

## Karakterisasi Molekuler Ikan Gurami Soang (*Osphronemus gouramy* Lac.) yang Mati pada Rentang Waktu berbeda menggunakan PCR-RFLP Gen *Major Histocompatibility Complex* Kelas II B

Jaka Tri Spetiawan<sup>1</sup>, Agus Nuryanto<sup>1</sup>, Hendro Pramono<sup>1</sup>, Kusbiyanto<sup>1</sup>, Petrus H. Tjahja Soedibja<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Biologi, Universitas Jenderal, Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122

<sup>2</sup> Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman  
correspondence author: anuryanto2003@yahoo.com

### Abstract

Gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.) is a popular fish species among Indonesian people. Several Gurami strains have been cultivated by fish farmer, one of which is Gurami Soang. This strain is believed to have a faster growth rate compared to other strains. However, like other strains, the fingerling of Soang strain have also a low survival and susceptible to disease, especially that caused by *Aeromonas hydrophila* infection. It has been proved that seeds from a single spawning event show variable disease resistance. The difference in resistance among individuals is suggested related to the difference in their genetic component. One of the genes responsible for resistance is Major Histocompatibility Complex (MHC) class II B gene. Variability in resistance can be analyzed by using PCR - RFLP technique. PCR-RFLP is a technique that can produce a specific DNA fragments by PCR, followed by cutting the PCR product using restriction enzymes to describe the presence or absence of restriction sites in DNA fragments. This research aims to determine genetic marker to differentiate between resistant and irrisistant individual of Gurami Soang infected by *A. hydrophila* which die at a different time period based on PCR-RFLP MHC class IIB gene. The study used survey method with purposive random sampling. This study was done from November 2015 up to April 2016. The Data of PCR-RFLP band patterns were analyzed descriptively. The result indicated that cutting of the MHC class II B gene using *Hinf*I produce two RFLP bands with 300 bp and 100 bp length in all samples. Meanwhile, the MHC IIB gene was not cutted by *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI and *Eco*RI enzymes for all samples. These mean that MHC II gene in all individuals were monomorphic. Therefore, it can be concluded that there is no specific genetic marker to differentiate gurami soang individuals which was dying in different time periods.

**Keywords:** *Gourami Soang, PCR-RFLP, genetic diversity, MHC class II B gene*

### Abstrak

Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.) merupakan jenis ikan yang populer di masyarakat Indonesia. Gurami soang merupakan *strain* ikan gurami yang memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat dibanding dengan *strain* yang lain. Namun, *strain* soang juga memiliki kelangsungan hidup yang rendah dan rentan terhadap penyakit. Penyakit ikan yang sangat berbahaya adalah yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Benih yang berasal dari satu pemijahan memiliki ketahanan terhadap penyakit yang bervariasi sehingga jika diinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* akan memiliki ketahanan berbeda-beda. Perbedaan daya hidup tersebut dapat terjadi karena perbedaan komponen genetik yang dimiliki pada setiap individu dalam satu pemijahan. Salah satu gen yang bertanggungjawab terhadap resistensi adalah gen *Major Histocompatibility Complex (MHC)* kelas II B. Variasi resistensi dapat dianalisa secara molekuler menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). PCR-RFLP merupakan suatu teknik yang dapat memperbanyak fragmen DNA tertentu melalui PCR, diikuti dengan pemotongan situs restriksi untuk menggambarkan ada atau tidak adanya perubahan situs restriksi yang terdapat pada fragmen. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan marka gen MHC kelas 2B pada ikan gurami soang dari satu pemijahan yang diinfeksi *A. hydrophila* yang mengalami kematian pada rentang waktu berbeda berdasarkan karakter PCR-RFLP. Penelitian dilakukan menggunakan metode *survey* dengan pengambilan sampel secara *purposive random sampling*. Penelitian dilakukan mulai November 2015 sampai dengan April 2016. Data pola pita PCR-RFLP dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemotongan gen MHC II menggunakan enzim *Hinf*I menghasilkan dua pita RFLP yang masing-masing berukuran lebih kurang 300 pb dan 100 pb. Kedua fragmen RFLP tersebut muncul pada semua sampel ikan gurami soang yang diteliti. Sementara itu, gen MHC II tidak terpotong ketika restriksi dilakukan menggunakan enzim *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, dan *Eco*RI. Hal tersebut mengindikasikan bahwa gen MHC IIB pada individu yang mati dalam waktu berbeda bersifat monomorfik. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa tidak ada marka PCR RFLP gen MHC II yang dapat digunakan untuk membedakan benih ikan gurami soang yang mati dengan waktu berbeda.

**Kata kunci:** *Gurami soang, PCR-RFLP, keragaman genetik, gen MHC kelas IIB*

## Pendahuluan

Ikan gurami (*Osphronemus goramy* Lac.) merupakan jenis ikan konsumsi yang disukai karena dagingnya yang tebal dan rasanya yang enak. Gurami telah dibudidayakan secara luas oleh masyarakat Indonesia dan menyebar ke negara lain (Welcomme, 1988). Ikan gurami memiliki beberapa *strain* di antaranya gurami Soang, Jepang, Paris, Bastard, dan Porselen yang banyak dibudidayakan (Nugroho, 2011). Sementara itu, menurut Setijaningsih *et al.* (2007), *strain* ikan gurami yang telah dibudidayakan di Indonesia meliputi gurami soang, gurami jepang, gurami paris, gurami bastar, dan gurami porselen.

Masalah yang sering dihadapi dalam kegiatan budidaya ikan adalah adanya penyakit pada ikan yang bersifat patogenik baik dari golongan parasit, jamur, bakteri, dan virus. Yu, *et al.* (2004) menyatakan bahwa bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) dan sangat membahayakan produksi perikanan. Sementara itu menurut Austin & Austin (2007), bakteri *Aeromonas* menjadi salah satu penyebab penyakit pada ikan air tawar dan dapat menyebabkan penyakit *furunculosis* dan *carp erythrodermatitis*. Bakteri pada ikan dapat dijumpai pada permukaan tubuh dan saluran pencernaan. Bakteri tersebut menyerang sistem pertahanan ikan yang mengakibatkan nafsu makan berkurang, tukak pada kulit dan penimbunan cairan dirongga tubuh sehingga menimbulkan kematian pada ikan gurami.

