

**Full Paper**

**VARIASI GENETIK IKAN HIAS CLOWN, *Amphiprion ocellaris***
**GENETIC VARIATION OF CLOWN FISH, *Amphiprion ocellaris***

Sari Budi Moria<sup>\*)</sup>, Ida Komang Wardana<sup>)</sup>, Gusti Ngurah Permana<sup>)</sup>,  
Ahmad Muzaki<sup>)</sup> dan Ketut Maha Setiawati<sup>)</sup>

**Abstract**

Evaluation of genetic variation of wild clown fish, *Amphiprion ocellaris* was conducted to collect basic knowledge in order to develop sustainable ornamental fish breeding under controlled condition. Clown fish samples were collected from three locations, i.e. Bali, Madura, and South Sulawesi waters. PCR amplification of mt-DNA by using universal primer obtained single band with molecule weight of 461 bp. RFLP of mt-DNA with *Hinf I*, *Mbo I* and *Nla III* restriction enzymes showed that the highest genetic variation as 0.581 was found from South Sulawesi population and the lowest as 0.382 from Bali, while Madura population has genetic variation of 0.456. Genetic distance of clown fish from South Sulawesi and Madura was closer (0.107) comparing to clown fish from Bali population (0.270).

**Key words: Clown fish, Genetic variation, RFLP-mt-DNA**
**Pengantar**

Indonesia merupakan negara kepulauan yang dua pertiga wilayahnya merupakan lautan dan kaya akan terumbu karang yang merupakan habitat berbagai jenis ikan hias maupun ikan konsumsi. Sebagian besar hasil tangkapan ikan hias laut Indonesia diekspor ke luar negeri dan menjadi sumber devisa dengan negara tujuan Singapura, Malaysia, Hongkong, Taiwan, Cina dan sebagian Eropa (Poernomo *et al.*, 2003).

Salah satu sumber daya hayati laut adalah ikan hias laut yang beraneka ragam jenisnya, yang mempunyai peluang cukup baik di pasar internasional. Ikan hias laut *Amphiprion ocellaris* (*clown fish*) merupakan ikan hias yang hidup di perairan terumbu karang (*coralreef*) (Allen, 1972) (Gambar 1).

Ikan ini banyak tersebar di Teluk Jakarta, Lampung, Aceh, Bali, Madura, Sulawesi, Maluku, dan Irian Jaya. Komoditi ikan hias clown (*Amphiprion ocellaris*) merupakan komoditas baru di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. Mengingat permintaan pasar yang semakin meningkat maka sangat diperlukan usaha budidaya ikan hias clown untuk mengurangi penangkapan di alam yang dapat menyebabkan kerusakan habitat karena biasanya menggunakan bahan beracun. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian tentang ikan hias clown. Salah satu aspek yang perlu dicermati agar pembenihan dan budidaya ikan hias clown berhasil perlu dilakukan penelusuran karakteristik genetik ikan hias clown dari alam sebagai bahan pertimbangan dalam pelaksanaan breeding program.

<sup>)</sup> Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol P.O. Box 140 Singaraja, Bali 81101

<sup>\*)</sup> Penulis untuk korespondensi : E-mail : moria68@telkom.net



Gambar 1. Morfologi ikan hias clown (*Amphiprion ocellaris*)

Pembenihan dapat menurunkan keragaman genetik pada turunan berikutnya dan indikasi terjadinya penurunan keragaman genetik ditentukan oleh lokus polimorfik, heterosigositas dan jumlah alel per lokus (Taniguchi *et al.*, 1983; Sugama *et al.*, 1998). Penurunan karakter genetik akibat hilangnya alel-alel langka dari hasil perbenihan dapat menghambat pertumbuhan, rentan terhadap serangan penyakit serta perubahan lingkungan (Leary *et al.*, 1985). Oleh karena itu, upaya penelusuran dan inventarisasi karakter genetik ikan hias clown pada tingkat molekuler perlu dilakukan untuk mendapatkan informasi keragaman genetik ikan hias clown yang dapat dijadikan acuan dalam memilih induk yang berkualitas unggul baik secara genotip maupun fenotip.

