NUKLEUS BIOSAINS
JURNAL ILMU HAYATI

Vol. 1 No. 2 ISSN 2774-6852
Desember 2020, 70-78
UNIVERSITAS NEGERI MANADO, SULAWESI UTARA, INDONESIA

Analisis DNA Mitokondria Gen 16S rRNA Ikan Payangka (*Ophieleotris* aporos) yang Hidup di Danau Tondano

Mitokondria DNA Analysis Gen 16S rRNA Payangka Fish *(Ophieleotris aporos)* that Lives in Tondano

Jenni L. Gultom[1*], Masje Wurarah[2], Mercy M. F. Rampengan[2]
[1]Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado
[2]Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado
Kampus Unima di Tondano, Sulawesi Utara 95618, Indonesia
[*]Penulis untuk korespondensi. e-mail: jenigultom01@gmail.com

Diterima 4 November 2020/Disetujui 18 November 2020

ABSTRACT

Payangka fish is a type of fish that lives in Lake Tondano, North Sulawesi. Payangka fish are widely consumed as food for local people. The research was aimed to investigate the relationship between the mitochondrial DNA of the payangka fish that lives in Lake Tondano. This research using a descriptive method experiments in a laboratory. Mitochondrial DNA analysis of the 16S rRNA gene of payangka (Ophieleotris *aporos*) using the Neighbor Joining method at the NCBI site. The results showed that the payangka fish (*O. aporos*) with the target sequence was 912 bp, and had 88% similarities with the species Mogurnda sp and Mogurnda adspersa.

Keywords**:** payangka fish (*Ophieleotris aporos*), DNA, gene 16S.

ABSTRAK

Ikan payangka merupakan salah satu jenis ikan yang hidup di danau Tondano Sulawesi Utara, ikan payangka banyak dikonsumsi sebagai makanan masyarakat setempat. Tujuan penelitian untuk mengetahui kekerabatan DNA mitokondria ikan payangka yang hidup di danau Tondano. Penelitian mengunakan metode deskriptif dengan experiment di laboratorium, analisis DNA mitokondria gen 16S rRNA ikan payangka (*Ophieleotris aporos*) mengunakan metode Neighbour Joining pada situs NCBI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan payangka (*O. aporos*) dengan sekuen target terdapat pada 912 *bp*, dan memiliki kemiripan sebanyak 88 % dengan spesies *Mogurnda* sp dan *Mogurnda adspersa.*

Kata kunci**:** ikan payangka (*Ophieleotris aporos*), DNA, Gen 16S.

PENDAHULUAN

Ikan payangka merupakan salah satu jenis ikan yang hidup di Sulawesi utara, ikan payangka banyak dikonsumsi sebagai makanan masyarakat setempat dan banyak terdapat di danau Tondano (Lukman 2011). Menurut Soeroto (1998) payangka memiliki siklus reproduksi yang tinggi, juga memiliki kemampuan produksi telur sepanjang tahun dengan produksi tertinggi pada bulan Juni, September, dan Desember produksi rata-rata adalah sekitar 30.000-60.000 butir telur setiap individu ikan payangka. Melihat banyaknya produksi ikan payangka maka perlu dilakukan perbaikan mutu genetik ikan payangka dengan menggunakan identifikasi spesies dan tingkat keragaman atau kekerabatan genetik ikan payangka untuk diketahui, salah satu metode molekuler yang digunakan untuk mengetahui spesies dan variasi gentik adalah menggunakan analisis DNA mitokondria (mtDNA).

Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan dalam bidang mikrobiologi karena gen 16S rRNA merupakan ciri khas dari setiap organisme karena memiliki *hypervariable region* yang bertujuan mengidentifikasi taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies (Tristia 2011). Danau Tondano terletak di kabupaten Minahasa, dengan luas perairan yang beranekaragam seperti 46 km^2 pada musim kemarau sedangkan 51 km^2 saat musim hujan dan keliling danau pada kondisi biasa atau normal ± 35,5 km^2 (Sembel 2015).