Pertahanan tubuh yang dimiliki setiap individu berbeda-beda tergantung komponen genetik yang diwarisi dari induknya (Kusbiyanto *et al.*, 2016). Variasi sifat pertahanan tubuh dari individu dalam satu populasi merupakan keanekaragaman yang dimiliki oleh suatu spesies yang terdapat dalam suatu populasi (Campbell *et al.*, 2009). Variasi intra populasi dapat dilihat secara genetik melalui karakter polimorfisme. Karakter tersebut seringkali dikontrol oleh satu gen yang diturunkan. Penelitian ini akan membantu dalam program budidaya melalui penyediaan metode seleksi benih secara molekuler. Metode *selective breeding* ini merupakan program pemuliaan yang bertujuan untuk meningkatkan mutu genetik dari populasi. Apabila hal ini dilakukan pada gurami soang, maka generasi berikutnya akan memiliki kualitas yang lebih baik, misalnya dapat tumbuh lebih cepat sehingga pemeliharaannya menjadi lebih efisien dan murah (Sembiring *et al.*, 2013).

*Major Histocompatibility Complex* (MHC) merupakan gen terbesar yang dapat ditemukan pada vertebrata yang mengkode molekul MHC yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh (Zhao *et al.*, 2013). Molekul MHC terlibat dalam interaksi antara benda asing dengan sistem pertahanan tubuh ikan. Berdasarkan fungsi

dan susunan kimianya, gen MHC dibagi menjadi dua, yaitu MHC class I dan MHC class II (Pang *et al.*, 2013). MHC I merupakan molekul yang terlibat dalam presentasi antigen peptida pada permukaan sel yang dikenali oleh reseptor T sel sitotoksik (TCR) dari limfosit T CD8<sup>+</sup>. Molekul MHC I merupakan rantai besar  $\alpha$  transmembran heterodimer (45 kDa) yang berasosiasi non-kovalen dengan rantai pendek (12 kDa)  $\beta$ 2-mikroglobulin. Masing-masing rantai besar disandikan oleh gen polimorfik yang berisi peptida *leader*, tiga domain ekstraseluler ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3) dan transmembran serta sitoplasma (Cuesta *et al.*, 2007). MHC I berperan penting dalam sistem utama kekebalan tubuh (Zhao *et al.*, 2013).

*Major Histocompatibility Complex* (MHC) adalah suatu kelompok atau kumpulan gen yang terletak dalam kromosom 6 dan berperan dalam pengenalan dan pemberian sinyal di antara sel-sel sistem pertahanan tubuh (sistem imun). MHC class II termasuk sistem imun spesifik yang bersifat adaptif. MHC class II terdiri atas sel-sel imunokompeten seperti sel B, monosit, makrofag, *antigen presenting cells* (APC), dan sel T aktif yang terdapat pada epitel kelenjar Timus (Baratawidjaja, 1991). Respons imun biasanya terkait dengan adanya molekul MHC class I dan MHC class II. Sel-sel fagositik akan diaktifkan oleh MHC class II untuk memproduksi antibodi dan mengaktifkan karakter-karakter imunologi yang terlibat dalam mengeliminasi parasit dan bakteri, dan menetralkan virus (Sucipto, 2011). Sebagai salah satu gen yang berfungsi menetralkan virus maka gen *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC - II) telah banyak digunakan sebagai penciri molekuler sebagai penanda ikan tahan penyakit (Consuegra dan Leaniz, 2008; Rakus *et al.*, 2009; Aryanto *et al.*, 2015; Aziz *et al.*, 2015).

MHC merupakan karakter daya tahan tubuh terhadap penyakit yang dapat dideteksi keberadaannya secara genotip. Menurut Hayuningtyas *et al.* (2013) hubungan antara pertumbuhan dengan gen MHC II memiliki korelasi yang negatif. Oleh karena itu, populasi ikan yang pertumbuhannya lambat memiliki tingkat persentase positif MHC II lebih dibandingkan populasi ikan yang pertumbuhannya cepat. Selain karakter daya tahan terdapat karakter pertumbuhan yang dapat dilihat secara fenotip, karakter ini juga berperan penting dalam peningkatan produksi secara kualitatif. Oleh karena itu, perlu adanya jaminan kualitas ikan konsumsi yang baik, salah satunya dengan penyediaan induk unggul yang dihasilkan melalui perbaikan genetic, sehingga dapat diperoleh keturunan gurami yang tahan infeksi *A. hydrophila*.

Deteksi *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dilakukan berdasarkan pada adanya kemungkinan untuk mem-

bandingkan profil pita-pita yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi terhadap DNA target/dari individu yang berbeda. Enzim restriksi akan memotong situs tertentu yang dikenalnya. Situs enzim restriksi dari genom suatu kelompok organisme yang berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim, atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukurannya antar individu. Polimorfisme ini selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogeni/dendogram kekerabatan kelompok (Purwantini et al., 2013).

Berdasarkan penelitian sebelumnya dikemukakan bahwa analisis polymerase chain reaction (PCR)-RFLP telah diterapkan untuk membedakan spesies dan mendeteksi variasi antar spesies atau intra spesies variasi berbagai spesies (Mesquita et al., 2001; Takehana et al., 2004; Cheng and Lu 2005; Ma et al., 2010) dan babi (Fibriana et al., 2012).. Oleh karena itu, teknik PCR-RFLP dapat digunakan untuk menganalisis keragaman dan keseragaman genetik individu. Hal ini merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk menganalisis keanekaragaman genetik pada ikan gurami soang berbeda ukuran dalam satu pemijahan, sehingga dapat mempelajari apakah ada perbedaan situs restriksi pada fragmen DNA ikan gurami soang berbeda ukuran yang dihasilkan dari satu pemijahan.

