

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Ikan sidat memiliki pola daur hidup katadromous, berarti ikan sidat hidup di lebih dari satu tempat yaitu pada saat memijah hingga fase larva mengawali hidupnya di laut, saat pertumbuhan menuju dewasa ikan sidat bergerak ke perairan tawar (Affandi, 2005). Ikan sidat termasuk jenis ikan yang populer dijadikan sebagai makanan mewah karena memiliki nilai nutrisi yang baik. Negara yang mengkonsumsi ikan sidat antara lain: Jepang, Cina, Korea, Amerika, dan beberapa negara Eropa. Tingginya tingkat konsumsi ikan sidat menyebabkan tinggi pula tingkat produksinya. Indonesia merupakan salah satu negara yang memproduksi ikan sidat (*Anguilla bicolor* dan *Anguilla marmorata*). Ikan sidat (*Anguilla bicolor*) merupakan salah satu jenis ikan sidat yang memiliki distribusi luas di Indonesia setelah *Anguilla marmorata* (Sarwono, 2011). Pemenuhan kebutuhan konsumsi ikan sidat didapatkan dari hasil budidaya. Indonesia termasuk ke dalam urutan sepuluh negara di dunia sebagai pengekspor ikan sidat terbanyak dengan kualitas baik. Produksi ikan sidat (*Anguilla bicolor* dan *Anguilla marmorata*) pada tahun 2019 adalah sebanyak 515.18 ton lebih banyak daripada tahun 2018 (Sarwono, 2011; Sadili *et al.*, 2016; Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2020). Budidaya ikan sidat masih mengandalkan benih (*glass eel/ elver*) dari penangkapan di muara sungai (Fahmi & Hirnawati, 2010).

Budidaya pemijahan ikan sidat sulit dilakukan karena tingkat mortalitas yang tinggi. Sifat ikan sidat (*catadromous*) dapat menjadi sebab sulit dilakukannya pemijahan secara buatan (Rachmawati & Susilo, 2011; Sadili *et al.*, 2016). Penangkapan benih ikan sidat di alam jika dilakukan terus menerus maka akan terjadi penurunan kelimpahan populasi dan mengancam kepunahan ikan sidat di lautan. Salah satu upaya perlu dilakukan untuk mendukung keberlanjutan budidaya ikan sidat, maka perlu dilakukan pemecahan masalah terkait ketersediaan benih ikan sidat agar penangkapan benih ikan sidat di laut mengalami penurunan. Informasi dibutuhkan melalui penelitian ilmu-ilmu dasar seperti ilmu fisika, kimia/biokimia dan biologi untuk pengembangan budi daya. Ilmu biologi secara umum (morfologi, fisiologis, & molekuler) dapat digunakan dalam penyelesaian

masalah budidaya benih ikan sidat baik dari segi kebutuhan nutrisi, kondisi lingkungan (temperatur, cahaya dan salinitas medium), aspek hormonal dan gen stres ikan sidat. Stres pada ikan dapat menghambat pertumbuhan dan pemijahan serta dapat menyebabkan kematian sehingga menimbulkan kerugian bagi pembudidaya (Slembrouck *et al.*, 2005; Rachmawati & Susilo, 2011; Murtini, 2015; Purohit *et al.*, 2016). Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk memonitoring kelulushidupan ikan sidat adalah dengan memonitoring ekspresi gen-gen stres, sehingga ikan sidat dewasa yang ditangkap dari laut dapat dibudidaya dan dikontrol kehidupannya agar tidak mengalami stres dan berkembangbiak dengan baik di tempat penangkaran (Kusumawaty, 2015).

Monitoring ekspresi dari gen-gen stres pada ikan sidat diperlukan untuk melihat apakah gen-gen tersebut diekspresikan atau tidak. Ekspresi gen ikan sidat dapat dimonitoring salah satu cara dengan menggunakan RT PCR. Analisis ekspresi gen dengan RT PCR memerlukan gen kontrol. Gen kontrol yang biasa digunakan adalah gen-gen *housekeeping*. Gen *housekeeping* adalah sekumpulan gen yang terekspresi secara konstitutif (terus-menerus/selalu aktif) di berbagai jaringan dan tipe sel, gen *housekeeping* akan berhenti bekerja saat mahluk hidup mati. Gen-gen ini senantiasa bekerja sepanjang waktu selama suatu manusia atau hewan itu hidup, gen akan berhenti bekerja saat manusia atau hewan itu mati. Gen *housekeeping* bekerja dalam proses metabolisme metabolit primer, aktin, kontraksi otot jantung, dan pemompaan darah dan lain-lain (Imriani, 2013). Optimasi gen-gen *housekeeping* diperlukan untuk analisis ekspresi gen. Validasi gen-gen *housekeeping* perlu dilakukan untuk mengetahui gen *housekeeping* mana yang terekspresikan secara stabil pada ikan. Gen referensi merupakan gen *housekeeping* yang telah diseleksi dan divalidasi. Fungsi dari gen referensi ini adalah sebagai kontrol internal pada studi analisis ekspresi gen menggunakan RT-PCR (Purohit *et al.*, 2016).

Kandidat gen *housekeeping* yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada peneliti sebelumnya, Yulianti (2019) berhasil mendapatkan sekuen *housekeeping gene* dari tiga gen yaitu 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α). Menurut Purohit *et al.* (2016) belum ada gen referensi yang dapat digunakan secara *universal*, hal ini dikarenakan ekspresi gen

yang diteliti dari banyak gen referensi yang digunakan bervariasi seperti berdasarkan jenis kelamin, jenis jaringan, tahap perkembangan dan kondisi eksperimental. Saat ini belum banyak penelitian yang dilakukan untuk memvalidasi penggunaan gen referensi yang sesuai untuk analisis ekspresi gen pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*) (Endah, 2018).

