

DNA BARCODING IKAN PANTAI BARAT SUMATRA

BP - 07

Arif Wibowo* dan Siswanta Kaban

Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum, Mariana

*e-mail: wibowo@kcp.go.id

Abstrak

Ikan merupakan kelompok vertebrata yang sangat beragam yang menunjukkan perubahan fenotipik yang mendalam selama fase pengembangannya. Dalam konteks ini, identifikasi spesies ikan menjadi sesuatu yang menantang dan Identifikasi spesies yang akurat tetap penting untuk menyelidiki kondisi keanekaragaman hayati dan konservasi. Sampai saat ini, pendekatan taksonomi tradisional mengandalkan sebagian besar pada karakter diagnosik morfologi, memerlukan pengetahuan ahli untuk mengidentifikasi spesimen. Selain itu, pendekatan morfologi untuk tugas identifikasi spesies rutin memiliki keterbatasan yang nyata. Metode identifikasi spesies ikan yang didasarkan pada keragaman urutan dalam fragmen DNA tunggal sitokrom c oksidase subunit I (COI) pada mtDNA merupakan metode identifikasi ikan yang efektif dan akurat, metode ini di kenal dengan istilah DNA barcoding. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menginisiasi data base (*library/referensi COI*) spesies ikan air tawar pantai barat Sumatra berdasarkan DNA barcoding. Ikan air tawar memberikan kesempatan yang baik untuk menguji keakuratan analisis barcode berbasis delimitasi spesies dan identifikasi selama rentang geografis yang luas.. Penelitian ini telah menunjukkan DNA barcode efektif membedakan ikan air tawar dari pantai Barat Sumatera. DNA barcoding mampu mengidentifikasi spesimen juvenil ikan dari Sungai Bantal kedalam spesies *Kuhlia malo* dengan tingkat kemiripan sekuen 98.5%. Namun demikian secara keseluruhan identifikasi ikan menggunakan DNA barcoding hanya mampu mengidentifikasi ikan sampai tingkat spesies sebesar 16.67%. Dengan menggunakan metode ini jelas akan memungkinkan identifikasi ikan pada semua tahapan perkembangan, seperti telur ikan air tawar yang terisolasi, fillet larva dan sirip ikan.

Kata kunci: COI dan identifikasi ikan, molekular

Pengantar

Ikan merupakan kelompok organisme yang sangat beragam yang menunjukkan perubahan morfologi yang nyata selama proses pengembangan (larva, juvenile dan dewasa). Dalam konteks ini, mengidentifikasi spesies ikan bukanlah hal yang mudah namun identifikasi spesies yang akurat tetap menjadi sesuatu yang sangat penting untuk memahami keanekaragaman hayati dan konservasi.

Sampai saat ini, taksonomi tradisional mengandalkan sebagian besar pada karakter diagnosik morfologi sehingga diperlukan pengetahuan dari seorang ahli untuk mengidentifikasi spesimen ikan secara benar. Selain itu, menggunakan pendekatan morfologi untuk mengidentifikasi spesies ikan secara rutin, memiliki empat keterbatasan yang nyata. Pertama, baik plastisitas fenotipik ataupun variabilitas genetik yang terdapat dalam karakter morfologi yang digunakan untuk pengenalan spesies dapat menyebabkan kesalahan identifikasi spesies. Kedua, pendekatan morfologi tidak bisa mengidentifikasi spesies secara benar pada taksonomi yang samar (*cryptic species*) yang umum di banyak kelompok ikan (Jarman & Elliott, 2000). Ketiga, kunci morfologi sering kali efektif hanya untuk tahap kehidupan tertentu (dewasa) atau jenis kelamin sehingga tahap tertentu (larva ikan) tidak dapat diidentifikasi dengan benar (Frantinesilva *et al.*, 2015). Padahal identifikasi yang benar dari telur ikan dan larva sampai tingkat spesies sangat penting dalam upaya kita memahami waktu dan tempat pemijahan, distribusi dan sebaran dan rute migrasi dalam sejarah kehidupan awal mereka (Ko *et al.*, 2013).

