

Identifikasi *Synaptula* (Echinodermata : Holothuroidea) Raja Ampat Berdasarkan

Gen COI

Robitoh Desi Kurniasari¹, Aris Soewondo², Abdul Hamid Toha³

^{1), 2)} Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang

³⁾ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Papua

Email korespondensi : Robitoh D.K ; nia.robitoh@gmail.com

ABSTRAK

Identifikasi spesies yang terkoleksi di perairan Raja Ampat perlu dilakukan untuk mendapatkan data biodiversitas perairan Raja Ampat. *Synaptula* merupakan salah satu timun laut dan merupakan organisme salah satu organisme yang *cryptic species*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Synaptula* yang dikoleksi dari perairan Raja Ampat menggunakan metode molekuler dengan marker gen COI. Alasan memilih *Synaptula* untuk diidentifikasi dikarenakan spesimen tersebut masih teridentifikasi sampai tingkat genus. Metode identifikasi secara molekuler yang digunakan adalah DNA barcoding, dengan tahapan, isolasi DNA, PCR, dan sekuensing. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *Synaptula* dari Raja Ampat (UNP 101) memiliki kemiripan yang tinggi dengan spesies *Plakobranhus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina, namun *Synaptula* UNP 101 dari Raja Ampat dengan *Synaptula reciprocans* jarak genetik sebesar 76.8% dan nilai similaritas sebesar 23.6% sehingga dapat diartikan bahwa memiliki perbedaan yang besar. Perbedaan hasil identifikasi kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi DNA template *Synaptula* oleh DNA template *Plakobranhus* UNP 67A dikarenakan proses identifikasi dilakukan dalam waktu yang bersamaan.

Kata Kunci : gen COI, identifikasi, *Synaptula*.

ABSTRACT

Identification of species Raja Ampat required in order to obtain marine biodiversity in Raja Ampat. *Synaptula* is one of the organism that inhabit in Raja Ampat and belonging to sea cucumber. Sea cucumber is an organism that difficult to distinguish through morphological characteristic.. This study aimed to identify *Synaptula* from Raja Ampat based on mitochondrial gene, cytochrome c oxidase subunit 1 (COI). The results of the study that *Synaptula* of Raja Ampat (UNP 101) is *Plakobranhus ocellatus*, the result is different with identification through morphological. *Synaptula* of Raja Ampat (UNP 101) has a high similarity with *Plakobranhus ocellatus* species from Sulawesi and the Philippines. Genetic distance *Synaptula* of Raja Ampat (UNP 101) with *Synaptula reciprocans* is 76.8%, while similarity values is 23.6%. The difference in the results of species identification may be caused by contamination DNA *Plakobranhus* UNP 67A to DNA *Synaptula* UNP 101, contamination is likely to occur during the identification process which simultaneity.

Keywords: COI gene, identification, *Synaptula*

PENDAHULUAN

Raja Ampat merupakan gugusan pulau-pulau kecil di pulau Papua. Lokasi kepulauan Raja Ampat merupakan ekosistem koral Indonesia yang paling asli dan paling kaya. Potensi sumberdaya terumbu karang yang dimiliki kabupatn Raja Ampat, merupakan bagian dari “segitiga karang dunia” (*coral triangle*) yang terdiri dari Indonesia, Filipina, Papua New Guinea, Jepang, dan Australia. Raja Ampat memiliki ekositem yang paling kaya diantara pulau-pulau penyusun segitiga karang [1]. *Synaptula* merupakan salah satu spesies timun laut yang ditemukan di Raja Ampat.

Identifikasi terhadap *Synaptula* perlu dilakukan karena diperlukan pendataan terhadap keragaman spesies di Indonesia. Identifikasi terhadap *Synaptula* memerlukan metode identikasi molekuler, karena *Synaptula* merupakan *cryptic species*. Metode identifikasi molekuler yang digunakan adalah DNA barcoding dengan penanda gen COI (mtDNA). Pada hewan, penggunaan mtDNA dalam identifikasi spesies didasari oleh analisis biogeografi dan sistematik sering tidak sejalan dengan identifikasi morfologi. Salah satu penyebabnya adalah karakter morfologi seringkali memperlihatkan fenomena *species cryptic*. Sedangkan mtDNA hewan merupakan genom sitoplasmik yang diwariskan secara

uniparental dan tidak mengalami rekombinasi sehingga *species sibling* bisa dipastikan mempunyai mtDNA dengan nilai kesamaan yang tinggi. Salah satu ruas mtDNA yang banyak digunakan sebagai *barcode* yaitu *cytochrome oxidase 1* (CO1) yang dipopulerkan oleh Hebert *et al.* (2003). Gen *cytochrome oxidase 1* (CO1) adalah segmen dari DNA mitokondria yang terdiri atas 648bp [2].

