

## Identifikasi *Clinostomum complanatum* Secara Molekuler pada Ikan Air Tawar di Yogyakarta dan Riau

(IDENTIFICATION OF *Clinostomum Complanatum* FROM FRESHWATER FISH IN YOGYAKARTA AND RIAU BASED ON MOLECULAR STUDY)

Morina Riauwaty<sup>1</sup>, Kurniasih<sup>2</sup>, Joko Prastowo<sup>3</sup>, Windarti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, <sup>4</sup>Laboratorium Terpadu, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau Pekanbaru Kampus Bina Widya km 12,5 Simpang Baru Pekanbaru 28293, Telp. (0761 63275), Email: *morinariauwaty@yahoo.co.id*

<sup>2</sup>Bagian Patologi, <sup>3</sup>Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) pada ikan air tawar di Yogyakarta dan Riau secara molekuler pada *internal transcribed spacer region* (ITS1). Ikan betok (*Anabas testudineus*) yang terinfeksi *Clinostomum* sp. diperoleh dari Kali Progo, Yogyakarta dan ikan sepat (*Trichogaster trichopterus*) dari Sungai Sail, Riau. Metaserkaria *Clinostomum* sp. pada insang dan organ *visceral*, diambil dengan menggunakan jarum, diawetkan dalam ethanol absolut. Pemeriksaan molekuler dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang terdiri atas ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis dan sekuensing DNA. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis dengan metode *maximum parsimony* dan *neighbour-joining*. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta identik dengan *Clinostomum complanatum* dan *Clinostomum* sp. asal Riau diduga spesies baru (perbedaan > 2%) yang satu klaster dengan *Clinostomum phalacrocoracis*.

Kata kunci: *Clinostomum complanatum*, Filogenetik, Yogyakarta, Riau.

### ABSTRACT

The aim of study was, to identify *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) infecting freshwater fish in Yogyakarta and Riau on the bases of their molecular profiles in the internal transcribed spacer region (ITS1). Samples of climbing gouramy (*Anabas testudineus*) infected by *Clinostomum* sp. were obtained from Kali Progo River, Yogyakarta. Whereas the climbing perch (*Trichogaster trichopterus*) were obtained from the Sail River, Riau. Metacercariae of *Clinostomum* sp. found in the gills and visceral organs were aseptically removed using needle, preserved in absolute ethanol. Molecular examination was performed by Polymerase Chain Reaction method consisted of extraction, amplification, electrophoresis and sequencing of DNA sample. The DNA sequences of the samples were analysed by maximum parsimony and neighbour-joining method. Phylogenetic analysis showed that *Clinostomum* sp. from Yogyakarta was genetically identical to *Clinostomum complanatum*, whereas *Clinostomum* sp. from Riau was genetically suspected as a new species (difference > 2%) which is included in one cluster to *Clinostomum phalacrocoracis*.

Keywords: *Clinostomum complanatum*, Phylogenetic, Yogyakarta, Riau.

### PENDAHULUAN

Trematoda *Digenea* dari genus *Clinostomum* adalah parasit pada tenggorokan dan esofagus burung piscivorous seperti *pelican*, *cormoran* dan *heron*. *Clinostomum* sp. merupakan parasit zoonotik yang dapat menular pada manusia (Kifune *et al.*, 2000).

Parasit tersebut juga dapat menginfeksi farings dan menyebabkan penyakit 'laryngo-pharyngitis' serta dapat menyebabkan kematian karena terjadi *asphyxia* pada manusia (Shirai *et al.*, 1998, Vianna *et al.*, 2005). Salah satu spesies yang berpotensi besar menyebabkan penyakit pada ikan budidaya adalah *Clinostomum complanatum*.

*Clinostomum complanatum* telah ditemukan oleh Rudolphi pertama sekali pada tahun 1814 dan merupakan trematoda yang paling parasitik yang banyak menyerang ikan air tawar baik di Eropa, Amerika Utara, dan Asia (Kitagawa *et al.*, 2003). Infeksi parasit tersebut dikenal dengan istilah *yellow grub* yang ditandai adanya tonjolan berwarna kekuningan yang berukuran kira-kira 2-3 mm dan ditemukan di tubuh ikan, insang, dan organ *visceral* dan dapat menyebabkan kematian serta kegagalan usaha budidaya (Handajani dan Samsundari, 2005). Gejala klinis ikan terserang parasit tersebut berupa perubahan tingkah laku, iritasi pada kulit, sekresi mukus berlebihan dan pada infeksi berat dapat menyebabkan kematian ikan budidaya (Mwita dan Nkwengulila, 2008).

