

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/bawal>

e-mail: bawal.puslitbangkan@gmail.com

BAWAL WIDYA RISET PERIKANAN TANGKAP

Volume 13 Nomor 3 Desember 2021

p-ISSN: 1907-8226

e-ISSN: 2502-6410

Nomor Akreditasi Kementerian RISTEK-BRIN: 148/M/KPT/2020



PENGUNAAN DNA BARCODING DALAM MENGIDENTIFIKASI LARVA GAS-TROPODA (FAMILY CYMATIIDAE) DI PERAIRAN KEPULAUAN SANGIHE- TALAUD, SULAWESI UTARA

DNA BARCODING TO IDENTIFY GASTROPOD LARVA (FAMILY CYMATIIDAE) IN THE SANGIHE-TALAUD ISLANDS, NORTH SULAWESI

Anna Rejeki Simbolon^{*1}, Medy Ompi², Ernawati Widyastuti¹ dan Diah Anggraini Wulandari³

¹Pusat Riset Oseanografi BRIN, Jalan Pasir Putih 1, Ancol Jakarta

²Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Samratulangi

³Pusat Riset Bioteknologi BRIN

Teregistrasi I tanggal: 1 Oktober 2021; Diterima setelah perbaikan tanggal: 25 Januari 2022;

Disetujui terbit tanggal: 28 Januari 2022

ABSTRAK

Perairan Kepulauan Sangihe-Talaud merupakan wilayah pemijahan hewan laut, sehingga berbagai jenis larva hewan laut dapat ditemukan di wilayah ini. Identifikasi larva gastropoda secara morfologi sangat sulit dilakukan karena tingginya kesamaan morfologi antar spesies pada fase larva. DNA Barcoding dapat digunakan untuk mengidentifikasi larva berbagai hewan laut. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi larva gastropoda dari Family Cymatiidae di Perairan Kepulauan Sangihe-Talaud. Sampel larva diambil dengan menggunakan alat *Issaac Kid Midwater Tramp* (IKMT) di kedalaman 1000 m di bawah permukaan laut pada siang dan malam hari. Barcoding DNA menggunakan primer universal LCO 1490 dan HCO 2198, pengeditan dan *alignment* sekuen DNA dalam Geneious ver. 9 dan identifikasi menggunakan BLAST di GenBank NCBI. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode neighbor joining (NJ) dan model Kimura-2i dalam MEGA X. Sebanyak 39 spesimen larva Cymatiidae terdiri atas 6 genus yaitu *Reticutriton*, *Monoplex*, *Turritriton*, *Cymatium*, *Gutturnium*, dan *Ranularia*; lima spesies teridentifikasi: *Reticutriton pfeifferianus*, *Monoplex aquatilis*, *Monoplex comptus*, *Cymatium cingulatum* dan *Gutturnium muricinum*, dengan tingkat kesamaan 97,32-100%. Berdasarkan pohon filogenetik sebagian sekuen individu termasuk kelompok monofiletik sedangkan genus *Monoplex* bersifat polifiletik dan mengelompok dalam genus yang berbeda dengan nilai bootstrap yang cukup tinggi. Jarak genetik antar spesies berkisar 0,0761-0,1737 dengan jarak genetik antar spesies terendah pada *Monoplex comptus* dan *Reticutriton pfeifferianus*. Penelitian ini menyimpulkan DNA barcoding dapat digunakan dalam mengidentifikasi larva Gastropoda khususnya family Cymatiidae. Identifikasi jenis hewan laut secara dini menjadi salah satu kunci penting dalam pengelolaan lestari jenis hewan laut. Identifikasi larva yang tepat akan berguna dalam pengelolaan konservasi suatu wilayah perairan.

Kata Kunci: DNA Barcoding; larva; Gastropoda; Cymatiidae; Sangihe-Talaud

ABSTRACT

The seas around the Sangihe-Talaud Islands are a spawning ground for marine animals, so that the larva of many marine animals can be found in this area. Morphological identification of gastropod larvae is very difficult because of the high morphological similarities between species in the larval stage. DNA Barcoding can be used to identify the larvae of various marine animals. This study aims to identify gastropod larvae, especially the family Cymatiidae, in the waters around the Sangihe-Talaud Islands. Larvae samples were collected using an Issaac Kid Midwater Tramp (IKMT) at a depth of 1000m below sea level during the day and night. DNA barcoding used the universal primers LCO 1490 and HCO 2198. DNA sequences were edited and aligned in Geneious ver 9 and identified using the NCBI GenBank BLAST routine. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor joining (NJ) method with the Kimura-2 model. A total of 39 Cymatiidae larvae were identified as belonging to 6 genera: Reticutriton, Monoplex, Turritriton, Cymatium, Gutturnium, and Ranularia; five species were identified: Reticutriton pfeifferianus, Monoplex aquatilis, Monoplex comptus, Cymatium cingulatum and Gutturnium muricinum, with a similarity of 97.32-100%. Based on the phylogenetic tree, some of the

Korespondensi penulis:
annarejekisimbolon@gmail.com

individual sequences belong to monophyletic groups, while the Monoplex genus is polyphyletic and grouped into several genera with relatively high bootstrap values. The genetic distance between species ranged from 0.0761-0.1737 with the lowest inter-species genetic distance between Monoplex comptus and Reticutricon pfeifferianus. This study concludes that DNA barcoding can be used to identify gastropod larvae, in particular the family Cymatiidae. Early identification of marine animal species is an important key to the sustainable management of marine animals. Identification of gastropod larvae can support the conservation management of marine waters.

Keywords: DNA Barcoding; larvae; Gastropods; Cymatiidae; Sangihe-Talaud

PENDAHULUAN

Gastropoda merupakan kelas terbesar dari phylum Moluska serta salah satu kelompok hewan laut dengan keanekaragaman spesies dan kelimpahan yang tinggi (Zapata *et al.*, 2014). Jumlah gastropoda laut yang telah diteliti berkisar 32.000 hingga 40.000 spesies, meskipun jumlah tersebut diduga hanya sekitar 23-32% dari jumlah total spesies gastropoda yang diestimasi (Appeltans *et al.*, 2012). Tingginya keanekaragaman spesies gastropoda belum diikuti dengan jumlah kajian mengenai taxonomi, sistematika hingga sejarah evolusi dan kekerabatan antar kelompok gastropoda. Identifikasi specimen umumnya hanya berdasarkan karakter morfologi dari cangkang, operculum dan radula (Barco *et al.*, 2016). Identifikasi spesies hanya berdasarkan karakter morfologi dapat menyebabkan terjadinya perkiraan spesies yang berlebih (*species overestimation*), karena beberapa kelompok Gastropoda memiliki plastisitas fenotipik yang tinggi, misalnya *Littorina saxatilis* yang memiliki kemampuan dalam mengubah fenotipenya sesuai dengan kondisi lingkungan sekitarnya; sebaliknya, penggunaan karakter morfologi tidak dapat membedakan spesies bersifat *cryptic* sehingga dapat pula terjadi pengurangan (*underestimation*) jumlah spesies yang sebenarnya (Borges *et al.*, 2016). Metode identifikasi spesies berdasarkan karakter morfologi juga sulit diterapkan pada stadium larva (Ran *et al.*, 2020).

