

**APLIKASI PENANDA DNA MIKROSATELIT DAN DNA MITOKONDRIA
DALAM PROGRAM PEMBIAKBAKAAN IKAN SIAKAP, *Lates calcarifer***

Oleh

ROZIANA MAT KHAIRUDDIN

**Tesis yang diserahkan untuk
memenuhi keperluan bagi
Ijazah Sarjana Sains**

JULAI 2011

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pemurah lagi Maha Mengasihani. Alhamdulillah, bersyukur saya kehadiran Allah s.w.t. kerana dengan rahmatNya saya telah berjaya menyiapkan projek penyelidikan dan penulisan tesis ini bagi memenuhi keperluan Ijazah Sarjana Sains. Jutaan penghargaan dan ucapan terima kasih saya ucapkan kepada penyelia saya, Prof. Madya Dr. Sofiman Othman atas segala nasihat, tunjuk ajar, dan idea kepada saya dalam menyiapkan projek penyelidikan dan penulisan tesis ini.

Penghargaan ini juga ditujukan kepada Encik Nik Daud Nik Sin dari Institut Penyelidikan dan Pengeluaran Ikan Laut, (IPPIL) Tanjung Demong, Terengganu yang banyak membantu saya dalam mendapatkan sampel dan maklumat tentang pengkulturan ikan siakap di Malaysia. Terima kasih kepada staf IPPIL yang sudi memberi bantuan dalam kerja-kerja penyampelan ikan siakap di sangkar terapung Semerak, Kelantan dan IPPIL.

Tidak dilupakan juga buat rakan seperjuangan, Lai Choay Hoong yang banyak memberi tunjuk ajar dan bimbingan dalam melakukan kerja-kerja di makmal dan penyampelan sampel ikan. Selain itu, kepada rakan – rakan lain dan ahli Makmal Penyelidikan 409, terima kasih sudi berkongsi idea, pendapat dan maklumat dalam melakukan penyelidikan di makmal dan tunjuk ajar dalam menganalisis data bagi menyiapkan kajian ini.

Sekalung penghargaan kepada "National Scheme Fund" (NSF), MOSTI dan "Research University Postgraduate Research Grant Scheme" (USM-RU-PRGS) yang menyumbangkan bantuan kewangan kepada saya. Tidak lupa juga kepada semua staf Pusat Pengajian Sains Kajihayat, USM di atas segala bantuan yang diberikan sepanjang saya menjalankan penyelidikan ini.

Tidak terkecuali buat suami tercinta, Saifullizan Shah Mohd Nor yang banyak memberikan dorongan dan semangat kepada saya dalam menyelesaikan projek penyelidikan dan penulisan tesis ini. Buat keluarga yang tersayang, ibu, ayah dan adik beradik, terima kasih kerana tidak pernah putus dalam memberikan semangat dan berdoa kepada saya walaupun kalian berada di kejauhan. Terima kasih yang tidak terhingga buat kalian.

Akhir kata, ucapan terima kasih kepada semua pihak yang terlibat secara langsung atau tidak yang tidak dapat saya sebutkan di sini. Hanya Allah yang dapat membalas jasa kalian semua. Sekian, terima kasih.

ISI KANDUNGAN

PENGHARGAAN	ii
ISI KANDUNGAN	iii
SENARAI JADUAL	viii
SENARAI RAJAH	x
SENARAI SIMBOL	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvii
BAB 1 – PENGENALAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	3
BAB 2 – TINJAUAN BAHAN BACAAN	
2.1 Ikan Siakap, <i>Lates calcarifer</i> (Bloch)	4
2.1.1 Taksonomi Ikan Siakap	6
2.1.2 Morfologi Ikan Siakap	7
2.1.3 Biologi dan Kitar Hidup Ikan Siakap	9
2.1.4 Pengeluaran Ikan Siakap di Malaysia	11
2.2 DNA Mikrosatelit	13
2.2.1 Evolusi Penanda DNA Mikrosatelit	15
2.2.2 Model Mutasi Mikrosatelit	16
2.2.3 Kelebihan DNA Mikrosatelit	17
2.3 DNA Mitokondria, mtDNA	19
2.3.1 Struktur DNA Mitokondria Ikan Siakap	20
2.3.2 Sifat – sifat DNA Mitokondria	22

2.3.3	Kelebihan DNA Mitokondria	23
2.3.4	DNA Mitokondria Control region (CR)	25
BAB 3 – BAHAN DAN KAEDAH		
3.1	Kajian Penentuan Induk Ikan Siakap Menggunakan DNA Mikrosatelit	27
3.1.1	Penyampelan Ikan Siakap	28
3.1.2	Pengestrakan DNA	29
3.1.2.1	Kaedah Pengestrakan Fenol-kloroform	29
3.1.2.2	Kaedah Pengekstrakan DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)	32
3.1.2.3	Penentuan Hasil Pengekstrakan DNA Genomik dengan Elektroforesis Gel Agarosa	33
3.1.3	Tindakbalas Mikrosatelit	34
3.1.3.1	Proses Pemilihan Pencetus Mikrosatelit	35
3.1.3.2	Proses Pengoptimuman Pencetus Mikrosatelit dalam Tindakbalas PCR	39
3.1.3.3	Gel Poliakrilamida 6% Tak Ternyahasli	39
3.1.4	Analisis Data Mikrosatelit	41
3.1.4.1	Diversiti Genetik Pencetus Mikrosatelit	41
3.1.4.2	Analisis Penentuan Induk	42
3.2	Kajian Kepelbagaian Genetik Populasi Induk dalam Program Pembiakbakaan Ikan Siakap	44
3.2.1	Penyampelan Ikan Siakap	45
3.2.2	Pengestrakan DNA	45
3.2.3	Amplifikasi DNA Mikrosatelit	45

3.2.4	Amplifikasi Penjujukan Berkitar DNA Mitokondria	46
3.2.4.1	Merekabentuk Pencetus Gen Dalam CR, Dloop C	46
3.2.4.2	Amplifikasi PCR bagi Penjujukan Jujukan Nukleotida CR	47
3.2.4.3	Penulenan Hasil PCR	48
3.2.4.3.1	Elektroforesis Gel “Low Melting Temperature Agarose” 1.0% (w/v)	48
3.2.4.3.2	Penulenan Hasil PCR dan Penjujukan Berkitar	49
3.2.5	Analisis Data	50
3.2.5.1	Variasi Genetik Populasi Induk Menggunakan Penanda DNA Mikrosatelit	50
3.2.5.2	Analisis Data Penjujukan DNA mitokondria	51
3.2.5.3	Analisis Filogenetik mtDNA CR pada Intrapopulasi	52
3.2.5.4	Analisis Filogenetik mtDNA CR pada Interpopulasi	52

BAB 4 – KEPUTUSAN

4.1	Kajian Penentuan Induk Ikan Siakap Menggunakan DNA Mikrosatelit	
4.1.1	Pengestrakan DNA	54
4.1.2	Tindakbalas DNA Mikrosatelit	
4.1.2.1	Pemilihan Pencetus Mikrosatelit	54
4.1.2.2	Pengoptimuman Pencetus Mikrosatelit	56

4.1.2.3	Proses Penyaringan Sampel DNA	58
4.1.3	Analisis Data Mikrostelit	60
4.1.3.1	Diversiti Genetik Pencetus Mikrosatelit	60
4.1.3.2	Simulasi Komputer dan Penentuan induk	62
4.2	Kajian Kepelbagaian Genetik Populasi Induk dalam Program Pembiakbakaan Ikan Siakap	
4.2.1	Pengestrakan DNA	65
4.2.2	Amplifikasi DNA Mikrosatelit	65
4.2.3	Perbezaan dan Variasi Genetik Dalam Populasi Induk	66
4.2.4	Hasil Perekaan Pencetus Gen Dalaman CR, D – loop C	68
4.2.5	Amplifikasi PCR bagi Penjujukan Jujukan Nukleotida CR	68
4.2.6	Penulenan Hasil PCR	71
4.2.7	Hasil Analisis Data mtDNA CR	72
4.2.7.1	Analisis Filogenetik mtDNA CR Intrapopulasi	72
4.2.7.1.1	Populasi Terengganu	72
4.2.7.1.2	Populasi Johor	75
4.2.7.1.3	Populasi Sabah	76
4.2.7.1.4	Populasi Tanjung Piandang	78
4.2.7.1.5	Populasi Semantan	79
4.2.7.1.6	Populasi Semerak	81
4.2.7.1.7	Populasi Merchang	82
4.2.7.2	Diversiti Genetik mtDNA CR pada Interpopulasi	84
4.2.7.3	Analisis Filogenetik mtDNA CR pada Interpopulasi	87
4.2.7.3.1	Neighbor Joining untuk Analisis	88

