

Amplifikasi Gen COI dan 16s rRNA dari Invertebrata Laut *Plakobranchnus ocellatus*

Fitria Eka Aprilia¹⁾, Aris Soewondo¹⁾, Widodo¹⁾, Abdul Hamid A. Toha²⁾

¹⁾Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawjaya, Malang

²⁾Jurusan Perikanan, Fakultas Peternakan, Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Negeri Papua, Manokwari, Papua Barat

Fitria eka aprilia: aprill.lia62@yahoo.com

ABSTRAK

Studi mengenai hubungan kekerabatan, evolusi dan identifikasi spesies secara molekuler tidak terlepas dari isolasi DNA dan amplifikasi gen COI dan 16s rRNA. Keberhasilan isolasi DNA dan amplifikasi gen COI dan 16S rRNA merupakan langkah awal yang penting untuk studi mengenai hubungan kekerabatan, evolusi dan identifikasi spesies. Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen COI dan 16S rRNA dari invertebrata laut yang diambil dari Raja Ampat, *Plakobranchnus ocellatus*. Sepasang primer COI universal LCO-1490 dan HCO-2198 digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen COI dari *P. ocellatus*, sedangkan amplifikasi gen 16s rRNA menggunakan sepasang primer 16Sar-L dan 16Sbr-L. Fragmen gen COI dan 16S rRNA berhasil teramplifikasi dengan panjang amplicon masing-masing sekitar 680 bp dan 450 bp.

Kata kunci: COI, gen, identifikasi, *Plakobranchnus ocellatus* dan 16S rRNA

ABSTRACT

The first important step to study about organism relationship, evolution and species identification are DNA isolation and amplification of 16S rRNA and COI genes. This research aimed to amplify COI and 16S rRNA genes of marine invertebrates taken from Raja Ampat, *Plakobranchnus ocellatus*. A pair of COI universal primer LCO-1490 and HCO-2198 was used for ampification a fragment COI gene *P. ocellatus*, while a fragment of the 16s rRNA gene was amplified using 16Sbr-L and 16Sar-L primer. Either a fragment COI or 16S rRNA genes was successfully amplified, with a length amplicon about 680 bp and 450 bp, respectively.

Keywords : COI, gene, identification, *Plakobrancus ocellatus*, and 16S rRNA

PENDAHULUAN

Studi mengenai identifikasi spesies, evolusi dan hubungan kekerabatan tidak terlepas dari isolasi DNA dan ampifikasi gen. Gen COI dan 16S rRNA adalah gen yang sering digunakan dalam studi identifikasi spesies, evolusi dan hubungan kekerabatan [1]

Gen COI dari genom mitokondria merupakan gen standar yang sering digunakan sebagai gen penanda pada identifikasi hewan [2]. Gen COI merupakan Gen COI memiliki dua keunggulan. Pertama, primer universal dari gen

ini sangat kokoh, sehingga mampu mengenali ujung 5' dari sebagian besar kelompok hewan. Kedua, gen COI memiliki evolusi molekuler yang paling tinggi dibandingkan dengan gen-gen di mitokondria yang lain, sehingga memiliki variasi intraspesifik rendah, tetapi interspesifik divergensinya tinggi antara taksa yang berdekatan [3]. Penanda lain yang sering digunakan untuk mendukung identifikasi spesies adalah gen dari mitokondrial juga yaitu 16S rRNA. Gen 16S rRNA merupakan gen penanda lain yang berguna dalam identifikasi spesies dan

untuk menggambarkan hubungan filogenetik antara organisme laut [4].

Gen 16S rRNA digunakan sebagai penanda standar *DNA barcoding* untuk melengkapi COI [5]. Beberapa peneliti menggunakan gabungan data sekuen gen COI dan 16S rRNA untuk menyimpulkan hubungan kekerabatan melalui pohon filogeni pada kelompok hewan yang memiliki tingkat *cryptic* tinggi, seperti kelompok Moluska [1] [6] [7] [8].

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengamplifikasi gen COI menggunakan primer universal LCO-1490 dan HCO-2198 [9] dan gen 16S rRNA menggunakan primer 16Sar-L dan 16Sbr-L [10] dari invertebrata laut *Plakobranthus ocellatus*.

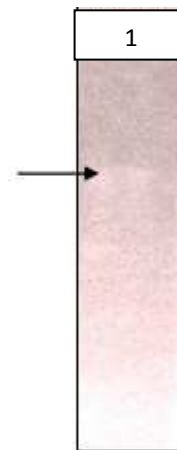
METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel. Spesimen *Plakobranthus ocellatus* diambil pada tanggal 13 Mei 2013 di Mios con, Waigeo, Raja Ampat, Papua.