Identifikasi molekular dapat digunakan untuk melengkapi kekurangan pada identifikasi secara morfologi (Simbolon *et al.*, 2021). Salah satu penanda molekular yang dapat digunakan dalam identifikasi spesies adalah DNA mitokondria cytochrome oxidase I (mtDNA COI) yang lazim disebut sebagai DNA barcode. COI cenderung sangat mirip (*conserved*) pada suatu spesies dan berbeda antar spesies sehingga dapat digunakan sebagai penanda spesies (Palanisamy *et al.*, 2020). DNA barcoding telah menjadi teknik identifikasi secara molekular yang umum digunakan (Hebert *et al.*, 2003). Dibanding metode morfologi, DNA barcoding lebih akurat dalam mengidentifikasi spesies kriptik, yaitu spesies dengan karakter morfologi yang sama (Simbolon *et al.*, 2021), dan juga berguna dalam identifikasi specimen yang telah rusak (Yang *et al.*, 2010) serta untuk mengidentifikasi specimen pada berbagai stadium pertumbuhan (telur, larva hingga dewasa) (Azmir *et al.*, 2017). DNA barcoding telah digunakan dalam mengidentifikasi gastropoda laut di

Perairan Pulau Robben, Afrika Selatan (Van Der Bank & Greenfield, 2015), keanekaragaman spesies gastropoda laut di pesisir Portugis (Borges *et al.*, 2016) dan digunakan dalam mengidentifikasi gastropoda laut stadium larva di Perairan Pulau Hainan, China (Ran *et al.*, 2020).

Sebagai salah satu negara di kawasan Segitiga Terumbu Karang (*Coral Triangle*), Indonesia merupakan negara kepulauan dengan tingkat keanekaragaman hayati laut yang tinggi. Namun, rendahnya sikap kepedulian masyarakat dan kurangnya perhatian pemerintah terhadap kelestarian ekosistem pesisir membiarkan kawasan pesisir tercemar (Simbolon, 2017; Simbolon, 2018). Van der Meij (2009) menyebutkan pencemaran dan tekanan tinggi pada perairan pesisir dapat menyebabkan pergeseran struktur komunitas bentik dan hilangnya keanekaragaman.

Perairan Sangihe-Talaud terletak diantara Laut Sulawesi dan Samudra Pasifik. Di dasar perairan terdapat beberapa gunung bawah laut dan rekahan hidrotermal (*hydrothermal vents*) di sekitar Pulau Kawio dan Pulau Mangehetang serta pertemuan antara lempeng Filipina dan lempeng Eurasia yang membentuk *ridge* memanjang dari utara Pulau Kawio hingga Kepulauan Halmahera (Manini *et al.*, 2008). Adanya aktivitas gunung bawah laut menjadikan perairan ini sebagai sumber air hangat dan daerah pemijahan biota laut (Adams *et al.*, 2012). Wilayah perairan ini juga merupakan salah satu pintu masuk Arus Lintas Indonesia atau Arlindo (Feng *et al.*, 2015) yang akan membawa berbagai macam larva hewan laut masuk ke berbagai wilayah perairan Indonesia lainnya (Gordon & Fine, 1996).

Karakteristik perairan yang unik dan kompleks membuat perairan Kepulauan Sangihe-Talaud penting untuk dijaga dan dilestarikan. Namun, informasi mengenai keanekaragaman spesies di wilayah laut bagian utara kepulauan tersebut masih terbatas. Sebagai hewan laut dengan keanekaragaman yang tinggi, hampir 90% spesies Kelas Gastropoda belum terdokumentasikan secara molekular (Barco *et al.*, 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi larva Gastropoda di perairan sekitar Kepulauan Sangihe-Talaud melalui DNA barcoding serta menyusun pohon filogenetiknya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi akurat berbasis analisis molekular mengenai jenis-jenis larva Gastropoda di perairan

Kepulauan Sangihe Talaud, Sulawesi Utara, untuk mendukung pengelolaan lestari hewan laut khususnya Gastropoda.

BAHANDANMETODE

Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini adalah bagian dari kegiatan Ekspedisi Widya Nusantara (EWIN) dengan menggunakan kapal riset Baruna Jaya VIII yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Oseanografi LIPI pada Oktober 2018. Pelayaran dilakukan selama 19 hari pada 5-24 Oktober 2021. Pengambilan sampel dilakukan pada 33 stasiun dengan jarak 30-50 mil antar stasiun di perairan sekitar Kepulauan Sangihe-Talaud dan Pulau Miangas mulai dari perairan Bitung menuju Maluku, melintasi Pulau Miangas dan kembali ke Bitung melalui sisi timur kepulauan Sangihe-Talaud (Gambar 1). Sampel larva diambil dengan menggunakan alat *Issac Kid Midwater Tramp* (IKMT) pada kedalaman 1000 m di bawah permukaan laut pada siang dan malam hari. Larva Gastropoda disortir dengan pinset larva, difoto dan dimasukkan ke dalam microtube yang berisi larutan ethanol absolut untuk proses DNA barcoding. Terdapat 39 spesimen larva Gastropoda dari Famili Cymatiidae yang berhasil dianalisa.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA larva Gastropoda menggunakan kit Qiagen DNEasy dengan protokol standar (No catalog ID 69506). Larva gastropoda utuh ditempatkan dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 mL yang berisi 180 μ L larutan buffer ATL (*tissue lysis buffer*) kemudian larva dihaluskan dengan menggunakan gunting bedah. Sampel ditambahkan 20 μ L proteinase K dan divortex selama satu menit, kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 56°C di dalam *thermostat waterbath*. Sampel yang telah diinkubasi divortex lagi selama 15 detik dan ditambahkan 200 μ L buffer AL dan 200 μ L ET-OH (96%-100%) lalu divortex selama dua menit. Selanjutnya, sampel dipindahkan ke dalam DNEasy *mini spin column* yang sudah ditempatkan dalam *collection tube* 2 mL. Sampel disentrifugasi pada 8.000 rpm selama satu menit. Hasil sisa residu sentrifugasi (*supernatant*) dibuang dan DNEasy *spin column* dengan *pellet* DNA dipindahkan dalam 2 mL *collection tube* yang baru. Selanjutnya ditambahkan 500 μ L buffer AW1 (*buffer wash* 1) dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama satu menit. *Spin column* ditempatkan dalam 2 mL *collection tube* baru dan ditambahkan 500 μ L buffer AW2 (*buffer wash* 2); kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm selama tiga menit. Selanjutnya *spin column* dipindahkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 mL baru. Elutasi DNA dilakukan dengan menambahkan 200 μ L buffer AE (*elution buffer*) lalu diinkubasi selama satu menit pada suhu ruang

dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama satu menit. Konsentrasi dan kualitas ekstrak DNA diukur dengan nanophotometer IMPLN dan disimpan di *freezer* pada suhu -80°C.

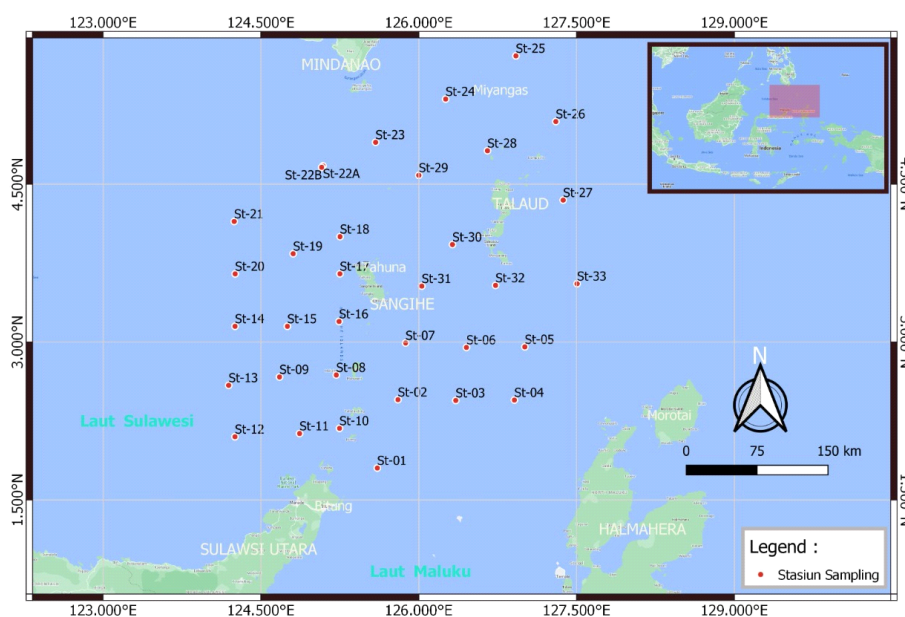
Amplifikasi DNA

Segmen gen COI dari genom mitokondria diamplifikasi menggunakan pasangan *universal primer* khusus DNA barcoding yaitu primer *forward* LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') dan primer *reverse* HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Amplifikasi DNA melalui prosedur PCR dilakukan dengan pembuatan larutan PCR yang terdiri dari 19,7 μ L ddH₂O; 3 μ L Taq buffer; 3 μ L MgCl₂; 0,6 μ L dNTPmix; 0,5 μ L BSA, 1 μ L primer *forward* (LCO 1490) dan primer *reverse* (HCO 2198); 0,2 μ L Taq DNA; serta 1 μ L DNA template (\pm 100 ng).

Proses amplifikasi mengikuti protokol standar di laboratorium untuk amplifikasi barcode pada invertebrata mengacu pada Folmer *et al.*, 1994. Profil PCR mengatur suhu mesin PCR seperti berikut: suhu *pre-denaturation* 95°C selama lima menit; 35 siklus dengan masing-masing denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, annealing pada suhu 40°C selama 1 menit; serta *extension* pada suhu 72°C selama satu menit 30 detik; dan diakhiri dengan *post extension* pada suhu 72°C selama lima menit. Visualisasi hasil PCR menggunakan elektroforesis pada gel agar-agar 2% di bawah UV transluminator. Produk PCR yang teramplifikasi dari semua sampel kemudian dikirim ke Macrogene Singapura untuk dilakukan sekuensing DNA (*Sanger sequencing*).

Analisis Data Hasil Sekuen

Sekuens yang dihasilkan diedit dan diurutkan (*alignment*) dengan menggunakan program Geneious Prime. Hasil editan kemudian dicocokkan dengan sekuens yang telah tersimpan sebagai *accession* pada basis data nukleotide GenBank NCBI dengan menggunakan fasilitas *Basic Local Assignment Search Tool* (BLAST). Prinsip identifikasi atau validasi spesies menggunakan BLAST adalah mencocokkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens spesies (*accession*) yang memiliki tingkat kesamaan tertinggi. Konstruksi pohon filogenetik dalam program MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) menggunakan sekuens yang dihasilkan dari sampel serta sekuens-sekuens dari GenBank dengan tingkat kesamaan tertinggi. Analisis filogenetik dilaksanakan berdasarkan metode neighbor joining (NJ) dengan model Kimura-2 parameter dan menggunakan 1.000x bootstrap (Keskin & Atar, 2013). *Outgroup* yang digunakan adalah *Peracle reticulata* (*Accession* KC774089.1).