Synaptula merupakan salah satu spesies yang tergolong kedalam ordo apodida. Karakter morfologi apodida adalah tubuhnya yang silindris, sistem pernafasannya mengerucut ke atas bagian tubuh, tidak memiliki papilla pada bagian anal, memiliki spikula atau ossicles yang sering termasuk kedalam golongan anchors yang berfungsi untuk attachment ke dasar substrat dan membantu pergerakannya sebagai alternative alat gerak menggantikan tidak adanya struktur podia. Keberadaan anchors ini merupakan kekhasan yang dimiliki famili synaptidae dan perbedaan struktur anchors dapat digunakan sebagai salah satu karakter morfologi yang membedakan antar genus pada family synaptidae [3]. *Synaptula* yang ditemukan di perairan Raja Ampat perlu diidentifikasi dengan metode DNA barcoding dengan penanda gen COI sehingga didapatkan jenis taksanya dan data yang didapatkan dapat digunakan untuk kepentingan manajemen konservasi.

METODE PENELITIAN

Penelitian bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Sampel makroinvertebrata *Synaptula* (UNP 101) diambil pada 4 Juni 2013 di aljuy bay, Waigeo dan disimpan dalam botol berisi etanol 95%.

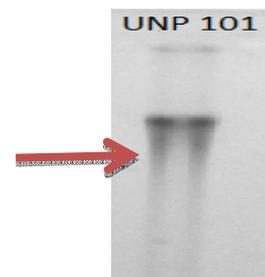
Ekstraksi DNA *Synaptula* dilakukan menggunakan Gsync DNA Extraction Kit (Geneaid). Kemudian Elektroforesis Gel Agrose Hasil Isolasi DNA untuk melihat hasil ekstraksi DNA. DNA yang telah diisolasi di amplifikasi sekuen gen CO1 dengan primer universal gen CO1 LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' dan HCO2198, 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'[4]. Racikan untuk PCR terdiri dari ddH₂O 12µl (diganti dengan larutan BSA), pcr mix kapa Taq Extra HotStart ReadyMix PCR kit (1,25 U per 50µl reaksi DNA polimerase, KAPA Taq Extra

buffer (1X), dNTPs (masing-masing dNTP 0,3 mM (1X)), MgCl₂ (2 mM 1X) dan stabiliser) sebanyak 10 µl, 1 µl masing-masing primer (10 µM), dan 1 µl DNA template. Program PCR : *hot start* 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 30 detik, *annealing* 50°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit(30 siklus), dan *post extension* 72°C selama 1 menit. Sampel hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C. Hasil PCR kemudian dilakukan Elektroforesis gel agarose untuk melihat DNA ampikon yang didapatkan dan panjang base pair.

DNA ampikon hasil PCR kemudian di sekuensing untuk mengetahui susunan basa pada organisme makroinvertebrata *Synaptula* Raja Ampat. Sekuen yang didapatkan dari sekuensing kemudian dianalisis menggunakan software bioedit dan disejajarkan dengan data base di NCBI. Hasil penjejajaran kemudian dipilih sekuen yang memiliki kesamaan diatas 85% dengan sekuen sampel *Synaptula*. sekuen yang dipilih kemudian dialignment dan disamakan panjang sekuen dan dilakukan perhitungan jarak genetic menggunakan software Mega 5.1. Berdasarkan jarak genetic yang telah didapatkan dihitung nilai similaritasnya dengan persamaan (1-jarak genetic) X 100% kemudian hasilnya diterjemahkan kedalam pohon filogenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies berdasarkan gen COI menggunakan maximum likelihood (ML) dengan metode estimasi jarak p-distance (bootstrap 1000) pada software MEGA 5.1 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA isolasi dari jaringan organisme *Synaptula* menggunakan Gsync DNA ExtractionKit (Geneaid). DNA hasil isolasi dilihat kualitasnya dengan uji kualitatif elektroforesis gel agarose .



Gambar 1: hasil uji kualitatif isolasi DNA *Synaptula* (yang ditunjuk garis merah merupakan pita DNA yang *Synaptula*)

DNA specimen berhasil diisolasi namun menunjukkan smear yang kemungkinan disebabkan DNA yang terisolasi belum murni masih terdapat kontaminan seperti protein dan RNA.

