

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 1 April 2021

p-ISSN: 1907-8226

e-ISSN: 2502-6410

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



IDENTIFIKASI MOLEKULAR DAN STRUKTUR FILOGENETIK MOLUSKA (GASTROPODA DAN BIVALVIA) DI PERAIRAN BIAK, PAPUA

MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHILOGENETIC STRUCTURE OF MOLLUSCA (GASTROPODS AND BIVALVIANS) IN BIAK WATERS, PAPUA

Anna Rejeki Simbolon* dan Ludi Parwadani Aji

¹Pusat Penelitian Oseanografi LIPI, Jalan Pasir Putih 1, Ancol Timur, Jakarta Utara. 14430, Indonesia

Teregistrasi 1 tanggal: 25 Juni 2021; Diterima setelah perbaikan tanggal: 30 Juli 2021;

Disetujui terbit tanggal: 2 Agustus 2021

ABSTRAK

Perairan Biak di wilayah Papua termasuk kawasan segitiga terumbu karang dengan tingkat keanekaragaman spesies yang tinggi, salah satu diantaranya adalah Phylum Moluska, namun lebih dari 90% spesies Moluska belum terdokumentasi secara akurat. Sebagai biota dengan keanekaragaman spesies yang tinggi, kesamaan morfologi cangkang moluska sering ditemukan sehingga menyebabkan kesulitan dalam identifikasi yang tepat. Untuk hal tersebut penanda molekular "DNA mitokondria cytochrome oxidase I" (mt-COI), biasa disebut DNA *barcoding*, dapat diterapkan untuk identifikasi species. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies Moluska dengan menggunakan DNA *barcoding* serta menyusun struktur filogenetik Moluska di perairan Biak, Papua. Contoh biologi Moluska diambil dengan metode jelajah di area padang lamun pada saat air surut. Analisis DNA menggunakan primer universal LCO 1490 dan HCO 2198, pengeditan dan pengurutan sekuen DNA dengan program Geneious ver 9 dan program BLAST. Struktur filogenetik dilakukan dengan metode neighbor joining (NJ) pada model Kimura-2. Hasil menunjukkan spesies moluska yang berhasil diidentifikasi secara molekular terdiri dari 23 spesies dengan tingkat kesamaan 97-100%. Pohon filogenetik menunjukkan pengelompokan spesies berdasarkan ordo, famili hingga genus yang berbeda. *Nerita* sp. memiliki jarak genetik terendah dan nilai bootstrap yang tinggi serta memiliki kesamaan warna dan pola yang hampir sama sehingga sering terjadi kesalahan identifikasi secara morfologi. Hasil analisis memperlihatkan DNA *barcoding* dapat digunakan dalam identifikasi spesies moluska dengan cepat dan akurat serta memberikan keragaman spesies yang tinggi. Identifikasi secara molekular dengan menggunakan DNA *barcoding* dapat dijadikan alat dalam mengidentifikasi spesies moluska secara lebih tepat sehingga pengelolaan spesies akan tepat sasaran serta bermanfaat bagi kajian pengelolaan selanjutnya.

Kata Kunci: Identifikasi molekular; DNA- *barcoding*; Phylum Moluska; Biak (Papua)

ABSTRACT

Biak waters in the Papua region are included in the coral reef triangle area with a high level of species diversity, one of which is the Mollusk Phylum, but more than 90% of Mollusk species have not been accurately documented. As a biota with high species diversity, similarity in morphology of mollusk shells is often found, causing difficulties in proper identification. For this reason, the molecular marker "mitochondrial DNA cytochrome oxidase I" (mt-COI), commonly called DNA *barcoding*, can be applied for species identification. This study aims to identify mollusk species using DNA *barcoding* and compose the phylogenetic structure of mollusks in the waters of Biak, Papua. Mollusk biology samples were taken by roaming the seagrass area at low tide. DNA analysis using universal primers LCO 1490 and HCO 2198, editing and sequencing DNA with the Geneious ver 9 program and the BLAST program. The phylogenetic structure was carried out using the neighbor joining (NJ) method on the Kimura-2 model. The results show that the mollusk species that have been identified molecularly consist of 23 species with a similarity level of 97-100%. The phylogenetic tree shows the grouping of species based on different orders, families and genera. *Nerita* sp. has the lowest genetic distance and high bootstrap value and has almost the same color and pattern so that morphological identification errors often occur. The results of the analysis show that DNA *barcoding* can be used in the identification of mollusk species quickly and

Korespondensi penulis:

e-mail: annarejekisimbolon@gmail.com

accurately and provides high species diversity. Molecular identification using DNA barcoding can be used as a tool in identifying mollusk species more precisely so that species management will be well targeted and useful for further management studies.

Keywords: *Molecular identification; DNA- barcoding; Phylum Mollusk; Biak (Papua)*

PENDAHULUAN

Moluska merupakan phylum biota laut yang memiliki tingkat keanekaragaman spesies yang tinggi dan persamaan bentuk morfologi sehingga seringkali menyebabkan kesulitan dalam identifikasi (Appeltans *et al.*, 2012). Setidaknya terdapat 239 spesies moluska di perairan Biak yang terdiri dari 177 spesies dari kelas Gastropoda dan 62 spesies dari kelas Bivalvia. Moluska dengan penyebaran yang luas ditemukan pada spesies *Monetaria annulus*, *Conomurex luhuanus* dan *Canarium urceus* dari kelas Gastropoda, sedangkan dari kelas Bivalvia adalah *Anadara antiquata* (Aji *et al.*, 2018).

