

**ISOLASI DAN AMPLIFIKASI WILAYAH mtDNA *D-LOOP* PADA IKAN
Kryptopterus limpok (Bleeker, 1852) DARI SUNGAI KAMPAR KIRI
PROVINSI RIAU**

Rizka Suci Akmando, Roza Elvyra, Dewi Indriyani Roslim

**Mahasiswa Program S1 Biologi
Dosen Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Kampus Bina Widya Pekanbaru, 28293, Indonesia
rizkasuciakmando@yahoo.co.id**

ABSTRACT

Scientific information of mtDNA D-loop region in fish, *Kryptopterus limpok*, from Riau is unknown. Before having genetic information, total DNA isolation and amplification is necessary to be carried out. This study was aimed to obtain the total DNA molecules and DNA fragment of the mtDNA D-loop region in fish *K. limpok* from Sungai Kampar Kiri, Riau. Ten muscle samples were taken from fish collected from the river and used for total DNA isolation. Products of DNA isolation were amplified using the PCR technique with universal primers i.e. L15926 (F) 5' TCA AAG CTT ACA CCA GTC TTG TAA ACC 3' dan H00651 (R) 5' TAA CTG CAG AAG GCT AGG ACC AAA CCT 3'. The PCR process consisted of pre-PCR at 94⁰C for 5 minutes, 35 cycles of PCR consisted of three stages, i.e. as denaturation at 94⁰C for 30 seconds, annealing at 59⁰C for 1 minutes, elongation at 72⁰C for 1 minutes, and post-PCR at 72⁰C for 5 minutes. This study obtained the intact total DNA molecules, with the total DNA concentration of 100 µg/ µl. The length of mtDNA D-loop fragment was 153 bp.

Keywords: DNA, *Kryptopterus limpok*, mtDNA *D-loop*, PCR, Riau

ABSTRAK

Informasi ilmiah secara genetik berdasarkan wilayah mtDNA *D-loop* pada ikan *Kryptopterus limpok* dari Provinsi Riau belum diketahui. Sebelum mendapatkan informasi ilmiah secara genetik, perlu dilakukan isolasi dan amplifikasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan molekul DNA total dan fragmen DNA pada wilayah mtDNA *D-loop* pada ikan *K. limpok* dari Sungai Kampar Kiri. Sepuluh sampel otot ikan diambil dari sungai dan digunakan untuk isolasi DNA total. Produk isolasi DNA total diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer universal L15926 (F) 5' TCA AAG CTT ACA CCA GTC TTG TAA ACC 3' dan H00651 (R) 5' TAA CTG CAG AAG GCT AGG ACC AAA CCT 3'. Proses PCR meliputi *pra* PCR dengan suhu 94⁰C selama 5 menit, PCR 35 siklus dengan tahap: denaturasi pada suhu 94⁰C selama 30 detik, penempelan pada suhu 59⁰C selama 1 menit, pemanjangan pada suhu 72⁰C selama 1 menit, dan *post* PCR dengan suhu 72⁰C selama 5 menit. Penelitian ini mendapatkan molekul DNA total yang utuh dan memiliki konsentrasi sekitar 100 µg/ µl. Fragmen mtDNA *D-loop* yang diperoleh berukuran 153 pb.

Kata kunci: DNA, *Kryptopterus limpok*, mtDNA *D-loop*, PCR, Riau

PENDAHULUAN

Sungai paparan banjir atau disebut juga dengan *flood plain river* di Indonesia terdapat di beberapa daerah, yaitu di Pulau Kalimantan dan di Pulau Sumatera, salah satunya yaitu di Provinsi Riau. Sungai paparan banjir di Provinsi Riau ini dicirikan dengan warna perairannya coklat tua, transparansi yang tinggi, dan pH relatif rendah. Sungai paparan banjir ini merupakan ciri khas sungai di Provinsi Riau yang tidak ditemukan di Provinsi yang berdekatan dengan Provinsi Riau sekalipun seperti Provinsi Sumatera Barat (Elvyra 2009).

Kekhasan dalam ekosistem sungai paparan banjir mengakibatkan ada beberapa jenis ikan bersifat endemik sungai paparan banjir atau hanya dapat ditemukan di sungai paparan banjir. Salah satunya jenis ikan dari genus *Kryptopterus* yang termasuk ke dalam famili Siluridae. Secara umum di Indonesia dikenal sebagai kelompok ikan lais (Kottelat *et al.* 1993). Di Provinsi Riau, *Kryptopterus limpok* disebut sebagai ikan selais janggut (Saberina dan Nuraini 2005).

Produksi ikan *K. limpok* di propinsi Riau mengalami penurunan hingga tahun 2013 dibandingkan produksi ikan *Kryptopterus limpok* di propinsi Riau pada tahun 2005 (Diskanlut Propinsi Riau 2014). Kemungkinan penurunan produksi ini disebabkan meningkatnya penangkapan ikan-ikan dewasa oleh nelayan dan rusaknya aliran sungai karena alih fungsi lahan menjadi perkebunan sawit. Berdasarkan potensi, kekhasan jenis, dan habitat hidup dari ikan *K. limpok*, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai informasi pada ikan *K.*

limpok, terutama dengan menggunakan teknik molekuler yang telah berkembang pesat guna menunjang usaha pelestarian jenis yang ada di sungai paparan banjir di Provinsi Riau.