	Antara Populasi	
4.2.7.3.2	Maximum Parsimony untuk Analisis	90
	Antara Populasi	
4.2.7.3.3	Maximum Likelihood untuk Analisis	94
	Antara Populasi	
BAB 5 – PERBINCANGAN		
5.1	Kajian Penentuan Induk Ikan Siakap Menggunakan DNA	99
	Mikrosatelit	
5.1.1	Diversiti Genetik Pencetus Mikrosatelit	99
5.1.2	Analisis Penentuan Induk	101
5.2	Kajian Kepelbagaian Genetik Populasi Induk Dalam Program	103
	Pembiakbakaan Ikan Siakap	
5.2.1	Diversiti Genetik mtDNA CR pada Ikan Siakap	104
5.2.2	Variasi Genetik Antara Populasi Induk	106
5.2.3	Analisis Filogenetik	110
5.2.4	Implikasi pada Akuakultur dan Penambahbaikan	113
	Genetik Ikan Siakap	
BAB 6 – KESIMPULAN DAN CADANGAN		116
RUJUKAN		119
LAMPIRAN		
PENERBITAN DAN SEMINAR		

SENARAI JADUAL

		Muka surat
Jadual 3.1	Lokasi penyampelan dan pelabelan individu ikan siakap yang telah digunakan dalam kajian penentuan induk ikan siakap menggunakan DNA mikrosatelit berdasarkan populasi.	29
Jadual 3.2	Senarai pencetus mikrosatelit yang digunakan dalam kajian penentuan induk ikan siakap menggunakan DNA mikrosatelit.	36
Jadual 3.3	Senarai Pencetus D-loop yang digunakan dalam kajian kepelbagaian genetik populasi induk dalam program pembiakbakaan ikan siakap.	46
Jadual 3.4	Bilangan sampel yang digunakan dalam amplifikasi PCR bagi penjujukan jujukan nukleotida CR pada kajian kepelbagaian genetik populasi induk dalam program pembiakbakaan ikan siakap.	47
Jadual 4.1	Hasil pengotimuman bagi semua pencetus yang digunakan dalam proses pengoptimuman pencetus mikrosatelit.	57
Jadual 4.2	Anggaran nilai diversiti genetik (A: bilangan alel, Ho: nilai heterozigositi dicerap, He: nilai heterozigositi dianggar, PIC: Kandungan ciri polimorfik, Ni: bilangan individu, SR: julat saiz alel dan Fis: pekali persenyawaan dalaman).	61
Jadual 4.3	Senarai A: Bilangan alel, kemungkinan pengecualian; Excl 1: pengecualian 1 induk, Excl 2: pengecualian 2 induk)	63
Jadual 4.4	Peratusan kejayaan penentuan pasangan induk-progeni berdasarkan dua paras keyakinan.	64
Jadual 4.5	Pasangan nilai F_{st} pada semua 20 lokus mikrosatelit untuk populasi dari Johor, Terengganu, dan Sabah.	67
Jadual 4.6	Senarai sampel yang berjaya diamplifikasi dan dilakukan penjujukan mtDNA CR pada kajian kepelbagaian genetik populasi induk dalam program pembiakbakaan ikan siakap.	70
Jadual 4.7	Perbandingan jarak genetik 23 individu ikan siakap daripada populasi Terengganu menggunakan jujukan mtDNA CR.	74
Jadual 4.8	Perbandingan jarak genetik lapan individu ikan siakap daripada populasi Johor menggunakan jujukan mtDNA CR.	76
Jadual 4.9	Perbandingan jarak genetik sembilan individu ikan siakap daripada populasi Sabah menggunakan jujukan mtDNA CR.	77
Jadual 4.10	Perbandingan jarak genetik tujuh individu ikan siakap daripada populasi Tanjung Piandang menggunakan jujukan mtDNA CR.	79

Jadual 4.11	Perbandingan jarak genetik tujuh individu ikan siakap daripada populasi Semantan menggunakan jujukan mtDNA CR.	80
Jadual 4.12	Perbandingan jarak genetik sembilan individu ikan siakap daripada populasi Semerak menggunakan jujukan mtDNA CR.	82
Jadual 4.13	Perbandingan jarak genetik tiga individu ikan siakap daripada populasi Merchang menggunakan jujukan mtDNA CR	83
Jadual 4.14	Penyebaran haplotip mtDNA CR <i>Lates calcarifer</i> pada sembilan populasi di Malaysia.	84
Jadual 4.15	Jumlah kepelbagaian diversiti haplotip (h) dan nukleotida (π) mtDNA Control region untuk setiap populasi. N: bilangan haplotip.	86
Jadual 4.16	Perbezaan berpasangan antara populasi, F_{st} berdasarkan data jujukan mtDNA control region untuk ikan siakap, <i>L. calcarifer</i> . Aras keyakinan F_{st} ($P < 0.05$) ditunjukkan dengan simbol asterik (*).	87
Jadual 4.17	Anggaran perbezaan jarak genetik berpasangan antara populasi ikan siakap, <i>L. calcarifer</i> di Malaysia menggunakan jujukan mtDNA CR.	98

SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 2.1	Ikan siakap, <i>Lates calcarifer</i> (Bloch)	5
Rajah 2.2	Morfologi Luar Ikan Siakap, <i>Lates calcarifer</i>	8
Rajah 2.3	Kitar hidup umum Ikan Siakap, <i>L. Calcarifer</i> - Diubah suai daripada Grey, (1986)	10
Rajah 2.4	Struktur asas mtDNA – Diubahsuai daripada http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrial_DNA	21
Rajah 3.1	Carta alir kaedah kajian penentuan induk ikan siakap menggunakan DNA mikrosatelit	27
Rajah 3.2	Carta alir kaedah kajian kepelbagaian genetik populasi induk dalam program pembiakbakaan ikan Siakap	44
Rajah 4.1	Hasil pengestrakan DNA dari sampel individu J1, J2, J3, J4, dan J5 dalam duplikat (1 dan 2). M ialah penanda λ <i>Hind</i> III.	55
Rajah 4.2	Hasil pemilihan pencetus mikrosatelit yang dielektroforesis pada 6% (v/v) gel poliakrilamida dengan menggunakan sampel DNA T6 bagi 20 pencetus .M adalah penanda 20 bp DNA.	55
Rajah 4.3	Hasil pengoptimuman yang dilakukan pada pencetus LcG0201B9 dengan menggunakan sampel DNA T9 pada kepekatan MgCl ₂ 1.5 mM dan 2.0 mM dan pada suhu penyepuhan yang berbeza. Hasil pengoptimuman ini dielektroforesis pada 2.0% gel agarosa. M adalah penanda 1kb. Anak panah menunjukkan pada suhu 52.5°C dan kepekatan MgCl ₂ 1.5 mM adalah hasil pengoptimuman yang dipilih untuk pengskrinan semua sampel bagi pencetus ini.	56
Rajah 4.4	Hasil PCR bagi penyaringan semua sampel bagi pencetus mikrosatelit. (A) penyaringan menggunakan pencetus LcG0102H1 bp 142. (B) penyaringan menggunakan pencetus TT4 bp 182. M adalah penanda 20 bp DNA Ladder.	59
Rajah 4.5	Jumlah nilai pengecualian dalam populasi untuk subset berlainan mengikut lokus yang paling polimorfik untuk (a) tiada ciri induk diketahui (Excl 1) (b) ciri satu induk diketahui (Excl 2).	64
Rajah 4.6	Plot analisis "Factorial Correspondence" bagi tiga populasi ikan siakap menggunakan 20 lokus mikrosatelit. Setiap simbol mewakili setiap individu ikan siakap.	67

