

Analisis genetik fragmen gen sitrokrom oksidase sub unit 1 dari *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis* Ishikawa 1904 (Labridae) asal Teluk Cenderawasih dan Raja Ampat

[Genetic analysis of cytochrome oxidase sub unit 1 gene fragment from *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis* (Labridae) from Cenderawasih Bay and Raja Ampat]

Muhammad Dailami^{1✉}, Darma Santi¹, Murtihapsari¹, Hermawaty Abubakar², Abdul Hamid A. Toha^{3*}

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Papua, Manokwari, 98314

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Papua, Manokwari, 98314

³Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Papua, Manokwari, 98314

Diterima: 15 April 2017; Disetujui: 14 Agustus 2018

Abstrak

Cirrhilabrus cf. ryukyuensis asal Teluk Cenderawasih dan Raja Ampat secara morfologi memiliki perbedaan warna dengan *Cirrhilabrus ryukyuensis*. Penelitian ini bertujuan menentukan hubungan filogenetik, evolusi, dan keragaman genetik *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis* berdasarkan gen Sitokrom Oksidase sub Unit I (COI). Genom DNA mitokondria diekstrak menggunakan larutan chelex 10%. Primer FISH-BCH dan BCL digunakan untuk mengamplifikasi fragmen Gen COI dan sekuensing. Analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Sequencher 4.1 dan MEGA 5. Gen COI dari enam sampel *C. cf. ryukyuensis* asal Teluk Cenderawasih dan Raja Ampat, memiliki panjang basa mencapai 613 bp. Komposisi rata-rata nukleotida T 32,8%, C 26,3%, A 23,2% dan G 17,7%. Terdapat enam posisi polimorfisme yang kesemuanya disebabkan oleh mutasi *transition*. Hasil penerjemahan nukleotida, diperoleh asam amino dengan panjang 204 asam amino dengan urutan yang sama. Pohon filogenetik menunjukkan keenam sampel berada dalam satu *clade* yang sama dan berbeda dari *clade Cirrhilabrus cyanopleura* data *Gene Bank*.

Kata penting: *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis*, DNA mitokondria, Gen COI, filogenetik

Abstract

Cirrhilabrus cf. ryukyuensis from Cenderawasih Bay and Raja Ampat have different color morphs with *Cirrhilabrus ryukyuensis*. This study was conducted to determine the phylogenetic relationship, evolution and genetic diversity of *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis* based on Cytochrome oxidase sub unit 1 (COI) gene. Mitochondrial DNA extracted by using chelex 10%. FISH-BCH and BCL primers were used to amplify COI gene fragment and sequencing. Data analysis conducted by using *software* Sequencher 4.1 and MEGA 5. COI genes from six samples of *C. cf. ryukyuensis* from Cenderawasih Bay and Raja Ampat have total 613 base pairs. The average compositions of nucleotides are T 32.8%, C 26.3%, A 23.2% and G 17.7%. There is six positions of polymorphism that caused by transition. Conversion of nucleotides to amino acid sequence resulted in 204 amino acid with the same sequence. The phylogenetic tree from six sample showed that all in one *clade*, but different *clade* from *Cirrhilabrus cyanopleura* from *GenBank*.

Key words: *Cirrhilabrus cf. ryukyuensis*, mitochondrial DNA, Gen COI, phylogenetic

Pendahuluan

Bentang laut kepala burung Papua (*Papuan Bird's Head Seascape*, BHS) merupakan salah satu kawasan laut penting di Asia dan Pasifik yang kaya dengan keanekaragaman hayati laut (Allen & Erdmann 2009, Mangubhai *et al.* 2012). Perairan laut Papua disebut juga sebagai jantung segitiga karang dunia (Veron *et al.* 2010). Donnelly & Mous (2002) melaporkan bah-

wa wilayah Raja Ampat memiliki keragaman jenis karang yang tinggi, di mana 75% jenis karang dunia bisa ditemukan di wilayah ini. Selain itu, terdapat 899 (84%) spesies ikan laut dari total 1.074 spesies ikan karang di dunia. Sementara perairan BHS lain di Teluk Cenderawasih memiliki spesies endemik yang tinggi (Wallace *et al.* 2011, Allen & Erdman 2012). Labridae adalah famili ikan karang terbanyak

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: hamid.toha@gmail.com

ketiga yang dijumpai di wilayah ini yang keka-
yaan jenisnya mencapai 109 spesies.

Cirrhilabrus ryukyuensis merupakan ikan karang dari famili Labridae yang pertama kali di-deskripsikan dari Pulau Ryukyu Jepang (Ishikawa 1904). Menurut Ruggiero *et al.* (2011), *C. ryukyuensis* merupakan nama sinonim *Cirrhilabrus cyanopleura*, akan tetapi menurut Kuitert & Tonzuka (2004) kedua spesies tersebut bukan spesies sama. Allen dan Erdmann menemukan spesies yang mirip dengan *Cirrhilabrus ryukyuensis* di perairan Papua dan mereka menyebutnya sebagai *Cirrhilabrus cf ryukyuensis*. *C. cf ryukyuensis* yang berasal dari Teluk Cenderawasih dan Raja Ampat (Gambar 1), secara morfologis memiliki perbedaan warna jika dibandingkan dengan *C. ryukyuensis* (komunikasi pribadi dengan Gerald Allen & Mark Erdmann).