### Bahan dan Metode

#### *Sampel ikan hias clown fish, Amphiprion ocellaris*

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil tangkapan di alam dari 3 (tiga) lokasi daerah sampling yaitu; di perairan Sulawesi Selatan (17 sampel), Madura (15 sampel) dan Bali (15 sampel). Daerah-daerah tersebut dijadikan sebagai tempat sampling, karena dianggap populasi ikan hias clown masih banyak dan habitat terumbu karang sebagai habitatnya masih bagus. Ukuran panjang dan berat masing-masing sampel disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Panjang total (cm) dan berat (g) rata-rata ikan hias clown, *Amphiprion ocellaris*

Lokasi	Panjang total rata-rata (cm)	Berat rata-rata (g)
Sulawesi Selatan	6,63±0,57	6,06±1,65
Madura	5,32±1,92	3,87±2,97
Bali	4,52±1,32	2,27±2,06

#### *Ekstraksi DNA*

DNA ikan diekstraksi dari daging dengan mengikuti metode Ovenden (2000). Langkah awal diambil 5-10 mg daging dan dimasukkan dalam tabung 1,5 ml yang telah berisi 200 µl larutan 10% Chelex-100 dalam TE buffer pH-8. Kemudian ditambahkan 5 µl proteinase kinase (20 mg/ml) dan diinkubasikan dalam *Thermoblock* pada suhu 55°C selama 2,5 jam. Selanjutnya suhu dinaikkan menjadi 89°C dan diinkubasi kembali selama 8 menit. Kemudian sampel didinginkan pada suhu kamar dan disentrifuge pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas (supernatan) diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

#### *RFLP-mt DNA*

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA mitokondria dalam penelitian ini adalah primer 15924 (L) dengan sekuen (5'-AGCTCAGCGCCAGA GCGCCGGTCTTGTA-3') dan 16498 (H) (5'-CCTGAAGTAGGAACCGATG-3').

Amplifikasi dilakukan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan komposisi reaksi yang terdiri atas : dd H<sub>2</sub>O, 10 pmol setiap primer dan Takara Ex Taq™ dan genome DNA sampel dengan total volume akhir 15µl. Siklus PCR yang digunakan dalam amplifikasi adalah 35 siklus yang terdiri atas 94°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, dan 72°C selama 1 menit. Selanjutnya satu siklus terakhir 72°C selama 7 menit. mt-DNA produk amplifikasi PCR dipotong dengan 4 enzim restriksi *Mbo* I (GATC), *Hha* I (GCGC), *Nla* III (CATG) dan *Hinf* I (GANTC). Hasil restriksi kemudian dipisahkan secara elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5% dalam 1x Tris-Boric-Acid (TBE) buffer. Setelah elektroforesis selama 25 menit, gel agarose direndam dalam larutan ethidium bromide untuk pewarnaan, kemudian fragmen DNA diamati dengan illuminator (UV) dan gambarnya dicetak dengan gel kamera polaroid. Berat molekul DNA dari masing-masing sampel dapat diketahui dengan menggunakan alat "Biodoc Analyze".

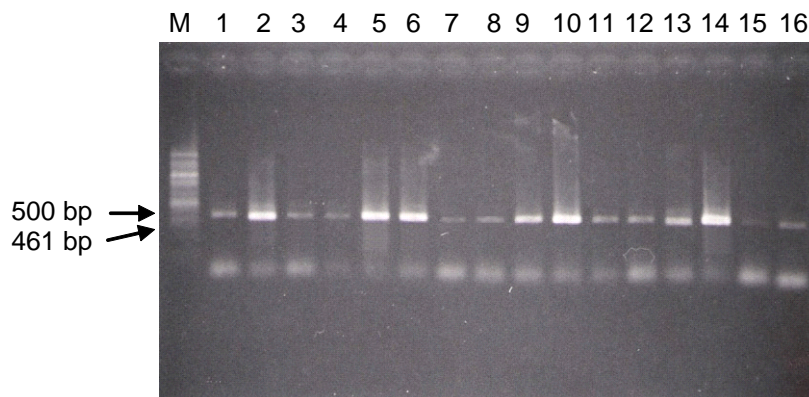
#### Analisis Data

Untuk mengevaluasi variasi DNA antar populasi ikan hias clown menggunakan software TFGA Program. Kekerbatan antar populasi dianalisis dengan menggunakan jarak genetik (Nei's, 1972).