Penggunaan kunci identifikasi morfologi seringkali menuntut tingkat keahlian yang khusus (tinggi) atau berpengalaman untuk dapat mengidentifikasi suatu spesies dan ada kecenderungan

penurunan jumlah ahli taksonomi dan pendanaan untuk taksonomi (Hopkins & Freckleton, 2002). Berangkat dari hal ini diperlukan pendekatan lain dalam mengidentifikasi spesies ikan.

Metode identifikasi spesies ikan yang didasarkan pada keragaman urutan dalam fragmen DNA tunggal sitokrom c oksidase subunit I (COI) pada mtDNA merupakan metode identifikasi ikan yang efektif dan akurat, metode ini di kenal dengan istilah DNA barcoding (Hebert *et al.*, 2003). DNA barcoding telah digunakan dalam banyak studi yang paling tidak menggambarkan kecepatan, kehandalan dan kepraktisannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menginisiasi data base (*library/referensi COI*) spesies ikan air tawar pantai barat Sumatra berdasarkan DNA barcoding. Ikan air tawar memberikan kesempatan yang baik untuk menguji keakuratan analisis barcode berbasis delimitasi spesies dan identifikasi selama rentang geografis yang luas.

Bahan dan Metode

Tempat dan waktu penelitian

Sejumlah 6 sampel ikan di koleksi dari perairan bagian barat pulau Sumatera tahun 2012. 4 sampel koleksi berasal dari Sungai Manna, Provinsi Bengkulu dengan rincian 3 specimen dari KutoPadang (S.04 28 128 / E.102 55 599) dan 1 sample dari Negri Kaya (S. 04 11 191 / E. 103 04 670), 1 sampel berasal dari Sungai Bantal (S.02 44 384 / E. 101 20 895) dan 1 sampel berasal dari perairan sekitar perairan Taman Nasional Bung Hatta, Sungai Lubuk Paraku, Sumatera Barat (S.00 56 873 / E. 100 30 392). Urutan nukleotida 501 COI mtDNA yang berasal dari 7 spesies ikan GenBank digunakan sebagai pembandingan yang memiliki hubungan kekerabatan paling dekat.

Proses ekstraksi DNA, amplifikasi dan elektroforesis sampel dilakukan di laboratorium Molekuler Ekologi, Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum (BP3U), Palembang. Sekuensing di lakukan di *First Base DNA sequencing service*, Singapura. Aliquots setiap sampel (10 mg / 1 x 1 cm jaringan) yang disimpan dalam alkohol absolut merupakan bahan utama untuk ekstraksi DNA dan purifikasi DNA mtDNA.

Ekstraksi dan purifikasi mtDNA

Ekstraksi DNA dan purifikasi DNA menggunakan *Genomic DNA mini kit for blood (Geneaid)* yang dimodifikasi. Jaringan yang disimpan dalam alkohol absolut dicuci menggunakan air destilata sebanyak dua kali, selanjutnya jaringan yang telah bersih dari alkohol disuspensikan dalam bufer STE (NaCl 1M, Tris-HCL 10mM, EDTA 0.1mM, pH 8) hingga volume 350µl. Jaringan dilisis dengan SDS 1% dan proteinase K 0,125 mg/ml pada suhu 55°C selama 24 jam menggunakan *rotary shaker* dalam inkubator. Setelah jaringan hancur seluruhnya, metode ekstraksi DNA selanjutnya mengikuti petunjuk *Genomic DNA mini kit for fresh blood (Geneaid)*.

Amplifikasi dan visualisasi fragmen mtDNA

Amplifikasi 501 fragmen awal gen COI mtDNA menggunakan primer Fish-COI-F (5'-ACT TCA AAC TTC CAY AAA GAY aty GG-3) and COI-Fish-R (5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCR AAR Aay CA-3 ') Ivanova *et al.* (2007). Komposisi larutan reaksi PCR dalam volume akhir 50 µl terdiri atas sampel DNA 5 µl, DW steril 16 µl, primer (COI-Fish-R dan Fish-COI-F) masing-masing sebanyak 2 µl dan *Kappa Taq ready mix* 25 µl. Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin *thermocycler Applied Biosystem* dengan kondisi sebagai berikut: tahap pradenaturasi 95°C selama 10 menit, tahap kedua, 35 siklus (denaturasi 94°C selama satu menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 48°C selama satu menit, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72 °C selama 1,5 menit) dan tahap terakhir yaitu pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72 °C selama 7 menit. Produk PCR divisualisasi 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 30 menit. Selanjutnya DNA diwarnai dengan pewarnaan sensitif perak nitrat (Tegelstörn, 1984).