Aohagi *et al.*, (1992) melaporkan spesies ikan air tawar yang ditemukan di Korea sebagai inang antara *hospes intermediar* kedua *Clinostomum* sp. adalah *Acheilognathus koreensis*, *Rhodeus uyekii* dan *Squalidus gracilis majimae*, pada *Carassius carassius* (Chung *et al.*, 1995), *Cyprinus carpio* (Aohagi *et al.*, 1993), *Oreochromis niloticus*, *Cobitis anguillicaudatus* (Dias *et al.* 2006). Ikan air tawar dilaporkan sebagai inang antara kedua di Eropa dan Asia adalah ikan lele (*Clarias batrachus*), nila (*Oreochromis niloticus*) dan mas (*Cyprinus carpio*) (Dias *et al.*, 2003).

Di Indonesia, metaserkaria *Clinostomum* sp. dijumpai pada ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) dan gurami (*Osphronemus gouramy*) (Kabata, 1985). Infeksi *Clinostomum* sp. pernah dilaporkan menyerang benih ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) yang berukuran panjang 2-3 cm yang dipelihara di sawah di wilayah Purwokerto, Jawa Tengah. Ikan gurami yang terserang *Clinostomum* sp. mengalami hambatan pertumbuhan dan menyebabkan kematian ikan (Handajani dan Samsundari, 2005). Sista yang ditemukan pada benih ikan gurami yang berukuran panjang 3-4 cm adalah 50 sista/ikan. Hasil survei tentang infeksi *Clinostomum* sp. pada ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*) di Jawa dilaporkan sebesar 4% dan intensitas infeksi berkisar 1-9 ind/ikan (Kabata, 1985). Selama ini, informasi tentang identifikasi *Clinostomum* sp. pada ikan air tawar di Indonesia secara molekuler belum pernah di laporkan.

Identifikasi spesifik dari *Clinostomum complanatum* berdasarkan perbandingan karakter morfologi seperti *oral-ventral sucker*, *ceca*, uterus, testis dan lubang ekskretori di Korea telah dilaporkan oleh Matthews dan Cribb (1998) dan Dias *et al.* (2003). Identifikasi morfologi dengan metode konvensional masih sulit dilakukan untuk membedakan spesies *Clinostomum* dan belum mendapatkan hasil yang akurat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui *Clinostomum* sp. yang menginfeksi ikan air tawar di Yogyakarta dan Riau berdasarkan molekuler pada *internal transcribed spacer region* (ITS1). Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi dasar tentang adanya variasi *strain Clinostomum* sp. pada ikan air tawar di Indonesia.

## METODE PENELITIAN

### Pengambilan sampel

Ikan betok (*Anabas testudineus*) yang terinfeksi *Clinostomum* sp. diperoleh dari Kali Progo, Yogyakarta dan ikan sepat (*Trichogaster trichopterus*) dari sungai Sail, Riau. Jumlah total ikan yang diamati sebanyak lima ekor. Metaserkaria *Clinostomum* sp. pada ikan betok dan ikan sepat ditemukan di daerah insang dan organ *visceral*. Metaserkaria *Clinostomum* sp. dikeluarkan dengan menggunakan dua jarum tajam. Selanjutnya diletakkan dalam larutan fisiologis (6,5%), difiksasi dalam etanol absolut dan dilakukan pemeriksaan secara molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Dzikowski *et al.*, 2004).

### Pemeriksaan Molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

**Ekstraksi rDNA.** Ekstraksi DNA dilakukan terhadap lima metaserkaria *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta dan Riau, dengan menggunakan DNA Kit (Qiagen) sesuai prosedur Sambrook dan Russel (2001). Metaserkaria *Clinostomum* sp. yang telah diawetkan dalam etanol absolut dimasukkan ke dalam tabung *ependorf*, ditambahkan ATL sebanyak 90 µl, digerus dengan menggunakan *pestle* hingga hancur. Hasil gerusan

ditambahkan Proteinase K sebanyak 15 µl, diaduk sampai merata dan diinkubasi selama 1,5 jam pada suhu 56°C, divortex selama 15 detik, ditambahkan *buffer* A1 sebanyak 100 µl dan ditambahkan etanol absolut sebanyak 100 µl. Supernatan dipindahkan ke *spin column tube*, disentrifugasi selama 1 menit pada 8.000 rpm. Supernatan dibuang, dipindahkan ke *spin column tube* baru dan ditambahkan *buffer* AW1 sebanyak 250 µl, disentrifugasi selama 1 menit pada 8.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Pellet dipindahkan ke *spin column tube* baru, ditambahkan *buffer* AW2 sebanyak 250 µl dan disentrifugasi selama 3 menit pada 12.000 rpm, supernatan dibuang. Pellet dipindahkan lagi ke *spin column tube* kemudian ditambahkan *buffer* AE sebanyak 100 µl, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi selama 1 menit pada 8.000 rpm. Hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

