

**Amplification and Analysis of Cytocrome Oxidase I of
Polypedates leucomystax from Bogor Agricultural University Area**
(Amplifikasi dan Analisis Sekuens Fragmen Sitokrom Oksidase I *Polypedates leucomystax* dari
Area Kampus Institut Pertanian Bogor)
Perkasa Arian¹, I Made Artika^{1,2*}, Syamsul Falah¹

¹*Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia*
²*Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta, 10430, Indonesia*

Received : 11 July 2015; Accepted: 04 January 2016

Corresponding author: Dr. I Made Artika, M.App.Sc; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: imart@ipb.ac.id

ABSTRACT

*DNA barcoding has become a useful tool for identifying and confirming of species within a known taxonomic framework. A large-scale effort is underway to barcode all amphibian species using the universally sequenced DNA region, a partial fragment of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI). This study was aimed to use DNA barcoding technique to identify and confirm species of *Polypedates leucomystax* and to analyze their phylogenetic relationship. Samples of *Polypedates leucomystax* were collected from Campus Area of Bogor Agricultural University. The cytochrome oxidase I gene of 600-700 nucleotides were amplified and observed in agarose gel electrophoresis. Forward sequence (604 base pairs) of COI gene was used for phylogenetic analyses. BLAST analysis against BOLD System database showed 95.75 % identity with sequences of *Polypedates leucomystax*. The pairwise genetic distances of *Polypedates leucomystax* with *Rhacophorus schlegelii*, *Limnonectes fujianensis*, *Fejervarya cancrivora*, and *Bufo melanostictus* were 0.274, 0.352, 0.339, 0.339, 0.393, respectively. These results illustrated that the genetic identification is congruence with the morphological identification. Phylogenetic tree analysis showed that the samples were in one clade with other tree frogs. The DNA barcoding technique based on the sequence of COI gene can therefore be used to identify and confirm species of *Polypedates leucomystax*.*

Keywords: *Cytochrome oxidase subunit I (COI), Genetic distance, Phylogenetic tree, *Polypedates leucomystax**

ABSTRAK

Barcoding DNA telah menjadi teknik yang berguna untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi spesies dalam suatu kerangka taksonomi. Upaya skala besar sedang dilakukan untuk barcod-

ing semua spesies amfibi menggunakan sekuen wilayah DNA universal, yaitu fragmen parsial gen sitokrom oksidase subunit I (COI) mitokondria. Penelitian ini bertujuan untuk menggunakan teknik *barcoding DNA* untuk identifikasi dan konfirmasi spesies *Polypedates leucomystax* dan menganalisis hubungan filogenetiknya. Sampel *Polypedates leucomystax* dikumpulkan dari area kampus Institut Pertanian Bogor. Gen sitokrom oksidase I berukuran 600-700 nukleotida diamplifikasi dan diamati pada elektroforesis gel agarosa. Sekuen forward (604 pasangan basa) dari gen COI digunakan untuk analisis filogenetik. Analisis BLAST terhadap basis data BOLD System menunjukkan kesamaan 95.75 % dengan sekuen *Polypedates leucomystax*. Jarak genetik berpasangan *Polypedates leucomystax* dengan *Rhacophorus schlegelii*, *Limnonectes fujianensis*, *Fejervarya cancrivora*, dan *Bufo melanostictus* masing-masing adalah 0.274, 0.352, 0.339, 0.339, 0.393, berturut-turut. Hasil ini menggambarkan bahwa hasil identifikasi genetik memiliki kecocokan dengan identifikasi morfologi. Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel ini berada dalam satu clade dengan katak pohon lainnya. Oleh karena itu, teknik *barcoding DNA* berdasarkan sekuen gen COI dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi spesies *Polypedates leucomystax*.

Kata kunci: Sitokrom oksidase subunit I, Jarak genetik, Pohon filogenetik, *Polypedates leucomystax*

1. PENDAHULUAN

Katak adalah amfibi yang tersebar luas di permukaan bumi. Indonesia adalah rumah bagi 450 spesies dari 11 % katak di dunia (Dian *et al.* 2013). Ada beberapa famili katak yang telah diidentifikasi di Jawa Barat yaitu *Bufo*idae, *Dicroglossidae*, *Megophryidae*, *Microhylidae*, *Ranidae*, *Rhacophoridae*, *Ichthyophiidae* (Kusrini 2013). *Polypedates leucomystax* atau katak pohon bergaris merupakan salah satu jenis hewan yang dapat berasosiasi dengan kerusakan habitat. Jenis katak ini dapat ditemukan pada hampir semua tipe habitat, termasuk di kawasan kampus IPB (Irawan 2008).

