

Isolasi DNA Total dan Optimasi Suhu *Annealing* Pada Amplifikasi Fragmen *COX2* Mitokondrial Ikan *Kryptopterus limpok* (Bleeker 1852) dari Sungai Kampar Provinsi Riau

KHAIRIZA UMAMI PUTRI PANJAITAN^{1*}, ROZA ELVYRA², DEWI INDRIYANI ROSLIM³

¹²³ Jurusan Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau
Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas, Panam, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia
*e-mail: khairizaumami@yahoo.co.id

ABSTRAK

Sungai paparan banjir yang ada di provinsi Riau memiliki ciri khas yaitu memiliki keunikan habitat dan fauna, salah satu jenis ikan yang hidup di sungai paparan banjir Riau adalah ikan yang berasal dari genus *Kryptopterus* yang perlu dijaga kelestariannya. Isolasi DNA total merupakan teknik yang digunakan untuk mendapatkan DNA murni dari suatu sampel. Molekul DNA total dan fragmen *COX2* mitokondrial dari ikan *Kryptopterus limpok* yang didapatkan kemudian akan digunakan untuk penelitian analisis keanekaragaman genetik sebagai salah satu usaha konservasi terhadap ikan jenis ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi DNA dan menentukan suhu *annealing* untuk gen *COX2* pada *K. limpok*. Sampel *K. limpok* berasal dari sungai paparan banjir yang ada di Provinsi Riau, yaitu Sungai Kampar. Otot yang digunakan untuk isolasi berasal dari bagian ekor ikan. Proses isolasi dan purifikasi dilakukan dengan menggunakan Kit isolasi dan purifikasi DNA Dneasy *Blood and Tissue Kit* dari Qiagen. Proses amplifikasi menggunakan 4 pasang primer. Proses isolasi menggunakan Kit isolasi dan purifikasi DNA Dneasy *Blood and Tissue Kit* dari Qiagen menghasilkan DNA total yang utuh dan tidak smear yang digunakan sebagai cetakan untuk tahap amplifikasi. Pasangan primer *COX2_SA_F1* dan *COX2_SA_R1* dengan suhu *annealing* 49°C merupakan pasangan primer yang tepat untuk amplifikasi fragmen *COX2* ikan *K. limpok*.

Kata Kunci: *COX2*, Isolasi DNA, *Kryptopterus limpok*, Optimasi PCR, Sungai paparan banjir.

ABSTRACT

Floodplain in Riau Province has a unique habitat and fauna characteristic. One of fish species occur in this area is the genus *Kryptopterus* that need to be conserved. Isolation of total DNA is a technique that used to obtain pure DNA from a sample. Total DNA molecules and fragments of the mitochondrial *COX2* of *Kryptopterus limpok* were obtained and will be used to study the genetic diversity analyzes as one of the conservation efforts to conserve this fish. This study aimed to isolate DNA and to determine the optimal temperature in the annealing process of mitochondrial *COX2* from *K. limpok* collected from flood plain, Kampar River, Riau Province. Tail Muscles was used for DNA isolation. The process of isolation and purification method using DNA Kit DNeasy Blood and Tissue from Qiagen. Amplification process used 4 primer pairs. The total DNA was intact and no smear used, this Dna was then used as a template for amplification stage. Primer pairs *COX2_SA_F1* and *COX2_SA_R1* with annealing temperature of 49°C is appropriate primers for amplification *COX2* fragment of *K. limpok*.

Key words: *COX2*, DNA isolation, *Kryptopterus limpok*, PCR optimization, floodplain.

PENDAHULUAN

Sungai paparan banjir memiliki habitat yang beragam yang memungkinkan banyak spesies ikan memanfaatkan daerah ini dengan berbagai cara untuk menunjang proses kehidupannya (Brocherding *et al.* 2002). Sungai paparan banjir yang terdapat di beberapa daerah di Indonesia salah satunya adalah yang ada di Provinsi Riau yaitu Sungai Kampar. Menurut Elvyra (2009), sungai di provinsi Riau memiliki ciri khas yaitu memiliki keunikan habitat dan fauna. Salah satu jenis ikan yang hidup di sungai paparan banjir Riau adalah ikan yang berasal dari genus *Kryptopterus* yang secara umum di Indonesia dikenal sebagai kelompok ikan selais (Kottelat *et al.* 1993).