Identifikasi molekuler telah menjadi metode yang dapat digunakan dalam identifikasi spesies secara tepat dan akurat (Simbolon *et al.*, 2021). Satu metode penanda molekuler terkini yang digunakan untuk identifikasi spesies ialah DNA mitokondria cytochrome oxidase I (mt-COI) (DNA *barcoding*) karena bersifat non rekombinan dan tidak bergantung pada kondisi lingkungan (Palanisamy *et al.*, 2020), sehingga DNA *barcoding* menjadi standard dalam identifikasi molekuler (Hebert *et al.*, 2003). DNA *barcoding* telah digunakan dalam mengkonfirmasi taksonomi hewan laut hingga filogeni molekuler Moluska (Barco *et al.*, 2016); metode ini juga menunjukkan bukti adanya keragaman spesies pada moluska di perairan Pasifik (Sun *et al.*, 2016).

Kress *et al.* (2015) menunjukkan bahwa DNA *barcoding* dapat menjadi alat yang efektif dalam pengelolaan dan pemantauan biota laut. Sementara itu, filogenetik merupakan metode taksonomi yang mengklasifikasikan spesies berdasarkan analisa sejarah evolusi yang dilakukan dengan analisa baik secara morfologi maupun analisa sekuen DNA (Juniar *et al.*, 2021). Penggunaan DNA *barcoding* dalam identifikasi spesies secara molekuler pada kerang laut dalam telah dilakukan oleh Liu & Zhang (2018); penggunaan gen COI dikombinasikan dengan analisis pohon filogenetik beserta jarak genetik diketahui mampu mengidentifikasi serta mengkaji keragaman dan sejarah evolusi kerang laut dalam.

Indonesia menjadi salah satu negara di kawasan Segitiga Terumbu Karang (*coral triangle*). Hal ini pula yang menjadikan Indonesia memiliki tingkat keanekaragaman hayati laut yang tinggi. Sayangnya, minimnya kepedulian terhadap kelestarian ekosistem pesisir membuat kawasan pesisir tercemar. Kurangnya penegakan peraturan pemerintah juga turut andil dalam pengelolaan kawasan pesisir yang semakin tertekan

(Simbolon, 2018). Hal ini menyebabkan penurunan kualitas air pada ekosistem pesisir serta dapat menurunkan keanekaragaman hayati di wilayah tersebut. Ditambahkan, tekanan tingkat tinggi pada ekosistem pesisir dapat mengakibatkan pergeseran struktur komunitas bentik dan hilangnya keanekaragaman (Van der Meij, 2009).

Perairan Biak yang terletak di wilayah Papua merupakan salah satu kawasan segitiga terumbu karang dengan keanekaragaman hewan laut yang tinggi. Pengelolaan kawasan ini harus dijaga dan dilestarikan agar keanekaragaman hewan laut dapat terjaga, salah satu biota laut yang umum ditemui adalah Moluska (Aji & Widyastuti, 2019). Sebagai phylum biota laut dengan keragaman tertinggi, lebih dari 90% spesies moluska belum terdokumentasikan secara molekuler (Barco *et al.*, 2016). Diantara spesies yang teridentifikasi sebanyak 80.000-10.0000 spesies, 98% dari total moluska merupakan kelas Gastropoda (Sturm *et al.*, 2006).

Penelitian mengenai identifikasi molekuler Moluska di perairan Biak (Papua) belum banyak dilakukan. Kondisi ini mendorong dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengidentifikasi spesies moluska dengan menggunakan teknik analisis DNA *barcoding* serta menyusun pohon filogenetik moluska di perairan tersebut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam identifikasi moluska secara molekuler khususnya di sekitar perairan Biak, sehingga pengelolaan jenis moluska di perairan ini dapat terjaga dengan baik dan berkelanjutan.

BAHATAN METODE

Teknik Pengambilan Sampel

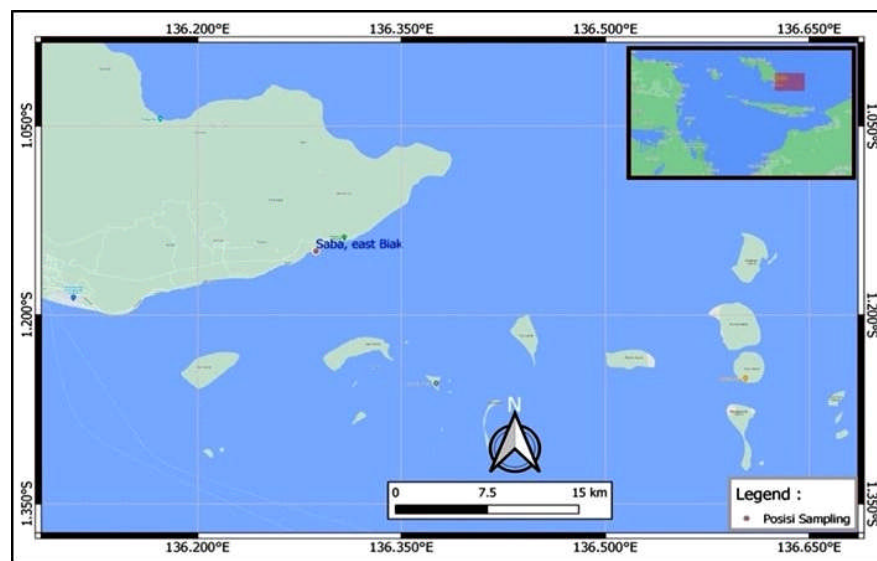
Pengambilan sampel selama 8 bulan dari April sampai November 2017 di sekitar perairan Biak, Provinsi Papua (Gambar 1). Moluska diambil dengan metode jelajah di area padang lamun pada saat air surut. Sampel moluska beserta cangkangnya yang diambil berjumlah 34 spesimen. Moluska dimasukkan ke dalam botol sampel berisi larutan alkohol teknis, sementara contoh jaringan (*tissue samples*) moluska disimpan di dalam botol sampel berisi larutan ethanol absolute untuk analisa DNA *barcoding*.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA jaringan moluska menggunakan standard protokol dari Qiagen kit untuk ekstraksi DNA pada jaringan dan darah dengan No catalog ID 69506. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menempatkan irisan jaringan moluska (± 25 mg) pada 1,5 mL tabung