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan marka gen *MHC* kelas 2B pada ikan gurami soang dari satu pemijahan yang diinfeksi *A. hydrophila* yang mengalami kematian pada rentang waktu berbeda berdasarkan karakter PCR-RFLP dan juga untuk menggambarkan fenomena variasi intra populasi yang terjadi pada populasi tersebut.

Penelitian karakterisasi molekuler dengan menggunakan PCR-RFLP gen *MHC* kelas 2B pada ikan gurami soang yang diinfeksi *A. hydrophila* dan mengalami kematian pada rentang waktu berbeda ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai karakter PCR-RFLP gen *MHC* kelas 2B pada ikan tersebut. Informasi tersebut dapat digunakan untuk membedakan individu yang memiliki tingkat resistensi tinggi dan rendah. Oleh karena itu diharapkan dapat bermanfaat bagi para pembudidaya ikan gurami soang untuk menentukan program pemuliaan yang tepat dalam tahapan berikutnya.

## Metode

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan dari November 2015 sampai April 2016. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *survey* dengan menggunakan

teknik *purposive random sampling*, yaitu pengambilan sampel hanya individu yang mati pada rentang waktu berbeda setelah infeksi *A. hydrophila*. Ikan yang mati mengalami peradangan sangat parah dan tidak ada proses penyembuhan, sedangkan ikan yang tetap hidup pasca infeksi mengalami peradangan namun kemudian mengalami penyembuhan. Sirip ekor dari masing-masing sampel ikan gurami soang dipotong dengan ukuran lebih kurang 5 mm. Sampel jaringan sirip ekor selanjutnya diawetkan dalam alkohol absolut 96% dan kemudian disimpan di lemari es dengan temperatur 4 °C.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Chelex. Pertama dibuat larutan *mastermix* yang terdiri atas chelex 5% 100 µl, DTT 0,1 mM 5 µl, dan proteinase-K sebanyak 4 µl, dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml. Kemudian, pipet 109 µl *mastermix* ke dalam *tube* 1,5 ml yang telah disiapkan untuk masing-masing sampel. Potongan sirip ikan dengan ukuran kurang lebih 0,2 mm dimasukkan ke dalam *tube* yang telah diberi larutan *mastermix* tersebut. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 56 °C dengan kecepatan 1000 rpm selama 4-6 jam pada *thermomixer*. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 gr selama 2-4 menit. Supernatan ditransfer ke dalam *tube* baru, kemudian diinkubasi kembali dengan kecepatan 1000 rpm selama 10-20 menit pada temperatur 95 °C untuk menghindari sisa protein yang terdapat pada templat sehingga tidak menghancurkan *Taq polymerase*.

Penanda genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah gen *MHC* kelas II B. Fragmen gen tersebut di amplifikasi menggunakan sepasang primer *MHC Forward* : 5' ATGGAAGATGAAATCGCCGC dan *MHC Reverse* 5' TGCCAGATCTTCTCCATGTCG (Wegner et al., 2006). Reaksi PCR dilakukan dengan volume total campuran sebanyak 25 µl. Larutan campuran tersebut terdiri atas air *ultrapure* (ddH<sub>2</sub>O) sebanyak 18,4 µl, buffer PCR 10x sebanyak 2,5 µl, dNTP sebanyak 1 µl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> 1 µl, primer 0,1 mM *MHC Forward* 1 µl, primer 0,1 mM *MHC Reverse* 1 µl dan, 1 U DNA *Taq polymerase* sebanyak 0,1 µl dan DNA 1 µl. Proses PCR dilakukan di dalam mesin *thermal cycle*. Kondisi optimal PCR yang diperoleh selama penelitian adalah predenaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit. PCR dilakukan sebanyak 3 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 45°C selama 2 menit dan pemanjangan (*extention*) pada suhu 72°C selama 1 menit 15 detik. Setelah 3 siklus, kemudian dilanjutkan sebanyak 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 48°C selama 2 menit dan pemanjangan (*extention*) pada suhu 72°C selama 1 menit 15 detik. Setelah 35 siklus,

kemudian dilanjutkan dengan pemanjangan akhir (*final extention*) pada suhu 72°C selama 9 menit. Selanjutnya produk PCR divisualisasikan pada elektroforesis gel agarosa 1%.

Segmen gen *MHC* kelas II B yang teramplifikasi dilakukan *skinning* untuk memperoleh situs polimorfisme menggunakan 5 enzim restriksi (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, dan *HinfI*). Pemotongan enzim restriksi dilakukan mengikuti protokol dari *Thermo scientific* dengan volume total campuran sebanyak 32 µl. Larutan campuran tersebut terdiri atas 18 µl *nuclease free water*, 10 µl produk PCR, 2 µl 10X buffer enzim, dan 0,5-2 µl enzim restriksi (1 U). Masing-masing larutan campuran dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama ± 16 jam. Sampel hasil digesti dimigrasikan pada gel agarosa 1 % dalam 1X TAE buffer dan diwarnai dengan menggunakan EtBr (*ethidium bromide*). Fragmen yang terpotong divisualisasikan di bawah UV trans-illuminator. Penggunaan enzim restriksi diharapkan mampu menghasilkan pola restriksi (pemotongan) DNA sehingga dapat digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan antara individu yang digunakan pada penelitian ini. Jika terdapat situs pemotongan maka enzim restriksi akan memotong DNA pada situs yang dikenal sehingga sekuens DNA terpisah menjadi fragmen-fragmen DNA. Ada atau tidaknya situs restriksi ditentukan berdasarkan kemunculan fragmen RFLP. Profil marka PCR-RFLP untuk setiap individu dianalisis kemunculan pitanya menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa 1% dan menggunakan marka 100 bp *ladder* sebagai pembanding fragmen yang diperoleh.

