

Autentikasi spesies ikan kerapu berdasarkan marka gen MT-COI dari perairan Peukan Bada, Aceh

Mohammad Mukhlis Kamal^{1*}, Agus Alim Hakim¹, Nurlisa Alias Butet¹, Yulia Fitrianiingsih¹, Rika Astuti²

¹Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor, Indonesia;

²Departemen Manajemen Sumberdaya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Teuku Umar, Meulaboh, Indonesia;

Riwayat artikel

Received : 25 Juni 2019

Revised : 08 Juli 2019

Accepted : 12 Juli 2019

Published : 14 Agustus 2019

*Corresponding Author:

Mohammad Mukhlis Kamal,

Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor, Indonesia;

Email:

mohammadmukhliskamal@gmail.com

Abstrak : Variasi bentuk dan pola pewarnaan tubuh ikan kerapu (Famili Serranidae) sangat variatif, sehingga pengenalan spesies secara morfologis sering tidak akurat. Penelitian ini bertujuan untuk mengautentikasi ikan kerapu dengan menggunakan marka gen COI. Contoh ikan kerapu yang diamati berjumlah 29 ekor yang dikumpulkan dari tiga tempat pendaratan ikan di Perairan Peukan Bada, Propinsi Aceh. Secara karakter morfologis, ikan kerapu tersebut teridentifikasi lebih dari 8 spesies. Untuk analisis DNA, sebanyak 30 mg daging sirip dari setiap ikan contoh diambil untuk dilakukan isolasi dan ekstraksi DNA, kemudian visualisasi elektroforesis dan fragmentasi DNA gen COI dengan metode PCR-sekuensing. Setelah diekstraksi, diperoleh 20 sampel DNA yang tervisualisasi dengan baik, yang dari jumlah tersebut terdapat 16 sampel dapat diamplifikasi. Hasilnya menunjukkan terdapat 6 spesies yang terautentikasi. Kelompok pertama adalah *Variola albimarginata*, *Cephalopholis urodeta*, dan *C. sexmaculata* dengan tingkat kemiripan $\geq 97\%$. Berikutnya *C. boenak*, *Epinephelus merra*, dan *Scolopsis vosmeri* tingkat kemiripannya $\leq 97\%$. Bila dibandingkan hasil autentikasi DNA, hasil penelitian menunjukkan bahwa 13 sampel atau $> 80\%$ tidak teridentifikasi dengan benar secara morfologis. Berdasarkan jarak genetik, pohon filogeni membentuk 2 clade antara Serranidae dan Nemipteridae. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan marka gen COI sangat efektif untuk autentikasi spesies yang dapat dijadikan sebagai instrumen dalam pemanfaatan dan pengelolaan ikan kerapu.

Kata kunci : kerapu, variasi morfologi, gen MT-COI, autentikasi.

Abstract : The groupers (family Serranidae) show high variability both in body shapes and coloration leads to highly morphological-based misidentification. The research was aimed in authentication of the grouper species using MT-COI gene. A total of 29 grouper fishes were collected from three fish landing sites of Peukan Bada, Aceh Province. These fishes were morphologically identified from which more than 8 species were obtained. A 30 mg of the fin meat of each sample was taken for DNA extraction, isolation, electrophoresis visualization, and DNA fragmentation of COI gene using PCR-sequencing. There were 20 DNA samples was clearly visualized of which 16 has been proceeded for amplification. The results showed that *V. albimarginata*, *C. urodeta*, and *C. sexmaculata* showed $\geq 97\%$ similarity, whereas *C. boenak*, *E. merra*, dan *S. vosmeri* with $\leq 97\%$ similarity. Based on phylogenetic tree analysis there was 2 clearly different clades separating family of Serranidae and Nemipteridae. The use of MT-COI gene was effective and accurate tool in species authentication which could be used as an instrument for utilization and management of the grouper species.

Keywords : groupers, morphological variation, MT-COI gene, authentication.

Pendahuluan

Ikan kerapu atau dikenal dengan nama umum *groupers fish* termasuk ke dalam sub-famili Epinephelinae, famili Serranidae, umumnya menghuni habitat perairan dangkal pada habitat terumbu karang, lamun, mangrove, dan estuari. Distribusi geografis ikan kerapu meliputi perairan tropis dan sub-tropis di Laut Atlantik, Mediterania dan Indo-Pasifik, termasuk Laut Merah (Hseu *et al.*, 2007). Indonesia adalah produsen kerapu utama di dunia, yang pada tahun 2011 menghasilkan 8.112 ton ikan kerapu (KKP, 2012), dan pada 2017 meningkat lebih dari lima kali lipat menjadi 46.504 ton (KKP, 2017).

Informasi mengenai keanekaragaman spesies ikan kerapu di Indonesia berkembang seiring waktu. Awalnya Kuhno *et al.* (1990) melaporkan tujuh genera, kemudian Nuraini (2007) mencatat 25 spesies di perairan Berau, Kalimantan Timur. Berikutnya adalah Rudi & Muchsin (2011) mendapatkan 28 spesies termasuk ke dalam tujuh genera di perairan Aceh utara. Data terkini (www.fishbase.org) jumlah spesies ikan ini di Indonesia mencapai 69 jenis yang termasuk ke dalam sembilan genera, yang didominasi oleh 3 genera yaitu *Epinephelus*, *Cephalopholis*, dan *Plectropomus*.

