

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Penelitian

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan salah satu ikan air tawar yang termasuk ke dalam *infraclass Teleostei* (Integrated Taxonomic Information System, 2012). Menurut Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya (2014) gurame merupakan salah satu komoditas perikanan budidaya yang potensial untuk dikembangkan. Terjadi peningkatan produksi gurame pada tahun 2009 hingga tahun 2013 sebesar 19,86 % per tahun di mana pada tahun 2009 produksi gurame sebesar 46,254 ton dan meningkat pada tahun 2013 menjadi 94,605 ton.

Menurut Sumanto (2005) strain gurame yang dikenal masyarakat pada umumnya yaitu strain gurame soang / angsa dan jepang. Gurame soang merupakan strain gurame yang sangat diminati dikalangan pembudidaya, karena masa panennya yang singkat yaitu berkisar antara sembilan hingga sepuluh bulan. Dalam kurun waktu tersebut gurame soang dapat mencapai bobot tubuh 500 gram dan dapat langsung di lepas ke pasaran, sedangkan pada gurame jenis lain dibutuhkan waktu satu tahun untuk mencapai bobot tubuh tersebut. Gurame soang banyak dikembangkan di daerah Jawa Barat seperti Tasikmalaya dan Ciamis. Omzet yang di peroleh dari budidaya ikan gurame soang dengan ukuran kolam 5x5 m sebanyak 10 buah, sebesar 27 hingga 30 juta rupiah per bulan. Hal tersebut sangat menguntungkan, di tambah dengan metode perawatan gurame soang yang mudah dilakukan (Mina, 2013).

Dalam usaha budidaya ikan, mortalitas dalam skala besar merupakan hal yang sangat diwaspadai oleh para pembudidaya, sama halnya dengan budidaya ikan gurame, faktor internal dan eksternal yang menyebabkan mortalitas pada gurame patut diwaspadai. Keadaan stres merupakan salah satu penyebab kematian pada ikan gurame. Menurut Lass (2015) ikan yang mengalami stres menunjukkan ciri berbeda tergantung faktor yang menyebabkan kondisi stres tersebut. Pada ikan stres yang disebabkan oleh keadaan air kolam yang kurang baik, ikan akan menunjukkan ciri tingkah laku seperti, ikan selalu berenang di permukaan air, nafsu makan berkurang, dan kerap diam di sudut

kolam atau menyendiri. Menurut Hoglund *et al.*, (2003) disebutkan bahwa keadaan stres pada ikan dapat ditunjukkan pula dengan keadaan tubuh yang lebih gelap secara drastis. Faktor keadaan sekitar yang membuat kondisi ikan terganggu merupakan faktor utama yang menyebabkan ikan mengalami perubahan warna menjadi lebih gelap sebagai ciri keadaan stres pada ikan.

Pada bagian tubuh yang menghitam atau menunjukkan warna lebih gelap aktifitas melanin berperan aktif didalamnya. Melanin merupakan produk dari melanosit yang berperan dalam pembentukan pigmen coklat atau hitam. Tidak hanya berperan dalam pigmentasi hitam atau coklat, melanin memiliki fungsi lain yaitu sebagai proteksi kulit dari sinar *ultraviolet* (UV). Melanin memiliki kuantitas bervariasi dalam kulit tergantung kondisi respon tubuh. Pada hewan, melanin memiliki fungsi tambahan yaitu sebagai aspek kamuflase dan ciri keadaan tubuh hewan tersebut (Prota, 1980).

Sel melanosit terletak di daerah *stratum basalis*, di mana memiliki fungsi dalam pembentukan melanin yang di bantu dengan kerja kelompok enzim *tyrosinase*. *Tirosin* diubah menjadi *3,4 dihidroksifenil alanin* (DOPA) untuk selanjutnya diubah menjadi *dopaquinone* yang kemudian dikonversi setelah melalui beberapa tahap perubahan menjadi melanin (Junqueira *et al.*, 2003). Aktifitas kelompok enzim *tyrosinase* mempengaruhi kecepatan proses *melanogenesis*, di mana gen *Tyrosinase-Related Protein-1* (TYRP1) berperan aktif dalam mengintruksikan pembuatan enzim *tyrosinase-related protein-1* (Yan *et al.*, 2013). TYRP1 merupakan salah satu gen yang berperan dalam proses sintesis melanin. TYRP1 berfungsi untuk menginstruksikan pembuatan enzim *tyrosinase-related protein-1*, di mana letak enzim tersebut berada pada sel melanosit yaitu sel yang memproduksi pigmen melanin. Melanin memberi warna pada kulit, mata, serta jaringan lain yang peka terhadap cahaya (Kwon, 1993).