Ikan *Kryptopterus limpok* memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena merupakan ikan konsumsi yang digemari masyarakat pada umumnya terutama jika telah diolah menjadi ikan asap (*smoked fish*). Ikan selais ini sendiri telah menjadi produk ikan yang mulai di ekspor ke Negara tetangga seperti Malaysia. Nilai komersial yang tinggi dari ikan ini menyebabkan perlu dilakukannya suatu usaha konservasi mengingat jumlah populasinya yang semakin menurun dan belum dapat dibudidayakan. Ikan ini sangat penting untuk dilestarikan jika melihat lokasi persebarannya yang hanya terdapat di beberapa daerah paparan banjir yang memiliki kelimpahan yang tidak luas (Elvyra 2009).

Meskipun ikan ini memiliki potensi yang tinggi (Pulungan *et al.* 1985), informasi mengenai genom inti dan mitokondrial masih terbatas jumlahnya saat ini. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui informasi genetik berbasis molekuler guna menunjang usaha konservasi dan perlindungan sumber daya genetik dari fauna sungai paparan banjir ini. Informasi molekuler yang digunakan dalam hal ini adalah gen *COX2*.

Teknik PCR digunakan dalam penelitian ini untuk mengamplifikasi fragmen *COX2*. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan salinan hanya dalam beberapa jam. Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan dimana primer oligonukleotida yang berperan sebagai *forward* dan *reverse* akan membatasi reaksi amplifikasi DNA (Zein & Prawiradilaga 2014)..

Untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi pada tahapan proses PCR yang meliputi pra-denaturasi, denaturasi, penempelan primer (*annealing*), pemanjangan primer (*extension*). Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi kondisi berkaitan erat dengan faktor-faktor seperti primer, polymerase DNA, suhu, konsentrasi, dalam hal ini berkaitan dengan dNTPs, DNA polymerase, buffer PCR dan waktu (Handoyo & Rudietna 2001).

Gen *COX2* adalah gen mtDNA yang mengkode protein sitokrom c oksidase subunit 2. Gen *COX2* digunakan sebagai penanda molekuler untuk mengetahui struktur genetika populasi spesies tertentu (Low *et al.* 2014). Gen *COX* telah ditetapkan sebagai DNA *barcode* yang ditujukan untuk pengembangan bioidentifikasi ikan secara global (*FishBol* 2013; Ivanova *et al.* 2007). Gen *COX1* telah digunakan dalam penelitian molekuler sebagai penanda genetik yang dilakukan terhadap genus *Kryptopterus* dan *Ompok* dari provinsi Riau (Elvyra & Duryadi 2013). Penelitian dengan menggunakan gen *COX3* juga telah dilakukan pada beberapa ikan dari genus *Kryptopterus* (Tampubolon 2015). Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan proses isolasi DNA dan amplifikasi dengan mengoptimasikan kondisi PCR untuk mendapatkan fragmen gen *COX2* pada ikan *Kryptopterus limpok* untuk melengkapi informasi genetik dan analisis keanekaragaman genetik ikan jenis ini.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2015 sampai dengan April 2016 di Laboratorium Zoologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Pengambilan sampel di sungai paparan banjir Provinsi Riau.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung mikrotip mikro, *waterbath*, gunting, pinset, mesin PCR, mesin elektroforesis horizontal, mesin sentrifus, mesin vortex, sisir dan cetakan agarose, gelas ukur, timbangan analitis, *hot plate*, *stirer*, *UV transilluminator*, Kit isolasi dan purifikasi DNA *Dneasy Blood and Tissue Kit* dari Qiagen, serta mesin pengurutan DNA.

Bahan yang digunakan adalah sampel otot ikan *K. limpok*, Kit isolasi dan purifikasi DNA *Dneasy Blood and Tissue Kit* dari Qiagen, PCR Kit TopTaq PCR dari Qiagen, Primer *COX2* yang di rancang dari

fragmen *COX2 Ictalurus punctatus* dan *Silurus asotus*, buffer TBE, Buffer TE, *Loading Dye*, DNA *Ladder*, etidium bromide, dan agarosa.

Isolasi dan Purifikasi DNA Total *K. limpok*

Proses isolasi dan purifikasi dilakukan dengan menggunakan Kit isolasi dan purifikasi DNA *Dneasy Blood and Tissue Kit* dari Qiagen. Sampel otot bagian ekor ikan *K. limpok* dicacah kemudian ditambahkan 180 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinase K, 200 µl etanol absolut untuk pelisisan sel. Selanjutnya dilakukan proses *washing* dengan penambahan 500 µl Buffer AW 1 dan 500 µl Buffer AW 2. Kemudian dilakukan proses elusi untuk memperoleh DNA total sebagai stok dengan penambahan 200 µl Buffer AE dalam sampel. Stok DNA total yang didapatkan kemudian disimpan pada suhu 4°C.