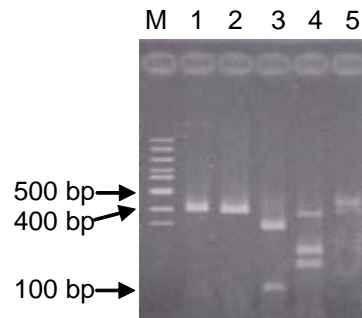
#### Hasil dan Pembahasan

mt-DNA ikan hias berdasarkan hasil PCR menunjukkan berat molekul sekitar 461 bp (Gambar 2). Dari empat enzim restriksi yang digunakan untuk memotong hasil PCR tersebut (*Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I dan *Mbo* I) sebagai analisa pendahuluan ternyata hanya enzim *Hinf* I dan *Mbo* I yang mempunyai situs pemotongan, sedangkan *Hae* III dan *Hha* I tidak menunjukkan pemotongan (Gambar 3). Analisa selanjutnya digunakan enzim restriksi *Nla* III agar dapat ditentukan keragaman genetik dari ikan hias clown, karena makin banyak enzim restriksi yang digunakan, maka hasil yang didapatkan makin sempurna. Pemotongan mt-DNA dengan enzim *Mbo* I dan *Hinf* I mempunyai satu dan dua jenis pola restriksi, sedangkan enzim *Nla* III, menghasilkan dua dan tiga pola restriksi (Gambar 4).

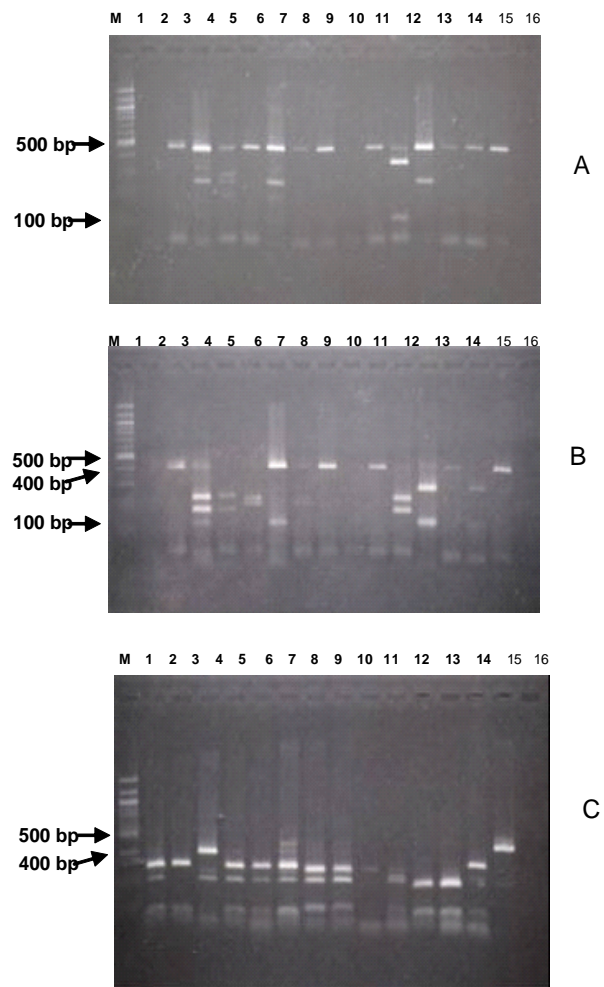
Keragaman fragmen mt-DNA ikan hias clown yang dipotong dengan tiga jenis enzim restriksi pada masing-masing lokasi disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil tersebut, keragaman genetik ikan hias clown cukup bagus, sehingga dapat dijadikan sebagai acuan untuk memilih lokasi calon induk yang akan digunakan dalam proses budidaya ikan tersebut.



Gambar 2. Amplifikasi PCR dari genom mt-DNA ikan hias clown, *Amphiprion ocellaris* (M = marker 100 bp ladder; 1-16 sampel ikan clown)



Gambar 3. Pemotongan mt-DNA dengan enzim restriksi sebagai analisa pendahuluan pada ikan hias clown, *Amphiprion ocellaris* dengan enzim restriksi. (M; marker, 1, *Hha I*; 2, *Hae III*; 3, *Hinf I*; 4, *Mbo I*; 5, tanpa pemotongan).