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel di Perairan Kepulauan Sangihe-Talaud, Sulawesi Utara
 Figure 1. Sampling locations in the waters around the Sangihe-Talaud Islands, North Sulawesi

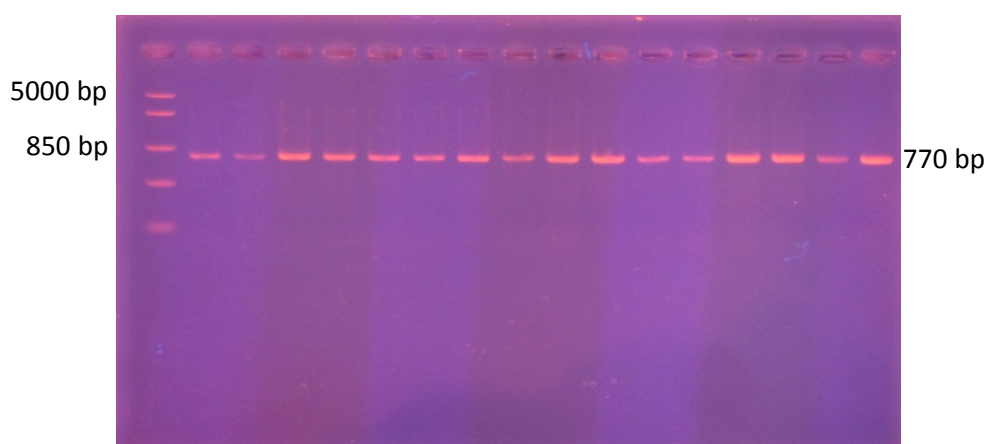
HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Diperoleh sekuens DNA barcode dari sebanyak 39 spesimen larva Cymatiidae yang berhasil di ekstraksi dan di amplifikasi dengan pasangan universal primer LCO 1490 dan HCO 2198. Keberhasilan amplifikasi DNA ditandai dengan munculnya pita (band) dengan panjang produk PCR sekitar 770 bp (Gambar 2). Tidak ditemukan stop kodon pada sekuens sehingga tidak terjadi bias pada analisa yang dilakukan (Barco *et al.*, 2016). Dari *alignment*

dihasilkan 39 sekuens dengan panjang 647 bp yang dapat dianalisa lebih lanjut.

Hasil BLAST menunjukkan bahwa sampel yang diperoleh terdiri dari 6 genus yaitu *Reticutriton*, *Monoplex*, *Turritriton*, *Cymatium*, *Gutturium*, dan *Ranularia*, dengan tingkat kesamaan sekuens 90-100%. Proses BLAST hanya mampu mengidentifikasi hingga tingkat spesies sebanyak 8 spesimen dengan tingkat kesamaan 97-100%. (Tabel 1). Morfologi larva yang teridentifikasi disajikan pada Gambar 3.



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen COI menggunakan barcode DNA universal primer LCO 1490 dan HCO 2198 berupa produk PCR sebesar ± 770 bp

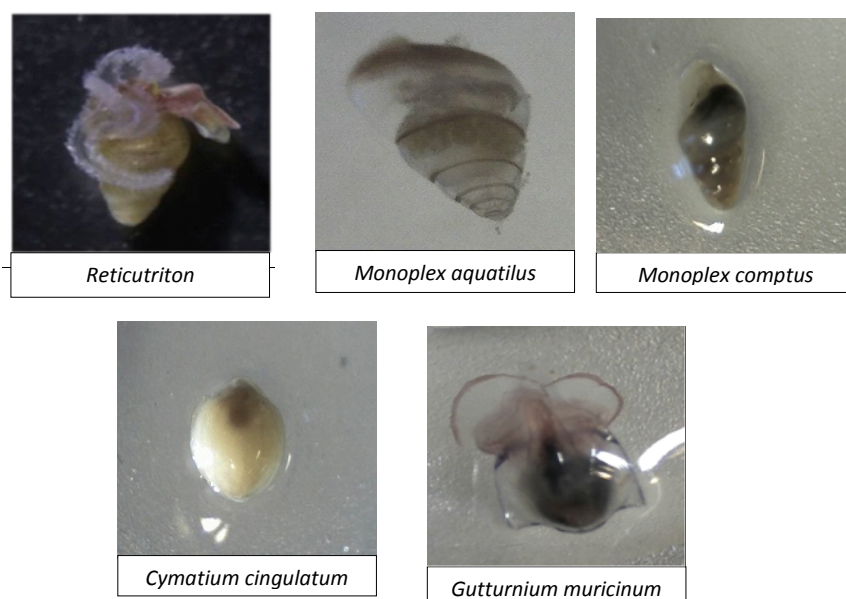
Figure 2. COI gene amplification PCR product of ± 770 bp obtained using universal DNA barcode primers LCO 1490 and HCO 2198

Tabel 1. Identifikasi larva Cymatiidae berdasarkan BLAST terhadap DNA barcode
 Table 1. Identification of Cymatiidae larvae based on DNA barcode BLAST results.

No	Kode DNA	Identitas sekuens terdekat hasil BLAST	% Identik	Nil ai E	Nomor Accession	Justifikasi Spesies (97-100%)
1	ML1	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,49	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
2	ML13	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,67	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
3	ML20	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,9	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
4	ML21	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,2	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
5	ML36	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,54	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
6	ML40	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,93	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
7	ML47	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,49	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
8	ML86	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,82	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
9	ML90	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,35	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
10	ML126	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,82	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
11	ML150	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,66	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
12	ML151	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,78	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
13	ML152	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,35	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
14	ML165	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,54	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
15	ML147	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,44	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
16	ML194	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,97	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
17	ML196	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,13	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
18	ML17	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,72	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
19	ML29	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,3	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
20	ML185	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	99,45	0	MH581362.1	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>
21	ML186	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	93,35	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
22	ML167	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,35	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
23	ML192	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,28	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
24	ML180	<i>Reticutriton pfeifferianus</i>	94,28	0	MH581362.1	<i>Reticutriton sp</i>
25	ML31	<i>Monoplex aquatilis</i>	100	0	MH581344.1	<i>Monoplex aquatilis</i>
26	ML166	<i>Monoplex aquatilis</i>	100	0	MH581344.1	<i>Monoplex aquatilis</i>
27	ML118	<i>Monoplex aquatilis</i>	100	0	MH581344.1	<i>Monoplex aquatilis</i>
28	ML22	<i>Monoplex comptus</i>	97,32	0	MH581345.1	<i>Monoplex comptus</i>
29	ML53	<i>Monoplex comptus</i>	91,98	0	MH581345.1	<i>Monoplex sp</i>
30	ML193	<i>Monoplex comptus</i>	93,97	0	MH581345.1	<i>Monoplex sp</i>
31	ML62	<i>Turritriton labiosus</i>	92,69	0	MH581381.1	<i>Turritriton sp.</i>
32	ML63	<i>Turritriton labiosus</i>	93,01	0	MH581381.1	<i>Turritriton sp.</i>
33	ML144	<i>Turritriton labiosus</i>	92,24	0	MH581381.1	<i>Turritriton sp.</i>
34	ML32	<i>Turritriton tenuiliratus</i>	91,88	0	MH581382.1	<i>Turritriton sp.</i>
35	ML16	<i>Ranularia caudata</i>	94,32	0	MH581360.1	<i>Ranularia sp</i>
36	ML137	<i>Cymatium sp</i>	90,06	0	JX241359.1	<i>Cymatium sp</i>
37	ML99	<i>Cymatium cingulatum</i>	100	0	HQ834114.1	<i>Cymatium cingulatum</i>
38	ML141	<i>Gutturnium muricinum</i>	99,06	0	MH581338.1	<i>Gutturnium muricinum</i>
39	ML148	<i>Gutturnium muricinum</i>	99,45	0	MH581338.1	<i>Gutturnium muricinum</i>

