

DNA Barcoding *Mobula* sp. yang Didaratkan di TPI Tanjung Luar Berdasarkan Analisis Gen ND5

Ahmad Izzul Rifqi Ansori¹, Baiq Hilda Astriana^{1*}, Mahardika Rizqi Himawan¹, Ni Luh Astria Yusmalinda², Andrianus Sembiring², Ni Putu Dian Pertiwi^{2*}, M. Danie Al Malik², Enex Yuniarti Ningsih², Abdul Kohar³

^{1*}Universitas Mataram, ^{2*}Biodiversitas Indonesia, ^{3*}WCS

*E-mail: ahmadizzulrifkiansori@gmail.com

ABSTRACT

Mobula is a genus of stingrays in the family of Mobulidae, which are distributed throughout tropical ocean with warm to moderate climates. Data information about sharks and stingrays is still limited. It may also impact the survival rates of sharks and stingrays. Molecular identification is tracing the monomer sequences of particular information molecule. Molecular identification (DNA Barcoding) can be amplified with PCR (*Polymerase Chain Reaction*) method. This research was conducted with the aim of knowing the species of *Mobula* using DNA barcoding and kinship using phylogenetic trees which was landed at Tanjung Luar Fish Market, East Lombok, West Nusa Tenggara based on analysis of the NADH dehydrogenase 5 (ND5) gene. The steps involved in the DNA Barcoding technique include: DNA extraction, PCR (Polymerase Chain Reaction), DNA visualization by electrophoresis, and DNA sequencing. Based on the identification results, there's only 3 *Mobula* species were found, which are *M.mobular*, *M.thurstoni* and *M.tarapacana*. Based on the phylogenetic tree formed, the samples are from 3 different species seen from the genetic distance and clade formed. Therefore, research related to the identification of the origin of *Mobula* which was landed at the Tanjung Luar Fish Market needs to be carried out.

Keyword : *Molecular, Mobula, Tanjung Luar*

PENDAHULUAN

Mobula merupakan genus pari dalam famili Mobulidae, yang dapat ditemukan di seluruh dunia di laut tropis dan hangat dengan iklim yang sedang (Kementerian Perikanan dan Kelautan, 2018). Ikan *Mobula* ini tersebar luas seluruh perairan di dunia, dan dapat ditemukan baik di perairan tropis maupun sub tropis (Kementerian Perikanan dan Kelautan, 2018).

WPP adalah wilayah pengelolaan perikanan di Indonesia yang terbagi menjadi 11 wilayah, yaitu WPP 571, 572, 573, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717 dan 718 yang dimana pemabagian tersebut berdasarkan wilayah, ekologi, karakteristik dan sumber daya ikan (Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan No. 18/PERMEN-KP/2014). Berdasarkan WPP 573 spesies *Mobula* yang banyak di tangkap adalah *Mobula thurstoni* dan *Mobula mobular*. Ikan pari *Mobula* sendiri ada sembilan jenis spesies yang masuk dalam genus *Mobula*, diantara sembilan spesies tersebut terdapat dua spesies memiliki ukuran tubuh yang besar yang dimana spesies *Mobula japonica* sering ditangkap dengan menggunakan jaring insang tuna. Tidak hanya *Mobula japonica*, akan tetapi *Mobula* jenis yang lainnya juga ikut tertangkap oleh jaring insang tuna tersebut seperti *Mobula tarapacana*, serta *Mobula thurstoni*. Hal ini disebabkan karena ikan pari *Mobula* memiliki nilai ekonomi yang tinggi, terutama pada bagian insangnya. Sehingga banyak nelayan yang menadikan ikan Pari *Mobula* menjadi tangkapan utama. (Dharmadi,2011).

Mobula menjadi daya tarik wisata baik lokal ataupun mancanegara, namun saat ini pari *Mobula* terancam punah karena populasi *Mobula* diperairan alamnya sudah menurun tajam dari tahun ke tahun (Kementerian Perikanan dan kelautan, 2018). Ikan *Mobula* ini

tersebar luas ke seluruh perairan di dunia, dan dapat ditemukan baik itu di perairan tropis maupun sub tropis (Kementrian Perikanan dan Kelautan, 2018). Pada saat ini informasi mengenai data yang berhubungan dengan Ikan hiu dan Pari masih terbatas. Hal ini juga dapat berdampak pada kelangsungan hidup dari hiu dan pari tersebut (Aisyah, 2021) karena pada dasarnya pengelolaan sumber daya *Mobula* membutuhkan data tersebut. Oleh sebab itu untuk mengetahui asal usul dari ikan Pari *Mobula* ini, salah satu cara yang dapat di lakukan yaitu melalui DNA Barcoding.