Gambar 4. Pola pemotongan hasil amplifikasi mt-DNA ikan hias (*Amphiprion ocellaris*) dengan tiga enzim restriksi yaitu enzim *Mbo I* (A); enzim *Hinf I* (B); enzim *Nla III* (C). (M : Marker, 1-15 Sampel ikan hias clown, 16 : PCR produk tanpa pemotongan).

Tabel 2. Keragaman fragmen mt DNA pada masing-masing enzim restriksi dengan berat molekul 461 bp pada ikan hias clown, *Amphiprion ocellaris* dari 3 populasi yang berbeda

Lokasi	Enzim restriksi	Keragaman fragment DNA		
		1	2	3
Sulawesi Selatan	<i>Hinf I</i>	A	B	C
	<i>Mbo I</i>	A	B	-
	<i>Nla III</i>	-	B	C
Madura	<i>Hinf I</i>	A	-	-
	<i>Mbo I</i>	A	B	-
	<i>Nla III</i>	A	B	C
	<i>Hinf I</i>	-	B	-
Bali	<i>Mbo I</i>	A	B	-
	<i>Nla III</i>	-	B	C

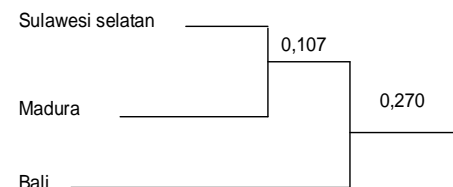
Berdasarkan hasil analisis dengan TFPGA terlihat bahwa keragaman genetik dari ke tiga enzim restriksi yaitu *Hinf I*, *Mbo I* dan *Nla III* ternyata pemotongan dengan *Hinf I*, dan *Nla III* memberikan variasi lokus yang lebih besar dibandingkan dengan enzim *Mbo I*. Keragaman genetik yang ditentukan oleh persentase lokus polimorfik tertinggi terdapat pada populasi ikan hias clown dari perairan Sulawesi Selatan (0,581), kemudian populasi Madura (0,456) dan yang terendah terdapat pada populasi dari Bali (0,382) (Tabel 3). Tingkat variasi genetik ikan hias clown yang diamati relatif lebih tinggi dibandingkan jenis ikan laut lainnya, seperti pada ikan kakap merah, *Lutjanus malabaricus* (0,001-0,028) (Permana *et al.*, 2003), ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus* (Andamari *et al.*, 2004), dan ikan napoleon, *C. undulatus* (0,469) (Moria *et al.*, 2005).

Variasi genetik pada ikan hias clown relatif tinggi, mungkin disebabkan budidaya komoditas ini masih belum banyak dilakukan dan nilai heterosigositas yang tinggi dapat memungkinkan untuk perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksploitasi gen-gen yang menguntungkan. Imron *et al.* (1999), menjelaskan bahwa populasi dengan variasi genetik yang tinggi akan memiliki

peluang hidup yang semakin tinggi untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Disamping itu Allendorf & Phelps (1980), juga mengemukakan bahwa populasi dengan nilai rata-rata heterosigositas yang tinggi akan memperlihatkan tingginya variabilitas genetik untuk suatu fenotif seperti rata-rata pertumbuhan, kelangsungan hidup dan normalitas benih turunannya.

Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik tersebut menunjukkan bahwa populasi Sulawesi Selatan dan Madura mempunyai jarak genetik terdekat (0,107), dibandingkan dengan populasi dari Bali mempunyai nilai jarak genetik 0,270. Nilai jarak genetik pada ikan hias clown ini relatif lebih besar. Berdasarkan habitatnya, ikan hias clown merupakan salah satu jenis ikan yang hidup di sekitar terumbu karang, sehingga ikan ini mempunyai karakteristik biologi dan ekologi yang spesifik seperti bertelur didasar perairan dan diantara terumbu karang. Oleh karena itu dari hasil jarak genetik tersebut sesuai dengan pendapat Ohtani *et al.* (1997) yang menyatakan bahwa jenis-jenis ikan yang berhabitat di area terumbu karang atau litoral cenderung memiliki nilai jarak genetik yang tinggi pada sub populasinya.

Jarak genetik ikan hias clown yang dihitung menurut Nei's (1972), berdasarkan situs restriksi dari 3 enzim antar lokasi perairan tertera pada Gambar 5.



