

Analisis Filogenetik Kerang Abalon (*Haliotis* sp.) di Perairan Maluku Berdasarkan Sekuen Gen COI

Monalisa Pertiwi Jeriska Taihuttu^{1*}, Aloysius Duran Corebima¹, Abdul Ghofur¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang –
Jl. Semarang 5, Malang

*E-mail: jeriskapertiwi@gmail.com

Abstrak: Abalon merupakan spesies laut yang memiliki prospek yang cukup baik untuk dikembangkan, mengingat permintaan yang cukup tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan menggunakan sekuen gen COI sebagai penanda genetik diantara Abalon (*Haliotis* sp.) yang berasal dari 3 lokasi yang berbeda di perairan Maluku, serta beberapa spesies Abalon dari *GeneBank*. Sampel Abalon diperoleh dari tiga perairan di Maluku, yaitu Desa Hukurila, Desa Seri, Desa Liliboi, masing-masing 2 sampel. DNA sampel diisolasi dan diekstraksi menggunakan *QIAamp DNA Mini Kit*. Amplifikasi gen target menggunakan sepasang Primer: COI_F (5'-TGATCCGGCTTAGTCGGAAGTGC-3') dan COI_R (5'-GATGTGTTGAAATTACG GTCGGT-3'). Primer mengamplifikasi sekuen gen COI sampel Abalon secara parsial dengan panjang 508 nt. Hubungan kekerabatan diperoleh dari data jarak genetik, similaritas genetik dan pohon filogenetik dengan metode *Neighbour-Joining* dan model substitusi Tamura Nei (TN 93) berdasarkan hasil uji fit model pada software MEGA v7. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya hubungan kekerabatan antar enam sampel Abalon asal Maluku. Abalon asal Desa Hukurila memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan Abalon asal Desa Seri daripada Abalon asal Desa liliboi. Abalon asal Desa Hukurila (H1,H2) dan Desa Seri (S2,S1) memiliki tingkat similaritas dan nilai bootstrap 80% dengan *Haliotis jaccensis* asal South Papua, Pulau Tonga, dengan jarak genetik (0,000 - 0,158'). Desa Liliboi (L2,L1) memiliki tingkat similaritas dan nilai bootstrap 91,91% - 100% dengan *Haliotis varia* asal Australia, dengan jarak genetik (0,188 – 0191).

Kata Kunci: Abalon; PCR; primer; filogeni.

Abstract: Abalone is a marine species that has good prospects for development, given the high demand. This study aims to determine the kinship relationship using the COI gene sequence as a genetic marker among Abalone (*Haliotis* sp.) originating from 3 different locations in Maluku waters. As well as some Abalone species from *GeneBank*. Abalone samples were obtained from three waters in Maluku, namely Hukurila Village, Seri Village, Liliboi Village, 2 samples each. DNA samples were isolated and extracted using *QIAamp DNA Mini Kit*. Amplification of the target gene used a pair of primers: COI_F (5'-TGATCCGGCTTAGTCGGAAGTGC-3') and COI_R (5'-GATGTGTTGAAATTACG GTCGGT-3 '). Primer amplifies the COI gene sequence in the Abalone sample partially with a length of 508 nt. The kinship relationship was obtained from genetic distance data, genetic similarity and phylogenetic trees using the neighbor-joining method and the Tamura Nei (TN 93) substitution model based on the results of the fit model test on MEGA v7 software. The results of this study indicate a kinship relationship between six Abalone samples from Maluku. Abalone from Hukurila Village have a closer kinship with Abalone from Seri Village than Abalone from Liliboi Village. Abalone from Hukurila Village (H1, H2) and Seri Village (S2, S1) have a similarity level and bootstrap value of 80% with *Haliotis jaccensis* from South Papua, Tonga Island, with a genetic distance (0.000 - 0.158'). Liliboi Village (L2, L1) has a similarity level and bootstrap value of 91.91% - 100% with *Haliotis varia* from Australia, with a genetic distance (0.188 - 0191).

Keywords: Abalone; PCR; primer; phylogeny.