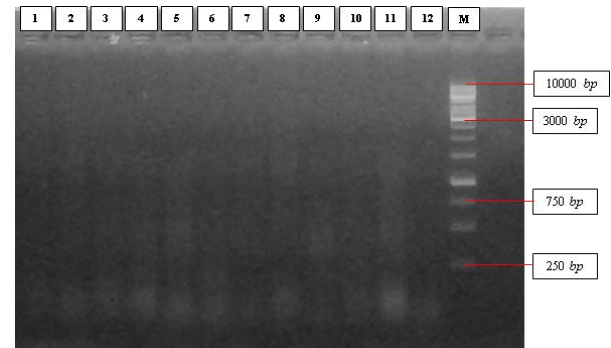
Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu keragaman genetik intra populasi ikan gurami *strain* soang. Sementara itu, parameter yang diamati keberadaan marka PCR-RFLP yang dapat digunakan untuk membedakan ikan yang mati pada rentang waktu berbeda. Profil marka PCR-RFLP untuk setiap benih yang mati pada rentang waktu berbeda dianalisis secara deskriptif berdasarkan kemunculan pita RFLP pada gel agarosa.

## Hasil dan Pembahasan

### Profil Genom Total Hasil Isolasi DNA Ikan Gurami Soang

DNA dari 12 individu ikan gurami soang berhasil diisolasi meskipun DNA yang diperoleh terlihat tidak utuh (*smear*) (Gambar 1.). Pita *smear* ini menunjukkan adanya fragmen-fragmen DNA yang terbentuk akibat perlakuan fisik selama proses ekstraksi DNA, seperti penggunaan butiran-butiran *chelex*. Butiran-butiran tersebut diduga yang menyebabkan genom terfragmentasi dan ketika divisualisasi pada gel agarosa terlihat

sebagai *smear*. Menurut Weeden et al. (1992), munculnya pita *smear* pada elektroforesis hasil isolasi DNA juga dapat terjadi karena adanya kontaminasi bahan organik lainnya seperti RNA dan protein.



**Gambar 1. Hasil visualisasi genom total ikan gurami soang**

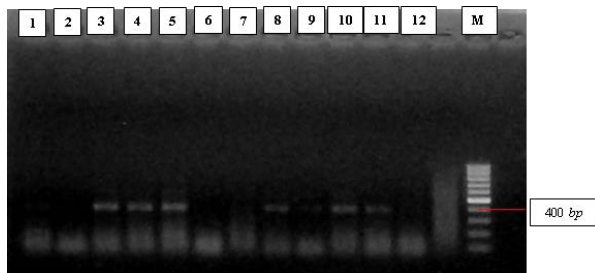
Keterangan :

1 & 7 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 2 & 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, 3 & 9 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 6 & 12 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keenam, dan M = DNA marka 1kb

Menurut Weeden et al. (1992), hasil isolasi DNA tersebut masih bisa digunakan sebagai *template* yang cukup baik untuk reaksi PCR. Kondisi tersebut juga pernah dilaporkan pada beberapa penelitian terdahulu yang memperoleh produk PCR dengan kuantitas dan kualitas yang baik meskipun menggunakan templat DNA berupa DNA *smear* (Nuryanto & Kochzius, 2009; Nuryanto et al., 2012; Azizah et al., 2015).

### Amplifikasi Gen *MHC* Kelas II B

Hasil amplifikasi gen *MHC* Kelas II B berupa fragmen DNA berukuran lebih kurang 400 pasang basa (pb). Pita amplicon yang dihasilkan merupakan fragmen yang diharapkan, karena menurut Hayuningtyas et al. (2013) dan Wegner et al. (2006), amplifikasi gen *MHC* Kelas II B dari genom total menggunakan primer *MHC* II akan menghasilkan produk dengan panjang sekitar 400 pb. Produk amplifikasi (*amplicon*) dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Hasil amplifikasi Gen *MHC* Kelas II B ikan gurami soang**

Keterangan :

1 & 7 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 2 & 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, 3 & 9 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 6 & 12 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keenam, dan M = DNA marka 100 pb

Produk PCR 400 pb diperoleh setelah melalui proses optimasi suhu, waktu, dan kombinasi reagen yang tepat. Gen *MHC* Kelas II B diamplifikasi dari 12 individu, namun produk amplifikasi hanya diperoleh dari 7 individu. Produk amplifikasi memiliki variasi intensitas pita yang dihasilkan seperti tebal dan jelas, tipis dan samar-samar. Hasil tersebut diduga disebabkan oleh perbedaan jumlah salinan amplifikasi yang dipengaruhi oleh keberadaan pengulangan sekuens tertentu dalam genom. Menurut Poerba & Martanti (2008), jumlah dan intensitas pita DNA yang dihasilkan sangat tergantung pada kemampuan primer mengenali urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA yang digunakan. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi DNA templat. DNA templat yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup. Sementara itu, menurut Gusmiaty et al. (2012), perbedaan DNA hasil amplifikasi disebabkan adanya persebaran lokasi basa nukleotida di dalam genom yang menjadi tempat atau situs penempelan primer. Jarak antar situs amplifikasi ini menghasilkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran pasang basa.

Selain faktor yang telah dijelaskan di atas, keberhasilan proses PCR juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yaitu kondisi deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), oligonukleotida primer, DNA template (cetakan), komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi (Yuwono, 2006). Faktor lain yang diduga sebagai penyebab produk amplifikasi tidak baik yaitu efisiensi reaksi amplifikasi dengan teknik PCR tidak akan meningkat dengan meningkatnya jumlah siklus amplifikasi, karena tingginya siklus amplifikasi dapat menyebabkan

terjadinya inaktivasi enzim DNA polimerase, degradasi dNTPs ataupun akumulasi hasil PCR yang nonspesifik. Pertimbangan faktor lain yang berperan penting dalam optimalisasi PCR adalah pengaturan temperatur pada penempelan primer dan waktu dari masing-masing reaksi. Sementara itu menurut Christianti et al. (2003), hasil PCR yang baik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian hasil ekstraksi DNA, ketepatan pemilihan primer yang digunakan serta ketepatan kondisi PCR. Apabila konsentrasi DNA terlalu rendah akan menghasilkan fragmen sebagai pita yang sangat tipis pada gel atau bahkan pita tidak terlihat secara visual. Sebaliknya, konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu pita dengan pita lainnya (Haris et al., 2003). Primer merupakan bagian penting dalam reaksi PCR karena primer merupakan inisiator pada sintesis DNA target. Primer yang digunakan pada penelitian ini telah memenuhi syarat dalam seleksi primer seperti terdiri atas 20 basa dan memiliki kandungan G/C sebesar 50%.

