

## OPTIMASI SUHU ANNEALING UNTUK AMPLIFIKASI GEN COI IKAN EKSTRIMOFIL MENGGUNAKAN REAL-TIME PCR

### OPTIMIZATION OF ANNEALING TEMPERATURE FOR COI GENE AMPLIFICATION ON EXTRIMOPHIL FISH USING REAL-TIME PCR

Ardiansyah Kurniawan<sup>1\*</sup>, Tiara P Anjani<sup>1</sup>, Eva Lestari<sup>1</sup>, Merin S<sup>1</sup>, Muhamad Ichsan<sup>1</sup>, Rina Apriyani<sup>1</sup>, Alya M Safitri<sup>1</sup>, Intan PNIK Almagribi<sup>1</sup>, Ahmad F Syarif<sup>1</sup>, Andri Kurniawan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Jurusan Akuakultur, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung, Kampus Terpadu Balunijuk, Merawang, Indonesia

Korespondensi email : [ardian\\_turen@yahoo.co.id](mailto:ardian_turen@yahoo.co.id)

#### Abstract

Extremophilic fish require genetic characterization to determine the identity of their species, their kinship, and the potential for genetic variation due to extreme environmental adaptation. DNA barcoding using Fish-F2 and Fish-R2 primers at annealing temperature at 52°C for 15 seconds showed qualitative failure results in most fish species. For this reason, it is necessary to optimize the annealing temperature in the PCR process to obtain DNA bands that correlate with successful identification. Fish samples were obtained from Ruai Silip, Bangka Island, Membalong, Belitung Island and Way Kanan, Lampung, Sumatra Island. The annealing temperature optimization was set at 50, 50.4, 51.1, 52.3, 53.7, 54.8, 55.5, and 56°C. There were five species of extremophile fish tested, namely *Brevibora sp*, *Barbodes binotatus*, *Rasbora bankanensis*, *Anabas testudineus*, and *Aplocheilus panchax*. Extremophile fish showed differences in the appearance of DNA bands in PCR with different annealing temperatures. *Brevibora sp* showed visualization of DNA bands at 54.8°C, *Barbodes binotatus* at 53.7, 54.8, 55.5, and 56°C, *Anabas testudineus* at 50 and 50.4°C, and *Aplocheilus panchax* produced clearly visible band on annealing temperatures.

Key words : *Extremophile Fish, DNA Barcoding, Annealing, Bangka Belitung*

#### Abstrak

Ikan-ikan ekstremofil memerlukan karakterisasi genetik untuk mengetahui identitas spesiesnya, kekerabatannya, dan potensi variasi genetiknya akibat adaptasi lingkungan ekstrem. Barcoding DNA menggunakan primer Fish-F2 dan Fish-R2 pada suhu annealing pada 52°C selama 15 detik menunjukkan hasil kegagalan secara kualitatif pada sebagian besar spesies ikan. Untuk itu diperlukan optimasi suhu annealing pada proses PCR untuk mendapatkan pita DNA yang berkorelasi dengan keberhasilan identifikasi. Sampel ikan diperoleh dari Ruai Silip, Pulau Bangka, Membalong, Pulau Belitung dan Way Kanan, Lampung, Pulau Sumatra. Optimasi suhu annealing diatur pada 50, 50.4, 51.1, 52.3, 53.7, 54.8, 55.5, dan 56°C. Terdapat lima spesies ikan ekstremofil yang diuji yaitu *Brevibora sp*, *Barbodes binotatus*, *Rasbora bankanensis*, *Anabas testudineus*, dan *Aplocheilus panchax*. Ikan ekstremofil menunjukkan perbedaan kemunculan pita DNA pada PCR dengan suhu annealing berbeda. *Brevibora sp* menunjukkan visualisasi pita DNA pada 54.8°C, *Barbodes binotatus* pada suhu 53.7, 54.8, 55.5, dan 56°C, *Anabas testudineus* pada suhu 50 dan 50.4°C, dan *Aplocheilus panchax* menghasilkan pita yang terlihat jelas pada semua suhu annealing.