PENDAHULUAN

Maluku merupakan provinsi kepulauan yang memiliki berbagai potensi sumberdaya perikanan dan kelautan sebagai modal dasar pembangunan nasional. Agar sektor perikanan dan kelautan dapat berkontribusi terhadap pembangunan kelautan nasional sebagai salah satu penghasil devisa, haruslah mampu mempertahankan daya dukung lingkungan agar potensi sumberdaya laut dapat berkelanjutan (Norhayatigeo, 2015). Salah satu komoditas laut yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan prospek masa depan yang menjanjikan adalah jenis moluska. Abalon merupakan jenis kerang yang bernilai tinggi dan merupakan sumber pendapatan yang sangat menguntungkan bagi nelayan di Indonesia dengan harganya yang cukup tinggi.

Data Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC) tahun 2007 menunjukkan bahwa pasar tidak dapat memenuhi permintaan dunia. Permintaan Abalon yang tinggi menyebabkan terjadi eksploitasi berlebihan di alam. Eksploitasi tersebut terutama yang dilakukan dengan cara tidak ramah lingkungan dapat menyebabkan putusnya siklus hidup generasi dalam jumlah yang besar, mengakibatkan penurunan potensi sumberdaya dan selanjutnya memicu terjadinya degradasi populasi. Produksi kerang abalon saat ini lebih banyak diperoleh dari tangkapan di alam, hal ini akan menimbulkan kekhawatiran akan terjadinya kelangkaan yang tidak mustahil akan berakhir pada kelangkaan atau kepunahan. Sampai saat ini kegiatan penelitian untuk abalone telah banyak dilakukan, akan tetapi untuk keragaman genetik terutama untuk spesies-spesies yang ada di Indonesia masih kurang menjadi perhatian. Untuk itu diadakan adanya upaya konservasi, untuk mendukung hal ini diperlukan informasi genetik.

Informasi genetik dalam hewan disimpan dalam DNA inti dan DNA organel (mitokondria dan kloroplas) (Nuryanto & Solihin, 2006). Penggunaan DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik memiliki beberapa kelebihan. mtDNA terdapat dalam jumlah kopi yang tinggi sehingga mudah diisolasi untuk berbagai keperluan analisis genom. Ukuran mtDNA relatif kecil sehingga dapat dipelajari secara menyeluruh sebagai satu kesatuan yang utuh (Solihin, 1994). Gen *cytochrome oxidase* subunit I (COI) merupakan salah satu gen penyandi protein di dalam genom mitokondria (mtDNA). Gen COI digunakan untuk mempelajari karakteristik genetik antar spesies maupun antar individu (Hebert *et al.*, 2003).

COI juga dapat digunakan sebagai *barcode*. Perkembangan literatur tentang *barcode* DNA menunjukkan bahwa sebuah fragmen pendek COI dapat digunakan sebagai penanda variasi yang secara akurat dapat mengidentifikasi berbagai macam hewan sampai tingkat spesies (Luo *et al.*, 2011). Penelitian ini diharapkan memberikan informasi dasar mengenai jarak genetik dan hubungan kekerabatan di antara populasi Abalon khususnya di Maluku. Dengan demikian, informasi dasar ini diharapkan menjadi perbaikan mutu benih secara genetik dan program konservasi dapat berjalan efektif dan terarah.

MATERIAL DAN METODE

Isolasi DNA Total

Isolasi DNA total dilakukan mengikuti protocol *QIAamp DNA Mini Kit*. Hasil isolasi DNA total diuji secara kuantitatif untuk melihat kemurnian dan konsentrasinya menggunakan Nanodrop. DNA total hasil isolasi digunakan sebagai *template* amplifikasi gen *COI* menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi gen menggunakan primer forward F1(5'-TGATCCGGCTTAGTCGGAACTGC-3') dan reverse R1 (5'-GATGTGTTGAAATTACG GTCGGT-3'). Proses amplifikasi dilakukan dengan suhu pradenaturasi 94°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus, yaitu denaturasi 94°C selama 1 menit, kemudian *annealing* 59°C selama 2 menit dan *extention* 72°C selama 2 menit, serta *extention* untuk langkah terakhir pada 72°C selama 10 menit. Pradenaturasi 95°C selama 3 menit, selanjutnya denaturasi 95°C selama 30 detik, kemudian *annealing* 55°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 1 menit sebanyak 20 siklus dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Keberhasilan proses amplifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis. Gen *COI* yang berhasil diamplifikasi dikirim ke 1st Base Malaysia untuk proses sekuensing.