microsentrifuge yang telah berisi 180 iL larutan buffer ATL (*buffer tissue lysis*) kemudian dihaluskan dengan menggunakan gunting bedah. Sampel ditambahkan 20 iL proteinase K dan divortex selama satu menit, serta diinkubasi selama semalam pada suhu 56°C di dalam *thermostat waterbath*. Sampel yang telah diinkubasi divortex lagi selama 15 detik dan ditambahkan 200 iL buffer AL dan 200 iL ET-OH (96%-100%) lalu divortex selama dua menit. Selanjutnya, sampel dipindahkan ke dalam DNA easy mini spin column yang sudah ditempatkan dalam 2 mL *collection tube*. Sampel disentrifugasi pada 8.000 rpm selama satu menit. Hasil sisa residu sentrifugasi dibuang dan DNAeasy spin column dipindahkan dalam 2 mL

collection tube yang baru. Selanjutnya ditambahkan 500 iL 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 iL buffer AW2 (*buffer wash 2*); kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm selama tiga menit. Selanjutnya spin column dipindahkan ke dalam 1,5 mL tabung *microsentrifuge* baru. Eludasi DNA dilakukan dengan menambahkan 200 iL buffer AE (*buffer elute*) lalu inkubasi selama satu menit pada suhu ruang dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama satu menit. Konsentrasi dan kualitas ekstrak DNA diukur pada nanophotometer IMPLEN dan disimpan di freezer pada suhu -80°C.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel Mollusca di padang lamun sekitar perairan Biak, Saba, Kabupaten Biak Numfor Provinsi Papua (136.291576 E, 1.156432 S), April-November 2017.

Figure 1. *Mollusca* sampling locations in seagrass beds around Biak waters, Saba, Biak Numfor Regency, Papua Province (136.291576 E, 1.156432 S), April-November 2017.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dengan prosedur analisis PCR dilakukan dengan pembuatan larutan PCR yang terdiri dari 19,7 iL ddH₂O; 3 iL Taq buffer; 3 iL MgCl₂; 0,6 iL dNTPmix; 0,5 iL BSA, 1 iL primer forward (LCO 1490) dan reverse (HCO2198); 0,2 iL Taq DNA; serta 1 iL DNA template ($\pm$ 100 ng). Ruas gen COI genom mitokondria kemudian diamplifikasi menggunakan universal primer DNA *barcoding* primer forward yaitu LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') dan primer reverse yaitu HCO 2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994).

Proses amplifikasi dilakukan dengan mengatur suhu mesin PCR step up seperti berikut; suhu pre-denaturation 95°C selama lima menit, masing-masing 35 siklus dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, annealing pada suhu 42°C-52°C selama 40 detik; 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 dengan menggunakan gel elektroforesis 2% dan UV transiluminator. Sampel hasil PCR yang teramplifikasi kemudian dikirim ke 1st Base Malaysia untuk dilakukan sekuensing DNA.

Analisis Data Hasil Sekuen

Hasil sekuen diedit dan diurutkan dengan menggunakan program Geneious Prime, hasil alignmentnya kemudian dicocokkan dengan program *Basic Local Assignment Search Tool* (BLAST) dan validasi spesies dipilih dengan tingkat kesamaan tertinggi. Prinsip dalam program ini yaitu mencocokkan sekuen yang diperoleh dengan sekuen spesies yang terdapat pada *genbank library*. Struktur pohon filogenetik dianalisis dengan program MEGA X dengan menambahkan sekuen dari GenBank dengan tingkat kesamaan tertinggi. Analisis filogenetik dilaksanakan berdasarkan metode neighbor

joining (NJ) model Kimura-2 parameter dengan uji pada 1.000x bootstrap (Keskin & Atar, 2013).

HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Identifikasi Molekular

Diperoleh sebanyak 34 spesimen moluska selama penelitian yang berhasil di ekstraksi dan di amplifikasi dengan barcode DNA universal primer LCO 1490 dan HCO 2198. Hasil amplifikasi ditandai dengan adanya pita (band) pada marker dengan panjang produk PCR sekitar 740 bp (Gambar 2). Urutan sekuen kemudian diidentifikasi dalam program BLAST untuk menentukan kecocokan yang paling mendekati dengan urutan bank gen.

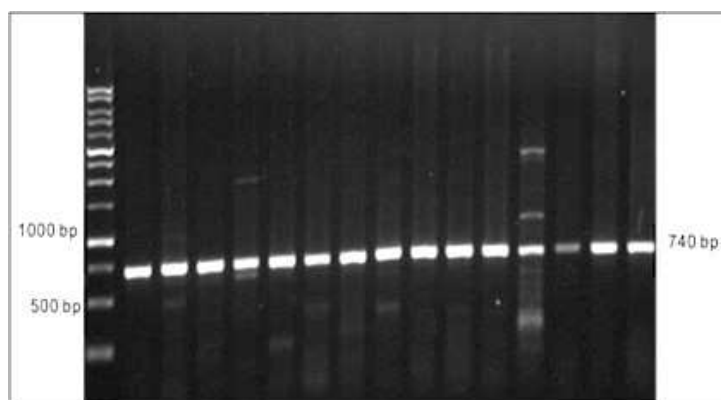
Dalam identifikasi molekuler tersebut tidak ditemukan adanya *kodon stop* yang menunjukkan bahwa panjang variasi tidak terkait dengan ko amplifikasi dari gen semu (*co-amplification pseudogenes*) dan tidak terjadi kemungkinan bias dari analisis yang dilakukan (Barco *et al.*, 2016). Setelah dilakukan pemotongan primer dan penggabungan dengan sekuen COI dari genebank serta melalui proses *alignent* diperoleh sekuen 618 bp yang dapat dianalisa lebih lanjut.

