

Karakteristik Gen *Cytochrome Oxidase* Subunit I (Coi) Tiram Daging dari Genus *Crassostrea* Sebagai Identitas Jenis di Delta Cimanuk, Jawa Barat (*Characteristics of Crassostrea Oyster Cytochrome Oxidase Subunit I (Coi) Gene As Species Identity In Delta Cimanuk, West Java*)

¹Dian Rezki Muliani, ²Fredinan Yulianda*, ²Nurlisa A Butet

¹Mahasiswa Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University, Bogor, 16128, Indonesia

²Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University, Bogor, 16128, Indonesia

*corresponding authors: fredinan@apps.ipb.ac.id

Diterima : 5 Januari 2020 Revisi : 23 Februari 2020 Disetujui : 15 Maret 2020

ABSTRACT

Oysters belong to the *Crassostrea*, which is a type of shellfish that lives as benthos in waters under the same substrate and environmental conditions will exhibit similar morphological changes in response. There are many types of oysters that have a similar shape are often an obstacle to differentiate of *Crassostrea* species through morphological identification. The purpose of this research was to identify the types of oysters found in the waters of Delta Cimanuk through analysis of the morphology and nucleotide diversity of *Cytochrome Oxidase* subunit I (COI) gene, as basic information on proper management and conservation. The morphological identification results show that there were two species of the *Crassostrea*. Identification of species through the *Barcoding* DNA technique shows that there is one type of oyster: *Crassostrea iredalei* with an accuracy of 99.5%.

Key word : COI gene, *Crassostrea*, Delta Cimanuk, molecular identification, morphology

ABSTRAK

Tiram termasuk ke dalam Genus *Crassostrea* yang merupakan jenis kerang-kerangan yang hidup sebagai bentos di perairan pada kondisi substrat dan lingkungan yang sama akan menunjukkan respon berupa perubahan morfologi yang hampir mirip. Banyaknya jenis tiram yang memiliki bentuk yang mirip seringkali menjadi hambatan untuk membedakan jenis *Crassostrea* melalui identifikasi secara morfologi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi jenis tiram yang terdapat di perairan Delta Cimanuk melalui analisis morfologi dan keragaman nukleotida gen *Cytochrome Oxidase* subunit I (COI), sebagai informasi dasar dalam pengelolaan dan konservasi yang tepat sasaran. Hasil identifikasi secara morfologi menunjukkan bahwa terdapat dua spesies dari Genus *Crassostrea* yakni *Crassostrea iredalei* dan *Crassostrea gigas*. Identifikasi spesies melalui teknik DNA *Barcoding* menunjukkan bahwa terdapat satu jenis tiram dari Genus *Crassostrea* yakni *Crassostrea iredalei* dengan tingkat keakuratan sebesar 99,5%.

Kata kunci : *Crassostrea*, Delta Cimanuk, gen COI, identifikasi molekuler, morfologi

PENDAHULUAN

Perairan kawasan Delta Cimanuk, Kabupaten Indramayu, Jawa Barat adalah daerah yang memiliki beragam jenis kerang-kerangan (Bivalvia). Jenis kerang yang hidup di Delta Cimanuk banyak menempel pada batu-batu, akar pohon, ataupun cangkang kerang mati yang keras. (Hermawati et al., 2017) juga melaporkan adanya keberadaan dan distribusi *Crassostrea* wilayah tersebut. Salah satu jenis kerang yang paling banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar adalah tiram (genus *Crassostrea*). Kegiatan pengambilan yang dilakukan terus-menerus tanpa memperhatikan kondisi biologis dan ekologisnya dapat mengakibatkan adanya penurunan populasi. Selain penurunan jumlah populasi, kondisi lingkungan secara ekologis juga mengalami berbagai ancaman, seperti meningkatnya jumlah limbah dan bahan pencemar yang berasal dari sumber-sumber buangan domestik ataupun industri yang terletak di sekitar Delta Cimanuk.

