

# DETEKSI POLIMORFISME GEN MITOKONDRIA 16S IKAN GLODOK (*Periophthalmus argentilineatus* Valenciennes, 1837) DARI MUARA TEKOLOK, LOMBOK TIMUR, NUSA TENGGARA BARAT

Deiandra Jasmine Audrea<sup>1)</sup>, Tuty Arisuryanti<sup>1)\*</sup>

Laboratorium Genetika & Pemuliaan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

E-mail korespondensi : tuty-arisuryanti@ugm.ac.id

Paper submit : 28 Mei 2021, Paper publish: September 2022

**Abstract** – Tekolok Estuary has high diversity of fishes including barred mudskipper (*Periophthalmus argentilineatus*). However, research on the genetic characterization of barred mudskipper from Tekolok Estuary based on 16S mitochondrial gene has never been conducted. Therefore, the aims of this study were to analyze genetic characterization and genetic variation of 9 samples of barred mudskipper (*Periophthalmus argentilineatus* Valenciennes, 1837) collected from Tekolok Estuary based on 16S mitochondrial gene. The method used was a PCR method using a thermal cycler and universal primers 16Sar and 16Sbr. The data obtained was then analyzed using GeneStudio, DNASTAR, BLAST, Mesquite, MEGAX, DnaSP, and NETWORK. Analysis of intrapopulation genetic variations detected 3 haplotypes with 2 variable sites without parsimony informative site. The results revealed low values of haplotype diversity and nucleotide diversity which were  $0.417 \pm 0.191$  and  $0.00079 \pm 0.00039$ , respectively. In addition, genetic distance of the barred mudskipper investigated in this study was 0-0.355% (average 0.079%). This result showed that there were polymorphisms and genetic variations at the intrapopulation level in barred mudskippers from Tekolok Estuary.

**Keywords:** Barred Mudskipper, *Periophthalmus argentilineatus*, Tekolok Estuary, polymorphism, 16S mtDNA.

**Abstrak** – Muara Tekolok, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat merupakan salah satu muara dengan biodiversitas ikan tinggi dan salah satu jenis ikan yang banyak ditemukan adalah ikan glodok (*Periophthalmus argentilineatus*). Namun demikian, penelitian mengenai karakterisasi genetik ikan glodok dari Muara Tekolok menggunakan gen mitokondria 16S sebagai penanda molekuler belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakterisasi genetik dan variasi genetik 9 sampel ikan glodok (*Periophthalmus argentilineatus* Valenciennes, 1837) dari Muara Tekolok berdasarkan gen mitokondria 16S. Metode yang digunakan pada penelitian adalah metode PCR menggunakan thermal cycler dan primer universal 16Sar dan 16Sbr. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan program GeneStudio, DNASTAR, BLAST, Mesquite, MEGAX, DnaSP, dan NETWORK. Hasil analisis variasi genetik intrapopulasi menunjukkan bahwa dari 9 sampel ikan glodok yang diteliti terdeteksi 3 haplotype dengan 2 situs polimorfik tanpa parsimony informative site. Hasil penelitian juga menunjukkan nilai keragaman haplotipe yaitu  $0,417 \pm 0,191$  dan nilai keragaman nukleotida adalah  $0,00079 \pm 0,00039$  serta jarak genetik intrapopulasi antara 0%-0,355% dengan rata-rata 0,079%. Hasil penelitian menunjukkan adanya polimorfisme pada level intrapopulasi dan mengindikasikan adanya variasi genetik pada ikan glodok dari Muara Tekolok.

**Kata kunci:** Ikan glodok, *Periophthalmus argentilineatus*, Muara Tekolok, polimorfisme, gen mitokondria 16S.

## PENDAHULUAN

Muara Tekolok merupakan salah satu dari banyak muara yang berada di Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat. Terdapat banyak variasi ikan yang dapat ditemukan di Muara Tekolok, seperti ikan lontok dan ikan glodok. Ikan glodok merupakan salah satu ikan banyak dikonsumsi masyarakat pesisir untuk memenuhi kebutuhan protein hewani.