Danau Tondano mempunyai peranan penting dalam sumber daya pangan di antaranya beberapa jenis ikan yang hidup dan berkembang di danau Tondano dalam menunjang kehidupan masyarakat sekitar yang tinggal di sekitar danau Tondano (Sembel 2015), danau Tondano merupakan habitat hidup ikan payangka dimana berperan sebagai indikator kerusakan lingkungan (Amanisal 2010).

Produksi ikan meningkat seiring dengan kebutuhan protein pada manusia. Data Survei Sosial Ekonomi Nasional - Badan Pusat Statistika dalam Warta Pasar Ikan (2016) menyatakan sumbangan protein ikan yang dikonsumsi oleh penduduk Indonesia mencapai 57%, diakibatkan karena meningkatnya jumlah pertumbuhan penduduk. Menurut Steffens (2006) ikan air tawar merupakan sumber protein hewan yang berkualitas karena memiliki komposisi asam amino seimbang dengan kadar protein berat basah mencapai 15-20% (Zakiah 2016). Tujuan penelitian untuk mengetahui kekerabatan DNA mitokondria ikan payangka yang hidup di danau Tondano.

BAHAN DAN METODE

Ikan payangka diperoleh dari lokasi di sekitar danau Tondano di wilayah Remboken diambil pada bagian mitokondria, setelah itu disimpan dalam wadah yang berisi alkohol 70%. Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain: sampel ikan payangka (*Ophieleotris aporos*), *ddh2o* Kit Ekstraksi menggunakan *Zymo Research Quick-DNA Miniprep plus Kit* yaitu: Genomic Binding Buffer, Solid tissue buffer (blue), g-DNA Wash buffer, Proteinase K, DNA Pre-wash Buffer, DNA Elution Buffer. Kit *PCR* yaitu: *My Taq HS Red Mix Bioline*, DNA Template, alkohol. Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif yang ditujukan untuk mendapatkan

gambaran DNA mitokondria gen 16S rRNA ikan payangka (*Ophieleoris aporos*) yang hidup di danau Tondano.

Prosedur Kerja

1. Persiapan Penelitian (Sterilisasi Alat)

Alat-alat yang akan digunakan disterilisasi lebih dahulu, bertujuan agar tidak terkontaminasi. Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas koran. Sterilisasi alat dan media dilakukan dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi.

2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah proses dan tahapan pertama yang dilakukan untuk mendapatkan total DNA dari suatu biota. Secara umum, ekstraksi DNA meliputi beberapa tahapan proses penting, yaitu dari mulai tahap persiapan hingga akhirnya diperoleh ekstrak. DNA yang terlarut dalam suatu larutan penyangga *(buffer)* khusus. Larutan tersebut digunakan untuk menyimpan dan mempertahankan kondisi DNA secara kualitatif dan kuantitatif dalam jangka waktu yang relatif lama. Secara kualitatif, berarti larutan penyangga tersebut harus dapat mempertahankan kualitas DNA yang terlarut tetap dalam kondisi baik. Sedangkan secara kuantitatif berarti larutan penyangga tersebut harus mampu mempertahankan jumlah DNA yang terlarut, sehingga jumlahnya tetap (tidak terdegradasi/rusak) dan cukup untuk digunakan dalam tahapan selanjutnya tanpa mengalami penurunan kualitas maupun kuantitas DNA terlarut. Sampel ikan mujair diekstraksi dengan *Zymo Research Quick-DNA Miniprep plus Kit.*