**Amplifikasi rDNA.** Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer universal SB11 dan AS11 (Kurniasih, 1995). Amplifikasi DNA dilakukan dengan cara mencampur DNA sebanyak 3 µl dengan *Master mix* (intron) sebanyak 18 µl dalam *microtube*, kemudian campuran divortex hingga homogen. Setelah homogen, dimasukkan masing-masing 2 µl SB11 - primer *forward* (5'- GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TC-3') dan AS11 - *reverse* (5'- CCT TGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3') hingga mencapai konsentrasi akhir 25 µl, selanjutnya campuran disentrifugasi selama 30 detik. Program PCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 95°C, *annealing* selama 5 menit pada suhu 60°C, ekstensi 1 menit 20 detik pada suhu 72°C selama dengan 26 siklus, ekstensi akhir selama 5 menit pada suhu 72°C, suhu akhir ekstensi 4°C. Hasil PCR dielektroforesis pada gel *agarose* 1,5% selama 30 menit pada 100 volt, kemudian diamati diatas *UV Transilluminator* dan hasilnya didokumentasi.

**Elektroforesis Gel Agarose.** Hasil ekstraksi DNA dielektroforesis dengan menggunakan gel *agarose* 1,5% dengan cara melarutkan *agarose* sebanyak 0,40 g ke dalam 40 ml TAE *buffer* 1 X, dipanaskan di atas

*microwave* dalam botol sampel berukuran 100 ml. Larutan didinginkan di dalam *waterbath* selama 10 menit pada suhu 60°C, ditambahkan 5 µl ethidium bromida sebagai pewarna, dan dicampur merata. *Agarose* dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir, dibiarkan sampai *agarose* mengeras (20 menit). TAE *buffer* dituang ke dalam cetakan.

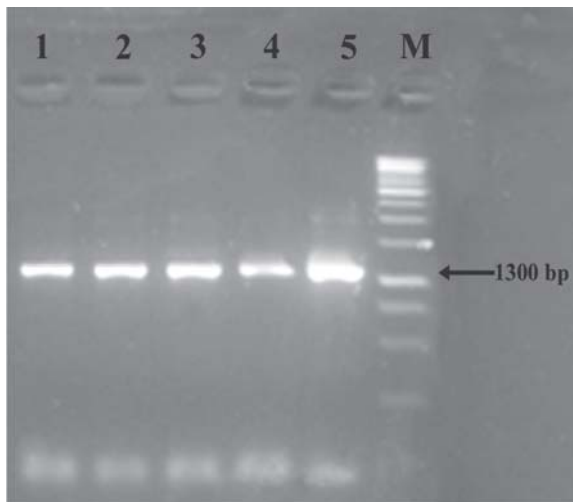
Produk PCR sebanyak 5 µl dicampur dengan 2 µl *loading dye* di atas parafilm. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam masing-masing sumur pada gel *agarose*. Sumur terakhir diisi dengan 5 µl penanda molekuler (*marker*). Elektroforesis dijalankan pada tegangan listrik/voltase 100 volt selama 30-45 menit. Pengamatan pita DNA divisualisasikan diatas *UV Transilluminator* dan hasilnya didokumentasi.

### Sekuensing dan Analisis Filogenetik

Sekuensing DNA dilakukan di laboratorium Bioteknologi PT. Wilmar, Cikarang, Jawa Barat dengan menggunakan metode Sanger (metode terminasi rantai). Sekuensing DNA menggunakan primer SB11, AS11 dan AS12 yang masing-masing dengan konsentrasi 10 pmol. Hasil sekuen DNA yang diperoleh dicari homologinya dengan sekuen lain yang telah terdaftar di *GenBank* dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) algoritma (Altschul *et al.*, 1990). Data yang diperoleh disejajarkan dengan ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Hasil urutan DNA diedit dan disejajarkan dengan menggunakan program Mega 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbour-Joining* (NJ) dengan 1000 kali pengulangan (Saitou dan Nei, 1987). Jarak genetik dihitung dengan model parameter Kimura. Pohon filogenetik digambar sesuai skala dengan panjang cabang yang sama seperti jarak evolusi (Tamura *et al.* 2007).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi lima *Clinostomum* sp. pada *internal transcribed spacer region* (ITS1) dengan menggunakan primer SB11 dan AS11 menunjukkan *band* yang sama pada 1.300 bp