Autentikasi spesies merupakan salah satu tantangan utama dalam pengelolaan sumber daya ikan. Khusus spesies ikan kerapu, para peneliti (Heemstra & Randall, 1993, Ding *et al.*, 2006) menemukan kontroversi dalam taksonomi dan hubungan filogenetik ikan ini dikarenakan variasi pewarnaan dan morfologi. Yeh *et al.* (2003) menegaskan bahwa kesalahan identifikasi dapat mengakibatkan kerugian dan hasil riset yang tidak valid.

Manfaat autentikasi dalam pemanfaatan dan perlindungan plasma nutfah ikan di antaranya dalam upaya pemulihan stok, budidaya, dan perdagangan. Untuk memperkaya stok ikan kerapu di perairan Kepulauan Seribu, misalnya, telah dilakukan *re-stocking* ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Kurnia, 2012). Sebagai komoditas favorit marikultur (James *et al.*, 1999), beberapa spesies ikan kerapu dikawinsilangkan untuk mencapai laju pertumbuhan yang tinggi, daya tahan yang lebih baik terhadap lingkungan, dan memaksimalkan keuntungan ekonomi. Misalnya adalah penyilangan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) dengan kerapu batik (*E. microdon*), atau kerapu macan dengan kerapu kertang (*E. lanceolatus*). Pada perdagangan internasional, kasus pengoplosan dan kesalahan pelabelan ikan impor sering terjadi (Rasmussen & Morrissey, 2008; Wong *et al.*, 2011), sehingga memungkinkan jenis ikan lain yang

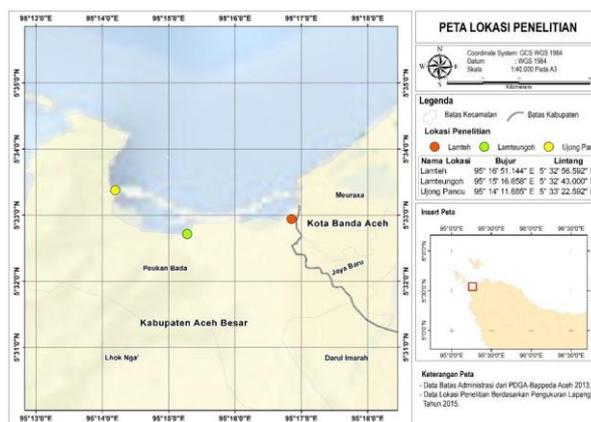
harganya lebih rendah diklaim sebagai ikan kerapu yang nilai ekonomisnya lebih tinggi.

Autentikasi yang mengandalkan karakter morfologi pada ikan yang variasi pewarnaan dan morfologi sangat tinggi seperti ikan kerapu dapat menghasilkan informasi yang tidak akurat. Untuk itu metode *DNA-barcoding* digunakan karena metode ini mampu mengidentifikasi spesies secara cepat baik dalam bentuk segar, beku, awetan, maupun spesimen. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Herbert *et al.* (2003) memberikan solusi untuk validasi spesies dengan menggunakan marka gen COI yang terletak pada segmen mitokondria sehingga mampu menelusuri variasi basa nukleotida pada setiap spesies, sehingga hubungan kekerabatan antar ikan kerapu dapat diketahui. Pada studi kali ini, sampel ikan kerapu berasal dari perairan Peukan Bada, Aceh. Luas areal terumbu karang perairan ini mencapai 1.155 ha (Campbell *et al.*, 2012), yang merupakan salah satu sentra penangkapan ikan karang, khususnya jenis kerapu (Astuti *et al.*, 2016). Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi marka genetik spesifik dari jenis-jenis ikan kerapu yang berasal dari perairan tersebut.

Bahan dan metode

Waktu dan tempat

Pengumpulan ikan contoh dilaksanakan antara Februari – April 2016, kemudian analisis laboratorium Juni – Agustus 2016. Ikan kerapu dikumpulkan dari tiga tempat pendaratan ikan, yaitu Lamteh, Lamteungoh, dan Ujong Pancu yang termasuk wilayah Kecamatan Peukan Bada, Kabupaten Aceh Besar, Provinsi Aceh (Gambar 1).



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel ikan kerapu pada tiga tempat pendaratan ikan di Lamteh, Lamteungoh, dan Ujong Pancu.

Protokol penelitian

Sebanyak 29 sampel ikan kerapu segar dikumpulkan untuk didokumentasikan dan diidentifikasi secara morfologi berdasarkan rujukan yang ada (Lieske & Myers, 2001; Allen *et al.*, 2003; Rudi & Muchsin, 2011). Setiap sampel ikan diambil daging pada bagian siripnya kira-kira 30 mg kemudian dan disimpan dalam alkohol 96%. Preparasi dan analisis sampel sebelum sekuensing semuanya dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Perairan, Departemen MSP-FPIK-IPB Bogor. Sebelum dianalisis setiap sampel dibersihkan, dicuci dengan aquades, kemudian dimasukkan ke dalam microtube 1,5 mL untuk proses isolasi dan ekstraksi DNA, yang prosedurnya mengikuti manual pabrik yang dimodifikasi menggunakan *Genomic DNA Minikit for Tissue*.