Crassostrea merupakan jenis kerang-kerangan yang memiliki tingkat toleransi yang cukup tinggi terhadap lingkungan khususnya di perairan estuari dan persebaran populasinya juga tergolong luas (Pereira et al., 2011). Tingginya tingkat toleransi terhadap tekanan lingkungan di perairan merupakan bentuk kemampuan tiram untuk

beradaptasi. Kemampuan adaptasi jenis tiram terhadap lingkungan ditunjukkan oleh salah satunya morfologi tiram yang dibentuk oleh kondisi lingkungan yang sama, sehingga beberapa jenis dari kelompok tiram mempunyai ciri morfologi eksternal yang relatif sama. Tingginya keragaman dan banyaknya spesies dari genus *Crassostrea* seringkali mengakibatkan adanya kesalahan dalam mengidentifikasi suatu spesies. Ciri morfologi yang memiliki kemiripan yang tinggi menyebabkan individu tiram sangat sulit dibedakan secara morfologi. Teknik identifikasi molekuler yang akurat dan tidak membutuhkan waktu analisis yang lama ini sangat diperlukan untuk memvalidasi spesies dari genus *Crassostrea*. Kesalahan identifikasi morfologi yang sangat sering ditemukan pada biota perairan adalah adanya fenomena *cryptic species* dan *complex species*. Pemberian nama yang salah terhadap suatu spesies dapat memberikan dampak yang besar terhadap upaya konservasi dan pengelolaan yang tidak tepat.

Keragaman genetik yang berasal dari sekuens nukleotida gen COI menjadi penciri bagi populasi tiram melalui bantuan teknik DNA *barcoding*. DNA *barcoding* menggunakan penanda gen COI karena memiliki keunggulan dalam identifikasi yang lebih akurat dan tidak membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya sehingga upaya pengembangan spesies dari genus *Crassostrea* dapat berjalan dengan baik (Meyer *et al.* 2010). Teknik identifikasi yang sangat populer dilakukan adalah DNA *barcoding*. DNA *barcoding* merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat dengan menggunakan daerah gen yang terstandarisasi sebagai penanda spesies (Hsiao *et al.*, 2016). Sumber DNA pada hewan eukariot seperti tiram berasal dari DNA inti dan DNA mitokondria (Slynko *et al.*, 2018) Gen yang sering digunakan dalam teknik DNA *Barcoding* biasanya memakai gen-gen *conserve* pada mitokondria, salah satu contohnya adalah marka gen *Cytochrome Oxidase* subunit I (COI). Keragaman sekuens nukleotida gen COI mampu menjadi dasar dalam sistem DNA *barcoding* hewan dalam menentukan kondisi lingkungan (Goodwin *et al.*, 2017). Berdasarkan hal tersebut, penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi jenis tiram di perairan Delta Cimanuk, Kabupaten Indramayu melalui identifikasi secara morfologi dan divalidasi dengan analisis keragaman basa nukleotida pada gen *Cytochrome Oxidase* subunit I (COI).

MATERI DAN METODE

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Perairan Pabean Ilir, Delta Cimanuk, Kecamatan Pasekan Indramayu, Jawa Barat. Tiram yang diperoleh dan dianalisis pada bulan September 2016 sampai Januari 2017 kemudian dianalisis di Laboratorium Biologi Molekuler Perikanan Lantai 4, Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Pengambilan contoh

Pengambilan contoh tiram dari lapang yang kemudian diambil bagian otot aduktornya dan dimasukkan ke dalam tabung koleksi berukuran 100 mL berisi alkohol 96% dan selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University untuk dilakukan tahap analisis molekuler.

Identifikasi secara morfologi dan Preparasi contoh

Identifikasi dilakukan dengan mencocokkan karakteristik fisik tiram dengan berdasarkan karakteristik yang dimiliki. Karakteristik yang dicocokkan adalah sifat morfometrik dan meristik tiram dari tingkatan paling umum yaitu tingkat kingdom hingga tingkat spesies. Identifikasi morfologi meliputi pengukuran parameter panjang dan lebar cangkang. Tiram yang telah diawetkan dilanjutkan pada tahap preparasi, yaitu bertujuan untuk menghilangkan kandungan alkohol sehingga memudahkan dalam proses isolasi. Proses pencucian alkohol dilakukan dengan cara merendam sekitar 30 mg potongan otot aduktor contoh dalam akuades dan dilakukan pengulangan sebanyak sepuluh kali.

