

BARCODING IKAN BELIDA (*Chitala lopis*) BERDASARKAN GEN CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT I (COI) DNA MITOKONDRIA

BP-07

Arif Wibowo

Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum, Mariana
e-mail: wibowo@kkp.go.id

Abstrak

Informasi genetik sangat bermanfaat bagi manajemen perikanan berkelanjutan, terutama untuk ikan langka yang populasinya menurun drastis seperti ikan belida. Barkoding atau penanda genetik spesifik ikan tidak hanya memberikan manfaat terkait dengan identifikasi taksonomi dan asal lokasi ikan namun juga karakterisasi ragam genetik yang diperlukan dalam upaya konservasi dan domestikasi. Penelitian ini dilakukan menggunakan penanda genetik (COI) bertujuan untuk mengidentifikasi spesies *Chitala lopis* dan menggambarkan variasi genetik dari populasi *C. lopis* di sungai yang berbeda di Indonesia. Penelitian dilakukan tahun 2006-2009 di Sungai Kampar, Riau; Sungai Indragiri Hilir, Riau; Sungai Mahakam, Kalimantan Timur; Sungai Musi, Sumatera Selatan dan Sungai Penyak, Bangka. Contoh diambil secara acak, jaringan otot ikan belida dari masing-masing spesimen dikoleksi dan diekstraksi menggunakan "Geneaid DNA ekstraksi kit". Bagian gen mtDNA yang digunakan adalah gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI). Analisis penanda genetik, keragaman genetik dan hubungan kekerabatan ikan belida dalam famili Notopteridae berdasarkan runutan 602 nukleotida dari 12 sekuen dua arah ikan belida dan 7 sekuen pembandingan dari *Genbank* menggunakan program MEGA versi 4.0 dengan metode bootstrapped Neighbor Joining dengan 1000 kali pengulangan. Hasil penelitian menunjukkan Gen COI mtDNA mampu dijadikan sebagai penanda genetik untuk mengidentifikasi ikan belida, sampel diklasifikasikan sebagai ikan belida jika memiliki intraspesifik variasi kurang dari 3%. Untuk *C. lopis* yang berasal dari Indonesia secara spesifik memiliki penanda genetik *Guanin* (G) pada posisi basa nukleotida ke-6176 dalam untai lengkap mtDNA. Paling tidak ada 13 situs bervariasi pada kelompok ikan belida berdasarkan gen COI mtDNA.

Kata kunci: barkoding, belida, COI, mtDNA

Pengantar

Informasi genetik sangat bermanfaat bagi manajemen perikanan berkelanjutan, terutama untuk ikan langka yang populasinya menurun drastis seperti ikan belida (*C. lopis*). Barkoding atau penanda genetik spesifik ikan tidak hanya memberikan manfaat terkait dengan identifikasi taksonomi dan asal lokasi ikan namun juga karakterisasi ragam genetik yang diperlukan dalam upaya konservasi dan domestikasi.

Bagian DNA yang umum digunakan sebagai barcoding adalah gen *cCytochrome Oxidase Subunit I* (COI) (Hebert *et al.*, 2003) bagian dari gen-gen yang ada dalam DNA mitokondria. DNA mitokondria (mtDNA) banyak digunakan sebagai barcode untuk mengidentifikasi spesies, keragaman genetik dan dinamika populasi karena memiliki beberapa kelebihan. Pertama, karena mtDNA memiliki ukuran yang kompak dan relatif kecil (16.000-20.000 pasang basa), tidak sekompleks DNA inti sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh. Kedua, mtDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti sehingga dapat memperlihatkan dengan jelas perbedaan antara populasi dan hubungan kekerabatannya. Ketiga, hanya sel telur yang menyumbang material mitokondria sehingga mtDNA hanya diturunkan dari induk betina. Keempat, bagian-bagian dari genom mitokondria berevolusi dengan laju yang berbeda sehingga dapat berguna untuk studi sistematika dan penelusuran asal muasal ikan (Iguchi *et al.*, 1999). Sebagai gambaran, pada akhir tahun 1990an lebih dari 80% studi phylogeographic menggunakan mtDNA sebagai penanda genetik (Avice, 1998).

