

Filogenetik Bulu Babi *Tripneustes gratilla* menggunakan Gen Sitokrom Oksidase Subunit 1

Philogenetics of Sea Urchin *Tripneustes gratilla* using Cytochrome Oxidase Subunit 1 Gene

Nurul Abidin¹, Rina Moge², Robi Binur²

¹Program Studi Pendidikan Biologi STKIP Muhammadiyah Manokwari, Manokwari 98315, Indonesia

²Jurusan Biologi FMIPA UNIPA, Manokwari 98312, Indonesia

*Korespondensi: masroel86@gmail.com

ABSTRAK

Bulu babi *Tripneustes gratilla* merupakan organisme multifungsi yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan potensial karena kandungan gizinya yang cukup tinggi. Organisme ini juga dapat digunakan sebagai bioindikator perairan laut dan sebagai organisme model dalam mempelajari aspek-aspek biologi. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari filogenetik (hubungan kekerabatan) bulu babi *T. gratilla* dari perairan Wasior dan Serui. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Negeri Papua pada bulan November - Desember 2009. Sampel diekstraksi dengan menggunakan Chelex 10 % dan diamplifikasi melalui teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Perunutan urutan nukleotida (*Sequencing*) fragmen gen CO I (*Cytochrome oxidase sub unit I*) dilakukan dengan menggunakan *sequencher* ABI 377 (*Applied Biosystem*). Data urutan nukleotida yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak (*software*) MEGA 4.0.2. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fragmen gen yang berhasil diamplifikasi berukuran 601 pasang basa (pb). Hasil pembacaan urutan nukleotida yang diperoleh memperlihatkan adanya variasi nukleotida diantara individu dari kedua perairan. Analisis filogenetik terhadap individu dari kedua perairan menghasilkan dua kelompok (*cluster*). Kelompok pertama terdiri dari SER 01 dan sub kelompok yang terdiri WSR 02 dan SER 02. Sedangkan kelompok kedua hanya terdiri dari WSR 01. Hasil ini memperlihatkan bahwa individu yang berasal dari Wasior (WSR 02) memiliki hubungan genetik yang dekat dengan individu yang berasal dari Serui (SER 02). Sehingga menunjukkan adanya keterkaitan genetik antara spesies *Tripneustes gratilla* dari kedua perairan tersebut.

Kata kunci: *Tripneustes gratilla*; filogenetik; gen sitokrom oksidase subunit 1

ABSTRACT

Sea urchin *Tripneustes gratilla* is multifunction organism that can be used as potential food source because of its high nutrient content. This organism can also be utilized bioindicator of sea waters and as a modal of organism for studying biology's purposes. The purposes of this research is studying Filogenetic of sea urchin *T. gratilla* from waters of Wasior and Serui. The research has been doing at the Biotechnology Laboratory of the state of University of Papua on November to December 2009. The sample was extracted by using Chelex 10 % and was amplified with PCR technic (polymerase chain reaction). Sequencing of CO I gens (cythochrome oxidase subunit I) was done using *sequencher* ABI 377 (*Applied Biosystem*). The result of nucleotid sequence data was analyzed utilizing MEGA 4.0.2. This researchs result showed that the gen fragment that was succesfully

amplified 601 bp. The sequence result of nucleotid which was analyzed the variety of nucleotid between the sample from two waters. Filogenetic analyzing toward individu of the two waters produce the two clusters. The first cluster consist of SER 01 and sub cluster which is consisted of WSR 02 and SER 02. While, the second cluster consist of only WSR 01. This result showed that every individu from Wasior (WSR 02) has close genetic relation with other individu from Serui (SER 02), that proved there is genetic flow between the two waters.

Keywords: *Tripneustes gratilla*; Filogenetic; Cythochrome oxidase subunit 1 gene.

PENDAHULUAN

Bulu babi *Tripneustes gratilla* merupakan salah satu spesies bulu babi yang gonadnya dimanfaatkan sebagai sumber pangan potensial karena gizinya cukup tinggi, dengan kandungan protein 15,43 % dan lemak 1,89 % (Mushtofa, 2007). Bulu babi *T. gratilla* juga merupakan salah satu organisme yang banyak digunakan sebagai model untuk mempelajari aspek-aspek biologi seperti biologi sel, biologi molekuler, regulasi gen, dan biokimia metabolit (Toha & Zain, 2006). Hewan ini hidup bebas, dengan penyebaran yang luas dan hampir ada di seluruh kawasan perairan. Organisme ini dapat ditemui pada semua laut dan lautan, serta hidup menyendiri maupun berkelompok (Aziz, 1987). Karena penyebaran yang cukup luas dan di daerah dengan pola geografi yang berbeda, sehingga menimbulkan banyak variasi pada bulu babi *T. gratilla*. Adanya variasi yang tampak secara fenotip pada penampilan fisik dari bulu babi merupakan perpaduan antara sifat genetik dan pengaruh dari lingkungan.

Penelitian tentang variasi, keanekaragaman maupun kekerabatan secara genetik banyak memanfaatkan mtDNA sebagai dasar untuk melihat adanya variasi, hubungan kekerabatan dalam spesies maupun studi yang berhubungan dengan populasi genetik (Wandia, 2001). Pemilihan mtDNA sebagai dasar untuk mempelajari adanya variasi genetik dan studi hubungan kekerabatan suatu spesies, dikarenakan gen ini banyak memiliki kelebihan dibandingkan dengan DNA inti

(nDNA). mtDNA diwariskan secara maternal dan laju evolusinya lebih tinggi dibandingkan DNA inti (Ratnayani et al. 2009).