Kata kunci : *Ikan Ekstremofil, Barcoding DNA, Annealing, Bangka Belitung*

#### PENDAHULUAN

Keanekaragaman iktiofauna di Sundaland menjadi kekayaan biodiversitas bagi Indonesia. Pulau Bangka yang berada di antara pulau besar Sumatra dan Kalimantan juga memiliki ikan air tawar yang beraneka ragam. Bahkan sebagian diantaranya berpotensi sebagai

ikan hias dan ikan konsumsi (Kurniawan *et al.*, 2022). Keanekaragaman ikan air tawar di sungai mengalami penurunan akibat terdampaknya sungai-sungai oleh penambangan timah (Muslih *et al.*, 2016). Meski demikian berbagai jenis ikan air tawar masih ditemukan di sungai dan danau bekas penambangan timah.

Perairan di Bangka dan Belitung memiliki pH yang cenderung asam, demikian juga dengan kolong atau danau bekas penambangan timahnya. Beberapa sungai yang terdapat penambangan timah di Bangka dan Belitung memiliki pH asam diantaranya adalah Sungai Menduk pH 4,7 – 4,8, Sungai Jelitik pH 5,3 (Saputro *et al.*, 2014; Muslih *et al.*, 2016). Sifat asam terbentuk dari proses oksidasi batuan/mineral dari sisa limbah tailing, batuan buangan tambang atau dinding batuan yang diikuti oleh oksidasi batuan/mineral sisa tailing tersebut yang melepaskan ion hidrogen (Kartika & Puryanti, 2019). Bahkan Wijianti *et al.* (2016) melaporkan adanya wilayah di Bangka yang sumur-sumur warganya memiliki pH asam.

Kondisi perairan yang asam menjadikan ikan-ikan yang hidup didalamnya termasuk organisme dengan kemampuan adaptasi terhadap ketidaksesuaian kualitas air. Ikan yang memiliki ketahanan terhadap tekanan lingkungan, termasuk diantaranya keasaman air, dikategorikan dalam ikan blackwater (Akbar, 2021). Sementara Kurniawan dan Mustikasari (2021) dan Permadi *et al.* (2022) mengategorikan sebagai ikan ekstremofil pada ikan-ikan yang mampu hidup di perairan dengan kondisi ekstrem.

Ikan-ikan ekstremofil dari Bangka Belitung ini memerlukan karakterisasi genetik untuk mengetahui identitas spesiesnya,

kekerabatannya, dan potensi variasi genetiknya akibat adaptasi lingkungan ekstrem. Ikan – ikan tersebut adalah Ikan Kenancat, Tanah, Bebidis, Kepala Timah, Seluang dan Bebidis yang secara morfologi memiliki kemiripan dengan karakter spesies berurutan *Rasbora bankanensis*, *Barbodes binotatus*, *Aplocheilus panchax*, *Rasbora einthovenii*, dan *Brevibora cheeya*. Barcoding DNA diterapkan menggunakan gen Sitokrom Oksidase I (COI) untuk memperoleh informasi genetik dari gen mitokondrianya. Penggunaan primer forward Fish-F2 dan reverse Fish-R2 (Ward *et al.*, 2005) dengan amplifikasi DNA pada suhu pre-denaturasi 95°C selama 1 menit, denaturasi pada 95°C selama 15 detik, annealing pada 52°C selama 15 detik, dan extension pada 72°C selama 10 detik (35 siklus), dan final extension pada 72°C selama 10 menit (Aisyah *et al.*, 2021) menunjukkan hasil uji kualitatif berbeda pada setiap spesies ikan. Kemunculan pita DNA teridentifikasi pada spesies *Rasbora bankanensis*, namun spesies lainnya tidak menunjukkan hasil adanya pita DNA. Produk hasil PCR yang tidak menunjukkan pita DNA saat diuji kualitatif menggunakan elektroforesis ini dimungkinkan memerlukan suhu anealing berbeda pada spesies yang berbeda. Untuk itu diperlukan optimasi suhu anealing pada proses PCR untuk mendapatkan pita DNA dan keberhasilan identifikasi DNA.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel ikan. 1) Riau Silip, Bangka. 2) Membalong, Belitung, 3) Baradatu, Kabuapten Way Kanan, Lampung.