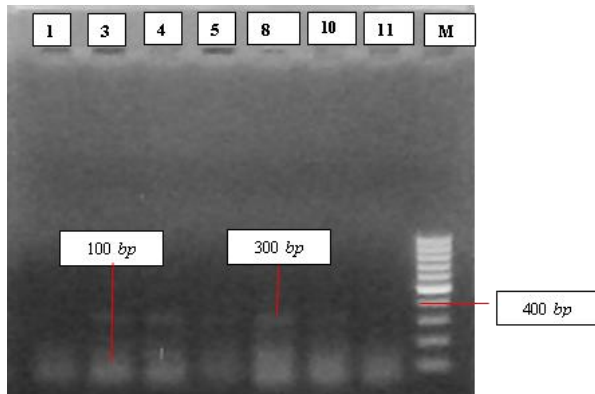
#### **Profil Marka PCR-RFLP Benih Ikan Mati Pada Rentang Waktu Berbeda**

Pemotongan produk PCR menggunakan lima enzim restriksi diperoleh satu enzim yang menghasilkan pola marka RFLP yaitu *HinfI*. Setelah dilakukan pemotongan produk PCR menggunakan enzim *HinfI*, dua pita RFLP yang dihasilkan berukuran lebih kurang 300 pb dan 100 pb. Kedua fragmen RFLP tersebut muncul pada semua sampel ikan gurami soang meskipun mati pada rentang waktu berbeda. Pemotongan yang menghasilkan dua pita ini menunjukkan bahwa gen *MHC* Kelas II B mempunyai satu sisi pemotongan untuk enzim *HinfI*. Hasil pemotongan produk PCR menggunakan enzim *HinfI* dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Pola marka *HinfI* yang dihasilkan sama untuk semua individu, maka marka *HinfI* PCR-RFLP gen *MHC* kelas II B tidak dapat digunakan sebagai pembeda antara benih ikan yang mati pada waktu berbeda. Hal ini diduga karena semua benih ikan yang mati pascainfeksi bakteri *A. hydrophila* memiliki alel gen *MHC* kelas II B yang sama dan waktu kematian tidak terkait dengan variasi komponen genetik. Hal tersebut berbeda dengan penelitian Jakaria & Noor (2011) pada sapi Bali (*Bos javanicus*) yang menghasilkan alel heterozigot menggunakan gen *Pit-1* yang dipotong menggunakan enzim *HinfI*. Perbedaan tersebut terjadi karena spesies organisme bahkan classis organisme yang digunakan dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian Jakaria dan Noor (2011). Pada penelitian ini digunakan ikan gurami soang sedangkan pada penelitian



Jakaria dan Noor (2011) digunakan sapi. Menurut Kusbiyanto et al. (2016) setiap spesies diduga memiliki ukuran gen yang berbeda termasuk ukuran gen MHC. Hal ini didukung oleh penelitian Hayuningtyas et al. (2013), Aryanto et al. (2015), dan Supriyanto & Dharmawantho (2015) yang memperoleh ampikon gen MHC II yang berbeda dari spesies ikan berbeda.

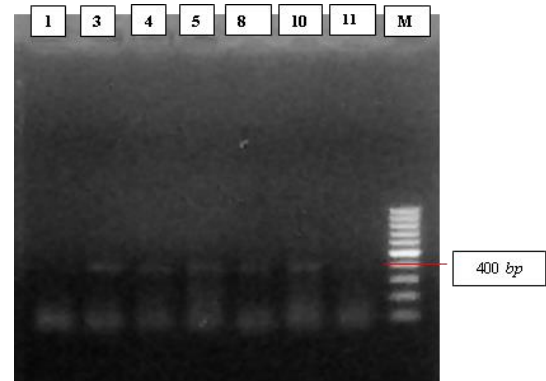


**Gambar 3. Hasil pemotongan produk PCR menggunakan Enzim *HindIII***

Keterangan :

1 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 3 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, dan M = DNA marka 100pb

Hasil pemotongan produk PCR menggunakan enzim *PstI* dapat dilihat pada Gambar 4. Penggunaan enzim *PstI* tidak menghasilkan marka spesifik sebagai pembeda strain ikan yang tahan terhadap *A. hydrophila* dan hanya menghasilkan pita dengan ukuran 400 pb. Kondisi ini terjadi diduga karena tidak situs spesifik yang dapat dikenali oleh enzim *PstI*. Menurut Santoso et al. (2008) enzim *PstI* memiliki situs pemotongan (restriksi) pada posisi 5'C-T-G-C-A↓G 3' atau 3 G↓A-C-G-T-C 5'. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian Azizah et al. (2015) pada ikan *Osphronemus gouramy* berbeda ukuran. Pada penelitian tersebut enzim *PstI* juga tidak dapat memotong gen sitokrom c oksidase 1 (CO1). Persamaan hasil tersebut diduga karena kedua gen yang digunakan dalam penelitian ini dan penelitian Azizah et al. (2015) sama-sama tidak memiliki situs restriksi untuk enzim *PstI*.