Isolasi dan ekstraksi DNA dan Pengujian kualitas DNA

Isolasi dan ekstraksi DNA menggunakan kit komersial *Gene Aid*. Tiram yang telah di preparasi (tahap penghilangan kandungan alkohol sehingga memudahkan dalam proses isolasi) diambil sebanyak 30 mg

kemudian dikeringkan dan dimasukkan ke dalam *microtube*. Prosedur ekstraksi DNA ini mengikuti manual kit *Gene Aid* hingga didapatkan DNA yang telah berhasil diekstraksi. Pengujian kualitas DNA yang sering disebut sebagai tahap elektroforesis yang dilakukan pada gel agarosa 1,2% menggunakan larutan buffer TAE 1x. Contoh tiram yang telah diekstraksi diambil sebanyak 2,5 μ L. Setelah itu visualisasi DNA total dilakukan dengan menggunakan mesin ultraviolet.

Amplifikasi dan visualisasi fragmen DNA gen COI

Kualitas DNA yang baik dari hasil uji kualitas DNA akan dilanjutkan ke tahap amplifikasi. Tahap ini dilakukan dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang terdiri atas tiga tahapan yakni denaturasi, annealing, dan elongasi. Prinsip kerja pada PCR biasanya terdapat pada perbedaan suhu setiap tahapannya (Hollingsworth, 2011). Amplifikasi menggunakan primer F yang didesain yaitu primer universal untuk beberapa biota akuatik. Tahap ini dilakukan sebanyak 35 kali ulangan dimana satu ulangan dari ketiga tahap ini disebut siklus. Predenaturasi merupakan tahap sebelum proses PCR dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 45 detik. Tahap annealing atau penempelan pada suhu 52°C selama 1 menit. Tahap elongasi dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit. Biasanya pada tahap setelah PCR dilakukan tahap tambahan yaitu tahap post elongasi pada suhu 72°C selama 5 menit yang bertujuan agar semua hasil PCR yang dihasilkan dalam bentuk untai ganda. Setelah itu dilakukan penyimpanan hasil PCR pada suhu penyimpanan 15°C selama 10 menit. Untuk melihat kualitas DNA yang dihasilkan dari tahap PCR digunakan gel agarosa 1,2% kemudian divisualisasi pada mesin luminasi ultraviolet.

Sekuensing (pengurutan produk PCR) DNA Crassostrea gen COI dan Data Validasi urutan basa nukleotida gen COI

Produk PCR yang memiliki kualitas baik dapat dilanjutkan ke tahap sekuensing atau pembacaan sekuens DNA. Urutan basa nukleotida yang diperoleh dari hasil sekuensing selanjutnya divalidasi menggunakan *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool- nucleotide*) yang terdapat di *GenBank*. Proses validasi dilakukan dengan cara mengunggah hasil sekuens nukleotida *Crassostrea* sp. pada *BLASTn* yang terdapat pada situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Pensejajaran sekuens nukleotida gen COI Crassostrea

Hasil sekuensing yang menghasilkan sekuens nukleotida disejajarkan menggunakan metode Clustal W pada perangkat lunak MEGA versi 5.2 untuk menganalisis jarak genetiknya pada pohon filogeni (Tamura et al., 2011). Sekuens nukleotida gen COI tiram dengan primer *forward* dan *reverse* diedit dan dianalisis untuk mendapatkan sekuens DNA dari gen COI tersebut.

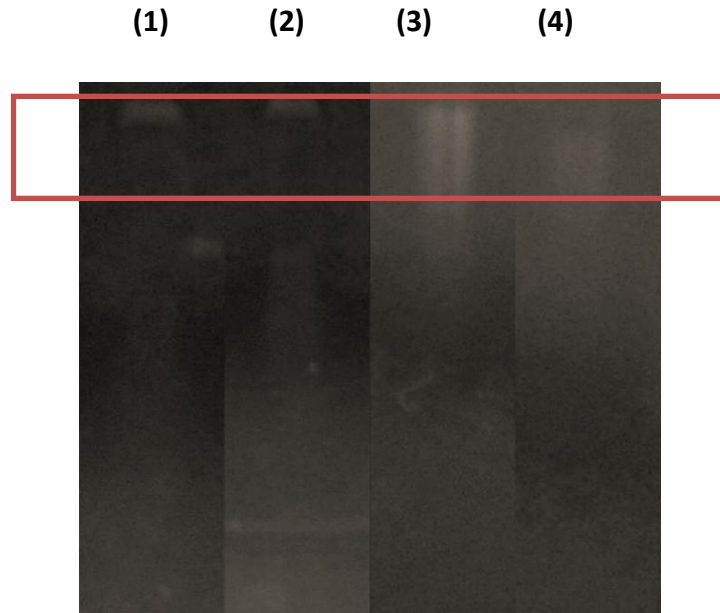
Penghitungan jarak genetik dan Rekonstruksi pohon filogeni