Optimasi suhu *annealing* menggunakan Teknik PCR

Molekul DNA total *K. limpok* digunakan sebagai cetakan untuk proses PCR. Proses PCR dilakukan dengan menggunakan PCR Kit TopTaq PCR dari Qiagen, primer yang dirancang dari fragmen *COX2 Ictalurus punctatus* dan *Silurus asotus* (Tabel 1) beserta optimasi *Tm* (*Temperatur melting*) untuk kombinasi pasangan primer (Tabel 2) (dengan kondisi PCR menurut Elvyra dan Duryadi (2007) dengan beberapa modifikasi.

Tabel 1. Rancangan primer dari fragmen *COX2Ictalurus punctatus* dan *Silurus asotus* yang akan mengamplifikasi fragmen *COX2 K. limpok*

Primer	5'-----3'
COX2_SP_F1	AAATCCTGCGTATCTTGAGC
COX2_SP_R1	TCAAAGTGCTCTAGGGGAAC
COX2_SP_F2	CCCTCACAACTAGGATTCCA
COX2_SA_F1	AAACTGACCATGGCACTAAA
COX2_SA_R1	ACGAAAACATAGGCTTGGAT
COX2_SA_F2	AAGTTACAGCTCTCAATGCT
COX2_SA_R2	TGGGCATTAGGGTGATAGTA

Keterangan: (SP)*Ictalurus Punctatus*; (SA)*Silurus asotus*; (F)*Forward*; (R)*Reverse*

Tabel 2. Kombinasi pasangan primer dan modifikasi suhu *annealing* proses amplifikasi.

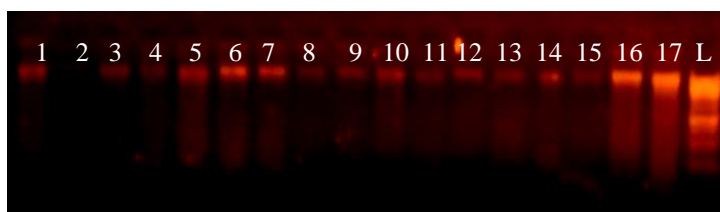
Primer		Tm Rata-rata (°C)	Ta (°C)	
Forward	Reverse		Tm -3'	Tm -5'
COX2_SP_F1	COX2_SP_R1	53,5	50,5	48,5
COX2_SP_F2	COX2_SP_R1	53,95	50,95	48,95
COX2_SA_F1	COX2_SA_R1	52	49	47
COX2_SA_F2	COX2_SA_R2	52,05	49,05	47,05

Keterangan: (Tm)*Temperature melting*; (Ta) *Temperature annealing*; (SP)*Ictalurus Punctatus*; (SA)*Silurus asotus*; (F)*Forward*; (R)*Reverse*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul DNA Total

DNA total yang diperoleh merupakan hasil isolasi dan purifikasi ikan *K. limpok* dari sungai paparan banjir Provinsi Riau yaitu Sungai Kampar. Tujuh belas DNA total yang telah diisolasi kemudian dimigrasikan pada gel agarosa 1,2 % menggunakan mesin *UV transiluminator* untuk melihat ketebalan pita DNA hasil isolasi yang kemudian akan digunakan sebagai cetakan untuk tahap amplifikasi daerah penyandi gen *COX2* (Cytochrome c Oxydase sub unit 2). Berdasarkan hasil elektroforesis, DNA total yang dihasilkan memiliki kondisi pita DNA yang utuh (Gambar 1). Molekul DNA dikatakan baik bila pita yang dihasilkan tebal, tegas, dan tidak smear (DNA yang terfragmentasi atau tidak utuh) (Nugraha 2014).



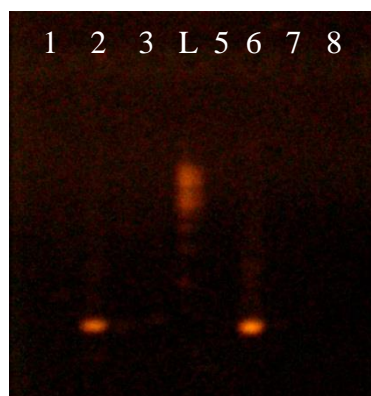
Gambar 1. Molekul DNA total *K. limpok* dari sungai Kampar menggunakan gel agarose 1,2 %.
Keterangan: (1-17) DNA total *K. limpok* dari Sungai Kampar; (L) DNA Ladder;