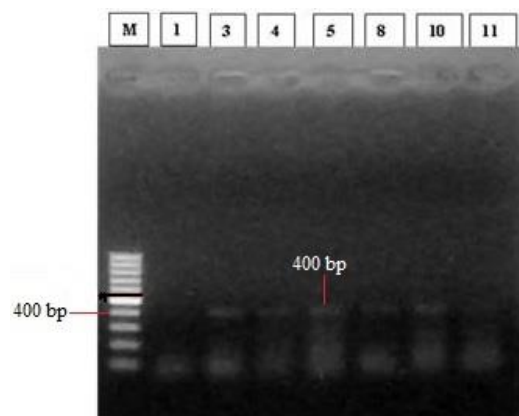


**Gambar 4. Hasil pemotongan produk PCR menggunakan Enzim *PstI***

Keterangan :

1 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 3 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, dan M = DNA marka 100 pb

Hasil pemotongan produk PCR menggunakan enzim *HindIII* dapat dilihat pada Gambar 5. Penggunaan enzim *HindIII* tidak menghasilkan marka spesifik sebagai pembeda strain ikan yang tahan terhadap *A. hydrophila* dan hanya menghasilkan pita dengan ukuran 400 pb. Enzim *HindIII* memiliki situs pemotongan (restriksi) 5'A↓A-G-C-T-T-3' atau 3'T-T-C-G-A↓A 5' (Brown, 1991). Tidak terpotongnya gen MHC IIB dari ikan gurami soang yang digunakan dalam penelitian ini diduga karena tidak ada situs spesifik yang dapat dikenali oleh gen *HindIII*. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Azizah et al. (2015) pada ikan *Osphronemus gouramy* soang berbeda ukuran. Perbedaan ini terjadi karena setiap gen urutan basa nukleotida yang berbeda sehingga situs restriksi yang dimiliki setiap gen berbeda meskipun diisolasi dari individu atau spesies yang sama.



**Gambar 5. Hasil pemotongan produk PCR menggunakan Enzim *HindIII***

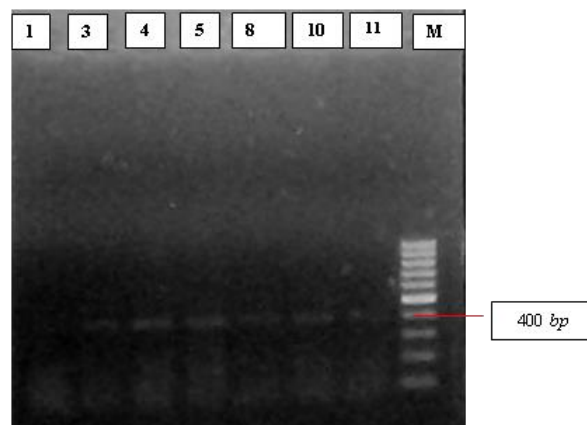
Keterangan :

1 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 3 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, dan M = DNA marka 100 pb

Hasil pemotongan produk PCR menggunakan enzim *Bam*HI dapat dilihat pada Gambar 6. Penggunaan enzim *Bam*HI tidak menghasilkan marka spesifik sebagai pembeda strain ikan yang tahan terhadap *A. hydrophila* dan hanya menghasilkan pita dengan ukuran 400 pb. Kondisi tersebut terjadi karena gen MHC IIB dari gurami soang tidak memiliki situs restriksi yang dikenali oleh enzim *Bam*HI. Menurut Ausubel (2003) enzim *Bam*HI akan mengenali situs restriksi dengan urutan basa nukleotida pada posisi 5' G↓G-A-T-C-C 3' atau 3'C-C-T-A-G↓G 5'. Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Azizah et al. (2015) pada ikan *Osphronemus gouramy* soang berbeda ukuran. Tidak terpotongnya produk PCR pada penelitian ini dan penelitian Azizah et al. (2015) diduga terjadi karena tidak terdapat situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI pada semua sampel.

Hasil pemotongan produk PCR menggunakan enzim *Eco*RI dapat dilihat pada Gambar 7. Penggunaan enzim *Eco*RI tidak menghasilkan marka spesifik sebagai pembeda strain ikan yang tahan terhadap *A. hydrophila* dan hanya menghasilkan pita dengan ukuran 400 pb. Kondisi tersebut diduga karena pada gen MHC IIB ikan gurami soang tidak terdapat situs restriksi yang dapat dikenali oleh gen *Eco*R1. Enzim *Eco*RI memiliki situs pemotongan (restriksi) pada posisi 5' G↓A-A-T-T-C 3' atau 3' C-T-T-A-A↓G 5' (Gholizadeh & Kohnehrrouz, 2009). Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Azizah et al. (2015) pada ikan *Osphronemus gouramy* soang berbeda ukuran. Persamaan hasil tersebut diduga gen MHC IIB dan CO1 pada ikan gurami soang tidak memiliki situs restriksi yang dapat dikenali oleh enzim *Eco*R1.

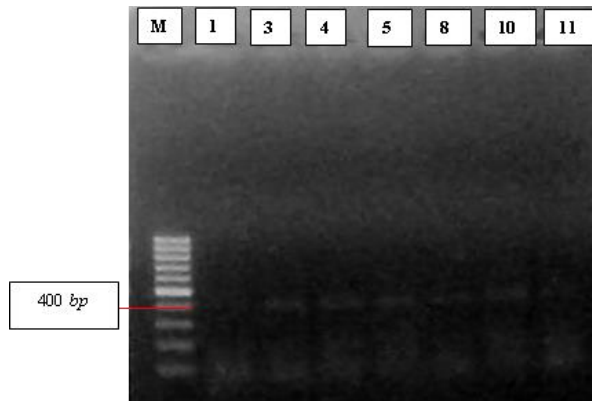
Keragaman genetik atau polimorfisme memiliki pengertian yaitu keberadaan dua atau lebih alel pada sebuah lokus dalam populasi. Keragaman genetik dapat diamati dengan pengamatan melalui karakter genetik dengan sifat yang diamati berupa DNA, yang sulit dipengaruhi lingkungan (Langga et al., 2012). Polimorfisme memiliki penilaian variasi genetik di alam yang terbaik dengan cara melihat nilai rata-rata heterozigositas yang teramati.