Identifikasi spesies adalah prasyarat untuk setiap penelitian biologis yang bermakna. Identifikasi fase dewasa, terutama spesies ikan komersial penting, biasanya tidak menjadi masalah, meskipun spesies samar (*cryptic species*) sering diungkapkan oleh penelitian genetik (Knowlton, 2000). Namun, morfologi identifikasi dari telur dan tahap larva ikan dapat sangat bermasalah dan dalam banyak kasus bahkan

tidak mungkin dilakukan. Metode mikroskop klasik memerlukan tingkat keahlian taksonomi yang tinggi, yang saat ini seringkali tidak berhasil, dan sangat memakan waktu dalam identifikasi telur dan larva ikan. Oleh karena itu, identifikasi spesies adalah hambatan utama, menjadi penghambat dalam nilai pentingnya pemantauan keanekaragaman hayati. Sebuah solusi untuk masalah ini adalah penerapan identifikasi berbasis DNA metode. Metode DNA adalah alat identifikasi yang sangat dipercaya dengan akurasi belum pernah ada sebelumnya karena mereka memiliki resolusi yang tertinggi, yang mencapai perubahan sampai pada tingkat perubahan basa tunggal dalam keseluruhan genom. Jumlah cetakan/kuantitas sel dari telur atau larva yang sedikit dapat diamplifikasi dengan teknik PCR.

Sejalan dengan keprihatinan global yang terus meningkat terkait dengan hilangnya keanekaragaman hayati dan upaya untuk melindungi keanekaragaman hayati maka diperlukan langkah-langkah untuk mengatur pemanfaatan keanekaragaman hayati dan merencanakan strategi konservasi untuk spesies yang jumlahnya di alam telah menurun. Kebijakan untuk melindungi spesies memerlukan masukan ilmiah pada struktur genetik dari spesies asli. Penanda molekuler telah terbukti jauh lebih unggul dibandingkan pendekatan konvensional (Wilson *et al.*, 2004). Data variasi genetik dapat memberikan masukan penting untuk merencanakan secara efektif strategi konservasi dan rehabilitasi populasi alami. Penelitian ini dilakukan menggunakan penanda genetik (COI) bertujuan untuk mengidentifikasi spesies *C. lopis* dan menggambarkan variasi genetik dari populasi *C. lopis* di sungai yang berbeda di Indonesia.

Bahan dan Metode

Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel jaringan ikan belida diawetkan dengan alkohol absolut, selanjutnya sampel tersebut dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi dan purifikasi DNA totalnya. Jumlah total sampel yang dikoleksi sebanyak 12 sampel, yang dikoleksi dalam kurun waktu tahun 2006-2009 dari Sungai Kampar, Riau (4 ekor) (2 sampel berukuran besar 30 kg/per ekor dan 6 kg, berwarna putih kemerahan dengan bintik hitam dan pola merah pada bagian ekor (belida totol) dan warna tubuh kehitaman dengan bentuk kepala agak kecil pada belida ukuran 6 kg, ditangkap pada sungai utama berair hitam), Sungai Indragiri Hilir, Riau (3 ekor), Sungai Mahakam, Kalimantan Timur (3 ekor), Sungai Musi, Sumatera Selatan (1) dan Sungai Penyak, Bangka (1 ekor). Sebagai pembanding digunakan 7 runtutan nukleotida yang diperoleh dari *Genebank* yang merupakan famili Notophteridae. Isolasi, ekstraksi, purifikasi, amplifikasi dan visualisasi DNA dilakukan pada tahun 2011 di laboratorium Molekuler Ekologi, Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum (BP3U), Palembang dan peruntukan DNA dilakukan oleh *Macrogen Corporation* di Korea Selatan.

Isolasi, Ekstraksi dan Purifikasi DNA Total

Ekstraksi DNA menggunakan *Genomic DNA mini kit for blood (Geneaid)* yang dimodifikasi. Bagian yang dimodifikasi adalah dalam penghancuran jaringan, penambahan SDS dan Proteinase K (Muladno, 2006). Sel-sel jaringan ikan belida yang disimpan dalam alkohol absolut dicuci dengan air destilata (*molecular grade*) sebanyak dua kali kemudian disuspensikan dalam bufer STE (NaCl 1M, Tris-HCL 10mM, EDTA 0.1mM, pH 8) hingga volume 350 μ l. Sel-sel jaringan dilisis (dipecah/dikeluarkan) dengan SDS 1% dan proteinase K 0.125 mg/ml pada suhu 55^oC selama semalam sambil dikocok perlahan dalam *rotary*. Metode ekstraksi DNA selanjutnya mengikuti petunjuk *Genomic DNA mini kit for fresh blood (Geneaid)* (Petunjuk perusahaan). Sampel DNA yang didapat, disimpan pada suhu 4^oC.