Fragmen gen *cytochrome oxidase subunit I* (CO I) dalam penelitian ini digunakan untuk melihat adanya variasi genetik. Urutan Gen CO I merupakan salah satu dari 13 gen penyandi protein yang mengkode enzim *cytochrome oxidase* yang terdapat dalam mtDNA sel eukariot. Selain itu gen COI memiliki dua kelebihan, *pertama* gen COI sebagai primer universal yang kuat karena mampu mengenali urutan sebagian besar filum hewan, *kedua* gen COI mapu menunjukkan jarak yang lebih besar dalam filogenetik makhluk hidup (Hebert et al. 2003). Selain itu, karena perubahan urutan asam amino pada gen COI lebih rendah dibandingkan gen mitokondria lainnya, memungkinkan gen ini untuk mengenali organisme yang belum teridentifikasi sehingga dapat dikelompokkan dalam sistem taksonomi.

Filogenetik atau pohon filogenik merupakan model matematika yang digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan dalam suatu spesies maupun populasi (Holmes, 1998). Filogenetik dibedakan menjadi dua yaitu, filogenetik berdasarkan data molekuler dan filogenetik yang berdasarkan data morfologi. Dari kedua filogenetik tersebut, filogenetik molekuler lebih akurat menggambarkan hubungan kekerabatan dibanding karakter morfologi atau fisiologi karena berdasarkan data urutan nukleotida. Dimana, hal tersebut sesuai dengan Moritz (1996), yang menyatakan bahwa

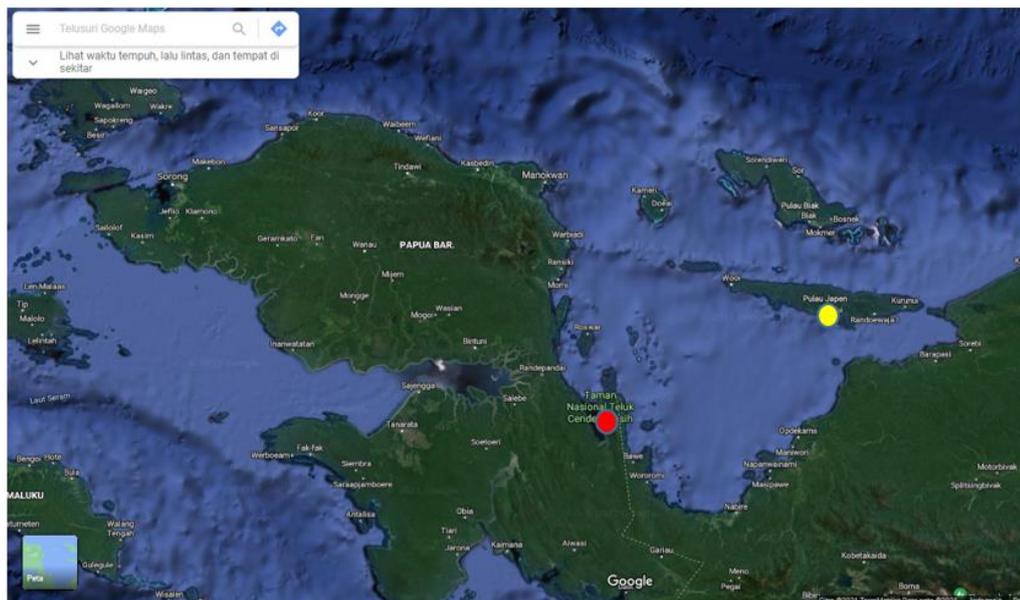
karakter molekuler merupakan sumber yang kaya untuk analisis filogenetik spesies. Selain itu juga dengan sistematika molekuler dapat dipahami dengan baik tentang sejarah biogeografi dan proses pembentukan populasi (Avice, 1994).

Filogenetik suatu gen atau organisme biasanya digambarkan dalam bentuk pohon dan akar. Dimana yang mempunyai akar dikenal dengan pohon akar (*rooted trees*) dan yang tidak mempunyai akar dikenal dengan pohon tanpa akar (*unrooted trees*) (Holmes, 1998). Untuk merekonstruksi filogenetik dari data molekuler diperlukan metode pendekatan. Terdapat dua metode yang umum digunakan, yaitu metode matriks jarak (*distance matrix methods*) dan metode parsimony maksimum (*maximum parsimony methods*) (Irma et al. 2005).

Metode matriks jarak (*distance matrix methods*), merupakan metode

yang menggunakan pendekatan dengan menggunakan data jarak genetik atau evolusi dari seluruh pasangan spesies atau populasi dan rekonstruksi filogenetik dibentuk dengan mempertimbangkan jarak tersebut. Sedangkan pada metode parsimony maksimum (*maximum parsimony methods*), data yang digunakan mengacu pada urutan asam amino atau urutan nukleotida dan filogenetik dibentuk dengan meminimalkan jumlah filogenetik (Irma et al. 2005)

Pada saat ini informasi pada tingkat molekuler mengenai bulu babi *T. gratilla* terutama yang berasal dari perairan Papua dan Papua Barat khususnya Wasior dan Serui masih sangat terbatas. Oleh karena itu penelitian merupakan penelitian awal yang berguna untuk penelitian selanjutnya.



