

IDENTIFIKASI MOLEKULER SIRIP IKAN HIU YANG DIDAPAT DARI PENGUMPUL SIRIP DI MINAHASA

(*Molecular Identification of Shark Fins Collected from Fins Collectors in Minahasa*)

Maratade Mopay^{1*}, Stenly Wullur¹, Erly Kaligis¹,

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

*e-mail :maratademopay@gmail.com

Sharks are highly vulnerable to the overfishing due to their slow growth and low reproductive rate. The high trade activity became a serious problem in maintaining the balance of marine ecosystems. Present study aimed to identify shark fins fin obtained from fin collectors in Tanawangko, Minahasa based on COI (*Cytochrome oxidase subunit I*) gene. DNA extraction was done following procedure *Dneasy Blood & Tissue Kit qiagen*, COI gene was amplified using primers primer Forward FishBCL5 (TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC) and Reverse HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA), sequences were analyzed using ABsequence3 and MEGA ver6, species identification was conducted using BLAST integrated in GenBank. A number of 4 shark fins were successfully collected from fin collectors in Tanawangko, Minahasa. BLAST results showed that the 4 fins were belong to species; *Carcharhinus amblyrhynchos*, *Prionace glauca*, *Carcharhinus sorrah*, dan *Carchahinus brevipina*

Keywords: Shark, fin, COI, Collector, Minahasa

Hiu adalah jenis ikan yang sangat rentan terhadap penangkapan secara berlebihan karena umumnya ikan ini memiliki pertumbuhan yang lambat dan tingkat reproduksi yang rendah. Tingginya aktifitas perdagangan sirip ikan hiu menjadi masalah serius dalam menjaga keseimbangan ekosistem laut. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sirip ikan hiu yang didapat dari pengumpul sirip di Tanawangko, Minahasa berdasarkan karakter nukleotida gen COI (*Cytochrome oxidase subunit I*). Metode ekstraksi DNA dilakukan mengikuti prosedur *Dneasy Blood & Tissue Kit qiagen*, amplifikasi gen COI menggunakan primer Forward FishBCL5 (TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC) dan Reverse HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA), sekuens dianalisa menggunakan ABsequence3 dan MEGA ver6, identifikasi spesies dilakukan menggunakan BLAST yang terintegrasi di laman GanBank. Sebanyak 4 potong sirip hiu dari individu berbeda berhasil didapatkan dari pengumpul sirip di Tanawangko, Minahasa. Hasil BLAST menunjukkan bahwa ke 4 sirip tersebut berasal dari spesies hiu; *Carcharhinus amblyrhynchos*, *Prionace glauca*, *Carcharhinus sorrah*, dan *Carchahinus brevipina*

Kata Kunci: Ikan Hiu, Sirip, COI, Collector, Minahasa

PENDAHULUAN

Hiu adalah jenis ikan yang sangat rentan terhadap dampak penangkapan secara berlebihan karena umumnya ikan ini memiliki pertumbuhan yang lambat dan memerlukan waktu yang lama untuk berkembang biak. Jenis ikan ini membutuhkan waktu sekitar 50-70 tahun untuk mencapai usia dewasa dan

berkembang biak. Dilaporkan pula bahwa ikan ini, hanya mampu menghasilkan jumlah anak yang relatif sedikit dibandingkan dengan kelompok ikan yang bernilai ekonomis lainnya (White *et al*, 2010).

Tingginya aktifitas perdagangan sirip ikan hiu menjadi masalah serius dalam menjaga keseimbangan ekosistem laut sehubungan dengan lambatnya perkembangbiakan hiu yang

berdampak pada penurunan populasi hiu yang signifikan dari tahun ke tahun (Mundy *et al.* 2013). Menghadapi masalah tersebut, berbagai kebijakan dalam tingkatan internasional, nasional hingga daerah telah dibuat untuk mengendalikan perburuan ikan hiu hingga perdagangan sirip ikan hiu. Akan tetapi, ikan hiu pada umumnya didaratkan dalam bentuk potongan tubuh setelah melalui proses *fining* pemisahan sirip dan bagian tubuh ikan (hiu), sehingga menjadi kendala serius dalam proses pengenalan spesies. Kesulitan yang sama dialami pula dalam kegiatan perdagangan sirip ikan hiu, yang mana objek yang digunakan sebagai acuan pengenalan spesies hanya berupa potongan sirip yang sulit untuk dikenali/identifikasi spesiesnya, dari data yang dipublikasikan Red list fauna data IUCN (*internasional Union for Conservation of nature*) menunjukkan ikan hiu telah dikategorikan spesies terancam punah.