Dimana pada metode ini dapat membantu proses identifikasi *Mobula* dan metode ini penting dilakukan sebagai salah satu langkah awal untuk memprediksi perairan asal dari jenis Pari yang ditemukan. DNA Barcoding, dilakukan karena metode ini dapat membantu dalam pengidentifikasian *Mobula*, baik dalam kondisi segar maupun spesimen. Pemilihan teknik DNA Barcoding ini dilakukan, karena hanya dibutuhkan sedikit jaringan tubuh pada *Mobula* untuk di Identifikasi. Menurut Sahaba *et.al*, (2021) mengemukakan bahwa penggunaan teknik DNA Barcoding pada sampel hiu pari di Tanjung Luar masih minim. Oleh sebab itu, penelitian terkait identifikasi asal usul dari *Mobula* yang di daratkan pada PPI tanjung luar perlu dilakukan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan Untuk mengetahui DNA Barcoding dan kekerabatan menggunakan pohon filogenetik dari *Mobula* sp. yang didaratkan di TPI Tanjung Luar, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat berdasarkan analisis Gen NADH dehydrogenase 5 (ND5).

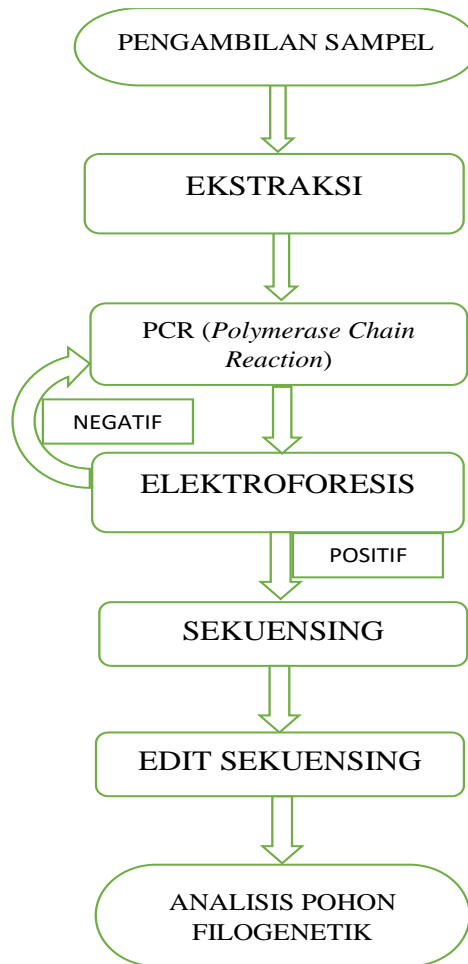
METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Pengambilan sampel dilakukan dari bulan Maret sampai Agustus 2022, sampel diambil langsung di TPI Tanjung Luar, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat. Proses Laboratorium dilakukan Biodiversitas Indonesia (Bionesia) Denpasar, Bali pada bulan Desember 2022.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan yaitu metode purposive sampling. Purposive sampling merupakan metode yang teknik pengambilan sampel dengan menentukan kriteria - kriteria tertentu (Mukhsin,*et.al*,2017). Artinya, sample diambil secara acak atau klaster. Akan tetapi dalam penelitian ini mengambil potongan tubuh ikan pari kemudian dimasukkan ke dalam plastik ziplock dan diberi etanol 96%. Kemudian pada plastik ziplock diberi keterangan berupa kode sampel, tanggal dan lokasi pengambilan sampel. Untuk sampel yang diambil berupa daging dari ikan *mobula* yang baru di daratkan (Lenaini, 2021). Metode molekuler dilakukan dengan menggunakan teknik DNA Barcoding. Tahapan yang dilakukan dalam teknik DNA Barcoding antara lain: ekstraksi DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), visualisasi DNA dengan elektroforesis, dan sequencing DNA.



