

Analisis Filogenetik dan DNA Barcode Ektoparasit *Octolasmis cor* yang terifestasi pada Kepiting Bakau *Scylla* spp.

Sutianto Pratama Suherman*¹; Sulastris Arsad²

1. *Jurusan Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Jenderal Sudirman No. 06, Kota Gorontalo 96128, Gorontalo, Indonesia
2. Program Studi Manajemen SumberDaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia

*Korespodensi : sutiantoprutama@ung.ac.id

(Diterima 02-07-2020; Direvisi 05-07-2020 Dipublikasi 25-07-2020)

ABSTRAK

Identifikasi morfologi memiliki keterbatasan dan hanya bisa diaplikasikan pada saat memasuki fase remaja atau dewasa, Identifikasi menggunakan sekuens DNA merupakan alternative yang dipakai dalam mengungkapkan taksonomi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui komposisi DNA dari gen 18s rRNA ektoparasit *Octolasmis cor* dan menganalisis filogenetik serta identifikasi spesies. Hasil menunjukkan karakteristik molekuler 18 rRNA dari sampel parasit *O.cor* yang ditemukan di wilayah Sulawesi Selatan diperoleh panjang DNA 1500 bp dengan komposisi basa Adenin 354 (23,6 %), Guanin 444 (29,6 %), , Timin 360 (24 %) dan Cytosin 342 (15,1%). Berdasarkan hasil analisis filogenetik menunjukkan jarak 0,004 yang artinya memiliki kedekatan hubungan atau kemungkinan dari spesies yang sama

Kata Kunci : Analisis Filogenetik; *Octolasmis cor* ; 18s rRNA

Phylogenetic Analysis and DNA of Ectoparasite Octolasmis cor manifested on Mud Crab Scylla spp. in South Sulawesi Waters

ABSTRACT

Morphological identification has limitations and can only be applied when entering the adolescent or adult phase, identification using DNA sequences is an alternative used in expressing taxonomy. The purpose of this study was to determine the DNA composition of the 18s rRNA ectoparasite *Octolasmis cor* gene and analyze phylogenetic and species identification. The results showed 18 rRNA molecular characteristics from *O.cor* parasite samples found in South Sulawesi region obtained DNA length 1500 bp with base composition of Adenine 354 (23.6%), Guanin 444 (29.6%), Thymine 360 (24%) and Cytosin 342 (15.1%). Based on the results of the phylogenetic analysis, it shows a distance of 0.004, which means it has a close relationship or possibility of the same species

Keyword : Analisis Filogenetik; *Octolasmis cor*; 18s rRNA

PENDAHULUAN

Kepiting bakau (*Scylla* spp) merupakan komoditas perikanan yang hidup diperairan banyak digemari oleh konsumen domestik dan mancanegara. Sehingga kepiting bakau menjadi salah satu komoditas ekspor yang bernilai ekonomis (Domitilla *et al.* 2020). Namun benih kepiting bakau di Indonesia masih mengandalkan hasil tangkapan alam, terutama di Sulawesi Selatan. Kekurangan dari benih tangkapan alam sangat mungkin terinfestasi berbagai jenis parasit antara lain *Octolasmis* spp.

Octolasmis spp adalah jenis parasit dari kelas Maxillopoda yang sering dijumpai pada beberapa jenis crustacean seperti kepiting, lobster dan udang. Parasit ini terdiri dari peduncle dan capitulum yang di bungkus cangkang (Praptiasih, 2010) Parasit ini dapat berkembang pada lingkungan budidaya. karena siklus hidupnya tidak memerlukan inang perantara (Jeffries *et al* 1995).

Kondisi padat penebaran tinggi disertai dengan menurunnya kualitas air dapat meningkatkan infestasi. Hal ini di buktikan Irvansyah *et al* (2012) dengan melihat tingkat intensitas serangan parasit *Octolasmis* spp dari benih kepiting tangkapan alam mencapai 65,259 % ketika dibesarkan dalam tambak. Infestasi *Octolasmis* spp yang berat diduga

merupakan potensi ancaman terhadap perkembangan budidaya kepiting bakau, sehingga dapat memberikan dampak negatif terhadap pendapatan ekonomi masyarakat terutama petambak kepiting bakau.