Tahapan Ekstraksi DNA

Disosiasi jaringan pengambilan jaringan sampel sebanyak 25 mg untuk kemudian sampel dihancurkan lalu pindahkan *tube*, lalu lisis menambahkan 95µl ddh2o, 95µl *solid tissue buffer* (blue), 10µl Proteinase K, kemudian sampel diinkubasi selama 90 menit dalam pada suhu 55^{o}C, selama diinkubasi tabung dikocok dan digoyang setiap 15 menit. Setelah diinkubasi memindahkan cairan/supernatan yang telah tercampur, kemudian daging sampel yang masih tersisa dibuang. Lalu *binding* menambahkan 2 volume (400µl) *genomic binding buffer*, centrifuse pada kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Kemudian memindahkan supernatan pada *Zymo spin collection tube* dan mensentrifus pada kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. *Washing* memindahkan *Zymo spin collection tube* pada tube baru dan lalu menambahkan 400µl DNA *pre-wash buffer* disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit, memindahkan *Zymo spin collection tube* pada tube baru dan menambahkan 700µl g-DNA *wash buffer* disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit, lalu memindahkan *zymo spin collection tube* pada *tube* baru dan kemudian menambahkan 200µl g-DNA *wash buffer* disentrifus pada 12000 rpm selama 1 menit. Lalu *elution* memindahkan *zymo spin collection tube* pada tube baru lalu menambahkan 50µl DNA *elution buffer* menginkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit dan *disentrifus* pada 12000 rpm selama 1 menit. kemudian memindahkan DNA yang terdapat dalam tube dalam tabung untuk purifikasi DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

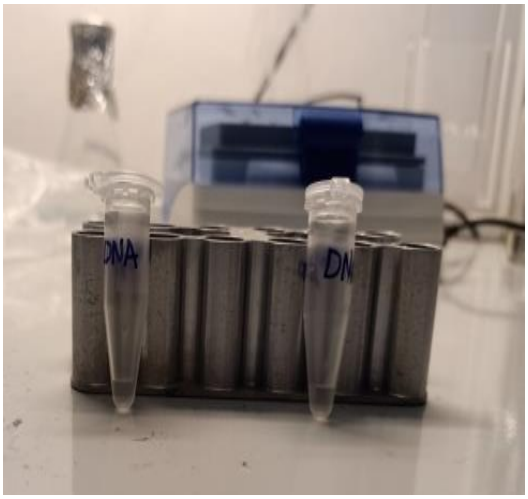
Deskripsi Sampel Penelitian Ikan Payangka

Sampel Ikan payangka diperoleh dari danau Tondano yang berlokasi di kecamatan Remboken, Kabupaten Minahasa pengambilan pada pagi hari pada jam 8.00 Wita. Ikan payangka yang digunakan memiliki jenis kelamin betina dan jantan perbedaan antara payangka betina dengan payangka jantan dapat dilihat dari warna perut (*abdomen*).

Pada payangka jantan memiliki abdomen berwarna merah sedangkan payangka betina memiliki abdomen berwarna abu-abu kehijauan, ikan payangka yang dapat dipanen adalah ikan payangka yang sudah berumur 2-3 bulan. Preparasi sampel ikan payangka dari jaringan otot selanjutnya disimpan dalam wadah yang berisi dengan alkohol 70% untuk digunakan ke tahap ekstraksi dan purifikasi DNA.

Ektraksi dan Purifikasi DNA

Ekstraksi dan purikasi DNA sumber jaringan yang digunakan berasal dari otot *abdomen* (otot perut) dari ikan payangka yang dilakukan menurut *protocol zymo Research Quick-DNA Miniprep plus Kit*. Dalam proses akhir didapatkan berupa DNA total yang di dapatkan dari jaringan ikan payangka berupa 100 µl berwarna putih bening.