Gambar 1. Hasil amplifikasi *Clinostomum* sp. pada *internal transcribed spacer* (ITS1) dengan PCR. Sumur 1 - 4: *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta (1300 bp). Sumur 5: *Clinostomum* sp. asal Riau (1300 bp). M. *Marker*

(Gambar 1). Hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan Dzikowski *et al.*, (2004) yang menggunakan primer spesifik dari *Clinostomum marginatum* dengan *forward primer* 5'-GACTTGTTTCGTCAGATTTG-3' dan *reverse primer* 5'-CCTTCCGAGGTTTACC-3' dengan suhu 60°C menghasilkan *band* 1.230 bp.

Hasil sekuensing dari kelima *Clinostomum* sp. menunjukkan susunan nukleotida yang berbeda (Gambar 2). Sekuen *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta (M1, M2, M3 dan M4) pada Gambar 2 menunjukkan perbedaan dengan sekuen *Clinostomum* (M5) asal Riau. Perbedaan sekuen *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta hanya satu nukleotida, sedangkan pada *Clinostomum* sp. asal Riau memiliki 21 nukleotida yang berbeda. Menurut Hillis dan Dixon, (1991), pada *Clinostomum cutaneum* dan *Clinostomum phalacrocorasis* memiliki perbedaan pada tiga nukleotida dengan kesamaan 99,8%. Perbedaan antara *Clinostomum complanatum* dan *Clinostomum marginatum* yang ditemukan pada burung kuntul perak kecil (*Ergretta garzetta*) hanya 2%, dengan demikian dapat dikatakan kedua spesies ini memiliki kesamaan karakter genetik (Dzikowski *et al.*, 2004). Bila dibandingkan dengan analisis sekuens antara *Fasciola hepatica* dan *F. gigantica* pada ITS1 menghasilkan sekuen yang identik dan tidak

terdapat variasi sekuen diantara kedua spesies tersebut. Perbedaan antara *F. hepatica* dan *F. gigantica* ada ITS1 hanya 1,2% dengan lima nukleotida berbeda (Lin *et al.*, 2007). Menurut Adlard (1993), perbandingan sekuen pada area ITS1 dari trematoda dengan inang berbeda dan asal yang berbeda mengindikasikan adanya perbedaan spesies yang spesifik.

Perbedaan spesies yang spesifik dapat diketahui dari analisis sekuen pada ITS1. Hillis dan Dixon (1991) melaporkan bahwa ITS1 dan ITS2 merupakan daerah yang relatif stabil dalam penentuan spesies/genus. Gen tersebut dapat digunakan sebagai *marker* (penanda) pada studi genetika populasi dan telah dapat membedakan sebanyak 19 famili digenea. Daerah ITS1 dicirikan dengan adanya unit berpasangan berulang pada ujung 5' yang memiliki variabilitas pada komponen sekuen baik pada tingkat inter- dan intraspesifik. Pengulangan unit tadi terdapat pada famili trematoda seperti Haematoloecidae, Mesometridae, Opecoelidae, Schistosomatidae, Strigeidae dan Telorchidae, tetapi belum ada informasi untuk Clinostomidae. Analisis *C. cutaneum*, *C. phalacrocorasis* dan *C. complanatum* mengindikasikan bahwa tidak ada unit yang berulang dalam spesies tersebut (Nolan dan Cribb, 2004).

Berdasarkan analisis *maximum parsimony* dan *neighbour-joining* diketahui bahwa *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta (M1-M4) berada dalam satu kluster dengan *Clinostomum complanatum* dari *Genebank* (93%) (Gambar 3).

Hasil analisis *maximum parsimony* dari *Clinostomum* sp. asal Riau (M5) menunjukkan satu kluster dengan *Clinostomum phalacrocorasis* (48%), sedangkan analisis *neighbour-joining* diketahui *Clinostomum* sp. termasuk dalam satu kluster dengan *Clinostomum phalacrocorasis* (52%) dan *Clinostomum cutaneum* (57%) dari *Genebank* (Dzikowski *et al.*, 2004). Hasil analisis *maximum parsimony* dan *neighbour-joining* dari *Clinostomum* sp. asal Riau menunjukkan validitas yang rendah dan memerlukan analisis lanjutan untuk mendapatkan hasil yang akurat. Hal tersebut sesuai dengan Kurniasih (1995), bahwa validitas yang baik dicapai minimal 85% dari tiap percabangan atau kluster.