Gambar 2. Bagan Alur Identifikasi Molekuler

Protokol PCR yang digunakan yaitu Bioline dengan *annealing* 55°C. Komposisi reaksi PCR satu sampel adalah 24 µl terdiri atas sampel DNA 2 µl, ddH₂O 10 µl, primer satu 1,25 µl, primer dua 1,25 µl dan BIOLINE Ready mix 12,5 µl. Herlan *et al.* (2019) Reaksi dilakukan dalam 38 siklus dengan parameter sebagai berikut: tahap pradenaturasi dilakukan pada suhu 94 °C selama 3 menit, selanjutnya tahap kedua denaturasi dengan suhu 94 °C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) suhu 55 °C selama 30 detik, tahap pemanjangan (*extension*) pita DNA dengan suhu 72°C selama 1 menit dan tahap terakhir yaitu pemanjangan akhir (*final extention*) pada suhu 72 °C selama 2 menit. Visualisasi hasil PCR melalui teknik elektroforesis (120 V, 30 menit) dengan menggunakan media agarose 1% yang ditambahkan dengan ethidium bromide. Untai DNA yang dihasilkan dalam reaksi PCR akan berpendar dibawah sinar UV karena ethidium bromide dapat berikatan dengan DNA.

Analisis Data

Pengeditan hasil sekuensing dan penentuan komposisi nukleotida dianalisis dengan MegaX (Kumar *et al.*, 2018). Urutan DNA disejajarkan dengan ClustalW vers. 1.4 (Thompson *et al.*, 1994). Pola dan tingkat substitusi diperkirakan di bawah model parameter-2 Kimura (1980). Identifikasi spesies secara online menggunakan data genbank pada NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dengan berbagai kode akses dengan metode BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) atau Barcode di Boldsystem (Barcode of life

data system v4) (Ratnasingham dan Hebert, 2007). Analisis DNA juga dilanjutkan dengan menghitung jarak genetik antar spesies dan juga analisis pohon filogenetik mobula menggunakan metode Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) dengan model Kimura 2-parameter, nilai bootstrap 1000x. Bootstrap adalah pengulangan pada pembuatan pohon filogenetik, nilai bootstrap merupakan nilai yang digunakan untuk menguji seberapa baik set data model yang kita gunakan (Kumar *et al.*, 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Genetik (DNA Barcoding)

Hasil yang diperoleh pada Tabel 1. menunjukkan bahwa Hasil BLAST berhasil mengidentifikasi ke-10 sampel dengan persentase nilai kemiripan berkisar antara 98.95 % - 100 %. Berdasar hasil BLAST sampel teridentifikasi menjadi 3 spesies yaitu *Mobula mobular* berjumlah 2 sampel dengan persentase kemiripan 99.47%, *M. thurstoni* berjumlah 7 sampel dengan nilai persentase kemiripan 98.95 – 100% dan *M. tarapacana* berjumlah 1 sampel dengan nilai persentase kemiripan 100%.

Tabel 1. Hasil BLAST Sampel Mobula yang Didaratkan di TPI Tanjung Luar

No.	Sampel	Hasil Blast	Panjang Sekuen	Nomor Akses	Ident (%)	Query Cover (%)
1.	Mobula BIO01.07.001	<i>Mobula mobular</i>	964	KX151644.1	99,47	100
2.	Mobula BIO01.07.002	<i>Mobula mobular</i>	970	KX151644.1	99.47	99
3.	Mobula BIO01.07.003	<i>Mobula thurstoni</i>	925	KX151650.1	99.73	100
4.	Mobula BIO01.07.004	<i>Mobula tarapacana</i>	948	FJ235626.1	100	100
5.	Mobula BIO01.07.005	<i>Mobula thurstoni</i>	956	FJ235629.1	99.91	99
6.	Mobula BIO01.07.006	<i>Mobula thurstoni</i>	936	FJ235629.1	100	100
7.	Mobula BIO01.07.007	<i>Mobula thurstoni</i>	477	NC037219.1	98.95	100
8.	Mobula BIO01.07.008	<i>Mobula thurstoni</i>	977	FJ235629.1	100	100
9.	Mobula BIO01.07.009	<i>Mobula thurstoni</i>	914	KM364993.1	100	100
10.	Mobula BIO01.07.010	<i>Mobula thurstoni</i>	944	FJ235629.1	99.89	100