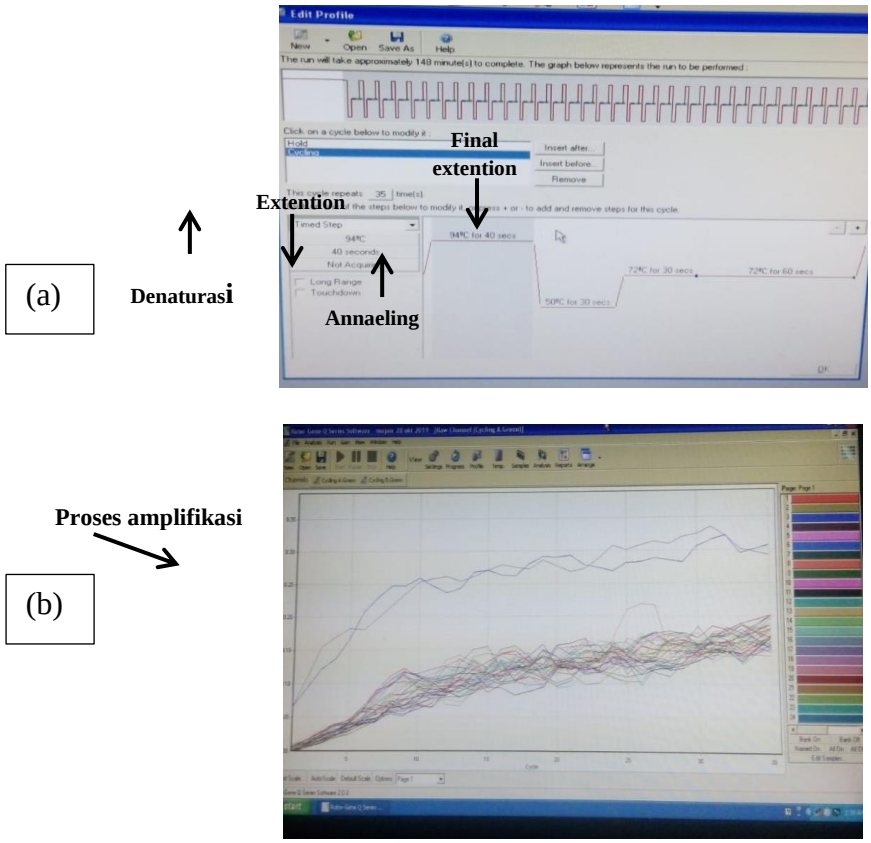


Gambar 1 Hasil ekstraksi dan purifikasi DNA jaringan otot abdomen ikan payangka

Amplifikasi dan Visualisasi Amplikon Gen 16S rRNA

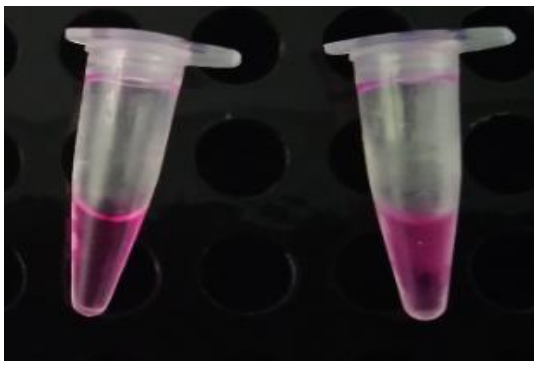
Amplifikasi dilakukan dengan metode PCR mengunakan alat *rotor gene Q Oiagen* amplifikasi dilakukan dengan komponen PCR terdiri atas 1 µ1 primer 16S Rrna, 2 µ1 dsDNA hasil ekstraksi, 25 µ1 2x My Taq HS RED Mix Bioline dan digenapkan menjadi 50 µl DdH2O.

Kondisi PCR yang digunakan terdiri dari 35 siklus, dengan tahapan di antaranya denaturasi terjadi pada suhu 94^{o}C selama 40 detik, *annealling* pada suhu 50 ^{o}C selama 30 detik, dan *extention* pada suhu 72 ^{o}C selama 30 detik. Kemudian dilanjutkan pada *final extention* pada suhu 72^{o}C selama 60 detik, pada tahap tersebut berlangsung selama 150 menit pada Gambar 2a. Pada Proses amplifikasi terjadi ditandai dengan adanya grafik yang menandakan bahwa proses amplifikasi terjadi dengan baik ditunjukkan pada Gambar 2b.