DNA *barcode* merupakan salah satu pendekatan molekuler baru yang efektif diaplikasikan dalam upaya pengenalan atau identifikasi spesies, khususnya dari objek berupa potongan organ suatu individu, seperti sirip ikan hiu (Ward *et. al.*, 2009). Metode ini menggunakan urutan pendek segmen DNA yang ada di mitokondria, yaitu gen *Cytochrome oxidase subunit I* (COI) sebagai dasar analisis identifikasi spesies (Hebert *et al.*, 2003). Metode ini hanya membutuhkan potongan sampel yang sangat sedikit/kecil dari suatu organisme yang akan diidentifikasi dan memiliki tingkat akurasi yang tinggi dalam membedakan spesies (Holmes *et al.*, 2008). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi sirip ikan hiu yang didapat dari pengumpul yang ada di Kabupaten Minahasa melalui pendekatan molekuler.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel dilakukan di desa Tanawangko, Kabupaten

Minahasa. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado.

Sampel sirip ikan hiu yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel sirip punggung. Pemilihan potongan sirip punggung dilakukan untuk menghindari terjadinya kekeliruan pengambilan sampel pada individu yang sama. Sampel sirip punggung ikan hiu kemudian direndam dalam air selama kurang lebih 1 jam hingga tekstur jaringannya menjadi lembek. Tahap Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan bantuan *Dneasy Blood & Tissue kit qiagen* dan prosedur isolasi DNA berpatokan pada prosedur pabrikan *Dneasy protocol* (www.qiagen.com). Sampel sirip ikan hiu sebanyak 50 mg, dilisis menggunakan buffer ATL dan DNA total dari sampel dipisahkan dari protein dan debris menggunakan 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.

Amplifikasi gen COI dilakukan dengan menggunakan bantuan mesin PCR. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen COI Forward Fish BCL5 (TCAACYAATCAYAAAGATATYGGAC) dan primer reverse, HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA) (Pelo. 2015). Amplifikasi gen dilakukan dengan menggunakan 5 x HOT Firepol Master Mix. Total volume yang digunakan untuk amplifikasi adalah 25 μ L, yang terdiri atas 1 μ L DNA sampel dan 1 μ L volume dari masing-masing primer. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR TPersonal (Biometra) dengan pengaturan suhu sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, denaturasi pada 95°C selama 40 detik yang dilakukan sebanyak 37

siklus, annealing pada suhu 50°C selama 40 detik yang dilakukan sebanyak 37 siklus, elongasi pada suhu 72°C selama 40 detik yang dilakukan sebanyak 37 siklus dan 1 siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 1 menit. Keberhasilan amplifikasi gen COI selanjutnya diperiksa menggunakan teknik gel elektroforesis. Gel yang digunakan adalah gel berkonsentrasi 1% yang ditambahkan dengan maestrosafe prestained sebanyak 2 µL. Produk amplifikasi DNA sebanyak 4 µL dan 1 µL 10x loading buffer dimasukkan dalam masing-masing sumur yang telah disiapkan dalam gel.

Hasil pemeriksaan gel elektroforesis diamati lewat sinar UV transluminator yang diikuti dengan dokumentasi menggunakan kamera digital. Produk amplifikasi yang menunjukkan adanya pita pada panjang basa sekitar 600-700 bp dikirim ke jasa pelayanan sekuensing FIRST BASE, Malaysia. Hasil sekuens dari sampel sirip ikan hiu didapat dalam bentuk format chromatogram, yang terdiri dari hasil sekuens sample forward dan reverse.

Kualitas hasil sekuens dianalisis menggunakan aplikasi *ABsequence3*, dimana kualitas hasil sekuens (urutan nukleotida) ditentukan berdasarkan pada QV^{+20} (*quality value* lebih besar dari 20) dan *CRL* (*contiguous read length*). QV^{+20} adalah nukleotida yang memiliki nilai kualitas hasil sekuens lebih dari 20, sedangkan *CRL* adalah deretan panjang nukleotida kualitas baik (>20) yang tak terpotong. Karakter nukleotida gen COI dianalisis dengan menggunakan program software MEGA versi 6.