Desain pasangan primer untuk RT-PCR dan optimasi akan dilakukan pada tiga organ, yaitu : hati, ginjal, dan usus dari ikan sidat (*Anguilla bicolor*). Penggunaan organ pada sistem ekresi dan sistem pencernaan karena saat stres tubuh ikan akan merespon sehingga mengganggu proses metabolisme dan proses fisiologis. Beberapa penelitian yang memberikan perlakuan untuk memonitoring kelulushidupan pada ikan sidat menunjukkan respon imun pada fisiologis ikan (Cholifah *et al.*, 2012; Rachmawati *et al.*, 2017). Organ yang digunakan merupakan organ dari *stock* penelitian yang dilakukan oleh Yulianti (2019). Hal tersebut karena adanya wabah COVID19 yang melanda seluruh dunia termasuk Indonesia, dan diberlakukannya PSBB (Pembatasan Sosial Berskala Besar) sehingga proses penelitian yang dilakukan di laboratorium dihentikan. Isolasi dilakukan dengan menggunakan organ yang tidak berasal dari pembedahan ikan sidat baru dan hanya dilakukan sekali. Berdasarkan hal tersebut, proses penelitian sebanyak 90% dilakukan secara kajian pustaka.

Proses penelitian dilakukan secara *in silico* dan kajian pustaka. Proses *in silico* dilakukan pada tahap analisis amplifikasi primer *multiplex* RT-PCR menggunakan *software* FastPCR. *Multiplex* merupakan teknik biologi molekuler yang luas untuk mengamplifikasi berbagai target dalam satu reaksi tunggal PCR. Primer *multiplex* adalah campuran beberapa pasangan primer dalam amplifikasi satu reaksi tunggal PCR (Desain Premier Biosoft, 2020). Keuntungan analisis *multiplex* RT-PCR dibandingkan PCR biasa adalah menghemat biaya, analisis dapat dilakukan pada banyak target dalam satu kali *running*, hasil data didapatkan dalam waktu singkat (Applied Biosystems, 2010). Analisis *multiplex* pada perangkat lunak melakukan pemeriksaan pada ukuran ampikon, deltaG (ΔG) dan pembentukan primer *dimer* (Lepais *et al.*, 2020). Berdasarkan ukuran ampikon, nilai deltaG (ΔG) dan terbentuknya primer *dimer* akan didapatkan hasil primer efisiensi amplifikasi PCR yang dapat menentukan kualitas produk PCR yang diuji secara *in silico*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah “Bagaimanakah perancangan urutan pasangan primer *multiplex* RT-PCR untuk gen *housekeeping* 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α) pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*)?”

1.3 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, dapat dikembangkan menjadi beberapa pertanyaan penelitian diantaranya, yaitu :

1. Bagaimanakah kualitas dan kuantitas RNA yang diekstraksi dari organ ikan sidat (*Anguilla bicolor*)?
2. Apakah urutan primer *multiplex* RT-PCR yang telah dirancang mampu mengamplifikasi gen *housekeeping* 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α) secara *in silico* pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*)?

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian yang akan dilakukan yaitu :

1. Populasi ikan sidat (*Anguilla bicolor*) yang berasal dari petani lokal.
2. Sampel ikan sidat (*Anguilla bicolor*) yang digunakan berasal dari organ hati, ginjal, dan usus.
3. Gen *housekeeping* yang digunakan 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α).

1.5 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk perancangan primer *multiplex* RT-PCR gen *housekeeping* yang dapat teramplifikasi secara *in silico* pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*).

1.6 Manfaat

Manfaat yang akan diperoleh dari penelitian yang dilakukan yaitu :

1. Koleksi gen *housekeeping* sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen ikan sidat (*Anguilla bicolor*).

2. Mendapatkan pasangan primer gen *housekeeping* yang terekspresikan secara stabil pada ikan sidat.
3. Dapat digunakan sebagai studi referensi gen dalam analisis ekspresi gen pada penelitian tentang ikan sidat (*Anguilla bicolor*) di masa mendatang.

1.7 Struktur Organisasi

Secara garis besar isi dari skripsi ini meliputi lima bagian, diantaranya yaitu Bab I Pendahuluan, Bab II Kajian Pustaka, Bab III Metode Penelitian, Bab IV Temuan dan Pembahasan serta Bab V Simpulan, Implikasi Dan Rekomendasi. Adapun uraian dari setiap babnya sebagai berikut:

1. Bab I

Bab I dijelaskan pendahuluan yang berisi latar belakang penelitian, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, batasan masalah, tujuan dari penelitian serta manfaat yang didapat dari penelitian yang dilakukan.

2. Bab II

Bab II dipaparkan mengenai kajian pustaka yang relevan dengan penelitian yang dilakukan. Kajian pustaka tersebut meliputi ikan sidat (*Anguilla bicolor*), *housekeeping gene* 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α) yang ada pada *Anguilla bicolor*, gen referensi, Primer *multiplex*, *Real Time-PCR*, Analisis asam nukleat secara kuantitatif dan kualitatif.

3. Bab III

Bab III diuraikan mengenai jenis penelitian yang digunakan pada penelitian, waktu dan tempat penelitian, prosedur penelitian yang meliputi tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap analisis data.

4. Bab IV

Bab IV berisi tentang temuan serta pembahasan mengenai penelitian yang dilakukan. Pembahasan tersebut tentunya didukung dengan teori-teori dari penelitian relevan yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya.

5. Bab V

Bab V dijelaskan mengenai kesimpulan, implikasi dan rekomendasi guna kepentingan pada penelitian selanjutnya, sehingga temuan yang didapat dari penelitian ini dapat lebih dikembangkan pada penelitian berikutnya.