

<p><b>Full Paper</b></p>
--------------------------

**POLIMORFISME ENZIM GLUCOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE PADA  
TIGA POPULASI TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)**

**GLUCOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE POLYMORPHISM IN  
THE THREE POPULATIONS OF YELLOWFIN TUNA, *Thunnus albacares***

Gusti Ngurah Permana<sup>\*)</sup>, Jhon H. Hutapea<sup>\*)</sup>, Sari Budi Moria<sup>\*)</sup>, dan Haryanti<sup>\*)</sup>

**Abstract**

Samples of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) were taken from three locations Bali, North Sulawesi and North Maluku. The glucose-6-phosphate isomerase (GPI) was analyzed from liver using allozyme electrophoresis method. Polymorphism of GPI enzyme was observed and four alleles (A,B,C,D) were found in Bali population, three alleles (A,B,C) were found in North Maluku and North Sulawesi populations. Heterozygosity values, from Bali, North Maluku and North Sulawesi were 0.419; 0.417; 0.143 respectively. Genetic distance between North Sulawesi and North Maluku were 0.029, and with Bali population was 0.353. These results indicated that North Maluku and North Sulawesi population were not separate by geographic barrier, therefore genetic distance of both populations was closed. However, those populations were genetically separated to the Bali population might be due to major hydrological barrier.

**Key words:** allozyme, glucosephosphate isomerase, yellowfin tuna

**Pengantar**

Tuna sirip kuning (*yellowfin tuna*), *Thunnus albacares* merupakan salah satu diantara spesies ikan bernilai ekonomis penting dalam perikanan di dunia. Mulai tahun 1986, penelitian mengenai budidaya ikan ini sudah dilakukan di jaring apung (Masuma *et al.*, 1993) termasuk beberapa aspek biologi (Wild, 1994), daur hidup dan perkembangan morfologi dari larva sampai juvenil (Kaji *et al.*, 1999).

Populasi genetik tuna dengan cakupan geografis dari seluruh laut Indonesia diduga mempunyai struktur berbeda-beda sebagai akibat dari keterbatasan laju migrasi gen. Bukti perbedaan stok ditemukan di dalam 2 jenis hiu (Lavery & Shaklee, 1989), 4 spesies cumi-cumi (Yeatman & Benzie, 1994), perbedaan struktur populasi ini juga ditemukan pada kerang mutiara (*pearl oyster*) (Johnson & Joll, 1993). Studi biokimia enzim dapat digunakan untuk mengetahui variasi

genetik dan perbedaan genetik pada beberapa populasi ikan. Polimorfisme enzim telah berhasil diaplikasikan dalam *genetics tag* pada kakap (*Chrysophrys auratus*) (Jamieson, 1974). Penelitian enzim polimorfisme pada populasi tuna masih sangat terbatas sehingga penting untuk diketahui terutama dalam mengetahui pemisahan *breeding stock* sebagai dasar pengetahuan dalam manajemen perbenihan tuna.

**Bahan dan Metode**

Sampel diambil dari tempat pelelangan ikan di Bali (perairan Bali Utara) pada Maret 2004, Sulawesi Utara (Kalesey) pada April 2004, dan Maluku Utara (Ternate) pada September 2004. Jumlah sampel yang dianalisis 149 ekor. Jaringan yang dipergunakan untuk analisis adalah hati (*liver*).

*Analisis allozyme*

Bahan kimia yang digunakan adalah:

<sup>\*)</sup> Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, PO BOX 140-Singaraja 81101-Bali. Telp: 0362 92278 Fax. 0362 92272

<sup>\*)</sup> Penulis untuk korespondensi, E-mail: agus.permana.2001@yahoo.com

*Starch potatoes agar*,  $MgCl_2$  1M, KCl 0,1N, buffer C-AMP pH 6, asam sitrat 7%, *Fast Blue Marker*. *Staining solution* adalah Fructose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma F.1502, USA) dan Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma G.8878, USA).