Perunutan produk PCR

Produk PCR di atas gel poliakrilamid yang berukuran sesuai dengan desain primer dimurnikan dengan metode *agarose-gel-cutting* yang diikuti dengan *spin-coloumn DNA extraction from gel*.

Produk PCR yang sudah dimurnikan dijadikan cetakan dalam *PCR for sequencing* dengan menggunakan pasangan primer yang sama dengan ampilifikasi awal. Pekerjaan ini dilakukan di *First Base DNA Sequencing Service* Singapura.

Analisa data

Hasil perunutan nukleotida diedit secara manual berdasarkan kromatogram. Runutan nukleotida yang sudah diedit kemudian saling disejajarkan antara bagian *forward* dan *reverse* menggunakan Clustal W yang tertanam dalam MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura *et al.*, 2007).

Analisa filogeni

Analisis filogeni *Neighbour Joining (NJ)* dilakukan menggunakan MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), berdasarkan model substitusi nukleotida *Kimura-2-paramater* dengan bootstrap 10.000 kali.

Jarak genetik

Jarak genetik dianalisa berdasarkan rumus yang dikemukakan oleh Nei (1987), dilakukan menggunakan MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) yaitu :

$$D = -\ln I \quad \dots (1)$$

$$I = \frac{J_{ab}}{\sqrt{J_{ai}J_{bi}}} \quad \dots (2)$$

I = Haplotipe ke i

ai = Frekuensi haplotipe ke -i dari populasi A

bi = Frekuensi haplotipe ke -i dari populasi B

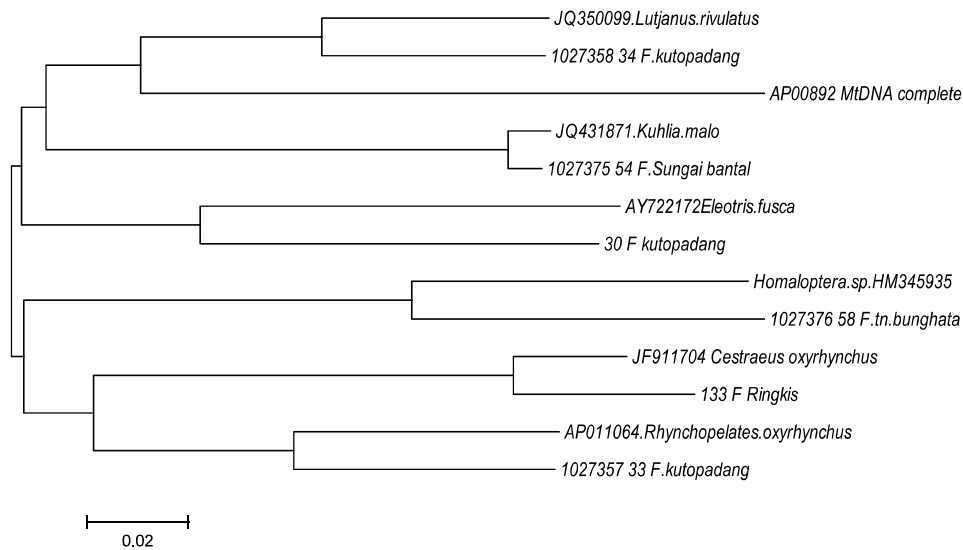
Ja_{bi} = Perkalian frekuensi haplotipe ke i dari populasi A dan frekuensi haplotipe ke-I pada populasi B