Produk DNA total yang dihasilkan diuji kualitasnya dengan metode elektroforesis pada gel agarosa 1,2% yang direndam dalam larutan buffer 1xTAE (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA). Volume DNA total untuk pengujian ini adalah 2,5 μ L. Selanjutnya, visualisasi DNA total dilakukan di bawah sinar UV, di mana DNA total yang ditunjukkan oleh pita tebal dan terbaca jelas dipilih untuk proses amplifikasi fragmen DNA gen COI dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Proses ini menggunakan kit komersial Kapa Extra Hot Start, yang prosedur amplifikasinya mengikuti manual pabrik. Tahapan ini merupakan proses amplifikasi secara enzimatik yang spesifik untuk menggandakan DNA (Chen & Janes, 2000). Primer yang digunakan merupakan primer universal untuk beberapa jenis biota yang didesain oleh Butet (2013).

Amplifikasi DNA dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu pra-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 52°C selama 1 menit, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit, pasca *elongasi* pada suhu 72°C selama 5 menit, dan penyimpanan pada suhu 15°C selama 10 menit. Tahap denaturasi, *annealing*, dan *elongasi* diulang sebanyak 35 kali. Produk PCR yang berkualitas baik dilanjutkan ke proses sekuensing yang dilakukan oleh perusahaan jasa sekuensing untuk keperluan pembacaan urutan basa nukleotida. Sekuensing dilakukan berdasarkan pada metode Sanger *et al.* (1977) karena lebih mudah, praktis, dan efisien.

Analisis data

Urutan nukleotida yang diperoleh dari proses sekuensing divalidasi dengan menggunakan BLASTn pada GenBank. Validasi ini berguna untuk melihat kesesuaian urutan nukleotida gen homolog dari spesies atau genus yang sama. Hasil sekuen berupa *electropherogram* yaitu puncak berwarna yang menunjukkan urutan basa DNA-nya (Zein &

Prawiladilaga, 2013). Urutan basa nukleotida *Ephinephelus* spp. kemudian disejajarkan dengan spesies lainnya (*ingroup* dan *outgroup*) menggunakan metode Clustal W (Butet, 2013). Tujuan penggunaan *outgroup* adalah sebagai faktor koreksi dalam penentuan karakter di antara *ingroup* yang ada (Maddison *et al.*, 1984). Jarak genetik sekuen gen COI dihitung dengan menggunakan metode *pairwise distance*.

Hasil perhitungan jarak genetik disajikan dalam bentuk matriks data yang kemudian digunakan untuk analisis hubungan kekerabatan antar spesies berdasarkan pohon filogeni. Metode ini dipilih karena sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat yang merefleksikan jarak yang nyata di antara sekuen (Dharmayanti, 2011). Selanjutnya dilakukan analisis filogeni terhadap *Epinephelus* spp. berdasarkan metode substitusi nukleotida dengan jarak genetik *pairwise distance* dan konstruksi pohon filogeni berdasarkan *bootstrapped Neighbour-Joining* (NJ) dengan 1000 kali pengulangan. Pensejajaran urutan basa, penghitungan jarak genetik, dan konstruksi pohon filogeni dilakukan dengan menggunakan software MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Hasil identifikasi secara molekuler yang telah didapat dengan teknik *DNA barcoding* kemudian dibandingkan dengan identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi. Identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi telah dilakukan sebelumnya (Astuti, 2016; Astuti *et al.*, 2016).

Hasil dan Pembahasan

Hasil

DNA total dan amplifikasi DNA gen COI

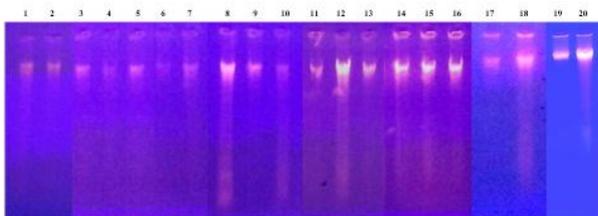
Isolasi dan ekstraksi terhadap 29 sampel daging sirip ikan kerapu menghasilkan 20 sampel DNA yang tervisualisasi saat elektroforesis (Gambar 2). Kemudian 16 dari 20 sampel tersebut yang teramplifikasi dengan baik (Gambar 3).

Validasi spesies

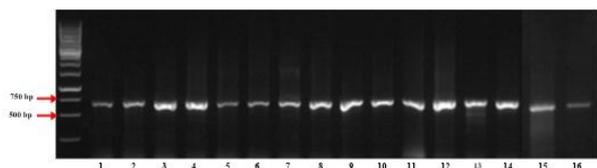
Berdasarkan hasil analisis BLASTn terhadap 16 sampel ikan kerapu yang teramplifikasi, maka spesies ikan kerapu dapat dikelompokkan ke dalam enam spesies. Spesies kerapu yang teridentifikasi dengan tingkat kemiripan $\leq 97\%$ adalah *Cephalopholis boenak*, *Epinephelus merra*, dan *Scolopsis vosmeri*. Sedangkan tiga spesies lainnya memiliki tingkat kemiripan $\geq 97\%$ yaitu *Variola albimarginata*, *C. urodeta*, dan *C. sexmaculata* (Tabel 1).

Sekuensing DNA dan pensejajaran urutan basa nukleotida gen COI kerapu

Berdasarkan hasil pensejajaran (*multiple alignment*), diperoleh nilai *conserved* 64,7% (415/641), *variable* sebesar 35,3% (226/641), dan *singleton* sebesar 3.7% (24/641). Berdasarkan hasil pensejajaran urutan basa nukleotida jumlah nukleotida spesifik ikan kerapu dari Peukan Bada disajikan pada Tabel 2.