Gambar 2(a) Tahapan PCR; (b) Proses amplifikasi

Hasil akhir dari tahapan PCR ikan payangka diperoleh 50 µl yang berwarna ungu dan selanjutnya disiapkan untuk tahap elektroforesis yang akan dikirim melalui jasa sekuensing FIRST BASE Singapura yang ditunjukkan pada Gambar 3.

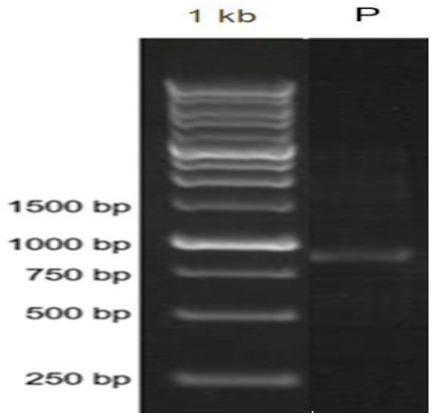


Gambar 3 Produk PCR

Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agrerosa

Visualisasi hasil amplifikasi dengan eleltroforesis gel agrerosa keberhasilan amplifikasi gen 16S rRNA dibuktikan dengan visualisasi amplikon dengan teknik elektroforesis 1,6% gel agrosa. Dari proses amplifikasi gen 16S rRNA ikan payangka tervisualisasi pada 912 *bp* berdasarkan ben yang terbentuk amplifikasi berlangsung

dengan baik berdasarkan ketebalan amplicon yang dapat dilanjutkan ke tahap sekuensing pada Gambar 4.



Gambar 4 visualisasi DNA ikan payangka diamplifikasikan dengan gen 16S rRNA

Rinanda (2011) mengatakan bahwa analisis sekuensing mengunakan gen 16S rRNA dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction)* merupakan metode yang tepat dalam menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies karena memiliki daerah yang lestari (*conseved*), salah satu keungulan dari metode ini adalah cepat dan efisien dalam mengidentifikasi bakteri patogen dan memiliki kelebihan yang lebih jika dibandingkan dengan metode mikrobiologi yang berbasis konvensional.

Barkode DNA pada *Sprirulina,* dengan menggunakan metode gen 16S rRNA yang dikulturkan pada media pupuk dan mengunakan limbah budidaya pada ikan lele berhasil didapatkan (Nurianti 2020), diperoleh rekontruksi filogeni dari *Arthuapina* dengan mengunakan metode *Neighbor Joining* (NJ).

Oktavia *et at.* (2018) berhasil mengetahui komposisi nukleotida ikan bilih (*Mystcoleucus padangensis* Bleeker) dengan menggunakan sekuen gen mitokondria 16S rRNA yang berlokasi di danau Singkarak, Solok, Sumatera Barat yang diharapkan dapat melengkapi data ilmiah karakteristik pada genetik ikan bilih.

Sarjito (2011) berhasil mengidentifikasi karakteristik molekuler ikan kerapu bebek, dengan menggunakan analisis berbasis sekuen gen 16S rRNA yang bertujuan sebagai pengukuhan karakteristik secara komprehensif atau efektif. Hasil penelitian didapatkan data bahwa isolat ikan kerapu memiliki kekerabatan dengan *Vibrio olivaceus* (99%) yang diberikan simbol JT07, V. *damsella* (99%) yang diberikan simbol JT10, dan V. *alginolyticus* (98%) yang diberi simbol dengan JT20.