Hasil sequencing harus dirapikan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk analisis. Sampel yang berhasil disekuen kemudian dianalisis dengan menggunakan metode DNA barcoding dan program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dengan data yang ada pada GeneBank. Hasil BLAST berhasil mengidentifikasi ke-10 sampel dengan persentase nilai kemiripan berkisar antara 98.95 % - 100 %. Menurut Leray *et al.* (2013) persentase kemiripan minimal untuk menyatakan suatu spesies adalah 98 %. Sedangkan nilai Query Cover menunjukkan kesamaan sekuen yang dibandingkan berkisar antara 99% - 100%. Jika dilihat hasil identifikasi genetik DNA Barcoding 10 sampel *Mobula sp.* yang di daratkan di TPI Tanjung Luar terdapat 3 spesies yang berbeda, yaitu ID BIO01.07.001 dan BIO01.07.002 teridentifikasi sebagai spesies *M. mobular*, ID sampel BIO01.07.004 teridentifikasi spesies *M. tarapacana*, sedangkan ID sampel BIO01.07.003, BIO01.07.005, BIO01.07.006,

BIO01.07.007, BIO01.07.008, BIO01.07.009 dan BIO01.07.010 teridentifikasi sebagai *M. thurstoni*.

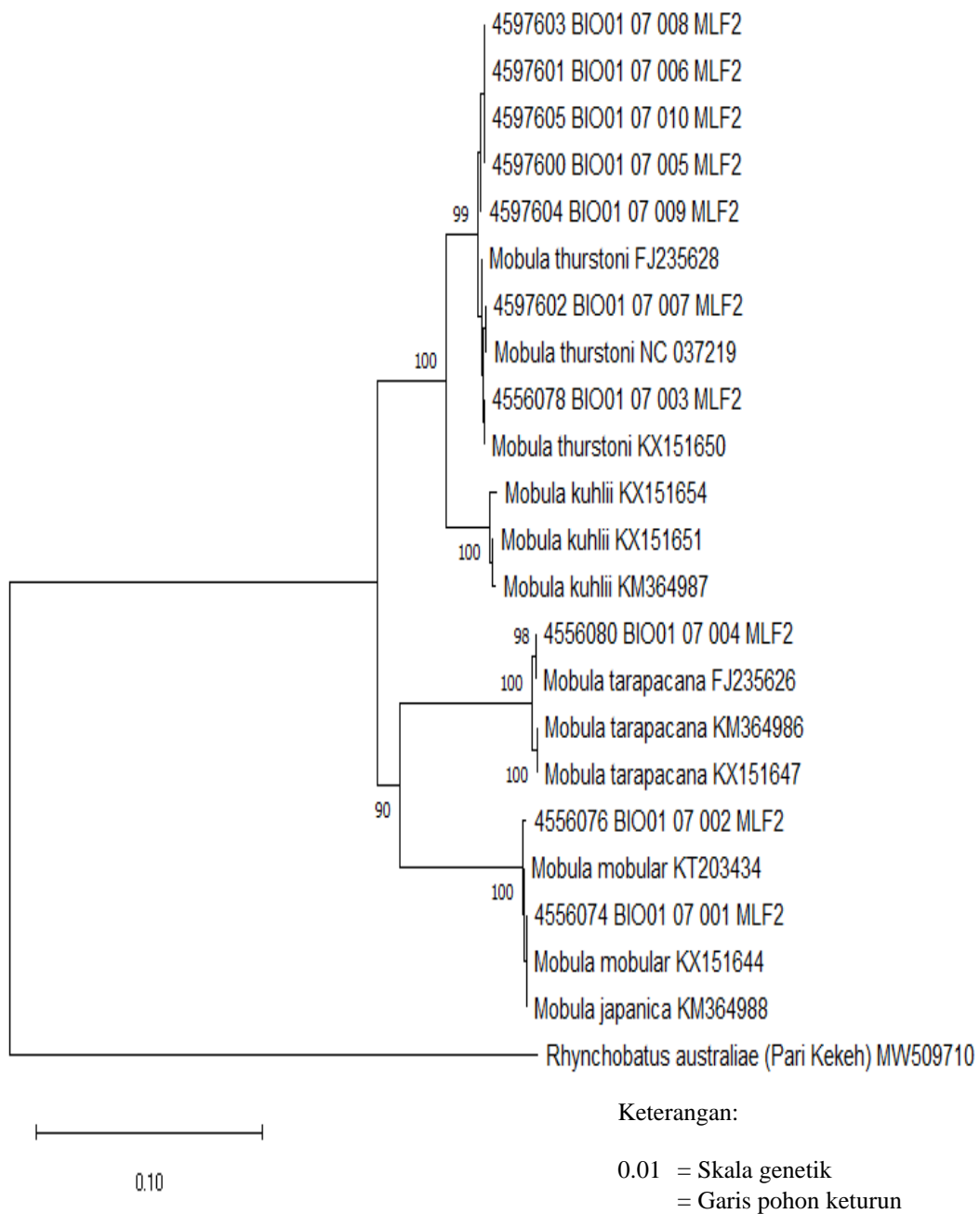
Analisis Filogenetik dan Jarak Genetik

Hasil yang diperoleh pada Analisis Filogenetik dan Jarak Genetik menunjukkan bahwa Pembuatan pohon filogenetik menambahkan data spesies *Mobula* yang terdapat pada GeneBank. Data tersebut sebagai pembanding sampel yang didapatkan dari TPI Tanjung Luar. Rekonstruksi pohon filogenetik yang dihasilkan menunjukkan adanya 4 clade yang terbentuk, sehingga didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 2. Distribusi Clade Sampel *Mobula* yang di TPI Tanjung Luar

No.	Clade	Jumlah	Kode Sampel
1.	Clade 1		BIO01 07 003, BIO01 07 005, BIO01 07 006, BIO01 07 007, BIO01 07 008, BIO01 07 009, BIO01 07 010
2.	Clade 3		BIO01 07 004