Sampel diambil dan dibawa ke laboratorium dalam keadaan segar dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}C$ . Analisis enzim menggunakan bufer citric acid aminopolymorpholine dengan pH 6. Jaringan hati (*liver*) digerus dan ditambahkan  $MgCl_2$  1 M., KCN 0,005 N. Horizontal starch gel elektroforesis dilakukan dalam penelitian ini dengan arus konstan  $80 \text{ mA/cm}^2$ , voltase 110 volt, pada *refrigerator* ( $4^{\circ}C$ ) selama 240 menit (4 jam). Starch gel dibuat dengan konsentrasi 12% (v/w) dalam bufer CAPM-6. Metode analisis mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Sugama & Priyono (1998).

#### a. Preparasi buffer elektroforesis

Buffer elektroforesis (CAPM pH 6) dibuat dengan mencampur *amino propyl-morpholine* sebanyak 24 ml dengan 15 g asam sitrat, selanjutnya ditambahkan aquadest hingga volume larutan mencapai 1000 ml, larutan dihomogenkan dengan menggunakan *stirrer*.

#### b. Preparasi gel pati konsentrasi 12% (w/v)

Gel dibuat dengan cara menimbang 48 g *potato starch* yang merupakan campuran 20 g *potato starch* (Sigma, USA) dan 28 g *hydrolyzed potato starch* (Smithville, USA) dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* 1000 ml. Di bagian lain dimasukkan 2 ml  $MgCl_2$ , 10 ml KCN 0,1 N dan 8 ml *buffer* CAPM pH 6 ke dalam gelas ukur 1000 ml, dikocok dan ditambahkan aquadest hingga volumenya mencapai 400 ml, larutan tersebut dituang ke dalam *erlenmeyer* yang berisi *potato starch* dan dikocok hingga larut, kemudian dipanaskan di atas pemanas hingga muncul gelembung-gelembung halus. Gelembung-gelembung halus tersebut dikeluarkan menggunakan aspirator dan gel pati dituang ke dalam cetakan ukuran

20x12x1 cm. Setelah dingin dan memadat, gel ditutup dengan plastik *wrap* dan selanjutnya disimpan dalam ruangan bersuhu  $20-25^{\circ}C$  selama 4-5 jam dan siap digunakan.

#### c. Preparasi jaringan

Sampel diambil dan dibawa ke laboratorium dalam keadaan segar dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}C$ . Jaringan hati (*liver*) disayat dan dimasukkan dalam tempat sampel/*plate* sampel kemudian ditambahkan homogenesing buffer ( $MgCl_2$  1 M dan KCN 0,005 N) selanjutnya digerus sampai hancur. Potongan kertas *blotting* ukuran 5x10 mm ditempelkan pada sayatan jaringan dan dibiarkan beberapa saat. Setelah tampak basah karena menyerap enzim yang keluar dari jaringan, potongan kertas *blotting* siap diaplikasikan pada gel.

#### d. Running elektroforesis

Gel dilepas dari cetakan dan tinggal menempel pada lempeng kaca, kemudian gel dipotong memanjang dengan perbandingan 60% (untuk sisi positif) dan sisanya 40% (untuk sisi negatif). Kertas *blotting* (*blotting paper*) yang telah menyerap enzim dari jaringan diletakkan berurutan diantara belahan gel. Pada kedua ujung dan bagian tengah belahan gel ditempatkan marker dari kertas saring yang telah direndam dalam *fast blue marker*. Selanjutnya kedua belahan gel disatukan kembali, bingkai cetakan dipasang kembali lalu ditutup dengan plastik *wrap*.

Gel kemudian diletakkan di atas nampan elektroforesis (*electrophoresis tray*), yang telah dituangi larutan buffer. Kedua sisi dihubungkan dengan menggunakan sellembar *paper bridges*. Bagian atas gel diletakkan kotak untuk es batu untuk menghindari gel terlalu panas. *Running* dilakukan pada *refrigerator* ( $4^{\circ}C$ ) dengan arus konstan  $80 \text{ mA/cm}^2$ , voltase 110 volt selama 240 menit.