Dewi *et al.* (2015) berhasil mengidentifikasi genetik *Staphylococcus* pada spesies ikan Tuna, mengunakan gen 16S rRNA berhasil didapatkan kekerabatan terdekat *Staphylococcus sciuri* dan *Staphylococcus haemolyticus.*

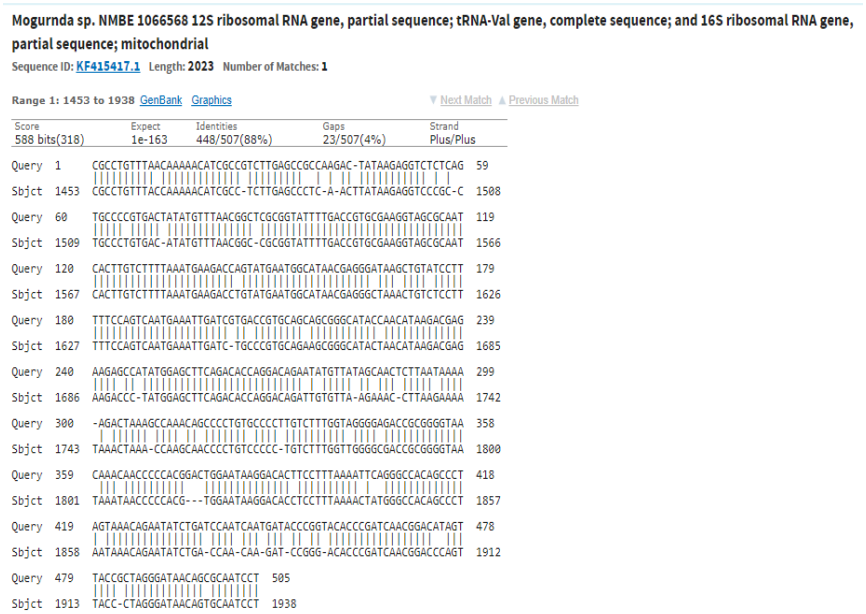
Sekuensing

Sekuensing menggunakan jasa First Base Singapura, data hasil sekuensing dalam bentuk file seq. Kemudian data hasil sekuensing di Basic Local Aligment Searching Test (Sofiyantii *et al.* 2018) pada situs NCBI (National Center for Biotechnology Information), lalu dianalisis mengunakan program MEGA 7.0 dan Geneus biometra 11.0 bertujuan untuk mendapatkan urutan nukleotida gen 16S rRNA ikan payangka yang berada pada 912 bp. Pada proses sekuensing berjalan dengan baik dan berhasil dapat dilihat dengan adanya pita kromatogram yang menunjukkan pemisahan jenis basa.

Pensejajaran Nukleutida Termirip Gen 16S rRNA Ikan Payangka

Persejajaran dianalisis pada situs NCBI (National Center for Biotechnology Information) metode BLAST (Basic Local Aligment Searching Test) pada nukleotida termirip pada gen 16S rRNA ikan payangka untuk mendapatkan sekuens dengan analisis *couting* yang bertujuan untuk mendapatkan laporan penelitian dari berbagai belahan dunia di GenBank NCBI. Hasil BLAST DNA ikan payangka menunjukkan sekuens dari aksesi memiliki kemiripan 88% terhadap spesies *Mogurnda* sp dan *Mogurnda adspersa* yang terdapat di NCBI. Pada Gambar 5, nilai skor diperoleh 588 bith yang serupa *data base segmen* yang disejajarkan yang menunjukkan nilai kemiripan yang tertinggi yang dapat dilihat pada sekuen yang serupa. Nilai *expect* menggambarkan jumlah perbedaan pensejajaran dengan skor (Wirdateti 2015) pada ikan payangka nilai *expert* pada 1e-163 , jika *expect* mendekati nol menunjukkan homologi sekuen dan jika semakin tinggi nilai *expect* maka semakin tinggi perbedaan sekuen yang dimiliki. Pada Gambar 5 terdapat istilah presentasi identitas yang diartikan sebagai seberapa persen kesamaan tertinggi pada suatu subjek yang sama, nilai presentasi identitas pada ikan payangka adalah sebesar 88%.