Saat ini indentifikasi spesies *octolasmis* spp hanya dilihat jumlah *capitular*, *scutum*, *tergum* dan *carina* (Jeffries *et al.*, 2005). Metode ini memiliki keterbatasan dan hanya bisa diaplikasikan pada saat parasit ini memasuki fase remaja atau dewasa, sedangkan pada fase larva atau *cryprid* teknik ini belum dapat diaplikasikan. Hal ini disebabkan pada fase *cypird* karakteristik morfologi belum terbentuk sehingga cukup sulit diidentifikasi. Alternative lain untuk metode Identifikasi adalah dengan menggunakan sekuens DNA, yaitu Salah satu penanda molekuler yang dipakai dalam mengungkapkan taksonomi suatu spesies dengan mengamati kode batang DNA atau *DNA barcoding* (Chippindale *et al.*, 1999). Dari sekian banyak teknik penanda DNA, salah satunya adalah ribosomal RNA (rRNA). Menurut Baker *et al.*, (2001) identifikasi spesies pada sub unit rRNA paling banyak digunakan sebagai *molecular chronometer* sebab dengan panjang 1600-2000 bp dapat memberikan informasi yang cukup tentang hubungan evolusi antar spesies.

Perkembangan teknik molekuler berdasarkan 18S rRNA telah berkembang pada tahun 1996 dan sangat jarang digunakan

sebagai alat indentifikasi organisme terutama di Indonesia, sehingga diharapkan dapat memberikan kontribusi besar bagi ilmu pengetahuan, selain itu juga untuk menambah informasi tentang karakter nukleotida 18s rRNA parasit *Octolasmis* spp serta mendesain pohon filogenetik molekulernya.

METODE PENELITIAN

Waktu dan tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun lalu di laboratorium parasit dan penyakit ikan Universitas Hasanuddin Makassar. Sampel diawetkan semenjak tahun 2013 yang merupakan parasit yang mengifestasi kepiting bakau.

Alat dan bahan.

Adapun alat yang digunakan penelitian ini adalah botol *ependrof*, *Thermal Cycle* (PCR), sumur gel eletroforesis, mikropipet, mesin ABI 3130xl *Genetic Analyzer* dan *UV transluminator*. Sedangkan bahan yang digunakan adalah Parasit *Octolasmis cor*, etanol, DNA mini kit (Qiagen), primer, larutan TBE 0,5x, loading dye dan akuades

Prosedur Penelitian

DNA mini kit (Qiagen) digunakan untuk ekstraksi DNA dari *Octolasmis cor* dengan mengikuti prosedur. Amplifikasi DNA dengan menggunakan metode Reaksi Rantai Polimerase (PCR) sedangkan primer yang

digunakan dirancang dengan menggunakan software *clustaW* untuk daerah yang terkonservasi berdasarkan sekuen referensi GenBank di NCBI dan selanjutnya software *pearlprimer* digunakan dalam menentukan primer pada daerah yang terkonservasi tersebut dari region 18S. kondisi PCR 94°C 5 menit (*initial Denaturation*), 30 siklus denaturasi dengan suhu 94°C 1 menit, *annealing* suhu 45°C 1 menit, dan *ekstension* disuhu 72°C 1,5 menit dan *final extension* pada suhu 72°C 7 menit

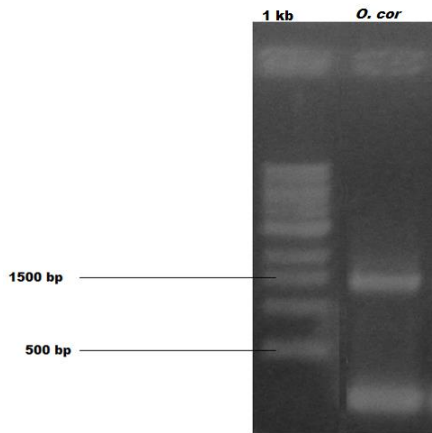
Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dalam gel agarose 1% dalam larutan TBE 0.5X. Sebanyak 10 µL DNA hasil PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye* kemudian dimasukkan dalam sumur gel elektroforesis. Elekrtoforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diletakkan diatas UV transluminator dan didokumentasikan menggunakan GelDoc (Sambrook *et al.* 1989).