Pohon filogenetik family Cymatiidae yang dihasilkan disajikan pada Gambar 4. Individu mengelompok pada 6 genus yang seluruhnya termasuk Family Cymatiidae. Selain genus *Monoplex*, semua individu dari setiap genus termasuk kelompok monofiletik dan individu dari spesies yang sama membentuk suatu cabang. Namun genus

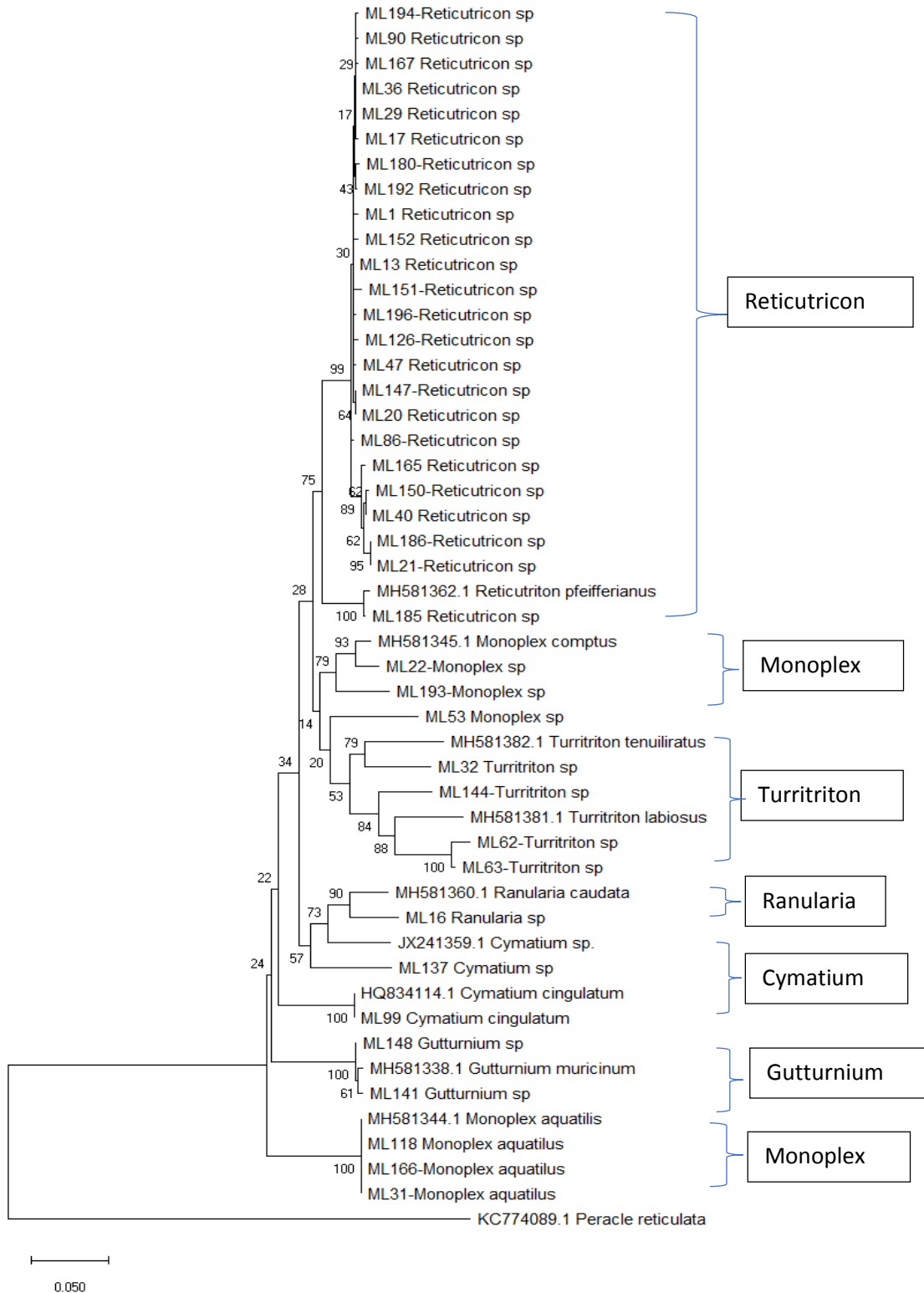
Monoplex terdiri atas tiga cabang dengan jarak relatif besar. Jarak genetik antar sampel berkisar 0,0761-0,1737 dengan jarak genetik antar spesies terendah pada *Monoplex comptus* dan *Reticutriton pfeifferianus* yaitu 0,0761 dan tertinggi pada *Cymatium sp* dan *Turritriton sp* yaitu 0,1737 (Tabel 2).



Gambar 3. Morfologi larva gastropoda (Family Cymatiidae) yang teridentifikasi dengan DNA barcoding
 Figure 3. Morphology of gastropod larvae (Family Cymatiidae) identified through DNA barcoding

Tabel 2. Jarak genetik antar larva famili Cymatiidae di Perairan Sangihe-Talaud Sulawesi Utara
 Table 2. Genetic distance between larvae of the family Cymatiidae from Sangihe-Talaud, North Sulawesi

	ML118 <i>Monoplex aquatilis</i>	ML137 <i>Cymatium sp</i>	ML141 <i>Gutturium muricinum</i>	ML144 <i>Turritriton sp</i>	ML16 <i>Ranularia sp</i>	ML185 <i>Reticutriton pfeifferanus</i>	ML22 <i>Monoplex comptus</i>	ML32 <i>Turritriton sp</i>	ML62 <i>Turritriton sp</i>	ML63 <i>Turritriton sp</i>
ML137 <i>Cymatium sp</i>	0,1539									
ML141 <i>Gutturium muricinum</i>	0,1189	0,1320								
ML144 <i>Turritriton sp</i>	0,1591	0,1509	0,1641							
ML16 <i>Ranularia sp</i>	0,1258	0,1067	0,1395	0,1251						
ML185 <i>Reticutriton pfeifferanus</i>	0,1213	0,1042	0,1280	0,1251	0,1046					
ML22 <i>Monoplex comptus</i>	0,1327	0,1205	0,1232	0,1112	0,1231	0,0761				
ML32 <i>Turritriton sp</i>	0,1446	0,1295	0,1324	0,1103	0,1158	0,1184	0,1113			
ML62 <i>Turritriton sp</i>	0,1715	0,1737	0,1643	0,0924	0,1502	0,1347	0,1277	0,1243		
ML63 <i>Turritriton sp</i>	0,1689	0,1711	0,1517	0,0833	0,1353	0,1299	0,1277	0,1123	0,0157	
ML99 <i>Cymatium cingulatum</i>	0,1125	0,1295	0,1124	0,1323	0,1303	0,0979	0,1000	0,1376	0,1445	0,1371



Gambar 4. Pohon Filogenetik Gastropoda (Family Cymatiidae) menggunakan metode neighbor joining (NJ) model Kimura 2 parameter, dan 1.000 replikasi bootstrap.

Figure 4. Cymatiidae phylogenetic tree using the neighbor joining (NJ) method with Kimura-2 parameter model and 1000 bootstrap replications.

Bahasan

Individu-individu di dalam suatu spesies memiliki persentase kesamaan (nilai similaritas) barcode yang tinggi. Maduppa *et al.* (2017) mengatakan nilai identitas yang mendekati 100% serta nilai $E = 0$ menunjukkan spesies yang sama dengan tingkat kepercayaan tinggi; sementara itu, kesamaan barcode di bawah 97% umumnya menunjukkan spesies yang berbeda (Hebert *et al.*, 2003). Penelitian ini menghasilkan sekuens barcode dari 39 spesimen larva Cymatiidae, dimana 8 spesimen teridentifikasi hingga spesies dengan jarak kesamaan 97-100% yaitu *Reticutriton pfeifferianus*, *Monoplex aquatilis*, *Monoplex comptus*, *Cymatium cingulatum* dan *Gutturium muricinum*. Spesimen lain teridentifikasi hingga tingkat genus dengan tingkat (atau persentase) kesamaan kurang dari 97% dengan sekuens yang tersimpan di GenBank. Penelitian Puillandre *et al.* (2009) juga mendapatkan hasil serupa dimana dari 24 spesimen larva gastropoda DNA barcoding hanya dapat mengidentifikasi 1 spesimen hingga tingkat spesies. Akurasi penggunaan DNA barcoding dalam proses identifikasi larva sangat bergantung pada kelengkapan basis data GenBank (Puillandre *et al.*, 2009). Namun membuat basis data sekuens referensi yang lengkap dan akurat adalah hal yang sulit karena sulitnya mengidentifikasi larva secara morfologi pada hewan dengan tingkat variasi spesies yang tinggi namun mirip secara morfologi pada fase larva (Kusbiyanto *et al.*, 2020), sehingga pengkayaan berupa identifikasi secara morfologi pada fase juvenil atau dewasa perlu dilakukan sebagai referensi dalam identifikasi pada fase larva.

Pohon filogenetik menjadi salah satu cara mengidentifikasi hubungan atau kekerabatan antar taksa ketika perbandingan sekuens sampel dengan basis data sekuens GenBank menghasilkan sekuens terdekat dengan nilai similaritas yang rendah (Puillandre *et al.*, 2009). Berdasarkan pohon filogenetik, sebagian besar sekuens spesimen termasuk dalam salah satu kelompok monofiletik dan setiap spesies mengelompok dalam salah satu diantara 6 genus yaitu *Reticutriton*, *Monoplex*, *Turritriton*, *Ranularia*, *Cymatium*, dan *Gutturium*. Tingginya nilai bootstrap menunjukkan bahwa struktur pohon memiliki validitas atau tingkat akurasi yang baik (Dharmayanti, 2011). Kemudian setiap sekuens sampel mengelompok dengan sekuens GenBank dengan nilai bootstrap yang tinggi. Pengelompokan monofiletik dengan nilai bootstrap yang tinggi mengindikasikan DNA barcoding, khususnya dengan menggunakan sekuens mtDNA COI, dapat digunakan untuk mengidentifikasi larva famili Cymatiidae dengan tingkat kepercayaan relatif tinggi. Hal yang sama ditemukan pada larva gastropoda di Perairan Pulau Hainan, China (Ran *et al.*, 2020).

Cymatiidae merupakan salah satu family pada kelompok Tonnoidea dengan klasifikasi yang masih diperdebatkan hingga saat ini, dengan adanya sinonim pada beberapa genus misalnya *Biplex* hingga perlunya revisi taksonomik pada genus *Monoplex*, salah satu genus dari kelompok Tonnoidea yang bersifat polifiletik, bahkan subset dari genus ini berada pada satu clade yang sama dengan genus monotipe *Gutturium*, (Strong *et al.*, 2019). Pada penelitian ini, genus *Monoplex* bersifat polifiletik dan terdiri dari tiga cabang (Gambar 3). Oleh karena belum adanya revisi taksonomik, dan belum jelas clade yang mana seharusnya disebutkan sebagai genus *Monoplex* (Strong *et al.*, 2019), identifikasi spesimen yang tergolong dalam genus tersebut masih bersifat sementara.

Jarak genetik dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan genetik antar individu, dimana jarak genetik cenderung meningkat seiring dengan kenaikan perbedaan klasifikasi tingkat taksonomi (Ran *et al.*, 2020). Penelitian ini menunjukkan bahwa *Reticutriton pfeifferianus* dan *Monoplex comptus* memiliki jarak genetik antar spesies terendah. Rendahnya jarak genetik yang mengindikasikan sedikitnya perbedaan genotip antar spesies disertai tingginya kesamaan morfologi antar spesies, dimana morfologi larva *Reticutriton pfeifferianus* dan *Monoplex comptus* hampir sama (Gambar 2). Strong *et al.* (2019) mengemukakan *Monoplex comptus* sebagai kelompok saudara (*sister group*) dari *Reticutriton pfeifferianus*. Rendahnya jarak genetik antar spesies kemungkinan terkait dengan tingginya kesamaan morfologi, kesamaan morfologi yang tinggi akan menyulitkan identifikasi spesies secara morfologi (Simbolon *et al.*, 2021).