Penghitungan jarak genetik dari urutan basa nukleotida gen COI intraspesies dan interspesies dilakukan menggunakan metode *pairwise distance* yang terdapat pada program MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011). Jarak genetik *Crassostrea* sp. yang berasal dari lokasi perairan yang berbeda menunjukkan jarak genetik intraspesies, sedangkan jarak genetik interspesies menunjukkan jarak genetik antar *Crassostrea* sp. Pohon filogeni dikonstruksi berdasarkan jarak genetik antarspesies yang berfungsi untuk mengetahui hubungan kekerabatan berdasarkan komposisi sekuens basa DNA atau protein. Analisis filogeni dilakukan menggunakan metode *bootstrapped Neighbour Joining Tree* dengan 1000 kali pengulangan pada *software* MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA total dan amplifikasi gen COI

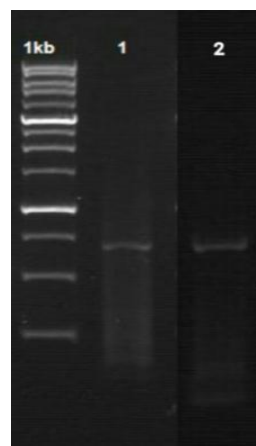
Bagian tubuh tiram yang digunakan dalam proses isolasi dan ekstraksi adalah bagian otot dari tubuh tiram. Bagian otot ini diambil karena mengandung jumlah mitokondria yang relatif tinggi. Tahap isolasi dan ekstraksi dari tujuh contoh tiram menghasilkan empat pita DNA dengan kualitas yang baik. Penentuan kualitas DNA dilakukan melalui teknik elektroforesis DNA total pada agarose 1,2% . Hasil pengujian DNA total tiram disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil pengujian kualitas DNA total tiram pada gel agarosa 1,2% (1) contoh 1; (2) contoh 2; (3) contoh 3; (4) contoh 4

Visualisasi elektroforesis contoh spesies menghasilkan pita DNA cukup terang menunjukkan keempat contoh spesies memiliki kualitas DNA yang baik. Kualitas DNA total yang baik dianggap layak digunakan sebagai cetakan dalam proses amplifikasi gen COI dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Amplifikasi gen COI yang telah diisolasi dengan menggunakan teknik PCR dengan suhu *annealing* (penempelan primer) sebesar 52°C. Gen COI target amplifikasi berukuran antara 500-750 *basepair* (bp) (Gambar 2).

(1) (2) (3)



Gambar 2. Visualisasi produk PCR pada gel agarose 0.8%; (1) Marker 1 kb (2) Contoh tiram 1 (3) Contoh tiram 2

Validasi sekuen nukleotida gen COI tiram *C. iredalei*

Sekuen nukleotida gen COI kedua sampel tiram diunggah pada *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool- nucleotide*) yang terdapat di pada situs web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk memastikan kebenaran dan kedekatannya dengan spesies lain. Hasil *BLASTn* didapatkan kebenaran bahwa kedua contoh tiram yang diamati merupakan *Crassostrea iredalei* dengan kemiripan sebesar 99%. Hasilnya disajikan pada Tabel 1 dan divalidasi pada grafik deskripsi hasil *BLASTn*.

Tabel 1. Hasil identifikasi spesies berdasarkan data sekuens DNA yang diunggah pada *BLASTn*

Deskripsi	Skor maksimal	Skor total	Query cover	Nilai E	Identifikasi	Kode Akses
<i>Crassostrea iredalei</i> cytochrome oxidase subunit (COI) gene, partial cds, mitochondrial gene for mitochon,	1214	1214	98%	0	99%	AY038078.1
<i>Crassostrea iredalei</i> isolate CiCB01 02 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds, mitochondrial	1166	1166	94%	0	99%	EU007464.1
<i>Crassostrea iredalei</i> isolate CiCB03 01 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds, mitochondrial	1160	1160	94%	0	99%	EU007465.1

Pensejajaran urutan basa nukleotida gen COI *Crassostrea* sp.