Rajah 4.7	Keputusan Perekaan Pencetus Dalaman CR, <i>D-loop</i> C daripada Perisian Primer3.	69
Rajah 4.8	Hasil amplifikasi jujukan nukleotida CR sampel T10 dan J6 dengan menggunakan pencetus <i>D-loop</i> . Pelabelan C menunjukkan sampel kawalan, amplifikasi PCR tanpa DNA ikan. M ialah penanda DNA 1kb.	70
Rajah 4.9	Hasil penulenan hasil PCR T10 dan J6. M ialah penanda DNA 1kb.	71
Rajah 4.10	Rajah Pohon menunjukkan hubungan genetik pada 23 individu ikan siakap daripada populasi Terengganu menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	73
Rajah 4.11	Rajah pohon menunjukkan hubungan genetik pada lapan individu ikan siakap daripada populasi Johor menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	75
Rajah 4.12	Rajah pohon menunjukkan hubungan genetik pada sembilan individu ikan siakap daripada populasi Sabah menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	77
Rajah 4.13	Rajah pohon menunjukkan hubungan genetik pada tujuh individu ikan siakap daripada populasi Tanjung Piandang menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	78
Rajah 4.14	Rajah pohon menunjukkan hubungan genetik pada tujuh individu ikan siakap daripada populasi Semantan menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	80

Rajah 4.15	Rajah pohon menunjukkan hubungan genetik pada sembilan individu ikan siakap daripada populasi Semerak menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	81
Rajah 4.16	Rajah pohon menunjukkan hubungan genetik pada tiga individu ikan siakap daripada populasi Merchang menggunakan jujukan mtDNA CR. Nilai pada setiap cabang adalah nilai bootstrap dengan 1000 ulangan dan skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Outgroup adalah <i>Danio rerio</i> (NC_002333.2) Pohon rajah dibina menggunakan kaedah Neighbor-Joining melalui perisian MEGA4.	83
Rajah 4.17	Rajah Pohon Analisis Jarak Neighbor-Joining dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. calcarifer</i> . Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	89
Rajah 4.18a	Rajah Pohon Maximum Parsimony dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. calcarifer</i> . Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	91
Rajah 4.18b	Rajah Pohon Maximum Parsimony (Kluster A) dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. calcarifer</i> . Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	92
Rajah 4.18c	Rajah Pohon Maximum Parsimony (Kluster B) dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. calcarifer</i> . Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	93
Rajah 4.19a	Rajah Pohon Maximum Likelihood dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. Calcarifer</i> di bawah model evolusi nukleotida TIM1+G. Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	95

Rajah 4.19b	Rajah Pohon Maximum Likelihood (Kluster A) dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. calcarifer</i> di bawah model evolusi nukleotida TIM1+G. Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	96
Rajah 4.19c	Rajah Pohon Analisis Maximum Likelihood (Kluster B) dengan nilai Bootstrap 100 pseudoreplikat menggunakan jujukan mtDNA CR <i>L. calcarifer</i> di bawah model evolusi nukleotida TIM1+G. Nilai Bootstrap >50% ditunjukkan pada cabang pohon rajah. Skala mewakili penggantian nukleotida pertapak. Rajah Pohon dibina menggunakan perisian MEGA4.	97

SENARAI SIMBOL

APS	Ammonium Persulfat
Ppt	Bahagian Perseribu
cm	Sentimeter
°C	Darjah Celcius
Δ	Delta
EDTA	Asid etilena diamina tetra asetik
EtBr	Etidium Bromida
g	G Force
kb	Kilo Bes
kg	Kilogram
MgCl ₂	Magnesium Klorida
m	Meter
μM	Mikro Molar
μl	Mikroliter
mM	Mili Molar
mg	Miligram
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mtDNA	Mitokondria DNA
M	Molar
TEMED	N, N, N',N' – Tetrametil Etilenadiamina
NaCl	Natrium Klorida
bp	Pasangan Bes
F ₁	Progeni
rpm	Putaran per minit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SD	Sisihan Piawai
T _a	Suhu Penyepuhan
PCR	Tindakbalas Berantai Polimerase
TBE	Tris – Borate EDTA
Tris-HCl	Tris Hidro Klorida
UV	Ultralembayung
V	Voltan
v/v	Isipadu/isipadu
w/v	Berat/Isipadu

APLIKASI PENANDA DNA MIKROSATELIT DAN DNA MITOKONDRIA DALAM PROGRAM PEMBIAKBAKAAN IKAN SIAKAP, *Lates calcarifer*

ABSTRAK

Ikan siakap, *Lates calcarifer* merupakan ikan ternakan yang popular dan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi di Malaysia. Kekurangan induk yang efektif untuk program pembiakan ikan siakap menjadi masalah kepada pengurusan populasi akuakultur. Pengetahuan dan data yang menyeluruh dari segi variasi genetik penting untuk menjayakan sesuatu program pengkulturan dan meningkatkan produktiviti hasil ternakan. Kajian ini membabitkan penentuan induk menggunakan penanda DNA mikrosatelit dan mengetahui tahap variasi genetik pada ikan siakap di Malaysia menggunakan penjujukan DNA mitokondria "control region" (mtDNA CR) dan penanda DNA mikrosatelit. Sebanyak 20 lokus mikrosatelit digunakan untuk pencapjarian DNA induk dan anak dalam penentuan induk kepada anak ikan siakap. Simulasi berdasarkan data frekuensi alel menunjukkan 5 lokus berjaya menentukan 97% progeni kepada pasangan induk mereka. Semua 20 lokus mikrosatelit yang digunakan dalam kajian ini adalah polimorfik (PIC = 0.52). Sejumlah 59 haplotip ikan siakap diperolehi dari data jujukan mtDNA CR. Nilai ini dianggap tinggi memandangkan nilai diversiti haplotip (h), berjulat antara 0.9286 hingga 1.000. Perbezaan genetik berpasangan antara populasi (F_{st} = 0.0407-0.1139 data mikrosatelit; 0.023-0.0597, data mtDNA CR) berada pada tahap rendah hingga sederhana. Analisis filogenetik menggunakan kaedah "Neighbor-joining" (NJ), "maximum

likelihood" (ML), dan "maximum parsimony" (MP) menunjukkan rajah pohon yang hampir sama. Populasi Sabah dikumpulkan pada kluster berlainan daripada populasi Johor dan Terengganu dengan nilai bootstrap 72%(NJ), 100%(MP) dan 96%(ML) dan penempatan dalam kluster berlainan ini juga disokong oleh plot analisis "Factorial Correspondence" (FCA) menggunakan data mikrosatelit.

**APPLICATION OF MICROSATELLITE DNA AND MITOCHONDRIAL DNA
MARKERS IN BREEDING PROGRAM OF THE ASIAN SEA BASS,**

Lates calcarifer

ABSTRACT

The Asian sea bass, *Lates calcarifer* is a popular aquaculture fish and has a high economic value in Malaysia. The lack of effective broodstocks for sea bass breeding program cause problems for the management of aquaculture populations. Extensive knowledge and data of genetic variations are important to have successful cultivation program and increase the aquaculture productivity. This study involves the identification of the Asian sea bass broodstocks using microsatellite DNA markers and examines the level of genetic variation of Asian sea bass in Malaysia using mitochondrial DNA control region (mtDNA CR) sequencing and microsatellite DNA markers. A total of 20 microsatellite loci were used for DNA fingerprinting of parent and progeny in the identification of the parents to their progeny in a mass breeding program. Simulations based on allele frequency data showed five loci were able to assigned 97% of progeny to their respective parents. All 20 microsatellite loci used in this study were polymorphic (PIC = 0.52). A total of 59 haplotypes were identified using the sequences of mtDNA CR. This value can be considered high since haplotype diversity (h) value range from 0.9286 to 1.000). Pairwise genetic differences between populations (F_{st} = 0.0407-0.1139 microsatellite data; 0.023-0.0597, mtDNA CR data) is at

low to moderate levels. Phylogenetic analysis using the neighbour-joining (NJ), maximum likelihood (ML), and the maximum parsimony (MP) trees showed similar topologies. The population of Sabah was placed in different cluster to those of Johore and Terengganu populations with 72% (NJ), 100% (MP) and 96% (ML) bootstrap values respectively, and the placement was also supported by the analysis "Factorial Correspondence" (FCA) plot using microsatellite data.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Pengenalan