#Clinostomum M1	GGA TCA TTA CGA GCC CCT ATT ATA ATA ATT GTG TGC TTA TTA CAT	[ 45]
#Clinostomum M2	... ..G ...	[ 45]
#Clinostomum M3	... ..	[ 45]
#Clinostomum M4	... ..G ...	[ 45]
#Clinostomum M5	... ..A.G ...	[ 45]
#Clinostomum M1	GCA TAT GAA TTT ATA TAA ATT CGC CAC CGC CCT GGC GTA ATA CAT	[ 90]
#Clinostomum M2	.. ..	[ 90]
#Clinostomum M3	... ..	[ 90]
#Clinostomum M4	... ..	[ 90]
#Clinostomum M5	... ..A.. ..CG ..	[ 90]
#Clinostomum M1	ATC CGT GAA TAC GGA AAT ATT TAA ATA CAC TTT TGT GTA TGG AAT	[ 135]
#Clinostomum M2	... ..	[ 135]
#Clinostomum M3	... ..T ...	[ 135]
#Clinostomum M4	... ..T ...	[ 135]
#Clinostomum M5	... ..C. ...	[ 135]
#Clinostomum M1	TGA CGG AAT CTG GCC GTA CCT ATG GTG CGG TAC AGC CTA CCC GTA	[ 180]
#Clinostomum M2	... ..	[ 180]
#Clinostomum M3	... ..	[ 180]
#Clinostomum M4	... ..	[ 180]
#Clinostomum M5	... ..	[ 180]
#Clinostomum M1	TCT GTT GCT TAT ATG GGC TCC GGT TCA TAT GTA GCT CAG TAC TAA	[ 225]
#Clinostomum M2	... ..	[ 225]
#Clinostomum M3	... ..	[ 225]
#Clinostomum M4	... ..	[ 225]
#Clinostomum M5	... ..T. ...T. ...A.G. ...	[ 225]
#Clinostomum M1	GTA GGC TTA ATT GAC CGG GGA ACC TCA CTG TCA GAT GCT CTG ATG	[ 270]
#Clinostomum M2	... ..	[ 270]
#Clinostomum M3	... ..	[ 270]
#Clinostomum M4	... ..	[ 270]
#Clinostomum M5	... ..	[ 270]
#Clinostomum M1	GTA TTC TTT TGA TTT TCG GAT CAT TTG TTT TGC CAG GAG CGA CAG	[ 315]
#Clinostomum M2	... ..	[ 315]
#Clinostomum M3	... ..	[ 315]
#Clinostomum M4	... ..	[ 315]
#Clinostomum M5	... ..A.. ..	[ 315]
#Clinostomum M1	AAA GTG CAT AGC TCT AGG GTT ATG TGC AAG GTT CAA TGA AGG GTG	[ 360]
#Clinostomum M2	... ..	[ 360]
#Clinostomum M3	... ..	[ 360]
#Clinostomum M4	... ..	[ 360]
#Clinostomum M5	... ..A ...	[ 360]
#Clinostomum M1	CGG ATC ATT ATC CGC ATT CTC CCC CCG GGT TGT TTC ACC CCG GTA	[ 405]
#Clinostomum M2	... ..	[ 405]
#Clinostomum M3	... ..	[ 405]
#Clinostomum M4	... ..	[ 405]
#Clinostomum M5	... ..T ...	[ 405]
#Clinostomum M1	GTA TTA TTC TGC CAT TTT TAC ATT GTT TAA GCA ATC TGA GTC AGT	[ 450]
#Clinostomum M2	... ..	[ 450]
#Clinostomum M3	... ..	[ 450]
#Clinostomum M4	... ..	[ 450]
#Clinostomum M5	... ..C. ...C	[ 450]
#Clinostomum M1	TAG TCT GGT TCG GAA AGC TGC CAT AAC ATG CAC CTG GTT GTT GAT	[ 495]
#Clinostomum M2	... ..	[ 495]
#Clinostomum M3	... ..	[ 495]
#Clinostomum M4	... ..	[ 495]
#Clinostomum M5	... ..G. ...	[ 495]
#Clinostomum M1	CAA CTG GAC TGC ATG AAC GTT CGC CTG GCG GTG CTC TAT CCC GGG	[ 540]
#Clinostomum M2	... ..	[ 540]
#Clinostomum M3	... ..	[ 540]
#Clinostomum M4	... ..	[ 540]
#Clinostomum M5	... ..A. ...	[ 540]
#Clinostomum M1	CTA GAA CGG TAA CCC TAG TTT CTG TGC ATT CGG GTA ACC GGG TGT	[ 585]
#Clinostomum M2	... ..	[ 585]
#Clinostomum M3	... ..	[ 585]