Berdasarkan hasil sekunsing, diperoleh panjang nukleotida sebesar 675 bp (primer *forward*) dan 478 bp (primer *reverse*), sedangkan jumlah basa nukleotida yang *conserve* diperoleh dari hasil pensejajaran diperoleh sepanjang 437 bp. Urutan basa nukleotida gen COI kedua contoh *C. iredalei* kemudian disejajarkan dengan *outgroup* dari beberapa spesies tiram dengan genus yang sama yang diperoleh dari *GenBank*. Berdasarkan hasil pensejajaran, diperoleh nilai *conserve* sebesar 82,37% (472/573), *variable* sebesar 17,62% (101/573), dan *singleton* sebesar 16,05% (92/573).

Analisis jarak genetik dan pohon filogeni gen COI *Crassostrea iredalei*

Jarak genetik menunjukkan hubungan kekerabatan antarspesies. Jarak genetik pada fragmen gen COI antara *C. iredalei* dengan beberapa spesies lain dari genus *Crassostrea* berkisar antara 0,005 sampai 0,168. Matriks jarak genetik fragmen gen COI pada *C. gigas*, *C. iredalei*, dan *C. madrasensis* berdasarkan metode *pairwise distance* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Matriks jarak genetik fragmen COI pada *C. iredalei*, *C. gigas*, dan *C. madrasensis* berdasarkan metode *pairwise distance*.

	<i>C. iredalei</i> 1	<i>C. iredalei</i> 2	<i>C. gigas</i> (KP099052.1)	<i>C. madrasensis</i> (JF915507.1)
<i>C. iredalei</i> 1		0,003	0,014	0,007
<i>C. iredalei</i> 2	0,005		0,015	0,007
<i>C. gigas</i> (KP099052.1)	0,162	0,168		0,015
<i>C. madrasensis</i> (JF915507.1)	0,031	0,033	0,161	

Analisis jarak genetik dengan menggunakan matriks pohon filogeni digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan berdasarkan pohon filogeni yang telah dikonstruksi berdasarkan jarak genetik *pairwise distance* dari basa-basa nukleotida COI antarspesies. *Ingroup* intraspesies *C. iredalei* menunjukkan hubungan kekerabatan yang erat. Cabang pohon filogeni pada spesies yang berbeda menunjukkan hubungan kekerabatan yang cukup erat dalam genus yang sama.

Nukleotida spesifik dan situs mutasi gen COI *C. iredalei*

Situs nukleotida spesifik gen COI *C. iredalei* diperoleh setelah proses pensejajaran dengan *C. gigas* dan *C. madrasensis*. Berdasarkan hasil pensejajaran, didapatkan sebanyak 92 situs nukleotida spesifik yang

merupakan basa nukleotida penciri sebagai karakteristik pembeda dari spesies lain. Situs nukleotida spesifik tersebut menunjukkan adanya mutasi yang spesifik pada *C. iredalei*. Situs mutasi yang diketahui setelah dilakukan proses penyejajaran urutan basa nukleotida antara *C. gigas* dan *C. madrasensis* yang digunakan sebagai acuan adalah sebanyak 101 situs. Situs mutasi yang ditemukan sebanyak 101 situs nukleotida ini merupakan situs yang mengalami perubahan basa nukleotida secara substitusi.

Sebaran populasi *Crassostrea* berdasarkan rasio panjang dan lebar cangkang

Pengelompokan spesies dalam satu genus *Crassostrea* dapat dilakukan melalui analisis rasio panjang dan lebar cangkang. Analisis ini menggambarkan bentuk dan ukuran tubuh yang berbeda sebagai implikasi dari jenis spesies yang berbeda pula. Perbedaan morfologi ini dapat disebabkan oleh adanya penyesuaian lingkungan, faktor genetik, dan usia (Stapley et al., 2010). Ukuran panjang lebih besar dibandingkan ukuran lebar cangkang untuk spesies *Crassostrea iredalei*, sehingga dapat disimpulkan bahwa rasio ukuran *C. iredalei* adalah kurang dari 1. Hasil analisis rasio panjang dan lebar cangkang dari genus *Crassostrea* yang terdapat di perairan Delta Cimanuk ditunjukkan dengan jumlah spesies *Crassostrea iredalei* dan jenis *Crassostrea* lainnya disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah individu *C. iredalei* dan *C. gigas* di Delta Cimanuk, Jawa Barat