DNA dipurifikasi dengan *Qiagen PCR Purification Kit* berdasarkan petunjuk kit. Kemudian hasil PCR yang sudah dipurifikasi disekuen dengan menggunakan sekuensing otomatis mesin ABI 3130xl *Genetic Analyzer* di Laboratorium 1st Base di Singapura. Selanjutnya dilakukan BLAST pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Hal ini bertujuan memastikan primer memotong tepat pada bagian dan untuk mengidentifikasi spesies

Octolasmis spp. yang tersimpan dalam database NCBI untuk menentukan homolog (Sulistijowati dan Mile, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi *Octolasmis cor* dari region 18S rRNA telah berhasil diamplifikasi dengan panjang 1500 bp. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram amplifikasi gen 18s rRNA specimen *Octolasmis cor* dalam 1% gel agarose (Keterangan: 1kb = DNA Ladder, *Octolasmis cor* =O.cor).

Hasil perhitungan (Gambar 2) jumlah basa nukleotida, diperoleh panjang DNA 1500bp dengan komposisi yaitu Adenin berjumlah 354 (23,6 %), Guanin 444 (29,6 %), Timin 360 (24 %) dan Cytosin 342 (15,1%). Dari semua jumlah kandungan basa nukleotida terbanyak mencapai 29,9 %. Yaitu Guanin, akan tetapi jumlah tersebut tidak jauh berbeda dengan basa nukleotida yang lain.

Hasil *blasting* (Tabel 1) tingkatan kemiripan dimiliki oleh *Octolasmis cor* dengan

max score 2760 dan *totaly score* 2670, *query cover* 100%, *E-value* 0.0 dan *Ident* 99,87 %. Menurut Tindi (2017) bahwa nilai *E-value* sama dengan 0.0 menunjukkan pensejajaran sekuen yang signifikan artinya sekuen specimen yang dicari melalui situs NCBI pada penelitian ini berasal dari genus yang sama atau identik. Sehingga dapat dipastikan bahwa specimen *O.cor* adalah *Octolasmis cor* karena memiliki tingkat kemiripan atau *per.indent* 99,87 %

Hasil analisis pohon filogenetik (Gambar 3) dengan menggunakan metode *neighbor joining* ditemukan jarak genetik sampel dengan *Octolasmis cor* menunjukkan nilai 0,004. Menurut Tallei *et al.* (2016), nilai jarak genetik yang semakin kecil antara dua organisme menunjukkan kedekatan hubungan kekerabatan artinya semakin kecil jaraknya maka semakin dekat pula hubungan kekerabatan antara keduanya. Hasil di atas menandakan bahwa kemungkinan besar bahwa spesies parasit yang ditemukan di wilayah Sulawesi Selatan adalah *Octolasmis cor* (Marcoz *et al* 2008)

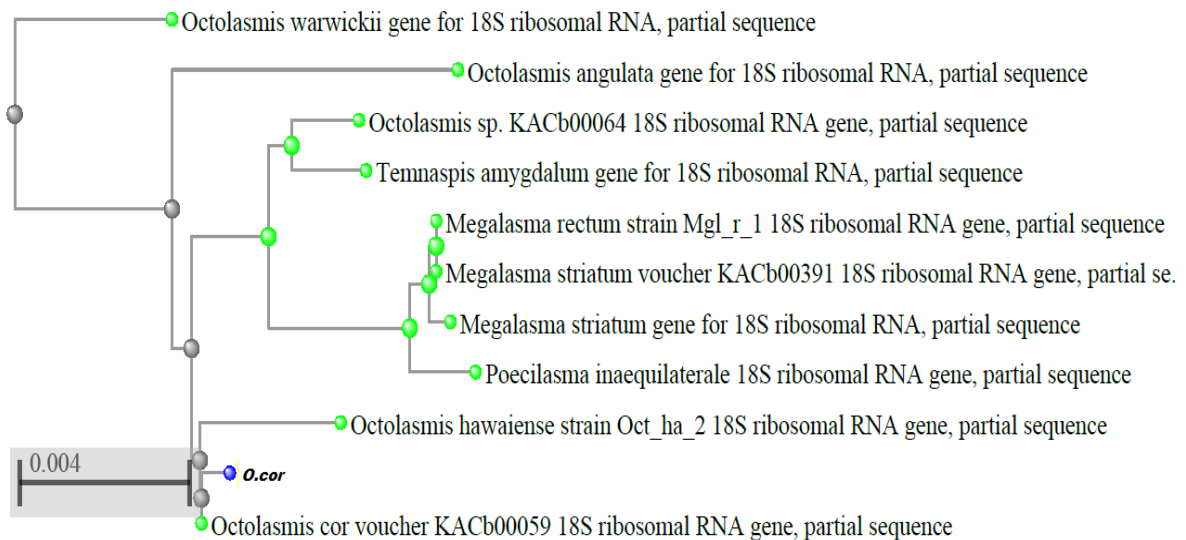
Tabel 1. Hasil *BLASTING* Specimen *O.cor* di Bank gen NCBI (3 teratas).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Octolasmis cor 18S ribosomal RNA gene	2760	2760	100 %	0,0	99,87 %	EU082407.1
Octolasmis sp. 18S ribosomal RNA gene	2726	2726	100 %	0,0	99,47%	EU082408.1
Temnaspis amygdalum 18S ribosomal RNA	2721	2721	100 %	0,0	99,40%	AB551730.1