Siakap (barramundi; *Lates calcarifer*, Centropomidae) adalah salah satu spesies ikan laut yang mempunyai nilai komersil yang penting di kawasan Asia-Pasifik (Yue et al., 2002) dan di Malaysia, siakap merupakan ikan laut yang mempunyai nilai permintaan yang tinggi (Grey, 1986). Walaupun pengkulturan siakap menggunakan sangkar terapung telah dimulakan sejak 1975 oleh Jabatan Perikanan (Ali, 1986) tetapi tiada data genetik atau maklumat genetik tentang populasi ikan ini. Pusat pembiakan ikan siakap telah lama ditubuhkan tetapi sehingga hari ini data tentang diversiti genetik dan struktur populasi induk spesies ini sangat terhad (Sim & Othman, 2005; Norfatimah et al., 2009).

Pengurusan populasi memerlukan pengetahuan dan data yang menyeluruh dari segi variasi genetik. Data ini penting untuk menghasilkan kejayaan rekabentuk program penambahbaikan genetik dan pengekalan populasi sesuatu spesies (Shikano & Taniguchi, 2002). Demi menjayakan program penternakan, pengekalan kevariabelan genetik serta pengoptimuman produktiviti penternakan ikan tidak boleh dipandang remeh. Cabaran utama program pemeliharaan ialah pengekalan kevariabelan genetik. Oleh sebab pengkulturan ikan selalunya menghadapi risiko tinggi kehilangan diversiti genetik, maka pengurusan populasi ikan siakap

memerlukan pengetahuan yang mendalam tentang variasi genetik spesies ini (Sim & Othman, 2005; Norfatimah et al., 2009).

Populasi *Lates calcarifer* ini telah dikaji dengan beberapa kaedah seperti menggunakan polimorfisme protein, DNA mitokondria dan mikrosatelit. Kemajuan penanda genetik polimorfik yang tinggi seperti mikrosatelit telah menyediakan cara yang sesuai untuk mengenal pasti hubungan keibubapaan di kalangan individu – individu dan bertujuan untuk mendapatkan maklumat salasilah kekeluargaan dalam program pemilihan akuakultur (Castro et al., 2004). Mikrosatelit telah banyak digunakan sebagai penanda dalam kajian haiwan akuatik seperti “European Seabass” (Garcia de Leon et al., 1998), “Atlantic salmon” (Skaala et al., 2004) dan “Arctic charr” (Ditlecadet et al., 2006).

Memandangkan saiz yang kecil, kadar evolusi yang cepat secara relatif dan pewarisan maternal-haploid, DNA mitokondria (mtDNA) sesuai dan telah banyak digunakan dalam kajian struktur genetik populasi, pengaliran gen, penghibridan, biogeografi, dan hubungan filogenetik bagi pelbagai haiwan (Venkatesh, 2003; Tang et al., 2006; Teletchea et al., 2006; Qi et al., 2007). Saiz genom mitokondria haiwan adalah lebih kurang 16.5 kb dan kebiasaannya mengandungi 13 gen pengkod protein, 2 gen ribosom RNA, 22 gen RNA penghantar, dan kawasan utama tak mengekod yang mana membenarkan permulaan transkripsi dan replikasi mitokondria. Penjjukan DNA mitokondria khususnya yang berevolusi cepat dan variasi yang tinggi, contohnya “control region” (CR) telah berjaya digunakan untuk

kajian populasi genetik pada haiwan akuatik dan pelbagai spesies (Diniz et al., 2005).

Sehubungan itu, pelbagai kejayaan penanda DNA mikrosatelit dan DNA mitokondria banyak digunakan dalam penyelidikan akuakultur. Walaupun beberapa populasi ikan siakap di Singapura dan Asia telah dikaji menggunakan penanda mikrosatelit (Yue et al., 2002; Zhu et al., 2006), penjujukan nukleotida penuh genom mitokondria (Lin et al., 2006), namun maklumat genetik tentang populasi ikan siakap di Malaysia untuk program penambahbaikan genetik dan pembiakan masih belum diterokai.

Tujuan kajian ini dilakukan adalah untuk membuktikan kegunaan penanda genetik mikrosatelit (jujukan berulang pendek) dan penjujukan gen pada DNA mitokondria untuk ikan siakap. Objektif kajian dibahagikan kepada dua bahagian:

- (a) Menentukan pasangan induk kepada setiap anak ikan siakap dalam program pembiakbakaan dengan menggunakan penanda DNA mikrosatelit.
- (b) Menentukan variasi genetik populasi induk ikan siakap menggunakan penanda DNA mikrosatelit dan DNA mitokondria.

TINJAUAN BAHAN BACAAN

2.1 Ikan Siakap, *Lates calcarifer* (Bloch)

Nama saintifik ikan siakap ialah *Lates calcarifer* (Rajah 2.1). Ia diperkenalkan oleh Bloch pada tahun 1790. Ikan ini dapat diperolehi dari bahagian utara sehingga Taiwan, bahagian selatan sehingga Pulau Fraser di pantai barat Australia, bahagian timur sehingga Papua New Guinea dan bahagian barat sehingga Teluk Farsi (Grey, 1986).

Oleh sebab ikan ini bertaburan luas, maka ia mempunyai nama yang berbeza-beza di kawasan yang berlainan. Secara umumnya, ikan ini lebih dikenali sebagai "Asian Seabass" dan "Barramundi" dalam Bahasa Inggeris. Nama tempatan *L. calcarifer* di Malaysia termasuklah "Siakap" dan "Siakap Putih". "Kakap" merupakan nama tempatan ikan ini di Indonesia. Di India, nama tempatannya termasuklah "Bhekti" dan "Seabass". Di Australia pula, nama tempatan lebih dikenali sebagai "Barramundi" ataupun "Giant Perch". Di Papua New Guinea ia dikenali sebagai "Anama" dan "Giant Perch". Di negara Jepun pula, ikan ini dikenali sebagai "Akemi" (FishBase: <http://www.fishbase.org>).



Rajah 2.1 Ikan siakap, *Lates calcarifer* (Bloch)