Pada Gambar 5 memiliki nilai nukleotida pada urutan ke-59 dari 507 nukleotida yang telah disejajarkan, lalu terdapat 448 nukleotida yang serasi dan 23 gaps. Gaps terjadi saat adanya proses pensejajaran ditandai dengan dash (Sunario 2015). Gaps bertujuan untuk mensejajarkan panjang sekuen dan terjadi biasa terjadi jika adanya perintah untuk proses pensejajaran (Sofianti 2019). Pada sekuen DNA biasa terjadi istilah indels yaitu gaps yang menunjukkan adanya mutase pada *insertion* (penyisipan) maupun *deletion* (pengurangan) suatu nukleotida (Evans dan warnau, 2018).

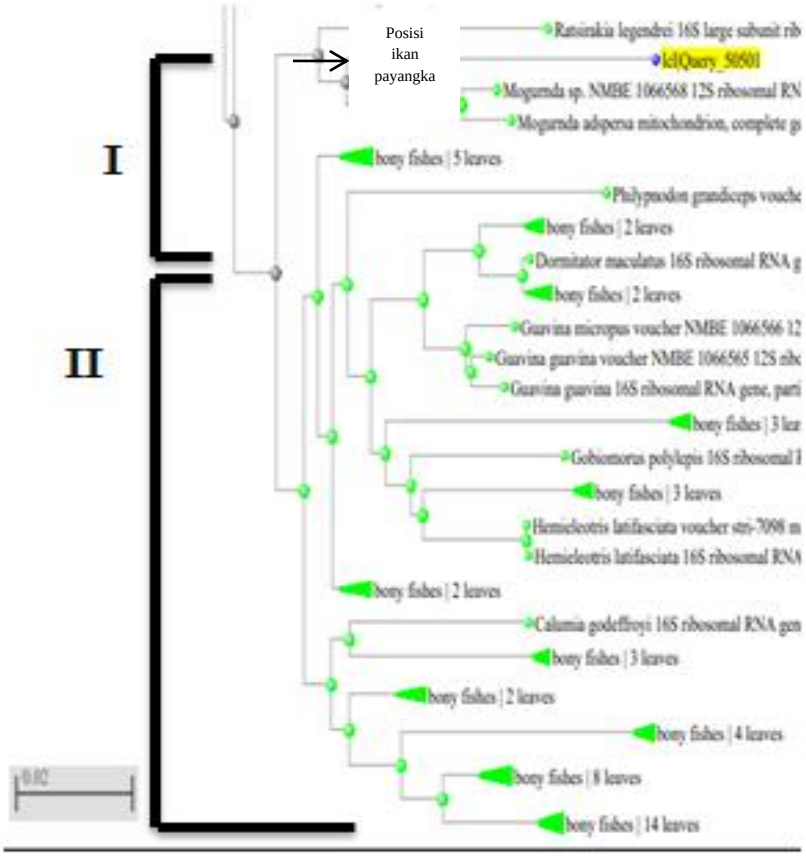


Gambar 5 Pensejajaran sekuens termirip ikan payangka

Rekontruksi Filogenetik Ikan Payangka

Pada Gambar 6 merupakan rekontruksi filogenetik ikan payangka berdasarkan sekuens 16S rRNA dilakukan dengan pendekatan rekontruksi filogeni pada situs NCBI dilakukan dengan metode *Neighbor Joining* mengunakan sekuens termirip hasil BLAST. Dapat dilihat bahwa ikan payangka memiliki 1 *group monoleptik* utama, 2

group monoleptik, keberadaan ikan payangka terdapat pada satu *group monoleptik* pertama terlihat pada bagian gambar yang ditandai oleh panah yang memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan *Mogurnda* sp dengan *Mogurnda adspersa.*



Gambar 6 Pohon Filogeni ikan payangka mengunakan metode *Neighbor Joining* mengunakan aplikasi NCBI

Ikan *Mogurnda* sp dan *Mogurnda adspersa* merupakan genus ikan air tawar yang berasal dari Australia bagian Timur dan Utara New Guinea dan beberapa spesies endemik terdapat di danau Kutuba Papua Nugini. Dilihat pada Gambar 6 dari pohon filogeni bahwa ikan payangka berada pada satu *group monoleptik* pertama yang berdekatan dengan *Mogurnda* sp dan *Mogurnda adspersa* mengunakan pendekatan *Neighbor Joining* mengunakan NCBI. Kekerabatan ikan payangka dapat dilihat dari morfologi ikan payangka (*Ophieleotris aporos*) dengan *Mogurnda* sp dan *Mogurnda aspera* yang terlihat sama dan termasuk famili Eleotridae.

