

IDENTIFIKASI MOLEKULER ROTIFER *Brachionus* sp. ASAL PERAIRAN TUMPAAN, MINAHASA SELATAN

(Molecular Identification of Rotifer *Brachionus* sp. Isolated from Tumpaan Waters, South Minahasa)

Jefri Sahari^{1*}, Joice Rimper¹, Stenly Wullur¹

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

*e-mail: jefrisahari@gmail.com

Rotifer used in the present study was isolated from Tumpaan, South Minahasa and was mass cultured for several generations. DNA genome of the rotifer was extracted following the procedure of *Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit*; COI (*Cytochrome oxidase sub unit 1*) gene was amplified in PCR (*Polymerase chain reaction*) machine using universal primers LCO1490 (*forward*) and HCO2198 (*reverse*); and the nucleotides of PCR product was sequenced. The sequenced data was analyzed using *ABSeqs* and MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Species identification was conducted using BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) integrated in Genbank. COI gene was successfully amplified using extracted DNA genome of the rotifer indicated by a clear DNA band that was observed at 700 bp. Sequence quality based on values of CRL (*contiguous read length*) and QV20⁺ (*quality value lebih besar dari 20*) was high (>600 bp). BLAST result of the rotifer in present study shows that the species is close to *Brachionus plicatilis* complex species. Maximum and total scores, percent query cover, and percent identity values were 1003-1116, 87-96% and 96-97%, respectively.

Keywords: Identification, Gene COI, *Brachionus*, Rotifers, North Sulawesi

Rotifer yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Tumpaan, Minahasa Selatan dan telah dikultur massal selama beberapa generasi. DNA genom rotifer diekstraksi mengikuti prosedur *Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit*; amplifikasi gen COI (*Cytochrome oxidase sub unit 1*) dilakukan dengan bantuan mesin PCR (*Polymerase chain reaction*) menggunakan primer universal (LCO1490 (*forward*) dan HCO2198 (*reverse*)); dan dilanjutkan dengan pengurutan nukleotida produk PCR. Pengolahan data hasil sekuens dilakukan dengan menggunakan program *ABSeqs* dan MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) Identifikasi spesies dilakukan dengan menggunakan teknik BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) di situs Genbank. Hasil amplifikasi gen COI menggunakan DNA template ekstrak DNA genom rotifer terobservasi adanya pita DNA pada posisi sekitar 700 bp. Kualitas hasil pengurutan nukleotida menggunakan produk PCR menunjukkan nilai CRL (*contiguous read length*) dan QV20⁺ (*quality value lebih besar dari 20*) yang tinggi (>600 nukleotida). Hasil BLAST menunjukkan bahwa rotifer dalam penelitian ini merujuk pada rotifer *Brachionus plicatilis* complex spesies. Maximum dan total score, prosentase query cover dan prosentase identity masing-masing pada nilai 1003-1116, 87-96% dan 96-97%.

Kata kunci: Identifikasi, Gen COI, *Brachionus*, Rotifer, Sulawesi Utara

PENDAHULUAN

Rotifer merupakan salah satu organisme planktonik yang banyak ditemukan di berbagai perairan estuari. Organisme planktonik ini, sering dimanfaatkan sebagai biokapsul hidup untuk transfer nutrisi dalam industri

budidaya larva berbagai jenis ikan laut, terutama pada tahap awal mencari makan (Wullur *et al.*, 2009 ; Wullur *et al.*, 2011). Rotifer dibedakan atas dua tipe yakni tipe L (*large*) yang berukuran 230-320 µm dan tipe S (*small*) yang berukuran 140-220 µm. Aspek biologi, potensi sumber bahan

metabolit aktif dan sumber biomaterial organisme ini telah banyak diteliti di laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi, Manado sejak tahun 1993. Di sisi yang berbeda, spesies dalam filum rotifer sering dilaporkan memiliki fenomena kriptik spesies, yang mana identifikasi berbasis morfologi sulit dilakukan sehubungan dengan karakter morfologi antar spesies yang berkerabat sulit dibedakan. Klarifikasi taksonomi spesies rotifer merupakan aspek penting dalam fungsinya sebagai organisme yang sering dipelihara untuk tujuan komersil. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi rotifer asal perairan estuari di Tumpaan, Minahasa Selatan melalui pendekatan teknik molekuler menggunakan gen *Cytochrome oxidase subunit 1* (COI) sebagai gen standard dalam identifikasi hewan

METODE PENELITIAN

Sampel rotifer yang digunakan dalam penelitian ini, merupakan rotifer hasil isolasi dari perairan estuari di Tumpaan, Minahasa Selatan Sulawesi Utara (Fembri dkk, 2016) (Gambar 1).