Optimasi Suhu Annealing Pada Proses PCR

Proses PCR dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen *COX2* mitokondrial pada ikan *K. limpok*. Optimasi proses PCR dilakukan guna mendapatkan pita utuh yang berada pada posisi pasang basa yang diharapkan yang menandakan keberhasilan proses ini. Primer yang digunakan dalam penelitian ini dirancang berdasarkan fragmen *COX2* dari *Ictalurus punctatus* dan *Silurus asotus* dengan jumlah 20 basa yang akan menempel pada situs 5' - 3' fragmen *COX2*. Dalam merancang primer, panjang optimal primer berkisar antara 18 – 30 basa. Panjang kurang dari 18 bisa akan menjadikan spesifitas primer rendah sedangkan panjang lebih dari 30 basa tidak akan meningkatkan spesifitas primer secara bermakna dan akan memerlukan biaya yang lebih mahal dalam pembuatannya (Handoyo & Rudietna 2001).

Primer yang telah di rancang kemudian dipasangkan berdasarkan kombinasi *forward* dan *reverse* pada situs penempelan -3' dan -5' untuk mengamplifikasi fragmen *COX2*. Pemilihan T_m (*Temperature melting*) primer sangat penting dan akan berpengaruh dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR. Pemilihan suhu merupakan hal yang sangat penting mengingat suhu merupakan salah satu faktor yang akan menentukan keberhasilan proses PCR. Dalam hal ini suhu berkaitan dengan proses denaturasi DNA template, *annealing* dan ekstensi primer. Dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan adanya *mispriming* pada daerah target dan non-target, dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan oleh eksperimen (Newton & Graham 1994).

Optimasi suhu *annealing* perlu dilakukan untuk memastikan suhu yang tepat yang akan digunakan untuk amplifikasi fragmen *COX2* pada *K. limpok* menggunakan primer 4 pasang primer yang telah dirancang. Pita tunggal yang dihasilkan pada tahap ini menandakan keberhasilan proses PCR dan pasangan primer yang spesifik yang menempel pada posisi yang diharapkan (Ratnayani *et al.* 2007). Profil DNA hasil amplifikasi disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Profil DNA hasil amplifikasi dengan optimasi suhu *annealing*. Keterangan: (L) DNA Ladder; (1) Suhu *annealing* COX2_SA_F1/COX2_SA_R1, 47°C; (2) COX2_SA_F2/COX2_SA_R2, 49,05°C; (3) COX2_SP_F1/COX2_SP_R1, 48,5°C; (4) COX2_SP_F2/COX2_SP_R1, 50,95°C; (5) COX2_SA_F2/COX2_SA_R2, 47,05°C; (6) COX2_SA_F1/COX2_SA_R1, 49°C; (7) COX2_SP_F2/COX2_SP_R1, 48,95°C; (8) COX2_SP_F1/COX2_SP_R1, 50,5°C.

Berdasarkan profil DNA dengan optimasi suhu yang telah dilakukan terhadap 4 pasang primer dengan 8 suhu *annealing* yang berbeda, diketahui bahwa pada hasil nomor 1, pasangan primer COX2_SA_F1/COX2_SA_R1 dengan suhu *annealing* 47°C tidak menghasilkan pita DNA. Hasil nomor 2 yaitu Pasangan primer COX2_SA_F2/COX2_SA_R2 dengan suhu *annealing* 49,05°C menghasilkan pita DNA yang utuh dan tidak smear. Untuk hasil optimasi suhu pada nomor 3, pasangan primer COX2_SP_F1/COX2_SP_R1 dengan suhu *annealing* 48,5°C, nomor 4 yang menggunakan pasangan primer COX2_SP_F2/COX2_SP_R1 dengan suhu *annealing* 50,95°C, dan hasil nomor 5 yang menggunakan pasangan primer COX2_SA_F2/COX2_SA_R2 dengan suhu *annealing* 47,05°C tidak menghasilkan pita DNA. Pita DNA juga tidak dihasilkan pada hasil nomor 7 dan 8 yang berturut-turut menggunakan pasangan primer COX2_SP_F2/COX2_SP_R1, suhu *annealing* 48,95°C dan COX2_SP_F1/COX2_SP_R1, suhu *annealing* 50,5°C. Sedangkan untuk hasil nomor 6 yang menggunakan pasangan primer COX2_SA_F1/COX2_SA_R1 dengan suhu *annealing* 49°C menghasilkan pita DNA yang utuh, tebal, terang, dan tidak smear.