Identifikasi spesies dengan teknik DNA *barcoding* telah banyak digunakan (Ward *et al.* 2005; Steinke *et al.* 2009; Hubert *et al.* 2011, Pentinsaari *et al.* 2016). Gen Sitokrom Oksidase Sub Unit I (COI) merupakan DNA *barcode* (Hebert *et al.* 2003) yang biasa digunakan se-

bagai acuan dalam identifikasi genetik. Gen COI dilaporkan memiliki potensi laju mutasi yang rendah dibandingkan gen sitokrom b (Da Fonseska *et al.* 2008). Gen COI juga merupakan gen yang banyak digunakan dalam analisis pohon filogenetik, keragaman genetik, sejarah evolusi, maupun genetika populasi (De Boer *et al.* 2014a, 2014b, Saleky *et al.* 2016).

Genus *Cirrhilabrus* Temminck & Schlegel, 1845 telah mengalami peningkatan sangat pesat dalam jumlah spesies yang diakui hingga saat ini. Penerapan teknik molekuler yang relatif baru juga telah membuka sumber daya yang sebelumnya belum dimanfaatkan untuk ahli taksonomi, memungkinkan pemeriksaan lebih dekat hubungan antara populasi dan terkadang mengungkapkan spesies samar dalam spesies nominal (Victor 2015). Hal ini termasuk identifikasi spesies menggunakan COI dalam genus *Cirrhilabrus* (Allen *et al.* 2015, Tea *et al.* 2016). Pada tahun 2015 genus ini telah mencakup 51 spesies (Allen *et al.* 2015) dan selanjutnya bertambah menjadi 52 spesies (Tea *et al.* 2016).



Gambar 1. *C. cf ryukyuensis* Teluk Cenderawasih (kiri) dan Raja Ampat (kanan)
(Foto: Erdmann dan Allen)

C. cf. ryukyuensis masih jarang diketahui secara ilmiah. Informasi awal tentang spesies ini hanya diperoleh melalui komunikasi pribadi dengan pakar seperti yang disampaikan sebelumnya. Penelitian ini adalah penelitian awal yang menggunakan penanda genetik COI. Dalam penelitian ini digambarkan karakter genetik COI spesies *C. cf. ryukyuensis* berdasarkan enam spesimen yang dikumpulkan dari Raja Ampat dan Teluk Cenderawasih. Hasil ini penting sebagai informasi awal dalam identifikasi dan penelitian genetik lanjut.

Bahan dan metode

Pengambilan sampel

Sampel berupa sirip ikan dikumpulkan dari perairan Raja Ampat (Flabacet, Misool Tenggara) dan Teluk Cenderawasih (Pulau Roon). Sebanyak enam sampel dianalisis dalam penelitian ini. Setiap lokasi diambil masing-masing tiga sampel (Tabel 1) dan disimpan dalam etanol 96% (Templado *et al.* 2010).



Gambar 1. Lokasi penelitian. Pengambilan sampel dilakukan di Perairan Papua, masing-masing Perairan Pulau Misool di Raja Ampat, dan Perairan Pulau Roon di Teluk Cenderawasih. Lokasi penelitian ditunjukkan dengan lingkaran warna merah (Sumber: google maps di <https://www.google.com/maps/place/>).

Tabel 1 Informasi sampel

No	Kode identitas	Nama Spesies	Lokasi
1	MB020201	<i>Cirrhilabrus cf ryukyuensis</i>	Teluk Cenderawasih
2	MB020204	<i>Cirrhilabrus cf ryukyuensis</i>	Teluk Cenderawasih
3	MB020205	<i>Cirrhilabrus cf ryukyuensis</i>	Teluk Cenderawasih
4	MB022014	<i>Cirrhilabrus cf ryukyuensis</i>	Raja Ampat
5	MB022006	<i>Cirrhilabrus cf ryukyuensis</i>	Raja Ampat
6	MB022002	<i>Cirrhilabrus cf ryukyuensis</i>	Raja Ampat

Ekstraksi DNA, PCR, elektroforesis

Ekstraksi DNA menggunakan metode pertukaran ion dengan larutan *Chelex* 10% (Walsh *et al.* 1991). Mula-mula dilakukan pengambilan sekitar 1 mg sirip *C. cf ryukyuensis* dan dimasukkan ke dalam larutan chelex 10%. Selanjutnya dicampur dengan alat *vortex* selama 15 detik lalu disentrifugasi 10 detik dan dipanaskan dalam alat pemanas (*heat block*) pada suhu 95°C selama 2 jam. Setelah pemanasan ini, sampel dicampur dengan *vortex* lagi selama 15 detik dan disentrifugasi selama 10 detik. Hasil ekstraksi berupa ekstrak DNA disimpan dalam lemari es.

Proses amplifikasi DNA dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode Polimerase Chain Reaction (PCR). PCR dilakukan pada mesin PCR (*thermo cycler*) type MJ Mini Biorad model TN 1148 dengan metode Hotstart dan profil suhu sebagai berikut: denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* (penempelan primer) 50°C se-lama 30 detik, *extention* (pemanjangan primer) 72°C selama 30 detik, dan *extention* akhir 72°C selama 7 menit. Proses PCR berlangsung sebanyak 37 siklus. Primer yang digunakan yaitu Fish BCH: 5'-GGG AGT AAA GTT AAT ACC TTT GCT C-3' dan Fish BCL: 5'-TTC CCG AAG GCA CAT TCT-3' (Ivanova *et al.* 2007).