Rotifer ini telah dimonokultur selama beberapa generasi menggunakan teknik kultur massal



Gambar 1. Rotifer Hasil Isolasi dari Perairan Tumpaan Minahasa Selatan, Sulawesi Utara.

tanpa mikroalga sebagai sumber nutrisi utama. Pengambilan sampel rotifer dilakukan dengan menyaring air kultur dari bak pemeliharaan massal menggunakan plankton net (berukuran mata jaring 40 μm). Sampel rotifer dibilas dengan air steril dan sebanyak 50 mg sampel digunakan untuk proses ekstraksi DNA. Prosedur ekstraksi DNA menggunakan panduan *DNeasy Blood & Tissue kit* (www.qiagen.com). Sampel dilisis menggunakan buffer ATL, DNA total dari sampel dipisahkan dari protein dan debris menggunakan bantuan proteinase K dan buffer AL. DNA total dikoleksi menggunakan *DNeasy mini spin kolom* dilanjutkan dengan proses pemurnian DNA menggunakan buffer AW1 dan AW2. DNA total yang terkoleksi dalam spin filter dipindahkan ke elution tube yang telah disiapkan dengan menggunakan buffer AE. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen COI adalah; LCO 1490 (*forward*) urutan nukleotida primer GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G dan HCO 2189 (*reverse*) urutan nukleotida primer TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA.

Total volume yang digunakan untuk amplifikasi DNA adalah 25 μL , yang terdiri atas; 5 x *HOT Firepol Master Mix* 5 μL , ddH₂O 17 μL , Primer *Forward* 10pmol/ μL (LCO 1490) 1 μL , Primer *Reverse* 10pmol/ μL (HCO 2189) 1 μL , DNA template 1 μL . Amplifikasi DNA menggunakan mesin cPCR *TPersonal (Biometra)* dengan pengaturan suhu sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 95^oC selama 2 menit, denaturasi pada suhu 95^oC selama 40 detik yang dilakukan sebanyak 37 siklus, *annealing* pada suhu 50^oC selama 40 detik 37 siklus, elongasi pada suhu 72^oC selama 40 detik 37 siklus dan 1 siklus perpanjangan akhir pada suhu 72^oC selama 1 menit.

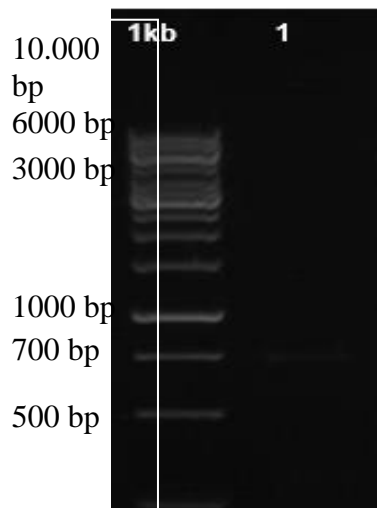
Produk amplifikasi DNA sebanyak 1 μL dan 10x *loading buffer* dimasukkan dalam masing-masing sumur yang telah disiapkan dalam gel. Pada salah satu sumur dalam gel di isi

dengan 2 µL 1 kb *ladder DNA marker*. Elektroforesis menggunakan 1x *TBE buffer* dan dialiri dengan tegangan listrik sebesar 80 *volts* dengan waktu kurang lebih 20 menit. Produk amplifikasi yang menunjukkan adanya pita pada panjang basa sekitar 700 bp selanjutnya dikirim ke jasa pelayanan sekuensing *FIRST BASE, Malaysia*. Prosedur pengiriman berupa sampel hasil amplifikasi berukuran 20 µl dan pada setiap sampel disertai primer *forward* dan *reverse* dengan ukuran 10 µl.