Hasil identifikasi molekuler berdasarkan program BLAST terhadap 34 spesimen moluska ditunjukkan dalam Tabel 1, sedangkan morfologi moluska diperlihatkan pada Gambar 3. Dari 34 spesimen teridentifikasi sebanyak 23 spesies moluska di perairan padang lamun di sekitar Biak, yang meliputi 5 spesies kelas Bivalvia dan 18 kelas Gastropoda. Species-species tersebut meliputi: *Monetaria annulus*, *Hippopus porcellanus*, *Vasticardium flavum*, *Conus leopardus*, *Pinctada margaritifera*, *Plankobranthus sp*, *Cypraea tigris*, *Conus virgo*, *Conus literatus*, *Conus marmoreus*, *Lambis lambis*, *Conomurex luhuanus*, *Nerita undata*, *Vasum turbinellus*, *Canarium*

urceus, *Pinna muricata*, *Conus miles*, *Drupa grossularia*, *Luria Isabella*, *Nassa serta*, *Conus quernicus*, *Nerita undulata*, dan *Spondylus squamosus*. Jenis-jenis moluska tersebut tersebar dalam 7 ordo yaitu Littorinimorpha, Neogastropoda, Cycloneritida, Nudibranchia, Ostreida, Cardiida, dan Pectinida. Sebagian besar moluska berasal dari ordo Neogastropoda (12 spesies), antara lain dari famili Strombidae (3 spesies), Muricidae (2 spesies), Turbinellidae (1 spesies) dan Conidae (6 spesies).

Jarak Genetik dan Struktur Pohon Filogenetik

Analisis jarak genetik antar spesies ditampilkan dalam Tabel 2. Penelitian ini menunjukkan jarak genetik berkisar antara 0,109-0,713; jarak genetik terendah ditemukan pada *Nerita undata* dan *Nerita undulata* yaitu 0,109, dan terbesar pada spesies *Spondylus squamosus* dan *Luria isabella* sebesar 0,713. Berdasarkan data dugaan jarak genetik yang diperoleh dapat disusun pohon filogenetik spesies-spesies Moluska dibandingkan dengan data GenBank seperti disajikan pada Gambar 4. Hampir seluruh moluska memiliki nilai bootstrap yang tinggi dengan sekuen genbank, hal ini menunjukkan tingginya kesamaan antar sekuen. Nilai bootstrap merupakan nilai yang menyatakan peluang terjadinya perubahan susunan clade pada pohon filogenetik. Semakin tinggi nilai bootstrap menunjukkan semakin kecil terjadinya perubahan susunan antar clade sehingga pohon yang dibentuk akan konsisten dan tidak berubah. Nilai bootstrap lebih dari 90% menunjukkan clade yang dapat dipercaya (Hall, 2001). Pohon filogenetik menunjukkan sekuen mengelompok berdasarkan kelas, ordo dan family yang berbeda. Konstruksi tersebut menampilkan pengelompokan spesies terjadi berdasarkan kesamaan genetik yang berkaitan dengan hubungan kekerabatan. Jenis moluska dengan spesies *N. undata* dan *N. undulata* memiliki nilai bootstrap 100, semakin tinggi nilai bootstrap pada masing-masing spesies menunjukkan kesamaan genetik yang tinggi dan kekerabatan yang dekat.



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen COI menggunakan barcode DNA universal primer LCO 1490 dan HCO 2198 terhadap produk PCR sebesar ± 740 bp.

Figure 2. COI gene amplification using universal DNA barcode primers LCO 1490 and HCO 2198 with a PCR product of 740 bp.