Stasiun	<i>C. iredalei</i>	<i>C. gigas</i>	Total individu
1	2	81	83
2	4	19	23
3	7	102	109
4	6	87	93
5	6	48	54
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	11	129	140
10	7	108	115
11	9	59	68
12	9	123	132
13	2	106	108
14	9	90	99
15	5	39	44

Terdapat dua jenis tiram yang diamati secara morfologi, identifikasi morfologinya menunjukkan bahwa kedua spesies termasuk ke dalam genus *Crassostrea* dengan nama spesies *Crassostrea gigas* dan *Crassostrea iredalei*. Tahap identifikasi secara morfologi ini dilakukan dengan mencocokkan bentuk tiram secara morfologi secara detail karakteristik morfologi dari masing-masing spesies. Secara morfologi, bentuk cangkang tiram asimetris, permukaan yang kasar dengan lipatan-lipatan. Cangkang tiram umumnya tebal, berwarna putih pucat atau sedikit kehitaman. Bagian dalam cangkang tiram terdapat scars atau bekas luka tempat menempelnya otot adduktor yang digunakan untuk mengendalikan pembukaan atau penutupan katup cangkang. Scars ini dapat digunakan sebagai parameter dalam menentukan spesies tiram secara morfologi, karena menunjukkan seberapa besar aktivitas ligamen engsel pada umbo tiram di mana setiap spesies memiliki kemampuan yang berbeda dalam pembukaan dan penutupan katup cangkang (Octavina et al., 2014).

Analisis perbandingan panjang dan lebar cangkang dilakukan untuk mengetahui perbedaan jumlah populasi antara *C. iredalei* dengan jenis *Crassostrea* sp lainnya. Berdasarkan hasil penelitian ini, jenis *C. iredalei* yang terdapat di Delta Cimanuk, Indramayu Jawa Barat tergolong lebih sedikit dibandingkan jenis *Crassostrea* lainnya. Menurut (Stapley et al., 2010), terdapat 8 jenis *Crassostrea* yang ada di daerah tropis khususnya di Indonesia termasuk *C. iredalei*. Identifikasi secara morfologi dianggap kurang akurat dalam pengklasifikasian spesies, sehingga diperlukan suatu teknik identifikasi yang lebih akurat yaitu identifikasi secara molekuler. Tahap identifikasi secara molekuler diawali dengan proses isolasi dan ekstraksi DNA pada sampel tiram yang diamati. Isolasi dan ekstraksi DNA *Crassostrea* yang berasal dari Delta Cimanuk menggunakan otot adduktor tiram dan menghasilkan pita DNA dengan kualitas yang baik, dan selanjutnya akan menjadi cetakan DNA dalam proses amplifikasi. Kualitas DNA total merupakan faktor penting dalam keberhasilan proses amplifikasi. Kandungan polisakarida dan protein polifenol yang tinggi di dalam otot adduktor tiram juga dapat menjadi kontaminan yang akan mengganggu proses polimerase enzimatik asam nukleat (Pereira et al., 2011).

DNA total dengan kualitas yang baik dijadikan sebagai cetakan DNA untuk mengamplifikasi gen COI *Crassostrea* dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Amplifikasi gen COI dilakukan pada suhu penempelan primer (*annealing*) sebesar 52°C. Suhu *annealing* yang optimal merupakan tahap yang sangat penting dilakukan pada metode PCR, hal ini disebabkan penempelan primer *forward* dan *reverse* pada kedua ujung DNA terjadi pada tahap *annealing*. Validasi gen COI *Crassostrea* menggunakan *BLASTn* (*Basic Local Allignment Search Tool-nucleotide*) menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut adalah *Crassostrea iredalei* dengan nilai keakuratan sebesar 99% yang menunjukkan pengidentifikasian spesies dengan DNA *barcoding* sangat akurat (Tabel 2). Keakuratan informasi spesies dilakukan dengan identifikasi molekuler yang menunjukkan kedekatannya dengan spesies lain, namun diperlukan analisis jarak genetika untuk mengetahui jarak genetik antara spesies contoh dengan masing-masing individu yang menjadi spesies pembanding. Analisis jarak genetika diperlukan sebagai dasar rekonstruksi pohon filogeni yang menggambarkan hubungan kekerabatan spesies contoh dan spesies *outgroup*.