jb ja = rata-rata Ja, jb untuk semua haplotipe

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi ikan menggunakan biokimia, barcode DNA membuka perspektif baru dalam ekologi dan sistematika ikan. Metode ini didasarkan pada paling tidak 500 nukleotida pertama fragmen DNA tunggal mitokondria sitokrom c oksidase subunit I (COI) (Hebert *et al.*, 2003) untuk mengidentifikasi spesies ikan. Penggunaan teknik DNA sebagai pelengkap taksonomi yang berbasis morfologi untuk studi sistematis sangat penting dilakukan dan DNA barcode telah terbukti menjadi metode alternatif yang berguna untuk penilaian keanekaragaman hayati yang cepat global. Selain itu, DNA barcode menerjemahkan pengetahuan para ahli taksonomi ke dalam format yang dapat diakses secara luas walaupun bagi seseorang yang bukan taksonomis (Kerr *et al.*, 2007).

Pohon filogeni dari 9 famili ikan (*Lutjanidae*, *Kuhliidae*, *Balitoridae*, *Notopteridae*, *Eleotridae*, *Terapontidae*, *Lutjanidae*, *Kuhliidae* dan *Balitoridae*) dan 4 ordo (*Osteoglossiformes*, *Mugiliformes*, *Perciformes* dan *Cypriniformes*), Gambar 1, memperlihatkan bahwa organisme ikan (juvenile dan dewasa) membentuk kelompok berdasarkan kedekatan hubungan kekerabatan. Kesamaan sekuense antar famili ikan berkisar antara 70% sampai 80% atau jarak genetiknya antara 0,2–0,3, Tabel 1. Jarak genetik berarti antara individu sejenis lebih kecil daripada rata-rata jarak genetik antar individu dari spesies yang berbeda. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa diversifikasi spesies ini didorong oleh mutasi pada tingkat yang lebih tinggi dari spesiasi dalam garis keturunan. Oleh karena itu, panjang cabang antara spesies cenderung jauh lebih dalam daripada di antara individu-individu dalam satu spesies (Meyer & Paulay, 2005).



Gambar 1. Pohon filogeni dari DNA Barcoding ikan air tawar Pantai Barat Sumatera

DNA barcoding mampu mengidentifikasi spesimen juvenil ikan dari Sungai Bantal kedalam spesies *Kuhlia malo* dengan tingkat kemiripan sekuen 98,5%, Tabel 2. Spesimen dikategorikan dalam satu spesies jika memiliki kesamaan sekuen COI mtDNA minimal 97% (Hebert *et al.*, 2003). Hasil ini mendukung efektivitas barcode DNA untuk identifikasi intraspesifik dan interspesifik, perbedaan genetik antara spesies ikan air tawar, urutan barcode yang membedakan satu spesies ikan dengan spesies lain. Tingkat resolusi taksonomi dalam spesies yang dipelajari adalah Sebanding dengan hasil pada ikan air tawar lainnya (Ward *et al.*, 2005; Ardura *et al.*, 2010). Dengan menggunakan metode ini jelas akan memungkinkan identifikasi ikan pada semua tahapan perkembangan, seperti telur ikan air tawar yang terisolasi, fillet larva dan sirip ikan. Dari perspektif sistematis, COI barcode merupakan pendekatan baru dan cepat untuk mengidentifikasi spesies berdasarkan karakter diagnostik khusus dan menjadi cara yang produktif untuk katalog keanekaragaman hayati (Barber & Boyle, 2006).

Namun demikian secara keseluruhan identifikasi ikan menggunakan DNA barcoding hanya mampu mengidentifikasi ikan sampai tingkat spesies sebesar 16,67%. Hasil ini bukan karena kemampuan pendekatan ini rendah, tetapi lebih disebabkan oleh referen sekuen untuk ikan-ikan yang berasal dari Indonesia rendah. Terutama ikan-ikan yang memiliki nilai ekonomis yang rendah (Ko *et al.*, 2013).