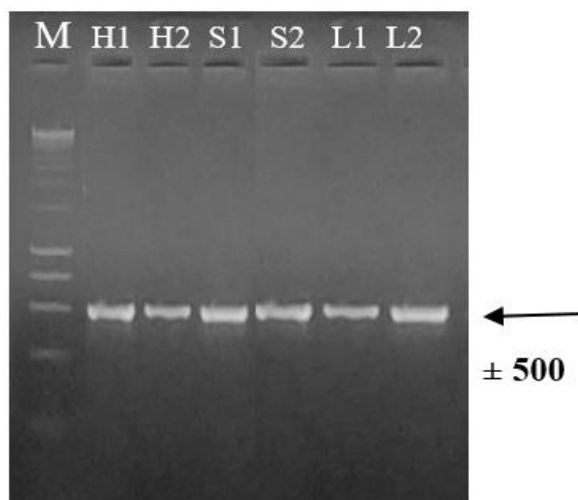
Analisa Data dan Sekuen

Sekuen gen *COI* DNA Mitokondria dianalisis secara deskriptif. Hasil sekuensing akan dilakukan *multiple* dengan melakukan BLAST pada GenBank. Analisis BLAST bertujuan untuk mensejajarkan *alignment* (pensejajaran berganda). Runutan yang diperoleh, diidentifikasi secara molekuler dan mencocokkan hasil sekuensing yang diperoleh dari sampel penelitian dengan data di GenBank. Pensejajaran runutan nukleotida gen penyandi *COI* dianalisis menggunakan program Clustal W yang terdapat pada software MEGA v7 (Tamura *et al.*, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA Total

Amplifikasi gen *COI* menggunakan primer *COIF* dan *COIR* dengan metode PCR berhasil mengamplifikasi gen *COI* Abalon. Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA tunggal. Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis, pita DNA yang terbentuk diketahui memiliki panjang gen *COI* ±500 bp yang ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Amplifikasi gen COI hasil PCR sampel Abalon (*Haliotis* sp.) pada Gel agarose 0,8% dengan M = Marker 100 kb plus DNA ladder; H1 = D.Hukurila 1; H2 = D.Hukurila 2; S1 = D.Seri 1; S2 = D.Seri 2; L1= D.Liliboi 1; L2 = D.Liliboi 2

Analisa Data Hasil Sekuensing

Sebelum analisis filogeni dilakukan, sekuens gen COI Abalon asal Maluku diujarkan dengan sekuens gen COI spesies Abalon pembandingan. Pensejajaran dilakukan dengan bantuan penjajar otomatis Clustal-X yang terdapat di software MEGA 6. Hasil pensejajaran sekuen parsial Gen COI ditemukan perbedaan basa di beberapa situs. Terdapat 143 situs yang bersifat beragam (*variable site*), dan 365 situs bersifat lestari (*conserved site*). Hasil pensejajaran juga ditemukan 20 situs yang bersifat automorfik atau singleton variable site dan 123 situs bersifat *parsimony informative*.

Jarak Genetik

Hasil analisis jarak genetik masing-masing individu atas dasar gen COI disajikan pada Tabel 1. Gambaran umum yang dapat ditarik adalah individu-individu yang berasal dari wilayah yang sama atau berdekatan memiliki jarak genetik yang relatif lebih dekat daripada individu-individu yang berasal dari dua wilayah yang berjauhan.