3.	Clade 4		BIO01 07 001, BIO01 07 002

Clade 2 terbentuk dari data genetik yang ditambahkan database GeneBank



Gambar 1. Pohon Filogenetik Sampel *Mobula* yang Didaratkan di TPI Tanjung Luar

Tabel 3. Jarak Genetik Sampel Mobula yang di TPI Tanjung Luar

	Thrustoni	Tarapacana	Mobular	Kuhli
Thrustoni (clade 1)				
Tarapacana (clade 3)	0.1178			
Mobular (clade 4)	0.1120	0.1170		
Kuhli (clade 2)	0.0382	0.1217	0.1195	

Pembuatan pohon filogenetik Mobula dilakukan dengan penjejeran sekuen (urutan basa nukleotida) DNA Mobula (alignment). Pembuatan pohon filogenetik menambahkan data genetik dari spesies Mobula yang terdapat pada GeneBank. Hal tersebut bertujuan sebagai data pembanding untuk menunjukkan perbedaan antara spesies tersebut dengan sampel Mobula dari TPI Tanjung Luar. Rekonstruksi pohon filogenetik menghasilkan 4 clade yang berbeda. *Outgroup* yang digunakan adalah *Rhynchobatus australiae* (Rahayu dan Nugroho, 2015). Penggunaan *R. australiae* sebagai *outgroup* karena masih dalam satu kelas dengan Mobula. Analisis filogenetik atau cladistic memiliki arti clade atau kelompok keturunan. Clade seperti cabang pohon yang menunjukkan organisme tertentu. Clade akan membentuk cladogram dan selanjutnya membentuk pohon filogenetik (Mirabella, 2011).

Penambahan data genetik Mobula yang terdapat pada GeneBank dalam pembuatan pohon filogenetik sebagai data pembanding. Perbedaan pada masing-masing spesies atau antar clade dapat dilihat dari jarak genetiknya. Jarak genetik semakin mendekati 0 itu semakin dekat dan sebaliknya semakin mendekati 1 itu semakin jauh. Menurut Zamroni dkk. (2014), bahwa jarak genetik 0 berarti spesies berasal dari populasi yang sama. Menurut Nei (1972), jarak genetik termasuk rendah apabila memiliki nilai antara 0,010 dan 0,099; sedang 0,1–0,99; dan tinggi 1,00–2,00.