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA. DNA diekstraksi dengan Gsync DNA Extraction Kit (Geneaid). Langkah-langkah ekstraksi mengikuti petunjuk produk. DNA yang telah diisolasi diamplifikasi. Fragmen gen mitokondria COI diamplifikasi menggunakan sepasang primer LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') dan HCO-2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') [9] dan fragmen gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan primer 16Sar-L (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') dan 16Sbr-H (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') [10]. Total volume reaksi yang digunakan untuk PCR yaitu 25 μ l. Campuran yang digunakan untuk PCR antara lain ddH₂O 12 μ l, PCR *mix* (Kapa Taq Extra HotStart Ready Mix PCR kit) 10 μ l, masing-masing primer (10 μ M) sebanyak 1 μ l, dan 1 μ l 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.

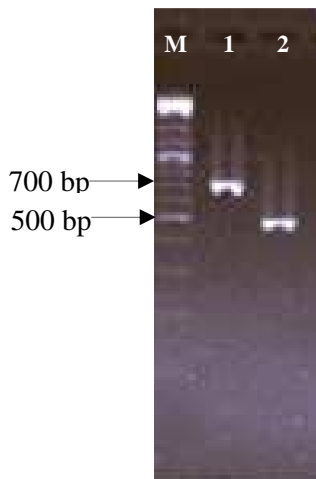
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA *Plakobranthus ocellatus*. DNA diisolasi dari jaringan *Plakobranthus ocellatus* menggunakan Gsync DNA Extraction Kit (Geneaid). Hasil isolasi DNA dilihat keberhasilannya dengan uji kualitatif elektroforesis gel agarose 1%. Berdasarkan hasil uji kualitatif isolasi DNA, DNA berhasil diisolasi, ditandai dengan terdapat pita tipis pada gel agarose (Gambar 1, ditunjuk oleh tanda panah).



Gambar 1. Hasil uji kualitatif isolasi DNA pada gel agrose 1%. 1: *Plakobranthus ocellatus*

Amplifikasi fragmen gen COI dan 16S rRNA. Sepasang primer universal LCO-1490 dan HCO-2198 [9] mampu mengamplifikasi secara spesifik gen COI pada *Plakobranthus ocellatus* dengan panjang amplicon sekitar 680 bp. Fragmen gen 16S rRNA dari *P. ocellatus* berhasil diamplifikasi menggunakan primer 16Sar-L dan 16Sbr-L [10] dengan panjang amplicon sekitar 450 bp. Panjang amplicon gen COI dan 16S rRNA yang teramplifikasi ini sudah sesuai dengan penelitian Takano [8].



Gambar 2. Hasil uji kualitatif hasil amplifikasi pada gel agarosa 1,5%. M: marker, 1: Gen COI, dan 2: gen 16s RNA.

Gen COI memiliki keunggulan, primer universalnya LCO-1490 dan HCO-2198 [9] dari gen ini sangat kokoh, sehingga mampu mengenali ujung 5' dari sebagian besar kelompok hewan, meskipun tidak semuanya, tetapi mewakili sebagian besar dari filum animalia [3].

KESIMPULAN

Fragmen gen COI dan 16s rRNA berhasil diamplifikasi dari invertebrata laut, *Plakobranthus ocellatus* dengan panjang ampikon masing-masing sekitar 680 bp dan 450 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada P. Hamid selaku ketua proyek MBRAI, USAID sebagai pemberi dana, P.Widodo dan P.Aris selaku pembimbing penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Feng, Y., Q. Li, L. Kong, dan X. Zheng. 2011. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16S rRNA genes. *Mol Biol Rep* (2011) 38:291–299.

[2] Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S. L. Ball, & J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270, 313–321.

[3] Hajibabaei, M., M.A. Smith, D.H. Janzen, J.J Rodriguez, J.B Whitfield, & P.D.N. Hebert. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6:959–964.

[4] Guo, X.D., D. Chen, T. J. Papenfuss, N.B. Ananjeva, D.A. Melnikov, Y. Wang. 2011. Phylogeny and divergence times of some racerunner lizards (Lacertidae: Eremias) inferred from mitochondrial 16S rRNA gene segments. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61 (2011) 400–412.

[5] Vences, M., M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari dan D.R Vieites. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2005, 2 :5.

[6] Christa, G., L. Wescott, T.F. Schaberle, G.M. Konig, & H. Wagele. 2012. What remains after 2 months of starvation? Analysis of sequestered algae in a photosynthetic slug, *Plakobranthus ocellatus* (Sacoglossa, Opisthobranchia), by barcoding. *Planta*.

[7] Ni, L., Q. Li, L. Kong, S. Huang, dan L. Li. 2012. DNA barcoding and phylogeny in the family Mactridae (Bivalvia:Heterodonta): Evidence for cryptic species. *Biochemical Systematics and Ecology* 44 (2012) 164-172

[8] Takano, T., Y.M. Hirano, C.D. Trowbridge, Y.J. Hirano dan Yasuyuki Watano. 2013. Taxonomic clarification in the genus Elysia (Gastropoda: Sacoglossa): *E. atroviridis* and *E. setoensis*. *Amer. Malac. Bull.* 31(1): 25–37 (2013).

[9] Folmer, O., 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* (1994) 3(5), 294-299..

[10] Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice, dan G. Grabowski. 1991. The Simple Fool's Guide to PCR. Version 2.0. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.