Pada daerah Cilacap dan Karawang, ikan ini biasa dikonsumsi sebagai ikan kering atau ikan asap. Ikan glodok memiliki kandungan gizi yang tinggi antara lain protein, asam lemak omega-6 dan omega-3 (Purwaningsih dkk., 2014). Ikan glodok dapat ditemukan pada habitat yang berlumpur seperti hutan mangrove dan mampu beradaptasi dengan lingkungan berlumpur dengan cara

menyimpan air dan udara pada *gill chambers*-nya yang membesar dan mampu melompat di atas lumpur untuk menghindari predator pada waktu surut (Arief, 2003). Penelitian mengenai keanekaragaman genetik ikan glodok telah banyak dilakukan di seluruh dunia, yaitu antara lain Afrika Timur, Malaysia, Sulawesi (Polgar *et al.*, 2014) dan Guangdong, China (Qiu *et al.*, 2015).

Di Indonesia, penelitian keanekaragaman genetik ikan glodok sebelumnya dilakukan oleh Dahrudin *et al.* (2016) di Jawa dan Bali menggunakan *DNA barcode* memperlihatkan adanya tiga spesies ikan glodok yaitu *P.argentilineatus*, *P.kalolo*, dan *P.novemradiatus*. Selanjutnya Arisuryanti *et al.* (2018) menemukan dua spesies yaitu *P.argentilineatus* dan *P.kalolo* di Laguna Bogowonto, Yogyakarta. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rha'ifa *et al.* (2021) menunjukkan bahwa ikan glodok yang dikoleksi dari Muara Tekolok menggunakan gen *COI* dengan metode *DNA barcoding* teridentifikasi sebagai spesies *Periophthalmus argentilineatus*. Namun demikian belum ada informasi variasi genetik intrapopulasi ikan glodok di Muara Tekolok.

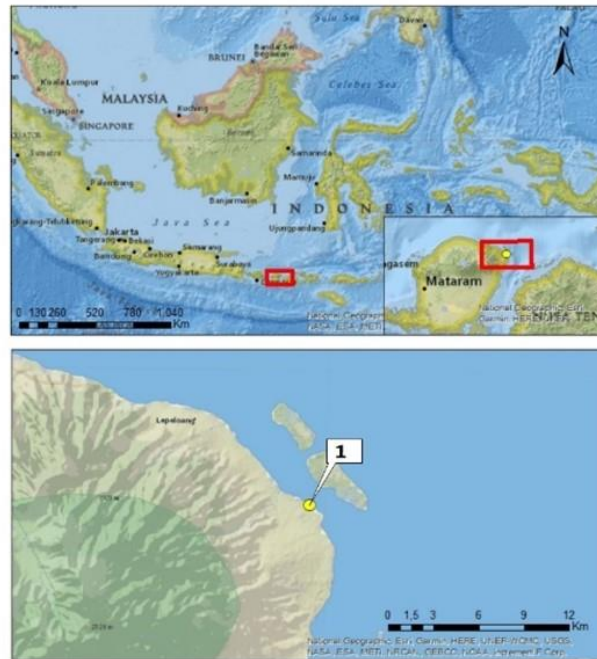
Data variasi genetik intrapopulasi merupakan data yang penting dalam usaha-usaha konservasi *broodstock* ikan glodok di habitatnya. Salah satu gen yang dapat digunakan untuk mendeteksi variasi genetik intrapopulasi adalah gen mitokondria *16S*. Gen mitokondria *16S* bersifat lestari

(*conserved*), sehingga jika ada perbedaan nukleotida antar sampel didalam populasi dapat diindikasikan adanya variasi genetik intrapopulasi (Cawthorn *et al.*, 2012). Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi variasi genetik intrapopulasi ikan glodok dari Muara Tekolok, Lombok Timur, Nusa Tenggara Timur menggunakan gen mitokondria *16S* sebagai penanda molekuler. Penggunaan gen mitokondria *16S* untuk deteksi variasi genetik pada ikan air tawar pernah dilakukan antara lain pada ikan tembakang (Arisuryanti *et al.*, 2019) dan ikan anggota famili Serranidae (Saad, 2019). Data penelitian yang didapatkan nantinya dapat digunakan untuk penyusunan *16S mitochondrial gene library* dan dapat diimplementasikan untuk pemanfaatan yang berkelanjutan (*sustainable use*).