Sampai saat ini belum diketahui adanya kaitan ekspresi gen TYRP1 dengan perubahan warna kulit pada ikan gurame yang mengalami stres. Hal ini disebabkan, karena minimnya informasi genetik terkait ekspresi gen tersebut. Sikuen gen TYRP1 yang terdokumentasikan pada ikan gurame diketahui sangat minim informasi pada laman *GenBank* (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Pada identifikasi suatu gen yang belum diketahui sikuennya atau minim informasi terakit gen tersebut, para peneliti umumnya

kerap merancang pasangan *primer degenerate* (Linhart & Shamir, 2004). Menurut Kwok *et al.*, (1994) keberadaan basa *degenerate* memiliki keunikan tersendiri dalam suatu sikuen primer. Didefinisikan sebagai sikuen primer yang mewakili basa nukleotida lebih dari satu basa, *primer degenerate* memiliki kecenderungan dapat mewakili empat basa *nukleotida* dalam satu urutan sikuen *primer*.

Para peneliti kerap menggunakan daerah *Coding DNA Sequence* (CDS) dalam merancang *primer degenerate*. CDS merupakan daerah yang terkonservasi atas *exon*, di mana daerah tersebut merupakan daerah spesifik pada suatu sikuen. Dalam identifikasi suatu gen dengan menggunakan pasangan *primer degenerate*, daerah CDS perlu diketahui, agar primer yang dirancang merupakan primer spesifik untuk suatu gen tertentu (Furuno *et al.*, 2003). Dalam merancang pasangan *primer degenerate* guna analisa gen yang minim informasi terkait organisme tersebut, digunakan sikuen sekerabat yang memiliki informasi genetik yang baik dalam mendukung hasil temuan organisme target. Menurut metode kromatografi Edwin Chargaff pada tahun 1949 – 1953 (dalam Watson *et al.*, 2014) didapat salah satu kesimpulan bahwa basa-basa yang menyusun rantai DNA dari *species* dengan kekerabatan yang dekat memiliki komposisi basa yang sama.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik perbanyakan DNA secara *in-vitro* guna didapatkan segmen DNA target dalam jumlah yang di butuhkan (Mullis *et al.*, 1986). *Nested PCR* (nPCR) merupakan salah satu jenis metode PCR di mana dalam prosesnya, digunakan dua kali reaksi PCR dengan menggunakan dua set primer yang berbeda (Yourno, 1993). Dalam proses nPCR, reaksi pertama digunakan *outer-primer* guna memulai proses amplifikasi, kemudian di reaksi kedua, *inner-primer* digunakan untuk meminimalisir produk amplifikasi yang tidak diinginkan (Haff, 1994).

Kajian integrasi molekuler dan perancangan primer dapat dijadikan landasan untuk mempelajari gen yang terlibat dalam proses sintesis melanin, salah satunya yaitu gen TYRP1. Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi gen TYRP1 pada ikan gurame dengan merancang pasangan *primer degenerate* berdasarkan konsensus sikuen gen TYRP1 dari beberapa ikan dari *infraclass Teleostei* dan amplifikasi dilakukan dengan metode nPCR. Kemudian, analisa dan

karakterisasi gen TYRP1 diawali dengan menentukan daerah sikuen genom yang terkonservasi atas daerah *exon* dan *intron* yang didapatkan dari hasil pensejajaran sikuen sampel hasil *sequencing* menggunakan *software Bioedit* untuk selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik gen TYRP1 yang dirancang dari sikuen nukleotida daerah CDS dan asam amino hasil *translate* sikuen nukleotida daerah CDS untuk mengetahui karakterisasi gen TYRP1 pada ikan gurame. Perancangan primer spesifik gen TYRP1 ikan gurame dilakukan secara *online* pada laman Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) yang dirancang dari sikuens nukleotida daerah CDS.