Proses PCR dengan enzim *amplitaq red* menggunakan dua *mastermix* modifikasi Barber & Erdman (2000). *Mastermix* satu terdiri atas 5,5 µL ddH₂O, 1,5 µL PCR buffer, 2,5 µL dNTP (8 mM), 2 µL MgCl₂ (25 mM), 1,25 µL primer Fish BCH dan 1,25 µL primer Fish BCL (10 mM). *Mastermix* dua terdiri atas 9 µL ddH₂O, 1 µL PCR buffer, 0,125 µL enzim *amplitaq Red*. Campur 14 µL *mastermix* satu dan 1 µL ekstrak DNA dicampur ke dalam tabung PCR dan kemudian campuran ini diletakkan dalam mesin *thermo cycler*. Mesin dihidupkan dengan program awal panas (*hot start*) sampai suhu 80°C. Program dihentikan sementara (*pause*) sebelum siklus pertama, lalu tambahkan 10,125 µL *Mastermix* dua. Setelah itu program dilanjutkan kembali hingga selesai.

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 1% (b.v⁻¹) dan dengan pewarna etidium bromida (EtBr). Sebanyak 4 µL produk PCR dicampurkan dengan 1 µL *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur gel. DNA *low mass ladder* digunakan sebagai penanda (*marker*). Elektroforesis dijalankan dengan voltase 200 volt, arus 400 mA, selama 15 menit. Pita DNA dilihat dengan menggunakan lampu UV-*transluminator* dan difoto dengan kamera.

Pemurnian exo-sap, siklus pengurutan nukleotida, dan sekuensing

Pemurnian hasil PCR dilakukan dengan menggunakan enzim *Exonuklease-Shrimp Alkaline Phosphatase* (Exo-Sap). Proses Exo-Sap bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa primer yang tidak ikut bereaksi dan juga dNTPs sisa selama proses PCR berlangsung. Sampel yang berhasil diamplifikasi dengan PCR, selanjutnya dimurnikan dengan metode Exo-Sap. Komposisi dan jumlah komponen dalam Exo-Sap yaitu enzim *Exonuklease* dan *Shrimp alkaline phosphatase*, masing-masing sebanyak 0,5 µL dan produk PCR sebanyak 5 µL. Proses berlangsung dalam *thermo cycler* dengan suhu 37°C selama 30 menit, untuk menghentikan kerja enzim yaitu pada suhu 80°C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar 25°C selama satu menit.

Sequencing DNA adalah metode untuk menentukan urutan nukleotida yang terdapat dalam DNA. *Mastermix* yang digunakan dalam *cycle sequencing* terdiri atas *mastermix* satu (MM1) dan *mastermix* dua (MM2). Komposisi *mastermix* satu yaitu: 7 µL ddH₂O, 2,5 µL buffer sekuensing, 0,5 µL DMSO, 0,5 µL *big dye*, dan 0,5 µL primer Fish-BCH. Untuk *mas-termix* dua bahan yang digunakan sama, tetapi primernya diganti dengan Fish BCL. Sebanyak 11 µL MM1 dalam tabung mikrosentrifugasi 48 lubang ditambahkan dengan 1 µL DNA hasil exo-sap. Pada lubang yang lain ditambahkan 11 µL MM2 dan 1 µL DNA hasil exo-sap. Selanjutnya, proses *cycle sequencing* dilakukan dalam *thermo cycler* dengan suhu 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik, 60°C selama 4 menit, dan dilakukan pengulangan sebanyak 25 siklus.

Dalam proses presipitasi, pada hasil *cycle sequencing* ditambahkan sebanyak 48 µL isopropanol 30% kemudian disentrifugasi dengan

kecepatan 2204 rcf (*relative centrifugal force*, gaya sentrifugal relatif) selama 30 menit. Setelah 30 menit, larutan dibuang dengan membalik tabung di atas tisu, sehingga semua larutan habis. Untuk memastikan tidak ada larutan yang tersisa, mensentrifugasi dengan keadaan terbalik (dialasi tisu) pada kecepatan 500 rcf selama 1 menit. Pellet DNA yang tersisa didalam tabung ditambah dengan 40 µL etanol 70%, dan disentrifugasi dengan kecepatan 2204 rcf selama 30 menit. Selanjutnya etanol dibuang dengan membalik tabung di atas tisu, dan disentrifugasi pada kecepatan yang sama selama satu menit dengan posisi terbalik. Pellet DNA yang tersisa dalam tabung ditutup dan dikemas dengan *aluminium foil*.

Pengurutan nukleotida dengan teknik *cycle sequencing* menggunakan *big dye terminator* berlabel fluoresence. Pembacaan urutan nukleotida dilakukan di Cornell University, California dengan menggunakan mesin sekuenser otomatis. Hasil pembacaan urutan nukleotida dalam bentuk AB1 file yang dapat diedit dengan menggunakan perangkat lunak Sequencher 4.1 ataupun MEGA 5.

Analisis data

Pengeditan dan analisis data urutan DNA hasil sekuensing menggunakan perangkat lunak Sequencher 4.1 (*Gene Code*) dan MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Penjajaran (*alignment*) sekuens berdasarkan *Clustal W* dengan perangkat lunak MEGA5. Analisis keragaman genetik individu berdasarkan komposisi nukleotida, sisi variabel, transisi dan transversasi sekuens berdasarkan Kimura-2-Parameter. Rasio tingkat substitusi sisi non-sinonim dan sinonim (dN/dS) berdasarkan metode Nei-Gojobori dengan MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Analisis trans-

lasi nukleotida fragmen Gen Sitokrom Oksidase sub unit I menjadi asam amino menggunakan perangkat lunak MEGA 5.