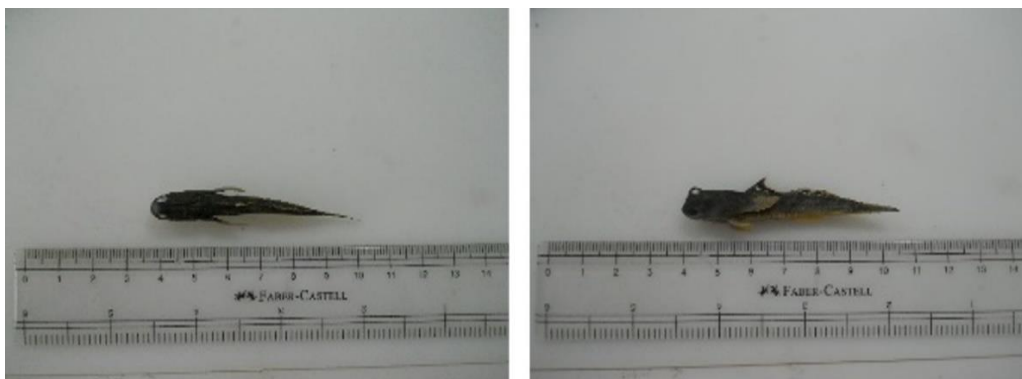
## METODE PENELITIAN

### Pengambilan Sampel

Sepuluh sampel ikan glodok diambil dari Muara Tekolok, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat dengan titik koordinat 8°20'30.0"S 116°42'31.0"E (Gambar 1). Sampel ikan glodok yang diperoleh didokumentasi (Gambar 2) dan selanjutnya dipreservasi dengan etanol absolut 99%. Kesepuluh sampel tersebut diberi kode MST-01, MST-02, MST-03, MST-04, MST-05, MST-06, MST-07, MST-08, MST-09, dan MST-10.



Gambar 1. Lokasi pengambilan ikan glodok di Muara Tekolok. Titik sampling 1 menunjukkan area pengambilan sampel.



Gambar 2. Sampel ikan glodok (*Periophthalmus argentilineatus*) yang disampling dari Muara tekolok. Gambar bagian kiri merupakan sisi drsal dan bagian kanan merupakan sisi ventral.

### Ekstraksi DNA, Amplifikasi, dan sekuensing gen mitokondria 16S

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan 50 mg sampel ikan glodok dengan QIAGEN Blood and Tissue DNA Extraction kit (QIAGEN, USA). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan MyTaq HS Red Mix PCR Kit serta primer 16Sar dan 16Sbr (Palumbi, 1996). Amplifikasi PCR menggunakan 25 µl reaksi yang terdiri dari 12,5 µl PCR mix; 0,6 µM untuk masing-masing primer; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; dan 5,5 µl

ddH<sub>2</sub>O, dan 3 µl sampel DNA template. Hasil amplifikasi PCR kemudian di elektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1%, dan divisualisasikan menggunakan UV Transilluminator dan gambar disimpan menggunakan Geldoc. Hasil amplifikasi (amplicon) kemudian dikirim ke layanan jasa First Base (Malaysia) melalui P.T. Genetika Science (Jakarta) untuk dilakukan purifikasi dan sekuensing secara bi-direction dengan menggunakan primer 16Sar dan 16Sbr. Adapun alat yang

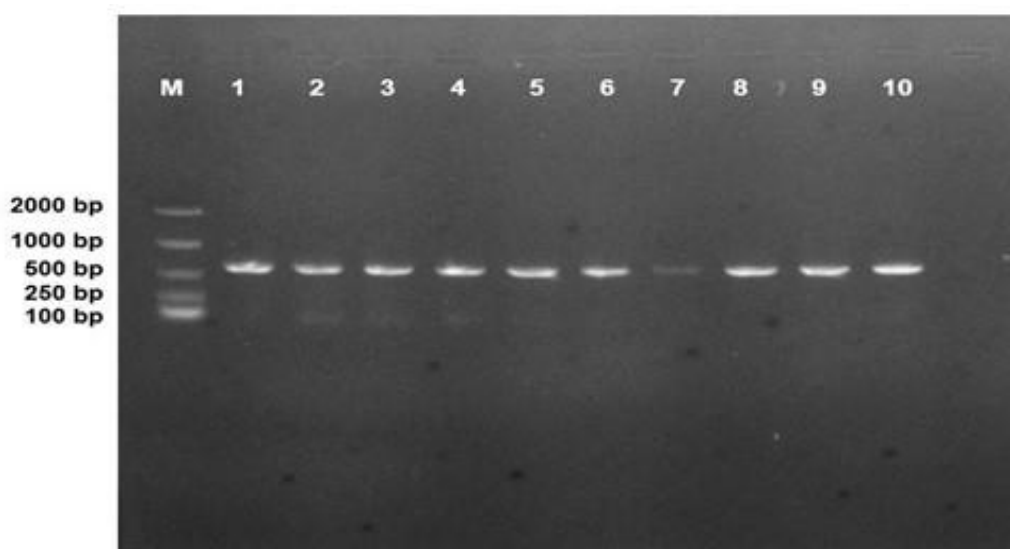
digunakan untuk sekuensing adalah ABI 3730xl (Applied Biosystem).