Gambar 2. Visualisasi 20 DNA total dari 29 sampel yang diambil dari sirip ikan kerapu. Keterangan: 1 = KAA 1.2; 2 = KAA 4.2; 3 = KAA 6.2; 4 = KAA 7.1; 5 = KAA 13.1; 6 = 15.2; 7 = KAA 14.2; 8 = KAA 16.2; 9 = KAA 18.2; 10 = KAA 17.2; 11 = KAA 19.2; 12 = KAA 20.1; 13 = KAA 21.2; 14 = KAA 22.2; 15 = KAA 24.1; 16 = KAA 28.1; 17 = KAA 25.2; 18 = KAA 26.2; 19 = KAA 27.1; 20 = KAA 29.2.



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA dengan gen COI mendapatkan 16 dari 20 total sampel teramplifikasi dengan baik, (keterangan: 1 = KAA 1.2; 2 = KAA 4.2; 3 = KAA 6.2; 4 = KAA 13.1; 5 = KAA 14.2; 6 = KAA 16.2; 7 = KAA 18.2; 8 = KAA 19.2; 9 = KAA 120.1; 10 = KAA 22.2; 11 = KAA 24.1; 12 = KAA 25.2; 13 = KAA 26.2; 14 = KAA 27.1; 15 = KAA 21.1; 16 = KAA 15.2).

Berdasarkan hasil *multiple alignment*, didapatkan sebanyak 20 situs nukleotida spesifik yang merupakan basa nukleotida penciri sebagai pembeda dari spesies lain. Situs ke-423 merupakan situs penciri dari *C. boenak*, situs ke-enam merupakan situs penciri dari *C. urodeta*, situs ke-576 merupakan situs penciri dari *E. merra*, situs ke-76, ke-195, ke-258, ke-296, ke-313, ke-400, ke-456, ke-482, ke-527, ke-535, ke-541, ke-551, ke-562, dan ke-563 merupakan situs penciri *S. vosmeri*, situs ke-99 dan ke-331 merupakan situs penciri *V. albimarginata*, dan situs ke-510 merupakan situs penciri dari *C. sexmaculata*.

Tabel 1. Hasil BLASTn yang diunggah pada situs NCBI

No	Kode spesimen	Validasi BLASTn	Query cover (%)	Kemiripan (%)	Nomer akses NCBI
1	KAA 1.2	<i>C. boenak</i>	100	91	KC537759.1
2	KAA 6.2	<i>E. merra</i>	97	91	AP005991.1
3	KAA 13.1	<i>E. merra</i>	97	91	AP005991.1
4	KAA 20.1	<i>E. merra</i>	97	91	AP005991.1
5	KAA 21.1	<i>E. merra</i>	97	91	AP005991.1
6	KAA 22.2	<i>E. merra</i>	97	91	AP005991.1
7	KAA 14.2	<i>S. vosmeri</i>	99	88	KT692978.1
8	KAA 16.2	<i>V. albimarginata</i>	99	99	KC593370.1
9	KAA 18.2	<i>V. albimarginata</i>	100	99	KC593370.1
10	KAA 4.2	<i>C. urodeta</i>	100	100	KU891818.2
11	KAA 19.2	<i>C. urodeta</i>	100	99	KU891818.2
12	KAA 26.2	<i>C. urodeta</i>	100	99	KU891818.2
13	KAA 27.1	<i>C. urodeta</i>	100	99	KU891818.2
14	KAA 28.1	<i>C. urodeta</i>	100	99	KU891818.2
15	KAA 24.1	<i>C. sexmaculata</i>	100	98	KJ469385.1
16	KAA 25.2	<i>C. sexmaculata</i>	100	98	KJ469385.1

Jarak genetik dan filogeni gen COI ikan kerapu

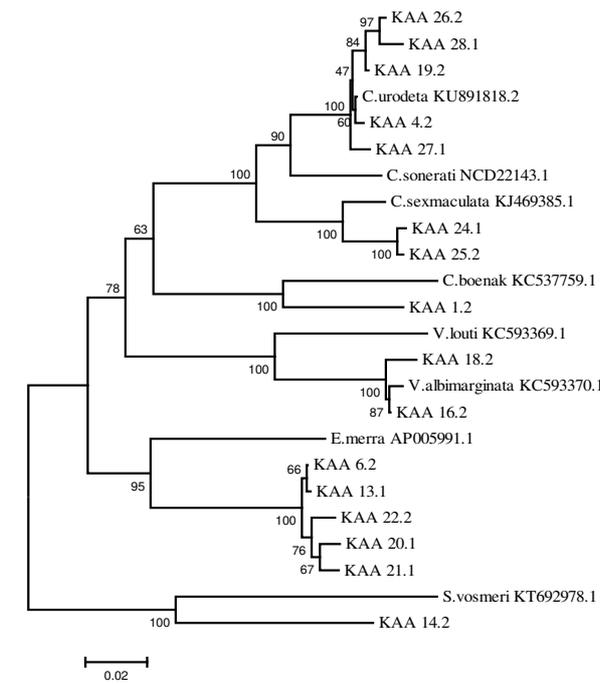
Jarak antar sekuen atau jarak genetik antar individu mendapatkan bahwa jarak genetik terendah yaitu 0,002 (0,2%) terlihat antara kode sampel KAA 6.2 dan KAA 13.1. Keduanya merupakan spesies yang teridentifikasi mirip dengan jenis *E. merra*. Jarak genetik tertinggi 0,233 (23,3%) terlihat antara kode sampel KAA 14.2 yang teridentifikasi mirip dengan jenis *S. vosmeri* dan KAA 20.1 yang teridentifikasi mirip dengan jenis *E. merra* (Tabel 3). Berdasarkan nilai jarak genetik dilakukan rekonstruksi pohon filogeni yang disajikan dalam Gambar 4.