**Gambar 6. Hasil pemotongan produk PCR menggunakan Enzim *Bam* HI**

Keterangan : 1 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 3 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, dan M = DNA marka 100 bp)

Lokus dinyatakan polimorfik apabila memiliki variasi alel dalam suatu populasi, sedangkan apabila tidak memiliki variasi maka dinyatakan bersifat monomorfik. Individu yang memiliki alel sama pada suatu lokus dinyatakan memiliki genotip yang homozigot, sedangkan yang memiliki alel berbeda dinyatakan heterozigot. Suatu lokus dianggap polimorfik apabila frekuensi alel yang paling sering muncul yaitu sama atau kurang dari 0,99 (Hughes et al., 2008). Hasil penelitian ini tidak menunjukkan adanya polimorfisme gen *MHC* Kelas II B pada ikan gurami soang yang mati pada waktu berbeda. Pemotongan produk PCR menggunakan enzim *Hinf*I menghasilkan dua pita RFLP yang masing-masing berukuran lebih kurang 300 pb dan 100 pb. Kedua fragmen RFLP tersebut muncul pada semua sampel ikan gurami soang. Pemotongan yang menghasilkan dua pita ini menunjukkan bahwa gen *MHC* Kelas II B mempunyai satu sisi pemotongan untuk enzim *Hinf*I. Sedangkan pemotongan menggunakan enzim restriksi *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, dan *Eco*RI tidak menunjukkan variasi individu jika dipotong atau dengan kata lain dalam keadaan monomorfisme, memiliki alel serupa (homozigot) sehingga nilai heterozigositasnya 0 (nol). Oleh karena nilai heterozigositas yang diperoleh 0 (nol), sehingga tidak perlu dianalisis lebih lanjut mengenai polimorfisme, frekuensi alel dan kekayaan alel menggunakan *software Arlequin*.



**Gambar 7. Hasil pemotongan produk PCR menggunakan Enzim Eco RI**

Keterangan :

1 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kesatu, 3 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari ketiga, 4 & 10 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari keempat, 5 & 11 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kelima, 8 = sampel ikan gurami soang yang mati pada hari kedua, dan M = DNA marka 100 bp)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, karakterisasi genetik ikan gurami soang dengan waktu kematian berbeda dalam satu pemijahan menggunakan PCR-RFLP gen *MHC* Kelas II B tidak menunjukkan adanya variasi pada level molekuler. Oleh karena itu, gen *MHC* Kelas II B dalam penelitian ini dapat dikatakan tidak dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan ikan gurami soang dengan waktu kematian berbeda. Variasi waktu kematian tersebut dimungkinkan terjadi bukan disebabkan oleh faktor genetik gen *MHC* Kelas II B, meskipun memiliki peran yang vital dalam pertahanan. Diduga masih terdapat beberapa faktor lain yang mengatur laju ekspresi gen tersebut. Hal ini dijelaskan lebih lanjut oleh Christianti et al. (2003) yang menyatakan bahwa variasi dapat terjadi karena adanya variasi genetik atau variasi lingkungan atau karena keduanya, yaitu variasi genetik dan lingkungan. Populasi dengan keragaman genetik yang tinggi memiliki peluang hidup yang lebih baik karena setiap gen memiliki respon yang berbeda-beda terhadap kondisi lingkungan, sehingga keragaman genetik yang tinggi di dalam populasi ikan dapat terlindung dari gangguan lingkungan (Hartl & Jones, 1998).

### Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh yaitu penggunaan enzim Hinf1, Pst1, HindIII dan EcoR1 tidak dapat menghasilkan marka genetik PCR-RFLP Gen *MHC* Kelas II B dapat digunakan sebagai marka molekuler pada populasi ikan

gurami soang yang mati pada waktu berbeda pasca infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Perlu membandingkan antara sampel ikan yang masih hidup dan mati pasca infeksi bakteri *A. hydrophila* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan genetik antara ikan yang resisten dan tidak resisten terhadap serangan bakteri tersebut serta menggunakan enzim restriksi yang berbeda.

### Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kemertian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini. Peneliti juga menyampaikan terimakasih kepada Ketua LPPM Unsoed dan Dekan Fakultas Biologi Unsoed yang telah memfasilitasi selama penelitian berlangsung. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Anggi Pratama, S.Si. dan Untung yang telah banyak membantu selama pelaksanaan penelitian.

### Daftar Referensi

- Aryanto D, Hayuningtyas EP, Syahputra K. 2015. Hubungan antara keberadaan gen Major histocompatibility complex class II (*MHC-II*) ketahanan terhadap penyakit, dan pertumbuhan pada populasi ikan mas Ras Rajadanu. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10 (4): 461 – 469.
- Austin, B. & Austin, D. 2007. *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish*. Fourth Edition. Springer
- Ausubel, F.M., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology Tabs*. 19th ed. Canada: John Willey & Sons.
- Azizah, S. N., A. Nuryanto, & H. Pramono. 2015. Karakterisasi Molekuler Ikan Gurami Soang (*Osphronemus goramy* Lac.) berbeda ukuran menggunakan Pcr-Rflp Gen Sitokrom C Oksidase 1. *Biosfera* 32 (3), pp. 185-193.
- Baratawidjaja, K. G. 1991. *Imunologi Dasar, Edisi 2*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Brown, T.A., 1991. Pengantar Kloning Gen. Translated by A.M. Sumiati & Praseno. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica.
- Campbell, R., Urry, Cain, Wasserman, Minorsky, & Jackson. 2009. *Biology 8<sup>th</sup> Edition*. Benjamin Cummings. San Fransisco.
- Christianti, T., Sutarno & Etikawati, N. 2003. Identifikasi Polimorfisme pada Fragmen D-Loop DNA Mitokondria Sapi Benggala. *BioSMART*, 5(2), pp.73-77.
- Cuesta, A. J., Meseguer, & Esteban, M.A. 2007. Cloning and regulation of the major histocompatibility class I alpha gene in the