#### e. Pengirisan gel

Gel hasil *running* diangkat, kertas saring bekas penanda (*marker*) dan ekstrak jaringan diambil dari gel. Ukuran luas gel diperkecil dengan memotong 1 cm pada

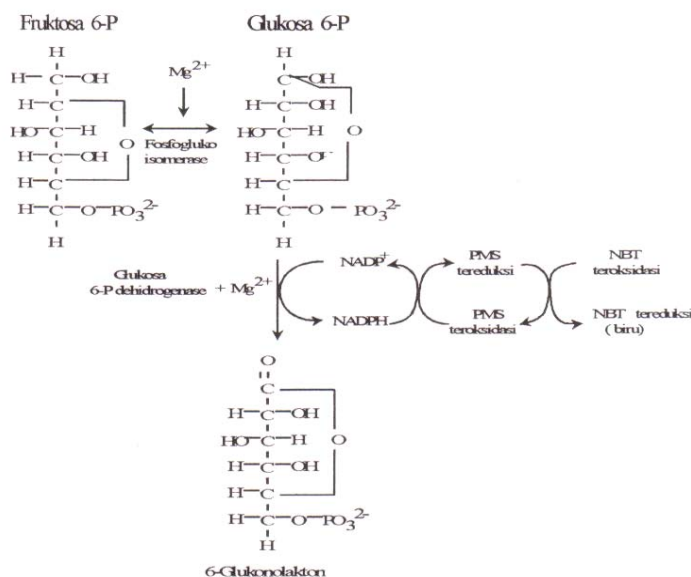
semua sisi. Pemotongan dilakukan dengan tidak melampaui batas penanda dan bekas ekstrak jaringan. Bingkai dilepas dan sisa potongan gel dibuang, lempengan kaca tempat gel menempel dibersihkan dan permukaan gel dikeringkan menggunakan kertas penyerap. Lempengan plastik (195x125x1 mm) diletakkan atas gel. Gel akan melekat kuat pada lempeng plastik tersebut, bingkai dipasang kembali. Di atas lempeng plastik diletakkan lempengan kaca kemudian gel dibalik ke kiri sehingga bagian atas berada di bawah, di atas gel diletakkan lempeng kaca.

Gel dipotong tipis setebal 1 mm dengan menggunakan senar gitar. Setiap selesai satu sayatan, ditambahkan lempeng plastik 1 mm pada bagian bawah sebagai alas, demikian seterusnya sampai gel tersayat seluruhnya. Dengan memutar ke arah kiri, gel dibalik lagi sehingga posisi seperti semula. Kaca dan lempeng plastik paling atas dilepaskan. Pojok kanan atas dipotong sedikit untuk menandai nomor sampel. Gel dipotong dua bagian tepat pada penanda batas (di tengah). Setiap irisan diambil secara hati-hati selanjutnya gel ditempatkan di dalam wadah kotak *polyethylene* untuk pewarnaan.

#### f. Pewarnaan

Pewarnaan yang dilakukan tergantung dari jenis enzim yang akan dianalisis. Dalam penelitian ini digunakan enzim GPI yang memerlukan koenzim *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADP). NADP berperan dalam pemindahan hidrogen dan ion  $H^+$ . Selain itu reagen lain yang digunakan adalah PMS (*phenazine methosulfat*) dan NBT (*nitroblue tetrazolium*). PMS berperan sebagai pengemban elektron antara NADH atau NADPH dan zat warna, yang menyebabkan warna NBT tereduksi dari tidak berwarna menjadi berwarna biru. Reaksi selengkapnya terlihat pada Gambar 1.

Gel yang telah tersayat kemudian disiram dengan larutan pewarna sesuai dengan jenis enzim yang akan dianalisis, kemudian diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu  $50^{\circ}C$ . Setelah pita yang muncul tampak jelas, inkubasi segera dihentikan dengan membuang larutan pewarna dan menggantinya dengan *acetic acid* (7%) sebagai larutan *stopper*. Larutan *stopper* diganti dengan gliserin 10% yang berfungsi untuk membuat gel lebih lunak/*soft* untuk dapat dilaminating.



Gambar 1. Reaksi GPI, substrat, G6PDH, koenzim dan pewarna.