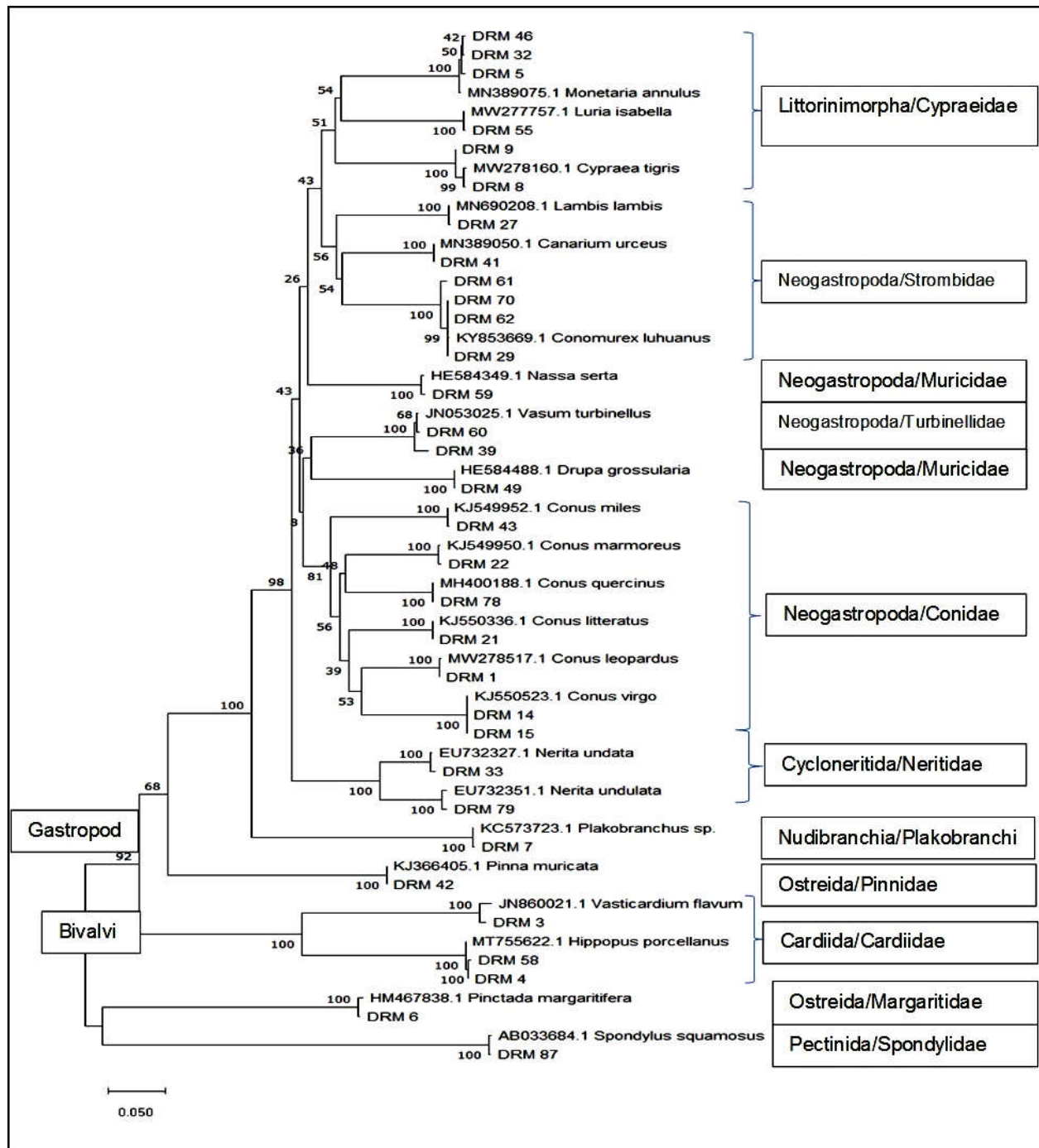
Tabel 1. Hasil identifikasi species Molluska dengan program BLAST

Table 1. Results of identification in the BLAST program

No	Kode DNA	Identifikasi BLAST	% Identifikasi	Query cover	E value	Accession Number
1	DRM1	<i>Conus leopardus</i>	99,84	100	0	MW278517.1
2	DRM3	<i>Vasticardium flavum</i>	98,28	100	0	JN860021.1
3	DRM4	<i>Hippopus porcellanus</i>	99,84	100	0	MT755622.1
4	DRM5	<i>Monetaria annulus</i>	97,31	99	0	MN389075.1
5	DRM6	<i>Pinctada margaritifera</i>	98,05	100	0	HM467838.1
6	DRM7	<i>Plakobranthus sp.</i>	99,69	100	0	KC573723.1
7	DRM8	<i>Cypraea tigris</i>	99,53	100	0	MW278160.1
8	DRM9	<i>Cypraea tigris</i>	97,83	100	0	MW278160.1
9	DRM14	<i>Conus virgo</i>	99,84	100	0	KJ550523.1
10	DRM15	<i>Conus virgo</i>	99,84	100	0	KJ550523.1
11	DRM21	<i>Conus litteratus</i>	100	100	0	KJ550336.1
12	DRM22	<i>Conus marmoreus</i>	99,53	100	0	KJ549950.1
13	DRM27	<i>Lambis lambis</i>	99,68	100	0	MN690208.1
14	DRM29	<i>Conomurex luhuanus</i>	99,69	100	0	KY853669.1
15	DRM32	<i>Monetaria annulus</i>	99,38	99	0	MN389075.1
16	DRM33	<i>Nerita undata</i>	99,07	100	0	EU732327.1
17	DRM39	<i>Vasum turbinellus</i>	98,76	100	0	HQ834084.1
18	DRM41	<i>Canarium urceus</i>	100	100	0	MN389050.1
19	DRM42	<i>Pinna muricata</i>	100	100	0	KJ366405.1
20	DRM43	<i>Conus miles</i>	99,84	100	0	KJ549952.1
21	DRM46	<i>Monetaria annulus</i>	99,38	99	0	MN389075.1
22	DRM49	<i>Drupa grossularia</i>	99,85	100	0	HE584488.1
23	DRM51	<i>Cypraea tigris</i>	99,69	100	0	MW278160.1
24	DRM55	<i>Luria isabella</i>	99,54	99	0	MW277757.1
25	DRM58	<i>Hippopus porcellanus</i>	99,53	100	0	MT755622.1
26	DRM59	<i>Nassa sarta</i>	99,22	100	0	HE584349.1
27	DRM60	<i>Vasum turbinellus</i>	99,53	100	0	JN053025.1
28	DRM61	<i>Conomurex luhuanus</i>	99,38	100	0	MN389060.1
29	DRM62	<i>Conomurex luhuanus</i>	99,85	100	0	KY853669.1
30	DRM70	<i>Conomurex luhuanus</i>	99,85	100	0	KY853669.1
31	DRM78	<i>Conus quercinus</i>	99,84	100	0	MH400188.1
32	DRM79	<i>Nerita undulata</i>	99,06	100	0	EU732351.1
33	DRM81	<i>Nassarius coronatus</i>	99,22	100	0	KY451287.1
34	DRM87	<i>Spondylus squamosus</i>	99,56	100	0	MW278517.1



Gambar 3. Morfologi moluska di perairan Biak yang diidentifikasi dengan Teknik DNA barcoding (Sumber: Aji, 2019).
 Figure 3. Molluscs in Biak Waters identified by DNA barcoding Molecular Techniques.



