

Isolasi DNA Total Dan Optimasi Suhu *Annealing* Untuk Primer *COX2* Pada Ikan *Ompok eugeneiatus* (Vaillant 1893) Asal Sungai Indragiri Hulu Riau

JESSICA RODEARNI SARAGIH^{1*}, ROZA ELVYRA¹, DEWI INDRIYANI
ROSLIM¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Riau, Pekanbaru 28293

*e-mail : jessicasaragih@gmail.com

ABSTRAK

Ikan selais *Ompok eugeneiatus* (Vaillant 1893) merupakan fauna khas sungai paparan banjir yang perlu dilestarikan. Teknik molekuler yang berkembang saat ini memungkinkan eksplorasi penanda genetik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk isolasi dan mengamplifikasi DNA mitokondrial (mtDNA) yang dapat digunakan untuk menunjang usaha konservasi dan perlindungan sumber daya genetik fauna paparan banjir. Otot dari setiap sampel ikan diisolasi DNA totalnya, lalu dilakukan optimasi primer *COX2* dengan teknik PCR menggunakan empat pasang primer *COX2*. Molekul DNA total pada ikan *O. eugeneiatus* telah didapatkan sesuai dengan protokol dari kit isolasi DNA *DNeasy Blood and Tissue* dari Qiagen. Pasangan primer *COX2_SA_F1* dan *COX2_SA_R1* dengan suhu *annealing* 49 °C menghasilkan pita yang paling baik dalam visualisasi hasil optimasi primer dengan ukuran 660pb pada *O. eugeneiatus* sehingga dapat digunakan sebagai primer dalam mendapatkan fragmen *COX2* dengan menggunakan teknik PCR.

Kata Kunci: *COX2*, *O. eugeneiatus*, Sungai Indragiri Hulu

ABSTRACT

Selais *Ompok eugeneiatus* (Vaillant 1893) is typical fauna from floodplain which need to be conserved. Development of molecular technique gives some possibility to explore genetic marker of this fish. The aim of this study were to isolate and amplify mitochondrial DNA (mtDNA) that can be used to support the conservation and protect its genetic source. The DNA was isolated from muscle of each sample and the primers optimized through PCR technique using four pairs of *COX2* primer. The total DNA of each sample was obtain by using *Dneasy Blood and Tissue* from Qiagen. Primer's pair of *COX2_SA_F1/COX2_SA_R1* with *annealing* temperature 49°C showed the best result with product obtained was 660 bp in *O. eugeneiatus* and it means that this primer can be used to obtain *COX2* fragment by using PCR technique.

Key words: *COX2*, Indragiri Hulu River, *O. eugeneiatus*

PENDAHULUAN

Sungai paparan banjir atau *floodplain river* ditemukan di beberapa pulau di Indonesia yaitu Pulau Kalimantan (Kalimantan Tengah, Kalimantan Timur, Kalimantan Barat) dan di Pulau Sumatera (Sumatera Selatan, Jambi, Riau). Sungai di Riau mayoritas merupakan sungai paparan banjir sehingga menjadi ciri khas dari daerah Riau. Beberapa jenis ikan yang biasanya ditemukan di sungai paparan banjir antara lain dari genus *Belodontichthys*, *Kryptoterus*, *Hemisilurus*, *Wallago*, dan *Ompok* dari famili Siluridae yang dikenal sebagai ikan bersungut atau *catfish* (Kottelat *et al.* 1993; *FishBase* 2013).

Ikan selais *Ompok eugeneiatus* (Vaillant 1893) merupakan fauna khas sungai paparan banjir yang perlu dilestarikan, hidup di perairan dengan kisaran pH rata-rata 5,56-5,78 di Sungai Kampar Riau dengan lokasi penyebaran yang terbatas dan tidak memiliki kelimpahan yang luas namun bernilai ekonomis (Elvyra 2009). Ikan ini memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Pulungan *et al.* 1985) namun belum dapat dibudidayakan, sehingga perlu dilestarikan.

Teknik molekuler yang kerap digunakan dalam menentukan marka spesifik adalah dengan menggunakan analisis pada fragmen penyandi protein yang terdapat pada genom mitokondria. DNA mitokondria terdapat dalam jumlah kopi yang tinggi sehingga mudah diisolasi dan dipurifikasi untuk berbagai keperluan analisis genom. Ukurannya yang relatif kecil (14-39 kb) mempermudah untuk dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh (Duryadi 1994). Dalam hal ini gen *COX2* merupakan gen pengkode protein yang berevolusi sangat lambat dan berukuran lebih kecil dari gen *COX1* (Simon 1991).