Barcoding DNA merupakan alat yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies dengan cepat (Shen *et al.* 2013). *Barcoding DNA* biasanya digunakan untuk rekonstruksi silsilah, forensik, dan survei keanekaragaman hayati (Che *et al.* 2011). *Barcoding DNA* menggunakan 650 pb bagian gen sitokrom oksidasi 1 mitokondria dapat digunakan sebagai dasar un-

tuk identifikasi spesies anggota *animal kingdom* dan beberapa grup eukariot lainnya (Park *et al.* 2010). DNA mitokondria (mtDNA) telah menjadi salah satu penanda molekuler yang paling banyak digunakan untuk studi filogenetik pada hewan karena struktur genomnya yang sederhana. Data sekuens mtDNA telah berhasil digunakan untuk menentukan hubungan filogenetik (Bajpai dan Tewari 2010).

Gen COI (sitokrom oksidase subunit I) dapat digunakan sebagai penanda mitokondria untuk *barcoding* spesies, filogeni, dan filogeografi (Marosi *et al.* 2010). Ukuran dan struktur gen sitokrom oksidase subunit 1 (COI) sangat cocok untuk analisis studi evolusi kelompok hewan (Bajpai dan Tewari 2010). Daerah 648 bp di ujung 5' dari gen mitokondria sitokrom oksidase subunit 1 (COI) adalah fragmen pilihan untuk *barcode* sebagian besar spesies hewan (Che *et al.* 2011). Gen COI juga telah digunakan untuk identifikasi spesies amfibi menggunakan teknik *barcoding DNA* (Smith *et al.* 2008).

Penelitian ini bertujuan menggunakan teknik *barcoding* DNA untuk identifikasi dan konfirmasi spesies *Polypedates leucomystax* dan menganalisis hubungan filogenetiknya. Sekuen parsial COI digunakan untuk analisis hubungan filogenetik dengan spesies lainnya dari genus *Rhacophorus* yang tersedia dalam *database Bold system*.

2. METODOLOGI

Bahan yang digunakan adalah aquades, *DNAeasy blood and tissue kit* (Qiagen), *go Taq green*, *Molecular Grade Water* (ddH₂O), oligonukleotida primer *chmf4* dan *chmr4*, agarosa, *loading dye*, *Gel Red*.

Persiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah katak yang diambil di sekitar area kampus Institut Pertanian Bogor, yaitu katak pohon yang hidup di kolam di depan Gedung Rektorat atau Gedung Andi Hakim Nasution. Spesies diidentifikasi berdasarkan morfologi dengan melihat perbedaan bentuk, dan corak warnanya. Katak diambil secara manual dan disimpan di akuarium dalam keadaan hidup dan terpelihara.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur yang tercantum dalam *laboratorium protocols DNA Extraction—Qiagen DNeasy kit*. Sebanyak 10 mg sampel jaringan kaki katak dipotong dengan menggunakan gunting steril dan dimasukkan kedalam *microtube* 1.5 mL. Kemudian, ditambahkan 180 µL bufer ATL dan 20 µL proteinase K, lalu campuran divortex. Setelah itu campuran diinkubasi pada suhu 55 °C selama 3 jam atau semalam hingga jaringan

hancur. Setelah diinkubasi, campuran divortex lalu ditambahkan 200 µL bufer AL dan divortex kembali. Campuran ditempatkan pada blok panas bersuhu 70 °C selama 10 menit. Setelah ditambahkan 200 µL etanol 100 %, campuran dipindahkan seluruhnya ke kolom *spin* (tersedia di dalam paket kit). Campuran disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. *Microtube* bagian bawah dibuang dan diganti dengan yang baru, lalu ditambahkan 500 µL Buffer AW1 dan disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. *Microtube* bagian bawah dibuang kembali dan diganti dengan yang baru lalu ditambahkan 500 µL bufer AW2 dan disentrifugasi pada 13000 rpm selama 3 menit. *Microtube* bagian bawah dibuang dan diganti dengan yang baru lalu ditempatkan dalam tabung 1.5 ml pada kolom *spin*, ditambahkan 200 µL bufer AE. Campuran didiamkan selama 1 menit, kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Proses diulangi dan hasil digabungkan sehingga diperoleh volume total 400 µL. Ekstrak DNA disimpan dalam *freezer*.