Gambar 2. Kondisi lokasi sampling ikan di hulu Sungai Lelabi, Riau Silip, Kabupaten Bangka (kiri) dan Membalong, Kabupaten Belitung (Tengah) dan Way Kanan (kanan)

## BAHAN DAN METODE

Sampel ikan ekstremofil diperoleh dari tiga lokasi di Pulau Bangka, Belitung, dan Sumatera (Gambar 1). *Rasbora bankanensis* dan *Brevibora sp* didapatkan dari hulu sungai Lelabi, Riau Silip, Kabupaten Bangka pada koordinat  $1^{\circ} 52' 2.388''$  LS dan  $105^{\circ} 45' 16.175''$  BT. *Barbodes binotatus*, *Aplocheilus panchax*, dan *Brevibora sp* diperoleh dari perairan di Membalong, Kabupaten Belitung pada koordinat  $3^{\circ} 3' 15.466''$  LS dan  $107^{\circ} 38' 23.197''$  BT Sampel *Anabas testudineus* diperoleh dari perairan di Desa Bumi Rejo, Kecamatan Baradatu, Kabupaten Way Kanan, Pulau Sumatra pada koordinat  $4^{\circ} 39' 26.971''$  LS dan  $104^{\circ} 33' 55.818''$  BT (Gambar 2). Seluruh sampel ikan dipreparasi menggunakan alkohol 96%.

Identifikasi DNA menggunakan gen sitokrom oksidase 1 (CO1) 630 bp. Primer yang digunakan untuk Fish-F2 forward dan Fish-R2 untuk reverse (Ward *et al.*, 2005). Isolasi DNA menggunakan Nexpro™ DNA kit di Laboratorium Biologi Dasar, Universitas Bangka Belitung. Proses PCR mengacu pada prosedur Aisyah *et al.* (2021) dengan menggunakan primer forward dan reverse sebanyak masing-masing 2%, 50% PCR mix menggunakan Nexpro™ Master mix, 36% ddH<sub>2</sub>O, dan 10% template DNA. Alat PCR yang digunakan produksi dari BioRad tipe T100™. Pengaturan PCR menggunakan suhu pre-denaturasi 95°C selama 1 menit, denaturasi pada 95°C selama 15 detik, dan extension pada 72°C selama 10 detik (35 siklus), dan final extension pada 72°C selama 10 menit. Optimasi annealing diatur pada suhu 50, 50.4, 51.1, 52.3, 53.7, 54.8, 55.5, dan 56°C.

Pengujian DNA secara kualitatif menggunakan metode elektroforesis dilakukan pada hasil ekstraksi dan produk PCR. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan media agar dengan formula gel 1 gr agarose

dalam campuran 5 ml TAE buffer dan 45 ml akuades. Larutan ditambahkan redgel stain sebanyak 8  $\mu$ l. Sampel DNA sebanyak 5  $\mu$ l dihom dengan 1  $\mu$ l *Loading Dye* dimasukkan sumur gel agarose. Elektroforesis menggunakan tegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi pita DNA menggunakan UV Transmulator.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ikan-ikan yang mampu beradaptasi pada perairan Pulau Bangka dan Belitung yang cenderung asam dan terkontaminasi logam berat penambangan timah dapat dikategorikan pada ikan ekstremofil. Beberapa ikan yang digunakan dalam kajian ini diidentifikasi penamaan spesiesnya berdasarkan karakter morfologinya (Gambar 3). *Rasbora bankanensis* dikenal sebagai Ikan Kenancat dan *Brevibora sp* disebut sebagai Ikan Bebidis oleh masyarakat lokal di Riau Silip, Kabupaten Bangka. Masyarakat di Belitung menamakan *Barbodes binotatus* sebagai Ikan Ban atau Ikan Tanah, *Aplocheilus panchax* sebagai ikan Kepala Timah dan *Brevibora sp* sebagai ikan Bebidis. Ikan Bebidis masih diberikan penamaan genus karena kedua pulau memiliki kedekatan genetik pada spesies yang berbeda, *Brevibora dorsiocellata* dan *Brevibora cheeya* (Syarif & Prasetyono, 2019; Sholihah *et al.*, 2020).