Amplifikasi dan Visualisasi Fragmen mtDNA

Amplifikasi sebagian fragmen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* mtDNA menggunakan primer universal Ivanova *et al.* (2009) COI F (5' – TCT ACC AAC CAC AAA GAC ATC GG 3') dan COI R (5' – TAC TTC TGG GTG TCC RAA GAA TCA 3'). Komposisi reaksi PCR dilakukan dengan volume akhir 50 μ l terdiri atas sampel DNA 5 μ l, DW steril 16 μ l, primer masing-masing 2 μ l dan *Taq ready mix* 25 μ l. Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin *PCR-Applied Biosystems* dengan kondisi sebagai berikut: tahap pradenaturasi 95^oC selama 10 menit, tahap kedua yang terdiri dari 30 siklus yang masing-masing mencakup tahap denaturasi 94^oC selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 48^oC selama 1 menit, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72^oC selama 1,5 menit dan tahap terakhir yaitu pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72^oC selama 7 menit. Produk PCR diuji menggunakan PAGE 6% dalam bufer 1x TBE (10 Mm Tris-HCL, 1 M asam borat, dan EDTA 0.1 Mm) yang dijalankan pada kondisi 200 Mv selama 50 menit. Selanjutnya DNA diwarnai dengan pewarnaan sensitif perak

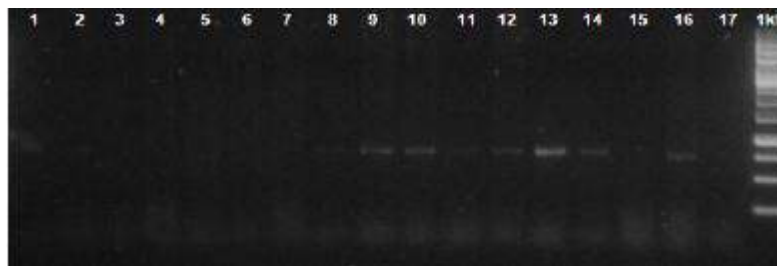
(Tegelstrom, 1986). Perunutan sampel DNA dilakukan pada dua arah (*forward* dan *reverse*) dan di kerjakan di perunutan DNA dilakukan oleh *Macrogen Corporation* di Korea Selatan.

Analisis Data Keragaman Genetik

Sisi homolog dari runutan-runutan basa nukleotida gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* DNA mitokondria ikan belida yang diperoleh, kemudian disejajarkan (*multiple alignment*) yang dibandingkan dengan runutan-runutan gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* suku *Notophteridae* dari *Genbank*. Sekuen chromatograms ditampilkan dan diedit secara manual menggunakan BIOEDIT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Setelah proses editing, dilakukan *multiple alignment* menggunakan CLUSTAL X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). Analisis hubungan kekerabatan dan jarak genetik runutan nukleotida, dilakukan dengan Kimura 2 Parameter menggunakan program MEGA versi 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) dengan metode *Bootstrapped Neighbor Joining* dengan 1.000 kali pengulangan.