Gambar 2. Lokasi pengambilan sampel dilakukan di Provinsi Papua (Serui, lingkaran warna kuning) dan Provinsi Papua Barat (Wasior, lingkaran warna merah)

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel Bulu Babi *T. gratilla* dikumpulkan dari perairan pantai Wasior di Kabupaten Teluk Wondama Provinsi Papua Barat dan perairan Serui Kabupeten Yapen Waropen Provinsi Papua. Dalam Penelitian ini sampel yang dianalisis sebanyak 4 sampel, masing-masing 2 sampel tiap lokasi. Bagian jaringan yang diambil adalah duri utuh hingga pangkalnya dan disimpan dalam etanol 95 %

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian ujung pangkal duri bulu babi *T.gratilla* yang berasal dari perairan Wasior (WSR) dan Serui (SER) masing-masing sebanyak 2 individu. Chelex® (BIO-RAD), *Taq* DNA Polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), larutan buffer PCR (500 mM

KCL, 100 mM Tris-HCl pH 8,4 pada suhu 20°C, 15 mM. MgCl₂ dan 1mg/ml gelatin), gel agarose, *Loading dye*, Bigdye© *terminator chemistry* (Perkin Elmer), formamida, etidium bromida (EtBr), *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) dan *Exonuclease* (EXO) (Amersham Biosciences Corporation, Arlington Heights, Illionis, USA), Alkohol 95 % dan 70 %, isopropanol 40 %, oligonukleotida primer (Trip R dan Trip F), spiritus, buffer *Sequencing, Molecular Grade Water*, akuades, label, tissu dan aluminium foil.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan larutan Chelex® (Barber et al. 2002). Caranya yaitu dengan mengambil bagian pangkal duri *T. gratilla* kira-kira 1 Mg, kemudian dimasukkan dalam larutan Chelex 10%.



Gambar 1. *T. gratilla* (foto: Abidin)

Selanjutnya dilakukan pengadukan dengan alat vortex selama 15 detik dan disentrifugasi selama 10 detik pada kecepatan 12000 rpm. Tabung yang berisi jaringan tubuh bulu babi *T.gratilla* tersebut kemudian dipanaskan selama 25 menit pada suhu 95° C. Kemudian setelah dipanaskan tabung divortex dan disentrifugasi kembali. Cairan yang berwarna jernih pada bagian atas tabung adalah yang akan digunakan dalam reaksi PCR.

Amplifikasi DNA dengan PCR

Proses amplifikasi dengan PCR pada fragmen gen COI menggunakan program *Hot-start* dan *Gold* (Saiki et al., 1988) mengikuti protokol modifikasi Barber dan Erdmann (2000). Sampel DNA yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam tabung eppendorf sebanyak 1 µL dan dicampur dengan reagen PCR yang terdiri dari dH₂O, larutan buffer PCR, dNTP, oligonukleotida primer COI Trip1R (5'-GGCATTCCAGCTAGTCCTARAA-3') dan COI Trip2F (5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3'), *Taq* DNA polymerase hingga volume total 25 µL kemudian divortex hingga tidak terdapat gelembung udara dalam tabung dan kemudian disentrifugasi selama 10 detik. Setelah itu dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan mesin PCR (*Thermal cycler*) pada suhu 95°C selama 7 menit untuk pembukaan rantai polinukleotida (*denaturation*), 52°C selama 30 detik untuk penempelan (*annealing*) primer pada DNA cetakan (*template*), dan 72°C selama 1 menit untuk pemanjangan rantai nukleotida

(*elongation*) dan diulang hingga 39 siklus. Setelah siklus ke-39, tabung diinkubasi pada suhu 72°C selama 10 menit.

Elektroforesis DNA

Sampel DNA yang telah diamplifikasi diambil 3 µL dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa dan ditambahkan 2 µL *loading dye* 6x dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet. Tahap akhir adalah memasukkan ladder (penanda DNA) sebanyak 4 µL pada sumuran gel agarosa yang pertama. Selanjutnya gel dielektroforesis pada arus 200 V selama 25 menit. Kemudian gel direndam dalam larutan etidium bromida selama 15 menit dicuci dengan air dan diamati dengan UV transluminator.

Purifikasi produk PCR (SAP/EXO)

Purifikasi menggunakan *Shrimp Alkaline phosphatase* (SAP) dan *Exonuclease* (EXO). Tabung eppendorf strip 200 µL (sama dengan tabung PCR) diberi label, setelah itu buat master mix SAP/EXO dengan mencampur SAP dan EXO dalam tabung eppendorf 250 µL. 5 µL sampel produk PCR yang positif dimasukkan dalam tabung eppendorf strip dan ditambahkan 1 µL master mix SAP/EXO. Kemudian disentrifugasi hingga tidak ada gelembung udara dalam tabung tersebut. Tabung yang telah disentrifugasi kemudian dimasukkan dalam mesin *Thermocycler* dan diinkubasi dengan menggunakan program SAP/EXO yaitu pada suhu 30°C selama 30 menit, suhu 80°C selama 15 menit dan pada suhu 25°C selama 1 menit. Setelah tahap SAP/EXO selesai, hasilnya dilanjutkan ke tahap *Cycle sequencing*.