Hasil sekuens dari sampel rotifer didapat dalam bentuk format chromatogram, yang terdiri dari hasil sekuens sample *forward* dan *reverse*. Kualitas hasil sekuens dianalisis menggunakan perangkat lunak *Sequence scanner (ABsequence3)*, dimana kualitas hasil ekuens (urutan nukleotida) ditentukan berdasarkan pada QV^{+20} (*quality value* lebih besar dari 20) dan *CRL (continuous read length)*. Penyusunan DNA consensus dilakukan dengan menggunakan program software *MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 6*. Sekuens DNA consensus dicocokkan ke data base *GenBank* dengan menggunakan fasilitas *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil visualisasi gel elektroforesis sampel rotifer menggunakan pasang primer *LCO1490* dan *HCO2198* dengan 1kb marker sebagai pembanding ditampilkan pada Gambar 2. Lintasan DNA sampel terobservasi adanya pita DNA yang diasumsikan berada pada posisi sekitar 700 bp. Munculnya pita DNA tersebut mengindikasikan adanya homologi sempurna antara kedua pasangan primer tersebut dengan basa nukleotida gen *COI* pada sampel rotifer yang diamplifikasi. Kemunculan pita DNA hasil amplifikasi gen *COI* pada posisi sekitar 700 bp telah pula dilaporkan



Gambar 2. Visualisasi Hasil Amplifikasi Gen *COI* Rotifer Menggunakan Primer *LCO 1490* Dan *HCO 2189* dengan 1Kb Marker Sebagai Pembanding.

pada penelitian sebelumnya (Pelo, 2015).

Hasil sekuens produk PCR sampel rotifer didapat dalam bentuk file chromatogram hasil amplifikasi primer *forward* dan *reverse*. Panjang nukleotida yang berhasil diurutkan menggunakan primer *forward* dan *reverse* adalah sebanyak 680 nukleotida.

Nilai *CRL* sampel hasil sekunes menggunakan primer *forward* sebesar 659 nukleotida dengan $QV20^{+}$ sebanyak 667 nukleotida sedangkan primer *reverse* menunjukan nilai *CRL* 659 nukleotida dan $QV20^{+}$ sebanyak 656 nukleotida (Tabel 1), yang mengindikasikan kualitas hasil sekuens yang baik.

Tabel1. Kualitas Nukleotida Hasil Sekuens yang Dianalisis Menggunakan *Sequence Scanner (Absequence3)*.

Sampel	CRL	QV20 ⁺
Rotifer	<i>For</i>	659 667
	<i>Rev</i>	659 656

Panjang basa nukleotida dalam bentuk DNA consensus yang didapat dari penyatuan hasil sekuens primer *forward* dan *reverse* adalah sebanyak 688 bp. Keberhasilan penyusunan DNA konsesus yang mendekati panjang basa nukleotida gen target (COI sekitar 700 bp) dalam penelitian ini, dapat disebabkan antara lain oleh hasil isolasi DNA yang maksimal, ketepatan primer dan suhu annealing yang digunakan saat amplifikasi serta kualitas hasil sekuens yang baik. Pencocokan karakter DNA sampel rotifer dilakukan dengan bantuan software *Nucleotide BLAST* yang terintegrasi pada laman GenBank. Hasil pencocokan karakter DNA, mendapatkan lebih dari 100 laporan dengan skor kecocokan paling tinggi dengan sampel rotifer, yaitu berada diatas 200 nukelotida.

Skor kecocokan paling tinggi dengan sampel rotifer sebagai mana ditampilkan pada Gambar 4, merujuk pada spesies rotifer *Brachionus plicatilis* complex sp. *Maximum* dan total score yang merepresentasikan tingkat homogenitas nukleotida sampel

rotifer dengan database yang ada di genbank menunjukkan nilai yang tinggi (1003-1116), begitu pula halnya dengan prosentase query cover (panjang nukleotida sampel yang cocok dengan database) yang berada pada kisaran 87-96% dan prosentase identity (persentase kecocokan sekuens sampel dengan database) yang berada pada kisaran 96-97%. Expect value (nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan) yang rendah, yaitu 0.0 mengindikasikan tingginya kecocokan sampel rotifer dengan spesies rotifer *B. plicatilis* complex sp.

Rotifer *Brachionus plicatilis* complex sp merupakan kelompok spesies berbeda yang memiliki hubungan dekat antar anggota spesiesnya, dan sulit dibedakan berdasarkan bentuk morfologi tubuh. Awalnya, pelaku akuakultur membedakan rotifer *B. plicatilis* complex sp kedalam 2 tipe berdasarkan ukuran tubuh, yaitu tipe-S (*Small*) berukuran tubuh kecil, dan tipe-L (*Large*) berukuran tubuh besar (Fu

Tabel 2. Cuplikan hasil penelusuran teratas menggunakan sekuens gen COI *Brachionus* sp asal perairan Tumpaan, Minahasa Selatan (Tanggal akses 31 Januari 2017).

Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identity	Accession
Brachionus plicatilis complex sp. AUYEN075	1116	1116	96%	0.0	97%	KU.299251.1
Brachionus plicatilis complex sp. AUYEN082	1098	1098	95%	0.0	97%	KU.299257.1
Brachionus plicatilis complex sp. AUYEN083	1092	1092	95%	0.0	97%	KU.299258.1
Brachionus plicatilis complex sp. AUYEN079	1092	1092	95%	0.0	97%	KU.299255.1
Brachionus plicatilis complex sp. AUYEN076	1092	1092	95%	0.0	97%	KU.299252.1
Brachionus plicatilis complex sp. AUYEN010	1092	1092	95%	0.0	97%	KU.299248.1

et al. 1991). Rotifer tipe-S dikenal dalam dunia ilmiah sebagai *Brachionus rotundiformis* dan tipe-L sebagai spesies *Brachionus plicatilis*. Melalui analisis ekologi dan reproduksi, para peneliti mendapati adanya tipe spesies baru selain tipe-S dan tipe-L, yaitu tipe-SM (*Small Medium*) yang disebut sebagai *Brachionus ibericus*. Seiring dengan perkembangan teknologi molekuler, didapati bahwa rotifer *B. rotundiformis* masih terbagi lagi atas 2 tipe berdasarkan ukuran tubuh, yaitu tipe-S dan tipe-SS (super small), tetapi kedua tipe rotifer ini masih tergolong dalam spesies yang sama, yaitu *B. rotundiformis*. Kajian lebih mendalam dalam bidang filogeni molekuler yang melibatkan jenis-jenis rotifer dari berbagai belahan dunia mengungkap adanya kesulitan taksonomi kelompok spesies rotifer ini dan mengelompokkan jenis-jenis rotifer tersebut diatas sebagai rotifer *B. plicatilis* complex sp. Kelompok rotifer ini diduga terdiri atas sekitar 7 hingga 14 spesies rotifer yang memiliki bentuk morfologi tubuh yang sulit dibedakan, dan penamaan beberapa spesies penyusun kelompok rotifer ini belum dilakukan.

KESIMPULAN

Gen COI rotifer asal Tumpaan dapat diamplifikasi menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198. Hasil BLAST di situs Genbank menunjukkan bahwa spesies rotifer asal Perairan Tumpaan Minahasa Selatan memiliki kemiripan yang paling dekat dengan spesies *Brachionus plicatilis* complex sp.

DAFTAR PUSTAKA

Fembri, F.I.K. 2016. Karakteristik Pertumbuhan Populasi Rotifer *B. rotundiformis* Tanpa Pemberian Airasi Dan Mikro Alga Pada Media Kadar Garam Berbeda. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*,

Kurniasih, E.M. 2013. DNA Barcoding dan Analisis filogenetik ikan hiu yang didaratkan di Pelabuhan Perikanan Samudera Cilacap. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.

Peloa, A. 2015. Amplifikasi Gen Cythrome Oxidase Subunit I (COI) dari Sampel Sirip Ikan Hiu dengan Menggunakan Beberapa Pasangan Primer. SKRIPSI, tidak dipublikasikan. FPIK. Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Rumampuk, Y. 2003, *Deteksi Keberadaan Senyawa Bioaktif pada Rotifer Brachionus rotundiformis yang Dikultur Dengan pemberian Mikroalga Mirip Chlorella sp pada Salinitas yang Berbeda*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT. Manado.

Wibowo, S.E. 2003. Prosentase Miksis dan Ekstraksi Senyawa Bioaktif *Brachionus rotundiformis* Strain Manembo-nembo yang Dimanipulasi Lingkungan Hidupnya. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Unsrat. Manado.

Wullur, S., Sakakura, Y., Hagiwara, A. 2009. The Minute Monogonont Rotifer Proales similis de Beauchamp: Culture and Feeding to Small Mouth Marine Fish Larvae. *Aquaculture*, 293:62-67.

Wullur, S., Sakakura, Y., Hagiwara, A. 2011. The Minute Monogonont

Rotifer *Proales similis* de
Beauchamp: Dietary Value for
Marine Fish Larvae.
Aquaculture 315:355-360.