Pita DNA yang tidak dihasilkan pada hasil nomor 1,3,4,5,7, dan 8 menandakan bahwa pasangan primer dan suhu *annealing* tersebut bukanlah primer dan suhu yang tepat untuk mengamplifikasi gen *COX2* pada *K. limpok*. Terdapat 2 pasang primer dengan suhu *annealing* yang menghasilkan pita DNA utuh, yaitu pada hasil nomor 2 dan 6. Pasangan primer COX2_SA_F1/COX2_SA_R1 dengan suhu *annealing* 49°C pada hasil nomor 6 menghasilkan pita DNA yang lebih terang dan tegas dibandingkan pita DNA yang dihasilkan oleh pasangan primer COX2_SA_F2/COX2_SA_R2 dengan suhu *annealing* 49,05°C pada hasil nomor 2. Oleh karena itu, pasangan primer dan suhu *annealing* yang tepat yang akan digunakan untuk mengamplifikasi gen *COX2* pada *K. limpok* adalah pasangan primer COX2_SA_F1/COX2_SA_R1 dengan suhu *annealing* 49°C.

KESIMPULAN

Proses isolasi menggunakan Kit isolasi dan purifikasi DNA Dneasy *Blood and Tissue Kit* dari Qiagen menghasilkan DNA total yang utuh dan tidak smear yang digunakan sebagai cetakan untuk tahap amplifikasi. Pasangan primer COX2_SA_F1 dan COX2_SA_R1 dengan suhu *annealing* 49°C merupakan pasangan primer yang tepat untuk amplifikasi fragmen *COX2* ikan *K. limpok*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis Mengucapkan terimakasih kepada Pusat Studi Pangan, Energi dan Bioteknologi-LPPM Universitas Riau atas bantuan pendanaan penelitian Pusat Studi Tahun anggaran 2015 a.n Roza Elvyra, M.si.

DAFTAR PUSTAKA

- Boercherding J, Bauerfeld M, Hintzen D, Neumann D. 2002. Lateral migrations of fishes between floodplain lakes and their drainage channels at the Lower Rhine: die and seasonal aspects. *Journal of FishBiology*. 61: 1154-1170.
- Elvyra R. 2009. *Kajian Keragaman Genetik Dan Biologi Reproduksi Ikan Lais Di Sungai Kampar Riau*. IPB. Bogor.
- Elvyra R, Duryadi D. 2013. The Characteristic mitochondrial cytochrome c oxidase sub unit 1 gene of *Kryptopterus apogon* (Bleeker 1851). *International Seminar fo Fishseries and Marine*2: 124-127
- FishBol. 2013. *Fish barcode of live initiative*. <http://www.fishbol.org/> [26 Oktober 2015].
- Handoyo D, Rudietna A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Bioteknologi*. 9(1): 17-29.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN. 2007. Barcoding: Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Moleculer Ecology Notes*. *Blackwell PublishingLtd*. doi: 10.1111/j. 1471-8286.2007.01748.
- Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirdjoatmodjo S. 1993. *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Jakarta: Periplus Edition (HK) in Cwith The Environment Rep. of Indonesia.

- Low VL, *et al.* 2014. Mitochondrial DNA markers reveal high genetic diversity but low genetic differentiation in the black fly *Simulium tani* Takaoka & Davies along an elevational gradient in Malaysia. *PLoS One*. 18;9(6):e100512. doi: 10.1371/journal.pone.0100512. eCollection 2014.
- Newton CR, Graham A. 1994. *PCR*. UK: Bios Scientific Publisher.
- Nugraha F. 2014. *Analisis Sekuen Ekson 3 Sampai Sebagian Ekson 6 Dari Gen Ferritin2 (Os Fer2) Pada Tiga Genotipe Padi (Oryza sativa L.) Indrairi Hilir, Riau*. [skripsi]. Pekanbaru: Universitas Riau.
- Pulungan CP, Ahmad, Siregar YI, Ma'amoen S, Alawi H. 1985. Morfometrik ikan lais Siluridea dari perairan kecamatan Kampar Kiri kabupaten Kampar Riau. Pekanbaru: Pusat Penelitian Universitas Riau.
- Ratnayani K, Wirajana IN, Laksmiwati AAIAM. 2007. Analisis variasi nukleotida daerah *D-loop* DNA mitokondria pada satu individu suku bali normal. *Jurnal Kimia*. 1(1): 7-14.
- Ratnasingham S, Hebert P. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Mol Ecol Notes*. 7: 355-364.
- Tampubolon R. 2015. *Analisis Penanda Genetik Pada Ktyptopterus apogon (Bleeker 1851) Berdasarkan Gen COX3 Dari Tiga Sungai Paparan Banjir Provinsi Riau*. [skripsi]. Pekanbaru: Universitas Riau.
- Zein MSA, Prawiradilaga DM. 2014. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Jakarta: Kencana.