Gambar 4. Pohon filogenetik Moluska berdasarkan jarak genetik dari sekuen DNA gen COI menggunakan metode neighbor joining (NJ) model Kimura 2 parameter, bootstrap 1.000 replikasi.

Figure 4. Mollusc phylogenetic tree based on COI gene DNA sequence using neighbor joining (NJ) method with Kimura-2 parameter model, bootstrap 1000 replications.

Table 2. Jarak genetik antar spesies Moluska di perairan Biak, Papua selama penelitian
 Tabel 2. Genetic distance between mollusk species in Biak Waters, Papua obtained during research

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2	0,583																					
3	0,566	0,314																				
4	0,268	0,512	0,551																			
5	0,619	0,565	0,595	0,495																		
6	0,366	0,595	0,592	0,363	0,527																	
7	0,201	0,575	0,556	0,256	0,573	0,342																
8	0,286	0,569	0,552	0,162	0,541	0,363	0,255															
9	0,245	0,539	0,552	0,138	0,512	0,347	0,249	0,195														
10	0,263	0,528	0,559	0,160	0,587	0,346	0,244	0,207	0,173													
11	0,254	0,557	0,576	0,245	0,566	0,370	0,196	0,264	0,226	0,226												
12	0,227	0,535	0,572	0,264	0,589	0,392	0,196	0,269	0,249	0,253	0,199											
13	0,280	0,527	0,518	0,252	0,541	0,366	0,290	0,294	0,251	0,266	0,247	0,256										
14	0,266	0,518	0,564	0,224	0,505	0,357	0,254	0,256	0,215	0,237	0,281	0,236	0,248									
15	0,234	0,528	0,569	0,228	0,587	0,356	0,225	0,252	0,215	0,222	0,184	0,163	0,211	0,235								
16	0,450	0,545	0,567	0,428	0,447	0,498	0,428	0,424	0,406	0,408	0,448	0,409	0,434	0,385	0,451							
17	0,254	0,572	0,563	0,198	0,552	0,365	0,259	0,214	0,189	0,212	0,283	0,269	0,280	0,209	0,245	0,448						
18	0,287	0,561	0,577	0,251	0,542	0,380	0,243	0,288	0,254	0,276	0,256	0,240	0,258	0,222	0,238	0,488	0,253					
19	0,210	0,638	0,638	0,265	0,589	0,369	0,213	0,270	0,253	0,254	0,243	0,253	0,268	0,257	0,250	0,464	0,242	0,276				
20	0,248	0,559	0,551	0,243	0,552	0,347	0,239	0,238	0,232	0,213	0,216	0,241	0,261	0,197	0,217	0,364	0,241	0,252	0,232			
21	0,245	0,528	0,522	0,157	0,558	0,347	0,236	0,225	0,157	0,162	0,243	0,250	0,238	0,237	0,202	0,424	0,191	0,265	0,234	0,238		
22	0,285	0,573	0,517	0,241	0,505	0,365	0,282	0,277	0,270	0,291	0,256	0,275	0,109	0,245	0,248	0,452	0,255	0,274	0,278	0,256	0,268	
23	0,662	0,653	0,699	0,670	0,569	0,628	0,680	0,665	0,707	0,687	0,691	0,683	0,612	0,627	0,616	0,643	0,688	0,628	0,713	0,696	0,688	0,617
1.	<i>Monetaria annulus</i>								9. <i>Conus literatus</i>				17. <i>Conus miles</i>									
2.	<i>Hippopus porcellanus</i>								10. <i>Conus marmoreus</i>				18. <i>Drupa grossularia</i>									
3.	<i>Vasticardium flavum</i>								11. <i>Lambis lambis</i>				19. <i>Luria isabella</i>									
4.	<i>Conus leopardus</i>								12. <i>Conomurex luhuanus</i>				20. <i>Nassa sarta</i>									
5.	<i>Pinctada margaritifera</i>								13. <i>Nerita undata</i>				21. <i>Conus quernicus</i>									
6.	<i>Plankobranchius sp</i>								14. <i>Vasum turbinellus</i>				22. <i>Nerita undulata</i>									
7.	<i>Cypraea tigris</i>								15. <i>Canarium urceus</i>				23. <i>Spondylus squamos</i>									
8.	<i>Conus virgo</i>								16. <i>Pinna muricata</i>													

Bahasan

Identifikasi Molekular

Hampir semua sampel dapat diidentifikasi hingga tingkat spesies, kecuali satu sampel yang teridentifikasi hingga tingkat genus, yaitu *Plakobbranchus* sp. Justifikasi spesies umumnya digunakan pada nilai similaritas dari 99 - 100%. Semakin tinggi nilai identitas antar spesies menunjukkan kesamaan spesies yang semakin tinggi. Nilai identitas yang mendekati 100%, serta nilai $E = 0$ menunjukkan tingkat kesamaan spesies yang tinggi (Madduppa *et al.*, 2017). Sementara itu menurut Hebert *et al.* (2003) identifikasi spesies di bawah 97% menunjukkan spesies berbeda. Penelitian ini menunjukkan sebagian besar nilai identitas berkisar 97% - 100% dengan demikian hasil BLAST yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan tingkat validasi kesamaan spesies yang tinggi.