2.1.1 Taksonomi Ikan Siakap

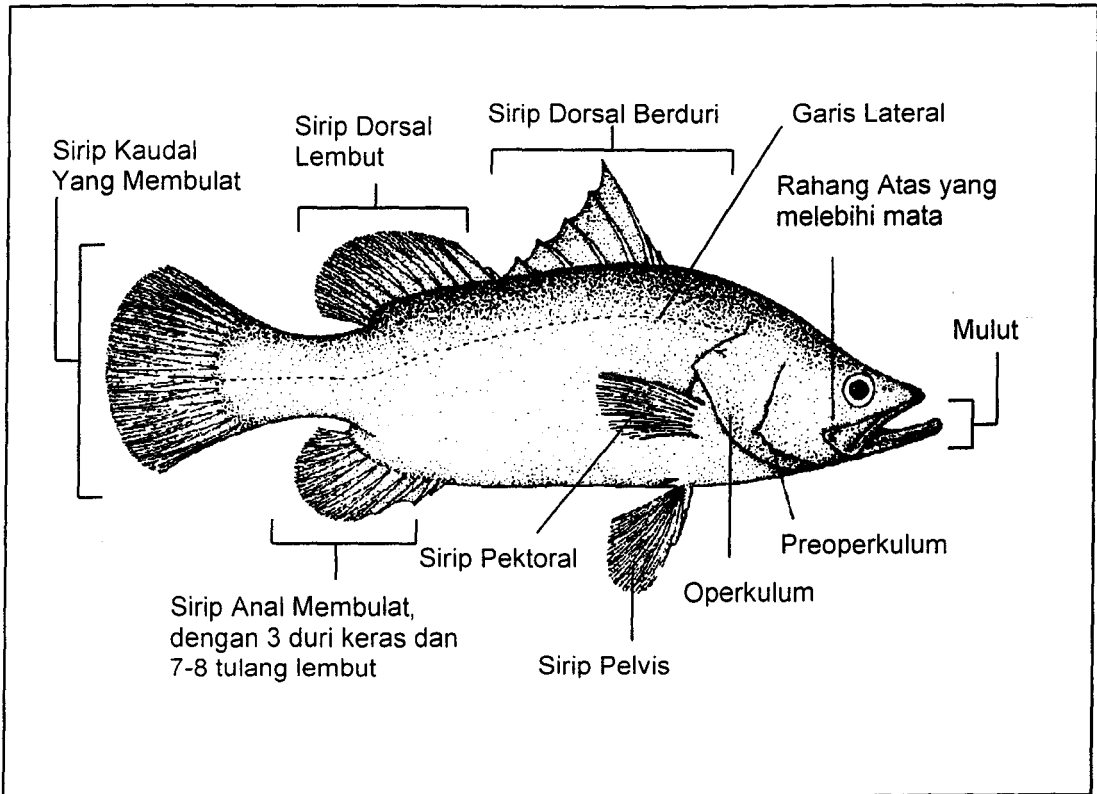
Berikut merupakan hierarki taksonomi ikan siakap, *Lates calcarifer* (Bloch) yang dibekalkan oleh ITIS (Integrated Taxonomic Information System) no. serial taksonomi: 167669.

Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Chordata
Subfilum	:	Vetebrata
Superkelas	:	Osteichthyes
Kelas	:	Actinopterygii
Subkelas	:	Neopterygii
Infrakelas	:	Teleostei
Superorder	:	Acanthopterygii
Order	:	Perciformes
Suborder	:	Percoidei
Famili	:	Centropomidae
Subfamili	:	Latinae
Genus	:	<i>Lates</i>
Spesies	:	<i>Lates calcarifer</i>

2.1.2 Morfologi Ikan Siakap

Ikan siakap dikenali dengan ciri hujung kepala yang tajam, bahagian depan kepala yang cekung, rahang besar dan luas berhampiran mata dan sirip kaundal yang berbentuk bulat (Rajah 2.2). Ikan siakap mempunyai lapan sirip dorsal yang pertama dengan tujuh atau lapan duri dan sirip dorsal kedua yang lembut yang mana terdapat sepuluh atau sebelas tulang yang lembut.

Siakap dewasa mempunyai warna biru kehijauan dan keperangan pada bahagian dorsal. Sisik seakan berwarna perak dan pada bahagian bawah berwarna putih. Ikan siakap yang belum matang terdapat tompok perang dengan belang putih yang jelas dari sirip dorsal hingga ke muncung depan (FOA, 2006).

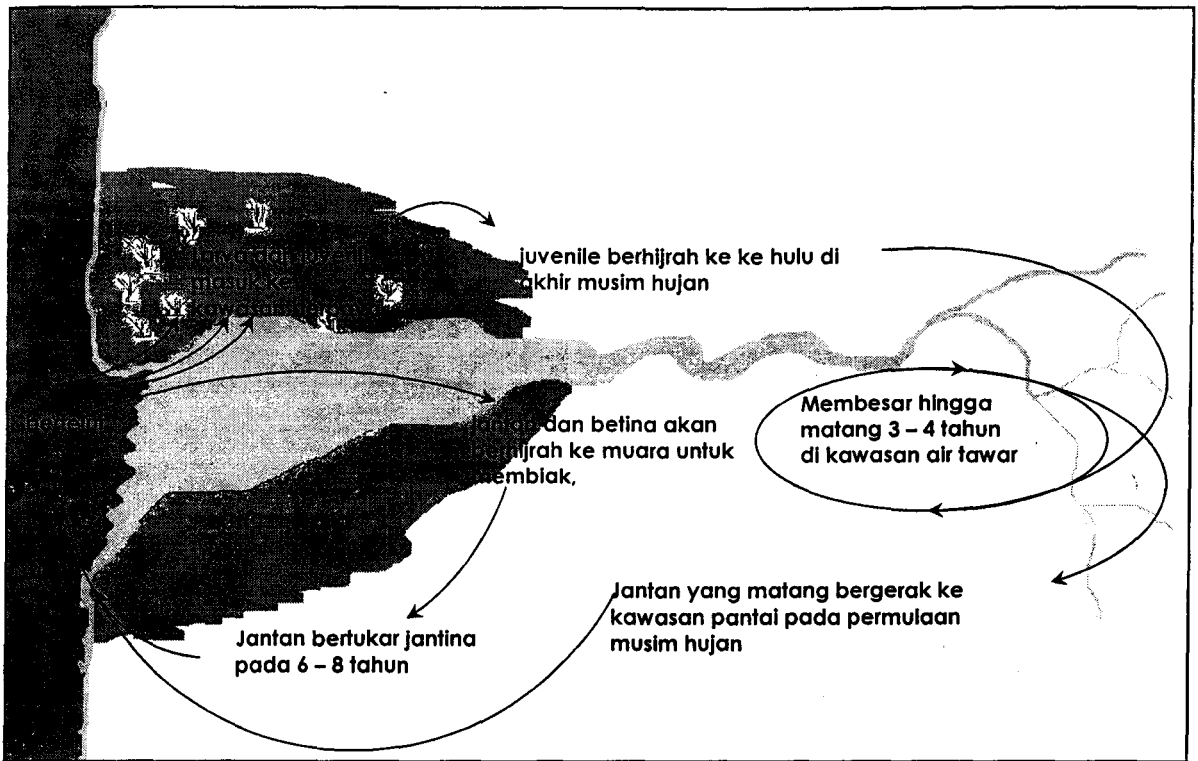


Rajah 2.2 Morfologi luar ikan siakap, *Lates calcarifer*

2.1.3 Biologi dan Kitar Hidup Ikan Siakap

Ikan siakap merupakan ikan air tawar atau payau. Ia merupakan spesies eurihalin dan katadromi. Eurihalin bermaksud ikan siakap boleh hidup di kawasan air yang berlainan kemasinan atau saliniti. Katadromi pula bermaksud, ikan-ikan dewasa dan matang akan berhijrah ke kawasan muara sungai atau laut untuk membiak.

Ikan siakap berhabitat di kawasan teluk, sungai dan muara perairan yang bersih. Rajah 2.3 menunjukkan kitar hidup umum ikan siakap. Ikan yang matang akan berada dalam muara sungai (saliniti 30 – 32 ppt dan kedalaman 10 – 15m). Peringkat juvenil (15 – 20 hari atau 0.4 – 0.7 cm) boleh didapati di sepanjang pantai dan kawasan air payau. Juvenil yang lebih besar (< 1.0 cm) boleh didapati di kawasan air tawar, contohnya di tasik dan bendang yang bersambung dengan sungai utama di mana ikan akan membesar di kawasan air tawar dan membiak di kawasan air masin (FOA, 2006).



Rajah 2.3 Kitar hidup umum ikan siakap, *L. calcarifer* - diubah suai daripada Grey, (1986).

Pada musim mengawan, ikan siakap jantan dan betina akan berhijrah ke muara untuk membiak, dan akan kembali ke perairan asal mereka. Menurut kajian Guiguen et al., (1993) menyatakan sesetengah ikan adalah hermafrodit protandrus iaitu mengalami pertukaran jantina daripada jantan kepada betina bergantung pada usia contohnya ikan siakap. Ikan siakap jantan yang melebihi usia lima tahun selalunya akan mengalami perubahan jantina untuk bertukar menjadi betina (Grey, 1986)

Kebiasaannya induk-induk yang matang (saiz sekurang-kurangnya 3.0 kg) akan menduduki kawasan pantai atau kawasan air masin dengan

saliniti antara 30 – 32 ppt (bahagian perseribu). Kawasan ini biasanya tidak melebihi 5 km dari pantai atau kedalaman air kurang 14 meter dan biasanya berhampiran muara sungai dan kawasan paya bakau. Induk-induk akan bertelur berpandukan kepada kitaran bulan. Kebiasaannya ikan akan bertelur pada waktu malam antara pukul 8 hingga 11 malam dan bertepatan dengan permulaan air pasang (FOA, 2006).