Amplifikasi Teknik PCR (Che *et al.* 2011)

Amplifikasi fragmen DNA dengan teknik PCR dilakukan dalam volume 25 µL yang mengandung 2 µL (50 ng) DNA *template*, 11 µL ddH₂O, 1 µL (20 µM) masing-masing primer, dan 10 µL *Taq green polymerase*. Primer yang digunakan adalah *chmf4*: 5'-TYT CWA CWA AYC AYA AAG AYA TCG G-3' dan *chmr4*: 5'-ACY TCR GGR TGR CCR AAR AAT CA-3' (Che *et al.* 2011). Kondisi PCR adalah sebagai berikut: pradenaturasi 5 menit pada 95 °C, diikuti oleh 35 siklus: denaturasi 1 menit pada 94 °C, *annealing* selama 1 menit pada 46 °C, *extension* selama 1 menit pada 72 °C. Terakhir, *extension* dilakukan pada 72 °C selama 10 me-

nit. Produk PCR dimurnikan dengan Kit *Gel Extraction Mini*.

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan berdasarkan metode standar yaitu menggunakan gel agarosa 1.5 %, buffer TAE, DNA *low mass ladder* digunakan sebagai penanda (*marker*), dan *Gel Red* sebagai pewarna. Potongan parafilm ditambahkan dengan 5 μ L *Gel Red* dan 5 μ L sampel (produk PCR), dan 5 μ L *low mass ladder* kemudian campuran dimasukkan ke dalam sumur. Elektroforesis dijalankan pada voltase 80 volt arus 400 mA, selama 45 menit. Visualisasi pita DNA dilakukan dengan menggunakan *Geldoc*.

Sekuensing DNA dan Analisis pohon Filogenetik

Sekuensing DNA dilakukan dengan metode dideoksi terminasi Sanger untuk menentukan sekuen nukleotida fragmen DNA. Proses sekuensing dilakukan oleh instansi penyedia jasa sekuensing DNA (Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta). Produk PCR dikirim ke Lembaga Eijkman dan diperoleh hasil sekuensing berupa AB1 file. Data sekuen DNA digunakan untuk analisis komposisi nukleotida dan jarak genetik. Hasil sekuensing juga dianalisis menggunakan BLAST untuk menentukan homologi sekuen. Alignment dilakukan menggunakan *software* Mega 5 (Tamura *et al.* 2011; Hall 2013). Program ini juga sekaligus digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik. Analisis pohon filogenetik menggunakan metode Maximum Likelihood (ML).

3. HASIL

Fragmen Gen COI

Amplifikasi daerah COI pada *Polypedates leucomystax* menghasilkan pita DNA tunggal yang menunjukkan hanya ada satu jenis gen dari organisme yang teramplifikasi berukuran 700-800 bp (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan fragmen COI yang digunakan yaitu berkisar 648 pb.

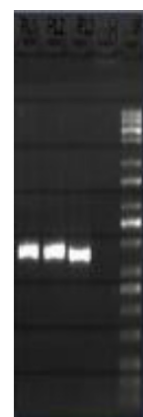
Sekuens Fragmen Gen COI

Dari hasil sekuensing didapatkan panjang nukleotida fragmen gen COI PL1, PL2 dan PL3, masing-masing berukuran sebesar 391 pb, 604 pd, dan 604 pb. Secara keseluruhan frekuensi rata-rata komposisi nukleotida yaitu T (31.92 %), C (27.43 %), A (23.42 %) dan G (17.03 %) (Tabel 1). Hasil analisis jarak genetik disajikan pada Tabel 2.