Sumber: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

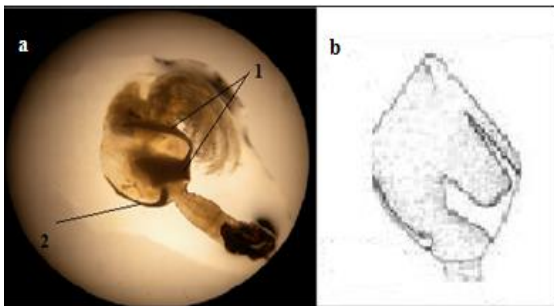
```
GATACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCAACCGAGCCTCAGTCCAGCGCTTCGGTGTGGCGGGCG
CTTTTATTGGCTGAAAACCGATGGCTGCCCTCGTGGCGGTCGTTATTCGATGAATACAATAACATTGTGTGGATCGCAC
GGTCCTGTACCGGGCAGCGCCTTTCAAATATCTGCCTTACAGCTCTCGACGGTTTGTAGTGGCTGACCGTGGCTCTG
ACGGGTAACGGGAATATGGTCTATTCCGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGCGG
CGTAACCTACCCACTCTCAGTTCGAGGAGGTAGTGACAATAATACCTTACAGAGGTCTCGTTAACCGAGATCTCTCAA
CGGAATGAGTACAACGTGAATCCTTTAACGAGGATCGACTGGAGGGCAAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
TCCAGTAGCGTATATTAAGCTGTTGCGGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATATCAGTGCCTGTCCGGTCCGGCATGCCGG
TGCGTTATGCGCGCAACCGCATGACGCCCGGGCTCCCAAATGTCGGCTGGCCGCATTCAATCGTGTCCGATCCGTCGACG
GGCCGTTCTTCGGAGGGGCTGTTGGCGACCGGGCGGCTTACCTTGAACAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCTCTTAATG
CCTGTATACATATTCATGGAATTGGAGAATACGTCCTCGGCTCGATTGTTGGTTTTGAGAGTGAAGGAAATGATTA
ATAGGGACTGACGGAGGCATTGATTGCGACGCGAGGGGTGAAATCCTGTGACCGTCGCACGACGAACTACTGCGAAAG
CATTGCGGAGAATGTTTTATTAGTCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTGAAAGGCATCAGATACCGCCTAGTTCTAAC
GTAAACGATGTCGACAGCAATCCGCAACGGTCACTTAAAGGACTGTGCGGGCAGCTTCCCGGAGAAATCAGAGTGT
GGACTCCGGGGAAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCTTGGG
CTTAATTTGACTCAACACGGGACAACCTACCAGGCCCGGACACCGTAAGGATTGACAGACTGATAGCTCTCTTGATTC
AGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTATTGTCTGGTTTATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCC
TATTAACCTGACGCCCGCAGTCTTATGTGACTGGGGTGTGCTTCTAGAGGGATCATCGGCGTCCAGCCGAAGGAAA
GGGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGTGTACTGAAGTGGTCAGCGCGCCGTT
AACGTCCTTCTCCGAGAGGAGCGGGCAAACGTTTGAACCTTTTCGTGATGGGAATGGGG
```

Gambar 2. Consensus DNA parasit *Octolasmis cor* asal perairan Sulawesi Selatan Specimen *O.cor*.



Gambar 3. Rekonstruksi pohon filogenetik beberapa jenis kerabat *Octolasmis* spp. berdasarkan 18S rRNA gen dengan metode *neighbor joining*

Hasil pengamatan morfologi dari sampel parasit yang ditemukan memiliki kesamaan dengan *Octolasmis cor* (Chan *et al.* 2012). Hal ini bisa dilihat dari jumlah cabang scutum, tergum dan carina pada kedua gambar parasit itu. *Octolasmis cor* memiliki jumlah cabang scutum terdiri dari 2 cabang dan 1 carina (Gambar 4a), salah satu ciri khas dari bentuk cabang scutum dari *Octolasmis cor* agak melebar.