Hasil dan Pembahasan

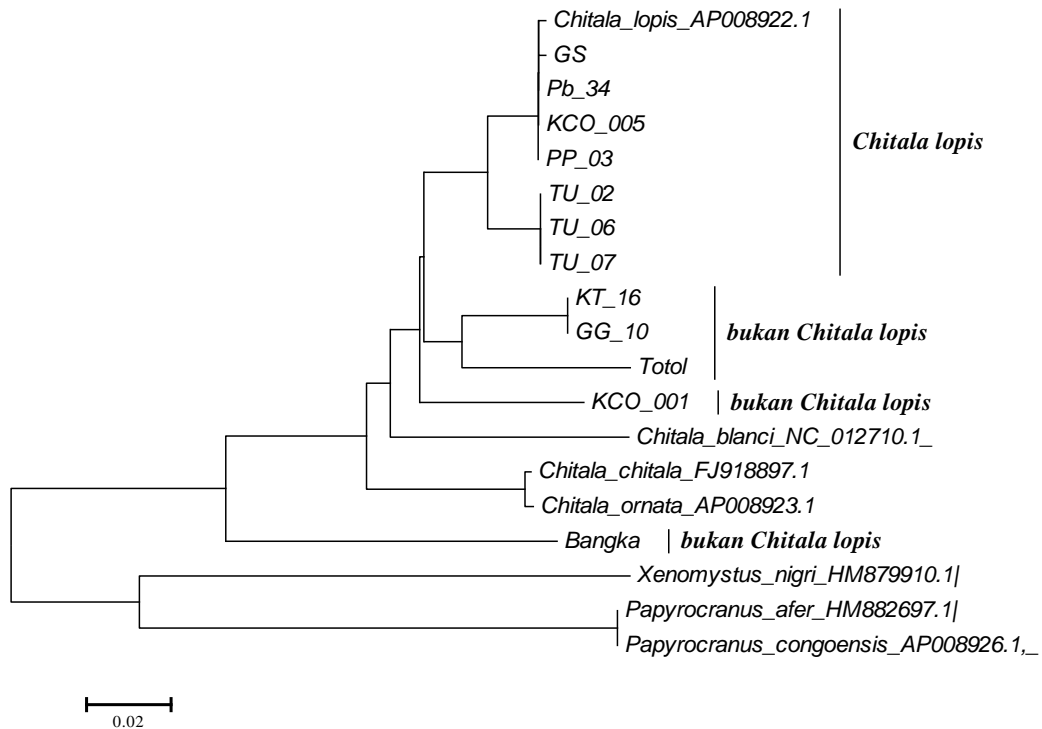
DNA total telah diisolasi dari cuplikan otot semua sampel, hasil isolasi DNA total ikan selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk amplikasi gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)* DNA mitokondria dengan teknik PCR. Amplikasi gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* menghasilkan fragmen gen COI berukuran antara 600 – 716 pb pada posisi 5521 - 6244 pb urutan sekuens lengkap mtDNA berdasarkan acuan *Genbank*. Profil DNA hasil amplikasi disajikan pada Gambar 1 dan runutan sekuens yang dihasilkan terlihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Profil DNA ikan belida hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer COI F dan COI R.

berdasarkan nukleotida gen COI memperlihatkan bahwa 7 sampel koleksi (58,33% dari keseluruhan sampel yang diidentifikasi secara morfologi sebagai *C. lopis*) secara jelas bisa dikonfirmasi dengan penanda molekuler pada tingkat spesies ikan berdasarkan pedoman Herbert *et al.* (2003) pada batas maksimum intraspesifik variasi 3%, Gambar 4. Sementara 5 sampel ikan belida berdasarkan identifikasi morfologi tidak dapat diklasifikasikan dalam tingkat spesies *C. lopis* berdasarkan pendekatan sekuens COI mtDNA karena memiliki intraspesifik variasi lebih dari 3% Gambar 4.

Kerancuan taksonomi pada ikan belida di Indonesia (Kottelat & Widjanarti, 2006) dan keberadaan spesies kriptik dalam kelompok ikan belida (Wibowo, 2011) mengindikasikan adanya variasi genetik yang besar pada sampel sehingga tidak bisa digabungkan atau dikelompokkan pada kelompok *C. lopis*. *Phylogroup* yang sangat berbeda sebagai contoh panjang cabang yang mengindikasikan jumlah substitusi persitus lebih dari 5% sekuens berbeda bisa merefleksikan spesies kriptik (Barber *et al.*, 2002).