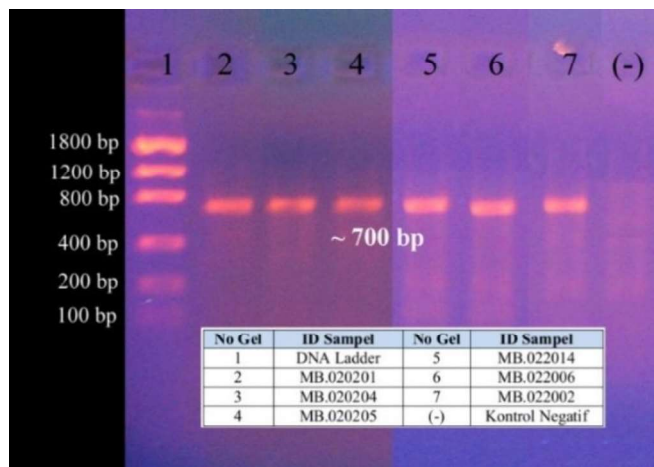
Identifikasi spesies dilakukan dengan BLAST (*basic local alignment search tools*) untuk menentukan homologi sekuens penelitian dengan sekuens GeneBank. Identifikasi dilanjutkan dengan analisis pohon filogenetik dan analisis jarak genetik berdasarkan Kimura-2-parameter antara pasangan sekuens menggunakan perangkat lunak MEGA5. Pohon filogenetik dibuat dengan beberapa parameter berikut: model statistik *Maksimum Likelihood*, model substitusi HKY, dan *bootstrap* dengan 1000 kali replikasi. Untuk sekuens pembanding, diunduh dari data *gene bank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Pemilihan model evolusi memberikan nilai BIC (*Bayesian Information Criterion*) terkecil yaitu model substitusi Hasegawa-Khisino-Yano (HKY). Model substitusi

HKY menganggap substitusi dari satu nukleotida ke nukleotida lainnya memiliki nilai yang berbeda (Nei & Kumar 2000, Tamura *et al.* 2007). Perbedaan nilai tersebut yang dijadikan dasar dalam pembuatan pohon filogenetik.

Hasil

Amplikon gen COI

Hasil amplifikasi dengan menggunakan teknik PCR berupa amplikon fragmen gen COI dari *C. cf ryukyuensis* divisualisasikan dengan menggunakan metode elektroforesis pada gel agarosa 1% (b.v⁻¹). Pewarnaan molekul DNA dilakukan dengan menggunakan etidium bromida (EtBr) yang memberikan warna jingga jika dilihat dengan *UV transluminator*. Hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis produk PCR yang dilihat dengan *UV transluminator*. Sumur gel pertama adalah DNA *ladder* yang telah terpotong dengan panjang basa tertentu. Pita DNA pada sumur pertama, terdapat 6 baris pita yang mana baris pertama memiliki ukuran sekitar 1800 pb, baris kedua 1200 pb, ketiga 800 pb, keempat 400 pb, kelima 200 pb, keenam 100 pb (Invitrogen 2005).

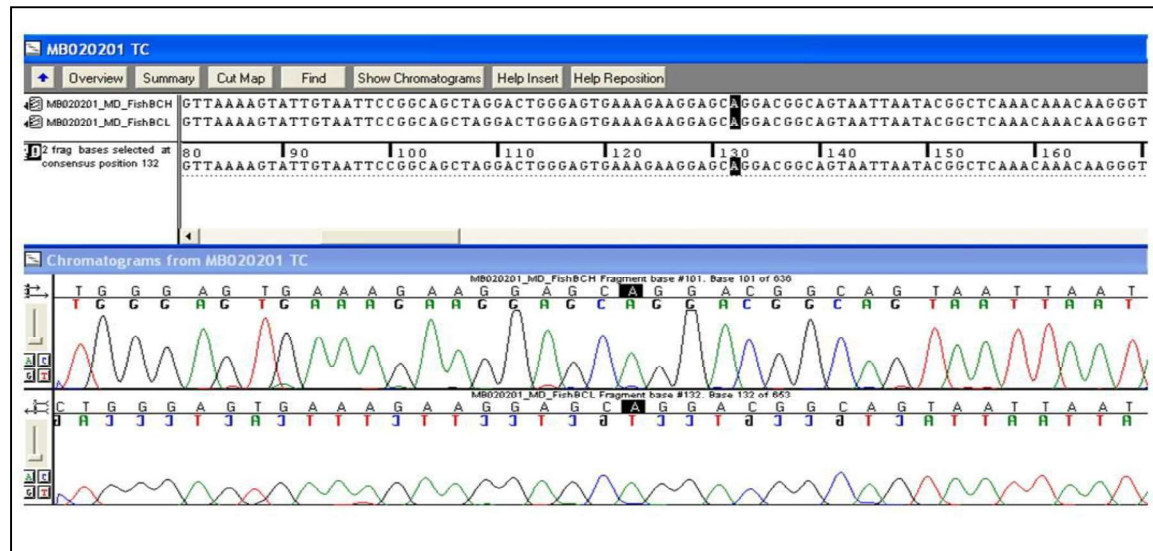
Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa keenam sampel positif memperoleh amplicon fragmen gen COI yang ditandai dengan adanya pita DNA pada sumur gel nomor 2 sampai 7 dengan panjang sekitar 700 pasangan basa (pb). Hasil ini memastikan bahwa gen hasil amplifikasi yang diperoleh benar-benar merupakan gen target dari primer yang digunakan.

Urutan nukleotida fragmen gen COI

Hasil sekuensing dalam bentuk elektroforegram dan sebagian urutan nukleotida fragmen gen COI disajikan pada Gambar 3.

Hasil sekuens keenam sampel memperoleh nukleotida dengan panjang basa 613 pb. Sekuens terbanyak merupakan nukleotida Timin (T). Rata-rata kandungan nukleotida Guanin dan Cytosin (G+C) adalah 44%, sedangkan rata-rata kandungan nukleotida Adenin dan Timin (A+T) mencapai 56%. Komposisi nukleotida untuk setiap sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

Keenam sampel tidak memiliki urutan nukleotida yang sama. Terdapat beberapa perbedaan nukleotida (polimorfisme) yang diakibatkan adanya mutasi titik. Polimorfisme pada keenam sampel ini disajikan pada Tabel 3.