Sebelum mendapatkan informasi ilmiah secara genetik, perlu dilakukan isolasi DNA total dan amplifikasi wilayah mtDNA *D-loop* pada ikan *K. limpok*. Ekstraksi untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam studi molekuler (Jose dan Usha 2000). Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari debris sel, seperti lemak, selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan molekul DNA total dan fragmen DNA pada wilayah mtDNA *D-loop* pada ikan *K. limpok* dari Sungai Kampar Kiri.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gunting, tabung mikro 1,5 ml dan 0,2 ml, rak tabung mikro, pipet mikro berbagai ukuran (10 μ l, 100 μ l dan 1000 μ l), tip mikro, vortex, mesin sentrifus, *water bath*, pinset, mesin elektroforesis horizontal, sisir dan cetakan agarose, gelas ukur, timbangan analitik, *hot plate*, stirer, UV transluminator, dan mesin PCR.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol absolut, 70% alkohol, akuabidestilata steril, dan kit isolasi DNA (*Qiagen Dneasy Blood and Tissue Kit*). Untuk amplifikasi DNA menggunakan bahan-bahan kit PCR

(Qiagen), primer, dan ddH₂O steril. Bahan untuk pembuatan gel agarose menggunakan 1x TBE, etidium bromid, 1% agarose, *loading dye*, DNA ladder, dan akuabidestilata steril.

b. Prosedur Penelitian

Sampel ikan diperoleh dengan membeli dari nelayan di Sungai Kampar Kiri khususnya Desa Mentulik yang melakukan penangkapan di sungai tersebut. Data yang diperoleh dari lapangan sebagian besar merupakan data primer yang diperoleh dari lokasi penelitian yaitu data jumlah ikan yang tertangkap dan identifikasi jenis dari ikan *K. limpok*. Identifikasi jenis ikan dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi Kottelat *et al.* (1993).

c. Penanganan Sampel

Ikan yang telah dibeli dari nelayan dipotong di bagian ekornya kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml. Kedalam tabung dimasukkan etanol absolut hingga otot ekor ikan terendam seluruhnya. Sampel kemudian diberi label dan disimpan di dalam kulkas.

d. Isolasi DNA Total

Otot ekor ikan yang disimpan di dalam kulkas dicuci menggunakan larutan TE sebelum diisolasi. Molekul DNA diisolasi dari otot di bagian ekor ikan mengikuti protokol dari pabrik (*Qiagen Dneasy Blood and Tissue Kit*). Otot dipotong kecil lalu dicacah sampai halus. Sampel otot tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml, kemudian ditambahkan dengan larutan buffer ATL sebanyak 180 µl, divortex selama 15 detik, ditambahkan larutan *Proteinase K* sebanyak 20 µl, divortex lagi selama 15

detik. Setelah itu, diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56⁰C selama 1-3 jam kemudian ditambahkan buffer AL sebanyak 200 µl, divortex selama 15 detik, ditambahkan etanol absolut sebanyak 200 µl, divortex lagi selama 15 detik.

Larutan DNA pada tabung mikro dipindahkan ke *spin column* yang terpasang pada *collection tube* dan disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 2 menit. Kemudian dipindahkan *spin column* ke *collection tube* yang baru, ditambahkan buffer AW 1 sebanyak 500 µl, disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, dipindahkan *spin column* ke *collection tube* yang baru, ditambahkan buffer AW 2 sebanyak 500 µl, disentrifus dengan kecepatan 400 rpm selama 10 menit. *Spin column* kemudian dipindahkan ke tabung mikro 1,5 ml, ditambahkan buffer AE sebanyak 200 µl, disentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 2 menit, supernatan disimpan di kulkas sebagai stok DNA 1. Setelah itu, dipindahkan lagi *spin column* ke tabung mikro 1,5 ml, ditambahkan buffer AE sebanyak 200 µl, disentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 2 menit (diulangi 2x), supernatan disimpan di kulkas sebagai stok DNA 2.

e. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA Total

Molekul DNA total dimigrasikan pada 1% gel agarose dalam larutan 1x TBE (*Trisbase-Boricacid-EDTA*) dengan menggunakan mesin Fison Mode FEC 360, *Large Horizontal Gel System*. Setelah itu diwarnai dengan etidium bromida (0,5 µg/ml), lalu DNA total divisualisasikan dengan bantuan UV transluminator ($\lambda = 300 \text{ nm}$).

f. Amplifikasi Wilayah *D-loop* dari DNA Mitokondria

Molekul DNA total hasil isolasi digunakan sebagai DNA cetakan dalam proses amplifikasi DNA. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi wilayah *D-loop* dari DNA mitokondria adalah sepasang primer *D-loop* universal yaitu L15926 (F) – 5' TCA AAG CTT ACA CCA GTC TTG TAA ACC 3' dan H00651 (R) – 5' TAA CTG CAG AAG GCT AGG ACC AAA CCT 3' (Kocher *et al.* 1989). Kondisi PCR yang digunakan menurut Elvyra dan Duryadi (2007) yang telah dimodifikasi; yaitu pada saat *pra PCR* dengan suhu 94°C selama 5 menit, PCR 35 siklus dengan tahap: denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan pada suhu 59°C selama 1 menit, pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post PCR* dengan suhu 72°C selama 5 menit.

g. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA Total

Molekul DNA hasil PCR dimigrasikan pada gel agarose dalam larutan 1x TBE (*Tris base-Boric acid – EDTA*) dengan menggunakan mesin Fison Mode FEC 360, *Large Horizontal Gel System*. Setelah itu diwarnai dengan etidium bromida (0,5 µg/ml), lalu divisualisasikan dengan bantuan UV transluminator ($\lambda = 300 \text{ nm}$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Molekul DNA Total Ikan *Kryptopterus limpok*

Molekul DNA total ikan *K. limpok* diisolasi sebanyak sepuluh sampel, kemudian sampel dielektroforesis untuk mengetahui kualitas sampel yang

diisolasi. Molekul DNA total hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 1.

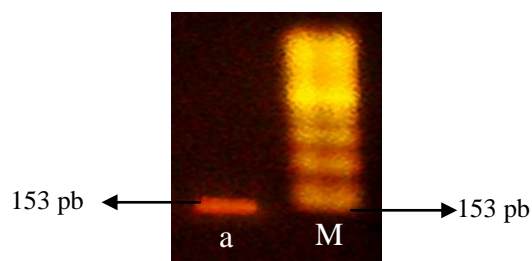


Gambar 1. Pita DNA total ikan *K. limpok* dari sungai Kampar Kiri

Kualitas DNA total menentukan berhasil atau tidaknya isolasi DNA total. Isolasi DNA total dikatakan berhasil apabila pita DNA yang diperoleh dari elektroforesis seperti garis yang jelas. Gambar 1 menunjukkan pita yang jelas dari isolasi DNA total. Sampel DNA total yang paling bagus dipilih untuk diamplifikasi. Sampel molekul DNA total nomor 7 dari Sungai Kampar Kiri digunakan untuk dianalisis selanjutnya.

b. Fragmen DNA Mitokondria pada Wilayah mtDNA *D-loop* ikan *Kryptopterus limpok*

Fragmen DNA Mitokondria (mtDNA) pada wilayah *D-loop* dari *K. limpok* yang diperoleh berukuran 153 pb (Gambar 2).



Gambar 2. Fragmen mtDNA *D-loop* parsial pada *K. limpok*. Keterangan: (M) 100 pb DNA ladder; (a) produk PCR sampel *K. limpok*

Panjang fragmen yang diperoleh jauh lebih pendek dari hasil yang seharusnya diperoleh dengan menggunakan primer *D-loop* universal L15926 (F) dan H00651 (R) (Kocher *et al.* 1989). Hal itu kemungkinan disebabkan mtDNA yang terfragmentasi pada saat isolasi DNA sehingga fragmen DNA yang diperoleh pendek. Menurut penelitian Widayanti (2014) pada mtDNA *D-loop* sepanjang 1318 pb dari kuda sumba yang teramplifikasi sepanjang 383 pb sudah dapat mewakili sebagai mtDNA *D-loop* dari kuda sumba, sehingga panjang fragmen *D-loop* yang diperoleh dari *K. limpok* ini bisa dianalisis untuk selanjutnya.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil mendapatkan molekul DNA total yang utuh. Fragmen mtDNA *D-loop* yang diperoleh berukuran 153 pb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIKTI DP2M yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Kompetensi tahun anggaran 2013-2014 a.n. Dr. Roza Elvyra, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

[Diskanlut] Dinas Perikanan dan Kelautan. 2013. *Statistik Perikanan Tangkap Provinsi Riau*. Pekanbaru. Diskanlut Provinsi Riau.

Elvyra R, dan Duryadi D. 2007. Kajian penanda genetik gen sitokrom b DNA mitokondria ikan lais dari Sungai Kampar Riau. *J Natur Ind* 10 : 6 -12.

Elvyra R. 2009. Kajian Keragaman Genetik dan Biologi Reproduksi Ikan Lais di Sungai Kampar Riau [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Jose, J. and R. Usha. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a highly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 349-355.

Kocher T.D, W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edward, S. Paabo, F.S. Fillablanca, A.C. Wilson. 1989. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 6196-6200.

Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirdjoatmodjo S. 1993. *Freshwater fishes of western Indonesia and Sulawesi*. Jakarta: Periplus edition (HK) in collaboration with the environment Rep. of Indonesia.

Saberina, dan Nuraini. 2005. Ekologi Ikan Lais (*kryptopterus* spp.) di Perairan Wilayah Pelalawan Riau. *Berkala Perikanan Terubuk* 32: 40-47.

Surzycki, S. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Widayanti R. 2014. Analisis Genetika Molekuler Kuda Sumba Berdasarkan Urutan *D-loop* Mitokondria. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8 (1):23-26.