DNA yang didapatkan kemudian dilakukan amplifikasi gen COI dengan metode PCR menggunakan primer LCO-1490 dan HCO-2198. Gen COI digunakan sebagai marker genetic dikarenakan gen COI memiliki tingkat evolusi yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk membedakan meski dalam kekerabatan yang dekat. Gen COI digunakan sebagai marker genetic dikarenakan gen COI memiliki tingkat evolusi yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk membedakan meski dalam kekerabatan yang dekat.

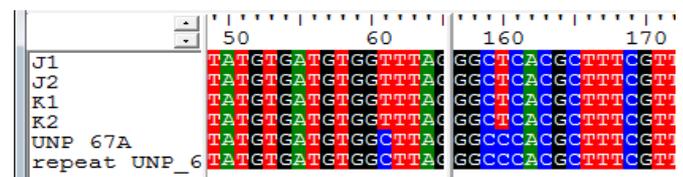
Berdasarkan hasil uji kualitatif gel agarose 0.8% diketahui bahwa sekuen gen COI dapat teramplifikasi dengan panjang ampikon ±750 bp namun pita DNA hasil amplifikasi tipis (ditunjuk oleh kotak merah) hal ini kemungkinan disebabkan oleh DNA *Synaptula* yang terisolasi belum murni sehingga sekuen yang teramplifikasi saat PCR sedikit. DNA *Synaptula* diulang sebanyak 4 tube dalam proses PCR.



Gambar 2 : hasil uji kualitatif DNA *Synaptula* hasil PCR (M=marker).

Hasil sekuensing yang didapatkan dari hasil PCR cukup baik. Berdasarkan data sekuen yang didapatkan dari keempat sampel PCR dari *Synaptula*. Sekuen forward kemudian di BLAST di NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Berdasarkan data yang didapatkan/ hasil blast tidak sesuai dengan identifikasi berdasarkan karakter morfologi yang telah dilakukan sebelumnya hal ini yang menunjuk pada spesies *Synaptula*, kemungkinan dikarenakan penggunaan primer COI yang sama dan bersifat universal dan proses identifikasi dilakukan secara bersamaan sehingga terjadi pembacaan region yang sama.

Hipotesis tersebut didasarkan pada hasil alignment dari sampel J1,J2,K1,K2,dan UNP 67A sebagai berikut ;



Gambar 3. Hasil alignment sekuen hasil sekuensing *Synaptula* dan UNP 67A (beda basa nukleotida ditunjuk oleh tanda bintang)

Dari hasil alignment menunjukkan bahwa hanya terdapat 2 basa yang berbeda (ditandai dengan tanda bintang) antara *Synaptula* UNP 101 (J1,J2,K1, dan K2) terhadap UNP 67A (*Plakobranchnus ocellatus*) dan didapatkan hasil BLAST yang memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Plakobranchnus*.

Hal ini berbeda dengan identifikasi morfologi yang merujuk pada spesies *Synaptula*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi DNA template *Synaptula* dengan DNA template *Plakobranchnus* dikarenakan proses pengerjaan proses identifikasi yang bersamaan.

KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil sekuensing bahwa spesimen / organisme makroinvertebrata yang dikoleksi pada tanggal 4 Juni 2013 di Waigeo, yang sebelumnya telah diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi sebagai *Synaptula* memiliki kemiripan yang tinggi dengan spesies *Plakobranchnus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina, namun jika dibandingkan antara *Synaptula* UNP 101 dari Raja Ampat dengan *Synaptula reciprocans* sangat jauh berbeda. Perbedaan hasil identifikasi berdasar karakter morfologi dan molekuler (berdasar sekuen gen COI) kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi DNA template *Synaptula* oleh DNA template *Plakobranchnus* UNP 67A dikarenakan proses identifikasi dilakukan dalam waktu yang bersamaan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada bapak ibu dan keluarga yang telah memberikan segala

dukungan yang telah diberikan dan juga teman-teman satu tim MB-RAI yang telah berjuang bersama menyelesaikan studi bersama-sama.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] McKenna, S.A, Gerald R Allen, and Suer suryadi. 2002. A Marine Rapid Assessment Of The Raja Ampat Islands, Papua Province, Indonesia. Conservation International.
- [2] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaardJR. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond* 270: 313-321.
- [3] Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, and T. A. Dewey. 2013. The Animal Diversity Web (online). Accessed at <http://animaldiversity.org>. diakses pada 1 November 2013.
- [4] Folmer M, M Black, W Hoeh, R Lutz & R Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.