Identifikasi sirip ikan hiu dilakukan berdasarkan karakter nuklotida gen COI dari masing-masing sampel. Pengolahan data nukleotida hasil sekuens menggunakan perangkat computer sebagai alat penunjang utama yang sudah dilengkapi dengan konektifitas internet. Identifikasi spesies dilakukan dengan mencocokkan

data nukleotida sampel dengan data nukleotida yang terdokumentasi di laman Gen bank NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

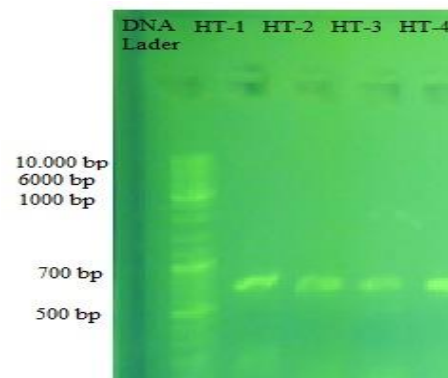
Metode pencocokan dilakukan dengan menggunakan teknik BLAST yang ada di laman tersebut. Penentuan status konservasi dari spesies yang berhasil teridentifikasi, dilakukan secara online dengan mengakses laman IUCN red list (www.iucn.org).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total sirip yang diperoleh dari pengumpul sirip di Tanawangko Minahasa, berjumlah 4 buah sirip punggung dengan kode sirip HT-1, HT-2, HT-3 dan HT-4 (Gambar 1)



Gambar 1. Bentuk dan tampilan sirip punggung ikan hiu yang didapat pengumpul di Tanawangko, Kabupaten Minahasa.



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi gen COI sirip ikan hiu dari Tanawangko (HT1, HT2, HT3, HT4)

Tabel 1. Kualitas hasil sekuens sirip ikan hiu yang dianalisis menggunakan program ABsequence. CRL (continuous read length) dan QV (quality value 20+).

No	Kode Sampel	Primer	CRL	QV20+
1	HT-1	For	651	660
		Rev	650	649
2	HT-2	For	653	655
		Re	659	662
3	HT-3	For	659	653
		Re	658	656
4	HT-4	For	649	656
		Re	652	657

Tabel 2. Cuplikan hasil penelusuran teratas menggunakan sekuens gen COI sirip hiu kode HT-1, HT_2, HT-3 dan HT-4 yang didapat dari pengumpul di Minahasa.

Description	Max Score	Total Score	E-value	Query cover	Identity	Accession
Sirip hiu kode HT-1						
Carcharhinus amblyrhynchos voucher SOSSRC:Carcharhinus amblyrhynchos OC-70 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1205	1205	0.0	95 %	100%	FJ519196.1
Carcharhinus amblyrhynchos voucher IBRC.01.77.03 cytochrome oxidase subunit 1(COI) gene, partial cds : mitochondrial	1203	1203	0.0	95%	99%	KF590385.1
Carcharhinus amblyrhynchos voucher BW-A2525 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds : mitochondrial	1203	1203	0.0	95%	99%	EU398594.1
Carcharhinus amblyrhynchos voucher BIOUG<CAN>BW-A3018 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1199	1199	0.0	95%	99%	EU398597.1
Carcharhinus amblyrhynchos voucher BW-A2522 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1199	1199	0.0	95%	99%	EU398596.1
Sirip hiu kode HT-2						
Prionace glauca mitochondrion complete genome	1267	1267	0.0	100%	99%	KF356249.1
Prionace glauca cytochrome oxidase subunit 1 gene, complete cds : mitochondrial	1267	1267	0.0	100%	99%	JQ654713.1
Carcharodon carcharias cytochrome oxidase subunit 1 gene. complete cds : mitochondrial	1256	1256	0.0	100%	99%	JQ654702.1
Prionace glauca isolate	1212	1212	0.0	95%	99%	KJ146042.1

GVH2121 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds : mitochondrial								
Prionace glauca	voucher	1210	1210	0.0	94%	100%	DQ108285.1	
BIOUG<CAN>BW-A073 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds : mitochondrial								
Sirip hiu kode HT-3								
Carcharhinus mitochondrion genome	sorrah complete	1267	1267	0.0	99%	99%	KF612341.1	
Carcharhinus IBRC011801	sorrah voucher cytochrome oxidase subunit 1(COI) gene, partial cds : mitochondrial	1208	1208	0.0	94%	100%	KC840949.1	
Carcharhinus SOSSRC OC-7	sorrah voucher Carcharhinus sorrah cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds : mitochondrial	1205	1205	0.0	93%	100%	FJ519167.1	
Carcharhinus IBRC011802	sorrah voucher cytochrome oxidase subunit 1(COI) gene, partial cds : mitochondrial	1203	1203	0.0	94%	99%	KC840950.1	
Carcharhinus NBFGR:CHN:SK14	sorrah voucher cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds : mitochondrial	1199	1199	0.0	94%	99%	KF899818.1	
Sirip hiu kode HT-4								
Carcharhinus mitochondrion genome	brevipinna complete	1273	1273	0.0	99%	99%	KM244770.1	
Carcharhinus voucher BW-A2529	brevipinna cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1210	1210	0.0	94%	100%	EU398602.1	
Carcharhinus voucher FDA 102	brevipinna cytochrome oxidase subunit 1(COI) gene, partial cds : mitochondrial	1208	1208	0.0	94%	100%	KF461149.1	
Carcharhinus voucher IBRC0122401	brevipinna cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds : mitochondrial	1208	1208	0.0	94%	100%	KF793760.1	
Carcharhinus voucher BW-A2530	brevipinna cytochrome oxidase subunit 1(COI) gene, partial cds: mitochondrial	1208	1208	0.0	94%	100%	EU398601.1	