Juvenil-juvenil yang menetas dari telur-telur akan dihanyutkan oleh ombak dan arus air pasang ke kawasan muara sungai dan kawasan hutan bakau (kawasan air payau) untuk membesar. Ikan-ikan akan menduduki kawasan ini sehingga ukuran mencapai lebih kurang 200 mm (8 inci). Ikan-ikan dewasa boleh juga didapati di kawasan-kawasan sungai air payau atau air tawar dan akan berhijrah ke kawasan air masin apabila sudah cukup matang (Grey, 1986). Kebiasaannya antara makanan ikan siakap adalah ikan, udang, udang karang, ketam dan serangga akuatik (Agri-BDC, 2006).

2.1.4 Pengeluaran Ikan Siakap di Malaysia

Pengeluaran ikan siakap di Malaysia berkembang dengan kadar 7.0% setahun. Pengeluaran ikan siakap di Asia tidak hanya melalui ternakan tetapi juga daripada sumber tangkapan. Penternakan ikan siakap, *L. calcarifer* kebelakangan ini merupakan satu industri komersil kerana permintaan tempatan terhadapnya yang tinggi terutama dalam bidang katering dari pihak pengusaha restoran dan hotel. Kementerian Pertanian dan Asas Tani Malaysia menyatakan penternakan ikan siakap telah mula

dibiakkan secara besar-besaran di Thailand sejak 70-an dan pengeluaran semasa dunia bagi ikan siakap yang diternak adalah 20,000 tan metrik di mana pengeluar terbesar ialah Thailand, Taiwan, Malaysia dan Indonesia. Malaysia mengeluarkan ikan siakap yang diternak dalam jumlah yang besar berbanding yang ditangkap (FOA, 2006).

Menurut Awang (1986) pengkulturan ikan siakap di Malaysia bermula pada pertengahan tahun 1970an menggunakan induk liar atau benih yang di import dari luar dan dikultur dalam sangkar yang dibina pada kawasan yang sesuai. Pemiakan larva ikan siakap, *L. calcarifer* di Malaysia mula dibangunkan oleh Institut Penyelidikan Perikanan yang berpusat di Gelugor, Pulau Pinang pada tahun 1982 (Awang, 1986). Ikan siakap dipelihara atau dikultur secara komersial samada dalam kolam atau sangkar air payau/masin atau air tawar. Beberapa tempat yang terkenal dengan aktiviti pengkulturan ikan dalam sangkar ialah di Kukup, Kong-Kong Laut dan Sedili di Johor, Pulau Ketam di Selangor, Bukit Tambun dan Pulau Aman di Pulau Pinang, Besut dan Setiu di Terengganu, Jubakar di Kelantan serta Tanjung Dawai dan Pulau Langkawi di Kedah (Agri-BDC, 2006).

Selain daripada ternakan domestik, Malaysia juga mengimport ikan siakap daripada negara jiran terutamanya daripada selatan Thailand apabila terdapat kekurangan bekalan dan dalam masa yang sama mengeksport sejumlah besar ikan siakap hidup ke Singapura. Data yang dikeluarkan oleh Jabatan Perikanan merekodkan bahawa Malaysia mengeksport 64.7 tan

ikan siakap sejuk beku yang bernilai RM 175,610 ke Singapura, Taiwan, Australia dan Brunei pada tahun 2001 (Agri-BDC, 2006).

2.2 DNA Mikrosatelit

Mikrosatelit atau jujukan berulang pendek (SSR) merupakan satu lokus DNA (atau kawasan yang mempunyai jujukan DNA) dengan jujukan DNA yang pendek dan diulang beberapa kali. Unit ulangan jujukan yang selalu terdapat pada mikrosatelit adalah di-, tri-, atau tetranukleotida. Mikrosatelit banyak terdapat di seluruh genom dan menunjukkan tahap alel polimorfik yang tinggi (Ellegren, 2004). Mikrosatelit merupakan penanda genetik bersifat kodominan yang bersaiz kecil dan mudah diamplifikasi dengan kaedah tindakbalas berantai polimerase (PCR). Ciri-ciri ini memberikan asas untuk kejayaan aplikasi penanda mikrosatelit dalam pelbagai kajian biologi dan perubatan, termasuk forensik, epidemiologi molekul, parasitologi, ekologi, pemetaan genetik, populasi dan genetik pemuliharaan (Neff et al., 2000).

Di dalam kajian perikanan dan akuakultur, mikrosatelit sangat berguna untuk kajian penentuan genetik induk, pemilihan induk, pemetaan genetik, dan mengenalpasti gen yang boleh diaplikasi dalam program pemuliharaan dan pembiakbakaan (Chistiakov et al., 2006). Liu & Cordes, (2004) menyatakan mikrosatelit banyak digunakan dalam kajian penentuan induk dan hubungan keibubapaan pada populasi semulajadi dan akuakultur serta pengawalan pengeluaran ikan akuakultur. Kajian Herbinger et al.,

(1995) adalah contoh kejayaan aplikasi penanda mikrosatelit dalam kajian hubungan keibubapaan: Kajian ini juga berjaya memadamkan 91% progeni kepada satu atau dua pasangan induk menggunakan 4 daripada 5 penanda mikrosatelit dalam analisis induk "rainbow trout" di Kanada. Selain itu, terdapat beberapa kajian lain yang menggunakan mikrosatelit sebagai penanda dalam penentuan induk dan program pembiakbakaan spesies ikan yang mempunyai nilai ekonomi pada populasi liar dan akuakultur. Ini termasuk "European sea bass" (Garcia de Leon et al., 1998), "Atlantic salmon" (Norris et al., 2000; King et al., 2001), "bluegill sunfish" *Lepomis macrochirus* (Neff, 2001), "red sea bream" *Pagrus major* (Doyle et al., 2001), "chinook salmon" *Oncorhynchus tshawytscha* dan "rainbow trout" (Bentzen et al., 2001), dan "turbot" *Scophthalmus maximus* (Castro et al., 2004).

2.2.1 Evolusi Penanda DNA Mikrosatelit

Jujukan DNA boleh berevolusi menerusi mutasi dengan membentuk sesuatu yang baru (alel baru). Perubahan ini mengambil kira samada terhasilnya alel baru melalui mutasi dan berapa banyak alel yang baru ini tersebar secara inter dan intrapopulasi (Blankenship et al., 2002). Kadar mutasi mikrosatelit dianggarkan 10^{-2} - 10^{-6} per lokus per generasi (Ellegren, 2000), dan ini beberapa kali ganda lebih besar daripada DNA tak berulang biasa (10^{-9}). Dua hipotesis diutarakan untuk menerangkan evolusi mikrosatelit iaitu 'slipped – strand mispairing' dan 'unequal crossing over' (Chistiakov et al., 2006).

Hipotesis 'slipped – strand mispairing' berlaku semasa replikasi DNA. Melalui mekanisma ini, DNA polimerase dikatakan telah terpesong daripada laluan semasa replikasi, samada meninggalkan unit ulangan atau menambahkan terlalu banyak unit ulangan. Ini akan menyebabkan untai baru mempunyai bilangan jujukan yang berbeza daripada untai asal (Ellegren, 2004). Ini menerangkan perubahan - perubahan kecil dalam bilangan jujukan berlaku (menambah atau mengurangkan satu atau hanya beberapa jujukan). Ini juga menjelaskan bagaimana lokus mikrosatelit boleh dihasilkan di tempat pertama dan ada kemungkinan bahawa urutan termasuk dua atau tiga ulangan secara rawak di seluruh genom. Pergelinciran ini membolehkan jujukan berulang pendek ini diampifikasi dari generasi ke generasi berturut - turut (Chistiakov et al., 2006)

Model 'unequal crossing over' menyatakan mutasi mikrosatelit disebabkan oleh dua untaian kromosom mengalami kesalahan pelarasan semasa rekombinasi dan menyebabkan pengurangan pada satu molekul DNA dan penambahan pada molekul DNA yang lain (Oliveira et al., 2006)

2.2.2 Model Mutasi Mikrosatelit

Oliveira et al. (2006) menyatakan terdapat empat jenis model mutasi yang telah dicadangkan untuk menerangkan kepelbagaian pada lokus mikrosatelit iaitu; model mutasi "stepwise" (SMM), model alel infiniti (IAM), model dwi fasa dan model alel-K. Namun, hanya model SMM dan IAM sahaja yang sering digunakan dalam kebanyakan kajian.