#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 585]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 585]
#Clinostomum M1	ATA	GAA	CAT	ACA	ACT	CTG	AGC	GGT	GGA	TCA	CTC	GGC	TCG	TGT	GTC	[ 630]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 630]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 630]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 630]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 630]
#Clinostomum M1	GAT	GAA	GAG	TGC	AGC	CAA	CTG	TGT	GAA	TTA	ATG	TGA	CCT	GCA	TAC	[ 675]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 675]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 675]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 675]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 675]
#Clinostomum M1	TGC	TTT	GAA	CAT	CGA	CCT	CTT	GAA	CGC	ATA	TTG	CGG	CCG	CAG	GAT	[ 720]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 720]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 720]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 720]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 720]
#Clinostomum M1	ATC	CTG	TGG	CCA	CGC	CTG	GCC	GAG	GGT	CGG	CTT	ATA	ATC	TAT	CAC	[ 765]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 765]
#Clinostomum P2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 765]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 765]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 765]
#Clinostomum M1	GAC	GCA	CAA	TAA	GTC	GTG	GCT	TGG	ATG	TGT	GCC	AGC	TGG	CGT	GAT	[ 810]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 810]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 810]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 810]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 810]
#Clinostomum M1	TTC	CCG	CTT	GCT	TAA	AGT	GGG	GTG	CCA	GAT	CTA	TGG	CTC	CTT	CCT	[ 855]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 855]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 855]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 855]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 855]
#Clinostomum M1	AAT	GTG	TCC	AGC	TAC	ACT	CAA	GTC	CAA	AGA	TGA	TAT	TTG	ATG	GAC	[ 900]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 900]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 900]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 900]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 900]
#Clinostomum M1	AGG	GTT	GTG	GTG	GTG	GAG	AAT	GCT	CGG	GTC	GTG	GCT	TAA	TGA	GAA	[ 945]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 945]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 945]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 945]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 945]
#Clinostomum M1	TGT	GAT	AAA	CGT	TCA	CGC	CTG	ATG	TCA	TTG	TCT	ATC	ATT	GCA	CCC	[ 990]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 990]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 990]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 990]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 990]
#Clinostomum M1	ATG	TTC	GGG	CTT	GCT											[1005]
#Clinostomum M2	...	...	...	...	...											[1005]
#Clinostomum M3	...	...	...	...	...											[1005]
#Clinostomum M4	...	...	...	...	...											[1005]
#Clinostomum M5	...	...	...	...	...											[1005]

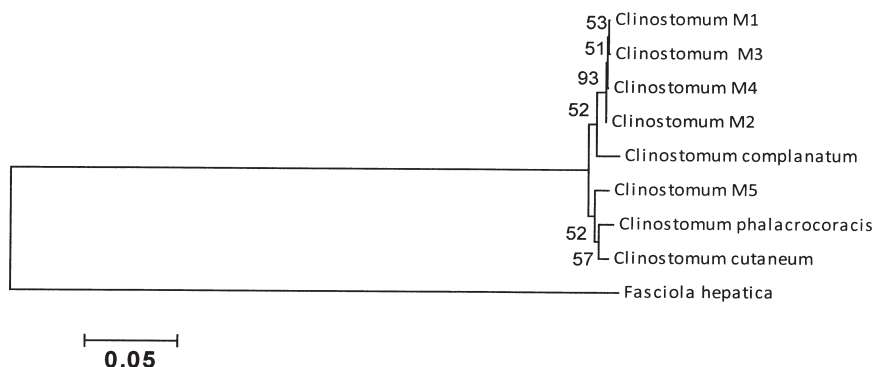
Gambar 2. Hasil sekuensing rDNA *Clinostomum* sp. (M1, M2, M3 dan M4) asal Yogyakarta dan *Clinostomum* sp. (M5) asal Riau

*Clinostomum* sp. yang berasal dari Yogyakarta menunjukkan masih merupakan satu spesies karena berada dalam satu cabang yang sama dengan perbedaan sekuens sebesar 0,1%, sedangkan *Clinostomum* asal Riau menunjukkan perbedaan > 2% ( 2,3-2,5%) dan diduga beda spesies (Tabel 1). Menurut Kurniasih (1995), perbedaan sekuens > 2% merupakan spesies yang berbeda, tetapi bila perbedaan sekuens 0,1% digolongkan masih dalam satu spesies.

