-masing marker genetik tersebut dapat memberikan informasi yang berharga mengenai aplikasi kedua marker genetik tersebut terutama untuk menganalisa keragaman genetik induk udang windu keturunan F1. Namun demikian dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa penggunaan kedua marker genetik tersebut

untuk menganalisa keragaman genetik induk udang windu keturunan F1 memberikan hasil yang tidak jauh berbeda. Dari hasil penghitungan nilai heterogenitas induk udang windu didapatkan hasil yang hampir sama yaitu 0,0422 dan 0,0417, demikian pula penghitungan nilai heterogenitas antara induk jantan dan betina udang windu turunan F1nya. Dengan demikian, baik marker genetik RFLP dan RAPD dapat dipergunakan sebagai marker spesifik famili pada udang windu.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

1. Marker genetik RFLP dan RAPD dapat dipergunakan sebagai marker spesifik famili pada spesies udang windu.
2. Rendahnya nilai heterogenitas induk udang windu turunan F1 (sebesar 0,0442) dikarenakan sumber induk alamnya sendiri (Selat Sunda) mempunyai potensi keragaman genetik yang rendah dan sedikitnya jumlah induk alam yang dijadikan sebagai sumber induk untuk pembenihan.
3. Nilai heterogenitas induk jantan udang windu turunan F1 lebih kecil dibandingkan dengan induk betinanya.

Saran

Untuk strategi jangka panjang yang lebih integral dan berkelanjutan, maka kombinasi antara pendekatan-pendekatan dasar biologi dengan aplikasi dari program genetik molekuler akan semakin mempercepat program domestikasi spesies penaeid ini di Indonesia.

Daftar Pustaka

- Avise, J.C. 1994. Molecular markers. Natural history and evolution. Chapman and Hall. London.
- Benzie, J.A.H., E. Ballment & S. Frusher. 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia : Preliminary data from allozymes and mtDNA. *Aquaculture* 111, 89-93.
- Benzie, J.A.H., E. Ballment & S. Frusher. 2000. Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research*, 31, 95-119.
- Hedgecock, D., M.L. Tracey & K. Nelson. 1982. The biology of Crustacea. L.G. Abele, Academic Press, New York, USA.
- Klinbunga, S., D.J. Penman, B.J. McAndrew, A. Tassanakajon & P. Jarayabhand. 1998. Genetic

variation, population differentiation and gene flow of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) inferred from mtDNA-RFLP data. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Aisan Fisheries Forum. Thailand.

Klinbunga, S., D. Siludjai, W. Wudthijinda, A. Tassanakajon, P. Jarayabhand & P. Menasveta. 2001. Genetic heterogeneity of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and Mitochondrial DNA RFLP analyses. *Marine Biotechnology* 3, 428-438.

Sbordoni, V.E. E. Matthaeis, C.M. Sbordoni, G. Rosa, & M. Mattoccia. (1986). Bottleneck effects and depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*, 57, 239-251.

Ovenden, J. 2000. Development of restriction enzyme markers for red snapper (*Lutjanus erythropterus* and *Lutjanus malabaricus*) stock discrimination using genetic variation in mitochondria DNA. Molecular Fisheries Laboratory, Southern Fisheries Center.