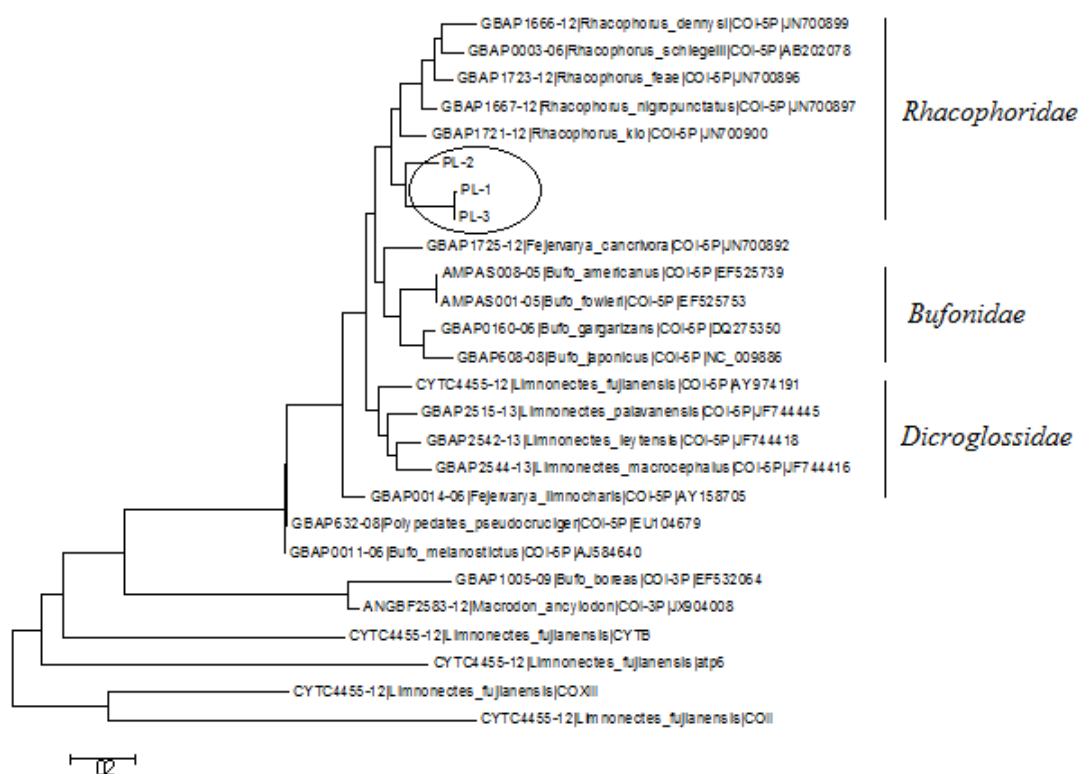
Pohon Filogenetik Fragmen Gen COI

Hasil analisis filogenetik menggunakan metode Maximum Likelihood (ML) disajikan pada Gambar 2.

1 2 3 M



Gambar 1 Visualisasi elektroforesis fragmen partial gen COI dari PL1, PL2, dan PL3



Gambar 2 Pohon filogenetik Maximum Likelihood dari sekuens penyandi parsial COI yang membandingkan *Polypedates leucomystax* (PL)

Tabel 1 Komposisi nukleotida fragmen parsial COI

Spesies katak	Nukleotida			
	A	C	G	T
PL1	87 (22.25 %)	111 (28 %)	71 (18.16 %)	122 (31.20 %)
PL2	153 (25.33 %)	153 (25.33 %)	95 (15.73 %)	202 (33.44 %)
PL3	137 (22.68 %)	175 (28.95 %)	104 (17.22 %)	188 (31.12 %)

Tabel 2 Jarak genetik

	1	2	3	4	5	6	7
<i>Bufo melanostictus</i>							
<i>Fejervarya cancrivora</i>	0.425						
<i>Limnonectes fujianensis</i>	0.379	0.310					
PL-1	0.392	0.343	0.357				
PL-2	0.339	0.324	0.336	0.323			
PL-3	0.393	0.339	0.352	0.005	0.314		
<i>Rhacophorus schlegelii</i>	0.376	0.383	0.274	0.278	0.303	0.274	

4. PEMBAHASAN

Sekuensing fragmen gen COI dilakukan secara langsung menggunakan primer *forward* dikarenakan primer tersebut merupakan primer spesifik untuk gen COI. Komposisi nukleotida yaitu T (31.92 %), C (27.43 %), A (23.42 %) dan G (17.03 %) merupakan tipikal komposisi mtDNA (Che *et al.* 2011). Sekuensing COI yang telah diamplifikasi dilakukan untuk menguatkan pernyataan bahwa spesimen yang ada adalah spesies *Polypedates leucomystax*. Analisis BLAST dilakukan pada hasil sekuen-sing menggunakan *database Bold System* yang menyediakan data sekuens fragmen DNA katak yang diamplifikasi menggunakan primer COI.

Hasil BLAST (*basic local alignment search tool*) menggunakan gen bank NCBI tidak menunjukkan homologi spesies yang baik, yaitu hanya menunjukkan 86 % homologi dengan spesies *Polypedates megacephalus*, sehingga digunakan database yang lain yaitu *Bold System*. Dari cara ini didapatkan homologi 95.75 % untuk spesies *Polypedates leucomystax*, menunjukkan bahwa amplifikasi gen COI *universal amphibian* dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies katak secara efektif, yaitu dengan tepat, akurat dan memiliki keterulangan yang tinggi (Dang *et al.* 2015).