Gambar 3. Filogram *neighbour joining* Kimura 2 parameter (panjang cabang mengindikasikan jumlah substitusi persitus) sampel ikan koleksi dan referen spesiesnya.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	<i>Chitala blanci_NC</i>																		
2	<i>Chitala chitala_FJ</i>	0,105																	
3	<i>Chitala ornata_AP</i>	0,106	0,003																
4	Bangka	0,179	0,166	0,171															
5	Totol	0,112	0,104	0,104	0,193														
6	<i>Chitala lopis_AP</i>	0,093	0,081	0,081	0,150	0,076													
7	KCO_001	0,095	0,097	0,097	0,164	0,101	0,067												
8	KT_16	0,093	0,079	0,080	0,155	0,065	0,067	0,065											
9	GG_10	0,093	0,079	0,080	0,155	0,065	0,067	0,065	0,000										
10	TU_02	0,096	0,079	0,079	0,148	0,074	0,026	0,069	0,061	0,061									
11	TU_06	0,096	0,079	0,079	0,148	0,074	0,026	0,069	0,061	0,061	0,000								
12	TU_07	0,096	0,079	0,079	0,148	0,074	0,026	0,069	0,061	0,061	0,000	0,000							
13	Pb_34	0,091	0,079	0,079	0,148	0,074	0,002	0,065	0,065	0,065	0,024	0,024	0,024						
14	GS	0,093	0,081	0,081	0,150	0,076	0,003	0,067	0,067	0,067	0,026	0,026	0,026	0,002					
15	KCO_005	0,091	0,079	0,079	0,148	0,074	0,002	0,065	0,065	0,065	0,024	0,024	0,024	0,000	0,002				
16	PP_03	0,091	0,079	0,079	0,148	0,074	0,002	0,065	0,065	0,065	0,024	0,024	0,024	0,000	0,002	0,000			
17	<i>Papyrocranus afer_HM</i>	0,264	0,235	0,240	0,279	0,280	0,279	0,286	0,283	0,283	0,269	0,269	0,269	0,276	0,279	0,276	0,276		
18	<i>Papyrocranus congoensis_AP</i>	0,264	0,235	0,240	0,279	0,280	0,279	0,286	0,283	0,283	0,269	0,269	0,269	0,276	0,279	0,276	0,276	0,000	
19	<i>Xenomystus nigri_HM</i>	0,290	0,263	0,262	0,269	0,299	0,269	0,303	0,269	0,269	0,279	0,279	0,279	0,266	0,266	0,266	0,266	0,229	0,229

Gambar 4. Jarak genetik atau variasi intraspesifik ikan belida sampel dan referen spesiesnya dari *Genbank Kimura 2 Parameter* (warna merah mengindikasikan variasi intraspesifik yang kurang dari 3%).

Dari 602 nukleotida gen COI *C. lopis* yang dibandingkan dengan data *GenBank*, beberapa basa nukleotida dapat dijadikan penanda genetik untuk membedakan *C. lopis* Indonesia dengan ikan belida dari luar Indonesia dan sampel ikan belida diantara sungai-sungai di Indonesia (Tabel 1). Untuk *C. lopis* yang berasal dari Indonesia secara spesifik memiliki penanda genetik *Guanin* (G) pada posisi basa nukleotida ke-6176 dari urutan untai lengkap mtDNA. Paling tidak ada 13 situs bervariasi pada kelompok ikan belida berdasarkan gen COI mtDNA.

Tabel 1. Basa nukleotida spesifik ikan belida dibandingkan antara kelompok spesies ikan belida asal Indonesia dengan referensi *Genbank*, memperlihatkan perbedaan urutan nukleotida diantara sampel yang berasal dari regional yang berbeda.

Jenis	Basa nukleotida													
	5630	5647	5668	5716	5719	5763	5753	5806	5809	5839	5972	6061	6169	6176
<i>Chitala lopis</i> _AP008922.1 (GB)	T	G	C	A	A	T	C	T	G	G	G	C	T	A
TU_02 (Specimen Mahakam)	C	A	T	G	A	C	T	C	A	A	A	T	C	G
TU_06 (Specimen Mahakam)	C	A	T	G	A	C	T	C	A	A	A	T	C	G
TU_07 (Specimen Mahakam)	C	A	T	G	A	C	T	C	A	A	A	T	C	G
KCO_005 (Specimen Indragiri Hilir)	T	G	C	A	A	T	C	T	G	G	G	C	T	G
PP_03 (Specimen Indragiri Hilir)	T	G	C	A	A	T	C	T	G	G	G	C	T	G
GS (Specimen Kampar)	T	G	C	A	G	T	C	T	G	G	G	C	T	G
PB_34 (Specimen Musi)	T	G	C	A	A	T	C	T	G	G	G	C	T	G

Tabel ini juga memperlihatkan bahwa barcode mampu mengungkap adanya variasi genetik diantara spesies ikan belida baik dengan ikan belida di luar Indonesia maupun diantara sungai-sungai di Indonesia, walaupun menurut Kottelat *et al.* (1997) kelompok ikan belida memiliki beberapa spesies yang secara morfologi tidak dapat dibedakan. Mendefinisikan nama spesies dari suatu sekuens mungkin tidak bisa, namun mengetahui bahwa biodiversitas itu ada berdasarkan DNA itu adalah berharga (Barber & Boyle, 2006). Lebih jauh, memahami dimensi dan distribusi biodiversitas sangat penting dalam perspektif mengamati pola keragaman hayati regional (Connolly *et al.*, 2003).