Model SMM menyatakan bahawa ketika mikrosatelit bermutasi, mereka hanya mendapat atau kehilangan satu ulangan (Chistiakov et al., 2006). Ini bermakna bahawa dua alel yang berbeza oleh satu ulangan adalah lebih berkait rapat dari alel yang berbeza dengan banyak ulangan. Statistik jarak genetik yang menggunakan model ini disebut R_{st} . Model SSM secara umum model pilihan apabila mengira hubungan antara individu dan substruktur populasi (DeWoody & Avise, 2000).

Model IAM menyatakan mutasi pada mikrosatelit melibatkan sebarang bilangan ulangan jujukan dan sentiasa membentuk alel baru. Statistik yang menggunakan model ini dipanggil F_{st} (Chistiakov et al., 2006). Anggaran saiz populasi akan lebih tepat dan kajian pengstrukturasi populasi

mungkin dapat ditaksirkan dengan menggunakan model yang sesuai untuk data mikrosatelit. Kebelakangan ini, model mutasi SMM menunjukkan jangkaan secara tepat jenis variasi yang biasa terdapat pada lokus mikrosatelit. Namun, kajian spesies akuatik khususnya dari “rainbow trout”, menunjukkan bahawa IAM memberikan keputusan secara konsisten, lebih baik daripada ramalan SMM untuk data kepelbagaian mikrosatelit menggunakan lokus mikrosatelit (Dewoody & Avise, 2000).

2.2.3 Kelebihan DNA Mikrosatelit

Mikrosatelit mempunyai beberapa kelebihan yang membuatnya sesuai sebagai penanda genetik untuk kajian akuakultur dan perikanan. Pertama, pada masa kini mikrosatelit senang untuk diperolehi, samada melalui cara pemencilan secara terus pada penanda spesifik untuk suatu spesies, iaitu melibatkan penjanaan pustaka DNA genom (Liu & Cordes, 2004). Kedua, penanda DNA mikrosatelit menunjukkan tahap variasi alel yang tinggi seterusnya menjadikan DNA mikrosatelit banyak digunakan dalam pelbagai kajian termasuk; (1) spesies yang menunjukkan tahap variasi yang rendah dalam kajian yang menggunakan penanda konvensional seperti aloenzim atau mtDNA; (2) populasi yang berlaku pembiakan dalaman seperti yang selalu terjadi pada populasi akuakultur; (3) kedudukan geografi populasi yang dikaji berdekatan, yang mana perbezaan genetik mungkin terhad.

Ketiga, alel mikrosatelit adalah kodominan dan diwarisi secara Mendel, tidak seperti penanda RAPD yang dominan/resesif atau mtDNA yang diwarisi secara klonal. Perwarisan secara Mendel dan sifat kodominan menjadikan mikrosatelit lebih informatif dalam kajian salasilah kekeluargaan dan kajian populasi. Maka maklumat struktur sesuatu populasi yang dikaji dapat diketahui dengan genotip disesuaikan dengan hukum kebarangkalian Hardy–Weinberg. Seterusnya, Jackson et al. (2003) menyatakan kelebihan mikrosatelit yang keempat ialah mikrosatelit boleh diuji menggunakan kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR) dan hanya memerlukan masa yang singkat sahaja untuk menganalisis sejumlah tisu sampel. Fungsi ini membolehkan penggunaan tisu sampel daripada sumber–sumber yang senang diperolehi seperti sirip dan sisik yang disimpan kering atau diawet dalam larutan alkohol pada suhu tertentu. Kelebihan ini dapat menjimatkan kos untuk mendapatkan tisu sampel dan juga pengangkutan.

Kelima, walaupun perkembangan awal penanda DNA mikrosatelit memerlukan kos yang tinggi dan mengambil masa yang lama berbanding penanda genetik lain, namun usaha ini dilihat memberi keuntungan pada peringkat seterusnya. Portaa et al. (2006) menyatakan mikrosatelit senang untuk diautomasi dengan kaedah amplifikasi berganda walaupun menggunakan ratusan bahkan ribuan sampel. Selain itu, jumlah alel polimorfik yang tinggi pada penanda mikrosatelit menunjukkan penanda menandakan mikrosatelit memberi maklumat yang lebih berbanding penanda DNA yang lain. Kecanggihan teknologi terkini membolehkan

mikrosatelit dianalisis secara senang dan cepat dengan adanya kaedah automasi dan pengesanan fluorometrik (Beaumont & Hoare, 2003).

Seterusnya, pencetus mikrosatelit yang diamplifikasi pada satu spesies biasanya boleh diamplifikasi pada spesies berbeza dalam genera yang sama atau berkaitan (Okumus & Çiftci, 2003).

2.3 DNA Mitokondria, mtDNA

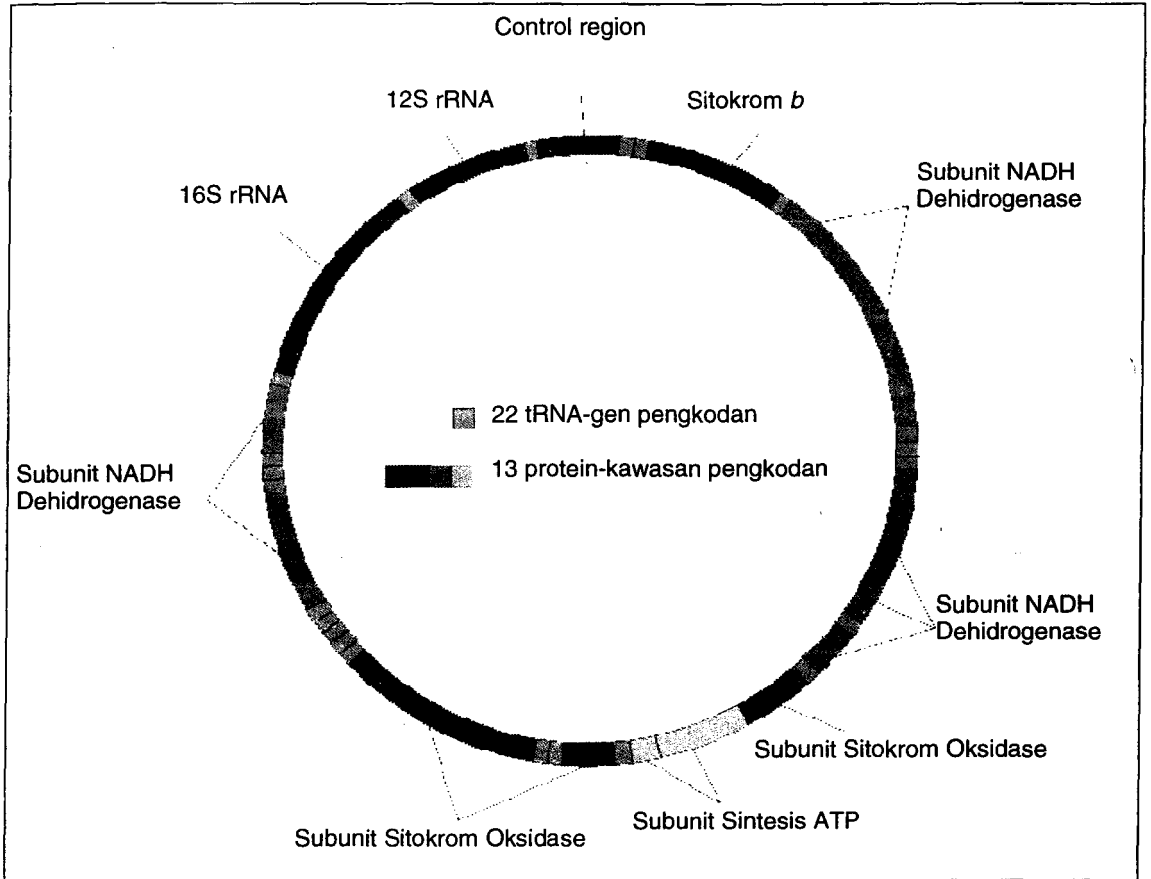
Mitokondria memiliki bahan genetik sendiri yang cirinya berbeza dengan bahan genetik pada sel nukleus. DNA mitokondria memiliki ciri-ciri yang berbeza dari DNA nukleus iaitu dari segi ukuran, jumlah gen, dan bentuk. Antaranya, mtDNA memiliki tahap mutasi yang lebih tinggi, iaitu sekitar 10 – 17 kali lebih pantas berbanding DNA nukleus (Okumus & Çiftci, 2003).