B. Rumusan Masalah Penelitian

Bagaimana *primer degenerate* yang dirancang berdasarkan konsensus sikuen gen TYRP1 dari beberapa ikan sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei* dapat mengamplifikasi gen TYRP1 pada DNA genom ikan gurame soang ?

C. Pertanyaan Penelitian

- 1) Bagaimana analisa *primer degenerate* yang dirancang berdasarkan konsensus sikuen gen TYRP1 dari beberapa ikan sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei* ?
- 2) Bagaimana amplifikasi gen TYRP1 pada DNA genom ikan gurame dengan pasangan *primer degenerate* yang telah dirancang sebelumnya ?
- 3) Bagaimana analisa sikuen hasil *sequencing* dari produk amplifikasi gen TYRP1 pada DNA genom ikan gurame oleh *primer degenerate* yang telah dirancang sebelumnya ?
- 4) Bagaimana analisa sikuen genom ikan gurame yang didapat dari sikuen hasil *sequencing* gen TYRP1 ?
- 5) Bagaimana karakterisasi gen TYRP1 pada ikan gurame yang ditunjukkan dengan konstruksi pohon filogenetik yang dirancang dari sikuen nukleotida daerah CDS dan asam amino hasil *translate* sikuen nukleotida daerah CDS dengan organisme sekerabatnya ?

- 6) Bagaimana perancangan primer spesifik gen TYRP1 pada ikan gurame yang dirancang dari sikuen nukleotida gen TYRP1 ikan gurame daerah CDS ?

D. Batasan Masalah Penelitian

- 1) Populasi yang digunakan adalah ikan gurame soang yang didapat dari tempat pengelolaan ikan, Tasikmalaya, Jawa Barat.
- 2) Sampel DNA yang digunakan berasal dari isolasi DNA genom ikan gurame pada penelitian Kusumawaty (2014, pustaka tidak dipublikasikan).
- 3) *Primer degenerate* dirancang berdasarkan konsensus sikuen gen TYRP1 dari beberapa ikan sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei*. Sikuen didapat pada laman *GenBank* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 4) Karakterisasi gen TYRP1 dalam penelitian ini dibatasi hingga proses mengetahui kelompok gen TYRP1 ikan gurame dengan kelompok ikan sekerabatnya melalui kontruksi pohon filogenetik.

E. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini, yaitu :

- 1) Didapatkan pasangan *primer degenerate* gen TYRP1 yang mampu mengamplifikasi gen TYRP1 pada DNA genom ikan gurame, dimana *primer degenerate* yang digunakan dirancang berdasarkan konsensus sikuen gen TYRP1 dari beberapa ikan sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei*.
- 2) Didapatkan sikuen gen TYRP1 ikan gurame yang terkonservasi atas daerah *exon* dan *intron* berdasarkan analisa sikuen hasil *sequencing*
- 3) Mengetahui karakterisasi gen TYRP1 ikan gurame dari hasil konstruksi pohon filogenetik gen TYRP1 dengan ikan sekerabat ikan gurame
- 4) Didapatkan kandidat primer spesifik gen TYRP1 ikan gurame yang dirancang dari daerah CDS sikuen gen TYRP1 ikan gurame

F. Manfaat Penelitian

- 1) Dapat memberikan informasi mengenai perancangan *primer degenerate* gen TYRP1 pada ikan gurame yang dirancang dari sikuen sekerabat ikan gurame dari *infraclass Teleostei*.
- 2) Dapat memberikan informasi mengenai analisa daerah sikuen DNA parsial gen TYRP1 ikan gurame yang terkonservasi atas daerah *exon* dan *intron*.
- 3) Dapat memberikan informasi mengenai metode *nested PCR* (nPCR), karakterisasi gen, dan perancangan primer spesifik.
- 4) Kedepanya diharapkan informasi genetik gen TYRP1 pada ikan gurame dapat dijadikan dasar ilmu guna mengetahui kondisi ikan gurame yang mengalami stres yang disebabkan oleh kondisi lingkungan yang tidak baik, ataupun infeksi bakteri / penyakit
- 5) Sebagai bahan tambahan ilmu, khususnya dibidang biologi molekuler, bioinformatika, dan zoologi
- 6) Sebagai pustaka awal bagi peneliti lain untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut.