

## OPTIMASI AMPLIFIKASI DNA MENGGUNAKAN METODE PCR (*Polymerase Chain Reaction*) PADA IKAN KARANG ANGGOTA FAMILI *Pseudochromidae* (DOTTYBACK) UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES SECARA MOLEKULAR

Ni PUTU DIAN PERTIWI<sup>1,2\*</sup>, I G.N.K MAHARDIKA<sup>2,3</sup>, NI LUH WATINIASIH<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Biologi Universitas Udayana, Denpasar, Bali

<sup>2</sup>Indonesian Biodiversity Research Center, Denpasar, Bali

<sup>3</sup>Lab. Biomedik dan Biologi Molekular, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar, Bali

<sup>4</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran Bali

\*Email korespondensi: putudianpertiwi@ibrebali.org

### INTISARI

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode yang digunakan dalam identifikasi suatu organisme. Identifikasi secara molekular menggunakan metode berbasis PCR perlu dilakukan pada ikan karang Famili *Pseudochromidae* karena ikan ini mempunyai variasi morfologi warna yang sangat tinggi dan menyulitkan identifikasi morfologi. Metode amplifikasi DNA untuk seluruh spesies ikan anggota famili ini belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimal untuk amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada 25 spesies ikan karang anggota famili *Pseudochromidae*, yang sebelumnya telah diidentifikasi secara morfologi.

Amplifikasi dilakukan pada tiga loki DNA mitokondria, yaitu 16S rRNA, *control region* dan *cytochrome oxidase I* (COI). Hasil penelitian menunjukkan kondisi optimum amplifikasi tidak berhubungan dengan perbedaan spesies. Modifikasi amplifikasi dapat dilakukan dengan penambahan volume *template* DNA dan BSA 1X serta penggantian temperatur *annealing*; sedangkan pergantian reagen tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Penggunaan primer depan CRK untuk amplifikasi lokus *control region* juga memberikan hasil yang lebih baik.

*Kata kunci: amplifikasi DNA, metode PCR, Pseudochromidae*

### ABSTRACT

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) is one of the methods used in identification of organism. Molecular identification based on PCR methods needs to be conducted for *Pseudochromidae* fishes due to its highly color morph. DNA amplification for all of the species of *Pseudochromidae* has only been studied in small numbers. This research aim to study the optimal conditions for DNA amplification of mitochondrial loci (mtDNA) of 25 species of *Pseudochromidae* using PCR methods, which has been previously identified using morphological characters.

Amplification was done on three mtDNA loci (16S rRNA, *control region* and *cytochrome oxidase I* (COI)). Result showed optimization has no correlation with species. Modification can be done with the additions of more volume of DNA template and BSA 1X, and also the alteration in annealing temperature. However, the modification on reagent used did not give significant effect. Primer modification using CRK rather than CRA, give better result on amplifying control region.

*Keywords: DNA amplification, PCR methods, Pseudochromidae*

### PENDAHULUAN

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk memperbanyak DNA suatu organisme. Metode berbasis PCR seringkali digunakan di dalam identifikasi organisme, baik melalui DNA *fingerprinting* maupun melalui DNA *barcoding*. Metode identifikasi genetik menggunakan metode PCR telah banyak berkembang, serta telah dilakukan pada berbagai organisme laut, antara lain berbagai karang keras (Shearer & Coffroth, 2008), ikan-ikan karang (Thacker, 2003), serta berbagai invertebrata laut (Malay

& Paulay, 2010; Plaisance *et al.*, 2009).

Identifikasi genetik biasanya dilakukan dengan menggunakan salah satu lokus mitokondria, yaitu lokus *cytochrome oxidase I* (COI), yang juga dikenal dengan istilah DNA *barcoding*. Namun, pada beberapa organisme, lokus COI tidak dapat digunakan untuk identifikasi pada tingkat spesies; bahkan kesulitan dalam mengamplifikasi lokus tersebut sangat tinggi pada organisme tertentu, contohnya pada berbagai jenis karang keras (Shearer & Coffroth, 2008). Sulitnya amplifikasi lokus COI pada beberapa organisme, menyebabkan digunakannya lokus lain baik pada DNA inti maupun DNA mitokondria untuk

identifikasi spesies secara genetik.

Ikan karang merupakan salah satu organisme yang mempunyai keanekaragaman serta kelimpahan yang tinggi di kawasan perairan tropis, terutama di kawasan *Coral Triangle* (segitiga terumbu karang) (Allen, 2008; Roberts *et. al.*, 2002). Selain itu, ikan karang juga diketahui mempunyai variasi warna yang sangat tinggi. Salah satu ikan karang dengan variasi morfologi warna yang sangat tinggi dan banyak ditemukan di kawasan perairan *Coral Triangle* adalah ikan karang anggota Famili *Pseudochromidae*, yang dikenal juga dengan nama *Dottyback*. Ikan anggota famili ini mempunyai warna yang bervariasi antar spesies yang berbeda (variasi interspesifik) serta antar individu dalam spesies yang sama (variasi intraspesifik), bahkan bervariasi antara jantan dan betina dalam satu spesies yang sama (Allen & Erdmann, 2012).

Tingginya variasi warna pada anggota famili ikan ini menyebabkan sulitnya identifikasi spesies secara morfologi, oleh karena itu diperlukan adanya identifikasi secara molekular untuk mendukung identifikasi spesies tersebut. Walaupun data molekular diharapkan dapat membantu dalam proses identifikasi, namun penelitian genetik belum pernah dilakukan pada seluruh spesies anggota famili *Pseudochromidae*. Penelitian genetik pada beberapa spesies anggota famili *Pseudochromidae* dilakukan menggunakan lokus 16S rRNA dan *control region* pada *Pseudochromis litus*, *P. rutilus*, *P. ransonneti*, *P. andamanensis*, *Pictichromis diadema*, *Pictichromis porphyreus*, serta *Pictichromis pacagnellae* (Twindiko *et al.*, 2013); dan menggunakan lokus *control region* (*d-loop*) pada *Pseudochromis fuscus* (Messmer *et al.*, 2005). Pada penelitian tersebut terlihat adanya variasi urutan nukleotida (sekuen) yang tinggi. Tingginya variasi nukleotida ini akan berpengaruh terhadap proses amplifikasi DNA, terutama pada lokus dan spesies yang berbeda.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimal untuk amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada 25 spesies ikan karang anggota Famili *Pseudochromidae*, yang sebelumnya telah diidentifikasi secara morfologi. Optimasi dalam amplifikasi ini akan dilakukan pada tiga lokus mitokondria, yaitu 16S rRNA, *control region*, dan COI.

## MATERI DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Sampel dalam penelitian ini dikoleksi dari wilayah *Coral Triangle*, yaitu di wilayah perairan Indonesia dan Filipina pada periode tahun 2008 – 2011. Total sampel yang dikoleksi sebanyak 100 individu. Sampel dikoleksi dengan menggunakan minyak cengkeh, *spear-gun* dan peralatan SCUBA. Sampel yang diperoleh difoto terlebih dahulu kemudian diambil bagian sirip untuk digunakan dalam analisis genetik. Sampel ikan utuh juga

dikoleksi untuk digunakan dalam identifikasi morfologi. Identifikasi morfologi dilakukan dengan menggunakan buku identifikasi ikan *Reef Fishes of the East Indies* (Allen & Erdmann, 2012).

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan larutan *chelex* 10% (Walsh *et al.*, 1991). Jaringan sampel diambil sebanyak  $\pm 2$  mm dengan menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam *tube* yang berisi larutan *chelex*. Sebelum dan sesudah digunakan untuk mengambil jaringan, pinset dicelupkan ke dalam ethanol 95% dan dibakar dengan api bunsen. Larutan *chelex* yang sudah diisi jaringan, divortex dan disentrifuge selama  $\pm 20$  detik, kemudian dipanaskan dalam *heating block* dengan temperatur 95°C selama  $\pm 45$  menit. Setelah dipanaskan, *tube* kembali divortex dan disentrifuge selama  $\pm 20$  detik.

### Amplifikasi DNA dengan metode PCR

DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi pada lokus 16S rRNA, *control region*, dan *cytochrome oxidase I* (COI). Primer yang digunakan dalam penelitian ini seperti pada Tabel 1. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode *Hotstart* standar dengan parameter sebagai berikut : denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 50°C selama 30 detik, dan *extension* 72°C selama 30 detik, diulang dalam 38 siklus PCR (Barber *et al.*, 2006).

Modifikasi terhadap temperatur *annealing*, volume *template* DNA, dan penambahan BSA 1X (*bovine serum albumin*) dilakukan pada beberapa sampel yang tidak teramplifikasi menggunakan prosedur standar. Modifikasi terhadap reagen yang digunakan juga dilakukan, yaitu dengan penggantian reagen dari AmpliTaq® DNA Polymerase menjadi AmpliTaq Gold® DNA Polymerase.

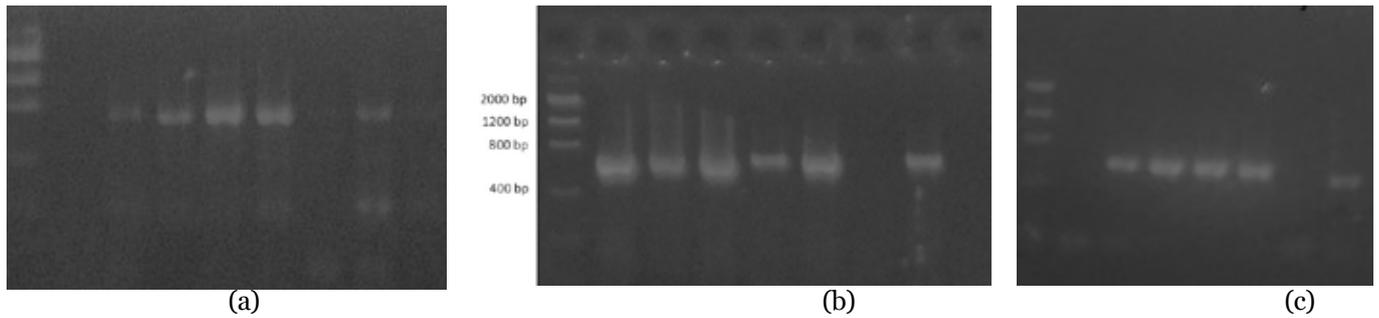
Tabel 1. Primer untuk amplifikasi masing – masing lokus; dengan panjang amplikon yang dihasilkan sekitar 500 bp – 650 bp

16S	16S Ar	5'-cgc ctg ttt atc aaa aac at-3'
	16S Br	5'-ccg gtc tga act cag atc acg t-3'
Control Region	CRK	5'-agc tca gcg cca gag cgc cgg tct tgt aaa-3'
	CRA	5'-tte cac ctc taa ctc cca aag cta g-3'
	CRE	5'-cct gaa gta gga acc aga tg-3'
Cytochrome Oxidase I (COI)	Fish BCL	5'-tca acy aat cay aaa gat aty ggc ac-3'
	Fish BCH	5'-taa act tca ggg tga cca aaa aat ca-3'

(Lee *et al.*, 1995; Matt Craig, komunikasi pribadi, 2010; Westneat & Alfaro, 2005)

### Visualisasi DNA

DNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer SB (sodium asam borat) dengan pewarna etidium bromida (0.5 µg/ml). Elektroforesis dilakukan pada 100 V selama 30 menit dan DNA diamati dengan UV transilluminator. Ukuran DNA hasil PCR dibandingkan dengan penanda (*ladder*) untuk mengetahui panjang DNA sampel. *Ladder* yang digunakan adalah *low mass ladder*, dengan panjang berkisar antara 100 – 2000 bp.



Gambar 1. Produk hasil amplifikasi dengan metode *Hotstart* standar. (a) lokus 16S. (b) lokus *control region*. (c) lokus COI.

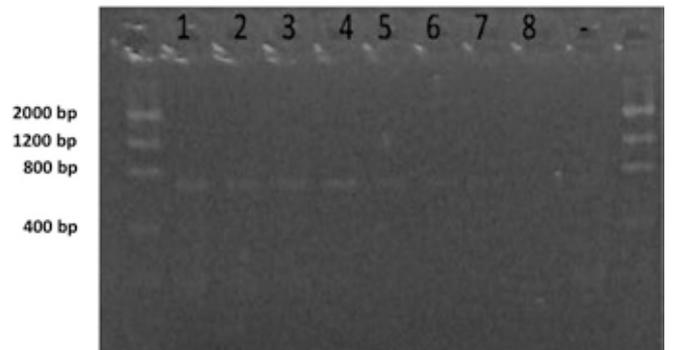
**HASIL**

Dari total 100 sampel yang dikoleksi, lokus 16S rRNA berhasil diamplifikasi dari 99 individu, lokus *control region* dari 49 individu, dan lokus *cytochrome oxidase I* (COI) berhasil diamplifikasi hanya dari 14 individu. Lokus 16S rRNA berhasil diamplifikasi dari hampir 80% jumlah sampel dengan menggunakan prosedur *Hotstart* standar; sedangkan pada amplifikasi lokus COI dan *control region*, modifikasi harus dilakukan untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang baik. Produk hasil PCR tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.

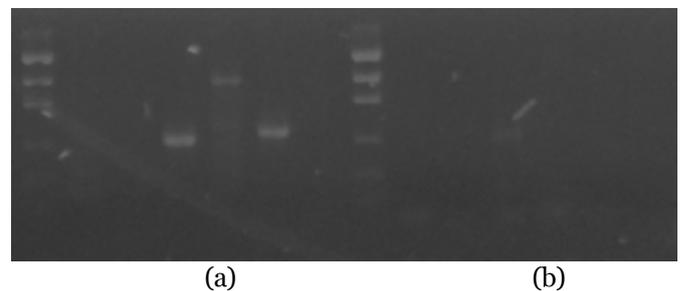
Modifikasi awal dilakukan dengan menggunakan metode *gradient* temperatur; sehingga akan terlihat temperatur *annealing* yang menunjukkan hasil amplifikasi yang positif (Gambar 2). Hasil amplifikasi akan terlihat sebagai pita DNA. Hasil ini kemudian dijadikan sebagai patokan *annealing* baru untuk amplifikasi. Dari keseluruhan *gradient* temperatur yang dilakukan, temperatur yang menunjukkan hasil positif adalah pada temperatur 47.5°C; 49 °C; 49.5°C; 50°C (lokus 16S); 49°C, 50°C, 51.6°C, 52°C (lokus *control region*); dan 50°C, 50.5°C (lokus COI).

Modifikasi juga dilakukan dengan menambahkan volume *template* DNA (sampel) dari 1 µl menjadi 2 µl – 4 µl serta dengan penambahan BSA 1X sebanyak 1 µl. Pada beberapa sampel, dilakukan perubahan terhadap reagen yang digunakan, yaitu dari AmpliTaq® DNA Polymerase menjadi AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Penambahan volume *template* DNA dan BSA 1X menunjukkan hasil amplifikasi yang lebih baik; sedangkan perubahan reagen menjadi AmpliTaq Gold® DNA Polymerase tidak menunjukkan hasil yang signifikan (Gambar 3).

Amplifikasi lokus *control region* dilakukan menggunakan dua primer depan (*forward*) dan hasil menunjukkan amplifikasi yang lebih baik dengan menggunakan primer CRK/CRE dibandingkan primer CRA/CRE. Dilihat dari hasil perbandingan produk PCR pada sampel dengan *low mass ladder* yang digunakan, terlihat bahwa panjang produk PCR yang dihasilkan dari ketiga lokus adalah berada pada kisaran 400 bp – 800 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil modifikasi menggunakan *gradient* temperatur. (1) 46.7°C (2) 48°C (3) 49.3°C (4) 50.6°C (5) 52°C (6) 53.3°C (7) 54.5°C (8) 55.2°C (8) kontrol negatif.



Gambar 3. Hasil modifikasi menggunakan reagen AmpliTaq® DNA Polymerase (a) menjadi AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (b) pada sampel yang sama.

**PEMBAHASAN**

Hasil visualisasi produk PCR setelah elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA pada sampel yang berhasil diamplifikasi dari ketiga lokus, namun tidak semua sampel tersebut menunjukkan ketebalan pita DNA yang sama. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan konsentrasi DNA hasil ekstraksi di dalam *template* yang digunakan untuk PCR serta perbedaan konsentrasi DNA yang berhasil diamplifikasi (diperbanyak) (Sambrook & Russell, 2001). Oleh karena itu, salah satu modifikasi untuk meningkatkan konsentrasi DNA *template* dan keberhasilan amplifikasi DNA adalah dengan meningkatkan volume *template* DNA menjadi 2 µl – 4 µl.

Hasil amplifikasi dari keseluruhan sampel menunjukkan bahwa lokus yang paling mudah untuk diamplifikasi adalah lokus 16S rRNA. Hal ini sesuai

dengan karakter dari lokus tersebut yang merupakan salah satu lokus yang bersifat *conserved* (tidak banyak mengalami perubahan nukleotida/mutasi). Rendahnya laju mutasi pada lokus ini menyebabkan rendahnya variasi pada situs penempelan primer (Case *et al.*, 2007). Sementara itu, hasil amplifikasi lokus *control region* menunjukkan keberhasilan amplifikasi sebesar 50% dari seluruh sampel, yang dapat disebabkan karena tingginya variasi pada situs penempelan primer dari lokus tersebut (McMillan & Palumbi, 1997). Namun, tingginya variasi dalam lokus tersebut diatasi dengan penggunaan primer depan yang berbeda, yaitu CRK dan CRA. Pada hasil amplifikasi lokus COI, rendahnya tingkat keberhasilan amplifikasi dapat disebabkan karena urutan sekuen pada primer bukan merupakan komplemen dari situs penempelan primer (Bucklin *et al.*, 2011).

Modifikasi pada temperatur *annealing* merupakan salah satu cara yang umum dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan dalam amplifikasi. Temperatur ini berpengaruh terhadap proses penempelan primer pada *template* DNA. Apabila temperatur *annealing* terlalu tinggi, primer tidak dapat menempel dengan baik pada *template*; sedangkan bila temperatur *annealing* rendah, maka primer akan menempel pada situs penempelan yang tidak spesifik yang kemudian akan menyebabkan teramplifikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan. *Gradient* PCR merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui optimasi temperatur *annealing* pada DNA (Sambrook & Russell, 2001). Pada penelitian ini, temperatur *gradient* yang menunjukkan hasil positif digunakan sebagai patokan *annealing* baru untuk sampel yang belum teramplifikasi, dan temperatur tersebut berbeda untuk masing – masing lokus untuk sampel tertentu, namun tidak dipengaruhi oleh spesies dari sampel tersebut.

Salah satu modifikasi lain yang digunakan adalah dengan penambahan BSA 1X. Reagen ini berfungsi untuk menghambat inhibitor seperti fenol, lipin, dan protein yang masih ada di dalam produk ekstraksi, sehingga akan meningkatkan keberhasilan dalam proses amplifikasi DNA (Kreder, 1996). Beberapa optimasi dalam amplifikasi PCR dilakukan dengan mengganti reagen yang digunakan, serta melakukan perubahan pada metode PCR yang digunakan, antara lain menggunakan *nested* PCR atau *touchdown* PCR (Sambrook & Russell, 2001). Modifikasi dalam perubahan reagen serta metode PCR tidak memberikan dampak yang signifikan dalam penelitian ini, yaitu dilihat dari tidak adanya hasil amplifikasi pada penggantian reagen yang digunakan dari AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase menjadi AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase.

Produk PCR menunjukkan panjang basa yang berkisar diantara 400 bp – 800 bp dan merupakan kisaran panjang basa yang sesuai untuk ketiga lokus tersebut. Pada hasil penelitian ini, tidak terlihat adanya pola tertentu dalam optimalisasi amplifikasi PCR masing-masing lokus pada tiap spesies. Optimalisasi tidak

bergantung pada persamaan maupun perbedaan spesies dari masing-masing sampel.

## SIMPULAN

Pada amplifikasi lokus 16S rRNA, *control region* dan COI pada ikan karang anggota Famili *Pseudochromidae*, masing-masing sampel mempunyai optimalisasi amplifikasi yang berbeda dan tidak tergantung dari spesies sampel tersebut. Modifikasi amplifikasi lokus 16S rRNA, *control region* dan COI dapat dilakukan dengan penambahan volume *template* DNA dan BSA 1X serta penggantian temperatur *annealing*; sedangkan pergantian reagen tidak memberikan pengaruh yang signifikan.

Temperatur *annealing* yang dapat digunakan untuk amplifikasi, antara lain: 47.5°C; 49 °C; 49.5°C; 50°C (lokus 16S); 49°C, 50°C, 51.6°C, 52°C (lokus *control region*); dan 50°C, 50.5°C (lokus COI). Penggunaan primer depan CRK untuk amplifikasi lokus *control region* memberikan hasil yang lebih baik.

## SARAN

Hasil optimasi untuk amplifikasi ketiga lokus mitokondria yang diperoleh dalam penelitian ini dapat berbeda apabila lokus dan spesies yang diteliti berbeda. Oleh karena itu, optimasi PCR dengan metode *Hotstart* yang digunakan dalam penelitian ini dapat dijadikan standar dan dapat dimodifikasi sesuai dengan perbedaan lokus dan spesies.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Dr. Mark Erdmann dan Dr. Gerald Allen atas bantuannya dalam pengambilan sampel dan identifikasi secara morfologi, serta kepada Dr. Paul Barber, Dita Cahyani dan Aji Wahyu Anggoro atas kesempatan yang diberikan sehingga penulis dapat melakukan penelitian di Laboratorium *Indonesian Biodiversity Research Center*.

## KEPUSTAKAAN

- Allen, G.R. 2008. Conservation Hotspot of Biodiversity and Endemism for Indo-Pacific Coral Reef Fishes. *Aquatic Conserv: Mar.Freshw.Ecosyst.* 18: 541-556.
- Allen, G. R. & M.V. Erdmann. 2012. *Reef Fishes of the East Indies*. Vol. I-III. Tropical Reef Research. Perth, Australia.
- Barber, P.H., M.V. Erdmann & S.R. Palumbi. 2006. Comparative Phylogeography of Three Codistributed Stomatopods: Origins and Timing of Regional Lineage Diversification in the Coral Triangle. *Evolution.* 60(9): 1825-1839.
- Bucklin, A., D. Steinke, & L. Blanko-Bercial. 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annu. Rev.Mar.Sci.* 3:471-508.
- Case, R.J., Y. Boucher, I. Dahlhoff, C. Holmstrom, W.F. Doolittle & S. Kjelleberg. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. 2007. *Applied and Environmental Microbiology.* 73 : 278-288.
- Kreder, C.A. 1996. Relief of Amplification Inhibitor in PCR with

- Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Applied and Environment Microbiology*. 62: 1102-1106.
- Lee, W., J. Conroy, W.H. Howell & T.D. Kocher. 1995. Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *J.Mol Evol.* 41: 54-66.
- Malay, M.D & G. Paulay. 2009. Peripatric Speciation Derives Diversification and Distributional Pattern of Reef Hermit Crabs (Decapoda: Diogenidae: *Calcinus*). *Evolution*. 1-29.
- McMillan, W.O., & S.R. Palumbi. 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). *Journal of Molecular Evolution*. 45:473-484.
- Messmer, V., L. van Herwerden, P.L. Munday & G.P. Jones. 2005. Phylogeography of colour polymorphism in the coral reef fish *Pseudochromis fuscus*, from Papua New Guinea and the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*. 24:392-402.
- Plaisance, L., N. Knowlton, G. Paulay & C. Meyer. 2009. Reef-associated crustacean fauna: biodiversity estimates using semi-quantitative sampling and DNA barcoding. *Coral Reefs*. 28 (4): 977-986.
- Roberts, C.M., C.J. McClean, J.E.N. Veron, J.P. Hawkins, G.R. Allen, D.E. McAllister, C.G. Mittermeier, F.W. Schueler, M. Spalding, F. Wells, C. Vynne, & T.B. Werner. 2002. Marine Biodiversity Hotspots and Conservation Priorities for Tropical Reefs. *Sciences*. 295: 1280-1284.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Shearer, T.L. & M.A. Coffroth. 2008. Barcoding Corals: Limited by Interspecific Divergence, not Intraspecific Variation. *Molecular Ecology Resources*. 8:247-255.
- Thacker, C.E. Molecular Phylogeny of the Gobioid Fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidei). 2003. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26 : 354-368.
- Twindiko, A.F.S., D.P. Wijayanti & Ambariyanto. 2013. Studi Filogenetik Ikan Karang Genus *Pseudochromis* dan *Pictichromis* di Perairan Indo-Pasifik. *Buletin Oseanografi Marina*. 2: 29-37.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.
- Westneat, M.W. & M.E. Alfaro. 2005. Phylogenetic Relationship and Evolutionary History of the Reef Fish Family Labridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36 : 370-390.