Penelitian informasi genetik genom mitokondria pada *Cyt b* dilakukan Elvyra & Duryadi (2007) daerah *D-Loop* telah dilakukan Tasiah (2014) dan gen *COX3* dilakukan Siagian (2015) pada ikan *O. eugeneiatus*. Namun data tersebut belum cukup untuk melengkapi data pada kedua ikan tersebut. Hal ini menjadi peluang dalam melakukan penelitian berdasarkan gen *COX2* yang juga terdapat di DNA mitokondria.

Optimasi primer pada proses PCR melibatkan beberapa variabel salah satunya suhu *annealing*. Jika suhu *annealing* terlalu rendah maka fragmen DNA yang didapatkan tidak spesifik dibuktikan dari visualisasi hasil PCR yang memperlihatkan adanya *multiple bands* (pita ganda) pada agarose. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi maka kemurnian hasil PCR akan rendah dan hasil fragmen yang didapatkan akan lebih sedikit dari target dikarenakan primer yang menempel pada cetakan terlalu sedikit (Rychlik *et al.* 1990).

Amplifikasi dengan menggunakan teknik PCR dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk optimasi adalah dengan menggunakan suhu *annealing* yang berkisar hingga 5°C lebih rendah dari *T_m* (*temperature of melting*) pasangan primer (Innis & Gelfand 1990). Proses *annealing* memerlukan waktu yang singkat berkisar antara 30 detik atau kurang dari 30 detik kecuali jika *T_a* (*temperature of annealing*) dekat dengan *T_m* atau kecuali primer tidak terlalu panjang seperti umumnya (Rybicki 2001).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan November 2015-April 2016. Pengambilan sampel dilakukan di Sungai Indragiri Hulu Provinsi Riau, penanganan sampel dan isolasi DNA dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sarung tangan, masker, tabung mikro dengan ukuran 1,5 ml dan 0,2 ml, rak tabung mikro, tip mikro, pipet mikro berukuran 10 µl, 100 µl, dan 1000 µl, pinset, gunting, gelas ukur, erlenmeyer, spatula, kamera (*Olympus SP-500 UZ*), timbangan analitik, UV transiluminator (*WiseUv WUV-M20, Daihan Scientific*), mesin sentrifus, mesin PCR, mesin vorteks, mesin elektroforesis (*Fison Mode FEC 360, Large Horizontal Gel System*), sisir dan cetakan gel agarose, *waterbath*, dan *hot plate*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah otot dari ikan *O. eugeneiatus* diambil 10 sampel ikan per sungai. Kit isolasi dan purifikasi DNA (*Dneasy Blood and Tissue Kit*) dari Qiagen, Etanol absolut dan buffer TE [1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCL pH 8,0; 40 mg/ml RNase]. Kit PCR (*TopTaq Master Mix* PCR) dari Qiagen, empat pasang primer diantaranya *COX2_SA_F1* (5'-AAA CTG ACC ATG GCA CTA AA-3') dengan *COX2_SA_R1* (5'-ACG AAA ACA TAG GCT TGG AT-3'), *COX2_SA_F2* (5'-AAG TTA CAG CTC TCA ATG CT-3') dengan *COX2_SA_R2* (5'-TTG GCA TTA GGG TGA TAG TA-3'), *COX2_SP_F1* (5'-AAA TCC TGC GTA TCT TGA GC-3'), *COX2_SP_F2* (5'-CCC TCA CAA CTA GGA TTC CA-3') dengan *COX2_SP_R1* (5'-TCA AGG TGC TCT AGG GGA AC-3'), *loading dye*, dan *DNA ladder*, agarose, etidium bromida, dan akuades.

Isolasi dan purifikasi DNA total dari sampel otot ikan menggunakan Kit isolasi dan purifikasi DNA *Dneasy Blood and Tissue Kit* dari Qiagen. Metode yang digunakan dalam isolasi DNA total dilakukan menurut protokol dari kit Qiagen dengan modifikasi beberapa kecepatan sentrifus. Setelah sampel otot ikan dicuci menggunakan larutan 1x *buffer* TE otot ikan kemudian dicacah halus dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml lalu ditambahkan *buffer* ATL sebanyak 180 µl, proteinase K sebanyak 20 µl, *buffer* AL sebanyak 200 µl, etanol absolut sebanyak 200 µl untuk melisis sel. Proses washing dilakukan dengan menambahkan *buffer* AW1 sebanyak 500 µl dan *buffer* AW2 sebanyak 500 µl ke dalam sampel. Elusi DNA dilakukan dengan menambahkan *buffer* AE sebanyak 200 µl. Molekul DNA disimpan pada suhu 4°C dan selanjutnya digunakan sebagai cetakan dalam proses optimasi suhu *annealing* primer *COX2* menggunakan PCR.