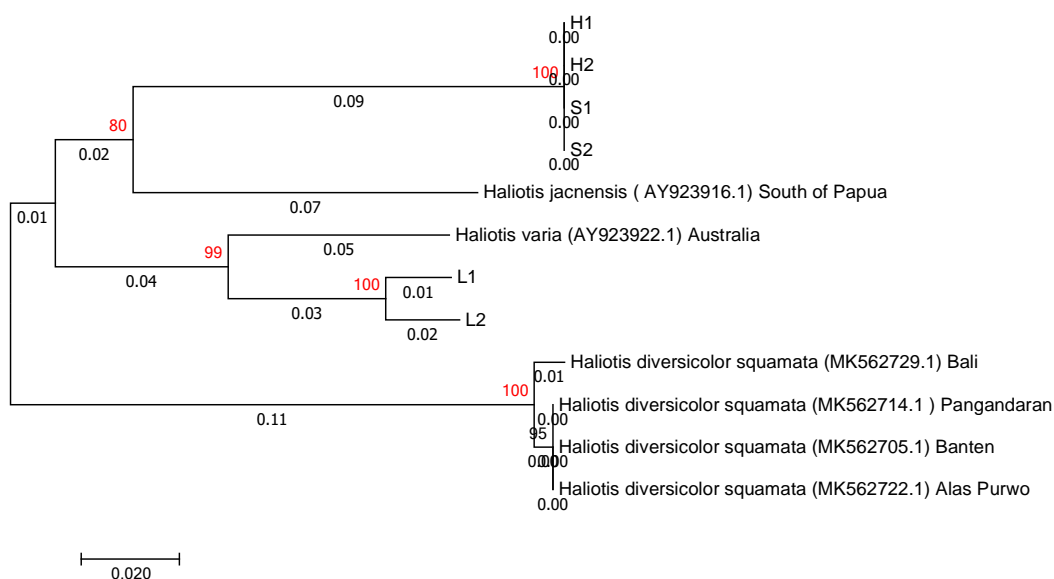
Tabel 1. Jarak genetik Abalon (*Haliotis* sp.) dari perairan di Maluku, ditambahkan dengan beberapa spesies pembandingan dari GenBank

Sekuen Sampel	NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H1	1												
H2	2	0.000											
S1	3	0.000	0.000										
S2	4	0.000	0.000	0.000									
L1	5	0.191	0.191	0.191	0.191								
L2	6	0.188	0.188	0.188	0.188	0.028							
<i>H. jacnensis</i> (AY923916.1) South of Papua	7	0.158	0.158	0.158	0.158	0.153	0.161						
<i>H. diversicolor</i> <i>squamata</i> (MK562714.1) Pangandaran	8	0.224	0.224	0.224	0.224	0.185	0.203	0.202					
<i>H. diversicolor</i> <i>squamata</i> (MK562705.1) Banten	9	0.224	0.224	0.224	0.224	0.185	0.203	0.202	0.000				
<i>H. diversicolor</i> <i>squamata</i> (MK562729.1) Bali	10	0.226	0.226	0.226	0.226	0.185	0.203	0.205	0.010	0.010			
<i>H. diversicolor</i> <i>squamata</i> (MK562722.1) Alas Purwo	11	0.224	0.224	0.224	0.224	0.185	0.203	0.202	0.000	0.000	0.010		
<i>Haliotis varia</i> (AY923922.1) Australia	12	0.177	0.177	0.177	0.177	0.092	0.090	0.183	0.206	0.206	0.211	0.206	

Keterangan: H1-H2= Abalon asal Desa Hukurila, S1-S2=Abalon asal Desa Seri, L1-L2=Abalon asal Desa Liliboy

Pohon Filogeni

Matriks jarak genetik tersebut diperkuat dengan analisis dendrogram antar populasi (Gambar 2). Berdasarkan hasil analisis hubungan kekerabatan yang ditunjukkan dalam bentuk dendrogram menghasilkan 2 kluster. Kelompok *Haliotis* asal Hukurila dan Seri terpisah dengan *Haliotis* asal Liliboi, *Haliotis* asal Hukurila dan Seri memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat, hal ini menunjukkan kelompok yang satu spesies. Dibandingkan dengan spesies pembandingan *Haliotis* asal Hukurila dan Seri memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Haliotis jacnensis*, sedangkan *Haliotis* asal Liliboi memiliki kekerabatan sangat dekat dengan *Haliotis varia*. Hasil pengelompokan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan penanda genetik gen COI dapat memisahkan intra dan interspesies dari Abalon. Gen COI DNA mitokondria dapat digunakan untuk identifikasi karakterisasi dan pengelompokan spesies (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2005).



Gambar 2. Pohon Filogeni menunjukkan hubungan filogenetik di antara 6 spesies Abalon tropis *Haliotis* sp. yang disimpulkan dari sekuens DNA gen mitokondria, Cythrome Oxidase subunit I, yang direkontruksikan menggunakan MEGA v7. Matriks jarak dihitung menggunakan model substitusi Tamura Nei, menggunakan pendekatan neighbor-joining dan diuji dengan metode bootstrap sebesar 1000 kali. Sampel dalam penelitian ini ditunjukkan dengan singkatan. Angka yang berwarna merah menunjukkan frekuensi nilai bootstrap (%) sedangkan angka yang berwarna hitam menunjukkan nilai panjang cabang yang berkolerasi dengan tingkat mutasi.