Siklus Pengurutan nukleotida (*Cycle sequencing*)

Produk PCR yang telah dipurifikasi selanjutnya dilanjutkan pada

tahap *Cycle sequencing*. Tahap ini dilakukan dengan membuat master mix, yaitu dengan menambahkan buffer *sequence* 15 µL, Primer COI Trip1F 3 µL, Big Dye© 3 µL dan dH₂O 45 µL. Master mix yang telah siap, kemudian diambil 11 µL dan dimasukkan dalam tabung eppendorf yang dibagi dalam 4 tabung. Selanjutnya produk PCR yang telah di EXO/SAP diambil 1 µL dan dimasukkan dalam tabung yang telah berisi master mix, kemudian tabung disentrifugasi hingga tidak ada gelembung udara. Setelah itu tabung dimasukkan dalam mesin *Thermocycler* dan diinkubasi dengan menggunakan program *Cycle sequencing* yaitu diinkubasi pada suhu 96 °C selama 10 detik, suhu 50 °C selama 5 detik, suhu 60 °C selama 4 menit dan diulang hingga 24 siklus dan pada siklus terakhir diinkubasi pada suhu 15 °C selama 3 menit.

Presipitasi DNA

Produk yang telah selesai pada tahap *cycle sequencing* selanjutnya dipresipitasi dengan menggunakan isopropanol 40 % sebanyak 40 µL untuk tiap tabung. Kemudian disentrifugasi selama 30 menit, setelah itu tutup tabung dibuka dan balik, dengan di alasi tisu kimtech untuk membuang larutan isopropanol. Pelet DNA yang telah diberi isopropanol selanjutnya ditambahkan alkohol 70 % sebanyak 46 µL tiap tabung kemudian disentrifugasi selama 1 menit. Setelah itu tabung dibuka penutupnya dan dibalik dengan posisi terbalik dengan di alasi tisu kimtech untuk menyerap sisa alkohol. Produk akhir dari DNA yang telah dipresipitasi selanjutnya diberi formamida sebanyak 10 µL tiap tabung, setelah itu tabung diberi penutup, dikemas dengan menggunakan aluminium foil.

Peruntan urutan nukleotida (*DNA Sequencing*)

Produk presipitasi dikirim ke Cornell University, AS untuk penentuan

urutan nukleotida (*sequencing*) dengan menggunakan mesin *Sequencher ABI 377* (*Applied Biosystem*). Hasil dari peruntutan urutan nukleotida (*sequencing*) diakses di website milik Cornell University di <http://cores.lifesciences.cornell.edu/user/dev/index.php>.

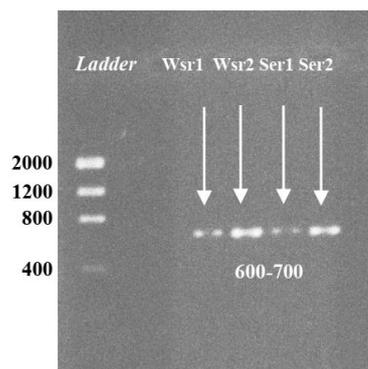
Analisis data

Data hasil pembacaan urutan nukleotida dianalisis dengan melakukan penjumlahan menggunakan ClustalW pada perangkat lunak (*software*) MEGA 4.0.2 (Tamura *et al.* 2007). Masing-masing individu disejajarkan dengan satu sama lain untuk melihat adanya variasi. ClustalW merupakan program penyepadanan nukleotida atau protein secara umum, program ini menghitung kesepadanan terbaik dari urutan nukleotida tertentu, sehingga kesamaan dan perbedaannya dapat diketahui (Mahardika, 2008). Kemudian dibuat pohon filogenetiknya berdasarkan metode Maksimum Parsimony, setelah itu ditentukan indeks perbedaannya (*Disparity index*) untuk menentukan seberapa dekat hubungan kekerabatannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Urutan Nukleotida Fragmen Gen COI

Hasil visualisasi elektroforesis pada gel agarose 1 % menunjukkan ukuran pasang basa (pb) yang seragam yaitu berkisar 600-700 pb. Ukuran besarnya pasang basa ditentukan berdasarkan perbandingan migrasi pita DNA sampel yang tervisualisasi dengan *Ladder* yang telah diketahui besar ukuran pasang basa tiap fragmennya.



Gambar 2. Hasil elektroforesis fragmen DNA dengan agarose 1%.

Ukuran yang relatif seragam dari fragmen DNA yang diamplifikasi, menunjukkan bahwa primer yang digunakan yaitu COI Trip1R dan COI Trip2F bekerja secara spesifik pada ukuran basa tertentu. Menurut Poerba dan Yuzammi (2008), bahwa jumlah pita yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung dengan primer mengenal homolognya pada cetakan DNA yang digunakan. Semakin banyak daerah penempelan dari primer yang digunakan semakin banyak jumlah pita DNA yang dihasilkan. Banyaknya jumlah pita yang berhasil diamplifikasi juga menentukan hasil peruntutan urutan nukleotida (*sequencing*), dimana akan diperlihatkan dengan bentuk puncak grafik yang dihasilkan.

Puncak grafik (*peak*) yang baik ditandai dengan tampilannya yang tidak berhimpitan dengan *peak* yang lain. Sehingga pada proses sekuensing, *sequencher* dapat menerjemahkannya menjadi nukleotida yang benar tanpa menghasilkan nukleotida yang tidak teridentifikasi dengan baik (ambigu). Tetapi hal itu tergantung pada produk amplifikasi yang dihasilkan dari proses PCR, sehingga mempengaruhi kualitas urutan nukleotida yang berhasil dibaca pada proses sekuensing.