**Analisa data**

Uji Chi-square digunakan untuk menentukan keabsahan genotip yang teramati yang diduga dengan hukum kesetimbangan Hardy-Weinberg, derajat bebas (df)=(n2-n)/2, n: jumlah alel per lokus (Sokal & Rohlf, 1981). Heterosigositas teramati (Ho) diketahui dengan menghitung genotip yang teramati, dengan menjumlah individu yang heterosigot dengan jumlah individu yang dianalisis.

**Hasil dan Pembahasan**

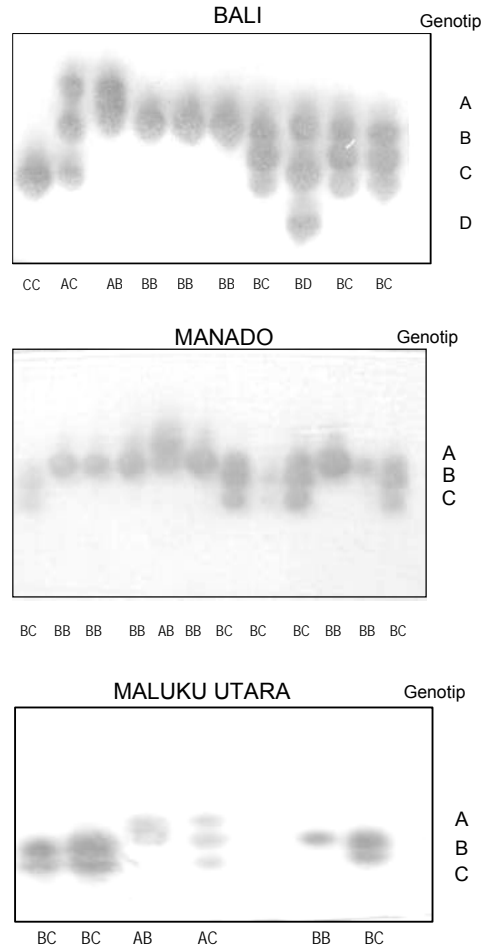
Hasil pengukuran panjang dan berat sampel tuna sirip kuning, *T. albacares* yang diambil dari 3 lokasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Panjang dan berat sampel tuna dari tiga lokasi (Bali, Sulawesi Utara dan Maluku Utara).

Lokasi	Jumlah sampel	Panjang cagak (kg)	Berat (kg)
Bali (Singaraja)	40	79,40 ±2,64	14,7 ±2,92
Sulawesi Utara (Kalesey)	63	78,99±1,89	10,5 ± 1,39
Maluku Utara (Ternate)	46	72,54±1,89	12,28±1,45

**Polimorfisme enzim glucose-6-phosphate isomerase**

Data yang bisa diperoleh dari allozyme elektroforesis antara lain adalah jumlah lokus, allozyme yang terbentuk, dan struktur sebagai unit allozyme (Harris & Hopkinson, 1976). Enzim *glucose-6-phosphate isomerase* (GPI) aktif pada jaringan hati (*liver*) dengan mobilitas kearah kutub positif (*katodal zone*). Polimorfisme lokus Gpi (*glucose-6-phosphate isomerase*) disajikan dalam zimogram (Gambar 2).



Gambar 2. Zymogram pita elektroforesis lokus Gpi, tuna sirip kuning, *T. albacares*.

Empat alel ditemukan pada populasi Bali yaitu (A,B,C,dan D), sedangkan populasi Sulawesi Utara dan Maluku Utara dikontrol oleh 3 alel yaitu (A, B dan C). GPI, *glucose phosphate isomerase* merupakan golongan enzim pengontrol pertumbuhan. Haris & Hopkinson, (1976) menyatakan bahwa lokus Gpi dan 6-Pgd diperlukan dalam reaksi metabolisme karbohidrat terutama pada jalan pentosa fosfat.