Gambar 4. a) Morfologi *Octolasmis cor* pada kepiting bakau yang tertangkap di Sulawesi selatan; b) Gambar *O.cor* (Chan *et al.* 2012)

SIMPULAN

Karakteristik molekuler 18 rRNA dari sampel parasit *O.cor* yang ditemukan di wilayah Sulawesi Selatan diperoleh panjang DNA 1500 bp dengan komposisi basa Adenin 354 (23,6 %), Guanin 444 (29,6 %), Timin 360 (24 %) dan Cytosin 342 (15,1%). Berdasarkan hasil analisis filogenetik menunjukkan jarak 0,004 yang artinya memiliki kedekatan hubungan atau kemungkinan dari spesies yang sama. Saran untuk penelitian ini diharapkan untuk dapat

mengidentifikasi karakteristik DNA parasit pada gen 28S atau *COI*.

DAFTAR PUSTAKA

- Baker, G.C., Shabarni-Gaffar, Cowon, D.C., Suharto, A.R. 2001. Microbial community analysis of Indonesian hot-springs. *FEMS Microbial Lett.* 103-9.
- Chan, K.K., Prabowo, Romanus, Lee, Kwen-Shen. 2012. *Octolasmis cor* (Aurivillius, 1892). <http://barnacle.biota.biodiv.tw/pages/1059> [diakses tanggal 14 agustus 2013].
- Chippindale, P.T., Dave, V.K, Whitmore, D.H., Robinson, J.V. 1999. Phylogenetic relationships of North American Damselflies of the Genus *Schnura* (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae) based on sequences of three mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 11(1): 110-121.
- Domitila, Ohoiulun., Marthinus, I. H. H. 2020. Analisis Morfometrik Kepiting Bakau (*Scylla Serrata*) Hasil tangkapan Dari Perairan Desa Warwut Kabupaten Maluku Tenggara. *Jambura Fish Processing Journal.* 2(1): 28-35.
- Irvansyah, M., Yusuf, Nurlita A., Gunanti M. 2012. Identifikasi dan intensitas ektoparasit pada kepiting bakau (*Scylla serrata*) stadia kepiting muda di pertambakan kepiting, kecamatan Sedati, Kabupaten Sidoarjo. *Jurnal Sains Dan Seni ITS* 1(1).
- Jeffries, William, B., Harold, K., Voris, P.N., Somsak, P. 2005. *Pedunculate Barnacles of the symbiotic genus Octolasmis (Cirripedia: Thoracica: Poecilasmatidae)*

from the Northern Gulf of Thailand The Natural History. *Journal of Chulalongkorn University* 5(1): 9-13.

Jeffries, William, B., Harold, K., Voris, Sombat, P., Heil, L.C. 1995. The live cycle *Lepadhormorph barnacle, Octolasmis cor* and methods for their laboratory culture. *Phuket Marine Biol. Cent. Bull.* 29-35.

Marcos P´erez-Losada, Jens, T., Hoeg, Keith, A., Crandall. 2004. Unraveling the evolutionary radiation of the *Thoracican barnacles* using molecular and morphological evidence: A comparison of several divergence time estimation approaches. *Society of Systematic Biologists.* 53(2):244–264.

Praptiasih, Indah. 2010. Mengenal Octolasmis, parasit leher angsa pada *Crustacea*. Info Karikan, edisi ketujuh. Pusat Karantian Ikan.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 113–127 p.

Sulistijowati, R., Mile, L.. 2016. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolates from Intestine of Milkfish (*Chanos-Chanos*) Potential Activity against Pathogen Bacteria Used PCR 18s Rrna Methode. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology.* 8(3).

Tallei, T.E., Rembet, R.E., Pelealu, J.J., Kolondam, B.J. 2016. Sequence variation and phylogenetic analysis of *Sansevieria trifasciata* (*Asparagaceae*). *Bioscience Research.* 13(1): 01-07.

Tindi, Monalisa, N., Gustaf, F., Mamangkey, Stenly, W. 2017. DNA *barcode* dan analisis filogenetik molekuler beberapa jenis bivalvia asal perairan Sulawesi Utara berdasarkan gen *Coi*. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis.* 1: 2.