Gambar 3. Elektroforegram dari sampel MB.020201. Setiap nukleotida memiliki puncak (*peak*) dengan warna yang berbeda, nukleotida A ditunjukkan dengan munculnya *peak* berwarna hijau, G berwarna hitam, C berwarna biru dan T berwarna merah.

Tabel 2 Komposisi nukleotida keenam sampel

ID Sampel	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
MB020201 TC	32,6	26,4	23,4	17,6
MB020204 TC	33,0	26,0	23,2	17,8
MB020205 TC	32,8	26,3	23,2	17,7
MB022014 R4	32,7	26,4	23,3	17,6
MB022006 R4	32,6	26,4	23,2	17,8
MB022002 R4	33,0	26,1	23,3	17,6
Rata-Rata	32,8	26,3	23,2	17,7

Urutan asam amino fragmen gen COI

Urutan sekuens nukleotida dapat diterjemahkan menjadi urutan asam amino. Seluruh nukleotida diterjemahkan ke dalam asam amino dan kodon awal (*start codon*) mulai dari nukleotida pertama. Panjang 613 pb nukleotida memiliki delapan posisi polimorfisme atau mutasi

substitusi yang semuanya merupakan substitusi *synonymous*. Hal ini dilihat dari hasil terjemahan asam aminonya. Keenam sampel memiliki urutan asam amino yang sama tanpa ada sedikitpun yang berbeda. Data perubahan setiap kodon yang mengalami substitusi beserta terjemahan asam aminonya ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 3 Polimorfisme enam sampel

ID sampel	Posisi nukleotida								Haplotipe
	117	150	174	255	294	516	594	612	
#MB020201_TC	T	A	G	C	T	C	G	C	1
#MB020204_TC	T	G	G	T	T	C	G	T	2
#MB020205_TC	T	G	G	T	T	C	G	C	3
#MB022014_R4	C	G	G	T	T	C	A	C	4
#MB022006_R4	T	G	G	T	C	C	G	C	5
#MB022002_R4	T	G	A	T	T	T	G	C	6
Jenis mutasi	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	

Keterangan: T, C, A, dan G masing-masing merupakan singkatan nukleotida timin, cytosin, adenin, dan guanin; *Tr* = *Transition* (transisi), *Tv* = *Transversion* (transversi).

Tabel 4. Substitusi dan pengaruhnya pada asam amino

No	Posisi kodon	Kodon awal	Asam amino	Kodon tersubstitusi	Asam amino	Posisi substitusi
1	39	AUU	I	AUC	I	Ketiga
2	50	GGA	G	GGG	G	Ketiga
3	58	UUG	L	UUA	L	Ketiga
4	85	CUC	L	CUU	L	Ketiga
5	98	GGU	G	GGC	G	Ketiga
6	172	CUC	L	CUU	L	Ketiga
7	198	GGG	G	GGA	G	Ketiga
8	204	UAC	Y	UAU	Y	Ketiga

Keterangan: Singkatan asam amino : I (isoleusin), G (glisin), L (lisin), Y (tirosin)

Pembahasan

Ukuran amplicon gen COI produk PCR pada penelitian ini sesuai dengan pernyataan Ivanova *et al.* (2007) yang mengatakan bahwa primer COI dapat digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen COI dengan panjang sekitar 608 sampai 645 pb. Enzim *taq polymerase* merupakan protein kompleks yang berperan dalam proses polimerisasi molekul DNA. *Taq polymerase* ini diisolasi bakteri *Thermus aquaticus* BM. Rantai polipeptida yang menyusun enzim ini memiliki berat molekul kurang dari 95 kilo dalton. Enzim ini memiliki suhu optimum antara 75-80°C dan masih dapat aktif meskipun mengalami pemanasan hingga mencapai suhu 95°C (Yuwono 2006).

Konsentrasi nukleotida produk PCR ditentukan berdasarkan tingkat kecerahan pita DNA penelitian dibandingkan dengan pita DNA *ladder*. Hasil penelitian pada sumur nomor 2 sampai nomor 7 menunjukkan tingkat kecerahan yang mendekati DNA *ladder* baris ke 3 (80 ng). Hal ini berarti bahwa konsentrasi DNA gen COI hasil amplifikasi memiliki konsentrasi kurang dari 80 ng tetapi lebih dari 40 ng. Hal ini sesuai dengan kecerahan pada pita DNA *ladder*. Menurut Invitrogen (2005), pita DNA *ladder* baris pertama memiliki konsentrasi 200 nano-gram (ng), baris kedua sampai keenam masing-masing menunjukkan konsentrasi 120 ng, 80 ng, 40 ng, 20 ng, dan 10 ng.

Polimorfisme fragmen gen COI C. cf rykyuensis

Sebuah sekuens dinyatakan berbeda haplotipe dengan sekuens lain, jika memiliki minimal satu nukleotida yang berbeda. Berdasarkan polimorfisme pada Tabel 3, keenam sampel dapat dikelompokkan menjadi enam haplotipe yang berbeda. Keenam sampel menunjukkan tingkat

keragaman haplotipe yang tinggi baik di daerah Teluk Cenderawasih maupun di daerah Raja Ampat. Polimorfisme ini terjadi akibat adanya mutasi pada DNA.