### Analisis Data

Data sekuen yang didapatkan kemudian diedit menggunakan SeqMan dan EditSeq pada program DNASTAR. Data kemudian dianalisis menggunakan Nucleotide BLAST pada laman NCBI untuk verifikasi spesies. Sekuen kemudian dikonversi ke format FASTA dan disejajarkan menggunakan menu opal pada program MESQUITE v.3.51 (Maddison and Maddison, 2018) dan ClustalW pada program MEGAX (Kumar et al., 2018). Selanjutnya jarak genetik dianalisis menggunakan model Kimura 2 Parameter pada program MEGAX (Kumar et al., 2018). Haplotype Networking ikan glodok dianalisis menggunakan program NETWORK (<https://www.fluxus-engineering.com>) dan variasi genetik sampel ikan glodok dianalisis menggunakan DnaSP v.5.10.01 (Librado and Rozas, 2009).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil amplifikasi gen mitokondria *16S* ikan glodok menghasilkan panjang fragmen 566 bp (Gambar 3). Namun demikian dari 10 sampel yang disekuensing, hanya 9 sampel yang memberikan hasil sekuen yang baik dan satu sekuen menghasilkan *chromatogram* yang tumpang tindih, sehingga tidak dapat disusun hasil urutan nukleotidanya dengan baik. Selanjutnya hasil dari 9 sekuen gen mitokondria *16S* dianalisis menggunakan *nucleotide* BLAST dan seluruh sampel memiliki nilai similaritas 99,82 %–100% dengan *Periophthalmus argentilineatus* yang terdata di *GenBank*. Berdasarkan hal tersebut maka sembilan ikan glodok dari Muara Tekolok tersebut terverifikasi sebagai spesies *Periophthalmus argentilineatus*. Verifikasi spesies tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Rha'ifa *et al.* (2021) bahwa ikan glodok yang ditemukan di Muara Tekolok adalah *Periophthalmus argentilineatus*.



Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR ikan glodok yang diteliti menggunakan gen mitokondria *16S* (Keterangan kode sampel: 1=MST-01, 2=MST-02, 3=MST-03, 4=MST-4, 5=MST-05, 6=MST-06, 7=MST, 8=MST-08, 9=MST-09, 10=MST-10).

Persentase komposisi nukleotida intrapopulasi *P. argentilineatus* disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 tampak bahwa tidak

ada perbedaan persentase timin (T) atau urasil (U) dan sitosin (C) pada sembilan sampel ikan glodok yang diteliti. Pada

penelitian ini terdapat perbedaan komposisi nukleotida adenin (A) dan guanin (G) pada sampel, yaitu sebesar 0,18% untuk adenin dan 0,18% untuk guanin. Sampel MST-02, MST-03, MST-04, MST-05, MST-06, MST-08, dan MST-10 memiliki komposisi adenin tertinggi sebesar 30,04%, sedangkan sampel MST-01 dan MST-07 memiliki komposisi adenin terendah sebesar 29,86%. Sebaliknya, sampel MST-01 dan MST-07 memiliki jumlah komposisi guanin tertinggi yaitu 22,97% sementara sampel MST-02, MST-03, MST-04, MST-05, MST-06, MST-08, dan MST-10 memiliki komposisi guanin sebesar 22,79%. Selisih persentase komponen nukleotida pada sembilan sampel ikan glodok mengindikasikan terdapat variasi genetik pada level intrapopulasi.

Hasil analisis variasi genetik intrapopulasi didapatkan bahwa dari sembilan sekuen gen mitokondria 16S sampel ikan glodok yang diteliti terbagi

menjadi 3 haplotipe dengan 2 situs polimorfik (situs ke 266 dan ke 369) dan keduanya memiliki perbedaan nukleotida transisi (Tabel 2).