Frekuensi alel tertinggi pada populasi Bali Gpi<sup>C</sup> (0,446) dan terendah Gpi<sup>D</sup> (0,128) sedangkan populasi Sulawesi Utara dan Maluku Utara, tertinggi Gpi<sup>A</sup>

(0,689 dan 0,728) dan terendah Gpi<sup>C</sup> (0,215 dan 0,185). Menurut Ward *et al.* (1994; 1997). Frekuensi Allele tertinggi adalah Gpi<sup>A</sup>75 ditemukan pada populasi tuna sirip kuning dari Pasifik bagian timur (*Eastern Pacific Ocean*), sedikit penurunan frekuensi terjadi ke arah kawasan pantai. Migrasi yellowfin tuna yang luas dapat dipengaruhi oleh perbedaan suhu yang kuat dari setiap perairan sehingga pada saat memijah (*spawning*) yellowfin tuna menginginkan suhu yang hangat sehingga pergerakan migrasi terjadi kearah tersebut (Díaz Jaimes & Uribe-Alcocer, 2003).

Nilai heterosigositas masing-masing populasi berkisar antara 0,143-0,419 (rata-rata 0,326) (Tabel 2). Dari hasil tersebut terlihat variasi genetik tertinggi adalah populasi Bali (0,419). Nilai heterosigositas tuna sirip kuning dari 3 populasi lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai heterosigositas teramati pada pasifik yellowfin tuna yaitu 0,027-0,083 (rata-rata: 0,052) dari 28 loci dan 8 lokus polimorfik: Aat (aspartate aminotransferase), Glud (glutamate dehydrogenase), Gpi-[F.sup.\*] dan Gpi-[S.sup.\*] (glucose phosphate isomerase), La (leucil-L-

alanine), Lgg (L-leucil-glycyl-glycine), Pap-[F.sup.\*] (L-leucil-L-proline), and 6-Pgd (phosphogluconate dehydro-genase). (Díaz Jaimes & Uribe-Alcocer, 2003).

Populasi dengan variasi genetik terendah adalah populasi Manado (0,143). Populasi dengan variasi genetik tinggi akan memiliki peluang hidup semakin tinggi untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Heterosigositas yang tinggi memungkinkan perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksplorasi gen-gen yang menguntungkan. Genotip heterosigositas resesif mengakibatkan detrimental yaitu kekurangan enzim essential yang diproduksi oleh alel dominan yang berhubungan dengan penurunan fekunditas, penurunan daya hidup atau peningkatan mortalitas, penurunan daya tahan terhadap penyakit dan laju pertumbuhan. Perbedaan nilai heterosigositas menggambarkan perbedaan lingkungan ada diantara populasi (Permana, 2003).

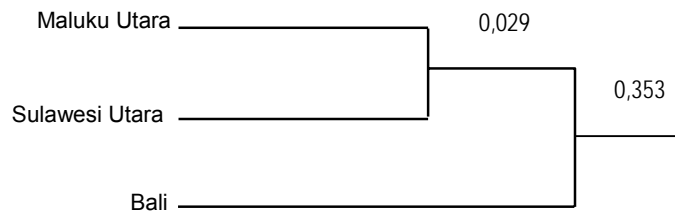
Jarak genetik (*genetic distance*) pada ketiga populasi: Bali, Sulawesi Utara dan Maluku Utara terlihat di dendogram pada Gambar 3 (Rogers, 1972 *cit.* Raymond & Rousset, 1995).

Tabel 2. Genotip teramati dari glucosephosphate isomerase, genotip harapan dan frekuensi alel dalam hukum kesetimbangan Hardy-Weinberg pada tuna sirip kuning, *T. albacares*

Lokasi	Genotype								N	
	AA	AB	AC	AD	BB	BC	CC	CD		DD
Bali	14 (6,54)	4 (5,65)	10 (19,62)	0 (0,65)	5 1,22	4 8,47	1 2,44	21 14,72	3 1,22	65
Sulawesi Utara	40 30,37	5 6,98	3 2,7	0 1,40	2 0,40	1 2,06	12 18,16	- 0,16	-	63
Maluku Utara	25 24,40	4 5,83	13 12,38	0 0,35	4 1,48	0 1,57	0 1,00	-	-	46

Lokasi	Allele frequencies				$\chi^2$	Heterosigositas	Probability for 1 df
	Gpi <sup>A</sup>	Gpi <sup>B</sup>	Gpi <sup>C</sup>	Gpi <sup>D</sup>			
Bali	0,297	0,128	0,446	0,128	2,36	0,419	0,20-0,10
Sulawesi Utara	0,698	0,079	0,216	-	0,53	0,143	0,50-0,30
Maluku Utara	0,728	0,087	0,185	-	0,57	0,417	0,50-0,30