Penelitian ini merupakan penelitian pertama tentang identifikasi larva Cymatiidae dengan menggunakan DNA barcoding di perairan Kepulauan Sangehe dan Talaud. Famili Cymatiidae tergolong gastropoda predator yang umumnya hidup di perairan subtropis hingga tropis (Strong *et al.*, 2019). *Reticutriton pfeifferianus* merupakan spesies dengan kelimpahan yang tinggi dibandingkan spesies lain di perairan laut; *R. pfeifferianus* umum ditemukan di perairan Singapura (Tan & Woo, 2010), dan ditemukan di Perairan Zona Ekonomi Eksklusif Serawak, Malaysia pada kedalaman 29-74 m (Morni *et al.*, 2017). *Monoplex sp* terdistribusi di sebagian besar lautan tropis dunia dari Afrika Timur dan Laut Merah ke Hawaii, laut India hingga Atlantik (referensi?). Sementara itu, *Gutturium muricinum* tersebar di seluruh wilayah perairan Indo-Pasifik Barat (Beu *et al.*, 2012).

Reticutriton, *Monoplex*, *Turritriton*, *Ranularia*, *Cymatium*, dan *Gutturium* merupakan anggota kelompok gastropoda Tonnoidea dengan kelimpahan tinggi dan terdistribusi luas di perairan laut dibandingkan jenis

moluska lainnya. Hal ini disebabkan sifat *planktotrophic* larvanya dimana durasi fase larva dapat berlangsung hingga berbulan-bulan; Scheltema (1971) memperkirakan fase larva pada beberapa spesies dari genus *Monoplex* dapat berlangsung selama lebih dari satu tahun. Selama fase planktonik, larva gastropoda tersebut menghasilkan sangat sedikit kalsium karbonat ke cangkangnya (Pechenik *et al.*, 1984).

Identifikasi spesies secara dini, khususnya di daerah pemijahan hewan laut, diperlukan agar pengelolaan spesies dapat dilakukan secara tepat; namun identifikasi larva secara morfologi cenderung sangat sulit dilakukan, dikarenakan tingginya kesamaan morfologi pada fase larva (Kusbiyanto *et al.*, 2020). DNA barcoding telah digunakan dalam mengidentifikasi hewan laut antara lain larva Krustasea (Kusbiyanto *et al.*, 2020); larva Nudibranchia (Hirose *et al.*, 2014); larva ikan (Pereira *et al.*, 2013) dan larva Decapoda (Palero *et al.*, 2016). Penelitian ini menunjukkan bahwa DNA barcoding dapat digunakan untuk mengidentifikasi sedikitnya sebagian larva Gastropoda, khususnya Cymatiidae, hingga tingkat spesies. Namun demikian, proporsi terbesar hanya teridentifikasi pada tingkat genus, hal yang menunjukkan pentingnya adanya upaya barcoding moluska pada fase juvenil dan atau dewasa yang lebih mudah diidentifikasi secara morfologi untuk memperkaya basis data sebagai referensi untuk identifikasi fase larva.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA barcoding dapat digunakan untuk mengidentifikasi larva gastropoda dari family Cymatiidae. Di Perairan Kepulauan Sangihe Talaud, Sulawesi Utara, dari 39 spesimen larva Cymatiidae sebanyak 8 spesimen teridentifikasi pada tingkat spesies (*Reticutriton pfeifferianus*, *Monoplex aquatilis*, *Monoplex comptus*, *Cymatium cingulatum* dan *Gutturium muricinum*) dengan tingkat kesamaan 97,32 – 100%. Hasil BLAST serta pohon filogenetik menunjukkan bahwa ke-39 specimen tersebut terdiri dari 6 genus yaitu *Reticutriton*, *Monoplex*, *Turritriton*, *Ranularia*, *Cymatium* dan *Gutturium*. *Reticutriton pfeifferianus* dan *Monoplex comptus* memiliki jarak genetik terendah serta kesamaan morfologi yang tinggi. Penelitian ini mengonfirmasi bahwa perairan Kepulauan Sangihe Talaud merupakan wilayah pemijahan hewan laut. Diperlukan pengayaan basis data barcode dengan menggunakan individu juvenil atau dewasa yang telah memiliki ciri morfologi yang memungkinkan untuk diidentifikasi dengan baik sebagai referensi pada identifikasi fase larva. Identifikasi larva hewan laut, khususnya Gastropoda, pada fase larva diharapkan dapat mendukung pengelolaan lestari jenis hewan laut tersebut di wilayah tersebut.