Hubungan kekerabatan spesies yang diidentifikasi dengan gen COI menggunakan *Neighbor-Joining* dan *Minimum Evolution* dengan pengolahan *bootstrap* 1000 menunjukkan *C. iredalei* membentuk satu kelompok yang sama. Selain itu, konstruksi pohon filogeni menggambarkan adanya pemisahan yang jelas antara *C. iredalei* dengan spesies *outgroup* yang lain. Pemisahan ini disebabkan oleh adanya situs nukleotida spesifik yang menandakan adanya pembeda dari kedua contoh yang dijadikan objek penelitian (*C. iredalei* contoh 1 dan 2) dengan spesies yang dibandingkan yaitu *Crassostrea gigas* (KP09052.1) dan *Crassostrea madrasensis* (JF915507.1). Data urutan basa nukleotida *C. gigas* dan *C. madrasensis* diperoleh dari *GenBank* sebagai spesies pembanding atau *outgroup*. Urutan basa nukleotida *C. iredalei* selanjutnya disejajarkan menggunakan *software* MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011). Perbandingan *C. iredalei* dengan spesies *outgroup*, diperoleh nilai jarak genetik yang cukup bervariasi. Jarak genetik terendah antara *C. iredalei* contoh 1 dan 2 adalah sebesar 0,003. Jarak genetik tertinggi antara *C. iredalei* dengan *C. gigas* sebesar 0,168. Perbedaan jarak genetik antara *C. iredalei* dengan spesies lainnya yang data basa nukleotidanya diperoleh dari *GenBank* adalah sebesar 3% atau lebih menunjukkan bahwa secara molekuler dipastikan *C. iredalei* berbeda spesies dengan *C. gigas* dan *C. madrasensis* dari genus *Crassostrea*.

Situs nukleotida spesifik gen COI *C. iredalei* diperoleh setelah pensejajaran dengan *C. gigas* dan *C. madrasensis*. Berdasarkan hasil pensejajaran didapatkan sebanyak 92 situs nukleotida spesifik yang merupakan basa nukleotida pembeda dan penciri dari spesies lain. Situs nukleotida spesifik tersebut menunjukkan adanya mutasi yang spesifik pada *C. iredalei* yang ditemukan setelah dilakukan pensejajaran dengan *C. gigas* dan *C. madrasensis* (sebagai acuan) adalah sebanyak 101 situs. Mutasi substitusi merupakan pertukaran basa nukleotida yang terjadi dalam urutan suatu DNA. Adanya situs mutasi dan perbedaan urutan basa nukleotida gen COI dari kedua contoh menunjukkan bahwa *C. iredalei* yang berasal dari perairan Delta Cimanuk memiliki keragaman nukleotida yang berbeda dengan spesies lainnya dalam satu genus *Crassostrea*. Keragaman nukleotida suatu spesies sangat penting untuk dipertahankan demi kelestarian spesies. Keragaman nukleotida dalam satu spesies yang semakin tinggi menunjukkan keragaman genetik yang tinggi pula. Keragaman genetik perlu diidentifikasi karena memiliki peranan yang sangat penting dalam kebugaran (*fitness*) dan ketahanan suatu populasi. Identifikasi molekuler dapat digunakan sebagai dasar sistematika dan konservasi sumberdaya hayati

(Sheth dan Thaker, 2017). Identifikasi morfologi spesies *C. iredalei* belum sepenuhnya menunjukkan kepastian taksonomi (*taxonomy certainty*).