Urutan nukleotida dari keempat individu yang berhasil dibaca mempunyai ukuran pasang basa sebesar 601 pb, yang diawali dengan urutan triplet kodon AGT dan diakhiri dengan

CCA. Meskipun urutan diawal dan akhir sama, tetapi dijumpai variasi urutan nukleotida di sepanjang rantai nukleotida yang berhasil dibaca. Hal ini mengindikasikan adanya variasi dalam individu tersebut. Seperti terlihat pada Tabel 2 berikut yang memuat persentase komposisi nukleotida dari tiap individu.

Tabel 2. Persentase komposisi nukleotida masing-masing individu dari perairan Wasior dan Serui.

| Individu | % A | % C | % G | % T |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| WSR 01 | 28.2 | 21.0 | 19.1 | 31.7 |
| WSR 02 | 26.6 | 22.7 | 20.3 | 30.4 |
| SER 01 | 27.9 | 21.5 | 19.3 | 31.3 |
| SER 02 | 28.2 | 21.5 | 19.1 | 31.1 |
| Rata-rata | 27.7 | 21.7 | 19.5 | 31.2 |

Tabel 2 memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan persentase komposisi nukleotida dari masing-masing individu. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi nukleotida tersebut tidak sesuai atau terdapat penyimpangan terhadap hukum Chargaf. Hukum Chargaf menyatakan bahwa perbandingan basa purin sama dengan basa pirimidin (Irma *et.al*, 2005). Menurut Akhmaloka (1993), ada beberapa hal yang menyebabkan terjadinya penyimpangan yaitu, karena guanin (G) dan sitosin (C) atau adenin (A) dan timin (T) tidak berada dalam jumlah yang ekimolar. Tetapi hal ini dapat diterangkan dengan adanya penggantian oleh 5-metilsitosin. Selain itu pada penelitian ini yang digunakan sebagai penanda genetik adalah fragmen gen, bukan merupakan DNA secara utuh. Sedangkan hukum Chargaf berlaku untuk perbandingan komposisi basa suatu DNA secara utuh. Oleh karena itu, dimungkinkan perbandingan komposisi basa yang didapat tidak sama dengan hukum Chargaf.

Perbedaan persentase komposisi nukleotida dijumpai pada masing-masing individu ditemukan dalam urutan nukleotida suatu organisme. Seperti diketahui bahwa suatu produk asam amino dapat dikode oleh lebih dari satu kodon, dimana kodon-kodon tersebut tersusun triplet. Sehingga

didapatkan kelimpahan kombinasi kodon yang mengkode asam amino tertentu. Menurut Pai (1992), dalam suatu organisme umumnya dijumpai kelimpahan kode genetik yang mengkode satu asam amino tertentu, yang selanjutnya kelimpahan tersebut mengalami *degenerasi*.

Data tersebut memberikan gambaran bahwa terdapat variasi pada tingkat nukleotida walaupun perbedaannya tidak terlalu besar, atau dapat dikatakan hampir seragam. Tetapi hal ini memberikan bukti bahwa antar individu dalam spesies yang sama pun memiliki perbedaan.

Variasi Nukleotida

Hasil penjajaran (*alignment*) dengan menggunakan program *ClustalW* lebih memperjelas adanya variasi urutan nukleotida antar individu seperti terlihat pada Gambar 3. Variasi itu terlihat pada nukleotida yang diperlihatkan. Urutan nukleotida yang sama diidentifikasi sebagai titik (.) dan nukleotida yang tidak sama diidentifikasi dengan huruf. Sedangkan adanya *gap* ditandai dengan (-) yang berarti nukleotida yang mengalami mutasi.

Variasi antar individu yang terlihat dari hasil penjajaran membuktikan bahwa terdapat variasi pada *T. gratilla* dari kedua perairan. Variasi yang terdapat pada suatu organisme tergantung beberapa faktor selain faktor genetik yaitu kondisi habitatnya. Habitat sebagai tempat hidup dan berkembang biak sangat dipengaruhi oleh kondisi geografis, ketersediaan makanan, arus laut maupun adanya predator. Selain itu juga dipengaruhi oleh faktor demografi, tingkah laku (*behavioral*), iklim dan proses tektonik (Palumbi, 1995 *disitasi* Grosberg dan Cunningham, 2001). Adanya faktor-faktor tersebut dapat mempengaruhi kehidupan *T. gratilla* yang dapat menimbulkan terjadinya variasi sebagai bentuk adaptasi terhadap kondisi lingkungan di habitatnya.