Jarak antara basa kurang dari 2% masih dapat digolongkan kedalam satu spesies, akan tetapi bila jarak lebih dari 2% sudah termasuk beda spesies. Hubungan kekerabatan *Clinostomum* sp. asal Yogyakarta sangat dekat dengan *Clinostomum complanatum*, sedangkan *Clinostomum* sp. asal Riau diduga merupakan spesies *Clinostomum* baru (beda > 2%) yang hubungannya dekat dengan *Clinostomum phalacrocorasis* walaupun memiliki morfologi sama.

Tabel 1. Perbedaan sekuensing kelima *Clinostomum* sp. Yogyakarta dan Riau dengan *Clinostomum complanatum*, *Clinostomum phalacrocoracis*, *Clinostomum cutaneum* dari *GeneBank* .

	1	2	3	4	5	6	7	8
[1] <i>Clinostomum</i> M1								
[2] <i>Clinostomum</i> M2	0.001							
[3] <i>Clinostomum</i> M3	0.001	0.002						
[4] <i>Clinostomum</i> M4	0.002	0.001	0.001					
[5] <i>Clinostomum</i> M5	0.023	0.022	0.025	0.023				
[6] <i>C.phalacrocoracis</i>	0.023	0.022	0.025	0.023	0.016			
[7] <i>C.complanatum</i>	0.017	0.016	0.018	0.017	0.025	0.020		
[8] <i>C.cutaneum</i>	0.021	0.020	0.022	0.021	0.018	0.012	0.020	



Gambar 3. Pohon neighbour-joining dari sekuen *Clinostomum* sp. pada *internal transcribed spacer region*, 1000X bootstrap resampling.

Hasil analisis genetik rDNA antara *C. complanatum* dan *C. marginatum* menunjukkan similaritas sebesar 98% (Dzikowski *et al.*, 2004). Subunit 18S rRNA adalah daerah yang tidak mudah berubah/bermutasi dan mengalami proses evolusionari yang lambat dan dapat digunakan untuk membedakan organisme untuk tingkat spesies Pada *C. cutaneum* dan *C. phalacrocoracis* terdapat perbedaan pada tiga nukleotida dengan kesamaan 99,8% pada fragmen 1.913 bp dalam area 18S rRNA (Hillis dan Dixon, 1991).

Hasil sekuen dari 28S rRNA hanya berisi gen-gen awal dengan panjang 1671 bp. Hasil BLAST diketahui *C. cutaneum* 99,9% identik dengan *C. phalacrocoracis* (99,9%), dengan *C. complanatum* (99,5%), dengan *Clinostomum* sp. dari Australia (99,3%) dan dengan *Clinostomum* sp. dari Amerika Serikat (98,2%). Perbedaan antara *C. cutaneum* dan *C. phalacrocoracis* hanya dalam perbedaan nukleotida (0,1%) dan perbedaan terbesar diamati pada *Clinostomum* sp. dari Amerika Serikat (1,7%). *C. cutaneum*

dan *C. phalacrocoracis* hanya memiliki satu perbedaan nukleotida saja, sehingga dapat dikatakan spesies ini identik satu sama lain (Gustinelli *et al.* 2010).

**SIMPULAN**

*Clinostomum* sp. asal Yogyakarta adalah identik secara molekuler dan satu klaster dengan *Clinostomum complanatum*. *Clinostomum* sp. asal Riau diduga merupakan spesies *Clinostomum* baru yang satu klaster dengan *Clinostomum phalacrocoracis*.