Pada dasarnya, mutasi dapat terjadi secara alami dan terjadi akibat adanya faktor eksternal. Mutasi alami terjadi karena adanya kesalahan penyalinan molekul DNA pada saat terjadi replikasi DNA, sedangkan mutasi akibat faktor eksternal terjadi karena radiasi ataupun adanya paparan bahan kimia. Meskipun dalam tubuh terdapat sistem perbaikan DNA, peristiwa mutasi masih terjadi dan terkadang masih terakumulasi dan terbawa sampai generasi berikutnya. Mutasi-mutasi tersebut yang akan mengakibatkan adanya evolusi (Toha 2011).

Mutasi transisi lebih sering dan mudah terjadi dibandingkan mutasi transversasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedelapan mutasi merupakan mutasi transisi, yakni antara nukleotida adenilat dan guanilat, serta nukleotida sitidilat dan timidilat. Hal ini disebabkan oleh adanya kemungkinan kesalahan pasangan dalam molekul DNA (Graur & Li 2000). Graur & Li (2000) mengatakan bahwa kemungkinan kesalahan pasangan yang diizinkan oleh konsep Watson dan Crick adalah kesalahan pasangan antara basa purin dan pirimidin. Penelitian selanjutnya menambahkan informasi bahwa kesalahan pasangan antara purin dan purin masih mungkin terjadi, sedangkan kesalahan pasangan antara basa pirimidin dan pirimidin tidak mungkin terjadi. Itulah sebabnya mutasi transisi lebih mudah dan sering terjadi daripada transversasi.

Keragaman asam amino fragmen gen COI C. cf rykyuensis

Dalam setiap DNA terdapat berbagai macam gen, baik yang menyandi protein maupun yang tidak menyandi protein. Salah satu gen

yang menyandi protein dalam DNA mitokondria adalah gen COI. Gen COI merupakan gen yang menyandi protein Sitokrom C Oksidase I (Pentinsaari *et al.* 2016) yang berperan dalam proses transfer elektron pada saat sintesis *Adenosine Triphosphate* (ATP) dalam mitokondria. Gen ini berada dalam genom mitokondria (DNA mitokondria). Penyusun utama suatu protein adalah asam-asam amino yang dihubungkan dengan adanya ikatan peptida. Urutan setiap asam amino penyusun protein ditentukan oleh urutan nukleotida gen yang menyandi protein tersebut. Perbedaan urutan asam amino akan menyebabkan perbedaan struktur dan fungsi protein tersebut dalam tubuh. Dengan mengetahui urutan nukleotida suatu gen, maka urutan asam aminonya dapat diterjemahkan berdasarkan kode genetiknya.

Berdasarkan Tabel 4, terlihat bahwa meskipun terjadi perubahan nukleotida, ternyata tidak merubah urutan asam amino yang disandinya. Hal ini menunjukkan bahwa substitusi yang terjadi pada posisi ketiga setiap kodon memiliki peluang yang kecil untuk merubah asam amino yang disandinya. Hal ini sesuai dengan pendapat Graur & Li (2000) yang menyatakan bahwa kemungkinan 70% mutasi yang terjadi pada posisi ketiga setiap kodon adalah *synonymous*, se-

dangkan mutasi yang terjadi pada posisi kedua semuanya adalah *non-synonymous*. Untuk posisi pertama, 96%-nya adalah *non-synonymous*.

Pohon filogenetik

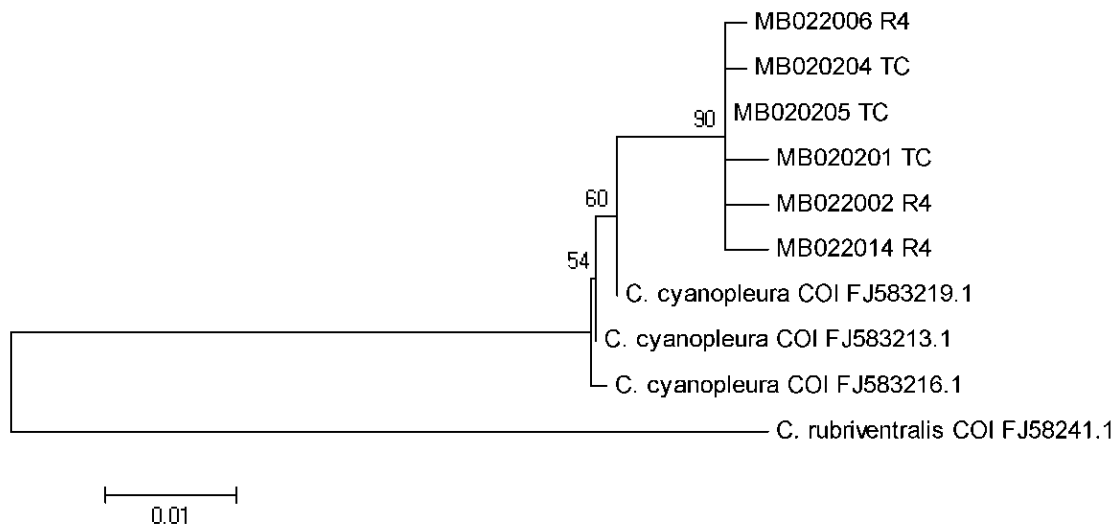
Setiap sampel dibandingkan dengan seluruh data *Gene Bank* dan dipilih satu sekuens yang memiliki kemiripan paling tinggi. Setiap sekuens yang memiliki kemiripan tinggi digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik. Hasil BLAST keenam sampel disajikan dalam Tabel 5.