Pohon filogenetik menunjukkan adanya 4 clade yang terbentuk. Jarak genetik terjauh ditunjukkan pada clade 2 dan clade 3 yang memiliki nilai 0,1217 yang dimana nilai jarak genetik tersebut berada pada nilai sedang. Berdasarkan analisis pohon filogenetik 5 clade tersebut menunjukkan spesies yang berbeda. Berdasarkan hasil identifikasi yang saya lakukan di lapangan pada saat pengambilan sampel memang memiliki beberapa perbedaan. Sehingga dapat dipastikan kedua clade ini merupakan dari spesies yang berbeda. Semakin besar nilai matriksnya, menunjukkan bahwa tingkat kekerabatan spesies semakin jauh dan dibuktikan oleh bentuk pohon filogenetik (Verawati, 2015). Sedangkan Jarak genetik terdekat ditunjukkan pada clade 1 dan clade 2, yang memiliki jarak genetik 0.0382 dimana nilai jarak genetik tersebut berada pada nilai rendah. Perbedaan jarak genetik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain genetik drift dan seleksi alam (Freeland, 2012). Semakin rendah jarak genetik antar spesies menunjukkan semakin sedikit perbedaan pasangan basa antar spesies yang diikuti dengan semakin tinggi persamaan morfologinya.

KESIMPULAN

Berdasarkan identifikasi DNA barcoding dapat disimpulkan bahwa hanya mendapatkan 3 spesies Mobula yaitu *M. mobular*, *M. thrustoni* dan *M. tarapacana*. Berdasarkan pohon filogenetik yang terbentuk sampel tersebut merupakan 3 spesies yang berbeda dilihat dari jarak genetik dan clade yang terbentuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu/Bapak dosen pembimbing program studi ilmu kelautan, WCS yang telah membantu dan memberikan arahan terkait perijinan dan pengambilan sampel di TPI Tanjung Luardan penelitian ini didanai dan didukung oleh *Rufford Foundation* (34956).

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, S., Farhaby, A, M., 2021. Identifikasi Molekuler Dan Status Konservasi Ikan Pari Hiu (Rhinidae) Yang Didaratkan Di Pulau Bangka. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 5(1), 61-69.
- Dharmadi., Sunarno, M, T, D., Edrus, I, N. 2011. Perikanan Dan Aspek Biologi Ikan Pari Lampengan, *Mobula japonica* Di Perairan Selatan Jawa. *Bawal*, 3 (6), 369-376.
- Dharmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *J. Wartazoa* 21(1): 1-10.
- Freeland, J.R., Kirk, H., & Petersen. S. (2012). *Genetic analysis of multiple populations in molecular ecology*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons.
- Kementrian Perikanan dan Kelautan. 2018. Kabar terbaru dari ikan pari mobula. <https://kkp.go.id/djpsdkp/ditppsdk/artikel/2785-kabar-terbaru-dari-ikanpari-mobula>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547– 1549.
- Lenaini, I. (2021). Teknik pengambilan sampel purposive dan snowball sampling. *Historis: Jurnal Kajian, Penelitian dan Pengembangan Pendidikan Sejarah*, 6(1), 33-39.
- Leray, M., J. Y. Yang., C. P. Mayer., S. C. Mill.s., N. Agudelo., V. Ranwes., J. T. Boehm., dan R.J. Machida. 2013. A New Versatile Primer Set Targeting a Short Fragment of The Mitochondrial COI Region for Metabarcoding Metazoan Diversity: *J. Frontiers in Zoology*. 10(1):34. DOI: 10.1186/1742- 9994-10-34.
- Madduppa, H. (2020). Perbandingan Hasil Metode Identifikasi Spesies: Morfologi dan Molekuler Pada Ikan Julung-Julung Di TPI (Tempat Pelelangan Ikan) Muara Angke, DKI Jakarta. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 13(3), 168-175.
- Mirabella, F.M. 2011. Pendekatan Pohon dalam Filogenetik. Makalah IF2091 Struktur Diskrit-Sem. I. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Rahayu, D. D. dan E. D. Nugroho. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi*. Plantaxia. Yogyakarta. 185 hlm.
- Sahaba, M, A, B., Abdullah, A., Nugraha, R. 2021. Dna Barcoding Untuk Autentikasi Produk Hiu Segar Dari Perairan Nusa Tenggara Barat. *Jphpi* , 24(3), 425-432.
- Thompson JD, Desmond GH, Toby JG. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Verawati, I. (2015). *Identifikasi Molekuler, Keragaman Genetik dan Karakteristik Habitat Siput Laut (Nudibranchia) Dari Beberapa Populasi di Indonesia*. Skripsi. Bogor, Indonesia: Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, Program Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Zamroni, A., Suwarso, & Nugroho, E. (2014). Struktur genetika populasi ikan malalugis biru (*Decapterus macarellus* Cuvier, 1833) di sekitar Sulawesi berdasarkan Mt-DNA marker. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 20(1), 31-41.