PERSANTUNAN

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Penelitian Oseanografi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang mengizinkan penelitian ini berlangsung. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Pak Riyana dan (Alm) Pak Jhon yang telah membantu dalam pengambilan sampel. Terima kasih kepada Pak Abu yang telah membantu membuat peta lokasi sampel. Penelitian ini dibiayai oleh Pusat Penelitian Oseanografi LIPI melalui hibah DIPA LIPI-EWIN 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, D.K., S.M. Arellano, & B. Govenar. (2012). Larval dispersal: Vent life in the water column. *Oceanography* 25(1):256–268. doi:<https://doi.org/10.5670/oceanog.2012.24>.
- Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G.I. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology*, 22, 2189–2202. Doi: [10.1016/j.cub.2012.09.036](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036).
- Azmir, I.A., Esa, Y., Amin, S.M.N., Md Yasin, I.S., Md Yusof, F.Z. (2017). Identification of larval fish in mangrove areas of Peninsular Malaysia using morphology and DNA barcoding methods. *J. Appl. Ichthyol*, 33, 998–1006. Doi: <https://doi.org/10.1111/jai.13425>.
- Barco, A., Michael, J., Raupach., Silke, L., Hermann., Neumann., & Thomas, K. N. (2016). Identification of North Sea molluscs with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16, 288–297. Doi: [10.1111/1755-0998.12440](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12440)
- Beu, A.G., Bouchet, P., & Tröndlé, J. (2012). Tonnoidean gastropods of French Polynesia. *Molluscan Research*, 32(2), 61–120.
- Borges, L.M.S., Claudia, H., Jorge, L., Ana, M.C., Ana, P.V., Gonc'alo, C., Rita, C., Ana, C. C., Maria, S. G. F., Maria, H. C., Filipe, O.C. (2016). With a little help from DNA barcoding: investigating the diversity of Gastropoda from the Portuguese coast. *Scientific RepoRts*, 6, 20226, 1-11. Doi: [10.1038/srep20226](https://doi.org/10.1038/srep20226).
- Feng, M., Zhang, N., Liu, Q., & Wijffels, S. (2018). The Indonesian throughflow, its variability and centennial change. *Geosci. Lett.*, 5, (3), 1-10. Doi: [10.1186/s40562-018-0102-2](https://doi.org/10.1186/s40562-018-0102-2).
- Frezal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* 8, 727–736.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294–299.
- Gordon, A. L., & Fine, R.A. (1996). Pathways of water between the Pacific and Indian oceans in the Indonesian seas. *Nature*, 379(2): 146- 149
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 270, 313–321. Doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hirose, M., Hirose, E., Kiyomoto, M. (2014). Identification of five species of *Dendrodoris* (Mollusca: Nudibranchia) from Japan, using DNA barcode and larval characters. *Marine Biodiversity*, 45(4), 1-12. Doi: 10.1007/s12526-014-0288-2
- Keskin, E., & Atar, H.H. (2013). DNA barcoding commercially important aquatic invertebrates of Turkey. *Mitochondrial DNA*, 24(4), 440–450. Doi: 10.3109/19401736.2012.762576
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549. Doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kusbiyanto, Dian, B., Agus, N. (2020). DNA barcoding of crustacean larvae in Segara Anakan, Cilacap, Central Java, Indonesia using cytochrome c oxidase gene. *Biodiversitas*, 21 (10), 4878-4887. Doi: 10.13057/biodiv/d211054
- Manini, E., Luna, G.M., Corinaldesi, C.Z.D., Bortoluzzi, G., Caramanna, G., Raffa, F., & Danovaro, R. (2008). Prokaryote diversity and virus abundance in shallow hydrothermal vents of the Mediterranean Sea (Panarea Island) and the Pasific Ocean (North Sulawesi-Indonesia). *MicrobEcol*, 55, 626-639.
- Morni, W. Z.W., Siti, A. K. A. Rahim., Richard, R., Jamil, M., & Ruhana, H. (2017). Checklist of Gastropods from the Exclusive Economic Zone (EEZ), Sarawak, Malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 28(1), 117–129. Doi: <https://doi.org/10.21315/tlsr2017.28.1.8>
- Palanisamy, S. K., Prasanna, K., Purushothaman, P., & Umamaheswari, S. (2020). Molecular approach to the identification and phylogenetic biogeography of snail *Telescopium telescopium* using mt-COI gene sequences. *Regional Studies in Marine Science*, 35, 1-17. doi:101016/j.rsma.2020.101109.
- Palero, F., Genis-Armero, R., Hall, M.R., Clark, P.F. (2016). DNA barcoding the phyllosoma of *Scyllaridessquammosus* (H. Milne Edwards, 1837) (Decapoda: Achelata: Scyllaridae). *Zootaxa*, 4139 (4), 481-498. doi:10.11646/zootaxa.4139.4.2.
- Pereira, L.H.G, Hanner, R., Foresti, F., Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC Genet*, 12, 20.
- Pechenik, J.A., Scheltema, R.S., & Eyster, L.S. (1984) Growth stasis and limited shell calcification in larvae of *Cymatium parthenopeum* during trans-Atlantic transport. *Science*, 224,1097–1099.
- Puillandre, N., Strong, E., Bouchet, P., Boisselier, M.C., Couloux, A., Samadi, S. (2009). Identifying gastropod spawn from DNA barcodes: possible but not yet practicable. *Molecular Ecology Resources*, 9 (5), 1311-1321. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02576.x.
- Ran, K., Li, Q., Qi, L., Li, W., & Kong, L. (2020). DNA barcoding for identification of marine gastropod species from Hainan island, China. *Fisheries Research*, 225, 105504, 1-7. doi:105504. 10.1016/j.fishres.2020.105504
- Scheltema, R.S. (1971) Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow-water benthic marine gastropods. *The Biological Bulletin*, 140, 284–322.
- Simbolon, A.R. (2017). Karakteristik dan sikap peduli lingkungan masyarakat Pesisir Kawasan Cilincing DKI Jakarta. *Jurnal Pro-Life*, 4(3), 456-466.
- Simbolon, A.R. (2018). Analisis Risiko Kesehatan Pencemaran Timbal (Pb) Pada Kerang Hijau (*Perna viridis*) di Perairan Cilincing Pesisir DKI Jakarta. *OLDI*, 3(3), 187-208. Doi: 10.14203/oldi.2018.v3i3.207.
- Simbolon, A.R., Masteria, Y. P., & Ismiliana, W. (2021). Identifikasi spesies menggunakan DNA barcoding dalam menunjang budidaya dan konservasi teripang di Perairan Lampung. *Jurnal Riset Akuakultur*, 16 (1), 31-37. Doi: <http://dx.doi.org/10.15578/jra.16.1.2021.31-37>.
- Strong, E.E., Nicolas, P., Alan, G. B., Magalie, C, Philippe, B. (2019). Frogs and tuns and tritons – A molecular phylogeny and revised family classification of the predatory gastropod superfamily Tonnoidea (Caenogastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 130, 18–34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmpev.2018.09.016>.

- Tan, S. K., & Woo, H.P.M. (2010). A preliminary checklist of the Molluscs of Singapore. *Raffles Museum of Biodiversity Research, National University of Singapore*, 32–48.
- Van der Meij, S. E. T., Moolenbeek, R.G., & B.W.Hoeksema, B.W. (2009). Decline of the Jakarta Bay molluscan fauna linked to human impact. *Marine Pollution Bulletin*, 59, 101-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.02.02>.
- Van Der Bank, H., & Greenfield, R. (2015). A pioneer survey and DNA barcoding of some commonly found gastropod molluscs on Robben Island. *Zookeys*, 481, 15-23. doi:<https://doi.org/10.3897/zookeys.481.8188>.
- Yang, R., Wu, X.B., Yan, P., & Li, X.Q. (2010). Using DNA barcodes to identify a bird involved in a bird strike at a Chinese airport. *Mol. Biol. Rep.* 37, 3517–3523.
- Zapata, F., Wilson, N.G., Howison, M., Andrade, S.C.S., Jorger, K.M., Schrod, M., Goetz, F.E., Giribet, G., & Dunn, C.W. (2014) Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. *Proc. R. Soc. B*, 281, 20141739, 1-9. doi:<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1739>