| | | | | | | | | |
|-----------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|----------|
| Wasiior_1 | AGTCTCACCT | AATTCTACCA | GGATTGGTA | TGATTTCCCG | TAACTCACTA | CTCAGGAAAG | CGAGAACCCT | TGGATATT |
| Wasiior_2 |T... | | | | | | | |
| Serui_1 |T..... | | | | A.A.GG..... | | |C.. |
| Serui_2 |T..... | | | | A.C.G..... | | | |
| | GGTATGGTTT | ATGCAATGAT | TGCTATAGGA | ATACTAGGAT | TTTTAGTATG | AGCTCTCATA | TGTTTACAGT | AGGAATGG |
| | | | | | | | | |
| | ACGTAACACA | CGAGCATACT | TCCCGCTGCA | ACATGATAAT | TGCCGTACCA | ACAGGAATTA | AGGTTTTTAG | ATGAATGG |
| | | | | | | | | |
| | CAACACTCCG | GATCAATCTC | AGGAGAAACC | CCACTACATG | AGCCCTGGGT | TTGTTTTCTA | TTTACATTAG | GAGGACTA |
| | | | | | | |C | |
| | ACTGGGATTG | TCAGCTATTG | CTCATTGACG | TTGTACTACA | CGACACTTAC | TACGTGGTAG | CTCACTTCCA | TTATGTAC |
| | | | | |C..... | | | |
| | ATCAATGGGA | GCCGTCTTTG | CATTTTTGCG | GATCCCCTGG | TTCCTTTTTT | CAGGTACAAC | CACACCCTCT | TGGGAAAG |
| | ...G..... | | | | | | | |
| | GTGCACTTCT | TTTAGTTATG | GAGTCAATCA | ACATTCTTCC | CACAACACTT | TTAGACTTGG | GGAAATGCCA | |
| |G..... | | | | |C.. | | |
| | | | | | |G.. | | |
| | | | | | |G.. | | |

Gambar 3. Hasil analisis penjajaran (*alignment*) dengan menggunakan program ClustalW.

Tabel 3 Urutan nukleotida *T. gratilla* yang memperlihatkan variasi.

| Wasiior 01 | Wasiior 02 | Serui 01 | Serui 02 |
|------------|------------|------------|-----------|
| AGTCTCACCT |T... |T... |T... |
| TGATTTCCCG | |A |A |
| TAACTCACTA | | A.GG..... | C.G-..... |
| TGGATATT | |C.. | |
| TTTACATTAG |C |G.... | |
| TACGTGGTAG | C..... | | |
| ATCAATGGGA | ..G..... | | |
| TTTAGTTATG |G.... | | |
| TTAGACTTGG |C.. |G.. |G.. |
| GGAATGCCA | | ..-..... | |

Tabel 3 memperlihatkan adanya variasi urutan nukleotida dari hasil penjajaran dengan program ClustalW pada software MEGA 4.0.2. Seperti yang diungkapkan oleh Hidayat *et al* (2008), yang menyatakan bahwa adanya *gap* menunjukkan proses mutasi yang berupa delesi maupun insersi. Selain itu, dengan penjajaran (*alignment*) akan menunjukkan tingkat homologi diantara sampel-sampel yang diteliti.

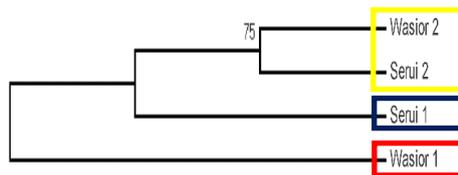
Wasiior 02 memiliki perbedaan yang cukup signifikan dengan Wasiior 01 dibandingkan dengan individu Serui

01 dan Serui 02, dimana hal itu juga terlihat pada hasil analisis filogenetik yang memperlihatkan bahwa Wasiior 01 tidak berada dalam satu kelompok dengan Wasiior 02, tetapi berada dalam satu kelompok yang terpisah dengan pertama (Wasiior 02, Serui 02 dan Serui 01). Hal ini memperlihatkan bahwa individu Wasiior 02 memiliki hubungan genetik dengan individu yang terdapat di perairan Serui dan membuktikan adanya aliran genetik diantara perairan Wasiior dan Serui.

Filogenetik *T. gratilla*

Rekonstruksi filogenetik *T. gratilla* dengan menggunakan metode maksimum parsimony, menghasilkan dua kelompok (*cluster*) dengan dukungan nilai *bootstrap* sebesar 75. Kedua kelompok terdiri dari individu yang berbeda lokasi yaitu kelompok pertama terdiri dari WSR 02, SER 02 dan SER 01. Sedangkan kelompok yang kedua hanya terdiri dari WSR 01.

Gambar 4 menunjukkan adanya dua kelompok yang berbeda walaupun dalam satu spesies. Pada kelompok pertama terdiri dari SER 01 dan terdapat sub kelompok yang terdiri dari WSR 02 dan SER 02, ini menunjukkan bahwa terdapat tiga individu dengan tipe yang sama. Selain itu pada gambar filogenetik tersebut terlihat bahwa dalam kelompok pertama terdapat sub kelompok yang terdiri dari dua individu berbeda lokasi yaitu WSR 02 dan SER 02. Hal ini mengindikasikan keduanya mempunyai hubungan genetik yang lebih dekat dibandingkan dengan individu lainnya.



Gambar 4. Filogenetik *T. gratilla* hasil analisis dengan metode maksimum parsimoni menghasilkan dua kelompok (*cluster*).

Tabel 4 menjelaskan bahwa masing-masing individu memiliki indeks perbedaan yang beragam. Indeks perbedaan terbesar yaitu antara WSR 01 terhadap WSR 02 dan SER 01 sebesar 0.01273. Terlihat pada pohon filogeni bahwa WSR 01 tidak berada dalam satu kelompok dengan kedua individu tersebut. Sedangkan indeks perbedaan terkecil yaitu antara WSR 02 dan SER 02 sebesar 0.003634, dimana kedua individu tersebut berada dalam satu sub kelompok.