Hasil amplifikasi gen COI dari keseluruhan sampel sirip ikan hiu (4 buah sampel) ditampilkan pada Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi gen COI dari semua sampel sirip ikan hiu menunjukkan adanya pita-pita DNA yang jelas dan tebal pada masing-masing lintasan sampel yang teramati pada posisi sekitar 700 bp gel elektroforesis menggunakan 10.000 bp DNA ladder sebagai pembanding. Hasil penelitian ini sama dengan yang dilaporkan oleh Peloa dkk (2015) yang menggunakan sampel sirip ikan hiu. Hebert et al (2003^a) juga melaporkan posisi pita gen COI yang sama pada berbagai jenis avertebrata laut, yang mana pita DNA gen COI muncul pada posisi sekitar 700 bp.

Kualitas hasil sekuens gen COI dari keseluruhan sirip hiu menunjukkan nilai CRL dan QV⁺²⁰ yang tinggi (> 600 nukleotida) (Tabel 1). Hasil *Nucleotida BLAST* pada laman GenBank menggunakan DNA konsensus HT-1 mendapatkan 100 laporan sekuens yang mirip dengan data yang ada di bank gen dengan tingkat kemiripan tinggi (skor ≥ 200 nukleotida). Hasil BLAST sekuens gen COI sirip hiu kode HT-1, HT-2, HT-3 dan HT-4, masing-masing merujuk pada spesies *Carcharhinus amblyrhynchos*, *Prionace glauca*, *Carcharhinus sorrah* dan *Carcharhinus brevipinna*. Skor keakuratan sekuens sirip hiu dalam penelitian ini dengan data yang ada di GenBank menunjukkan tingkat keakuratan yang tinggi, terlihat dari skor maksimum dan skor total (>1000 nukleotida), query cover (>93%), E-value (0.0), dan percent identity (>99%).

Status konservasi berdasarkan data IUCN redlist dari keseluruhan spesies yang teridentifikasi dalam penelitian ini adalah *near threatened* (NT) atau hampir terancam

KESIMPULAN

Hasil identifikasi molekuler 4 sampel sirip hiu yang didapat dari

pengumpul yang ada di Minahasa merujuk pada 4 spesies ikan hiu yang berbeda, yaitu; *Carcharhinus amblyrhynchos*, *Prionace glauca*, *Carcharhinus sorrah* dan *Carcharhinus brevipinna*. Hasil akses data status konservasi menurut situs IUCN redlist, menempatkan keempat spesies tersebut dalam kategori *Near Threatened* (NT) atau hampir terancam.

DAFTAR PUSTAKA

- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, . S. L. 2003^a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science*, 270(512), 313-321.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S., Ward, R.D. 2003^b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related speises. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science*, 270(1), 596-599.
- Holmes, B. H., Steinke, D., Ward, R. D. 2008. Identification of shark and rays fins using DNA Barcoding. *Fisheries Research*, 95(2),280-288.
- IUCN red list of Threatened Species.2016. <http://www.iucnredlist.org/>.diakses februari 2016.
- Mundy T.V., and V. Crook. 2013. Into the deep: Implementing CITES measures for commercially-valuable sharks and manta rays. Report prepared for the European Commission.
- IUCN red list of Threatened Speceies. 2016. <http://www.iucnredlist.org/>. diakses februari 2016.

White W.T., Last, P.R., Stevens, J.D.,
Yarsley, G.K., Fahmi, Darmadi.
2006. *Economically important
shark & rays Indonesia.*
*Australian Centre for
International Agricultural
Research, Canberra, Australia.p
2601.*