Hasil penelitian juga memperlihatkan nilai keragaman haplotipe ( $H_d$ ) yaitu  $0,417 \pm 0,191$  dan nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar  $0,00079 \pm 0,00039$ . Selanjutnya jarak genetik *P. argentilineatus* dari Muara Tekolok, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat adalah antara 0%-0,355% dengan rata-rata 0,079%. Hasil analisis ini mengindikasikan adanya variasi genetik level intrapopulasi. Nilai  $H_d$  dapat menentukan apakah suatu sampel memiliki keragaman yang tinggi atau tidak, yaitu apabila nilai  $H_d \geq 0 < 0,5$  maka keragaman haplotipe rendah, sedangkan  $H_d > 0,5 \leq 1$  mengindikasikan keragaman haplotype yang tinggi (Hobbs *et al.*, 2013). Keragaman haplotipe pada sampel *P. argentilineatus* dari Muara Tekolok tergolong rendah, yaitu sebesar 0,417.

Tabel 1. Persentase (%) komposisi nukleotida intrapopulasi *P. argentilineatus* (MST-01 sampai MST-08 dan MST-10) dari Muara Tekolok, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat dengan panjang fragmen 566 bp

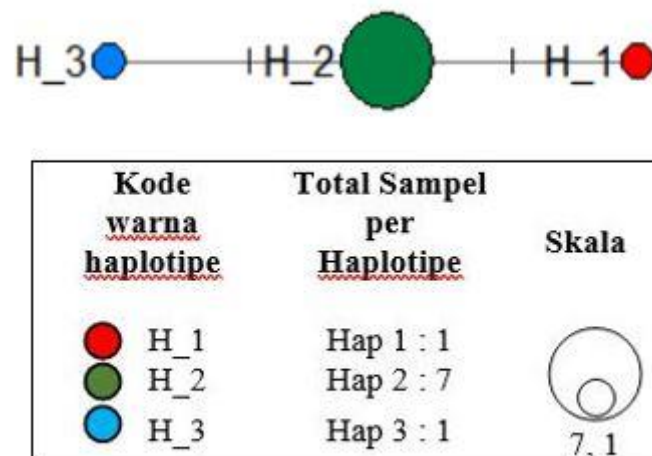
| Sampel yang diteliti | T(U) (%) | C (%) | A (%) | G (%) | A+T (%) | G+C (%) |
|----------------------|----------|-------|-------|-------|---------|---------|
| MST-01               | 23,32    | 23,85 | 29,86 | 22,97 | 53,18   | 46,82   |
| MST-02               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| MST-03               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| MST-04               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| MST-05               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| MST-06               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| MST-07               | 23,32    | 23,85 | 29,86 | 22,97 | 53,18   | 46,82   |
| MST-08               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| MST-10               | 23,32    | 23,85 | 30,04 | 22,79 | 53,36   | 46,64   |
| Rata-Rata            | 23,32    | 23,85 | 30,00 | 22,83 | 53,32   | 46,68   |



Tabel 2. Situs polimorfik sampel ikan glodok (*P. argentilineatus*) dari Muara Tekolok, Lombok, Nusa Tenggara Barat dengan panjang fragmen sampel 566 bp.

| Sampel | Haplotipe | Polymorphic Sites |   |
|--------|-----------|-------------------|---|
|        |           | 2                 | 3 |
|        |           | 6                 | 6 |
|        |           | 6                 | 9 |
| MST-01 | Hap_1     | A                 | G |
| MST-02 | Hap_2     | .                 | A |
| MST-03 | Hap_2     | .                 | A |
| MST-04 | Hap_2     | .                 | A |
| MST-05 | Hap_2     | .                 | A |
| MST-06 | Hap_2     | .                 | A |
| MST-07 | Hap_3     | G                 | A |
| MST-08 | Hap_2     | .                 | A |
| MST-10 | Hap_2     | .                 | A |

Polimorfisme dari sekuens mitokondria 16S yang diteliti didukung dengan hasil *Median Joining Network* yang dikonstruksi menggunakan program NETWORK, dapat dilihat pada Gambar 4. Sampel terbagi menjadi 3 haplotipe, dengan jumlah *mutation points* sebanyak 1 antar haplotipe. *Mutation points* mengindikasikan adanya variasi genetik pada level intrapopulasi dari ikan glodok dari Muara Tekolok.



Gambar 4. Hasil konstruksi *Median Joining Haplotype Network* sampel *P. argentilineatus* dari Muara Tekolok.

Sekuen gen mitokondria 16S yang didapatkan pada penelitian ini dapat digunakan untuk mendeteksi adanya polimorfisme yang mengindikasikan adanya variasi genetik *P. argentilineatus* dalam level intrapopulasi dari Muara Tekolok. Data sekuen yang diperoleh selanjutnya dapat digunakan untuk penyusunan 16S *mitochondrial gene library* dan untuk referensi penelitian selanjutnya.