KESIMPULAN

Hasil dari karakteristik amplifikasi ikan payangka (*O. aporos*) yang hidup di danau Tondano mengunakan gen 16S rRNA dengan sekuen target terdapat pada 912 *bp* dan dapat dilihat bahwa aksesi dari sekuens yang tersimpan di data NCBI dengan metode Neighbour Joining, menunjukkan bahwa memiliki kemiripan sebanyak 88 % dengan spesies *Mogurnda* sp dan *Mogurnda adspersa*.

DAFTAR PUSTAKA

Amanisal. 2010. Perubahan kondisi tubuh ikan payangka (*Ophieleotris aporos* Bleeker) di danau Tondano. *Jurnal FSP FPIK Unpatti-Ambon* 1(1): 51-55.

Evans S, Warnow T. 2018. Phylogenetic analyses of aligments with gaps. *Jurnal Statistics Berkeley* University Of California, Berkeley, CA, USA.

Lukman. 2011. Kondisi perikanan danau Limboto dan potensi perikanan ikan payangka (*Ophieleotris aporos). Jurnal*. Staf Peneliti Pusat Limnologi Lipi. *Jurnal.* 1(1): 381-389.

Nurianti Y. 2020. Barkode DNA spirulina yang dikultur menggunakan media pupuk teknis dan limbah budidaya ikan lele berdasarkan gen 16S rRNA [skripsi]. Palembang: Universitas Sriwijaya.

Oktavia L, Arisuryanti T. 2018. Komposisi nukleotida sekuen gen mitokondria 16S rRNA ikan bilih (*Mytacoleucus padangensis* Bleeker, 1852) danau Singkarak, Sumatera Barat. *Journal of Science and Technology (IJSTE)* 3(2): 10–20.

Rinanda T. 2011. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. J*ournal of Science and Technology (IJSTE)* 3(2): 1–7.

Sarjito. 2011. karakterisasi ikan kerapu secara molekuler berbasis 16 S rDNA. *Indonesian Journal of Marine Sciences* 16(4): 229-235.

Sembel DT. 2015. Toksikologi lingkungan dampak pencemaran dari berbagai bahan kimia dalam kehidupan sehari–hari. Yogyakarta: Penerbit Andi.

Soeroto B. 1988. Makanan dan reproduksi ikan payangka (*Ophieleotris aporos* (Bleeker)) di danau Tondano [*tesis*]. Fakultas Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Sofianti N, Isda MN. 2019. Paku Kawat *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. (*Lycopdiaceae-Lycopodiales*) dari Provinsi Riau kajian morfologi dan sekuen DNA berdasarkan Primer RBCL. *Jurnal biologi unand* 7(1): 43.

Sofianti N, Isda MN. 2018. Pengembangan metode SEM dan analisis DNA dalam statistika tumbuhan dari Provinsi Riau – Kajian Morfologi dan Sekuen DNA berdasarkan Primer RBCL. *Jurnal Biologi Unand* 7(4): 55.

Tristia R. 2011. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 11(3): 1442-1026.

Wirdateti EI, Handayani. 2015. Analisis sekuen DNA mitokondria Cytochrome Oxidase-1 mtDNA pada kukang Indonesia (*Nycticebus* spp) sebagai penanda guna pengembangan identifikasi spesies. *Jurnal Biologi Indonesia* 12(1): 511-866.

Zakiah AFN. 2016. Analisis DNA mitokondria dan profil protein beberapa ikan air tawar Indonesia [skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.