Analisis filogenetik menggunakan metode Maximum Likelihood (ML) dapat menggambarkan kejelasan identifikasi suatu spesies, perbedaannya dibatasi oleh suatu *node* dan kluster. Suatu spesimen dari daerah yang berbeda dapat secara bersama-sama berada pada kluster yang sama (Che *et al.* 2011). Pohon filogenetik menunjukkan hubungan spesies berdasarkan kesamaan genetik. *Polypedates* terletak pada kluster sama dengan kelompok *Rhacoporus*

yang merupakan jenis katak pohon, dan berbeda dengan katak jenis lain (Gambar 2).

Analisis jarak genetik menggunakan metode analisis *pairwise maximum likelihood* dapat menjelaskan selisih jarak antara suatu populasi ataupun selisih jarak antara suatu spesies dengan membandingkan selisih jarak genetiknya, jika nilai jarak genetik kecil berarti mempunyai jarak genetik yang dekat (McFadden *et al.* 2010).

Penelitian ini menggunakan 3 sampel dengan spesies yang sama akan tetapi pada pohon filogenetik berada pada ranting yang sedikit berbeda. Jarak genetik antara spesies menunjukkan bahwa antara PL1 dan PL2 adalah 0.323, PL2 dengan PL 3 adalah 0.314, dan antara PL1 dengan PL3 memiliki jarak yang paling dekat yaitu 0.005 (Tabel 2). Walaupun PL1 dengan PL2 dan PL2 dengan PL3 pada pohon filogenetik menunjukkan satu spesies akan tetapi memiliki jarak genetik sedikit lebih jauh, hal ini dikarenakan mempunyai beberapa urutan sekuens yang berbeda yang antara lain dapat disebabkan oleh mutasi.

Analisis jarak genetik untuk melihat kekerabatan katak pohon PL diwakilkan oleh PL3 yang dibandingkan dengan spesies lain. PL pada pohon filogenetik berada pada kluster yang sama dengan katak jenis *Rhacoporus* yang mempunyai jarak genetik paling dekat dan berada pada satu famili *Rhacophoridae* atau keluarga katak pohon yang berarti berbeda dengan jenis katak lainnya. Jarak genetik berturut-turut dengan *Rhacophorus schlegelii*, *Limnonectes fujianensis*, *Fejervarya cancrivora*, *Bufo melanostictus* yaitu 0.274, 0.352, 0.339, 0.339, dan 0.393.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai N and Tewari RR. 2010. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *J Gen* 89: 51–54. DOI: 10.1007/s12041-010-0010-5
- Che J, Chen HM, Yang JX, Jin JQ, Jiang K, Yuan ZY, Murphy RW, dan Zhang YP. 2012. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Mol Ecol Res* 12: 247-258. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03090.x
- Dang NX, Sun FH, Lv YY, Zhao BH, Wang JC, Murphy RW, Wang WZ, and Li JT. 2015. DNA barcoding and the identification of tree frogs (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Informa Healthcare*, Early Online: 1–11. DOI:10.3109/19401736.2015.1041113
- Dian RW, Ibrohim MH, Dwi L. 2013. The observation of frog Species at State University of Malang as a preliminary effort on frog conservation. *J Trop Life Sci*. 3: 43 – 47.
- Hall BG. 2013. Building phylogenetic tree from molecular data with MEGA. *Mol Bio Evol* 30: 1229-1235
- Irawan F. 2008. Preferensi Habitat Berbiak Katak Pohon Bergaris (*Polypedates leucomystax gravenhorst* 1829) di Kampus IPB Dramaga Bogor. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kusrini MD. 2013. *Panduan Bergambar Identifikasi Amfibi Jawa Barat*. Bogor: Pustaka Media Konservasi.
- Marosi B, Sós T, Ghira IV, Damert A and Popescu O. 2010. Identification of COI partial sequences in two closely related frog species, *Rana dalmatina* and *Rana temporaria*. *Herpetologica Romanica* 4: 1-6.
- McFadden CS, Benayahu Y, Pante E, Thoma JN, Nevarez PA dan France SC. 2010. Limitations of mitochondrial gene barcoding in Octocorallia. *Mol Ecol Resour* 11: 19-31. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02875.x
- Park DS, Suh SJ, Oh HW dan Hebert PDN. 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics* 11:423. DOI: 10.1186/1471-2164-11-423
- Shen Y-Y, Chen X, Murphy RW. 2013. Assessing DNA Barcoding as a Tool for Species Identification and Data Quality Control. *PLoS ONE* 8(2): e57125. doi:10.1371/journal.pone.0057125
- Smith MA, Poyarkov-JR NA, Hebert PDN. 2008. COI DNA barcoding amphibian: take the chance, meet the challenge. *Mol Ecol Resour* 8:235-246
- 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. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739