Sebanyak 16 sampel kerapu dari Aceh merupakan *ingroup* dan 8 data diambil dari *genebank* sebagai *outgroup*. Data *genebank* yang digunakan sebagai *outgroup* yaitu *C. urodeta* KU891818.2, *C. sonnerati* NCD22143.1, *C. sexmaculata* KJ469385.1, *C. boenak* KC537759.1, *V. louti* KC993369.1, *V. albimarginata* KC593370.1, *E.merra* AP005991.1, dan *S. vosmeri* KT692978.1. Beberapa percabangan memiliki nilai 100, hal tersebut menunjukkan bahwa percabangan sangat kuat berada dalam satu kelompok dengan nilai konsistensi bootstrap hingga 100%. Seperti pada sekuen KAA 24.1, KAA 25.1, dan *C. sexmaculata* yang sangat kuat dalam satu kelompok. Sedangkan di percabangan antara KAA 26.2, KAA 28.1, KAA 19.2, *C. urodeta*, dan KAA 4.2

terdapat nilai 47. Artinya kelima sekuen tidak terlalu kuat berada dalam satu kelompok yang hanya didukung oleh 47% dari bootstrap. Hasil konstruksi pohon filogeni ikan kerapu Aceh menunjukkan pemisahan yang jelas antara famili Serranidae dan famili Nemipteridae, sehingga terbentuk dua *clade* utama. Individu-individu yang memiliki jarak genetik yang rendah berada pada simpul ranting yang berdekatan.

Tabel 2. Situs nukleotida spesifik ikan kerapu di perairan Peukan Bada, Aceh Besar

Kode spesimen	Situs nukleotida ke-																							
	6	76	99	195	258	296	313	331	400	423	456	482	510	527	535	541	551	562	563	576				
<i>C.boenak</i> KC537759.1	C	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A		
CAA 1.2	C	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A		
<i>C.urodeta</i> KU891818.2	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 26.2	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 27.1	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 28.1	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 19.2	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 4.2	A	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
<i>E.merra</i> AP005991.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 6.2	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 13.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 20.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 22.2	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 21.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
<i>S.vosmeri</i> KT692978.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 14.2	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
<i>V.albimarginata</i> KC593370.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 16.2	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 18.2	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
<i>C.sexmaculata</i> KJ469385.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 24.1	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			
CAA 25.2	C	A	A	T	G	A	C	A	C	A	C	A	C	A	G	A	G	A	G	T	A			



Gambar 4. Konstruksi pohon filogeni ikan kerapu berdasarkan gen COI dengan metode Neighbor Joining

Hasil identifikasi secara morfologi dan molecular

Hasil identifikasi secara molekuler yang telah didapat dengan teknik *DNA barcoding* kemudian dibandingkan dengan identifikasi berdasarkan

karakteristik morfologi (Tabel 4). Identifikasi ikan kerapu Aceh secara morfologi yang dibandingkan dengan identifikasi secara molekuler diperoleh hasil yang berbeda pada nomor spesimen 3 sampai dengan 16.

Tabel 3. Jarak genetik ikan kerapu

No spesimen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1 <i>C.boenak</i> KC537759.1																									
2 KAA 1.2	0.082																								
3 <i>C.urodeta</i> KU891818.2	0.142	0.148																							
4 KAA 16.2	0.170	0.148	0.014																						
5 KAA 27.1	0.198	0.154	0.008	0.039																					
6 KAA 19	0.178	0.158	0.010	0.009	0.024																				
7 KAA 19.2	0.187	0.148	0.006	0.008	0.011	0.013																			
8 KAA 4.2	0.162	0.148	0.003	0.011	0.011	0.019	0.009																		
9 <i>E.merra</i> AP005991.1	0.170	0.170	0.170	0.177	0.182	0.170	0.170																		
10 KAA 6.2	0.180	0.185	0.182	0.180	0.185	0.174	0.184	0.185																	
11 KAA 13.1	0.188	0.170	0.184	0.170	0.185	0.178	0.188	0.188	0.183																
12 KAA 20.1	0.179	0.182	0.179	0.180	0.172	0.187	0.180	0.181	0.188	0.183															
13 KAA 22.2	0.179	0.177	0.179	0.179	0.180	0.178	0.179	0.179	0.184	0.184	0.183														
14 KAA 21.1	0.174	0.184	0.179	0.180	0.175	0.185	0.178	0.179	0.182	0.187	0.183	0.187													
15 <i>S.vosmeri</i> KT692978.1	0.200	0.278	0.284	0.284	0.283	0.289	0.289	0.287	0.281	0.289	0.287	0.284	0.281	0.284											
16 KAA 14.2	0.221	0.251	0.250	0.251	0.251	0.254	0.250	0.250	0.250	0.250	0.251	0.251	0.251	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	
17 <i>V.albimarginata</i> KC593370.1	0.206	0.189	0.182	0.170	0.188	0.174	0.184	0.187	0.177	0.181	0.189	0.204	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
18 KAA 18.2	0.200	0.189	0.188	0.184	0.182	0.188	0.188	0.181	0.170	0.181	0.189	0.204	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
19 KAA 18.2	0.221	0.284	0.171	0.170	0.189	0.179	0.179	0.180	0.180	0.180	0.180	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
20 <i>C.sexmaculata</i> KJ469385.1	0.212	0.148	0.074	0.081	0.078	0.080	0.078	0.079	0.077	0.079	0.080	0.170	0.170	0.180	0.200	0.204	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
21 KAA 24.1	0.170	0.184	0.081	0.080	0.081	0.086	0.082	0.081	0.080	0.087	0.180	0.181	0.181	0.181	0.180	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
22 KAA 25.2	0.170	0.184	0.081	0.080	0.079	0.084	0.082	0.081	0.080	0.087	0.180	0.181	0.181	0.181	0.180	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
23 <i>C.sexmaculata</i> KJ469385.1	0.170	0.181	0.080	0.081	0.080	0.080	0.081	0.080	0.080	0.080	0.180	0.179	0.184	0.179	0.182	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	
24 <i>V.albimarginata</i> KC593370.1	0.207	0.188	0.182	0.177	0.179	0.179	0.180	0.173	0.208	0.184	0.184	0.204	0.204	0.207	0.201	0.202	0.202	0.202	0.202	0.202	0.202	0.202	0.202	0.202	