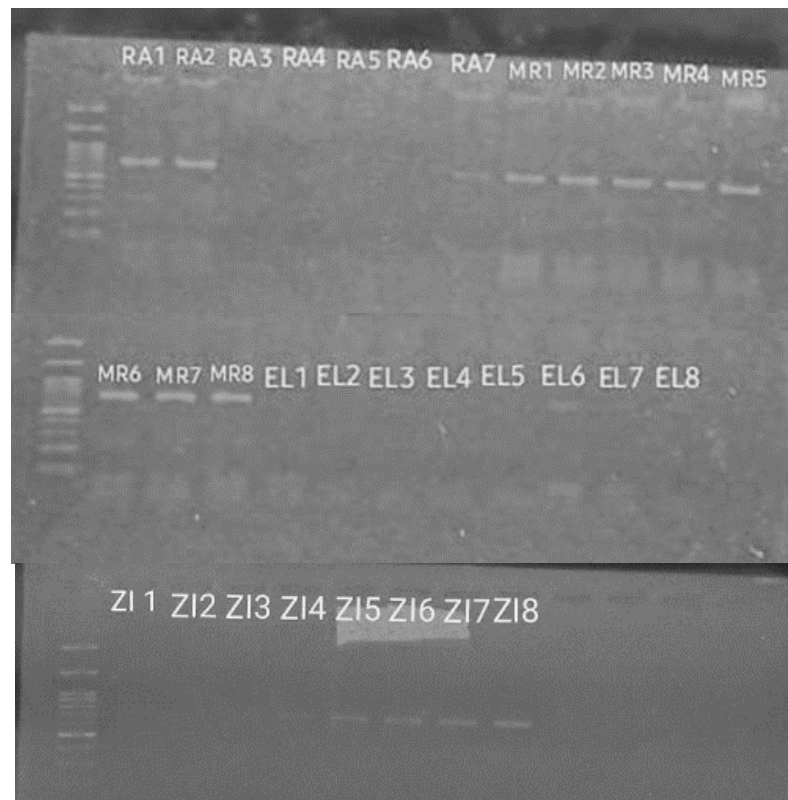
Ekstraksi DNA pada sampel-sampel ikan dilakukan sesuai prosedur. Hasil ekstraksi DNA diuji menggunakan metode elektroforesis menunjukkan adanya pita-pita DNA yang muncul. Sebagian besar ekstrak DNA teridentifikasi dalam uji kualitatif ini. *Brevibora sp*, *Anabas testudineus*, dan *Aplocheilus panchax* diperoleh keberadaan DNA nya. *Barbodes binotatus* tidak menunjukkan pita yang jelas, namun masih terlihat adanya smear tebal dengan berat DNA yang berbeda (Gambar 4).



Gambar 3. Spesies ikan ekstremofil yang diuji dalam penelitian ini ( a. *Brevibora* sp, b. *Barbodes binotatus*, c. *Rasbora bankanensis*, d. *Anabas testudineus*, e. *Aplocheilus panchax*)



Gambar 4. Hasil elektroforesis pada produk ekstraksi DNA (EL = *Brevibora* sp, ZI = *Barbodes binotatus*, RA = *Anabas testudineus*, MR = *Aplocheilus panchax*)



Gambar 5. Hasil elektroforesis pada produk PCR dengan optimasi suhu annealing (EL = *Brevibora* sp, ZI = *Barbodes binotatus*, RA = *Anabas testudineus*, MR = *Aplocheilus panchax*)

Hasil elektroforesis dari produk setelah PCR menunjukkan bahwa *Aplocheilus panchax* menghasilkan pita DNA yang terlihat jelas pada semua suhu annealing yang digunakan. Mustikasari dan Agustiani (2021) menggunakan suhu annealing 50°C selama 30 detik pada spesies ini. Secara teoritis, suhu annealing yang dapat digunakan berada pada rentang 5°C di atas dan dibawah suhu melting. Suhu melting ini merupakan temperatur yang dapat memisahkan 50 % untai ganda DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

*Brevibora* sp menghasilkan pita hanya pada suhu annealing 54,8°C namun dengan ketebalan rendah. Ketidakhadiran pita pada penggunaan suhu lain dapat dikarenakan tidak optimalnya proses amplifikasi atau konsentrasi DNA yang rendah. Hal ini terlihat pada pita yang kurang nampak jelas yang menunjukkan konsentrasinya yang rendah. Ekstraksi DNA dengan metode kit ekstraksi DNA menunjukkan konsentrasi DNA lebih rendah dibandingkan cara konvensional (Fitriya et al., 2015; Iqbal et al., 2016). Jika merujuk pada publikasi Sholihah et al (2000) dan Sholihah et al (2021), *Brevibora* dapat diamplifikasi dengan suhu annealing 56°C selama 20 detik.