Keenam sampel merujuk pada spesies *Cirrhilabrus cyanopleura*. Hal ini terbukti dengan hasil BLAST (*Basic local alignment search tools*) ke data *Gene Bank* yang menunjukkan bahwa sekuens ini memiliki kemiripan yang tinggi dengan ikan *C. cyanopleura*. Dalam data *Gene Bank*, tidak ditemukan adanya sekuens gen COI dari *C. ryukyuensis*. Hal ini disebabkan kebanyakan ahli menganggap bahwa *C. ryukyuensis* merupakan sinonim dengan *C. cyanopleura*, sehingga data sekuens yang mereka unggah ke *Gene Bank* menggunakan nama *C. cyanopleura*.

Hasil analisis lebih lanjut dengan pohon filogenetik menunjukkan bahwa seluruh sampel memang berbeda dengan *C. cyanopleura*. Pohon filogenetik ditampilkan pada Gambar 4.

Tabel 5. Hasil BLAST ke data GeneBank

No	Nomor ID	Hasil BLAST	Spesies Hasil BLAST	Query Qoverage	Identity
1	MB020201	FJ583213.1	<i>C. cyanopleura</i>	100%	99%
2	MB020204	FJ583219.1	<i>C. cyanopleura</i>	100%	99%
3	MB020205	FJ583219.1	<i>C. cyanopleura</i>	100%	99%
4	MB022006	FJ583219.1	<i>C. cyanopleura</i>	100%	99%
5	MB022014	FJ583216.1	<i>C. cyanopleura</i>	100%	99%
6	MB022002	FJ583219.1	<i>C. cyanopleura</i>	100%	99%



Gambar 4. Pohon Filogenetik keenam sampel. Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan perangkat lunak MEGA5. Tiga sekuens *C. cyanopleura* yang memiliki kemiripan tertinggi dari Gene Bank, digunakan sebagai pembandingan, yaitu sekuens dengan kode akses FJ583213.1, FJ583219.1, dan FJ583216.1 (Steinki *et al.* 2009) Sebagai *out group* digunakan sekuens *C. rubriventralis* (kode akses : FJ58241.1) (Steinki *et al.* 2009) dari *GeneBank*. *Out group* berada dalam *clade* tersendiri dari keenam sampel dan data *Gene Bank* lainnya.

Pohon filogenetik menunjukkan bahwa keenam sampel berada dalam satu *clade* (grup atau kelompok) dan didukung oleh 90% nilai *bootstrap*, akan tetapi terpisah dari grup *C. cyanopleura* dengan dukungan 60% nilai *bootstrap*. Sekuens dari *Gene Bank* dengan kode akses FJ583219 memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan keenam sampel. Hal ini berbeda dengan hasil BLAST. Hal ini karena nilai *bootstrap* yang rendah dan terpisah grup antara keenam sampel. Dengan demikian tidak ada jaminan bahwa sampel penelitian ini merupakan satu spesies dengan *C. cyanopleura*.

Hasil analisis jarak genetik keenam sampel dibandingkan dengan data genebank disajikan pada Tabel 6.

Jarak genetik di antara keenam sampel berkisar antara 0,002 – 0,007, sedangkan jarak genetik antara keenam sampel dan sekuens *C. cyanopleura* berkisar antara 0,008 – 0,015. Jarak genetik paling jauh ditunjukkan antara *out group*, sampel penelitian dan data *Genebank* lainnya dengan kisaran 0,102 – 0,114. Jarak genetik ini menunjukkan tingkat kekerabatan setiap sampel dan data *Genebank*.

Tabel 6. Jarak genetik keenam sampel dan data *Genebank*

No	ID SAMPEL	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	MB020201_TC									
2	MB020205_TC	0,003								
3	MB020204_TC	0,005	0,002							
4	MB022002_R4	0,007	0,003	0,005						
5	MB022014_R4	0,007	0,003	0,005	0,007					
6	MB022006_R4	0,005	0,002	0,003	0,005	0,005				
7	<i>C. cyanopleura</i> FJ583216.1	0,015	0,012	0,013	0,015	0,012	0,013			
8	<i>C. cyanopleura</i> FJ583213.1	0,013	0,01	0,012	0,013	0,01	0,012	0,002		
9	<i>C. cyanopleura</i> FJ583219.1	0,012	0,008	0,01	0,012	0,012	0,01	0,003	0,002	
10	<i>C. rubriventralis</i> FJ58241.1	0,112	0,112	0,114	0,112	0,112	0,114	0,102	0,102	0,104

Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa nukleotida fragmen Gen COI dari *C. cf ryukyuensis* pada penelitian ini memiliki panjang mencapai 613 pb. Komposisi nukleotida terdiri atas T 32,8%, C 26,3%, A 23,2%, G 17,7%. Kandungan A+T lebih tinggi daripada kandungan G+C. Keragaman nukleotida terjadi akibat adanya delapan mutasi transisi yang terjadi pada nukleotida ke 117, 150, 174, 255, 294, 516, 594 dan 612. Hasil penerjemahan 613 pb nukleotida didapatkan 204 asam amino. Komposisi penyusun asam amino dengan jumlah tertinggi yaitu Leusin (Leu) 15,686 % dan terendah yaitu asam amino Sistein (Cys) 0%. Keenam sampel *C. cf ryukyuensis* memiliki keragaman asam amino yang rendah karena memiliki jumlah dan urutan asam amino yang sama. BLAST dengan data Gene-bank, menunjukkan bahwa sekuens yang diperoleh benar-benar sekuens Gen COI yang dibuktikan dengan kemiripannya dengan sekuens Gen COI dari *C. cyanopleura*. Pohon filogenetik menunjukkan bahwa keenam sampel berada dalam satu kelompok atau grup dan berbeda dengan grup *C. cyanopleura*.