Tabel 4. Hasil identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan identifikasi berdasarkan teknik *DNA barcoding*

No	Kode spesimen	Identifikasi secara Morfologi	Validasi BLASTn	Kemiripan (%)
1	CAA 1.2	<i>C.boenak</i>	<i>C.boenak</i>	91
2	CAA 16.2	<i>V.albimarginata</i>	<i>V.albimarginata</i>	99
3	CAA 6.2	<i>E.fasciatus</i>	<i>E.merra</i>	91
4	CAA 13.1	<i>E.fasciatus</i>	<i>E.merra</i>	91
5	CAA 20.1	<i>E.fasciatus</i>	<i>E.merra</i>	91
6	CAA 21.1	<i>E.fasciatus</i>	<i>E.merra</i>	91
7	CAA 22.2	<i>E.fasciatus</i>	<i>E.merra</i>	91
8	CAA 14.2	<i>V.albimarginata</i>	<i>S.vosmeri</i>	88
9	CAA 18.2	<i>V.louti</i>	<i>V.albimarginata</i>	99
10	CAA 4.2	<i>C.spiloparaea</i>	<i>C.urodeta</i>	100
11	CAA 24.1	<i>C.miniata</i>	<i>C.sexmaculata</i>	98
12	CAA 25.2	<i>C.miniata</i>	<i>C.sexmaculata</i>	98
13	CAA 26.2	<i>C.sonnerati</i>	<i>C.urodeta</i>	99
14	CAA 27.1	<i>C.sonnerati</i>	<i>C.urodeta</i>	99
15	CAA 28.1	<i>C.sonnerati</i>	<i>C.urodeta</i>	99
16	CAA 19.2	<i>C.sonnerati</i>	<i>C.urodeta</i>	99

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan tiga spesies ikan kerapu dengan tingkat kemiripan $\geq 97\%$ yaitu *Variola albimarginata*, *Cephalopholis urodeta*, dan *C.sexmaculata*. Sedangkan tiga spesies lainnya tingkat kemiripannya $\leq 97\%$, yang ditemukan pada *C.boenak*, *E.merra*, dan *Scolopsis vosmeri*. Menurut Herbert *et al.* (2003) suatu spesies yang memiliki jarak genetik lebih dari 3 % maka dapat dikatakan spesies tersebut satu sama

lain berbeda. Perbandingan hasil validasi BLASTn dengan hasil identifikasi secara morfologi yang dilakukan oleh Astuti (2016) memperlihatkan hasil yang berbeda pada spesimen nomor tiga sampai 16 (Tabel 4). Hal, ini diduga bahwa ikan kerapu menunjukkan sifat plastisitas fenotip, yakni kemampuan satu gen untuk memproduksi lebih dari satu fenotip dikarenakan terpapar pada kondisi lingkungan yang berbeda. Kondisi ini menurut Butet (2013) memungkinkan suatu spesies mengembangkan fenotip yang berbeda-beda, misalnya hasil penelitian Craig *et al.* (2009) yang menemukan fenomena tersebut pada spesies *E. itajara*. Berdasarkan uraian di atas dan bukti-bukti yang diperoleh, hasil penelitian ini mempertegas bahwa metode marka gen COI sangat efektif dalam uji autentikasi spesies untuk beragam peruntukan (Rasmussen & Morrissey, 2008; Wong *et al.*, 2011; Herdiana *et al.*, 2017).

Berdasarkan konstruksi pohon filogeni, semua individu yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat berada pada simpul-simpul ranting yang berdekatan, dan setiap genus membentuk klaster (*clade*) seperti yang terlihat pada genera *Cephalopholis*, *Variola*, *Epinephelus*, dan *Scolopsis*. Pengelompokan ini membentuk dua *clade* besar. Adanya *clade* besar ini disebabkan karena perbedaan famili. *Clade* pertama merupakan famili Serranidae yang terdiri dari tiga subclade, tiga subclade ini adalah genus *Epinephelus*, *Cephalopholis* dan *Variola*. *Clade* kedua merupakan famili Nemipteridae yang hanya terdiri dari satu subclade yaitu genus *Scolopsis*. Genus ini merupakan anggota dari famili Nemipteridae yang tidak termasuk jenis ikan kerapu. Kedua famili ini dipisahkan oleh jarak genetik yang cukup tinggi yaitu 23,5%.