Gambar 3. Jarak genetik tuna sirip kuning (*T. albacares*) dari 3 lokasi

Populasi Maluku Utara dan Sulawesi Utara berjarak genetik terdekat yaitu 0,029. Hal ini mengindikasikan bahwa perairan Sulawesi Utara dan Maluku Utara sering digunakan sebagai jalur migrasi dengan jarak geografis yang dekat dan ditemukannya beberapa alel yang sama pada kedua populasi tersebut. Adanya pemisahan oleh suatu *hydrological barrier* antara populasi Sulawesi Utara, Maluku Utara dengan Bali menyebabkan jarak genetik kedua populasi dengan populasi Bali cukup besar (0,353).

### Kesimpulan

1. Nilai heterosigositas populasi tuna sirip kuning dari perairan Bali, Sulawesi Utara dan Maluku utara masing-masing adalah 0,419; 0,417; dan 0,143.
2. Jarak genetik tuna dari populasi Maluku Utara dan Sulawesi Utara 0,029 sedangkan pada populasi Bali sebesar 0,353.

### Daftar Pustaka

- Díaz-Jaimes, P. and Y.M. Uribe-Alcocer. 2003. Allozyme and RAPD variation in the eastern Pacific yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Fish. Bull.* 101: 769-777.
- Haris, H. and D.A. Hopkinson. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. MRC. Human Biochemical Genetics Unit Galton Laboratory University College London. North-Holland Publishing Company. 273 p.
- Jamieson, A. 1974. Genetics "tag" for marines fish stocks. *Sea Fisheries Research*. Harden Jones F. R. (Ed). Elk Science. London: 91-99.
- Johnson, M.S. and L.M. Joll. 1993. Genetic subdivision of the pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson, 1901) (Mollusca: *Pteridae*) in northern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 44: 85-673.
- Kaji, T., M. Tanaka, H. Takeuchi, S. Oshumi, K. Teruya, and J. Hirokawa. 1999. Growth and morphological development of laboratory-reared yellowfin tuna, *Thunnus albacares* larvae and early juveniles with special emphasis on the digestive system. *Fish. Sci.* 65: 700-707.
- Lavery, S. and J.B. Shaklee. 1989. Population genetics for two tropical sharks, *Carcharhinus tilsoni* and *C. sorrah*, in northern Australia. *J. Marine and Freshwater Research*. 40: 57-451.
- Masuma, S., N. Tezuka, K. Teruya, M. Oka, M. Kanematsu, and H. Nikaido. 1993. Maturation and spawning of reared yellowfin tunas at Yaeyama. Abstracts of the Annual Meeting of Japanese Society of Scientific Fisheries. Tokyo. Japan. April 2-5. 149-156.
- Permana G.N., Haryanti, S.B. Moria, and K. Sugama. 2003. Identification and variation of red snapper, *Lutjanus* sp. through allozyme electrophoretic analysis Indonesian. *Fisheries Research Journal*. IX(1): 33-40.

- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2); Population genetic software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Sugama, K. and A. Prijono. 1998. Biochemical genetic differentiation among wild populations of milkfish (*Chanos-chanos*) in Indonesia. *Fisheries Research Journal*. IV (1): 11-18.
- Sokal R.R. and R.G. Rohlf. 1981. *Biometry*. Freeman and Co. San Francisco. California. 776 p.
- Wild, A. 1994. A review of the biology and fisheries for yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, in the eastern Pacific Ocean. *FAO Fish. Tech. Pap.* 336: 52-107.
- Ward, R.D., G. Elliott, P.M. Grewe, and A. Molenski. 1994. Allozyme and mitochondrial DNA variation in yellowfin tuna (*Thunnus albaeares*) from the Pacific Ocean. *Mar. Biol.* 118: 531-539.
- Yeatman, J. and J.A.H. Benzie. 1994. Genetic structure and distribution of *Photololigo* spp. in Australia. *Marine Biology* (Berlin). 118: 79-87.