Nilai jarak perbedaan masing-masing individu menggambarkan seberapa jauh atau dekatnya kekerabatan suatu individu. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa jarak perbedaan yang signifikan adalah antara WSR 01 dengan WSR 02, dan SER 01. Suatu jarak perbedaan dianggap signifikan apabila nilainya ≥ 0.01 (Malay et al, 2000). Walaupun terdapat jarak yang signifikan yaitu sebesar 0.01273 antar individu dari kedua perairan tersebut, namun hasil analisis filogenetik membuktikan bahwa *T. gratilla* dari kedua perairan memiliki hubungan khususnya individu WSR 02 dan SER 02. Hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya isolasi terhadap individu baik yang berasal dari perairan Wasior (WSR) maupun dari perairan Serui (SER). Analisis filogenetik memberikan hasil yang memperlihatkan hubungan genetik antara individu yang berasal dari kedua perairan tersebut.

Tabel 4 Indeks perbedaan (*Disparity index*) antar individu *T. gratilla*.

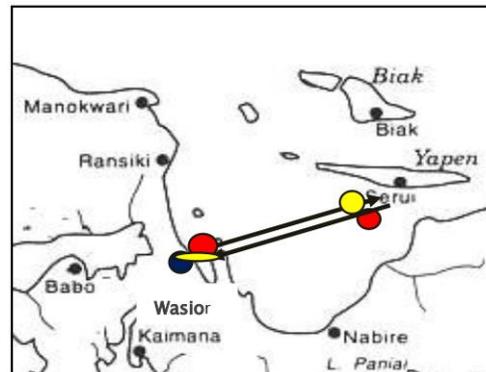
| Individu | WSR 01 | WSR 02 | SER 01 | SER 02 |
|----------|--------|---------|---------|---------|
| WSR 01 | - | 0.01273 | 0.01273 | 0.00909 |
| WSR 02 | | - | 0.00545 | 0.00364 |
| SER 01 | | | - | 0.00545 |
| SER 02 | | | | - |

Hubungan genetik yang terlihat antara *T. gratilla* dari perairan Wasior dan perairan Serui dimungkinkan terjadi karena penyebaran individu pada saat fase larva planktonik yang terbawa oleh arus laut. Fase larva planktonik *T. gratilla* mempunyai waktu yang cukup panjang, dimana menurut Shokita (1991) berkisar lebih dari 25 hari. Sedangkan menurut Juinio-Menez (1998) *disitasi* Malay *et al.* (2000), bahwa fase hidup larva *T. gratilla* berkisar 42-52 hari. Sehingga memungkinkan arus laut menyebarkan larva tersebut ke kawasan perairan yang cukup jauh dari tempat asalnya. Menurut Malay *et al.* (2000), bahwa fase larva *T. gratilla* mempunyai waktu yang cukup panjang sehingga arus laut adalah media yang mampu menyebarkan larva ke daerah yang lebih jauh. Adanya penyebaran larva ini memungkinkan terjadinya aliran genetik sehingga menimbulkan keanekaragaman pada suatu kawasan tertentu. Bahri, *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa arus laut di kepulauan Yapen Waropen mempunyai pola yang unik karena dipengaruhi sejumlah faktor seperti faktor fisika dan kimia yang berasal dari letak geografis yang berdekatan Samudera Pasifik. Selain itu, adanya hubungan genetik antara kelompok bulu babi *T. gratilla* dari perairan wasior dan serui karena kedua lokasi spesies tersebut masih dalam satu kawasan Teluk Cenderawasih.

Bahri, dkk (2017) yang menjelaskan bahwa pola arus laut di Teluk Cenderawasih mempunyai karakteristik semi tertutup sehingga menyebabkan kecilnya potensi aliran variasi genetik yang berasal dari luar Teluk Cenderawasih. Karena keragaman genetik dapat terjadi karena dua faktor utama yaitu kondisi habitat dan eksploitasi yang berlebihan.

Individu *T. gratilla* yang berasal dari kedua perairan memiliki hubungan genetik. Hal ini menunjukkan bahwa pada perairan tersebut tidak ada isolasi yang membatasi penyebaran *T. gratilla* dari kedua perairan. Adanya arus laut di perairan tersebut bukan merupakan faktor

pembatas tetapi merupakan media yang berperan menyebarkan larva *T. gratilla* dari kedua perairan, sehingga aliran genetik antar kedua perairan dapat terjadi dengan baik.



Gambar 5. Ilustrasi yang menggambarkan aliran geneti *T. gratilla* di perairan Wasior dan Serui

KESIMPULAN

Hasil peruntukan nukleotida bulu babi *T. gratilla* menunjukkan adanya variasi nukleotida antar individu dari perairan Wasior dan Serui. Namun secara umum urutan nukleotida individu dari kedua perairan memiliki tingkat homologi yang seragam atau tinggi. Analisis menunjukkan variasi yang terdapat pada urutan nukleotida dari kedua individu tidak berbeda nyata atau dapat dikatakan seragam. Dimana hasil analisis memberikan nilai indeks perbedaan (*disparity index*) terbesar adalah antara WSR 01 dengan WSR 02 dan SER 02 sebesar 0.01273, sedangkan indeks perbedaan terkecil adalah antara WSR 02 dan SER 02 yaitu 0.00364.