Daftar pustaka

- Allen GR, Erdmann MV. 2009. Reef fishes of the Bird's Head Peninsula, West Papua, Indonesia. *Check List: Journal of species lists and distribution*, 5(3): 587-628.
- Allen GR, Erdmann MV. 2012. Reef Fishes of the East Indies. Volumes I–III. Tropical Reef Research, Perth.
- Allen GR, Erdmann MV, Dailami M. 2015. *Cirrhilabrus marinda*, a new species of wrasse (Pisces: Labridae) from eastern Indonesia, Papua New Guinea, and Vanuatu. *Journal of the Ocean Science Foundation*, 15: 1–15.
- Barber PH, Erdmann MV. 2000. Molecular systematic of the Gonodactylidae (Stomatopoda) using mitochondrial cytochrome oxidase C (sub unit 1) DNA sequence data. *Journal of Crustacean Biology*, 20(2): 20-36.
- da Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Ramos MJ, Antunes A. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomic*. 9: 119.
- DeBoer TS, Naguit MRA, Erdmann MV, Ablan - Lagman MC, Ambariyanto, Carpenter KE, Toha AHA, Barber PH. 2014a. Concordance between phylogeographic and biogeographic boundaries in the Coral Triangle: conservation implications based on comparative analyses of multiple giant clam species. *Bulletin of Marine Science*, 90(1): 277–300.

- DeBoer TS, Naguit MRA, Erdmann MV, Ablan - Lagman MC, Ambariyanto, Carpenter KE, Toha AHA, Barber PH. 2014b. Concordant phylogenetic patterns inferred from mitochondrial and microsatellite DNA in the giant clam, *Tridacna crocea*. *Bulletin of Marine Science*, 90(1): 301–329.
- Donnelly R, Mous PJ. 2002. Laporan Survey Kaji Ilmiah Ekologi cara cepat di Kepulauan Raja Ampat, Papua, Indonesia, dilaksanakan pada 30 Oktober – 22 November 2002. Penerjemah: UNIPA, TNC – Southeast Asia Center for MPA. Bali, 46-55.
- Graur D, Li WH. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2 ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 481 p.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hubert N, Paradis E, Bruggemann H, Planes S. 2011. Community assembly and diversification in Indo-Pacific coral reef fishes. *Ecology and Evolution*, 1(3): 229-277.
- Ishikawa C. 1904. Notes on some new or little-known fishes of Japan. *Proceeding of Natural History, Tokyo Museum*, 1(1): 17 pp.
- Invitrogen. 2005. *Catalog 2005: Life sciences research product and services*. Invitrogen corporation, California: XV + 736 p.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4): 544-548.
- Kuiter RH, Tonozuka T. 2004. *Indonesian Reef Fishes*. PT. Dive and Dive's. Sanur, Denpasar, Bali.
- Mangubhai S, Erdmann MV, Wilson JR, Hufard CL, Ballamu F, Hidayat NI, Hiti-peuw C, Lazuardi ME, Muhajir, Pada D, Purba G, Rotinsulu C, Rumatna L, Sumolang K, Wen W. 2012. Papuan Bird's Head Seascape: Emerging threats and challenges in the global center of marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin*, 64(11): 2279–2295.
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 352p.
- Pentinsaari M, Salmela H, Mutanen M, Roslin T. 2016. Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific Reports*, 6 (35275): 1-12.
- Ruggiero M, Gordon D, Bailly N, Kirk P, Nicolson D. 2011. The catalogue of life taxonomic classification, Edition 2, Part A. In: Bisby FA, Roskov YR, Orrell TM, Nicolson D, Paglinawan LE, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, Baillargeon G, Ouvrard D (eds.) *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2011 Annual Checklist*. Digital Resource at www.catalogue-of-life.org/col/; Species 2000: Reading, UK.
- Saleky D, Setyobudiandi I, Toha HA, Takdir M, Madduppa H. 2016. Length-weight relationship and population genetic of two marine gastropods species (*Turbinidae: Turbo sparverius* and *Turbo bruneus*) in the Bird Head's Seascape Papua, Indonesia. *Biodiversitas*, 17(1): 208-217.
- Steinke D, Zemlak TS, Hebert PDN. 2009. Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade. *Plos One*, 4(7) e6300: 1-5.
- 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
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetiks Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739.
- Tea YK, Senou H, Greene BD. 2016. *Cirrhitobrus isosceles*, a new species of wrasse (Teleostei: Labridae) from the Ryukyu Archipelago and the Philippines, with notes on the *C. lunatus* complex. *Journal of the Ocean Science Foundation*, 21: 18–37.
- Templado J, Paulay G, Gittenberger A, Meyer C. 2010. Chapter 11 – Sampling the marine realm. In: Eymann J, Degreef J, Häuser C, Monje JC, Samyn Y, Spiegel DV (eds). *Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories and Monitoring*. Abc Taxa, 8(1): 273-311.

- Toha AHA. 2011. *Ensiklopedia Biokimia dan Biologi Molekuler*. Penerbit EGC. Jakarta. 884 hlm.
- Veron JEN, DeVantier LM, Turak E, Green AL, Kininmonth S, Stafford SM, Peterson N. 2010. The Coral Triangle. *Manuscript The Nature Conservancy*. Australia.
- Victor BC. 2015. How many coral reef fish species are there? Cryptic diversity and the new molecular taxonomy. In: Mora C (editor). *Ecology of Fishes on Coral Reefs*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 76-87.
- Wallace CC, Turak E, De Vantier L. 2011. Novel characteristics in a conservative coral genus: three new species of *Astreopora* (Scleractinia: Acroporidae) from West Papua. *Journal of Natural History*, 45(31-32): 1905–1924.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex-100 as medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4): 506-513.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Herbert PDN. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462): 1847-1857.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta. 240 hlm.