*Barbodes binotatus* menghasilkan pita DNA yang terlihat secara visual pada penggunaan suhu annealing 53,7, 54,8, 55,5, dan 56°C. Kondisi pita yang paling tebal terdapat pada suhu annealing 56°C. Suhu 54°C dan 56°C digunakan pada pengaturan suhu annealing untuk barcoding DNA (Hutama et al., 2017; Roesma et al., 2019). Suhu annealing yang lebih rendah yaitu 50°C juga digunakan untuk *B. Binotatus* dari Nusa Tenggara barat, namun diiringi dengan waktu 10 detik lebih lama (Arisuryanti et al., 2019).

*Anabas testudineus* lebih berhasil diamplifikasi menggunakan suhu annealing 50 dan 50,4°C, meskipun juga muncul pita dengan visual tipis pada penggunaan suhu 56°C. *A. Testudineus* dari pulau Siberut, Kepulauan Mentawai berhasil diidentifikasi menggunakan gen CO1 pada suhu annealing yang lebih tinggi yaitu 53°C selama 30 detik (Roesma et al., 2022), sementara Arisuryanti et al. (2019) dan Srinu et al. (2019) menggunakan suhu 50°C dengan waktu yang lebih lama untuk penempelan primer. Annealing merupakan tahap penempelan primer pada rantai tunggal DNA, waktu annealing umumnya 30-45 detik (Amanda, 2019).

## KESIMPULAN

Ikan ekstremofil menunjukkan perbedaan kemunculan pita DNA pada PCR dengan suhu annealing berbeda. *Brevibora* sp menunjukkan visualisasi pita DNA pada 54,8°C, *Barbodes binotatus* pada suhu 53,7, 54,8, 55,5, dan 56°C,

*Anabas testudineus* pada suhu 50 dan 50,4°C, dan *Aplocheilus panchax* menghasilkan yang terlihat jelas semua suhu annealing.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Universitas Bangka Belitung dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas pendanaan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, S., Thania, O. S., & Syarif, A. F. 2021. Identifikasi Molekuler Sirip Ikan Hiu Menggunakan Gen Mitokondria Cytochrome C Oxydase Subunit I (COI) Yang Didaratkan Di Pesisir Kabupaten Bangka Selatan. *Jurnal Enggano*, 6(1), 99-109.
- Akbar, J. 2021. Pertumbuhan Dan Kelangsungan Hidup Ikan Betok (*Anabas testudineus*) Yang Dipelihara Pada Salinitas Berbeda. *Bioscientiae*, 9(2), 1-8.
- Amanda, K. 2019. Optimasi Suhu Annealing Proses PCR Amplifikasi Gen shv Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Arisuryanti, T., Hasan, R. L., Ayu, K. L., Ratman, N., & Hakim, L. 2019. Genetic Identification of Freshwater Fish Species Through DNA Barcoding from Lake Lebo Taliwang, West Nusa Tenggara. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 4(3), 107-112.
- Asy'ari, M., & Noer, A. S. 2005. Optimasi konsentrasi MgCl<sub>2</sub> dan suhu annealing pada proses amplifikasi multifragmens mtDNA dengan metoda PCR. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 8(1), 23-27.
- Fitriya, R. T., Ibrahim, M., & Lisdiana, L. 2015. Keefektifan metode isolasi DNA kit dan CTAB/NaCl yang dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *LenteraBio*, 4(1), 87-92.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. 2000. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17-29.
- Hutama, A., Dahrudin, H., Busson, F., Sauri, S., Keith, P., Hadiaty, R. K. & Hubert, N. 2017. Identifying spatially concordant evolutionary significant units across multiple species through DNA barcodes: Application to the conservation genetics of the freshwater fishes of Java and Bali. *Global ecology and conservation*, 12, 170-187.
- Iqbal, M., Buwono, I. D., & Kurniawati, N. 2016. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus

- (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 7(1).
- Karlina, W., Roesma, D. I., & Tjong, D. H. 2016. Phylogenetic study of *Puntius cf. binotatus* fish from Gunung Tujuh Lake in Sumatera Based on Cytochrome b Gene. *J Entomol Zool Stud*, 4(2), 538-540.
- Kartika, P., & Puryanti, D. 2019. Identifikasi Pencemaran Logam Berat Air Kolong dan Air Sumur di Sekitar Bekas Tambang Timah Perayun Kundur, Kepulauan Riau. *Jurnal Fisika Unand*, 8(4), 329-335.
- Kurniawan, A., & Mustikasari, D. 2021. Review tentang kemampuan ikan ekstremofil untuk hidup di perairan asam dan terkontaminasi logam berat pascapenambangan timah. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 19(3), 541-554.
- Kurniawan, A., Subagja, J., Taufansyah, E., Bidayani, E., Putri, A. M., Lestari, B., & Syarif, A. F. 2022. Diseminasi Pengembangan Potensi Ikan Lokal Bangka Belitung Kepada Masyarakat Perikanan Indonesia. *JURPIKAT (Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat)*, 3(1), 9-18.
- Muslih, K., Adiwilaga, E. M., & Adiwibowo, S. 2016. Pengaruh penambangan timah terhadap keanekaragaman ikan sungai dan kearifan lokal masyarakat di Kabupaten Bangka. *Limnotek: perairan darat tropis di Indonesia*, 21(1).
- Mustikasari, D., & Agustiani, R. D. 2021. DNA Barcoding Ikan Kepala Timah Dan Betok Berdasarkan Gen COI sebagai Ikan Pioneer di Kolong Pascatambang Timah, Pulau Bangka. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 12(1), 86-95.
- Permadi, J., Rochvita, A., Anggraini, R. C. P. K., & Palimirmo, F. S. 2022. Filogenetik Ikan Ekstremofil Edible Populasi Magelang Menggunakan Gen Cytochrome Oxydase I. *Journal of Research and Technology*, 8(1), 89-100.
- Roesma, D. I., Tjong, D. H., Karlina, W., & Aidil, D. R. 2019. Taxonomy confirmation of *Puntius cf. binotatus* from Gunung Tujuh Lake, Jambi, Indonesia based on cytochrome oxidase-I (COI) gene. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(1), 54-60.
- Roesma, D., Tjong, D. H., Janra, M., & Aidil, D. 2022. DNA barcoding of freshwater fish in Siberut Island, Mentawai Archipelago, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(4).
- Saputro, B., Santosa, L. W., & Murti, S. H. 2014. Pengaruh Aktivitas Penambangan Timah Putih (SN) terhadap Kerusakan Lingkungan Perairan Sungai Jelitik Kabupaten Bangka Provinsi Kepulauan Bangka Belitung. *Majalah Geografi Indonesia*, 28(1), 1-11.
- Sholihah, A., Delrieu-Trottin, E., Sukmono, T., Dahrudin, H., Pouzadoux, J., Tilak, M. K., ... & Hubert, N. 2021. Limited dispersal and in situ diversification drive the evolutionary history of Rasborinae fishes in Sundaland. *Journal of biogeography*, 48(9), 2153-2173.
- Sholihah, A., Delrieu-Trottin, E., Sukmono, T., Dahrudin, H., Risdawati, R., Elvyra, R., ... & Hubert, N. 2020. Disentangling the taxonomy of the subfamily Rasborinae (Cypriniformes, Danionidae) in Sundaland using DNA barcodes. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.
- Srinu, G., Padmavathi, P., & Chatla, D. 2019. Identification and Validation of Anabas spp.(Osteichthyes: Anabantidae) Through Morphology and DNA Barcoding From Lake Kolleru, Andhra Pradesh, India. *Journal of Coastal Research*, 86(SI), 142-148.
- Syarif, A. F., & Prasetyono, E. 2019. Karakter morfometrik, pertumbuhan, dan sintasan tiga spesies ikan seluang (famili: Cyprinidae) asal Pulau Bangka. *Media Akuakultur*, 14(1), 1-7.
- Wijanti, E. S., Nurhadini, N., & Saporin, S. 2016. Peningkatan Kualitas Air Minum Menggunakan Penyaringan Sederhana Berbasis Limbah Cangkang Siput Gonggong di Desa Kulur Ilir Kabupaten Bangka Tengah. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Bangka Belitung*, 3(2).
- Wongsawad, C., Wongsawad, P., Sukontason, K., Maneepitaksanti, W., & Nantararat, N. 2017. Molecular phylogenetics of *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) originated from freshwater fish from Chiang Mai Province, Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 55(1), 31-37.