Gambar 5. Kluster dendrogram ikan hias clown, *Amphiprion ocellaris* berdasarkan hubungan genetik dari tiga populasi

Tabel 3. Allel frekuensi, variasi genetik dan heterosigositas pada 3 populasi ikan hias clown (*Amphiprion ocellaris*) dari alam.

No haplotipe	Haplotipe	Sulawesi Selatan	Madura	Bali
1.	ABB	0	1 (0,066)	0
2.	AAC	2 (0,1176)	1 (0,066)	0
3.	AAA	2 (0,1176)	3 (0,200)	1 (0,066)
4.	AAB	3 (0,1764)	4 (0,266)	1 (0,066)
5.	ABA	0	2 (0,133)	0
6.	BBB	1 (0,0580)	0	5 (0,333)
7.	BAC	1 (0,0580)	1(0,066)	1 (0,066)
8.	BAB	1 (0,0580)	1(0,066)	5 (0,333)
9.	BBC	1 (0,0580)	0	2 (0,133)
10.	BAA	1 (0,0580)	0	0
11.	BBA	0	1 (0,066)	1 (0,066)
12.	CBB	3 (0,1764)	0	0
13.	CAB	1 (0,0580)	0	0
14.	CBC	1 (0,0580)	0	0
Jumlah sample		17	15	15
Jumlah allele		3	3	3
Variasi genetik		0,581	456	0,382

### Kesimpulan

Keragaman genetik dengan nilai heterosigositas tertinggi terdapat pada populasi ikan hias clown dari perairan Sulawesi selatan (0,581), sehingga dapat dijadikan sebagai sumber induk untuk keperluan budidaya. Populasi Sulawesi Selatan dan Madura mempunyai pasangan alel yang hampir sama dengan jarak genetik yang dekat (0,107), sedangkan populasi Bali mempunyai jarak genetik paling jauh (0,270) terhadap 2 populasi lainnya.

### Daftar Pustaka

Allen, G.P. 1972. The anemone fish. Their classification and biology. T.F.H. Publication, Inc. Ltd. 288 p.

Allendorf, F.W. and S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in hatchery stock of cut throat trout. Trans Am.Fish.Soc. 109 : 537-543.

Andamari, R., Haryanti, K. Suwiryana, S.B. Moria dan G.N. Permana. 2004. Bioreproduksi dan karakteristik variasi genetik ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*. Laporan Teknis Proyek Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali. 12 p.

Imron, K. Sugama, K. Sumantadinata and K. Soewardi. 1999. Genetic variation in cultured stocks of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Indonesia. Indonesian Fisheries Research Journal. V(1) :10-18.

Leary, F.L., F.W. Allendorf, and K.L. Knudsen. 1985. Developmental instability as an indicator of reduced genetic variation in Hatchery Trout. Trans. Am. Fish. Soc. 114 : 230-235.

- Moria, S.B., Haryanti, G.N. Permana, I.K. Wardana dan B. Slamet. 2005. Studi Pendahuluan karakter genetik ikan napoeon, *Cheilinus undulatus* dengan metode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) mt-DNA. Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan Tahun 2005 tanggal 30 Juli. Yogyakarta : 48-54.
- Nei's, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalis*. 106 (949) : 283-292.
- Ohtani, T., K. Miyahara and N. Shimamoto. 1997. Genetic variability of allozymes in japanese Sea Bass, *Lateolabrax japonicus* in the coastal water of Hyogo prefecture. *Fisheries Science*. 63 (5) : 731.
- 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 Centre*. 18 p.
- Permana, G.N., S.B. Moria, Haryanti, and K. Sugama. 2003. Genetic identification and variation of Red Snapper, *Lutjanus* sp. through allozyme electrophoretic analysis. *Indonesian Fisheries Research Journal*. IX (1):33-40.
- Poernomo, A., S. Mardlijah, M.L. Linting, E. M. Amin, dan Widjopriyono. 2003. Ikan hias laut Indonesia. Penebar Swadaya. Jakarta. 182 p.
- Sugama, K., Tridjoko, Haryanti, S.B. Moria and F. Cholikh. 1998. Genetic variation and population structure in the Humber grouper, *Cromileptes altivelis* throughout its range in Indonesia waters. *Indonesian Fisheries Research Journal*. V (1) :32-38.
- Taniguchi, N., K. Sumantadinata and S. Iyama. 1983. Genetic change in the first and second generation of hatchery stock of black sea bream. *Aquaculture*. 35:309-320.