Hasil Analisis filogenetik menunjukkan bahwa bulu babi *T. gratilla* asal perairan Wasior dan Serui memiliki hubungan kekerabatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada bapak Abdul Hamid. A. Toha, Mr. Paul Barber, Mr. Craig. J. Starger atas bimbingan teori, metode dan pelatihan di laboratorium dan atas

dukungan dana melalui bakpak sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhmaloka. (1993). Struktur dan Fungsi Asam Nukleat. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Avise, J.C. (1994). Why Employ Molecular Genetic Markers? In Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman-Hall. 5-14.
- Aziz, A. (1987). Makanan dan Cara Makan Berbagai Jenis Bulu babi. Oseana. 12(4). 91-100.
- Bahri, S., Atmadipoera, A.S. dan Madduppa, H.H. 2017. Genetic Diversity of Olive Ridley *Lepidochelys olivaceae* Associated with Current Pattern in Cendrawasih Bay Papua. Jurnal Ilmu dan Teknologi kelautan Tropis. 9 (2). 747-760.
- Barber, P.H, and Erdmann, M.V. (2000). Molecular Systematic of The Gonodactylidae (Stomatopoda) using Mitochondrial Cytochrome oxidase C (subunit 1) DNA Sequence Data. J. Crustacean Biol. 20. 20-36.
- Barber, P.H, Palumbi S.R., Erdmann, M.V., and Moosa, M.K. (2002). Sharp Genetic Breaks among Populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) Indicate Limits to Larval Transport: Patterns, Causes, and Consequences. Molecular Ecology. 11. 659-674.
- Folmer, O., Black, M., W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. (1994). DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3(5). 294-299.
- Grosberg, R., Cunningham, C.W. (2001). Genetic Structure in The Sea: from Population to Communities in Marine Ecology. Sinauer Press. Sunderland MA. Pp. 61-84.
- Hebert, P.D.N., Sujevan. R, and deWaard J.R. (2003). Barcoding Animal life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. The Royal Society. Biology Letters. 10. 1-4.
- Hidayat, T., Kusumawaty, D., Yati K.D.D, Muchtar, A.A., dan Mariana, D. 2008. Analisis Filogenetik Molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Jurnal Matematika dan Sains. 13 (1).
- Holmes, E.C. (1998). Trees in Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach. pp. 11-36.
- Irma, E.K., Jeni dan A. H. A. Toha. (2005). Buku Ajar Biologi Molekuler. Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Negeri Papua. Manokwari.
- Malay, M.C.D, M.A.R Juinio-Menez and C.J Villanoy. (2000). Population Genetic Structure of The Sea Urchin *Tripneustes gratilla* from Selected Sites in Western Luzon and Eastern Philippines. Proceeding 9th international coral reef symposium. Bali, Indonesia.
- Mahardika, I.G.N.K, dan Lies Parede, L. (2008). Analisis Filogenetik Sekuen Nukleotida bagian Hipervariabel Protein VP2 Virus Gumboro Isolat Indonesia. Jurnal Veteriner. 9 (2). 60-64.
- Mushtofa, J. (2007). Bulu Babi (*Tripneustes gratilla*). <http://www.ulfana.multiplay.com/d> oc. 22 April 2009.
- Moritz, C. (1996). Uses of molecular phylogenies for conservation., In New Uses for New Phylogenies (Harvey, Ph.H., Leigh Brown, A.J., Maynard Smith, J., Nee, S., eds). Oxford University Press. Oxford. pp 203-216.
- Pai. C.A. (1992). Dasar-dasar genetika. Edisi Kedua. Penerjemah; Muchidin Apandi. Erlangga. Jakarta.

- Poerba, Y.S. dan Yuzammi. (2008). Pendugaan Keragaman Genetik *Amorphophallus titanum* Becc. Berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA. Biodiversitas.9(2).103-107.
- Radjab, A.W. (2001). Reproduksi dan Siklus Bulu babi (Echinoidea). Oseana. 26(3). 25-26.
- Ratnayani K., Yowani, S.C. dan Liangky, S.S. (2009). Amplifikasi Fragmen 0,4 kb Daerah D-loop DNA Mitokondria Lima Individu Suku Bali Tanpa Hubungan Kekerbatan dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. Jurnal Kimia 3 (1): 14-20.
- Jaafar, R.B.T.A. (2008). Population Genetic Studies of Marble goby *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker, 1852) in Malaysia using Microsatellite and Mitochondrial DNA Markers. Thesis. Universiti Sains Malaysia.
- Schulz, M. and Riidel, G. (1989). Accumulation of The Cytochrome c Oxidase Subunits I and II in Yeast Requires a Mitochondrial Membrane-Associated Protein, Encoded by The Nuclear SC01 gene. J. Mol. Gen. Genet. 216:37-43.
- Shokita, S, Kakazu, K, Tomori, A, and T. Toma. (1992). Aquaculture in Tropical Areas. Midori Shobo Co.Ltd.
- Solihin, D.D. (1994). Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi Populasi pada Hewan. Jurnal Hayati. 1(1): 1-4.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.2 Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- Toha, A.H.A, Zain, S. (2006). Bulu Babi : Bioindikator Perairan Laut. Jurnal Perikanan dan Ilmu Kelautan. Berkala Ilmiah Penelitian Perikanan dan Kelautan. 1 (4).
- Toha, A.H.A, Suhaemi dan Binur, R. (2009). Usul Penelitian Strategis Nasional TA 2009. Analisis Keragaman Hayati Bulu Babi (*Tripneustes gratilla*) dalam Upaya Konservasi dan Menghindari Kepunahan Organisme Model Riset Biologi. Universitas Negeri Papua. Manokwari.
- Wandia, I.N. (2001). Genom Mitokondria. Jurnal Veteriner FKH. Universitas Udayana. 2(4).