Kesimpulan

Gen COI mtDNA mampu dijadikan sebagai penanda genetik untuk mengidentifikasi ikan belida, sampel diklasifikasikan sebagai ikan belida jika memiliki intraspesifik variasi kurang dari 3%. Untuk *C. lopis* yang berasal dari Indonesia secara spesifik memiliki penanda genetik *Guanin* (G) pada posisi basa nukleotida ke-6176 dari urutanantai lengkap mtDNA. Sementara paling tidak ada 13 situs bervariasi pada kelompok ikan belida berdasarkan gen COI mtDNA.

Daftar Pustaka

- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371–379.
- Barber, P. H., M. K. Moosa & S. R. Palumbi. 2002. Rapid recovery of genetic diversity of stomatopod populations on Krakatau: temporal and spatial scales of marine larval dispersal. *Proc. R. Soc. Series B, Biological sciences* 269: 1591–1597.
- Barber P & S. L. Boyce. 2006. Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 273: 2053–2061.
- Connolly, S. R., D. R. Bellwood & T. P. Hughes. 2003. Geographic ranges and species richness gradients: a reevaluation of coral reef biogeography. *Ecology* 84 : 2178–2190.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham & J. R. deWaard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B* 270, S96–S99.
- Ivanova N. V., T. S. Zemlak., R. H. Hanner & P. D. N. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544–548.
- Iguchi K., Y. Tanimura, H. Takeshima & M. Nishida. 1999. Genetic variation and geographic population structure of amphidromous Ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. *Fish Sci.* 65: 63-67.
- Knowlton, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73–90.
- Kottelat, M & E. Widjanarti. 2006. The fishes of danau sentarum national park and kapuas lake area, West Borneo. *The Raffles Bulletin Zoology Supplemental* 13: 139-173.
- Kottelat, M., S. N. Kartikasari., A.J. Whitten & S. Wirjoatmodjo. 1997. freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi. Ed. Dua bahasa. Periplus Editions Limited. Jakarta. 293 h
- Muladno. 2006. Aplikasi teknologi molekuler dalam upaya peningkatan produktivitas hewan. pelatihan teknik diagnostik molekuler untuk peningkatan produksi peternakan dan perikanan di kawasan timur Indonesia. Kerjasama Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat Institut Pertanian Bogor dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Depdiknas, Bogor. 36 h.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Tegelstrom H. 1986. Mitochondrial DNA in Natural Populations: an Improved Routine for the Screening of Genetic Variation Based on Sensitive Silver Staining. *Electrophoresis* 7: 226-229.

Thompson, J.D., T.J. Gibson., F. Plewniak., F. Jeanmougin and D.J Higgins. 1997. The clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Res*, 25(24): 4876-4882.

Wibowo, A. Kajian bioekologi dalam rangka menentukan arah pengelolaan ikan belida *C. lopis* Bleeker 1851) di Sungai Kampar Riau. Disertasi. Institut Pertanian Bogor.

Wilson, A.J., J.A. Hutchings & M.M. Ferguson. 2004. Dispersal in a stream dwelling salmonid: inferences from tagging and microsatellite studies. *Conserv Genet*, 5:25–37.

Tanya Jawab

Penanya : Hafrijal Syandri

Pertanyaan : Ikan perairan umum (ikan → genetik) supaya lebih diintensifkan karena selama ini penelitian sumberdaya genetik dilakukan di laut

Jawaban : Tahun-tahun yang akan datang akan dilakukan penelitian yang lebih intensif untuk perairan tawar, terkait dengan permintaan Direktorat Konservasi Ikan tentang Data Base Ikan Asli Indonesia dan ditetapkannya Palembang sebagai pusat perikanan air tawar sehingga akan mendorong penelitian perikanan air tawar.