Optimasi suhu *annealing* primer *COX2* dilakukan dengan teknik PCR dengan menggunakan kit *TopTaq Master Mix* PCR dari Qiagen. Primer yang digunakan terdiri dari empat pasang primer yang didesain menggunakan program Primer3 Output dengan acuan sekuen DNA mitokondrial dari spesies

Silurus asotus (GenBank 2012) dan *Ictalurus punctatus* (GenBank 2010). Total volume PCR yang digunakan adalah 20 µl dan kondisi PCR yang digunakan merupakan hasil modifikasi yang dilakukan Elvyra dan Duryadi (2007). Pada optimasi dilakukan perlakuan Ta pada setiap pasang primer sebanyak dua suhu. Kedua perlakuan Ta ini didapatkan dengan menghitung rata-rata Tm pada sepasang primer dan menurunkan suhu tersebut 3°C hingga 5°C (Tabel 1).

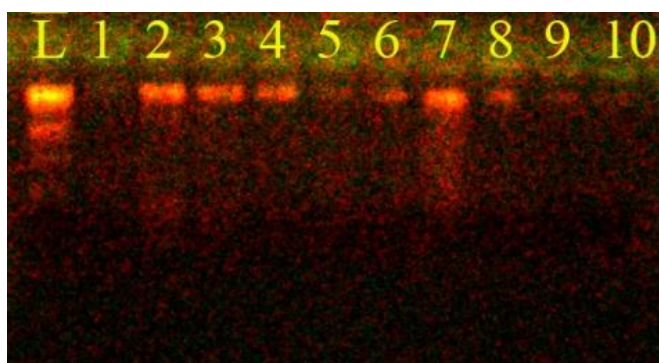
Tabel 1. Pasangan primer COX2, rata-rata Tm, dan Ta yang digunakan pada proses optimasi primer COX2 dengan teknik PCR

Pasangan Primer	Rata-rata Tm	Ta	
		Tm (-3°C)	Tm (-5°C)
COX2_SA_F1/COX2_SA_R1	52 °C	49 °C	47 °C
COX2_SA_F2/ COX2_SA_R2	52,05 °C	49,05 °C	47,05 °C
COX2_SP_F1/ COX2_SP_R1	53,5 °C	50,5 °C	48,5 °C
COX2_SP_F2/ COX2_SP_R1	53,95 °C	50,95 °C	48,95 °C

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul DNA Total

Molekul DNA total diperoleh dari isolasi dan purifikasi 10 sampel otot ikan *O. eugeneiatus* dari Sungai Indragiri Hulu dengan menggunakan kit isolasi DNA *Dneasy Blood and Tissue Kit* dari Qiagen. DNA total berhasil diperoleh berdasarkan visualisasi DNA dengan menggunakan elektroforesis dengan kondisi pita tebal (Gambar 1). Molekul DNA total yang didapatkan akan dijadikan cetakan (*template*) pada proses amplifikasi fragmen *COX2*.



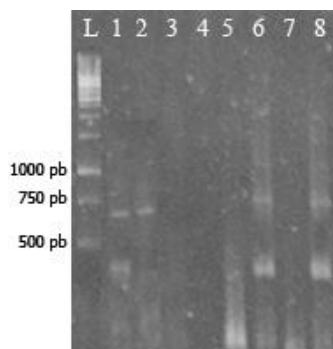
Gambar 1. Profil DNA total *O. eugeneiatus* pada 1,2% gel agarose dari sungai Indragiri Hulu; L=Ladder 1kb; 1-10= DNA total *O. eugeneiatus*.

Suhu Annealing untuk primer COX2

DNA total yang dipilih sebagai cetakan pada proses optimasi adalah yang memiliki pita yang utuh dengan konsentrasi sekitar 100ng/µl. Pada proses optimasi digunakan empat pasang primer yang menghasilkan pita-pita yang berbeda (Gambar 2). Pada visualisasi hasil optimasi primer dengan menggunakan pasangan primer COX2_SA_F1/COX2_SA_R1 dengan menggunakan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* 5°C diperoleh dua pita DNA berukuran 630pb dan dibawah 500pb sedangkan dengan menggunakan penurunan suhu *melting* 3°C diperoleh pita berukuran 660pb. Pada pasangan primer COX2_SA_F2/COX2_SA_R2 dengan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* 5°C dan 3°C menunjukkan tidak terjadinya amplifikasi. Pasangan primer COX2_SP_F1/COX2_SP_R1 dengan suhu *annealing* dari penurunan suhu *melting* 5°C diperoleh fragmen DNA dengan ukuran dibawah 500pb sedangkan dengan penurunan suhu *melting* 3°C diperoleh dua fragmen DNA dengan 750pb dan dibawah 500pb. Pada pasangan primer COX2_SP_F2/COX2_SP_R1 dengan suhu *annealing* dari penurunan suhu

melting 5°C tidak terjadi amplifikasi dan dengan menggunakan penurunan suhu *melting* 3°C diperoleh dua ukuran fragmen yaitu 750pb dan dibawah 500pb.