Selain itu DNA mitokondria terdapat dalam jumlah banyak (lebih dari 1000 salinan) dalam setiap sel, sedangkan DNA nukleus hanya berjumlah dua salinan. DNA nukleus merupakan hasil rekombinasi DNA kedua-dua induk sementara DNA mitokondria hanya diwarisi dari ibu (Lin et al., 2006). DNA nukleus yang berbentuk linear manakala mtDNA berbentuk lingkaran. Sebahagian besar mtDNA membawa protein yang berfungsi dalam proses respirasi sel.

Saiz genom pada DNA mitokondria secara relatif kecil apabila dibandingkan dengan genom DNA pada nukleus. Ukuran genom DNA mitokondria pada setiap organisma sangat bervariasi. Pada manusia ukuran DNA mitokondria adalah 16.6 kb, hampir sama saiz mitokondria pada kebanyakan organisma akuatik (Lin et al., 2006).

2.3.1 Struktur DNA Mitokondria Ikan Siakap

Saiz mtDNA ikan siakap ialah 16,535 bp, mengandungi 2 gen yang mengkodkan molekul RNA ribosom (rRNA), 22 gen yang mengkodkan molekul tRNA, satu tapak pengawalan major tak pengkodan (major noncoding control region) yang singkat, dengan hanya 768 bp dan 13 gen yang mengkodkan subunit protein bagi enzim pemfosforilan oksidatif (Lin et al., 2006). Daripada itu, dua belas gen yang mengkodkan subunit bagi enzim kompleks terlibat dalam pengangkutan elektron dan sistesis ATP. Rajah 2.4 menunjukkan struktur asas mtDNA.



Rajah 2.4 Struktur asas mtDNA – Diubahsuai daripada http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrial_DNA

2.3.2 Sifat-sifat DNA Mitokondria

DNA mitokondria diwariskan secara maternal (Okumus & Çiftci, 2003). Sel telur memiliki jumlah mitokondria yang lebih banyak dibandingkan sel sperma, iaitu sekitar 100,000 molekul berbanding sel sperma hanya memiliki sekitar 100-1500 mtDNA. Dalam sel sperma, mitokondria banyak terdapat pada bahagian ekor. Semasa persenyawaan sel telur, bahagian ekor sperma dilepaskan sehingga hanya sedikit atau hampir tidak ada mtDNA sperma yang masuk ke dalam sel telur. Oleh itu, sumbangan secara paternal hanya berjumlah 100 mitokondria atau langsung tiada (Holt & Jacobs, 2000). Seterusnya semasa proses pertumbuhan sel, jumlah mtDNA secara paternal semakin berkurang. Jika dibandingkan dengan sumbangan secara maternal iaitu 100 000, maka sumbangan secara paternal hanya 0.1%. Oleh kerana itu, dianggap rekombinasi tidak berlaku dan kesimpulan bahawa mtDNA bersifat klonal, diturunkan dari ibu ke seluruh keturunannya (Beaumont & Hoare, 2003).

DNA mitokondria juga memiliki sifat unik yang lain iaitu tahap mutasinya yang sangat tinggi sekitar 10-17 kali berbanding DNA nukleus (Liu & Cordes, 2004). Hal ini disebabkan mtDNA tidak memiliki mekanisme replikasi yang efisien, tidak memiliki protein histon, dan terletak berdekatan dengan membran dalam mitokondria tempat berlakunya tindakbalas fosforilasi oksidatif yang menghasilkan radikal oksigen sebagai produk sampingan (Beaumont & Hoare, 2003). Selain itu, DNA polimerase yang

dimiliki oleh mitokondria adalah DNA polimerase γ yang tidak mempunyai aktiviti "proofreading" (suatu proses pembaikan dan ketepatan dalam replikasi DNA). Kekurangan ini menyebabkan mtDNA tidak memiliki sistem pembaikan yang dapat menghilangkan kesalahan replikasi. Replikasi mtDNA yang tidak tepat ini akan menyebabkan mutasi mudah terjadi.

Salah satu bentuk keunikan yang lain pada mitokondria adalah perbezaan kod genetik mitokondria yang mana menunjukkan perbezaan dalam hal pengenalan kodon universal. UGA tidak dibaca sebagai "berhenti" (stop) melainkan sebagai triptofan, AGA dan AGG tidak dibaca sebagai arginina tetapi sebagai "berhenti", AUA dibaca sebagai methionina (Beaumont & Hoare, 2003).

2.3.3 Kelebihan DNA Mitokondria

Selain DNA nukleus, mtDNA telah banyak digunakan dalam bidang forensik dan menjadi barang bukti di institusi pengadilan kebanyakan negara termasuk Malaysia. Kelebihan utama penggunaan mtDNA adalah mempunyai jumlah molekul yang tinggi dalam satu sel sehingga analisis dari sampel yang sangat sedikit, misalnya cairan tubuh, akar atau helaian rambut bahkan tulang dan fosil tulang boleh dilakukan.

Kelemahan penggunaan mtDNA adalah kemungkinan penemuan persamaan antara individu yang mempunyai relatif kesamaan genetik yang tinggi, terutamanya individu yang mempunyai hubungan kekeluarga sebelah

ibu. Individu yang terdapat hubungan maternal akan memiliki jujukan DNA yang sama manakala berbeza sekiranya tidak mempunyai kaitan pada hubungan maternal.

Variasi mtDNA telah banyak dikaji dalam sebilangan spesies haiwan pada tahap intraspesifik (Ghorashi et al., 2008). Antara kajian ini, terdapat 21 spesies yang melibatkan invertebrata, ikan, amfibia, reptilia, burung, dan mamalia. Variasi intraspesifik bagi mtDNA adalah dalam lingkungan 0.1% hingga 8.7% dan purata ialah 2.8% (Khan et al., 2005). Terdapat beberapa sebab yang baik bagi penggunaan mtDNA sesuatu spesies sebagai sistem model dalam pengajian evolusi genomik. Misalnya, genom mitokondria adalah dipisahkan secara fizikal daripada genom nukleus. Genom mitokondria bersaiz kecil dan bilangan banyak berbanding genom nukleus menjadikan mtDNA satu model penyelidikan evolusi yang baik (Beaumont & Hoare, 2003).

Selain itu, genom haploid, ciri pewarisan maternal dan kadar evolusi yang cepat secara relatif iaitu mtDNA berevolusi lebih cepat berbanding salinan-tunggal DNA nukleus dalam haiwan (Diniz et al., 2005; Lin et al., 2006), menjadikan mtDNA sesuai dan dapat digunakan dalam kajian struktur genetik bagi sesuatu populasi, pengaliran gen, penghibridan, biogeografi, dan hubungan filogenetik bagi pelbagai haiwan (Diniz et al., 2005; Lin et al., 2006; Nguyen et al., 2006; Graves et al., 2009). Perkembangan teknik penjujukan menggunakan PCR telah meningkatkan kegunaan maklumat