Species *C. urodeta* berada satu *clade* dengan *C. sonnerati* memperlihatkan hubungan kekerabatan yang dekat dengan jarak genetik antar keduanya 5,6%. Kesalahan identifikasi sering terjadi pada dua spesies ini. Hal ini dikarenakan bentuk morfologi yang mirip seperti yang diungkapkan oleh Ariyanti *et al.* (2015), bahwa secara fenotip, *C. urodeta* dewasa mirip dengan juvenil *C. sonnerati* karena memiliki ciri mencolok yaitu garis yang menyudut pada sirip ekor. Secara molekuler kedua spesies ini berbeda yang dibuktikan dengan posisi *C. sonnerati* dan *C. urodeta* berada pada simpul yang terpisah. Begitu juga dengan *V. albimarginata* dengan *V. louti*. Secara morfologi, *V. albimarginata* memiliki tepi ekor yang berwarna putih sedangkan *V. louti* memiliki tepi ekor yang berwarna kuning (Allen *et al.*, 2003). Fenomena seperti ini disebut sebagai spesies kriptik, yakni secara morfologi identik tetapi spesiesnya berbeda.

Metode DNA *barcoding* dapat digunakan sebagai instrumen dalam pemanfaatan dan perlindungan spesies. Aplikasi dari DNA *barcoding* dapat menghindarkan perdagangan (ekspor) dalam kondisi hidup dan filet dari berbagai fase hidup. Gen COI dapat menjadi suatu identitas molekuler dan alat autentikasi bagi sumber daya

ikan kerapu Aceh untuk mencegah perdagangan ilegal dan pencurian sumberdaya ikan. Benih ikan kerapu banyak ditangkap dari alam untuk kemudian dibudidayakan. Hasil budidaya ini yang kemudian dijual kepada pengepul untuk dijual lagi kepada pihak asing. Selain menangkap benih, masyarakat juga menangkap ikan dewasa dikarenakan harga ikan yang ditangkap dari alam lebih mahal. Jika ikan dijual dalam keadaan sudah difilet, menurut Rasmussen & Morrissey (2008) bahwa autentifikasi dapat dijadikan sebagai instrumen untuk pengujian terhadap pencampuran jenis dan penipuan label yang dapat merugikan konsumen dan merusak kepercayaan pasar.

Pada penelitian ini, hampir 70% pita DNA tervisualisasi dengan baik yang mana sampelnya berasal dari bagian sirip ikan. Sirip ikan merupakan bagian tubuh yang non-invasif yang tingkat kerusakannya dan kontaminannya lebih rendah dibandingkan dengan bagian tubuh ikan. Selanjutnya pada proses amplifikasi menunjukkan bahwa 80% sampel dapat dilakukan sampai tahapan PCR dan sekuensing. Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan PCR di antaranya pengaruh penyimpanan (Sutrisno, 2012) dan kerusakan DNA dalam spesimen dan jaringan yang diawetkan (Zimmermann *et al.*, 2008). Selain itu, penelitian ini berhasil memperlihatkan bahwa penggunaan sebagian sirip ikan untuk DNA *barcoding* memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi dan pada kondisi tertentu dapat dilakukan tanpa harus mematikan ikannya.

Kesimpulan

Autentikasi terhadap ikan kerapu yang ditangkap di perairan Peukan Bada berhasil membedakan tiga spesies dengan tingkat kemiripan $\geq 97\%$ (*V. albimarginata*, *C. urodeta*, dan *C. sexmaculata*), dan tiga spesies lainnya dengan tingkat kemiripan $\leq 97\%$ (*C. boenak*, *E. merra*, dan *S. vosmeri*). Konstruksi pohon filogeni terhadap spesies ikan kerapu dari perairan Peukan Bada membentuk dua *clade* utama yang memisahkan secara jelas antara famili Serranidae dan Nemipteridae. Hasil autentikasi genetik dengan menggunakan gen COI berhasil membedakan spesies *E. fasciatus*, *V. albimarginata*, *V. louti*, *C. spiloparaea*, *C. miniata*, dan *C. sonnerati*, yang karakteristik morfologinya kompleks. Hal ini mengkonfirmasi bahwa fenomena *fenotip plasticity* pada ikan kerapu, sehingga autentikasi spesies untuk pemanfaatannya sangat bermanfaat. Penggunaan DNA *barcoding* dengan menggunakan metode COI sangat efektif dan tingkat keakuratannya tinggi.

Ucapan Terima kasih

Terimakasih kepada Rika Astuti yang telah mengumpulkan dan menyediakan ikan kerapu untuk dikirim ke Bogor.