Hal ini karena adanya fenomena *cryptic species and complex species* (spesies kriptik dan kompleks) yang sering kali menyebabkan kekeliruan dalam identifikasi organisme akuatik melalui metode morfologi dan morfometrik saja. Oleh karena itu, beberapa parameter morfometrik seperti ukuran bekas luka adduktor (*scars*) dan identifikasi warna bekas luka adduktor dianggap penting untuk diketahui dalam meningkatkan keakuratan pengidentifikasian spesies secara morfometrik. Keragaman genetik mampu menyediakan keragaman respon yang penting untuk menjaga fungsi dari ekosistem dan proses adaptasi spesies dalam perubahan kondisi lingkungan (Roger et al., 2012; Sjöqvist dan Kremp, 2016). Beberapa jenis tiram yang diperoleh dari Delta Cimanuk Indramayu menggambarkan identitas populasi *Crassostrea* yang terdapat di perairan tersebut. Oleh karena itu, informasi mengenai jenis spesies *Crassostrea* yang terdapat di Delta Cimanuk dapat menjadi sarana dalam kegiatan konservasi dan pengelolaan yang tepat sasaran, serta untuk mempertahankan kondisi lingkungan perairan Teluk Pabean Ilir dari berbagai macam ancaman kegiatan antropogenik ataupun ancaman lingkungan lainnya. Kondisi habitat yang terjaga menjadi indikasi yang penting dalam pemeliharaan keragaman genetik *C. iredalei* sehingga populasinya tetap lestari dan berkelanjutan.

KESIMPULAN

Identifikasi jenis tiram *C. iredalei* yang terdapat di perairan Delta Cimanuk, Jawa Barat berhasil divalidasi melalui teknik *barcoding* menggunakan marka gen COI dengan nilai persentase identifikasi lebih dari 96%. Analisis molekuler gen COI pada tiram *C. iredalei* mendukung hasil identifikasi morfologi dan morfometrik yang menunjukkan terdapat lebih dari satu spesies yang ada di perairan Delta Cimanuk.

DEKLARASI

Penulis mendeklarasikan bahwa penulis tidak ada konflik

DAFTAR PUSTAKA

- Goodwin, K. D., Thompson, L. R., Duarte, B., Kahlke, T., Thompson, A. R., Marques, J. C., Caçador, I. (2017). DNA sequencing as a tool to monitor marine ecological status. *Frontiers in Marine Science*, 4:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00107>
- Hermawati, S., Sulistiono, Samosir, A. M. (2017). Distribution, condition and gonad maturity of the invasive pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg 1793) in Cimanuk Delta, Indramayu, West Java, Indonesia. *Omni-Akuatika*, 13(2):99–110.
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49):19451–19452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108>
- Hsiao, S. T., Chuang, S. C., Chen, K. S., Ho, P. H., Wu, C. L., Chen, C. A. (2016). DNA barcoding reveals that the common cupped oyster in Taiwan is the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Ostreoida; Ostreidae), not *C. gigas*. *Scientific Reports*, 6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep34057>
- Octavina, C., Yulianda, F., Krisanti, M. (2014). Struktur komunitas tiram daging di perairan estuaria Kuala Gigieng , Kabupaten Aceh Besar , Provinsi Aceh Population structure of oysters in estuary area of Kuala Gigieng , Aceh Besar District , Aceh Province. *Depik*, 3(2):108–117.
- Pereira, J. C., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A., Guedes-Pinto, H. (2011). An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11):8086–8095. <https://doi.org/10.3390/ijms12118086>
- Roger, F., Godhe, A., Gamfeldt, L. (2012). Genetic diversity and ecosystem functioning in the face of multiple stressors. *PLoS ONE*, 7(9):e45007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045007>

- Sheth, B. P., Thaker, V. S. (2017). DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. *Genome*, 6(7):618–628.
- Sjöqvist, C. O., Kremp, A. (2016). Genetic diversity affects ecological performance and stress response of marine diatom populations. *ISME Journal*, 10(11):2755–2766. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.44>
- Slynko, Y. V., Slynko, E. E., Pirkova, A. V., Ladygina, L. V., Ryabushko, V. I. (2018). Mitochondrial DNA barcoding of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Mollusca: Bivalvia: Ostreidae), cultivated in the Black Sea. *Russian Journal of Genetics*, 54(12):1445–1451. <https://doi.org/10.1134/S1022795418120153>
- Stapley, J., Reger, J., Feulner, P. G. D., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison, C., Ball, A. D., Beckerman, A. P., Slate, J. (2010). Adaptation genomics: The next generation. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(12):705–712. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.09.002>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5 : molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood , evolutionary distance , and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>