Satu spesimen teridentifikasi hingga tingkat genus, yaitu *Plakobbranchus* sp, hal ini memang menjadi salah satu kekurangan dalam identifikasi molekuler, yang mana metode ini bergantung pada taksonomi sekuen dari genbank library (Fahmi *et al.*, 2016). *Plakobbranchus* sp merupakan salah satu kelompok Nudibranchia, dengan keragaman famili yang kompleks. Nudibranchia umumnya ditemukan pada perairan tropis hingga subtropis di sepanjang perairan Indo-West Pacific. Kesulitan dalam mengidentifikasi kelompok Nudibranchia disebabkan tingginya variasi perbedaan pola warna pada tubuh sehingga mengakibatkan kesulitan dalam penetapan taksonomi antar spesies (Furfaro *et al.*, 2016).

Seluruh spesimen dapat diidentifikasi dengan baik hingga tingkat spesies dengan tingkat kesamaan spesies yang tinggi, hal ini mengkonfirmasi bahwa gen COI dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies moluska dengan baik. Hasil identifikasi yang diperoleh diharapkan dapat menjadi bahan referensi dalam mengidentifikasi moluska di perairan Indonesia khususnya perairan Biak. Identifikasi molekuler dengan menggunakan gen COI pada moluska di perairan Indonesia juga telah dilakukan oleh Juniar *et al.* (2021) yang mengidentifikasi spesies *Clithon oualaniense* di perairan Madura dengan tingkat kesamaan spesies 98-100%. Saleky *et al.* (2020) juga menggunakan gen yang sama dalam mengidentifikasi *Turbo stenogyris* di pesisir pantai Yekwandi Distrik Momiwaren Kabupaten Manokwari Selatan.

Struktur Filogenetik

Jarak genetik yang semakin rendah antar spesies menandai semakin sedikitnya perbedaan pasangan basa antar spesies yang diikuti tingginya persamaan morfologi. Moluska dengan jenis *N. undata* dan *N. undulata* memiliki jarak genetik terendah, menunjukkan hubungan

kekerabatan yang erat, hal yang sama dilaporkan oleh Chee & Siti (2014) pada *N. undata* dan *N. undulata* di perairan Malaysia. Famili Neritidia memiliki warna dan pola yang hampir sama sehingga sering mengalami kesulitan dalam identifikasi secara morfologi, kesamaan pola warna tidak dapat digunakan dalam identifikasi Neritidia dikarenakan kemungkinan tingginya variasi antar spesies (Chee & Siti, 2014). Penelitian ini menunjukkan identifikasi molekuler khususnya dengan menggunakan DNA *barcoding* pada gen mt-COI dapat dijadikan metode dalam mengidentifikasi spesies pada genus Nerita yang memiliki morfologi antar spesies yang hampir sama.

S. squamosus dan *L. Isabella* memiliki jarak genetik yang besar yang mengindikasikan tingginya perbedaan genetik antara kedua spesies. Besarnya jarak genetik menandakan perbedaan dalam tingkat family hingga genus (Ran *et al.*, 2020). Perbedaan jarak genetik dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan. *Genetic drift* dan seleksi alam merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi perbedaan jarak genetik (Freeland, 2012). Selain itu, perbedaan geografis dan kondisi lingkungan dapat menyebabkan perubahan morfologi dan filogenetik (Twindiko *et al.*, 2013). Moluska memiliki variasi genetik yang luas sehingga identifikasi spesies tidak hanya berdasarkan jarak genetik intraspesies dan antarspesies.

Kesamaan genetik tinggi ditandai dengan kesamaan morfologi yang tinggi, hal ini lah yang menyebabkan sering terjadinya kesalahan dalam identifikasi spesies secara morfologi (Simbolon *et al.*, 2021). Spesies *Hippopus porcelanus* dan *Vasticardium flavum* memiliki nilai bootstrap 100 (Gambar 3), hal ini menunjukkan tingginya kesamaan genetik sehingga kesamaan morfologi kedua spesies tersebut cukup tinggi (Gambar 2). Hal yang sama juga terlihat pada spesies *Nerita undata* dan *Nerita undulata* dengan nilai bootstrap 100 kedua spesies ini secara morfologi sangat mirip (Gambar 2) namun secara molekuler merupakan 2 spesies yang berbeda (spesies kriptik).

Identifikasi spesies secara molekuler dengan menggunakan DNA *barcoding* dapat menjadi metode dalam mengungkap spesies dengan kesamaan morfologi yang tinggi (spesies kriptik) sehingga identifikasi spesies dapat lebih tepat. Namun identifikasi secara molekuler sangat tergantung dengan jumlah data sekuen yang tersimpan dalam *library genbank* (Fahmi *et al.*, 2016) sehingga identifikasi morfologi dan molekuler sebaiknya dilakukan secara bersamaan agar identifikasi lebih tepat dan akurat.

KESIMPULAN

Analisis DNA *barcoding* dengan gen mt-COI dapat digunakan dalam mengidentifikasi spesies Moluska. Dari

34 spesimen moluska yang dianalisis dapat diidentifikasi sebanyak 23 spesies moluska. Dalam pohon filogenetik yang disusun ke 23 spesies mengelompok berdasarkan genus, famili, dan ordo yang berbeda. Moluska merupakan phylum yang memiliki variasi spesies dan kesamaan morfologi yang tinggi. Tingginya variasi antar spesies moluska menyebabkan sering terjadinya kesalahan identifikasi secara morfologi. Identifikasi secara molekuler dengan menggunakan DNA *barcoding* dapat dijadikan alat dalam mengidentifikasi spesies moluska secara lebih tepat sehingga pengelolaan spesies akan tepat sasaran serta bermanfaat bagi kajian pengelolaan selanjutnya.