Hasil konstruksi filogenetik menunjukkan bahwa terdapat dua percabangan utama yang terbentuk, yaitu percabangan yang mengarah ke kelompok *Haliotis* sp. (*ingroup*) dan yang mengarah ke pembandingnya. Percabangan yang mengarah ke kelompok *Haliotis* terbagi menjadi dua sub cabang, yaitu percabangan pertama mengarah ke kelompok *Haliotis* sampel (H2, H1, S1, dan S2) dan *Haliotis jacnensis*, dengan nilai bootstrap 80% sedangkan percabangan kedua mengarah ke kelompok *Haliotis* sampel (L2 dan L1) dan *Haliotis varia*, dengan nilai bootstrap 90%. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel *Haliotis* yang digunakan pada penelitian ini terbagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok *Haliotis* yang berkerabat dekat dengan *H. jacnensis* dengan *Haliotis* yang berkerabat dengan *H. varia*. Percabangan yang membagi *Haliotis* sampel (H2, H1, S1, dan S2) didukung oleh nilai bootstrap sebesar 100%, hal ini menunjukkan antar sampel H1, H2 dan S1, S2 merupakan satu spesies. Sedangkan percabangan yang membagi *Haliotis* sampel (L2 dan L1) didukung oleh nilai bootstrap 100%. Sampel *Haliotis* L2 dan L1 merupakan satu spesies dan tidak berkerabat dengan spesies dari sampel H1, H2, S1, S2. Percabangan yang mengarah ke pembanding, membentuk kelompok sendiri yaitu *Haliotis diversicolor squamata* asal Pangandaran, *Haliotis diversicolor squamata* asal Banten, *Haliotis*

diversicolor squamata asal Bali, *Haliotis diversicolor squamata* asal Alas Purwo, dengan nilai bootstrap 100%, hal ini juga mengindikasikan bahwa spesies-spesies ini memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Berdasarkan hasil, dapat disimpulkan bahwa topologi pohon filogeni yang dihasilkan serupa. Individu-individu Abalon yang berasal dari wilayah yang sama mengelompok pada kelompok yang sama.

KESIMPULAN

Hubungan kekerabatan antar enam sampel Abalon asal Maluku ditampilkan melalui analisis pada jarak genetik, dan pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel Abalon asal Desa Hukurila memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan Abalon asal Desa Seri daripada Abalon asal Desa liliboi. Abalon asal Desa Hukurila (H1,H2) dan Desa Seri (S2,S1) memiliki tingkat similaritas dan nilai bootstrap 80% dengan *Haliotis jaccensis* asal South Papua, Pulau Tonga, sehingga memiliki hubungan kekerabatan yang relatif dekat. Desa liliboi (L2,L1) memiliki tingkat similaritas dan nilai bootstrap 91,91% - 100% dengan *Haliotis varia* asal Australia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan Terima kasih kepada bapak Mahrus Ismail, asisten laboratorium genetika Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang membantu penelitian ini. Terima kasih kepada Ibu Dra. Dwi Lestyorini, M.Si, D.Sc, yang telah banyak memberi saran dan masukan serta membantu pada waktu penelitian di Laboratorium Bioteknologi Universitas Negeri Malang.

DAFTAR RUJUKAN

- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1), S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>.
- Norhayatigeo. (2015). *Geografi Regional Provinsi Maluku*. Retrieved from <https://norhayati099.wordpress.com/2015/06/08/geografi-regional-provinsi-maluku/>
- Nuryanto, A., & Solihin, D. D. (2006). Variasi Sekuens Gen Mitokondria Sitokrom C Oksidase I dari Siput Lola (*Trochus niloticus*). *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal*, 23(1), 31-37. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2006.23.1.143>.
- Solihin, D. D. (1994). Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi Populasi pada Hewan. *Hayati*, 1(1), 1-4.

- Luo, X. L., Zhu, J. Y., Gleisner, R. (2011). Effect of wet-pressing-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. *Cellulose*, 18, 1055-1062. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9541-z>.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596-1599. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>.