Daftar Pustaka

- Allen, G., Steene, R.C., Humann, P. & De Loach, N. (2003). *Reef Fish Identification: Tropical Pasific*. Star Standard Industries Pte Ltd, Singapore. 457 p.
- Ariyanti, Y., Farajallah, A. & Arlyza, I.S. (2015). Phylogenetic analysis of the darkfin hind, *Cephalopholis urodeta* (Serranidae) using partial mitochondrial CO1 Gene Sequences. *Ilmu Kelautan*, 20(1): 38-44.
- Astuti, R. (2016). Analisis populasi ikan kerapu (Serranidae) yang tertangkap di perairan Peukan Bada, Aceh Besar, Provinsi Aceh. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 61 p.
- Astuti, R., Kamal M.M. & Yonvitner (2016). Struktur komunitas ikan kerapu (Serranidae) yang didaratkan di Kecamatan Peukan Bada, Provinsi Aceh. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 8(1): 73-84.
- Butet, N.A. (2013). Plastisitas fenotip kerang darah *Anadara granosa* L. dalam merespon pencemaran lingkungan: studi kasus di perairan pesisir Banten. *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 92 p.
- Campbell, S.J., Mukminin, A. & Prasetia, R. (2012). *Reef fish Spawning aggregations in Aceh, Sumatra: Local knowledge of occurrence and status*. WCS Indonesian Marine Program, Bogor. 79 p.
- Craig, M.T., Graham, R.T., Torres, R.A., Hyde, J.R., Freitas, M.O., Ferreira, B.P., Hostim-Silva, M., Gerhardinger, L.C., Bertoincini, A.A. & Robertson, D.R. (2009). How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. *Endangered Species Research*, 7: 167-174.
- Chen, B.Y. & Janes, H.W. (2000). *PCR Cloning Protocol*. Humana Press Inc., New Jersey. 433 p.
- Dharmayanti, I. (2011). Filogenetika molekuler: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 21(1): 1-10.
- Ding, S., Zhuang, X., Guo, F., Wang, J., Su, Y., Zhang, Q. & Li Q. (2006). Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences. *Science in China Series C Life Sciences*, 49(3): 235–242.
- Heemstra, P.C. & Randall JE. (1993). *FAO species catalogue. v. 16: Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, Rockcod, Hind, Coral grouper and Lyretail species known to date*. FAO Fisheries synopsis, Rome. 125 p.
- Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S. & de Waard JR. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society*, 270B: 96–99.
- Herdiana, L., Kamal, M.M., Butet, N.A. & Affandi, R. (2017). Keragaman morfometrik dan genetik Gen COI belut sawah (*Monopterus albus*) asal empat populasi di Jawa Barat. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 22(3): 180-190.
- Hseu, J.R., Huang, W.I. & Yeong, T.C. (2007). What causes cannibalization-associated suffocation in cultured brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775). *Aquaculture Research*, 38: 1056–1060.
- James, C.M., Al-Thobaiti, S.A., Rasem, B.M. & Carlos, M.H. (1999). Potential of grouper hybrid *Epinephelus fuscoguttatus* X *E. polyphekadion* for aquaculture. *Naga the ICLARM Quarterly*, 22(1): 19–23.
- KKP. (2012). Statistik perikanan budidaya 2011. Dirjen Perikanan Budidaya, Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia, Jakarta. 79 halaman.
- KKP. (2017). Statistik perikanan budidaya 2016. Dirjen Perikanan Budidaya, Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia, Jakarta. 84 halaman.
- Kuhno, H., Duray, M. & Sunyoto, P. (1990). *A Field Guide to Groupers of Southeast Asia*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Jakarta. 26 p.
- Kurnia, R. (2012). Model *restocking* kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dalam system *sea ranching* di perairan Dangkal Semak Daun,

- Kepulauan Seribu. *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 174 p.
- Maddison, W.P., Donoghue, M.J. & Maddison, D.R. (1984). Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology*, 33(1): 83-103.
- Nuraini (2007). Jenis ikan kerapu (Serranidae) dan hubungan panjang-berat di perairan Berau, Kalimantan Timur. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 7(2): 61-65.
- Rasmussen, R.S. & Morrissey, M.T. (2008). DNA-based method for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 280-295.
- Rudi & Muchsin, I. (2011). *Ikan Karang Perairan Aceh dan Sekitarnya*. Lubuk Agung, Bandung. 216 p.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 74(12): 5463-5467.
- Sutrisno, H. (2012). The impact of storage times to the pcr success: case study on insect collection in Indonesia. *HAYATI Journal Biosciences*, 19(2): 99-104.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* doi:10.1093/molbev/mst197.
- Wong, L.L., Eric, P., Jianguo, L., Huseyin, K., Shunping, H., Chuanjiang, Z., Uthairat, N. & Zhanjiang, L. (2010). DNA Barcoding of catfish: Species authentication and phylogenetic assessment. *PLoS ONE*
doi:10.1371/journal.pone.0017812. www.fishbase.org/identification/SpeciesList.php?class=&order=&famcode=289&subfamily=Epinephelinae&genus=&areacode=&c_code=360&spines=&fins=&resultPage=1&sortBy=species (diunduh tanggal 6 Juni 2018 jam 00.19 WIB).
- Yeh, S.L., Kuo, C.M., Ting, Y.Y. & Chang, C.F. (2003). Androgens stimulate sex change in protogynous grouper, *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135C: 375-382.
- Lieske, E. & Myers, R. (2001). *Reef Fishes Of The World*. Harper Collin Publishers, London. 400 p.
- Zein, M.S.A. & Prawiladilaga DM. (2013). *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana Prenada, Jakarta. 262 p.
- Zimmermann, J., Hajibabaei, M., Blackburn, D.C., Hanken, J., Cantin, E., Posfai, J. & Evan, T.C. (2008). DNA damage in preserved specimens and tissue samples : a molecular assessment. *Frontiers in Zoology*, 23: 5-18.