## SIMPULAN

Gen mitokondria 16S dapat digunakan untuk mendeteksi adanya polimorfisme dalam populasi *P. argentilineatus* di Muara Tekolok. Hasil analisis intrapopulasi menunjukkan dari 9 sampel yang diteliti terbagi menjadi 3 haplotipe dengan 2 situs polimorfik. Nilai keragaman haplotipe yaitu  $0,417 \pm 0,191$  dan nilai keragaman

nukleotida adalah  $0,00079 \pm 0,00039$ . Perbedaan pada sekuen gen mitokondria 16S antar sampel ikan glodok (*P. argentilineatus*) yang diteliti dapat mengindikasikan adanya variasi genetik pada level intrapopulasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Kepala Laboratorium Genetika & Pemuliaan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada atas fasilitas yang disediakan untuk penelitian ini dan Febrina Rha'ifa yang telah membantu pengambilan sampel di Mura Tekolok, Lombok Timur, NTB.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arief, A. 2003. *Hutan Mangrove*. Yogyakarta : Kanisius. Halaman 22.
- Arisuryanti, T., Hasan, R.L., and Koentjana, J.P. 2018. Genetic Identification of Two Mudskipper Species (Pisces: Gobiidae) from Bogowonto Lagoon (Yogyakarta, Indonesia) using *COI* Mitochondrial Gene as a DNA Barcoding Marker. *AIP Conference Proceedings*. 2002 (1) : 020068.
- Arisuryanti, T., G.A. Pratama, L. Hakim, J.P. Koentjana, F.K. Nazira. 2019. Genetic characterization of kissing gourami (*Helostoma temminckii* Cuvier, 1829) in Ogan River, South Sumatra inferred from 16S rRNA and COI mitochondrial genes. *Indonesian Fisheries Research Journal* 25(1): 37-44.
- Cawthorn, D.M., H.A. Steinman and R.C. Witthuhn. 2012. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa. *Gene* 491 (1): 40-48
- Dahrudin, H., Hutama, A., Busson, F., Sauri, S., Hanner, R., Keith, P., Hadiaty, R., and Hubert, N. 2016. Revisiting the ichthyodiversity of Java and Bali through DNA barcodes: taxonomic coverage, identification accuracy, cryptic diversity and identification of exotic species. *Molecular Ecology Resources* 17(2) : 288 – 299.
- Fakhri, F., Narayani, I., dan Mahardika, I.G.N.K. 2015. Keragaman Genetik Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*) dari Kabupaten Jembrana dan Karangasem, Bali. *Jurnal Biologi* 19 (1) : 11 – 14.
- Hobbs, J.P.A., Van Herwerden, L., Jerry, D.R., Jones, G.P. Munday, P.L. 2013. High genetic diversity in geographically remote populations of endemic and widespread coral reef angelfishes (genus: Centropyge). *Diversity*, 5(1): 39-50
- Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 : 111 – 120.
- Kumar, S., Stetcher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35 (6) : 1547-1549.
- Librado, P., and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Maddison, W.P., and Maddison, D.R. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51. Accessed at <http://www.mesquiteproject.org>.

- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In Hillis, D.M., Moritz, C., and Mable, B.K. *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates. Page 205-247.
- Polgar, G., Zane, L., Babbucci, M., Barbisan, F., Patarnello, T., Ruber, L., and Papetti, C. 2014. Phylogeography and demographic history of two widespread Indo-Pacific mudskippers (Gobiidae : *Periophthalmus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73 (2014) : 161 – 176.
- Purwaningsih, S., Salamah, E., dan Dewantoro, R. 2014. Komposisi kimia dan asam lemak ikan glodok akibat pengolahan suhu tinggi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 17 (2) : 166 – 174.
- Rha'ifa, F.A., Audrea, D.J., Hakim, L., Arisuryanti, A. 2021. DNA barcode of barred mudskipper (*Periophthalmus argentilineatus* Valenciennes, 1837) from Tekolok Estuary (West Nusa Tenggara, Indonesia) and their phylogenetic relationship with other Indonesian barred mudskippers. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 6(2), jtbb59702.
- Saad, Y.M. 2019. Analysis of 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence variations and phylogenetic relations among some Serranidae fishes. *South African Journal of Animal Science* 49(1): 80-89.