Tabel 1. Jarak genetik antar sample koleksi yang diuji dengan referensinya dari GenBank berdasarkan gen COI DNA mitokondria menggunakan Model *pairwise distance*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	AP00892_MtDNA_complete											
2	JF911704_Cestreaeus_oxyrhynchus	0,274										
3	133_F_Ringkis	0,281	0,058									
4	AY722172Eleotris.fusca	0,267	0,234	0,237								
5	30_F_kutopadang	0,254	0,234	0,245	0,161							
6	AP011064.Rhynchopelates.oxyrhynchus	0,270	0,212	0,227	0,232	0,219						
7	1027357_33_F.kutopadang	0,279	0,175	0,195	0,226	0,246	0,103					
8	JQ350099.Lutjanus.rivulatus	0,197	0,222	0,231	0,226	0,219	0,214	0,199				
9	1027358_34_F.kutopadang	0,208	0,227	0,252	0,215	0,211	0,219	0,218	0,088			
10	JQ431871.Kuhlia.malo	0,249	0,238	0,248	0,222	0,218	0,187	0,198	0,201	0,173		
11	1027375_54_F.Sungai_bantal	0,247	0,244	0,250	0,219	0,218	0,180	0,196	0,203	0,174	0,015	
12	Homoptera.sp.HM345935	0,268	0,252	0,270	0,276	0,266	0,250	0,242	0,260	0,271	0,248	0,248
13	1027376_58_F.tn.bunghata	0,272	0,252	0,276	0,265	0,249	0,258	0,268	0,268	0,266	0,257	0,135

Tabel 2. Kesamaan urutan sekuen berdasarkan gen COI DNA mitokondria menggunakan Model *pairwise distance*

No	Specimens sample	Jarak genetik terdekat	Kesamaan (%)
1	133F Ringkis	<i>Cestraeus oxyrhynchus</i>	94.50
2	30F Kutopadang	<i>Eleotris fusca</i>	83.90
3	33F Kutopadang	<i>Rhynchopelates oxyrhynchus</i>	89.70
4	34F Kutopadang	<i>Lutjanus rivulatus</i>	91.20
5	54F Sungai Bantal	<i>Kuhlia malo</i>	98.50
6	58F Tn BungHatta	Homaloptera sp	86.50

Kesimpulan

Penelitian ini telah menunjukkan DNA barcode efektif membedakan ikan air tawar dari pantai Barat Sumatera. DNA barcoding mampu mengidentifikasi spesimen juvenil ikan dari Sungai Bantal kedalam spesies *Kuhlia malo* dengan tingkat kemiripan sekuen 98,5%. Namun demikian secara keseluruhan identifikasi ikan menggunakan DNA barcoding hanya mampu mengidentifikasi ikan sampai tingkat spesies sebesar 16,67%. Dengan menggunakan metode ini jelas akan memungkinkan identifikasi ikan pada semua tahapan perkembangan, seperti telur ikan air tawar yang terisolasi, fillet larva dan sirip ikan.

Daftar Pustaka

- 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: p. 2053–2061.
- Frantine-Silva, W., S. H. Sofia, M. L. Orsi, F. S. Almeida. 2015. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Mol Ecol Resour.* 2015 Feb 6. doi: 10.1111/1755-0998.12385.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hopkins, G., R. Freckleton. 2002. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation*, 5, 245–249.
- Jarman, S. N., N. G. Elliott. 2000 DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *J. Evol. Biol.* 13, 624–633.
- Kerr, K. C., M. Y. Stoeckle, C. J. Dove, L. A. Weigt, C. M. Francis, P. D. N. Hebert. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7: 535-543.
- Ko, H. L., Y. T. Wang, T. S. Chiu, M. A. Lee, M. Y. Leu, K. Z. Chang, W. Y. Chen, K. T. Shao. 2013. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA Barcoding. *PLoS ONE* 8(1): 1-7.
- Meyer, C. P., G. Paulay. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biology*, 3: p.2229–2238.
- 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.

Tegelstöm, H. 1986. Mitochondrial DNA in Natural Population : an Improved Routine for Screening of Genetic Variation Base on Sensitive Silver Staining. Electrophoresis. 7: 226-229

Tanya Jawab

Penanya : Sharifuddin Bin Andy Omar
Pertanyaan : Apakah dengan metode DNA Barcoding dapat mengetahui induknya?
Jawaban : Bisa, apabila saat di identifikasi secara filogenik.

Penanya : Eko Setyobudi
Pertanyaan : Seberapa tingkat kesamaan spesies?
Jawaban : Silahkan ditanyakan langsung kepada penulis pertama