**SARAN**

Penelitian yang lebih lanjut tentang *Clinostomum* sp. pada ikan air tawar dari daerah lain di Indonesia secara molekuler perlu dilakukan.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Hibah Disertasi Doktor, yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Disertasi Doktor Nomor: 481/SP2H/PP/DP2M/VI/2010 Tanggal 11 Juni 2010.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adlard RD. 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of fasciolidae (Digenea). *Int J Parasitol* 51 (3): 423-425.
- Altchul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic Local Allignment Search. *J Mol Biol* 215 (3): 403-410.
- Aohagi Y, Shibahara T, Machid N, Yamaga Y, Kagota K. 1992. *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae) in Five New Fish Hosts in Japan. *J. Wildl. Dis.* 28 (3): 467-469.
- Aohagi Y, Shibahara T, Machida N, Yamaga Y, Kagota K. 1993. *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae) in wild herons and egrets, Tottori Prefecture. *J. Wildl. Dis.* 28: 470-471.
- Chung D, Moon CH, Kong HH, Choi D, Lim DK. 1995. The first human case of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomidae) infection in Korea. *The Korean J Parasitol* 33 (3): 219-223.
- Dias MLGC, Eiras JC, Machado MH, Souza GTR, Pavanelli GC. 2003. The life cycle of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1819. (Digenea, Clinostomidae) on the floodplain of the High Parana River, Brazil. *Parasitol. Res.* 89: 506-508.
- Dias MLGG, Minte-Vera, CV, Eiras JC, Machado MH, Souza GTR, Pavanelli GC. 2006. Ecology of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 (Trematoda: Clinostomidae) infecting fish from the floodplain of the high Parana River, Brazil. *Parasitol Res* 99: 675-681.
- Dzikowski R, Levy MG, Poore MF, Flowers JR, Paperna I. 2004. *Clinostomum complanatum* and *Clinostomum marginatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomidae) are separate spesies based on differences in Ribosomal DNA. *J Parasitol* 90 (2): 413-414.
- Gustinelli A, Caffara M, Florio D, Otachi EO, Wathuta EM, Fioravanti ML. 2010. First description of the adult stage of *Clinostomum cutaneum* Paperna, 1964 (Digenea: Clinostomidae) from grey herons *Ardea cinerea* (L.) and a redescription of the metacercariae from Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (L.) in Kenya. *Syst. Parasitol* 76:39-51.
- Handajani H, Samsundari S. 2005. *Parasit dan Penyakit Ikan*. Malang. Universitas Muhammadiyah. 201 Hal.
- Hillis DM, Dixon, MT. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Kabata Z. 1985. *Parasites and Diseases of Fish Culture in the Tropics*. Philadephia, Taylor & Francis Limited. 21.
- Kagei N, Yanohara Y, Uchinawa R, Sato A. 1984. On the yellow grubs, metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819), found in the cultured loach. *Japanese J. Parasitol.* 33: 59-62.
- Kifune T, Ogata M, Miyahara M. 2000. The first case of Human Infection with *Clinostomum* (Trematoda: Clinostomidae) in Yamaguschi Prefecture, Japan. *Med Bull Fukuaka Univ.* 27 (2): 101-105.
- Kitagawa N, Oda M, Totoki T, Washizaki S, Oda M, Kifune T. 2003. Lidocaine spray used to capture a live *Clinostomum* parasite causing laryngitis. *Am J Otolaryngol* 24 (5): 341-343.
- Lin RQ, Dong J, Nie K, Wang CR. 2007. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existance of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China. *Parasitol. Res.* 101: 813-817.
- Matthews D, Cribb TH. 1998. Digenetic trematodes of the genus *Clinostomum* Leidy, 1856 (Digenea: Clinostomidae) from birds of Queensland, Australia, including *C. wilsoni* n. sp. from *Egretta intermedia*. *Systematic Parasitol* 39: 199-208.
- Mwita C, Nkwengulila G. 2008. Determinants of the parasite community of clariid fishes from Lake Victoria, Tanzania. *J Helminthol.* 82: 7 – 16.
- Nolan MJ, Cribb TH. 2004. The life cycle of *Paracardicoloides yamagutii* Martin, 1974 (Digenea: Sanguinicolidae). *Folia Parasitologica* 51: 320-326.



- Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4): 406-425.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual* 3<sup>th</sup> ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press,.
- Shirai R, Mathubara K, Ohnishi T, Nishiyama H, Watanabe A, Harada R, Kaduta J and Kohno S. 1998. A case of human infection with *Clinostomum* sp. *Kansenshogaku Zasshi* 72 (11): 1242-5.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evaluation* 10: 1093/molbel/msm 092.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive Multiple Sequence Alligment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Vianna RTJ, Pereira, Brandao VM. 2005. *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) density in Rhamdia quelen (Siluriformes, Pimelodidae) from South Brazil. *Brazilian Arc Biol and Tech* 48 (4): 635-642.