- teleost fish gillhead seabream. *Fish Shellfish Immunol*, 22, pp.718-726.
- Gholizadeh, A. & Kohnehrouz, B.B., 2009. Carborundum-Dependent Entrance of EcoRI Restriction Enzyme into Plant Cell and Specific of Genomic DNA. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47, pp.684-689
- Gusmiaty, Restu, M. & Pongtuluran. 2012. Seleksi Primer untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Bitti (*Vitex coffassus*). *Jurnal Perennial*, 8(1), pp.25-29.
- Haris, N., Aswidinoo, H., Nurita, T. M. & Purwantara, A. 2003. *Jurnal Menara Perkebunan*, 71(1), pp.1-15.
- Hartl, D.L. & Jones, E.W. 1998. *Genetics: principles and analysis*. 4th ed. United States of America: Jones and Bartlett Publishers. Inc.
- Hayuningtyas, Didik, A., & Khairul, S. 2013. Hubungan Antara Pertumbuhan Dengan Keberadaan Gen Tahan Penyakit Major Histocompatibility Complex (MHC) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Balai Penelitian Pemuliaan Ikan. *J. Ris. Akuakultur*, 8(3), pp.383-391.
- Hernawati & Gede, S. 2007. Penggunaan Sistem Resirkulasi Dalam Pendederan Benih Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*, Lac). *DiSainTek*, 1(1), pp.1-14.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N. & Vellend, M., 2008. Ecological Consequences of Genetic Diversity. *Ecology Letters*, 11(6), pp.609-623.
- Jakaria & R. R. Noor. 2011. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism at *Hinf-1* Enzyme Restriction Site of *Pit-1* Gene on Indonesian Bali Cattle Population. *Media Peternakan*, 38(2), pp.104-109.
- Kusbiyanto, A. Nuryanto, & P.H.T. Soedibja. 2016. Deteksi gen *major histocompatibility complex class II* pada yuwana gurami soang, *Osphronemus goramy* Lacepede, 1801 asal satu pemijahan. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 16 (3) *in pres*.
- Langga, I. F., Restu, M. & Kuswinanti, T. 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex cofassus Reinw*) serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR. *Jurnal Sains & Teknologi*, 12(3), pp.265-276.
- Nugroho, E. 2011. Evaluasi variasi genetik ras-ras ikan gurami dengan menggunakan marker DNA. *Jurnal Perikanan*, 8(2), pp.86-90.
- Nuryanto, A. & Kochzius, M., 2009. Highly Restricted Gene Flow and Deep Evolutionary Lineages in the Giant Clam *Tridacna maxima*. *Coral Reef*, 28, pp.607-619.
- Nuryanto, A., Wijayanti, G. E., Susilo, U., Darsono & Suharno., 2012. *Peningkatan Produksi Gurami Banyumas Melalui Pendekatan Genetik, Reproduksi, Manajemen Pemeliharaan dan Evaluasi Aspek Sosioekonomi*. Laporan Penelitian. Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman Fakultas Biologi.
- Pang, J. C., Feng-ying, G., Mai-xin, L., Xing, Y., Hua-ping, Z., & Xiao-li, K. 2013. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Genomic structure, molecular polymorphism and expression patterns. *Fish and Shellfish Immunology*, 34, pp.486-496
- Poerba, Y. S. & Martanti, D. 2008. Keragaman Genetik Berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA pada *Amorphopallus muelleri* Blume di Jawa. *Jurnal Biodiversitas*, 9(4), pp.245-249.
- Purwanti, D., Yuwanta, T., Hartatik, T., & Ismoyowati. 2013. Morphology and genetik diversity of mitochondrial dna d-loop region using PCR-RFLP analysis in magelang duck and other native duck. *J.Indonesian Trop.Anim.Agric*, 38(1), pp.1-9.
- Santoso, T.J., Hidayat, S., Herman, M., Aswidinoo, H., & Sudarsono., 2008. Identitas dan Keragaman Genetik Begomovirus yang Berasosiasi dengan Penyakit Keriting pada Tomat Berdasarkan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). *Jurnal AgroBiogen*, 4(1), pp.9-17.
- Sembiring, S.B.M., Tridjoko & Haryanti. 2013. Keragaman genetik ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) generasi f1 dan f3. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 5(1), pp.103-111.
- Setijaningsih L, Arifin OZ, Gustiano R. 2007. Karakterisasi tiga ras ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) berdasarkan metode truss morfometriks. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 7(1): 23-30
- Subowo. 1993. *Imunologi Klinik*. Angkasa. Bandung.
- Sucipto, C.D. 2011. *Vektor Penyakit Tropis*. Gosityen Publishing. Yogyakarta.
- Supriyanto, Dharmawantho L. 2015. Deteksi gen *major histocompatibility complex (MHC)* pada beberapa Ras ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dengan menggunakan metode polymerase chain reaction (PCR). *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 13 (1): 33-37.

- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E. & Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers *In* applications of RAPD technology to plant breeding, Symposium Proceedings. 1992. Crop Science Society of America, Madison, WI.
- Wegner, K. M., Kalbe, M., Rauch, G., Kurtz, J., Schaschl, H., & Reusch, B.H. 2006. Genetic variation in *MHC* class II expression and interactions with *MHC* sequence polymorphism in three-spined sticklebacks. *Molecular Ecology*, 15, pp.1153–1164.
- Welcomme, R. L. 1988. International introductions of inland aquatic species. *FAO Fisheries Technical Paper*, 294, pp.212-214
- Yu HB, Rao PSS, Lee HC, Vilches S, Merino S, Tomas JM, Leung KY. 2004. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and Immunity* 72 (3): 1248-1256
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction: Panduan Eksperimen PCR untuk Memecahkan Masalah Biologi Terkini*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Zhao, Y., Gentekaki, E., Yi, Z. & Lin, X. 2013. Genetic differentiation of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit gene in genus *Paramecium* (Protista, Ciliophora). *Plos One*, 8(10), pp.1-8.