Hasil optimum fragmen gen *COX2* yang diperoleh sesuai dengan hasil desain primer dengan kisaran 690pb yaitu dengan menggunakan pasangan primer COX2_SA_F1 sebagai *forward* dan COX2_SA_R1 sebagai *reverse* dengan suhu *annealing* 49°C atau penurunan suhu *melting* sebesar 3 °C dengan ukuran fragmen 660 pb.



Gambar 2. Profil fragmen DNA *COX2* pada *O. eugeneiatus* asal Sungai Indragiri Hulu; suhu *annealing*: (1) 47 °C (2) 49 °C menggunakan pasangan primer COX2_SA_F1/COX2_SA_R1; (3) 47,05 °C (4) 49,05 °C menggunakan pasangan primer COX2_SA_F2/COX2_SA_R2; (5) 48,5 °C (6) 50,5 °C menggunakan pasangan primer COX2_SP_F1/COX2_SP_R1; (7) 48,95 °C (8) 50,95 °C menggunakan pasangan primer COX2_SP_F2/COX2_SP_R1; L= *Ladder*.

KESIMPULAN

Molekul DNA total pada ikan *O. eugeneiatus* telah didapatkan sesuai dengan protokol dari kit isolasi DNA *DNeasy Blood and Tissue* dari Qiagen dengan beberapa modifikasi kecepatan dan waktu sentrifus. Pasangan primer COX2_SA_F1 dan COX2_SA_R1 dengan suhu *annealing* 49 °C menghasilkan pita yang paling baik dalam visualisasi hasil optimasi primer dengan ukuran 660pb sehingga dapat digunakan sebagai primer dalam mendapatkan fragmen *COX2* dengan menggunakan teknik PCR.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Studi Pangan, Energi dan Bioteknologi-LPPM Universitas Riau atas bantuan pendanaan penelitian Pusat Studi Tahun Anggaran 2015 a.n. Dr. Roza Elvyra, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Duryadi D. 1994. Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Elvyra R. 2009. Kajian Keragaman Genetik dan Biologi Reproduksi Ikan Lais di Sungai Kampar Riau [disertasi]. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.au
- Elvyra R, Duryadi D. 2007. Kajian penanda genetik gen sitokrom b DNA mitokondria ikan selais dari Sungai Kampar Riau. *J Natur Ind* 10: 6-12
- Fishbase. 2010. A global information system on fishes. <http://fishbase.sinica.edu.tw/Summary/SpeciesSummary.php?ID=23107>. [Diakses pada 5 November 2015]
- GenBank. 2010. *Ictalurus punctatus* mitochondrion, complete genome. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_003489.1. [diakses pada 26 Februari 2016]
- GenBank. 2012. *Silurus asotus* mitochondrion, complete genome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX087351.1>. [diakses pada 26 Februari 2016]
- Innis, MA & Gelfand, DH. 1990. Optimization of PCRs. Academic Press: New York

- Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirdjoatnodjo S. 1993. *Freshwater fishes of western Indonesia and Sulawesi*. Jakarta: Periplus edition (HK) in collaboration with the environment Rep. Of Indonesia.
- Pulungan, C.P., Ahmad, M., Siregar, Y.I., Ma'amoen A. A. H. 1985. Morfometrik ikan lais Siluroidea dari perairan kecamatan Kampar Kiri kabupaten Kampar Riau. Pekanbaru: Pusat Penelitian Universitas Riau.
- Rybicki, E. 2001. PCR Primer Design and Reaction Optimization. University of Cape Town:
- Rychlik, W., Spencer, WJ., Rhoads, RE. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in invitro. *Nucleic Acid Research* 18(21): 6409-6412
- Siagian TR. 2015. Kajian marka genetika berdasarkan gen COX3 pada ikan selais kaporeh (*Ompok eugeneiatus* Vaillant 1893) dari tiga sungai rawa banjiran, Provinsi Riau. [skripsi] Pekanbaru: Universitas Riau
- Simon, C. 1991. Molecular Systematics at the Species Boundary: Exploiting Conserved and Variable Regions of the Mitochondrial Genome of Animals Via Direct Sequencing from Amplified DNA. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Nato Advanced Studies Institute, series H: *Cell Biology*. Springer 1(57): 33-34.
- Tasiah. 2014. Analisis penanda genetik spesifik berbasis daerah D-Loop pada ikan selais *Ompok eugeneiatus* (Vaillant 1893) dari sungai Kampar Kiri dan Indragiri Hulu Provinsi Riau.[skripsi]. Pekanbaru:Universitas Riau.