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 Adriani Widyastuti, Yohana Farwas dan staf LKBL Biak LIPI yang telah membantu dalam pengambilan sampel. Penelitian ini dibiayai oleh Pusat Penelitian Oseanografi LIPI melalui hibah dana luar negeri dalam program UNESCO/Korean Funds-in-Trust Project *Enhance the Capacity for Species Identification and Genetic Analysis on Marine Organisms in the Coral Reef Ecosystems in the Western Pacific - Third Phase (DRMREEF-II and III)*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aji, L. P., Widyastuti, A., & Capriati, A. (2018). Struktur Komunitas Moluska di Padang Lamun Perairan Kepulauan Padaido dan Aimando Kabupaten Biak Numfor, Papua. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 3(3), 219-234. doi: 10.14203/oldi.2018.v3i3.184.
- Aji, L.P. & Widyastuti, A. (2019). The condition and composition of seagrass and mollusca on Biak island, Papua. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Doi: 10.1088/1755-1315/404/1/012069.
- 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.
- Barco, A., Michael, J., Raupach, S., Silke, L., Hermann, J., Neumann, M., & Thomas, K. N. (2016). Identification of North Sea molluscs with DNA *barcoding*. *Molecular Ecology Resources*, 16, 288-297. doi: 10.1111/1755-0998.12440
- Chee, S.Y., & Siti, A. M. N. (2014). Short communication: DNA *barcoding* reveals Neritid diversity (Mollusca: Gastropoda) diversity in Malaysian waters. *Mitochondrial DNA*, Early Online, 1-3. doi: 10.3109/19401736.2014.987237
- Fahmi, M.R., Prasetyo, A.B., Kusumah, R.V., Hayuningtyas, E.P., & Ardi, I. (2016). *Barcoding* DNA ikan hias lahan gambut. *Jurnal Riset Akuakultur*, 11(2), 137-145. doi: 10.15578/jra.11.2.2016.137-145
- Furfaro, G., Modica, M. V., Oliverio, M., & Mariottini, P. (2016). A DNA- *barcoding* approach to the phenotypic diversity of Mediterranean species of Felimare Ev. Marcus & Er. Marcus, 1967 (Mollusca: Gastropoda), with a preliminary phylogenetic analysis. *Italian Journal of Zoology*, 1-13. doi: 10.1080/11250003.2016.1150525
- Freeland, J.R., Kirk, H., & Petersen, S. (2012). *Genetic analysis of multiple populations in molecular ecology*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons.
- 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.
- Hall, B.G. (2001). *Phylogenetic Trees Made Easy: A How - To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- 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.
- Kress, W.J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D.L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 30, 25-35. doi: 10.1016/j.tree.2014.10.008
- 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
- Juniar, A.E., Reni, A., & Dwi, A.R. (2021). Genetic identification of *Clithon oualaniense* (Gastropoda: Neritidae) from Madura, Indonesia. *AACL Bioflux*, 14 (2), 1046-1056.
- Liu, J., & Zhang, H. (2018). DNA *barcoding* for species identification in deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomysidae), *Mitochondrial DNA*, Part A. doi: 10.1080/24701394.2018.1424843

- Madduppa, H., Taurusman, Am. A., Subhan, B., Anggraini, N.P., Fadillah, R., & Tarman, K. (2017). Short communication: DNA *barcoding* reveals vulnerable and not evaluated species of sea cucumbers (Holothuroidea and Stichopodidae) from Kepulauan Seribu Reefs, Indonesia. *Biodiversitas*, 18(3), 893-898. doi: 10.13057/biodiv/d180305
- 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:10.1016/j.rsma.2020.101109.
- 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, doi: 105504. 10.1016/j.fishres.2020.105504
- Saleky, D., Simon, P.O. L., Thomas, F.P., Isma., Rosa, D. P., Marius, A.W., Edy, H.P.M., Muhammad, D. (2020). Analisis pola pertumbuhan dan pendekatan DNA *barcoding* untuk identifikasi *Turbo stenogyrus* P. Fischer, 1873 (Mollusca: Gastropoda). *Biotropika Journal of Tropical Biology*, 8 (2), 79-84. doi: 10.21776/ub.biotropika.2020.008.02.03.
- Simbolon, A.R. (2018). Analisis risiko kesehatan pencemaran timbal (Pb) pada kerang hijau (*Perna viridis*) di Perairan Cilincing Pesisir DKI Jakarta. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 3(3), 197-208. 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>
- Sturm, C.F., Pearce, T.A. & Valdes, A. (2006). The Mollusks. A Guide to Their Study, Collection, and Preservation. American Malacological Society, Pittsburgh.
- Sun, S., Qi, L., Lingfeng, K., Hong, Y., Xiaodong, Z., Ruihai, Y., Lina, D., Yan, S., Jun, C., Jun, L., Lehai, N., Yanwei, F., Zhenzhen, Y., Shanmei, Z., & Jiping, L. (2016). DNA *barcoding* reveal patterns of species diversity among northwestern Pacific molluscs. *Scientific Reports*, 6, 33367, 1-17. doi: 10.1038/srep33367.
- Twindiko A. F., Wijayanti D. P., Ambariyanto A. (2013). Phylogenetic study of coral fish genus *Pseudochromis* and *Pictichromis* in Indo-Pacific Waters. *Marina Oceanography Bulletin*, 2(3), 29-37.
- 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.2009.02.021>.