



## IDENTIFIKASI DAN ANALISIS FILOGENTIK KERANG KIMA (GENUS *Tridacna*) DARI PULAU KUR MENGGUNAKAN DNA BARCODING

### IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF GIANT CLAMS (*Genus Tridacna*) FROM KUR ISLAND USING THE DNA BARCODE BARCODING

Teddy Triandiza<sup>1\*</sup>, Agus Kusnadi<sup>1</sup>, Hawis Madduppa<sup>2</sup>, Neviaty P. Zamani<sup>2</sup>, Udhi E.  
Hernawan<sup>1</sup>, Rosmi N. Pesillette<sup>3</sup>, Abdul Kadir Yamko<sup>3</sup>, Nurlita P. Anggraini<sup>2</sup>, Fildzah Z.  
Hulwani<sup>2</sup>, Ichtineza H. Hardono<sup>2</sup>, Risnita Tri Utami<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Pasir Putih Ancol Timur, 14430, Jakarta Utara

<sup>2</sup>IPB University, Jl. Raya Dramaga, 16680, Bogor

<sup>3</sup>Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Y. Syaranamual Guru Guru Poka, 97233, Ambon

<sup>4</sup>Universitas Prof. Dr. Hazarin, SH, Jl. Jendral Ahmad Yani No.1, 38115, Bengkulu

\*Corresponding author: teddy.triandiza27@gmail.com

Naskah Diterima: 4 Oktober 2020; Direvisi: 29 Juli 2021; Disetujui: 4 Oktober 2021

#### Abstrak

Peran penting kerang Kima secara ekologis sebagai salah satu spesies kunci dalam ekosistem terumbu karang menyebabkan biota laut ini mengalami tekanan antropogenik di sebagian besar wilayah di Indo-Pasifik, termasuk Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies Kima genus *Tridacna* asal Pulau Kur menggunakan marka gen COI dan menganalisis hubungan filogenetiknya. Sampel jaringan Kima diekstrak menggunakan kit ekstraksi komersial. Primer universal (LCO1490; HCO2198) dan primer spesifik Kima (LCO: 5'-GGG TGA TAA TTC GAA CAG AA-3'; RCO: 5'-TAG TTA AAG CCC CAG CTA AA-3') digunakan untuk mengamplifikasi DNA target. Analisis data dilakukan terhadap 26 sekuen Kima asal Pulau Kur dengan panjang fragmen 479 bp menggunakan *software* MEGA6 meliputi analisis jarak genetik dan pohon filogenetik. Hasil analisis homologi menggunakan BLASTn mendapatkan empat jenis Kima, yaitu *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *T. noae*, dan *T. squamosa* dengan similaritas 99–100%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jarak genetik dalam spesies sangat rendah berkisar 0,0000–0,0103 sedangkan jarak genetik antar spesies berkisar antara 0,0112–0,1729. Hasil konstruksi pohon filogenetik kerang Kima menunjukkan adanya dua klad utama yang kohesif dan jelas terpisah, yaitu kelompok *Tridacna* yang monofiletik dan *Hippopus hippopus*. Berdasarkan hasil penelitian, teknik DNA *Barcoding* sangat efektif untuk identifikasi dan mengkonfirmasi fenomena *cryptic species*.

**Kata kunci:** Antropogenik; COI; Filogenetik; Kerang Kima; Pulau Kur

#### Abstract

The role of the giant clam as the key and ecologically important species in coral reef ecosystem has led them to experience anthropogenic pressure in the most of Indo-pacific region including Indonesia. This research aimed to identify the species of giant clam *Tridacna* from Kur Island, Southeast Maluku by using COI gene marker and to analyze their phylogenetic relationship. The tissue sample of giant clam was extracted with a commercial extraction kit. Universal primer (LCO1490; HCO2198) and specific primer for giant clam (LCO: 5'-GGG TGA TAA TTC GAA CAG AA-3'; RCO: 5'-TAG TT AAG CCC CAG CTA AA-3') was used to amplify DNA target. Twenty-six sequences from Kur Island with 479 bp fragment length were analyzed by using MEGA6 software. Homological analysis on BLASTn found four species i.e *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *T. noae*, and *T. squamosa* with 99–100% similarity. The result also showed that genetic distance value intraspecies was very low ranging from 0.000 to 0.0105, while genetic distance inter-species ranged from 0.0112 to 0.1729. Reconstruction of phylogenetic tree of giant clam revealed two main group that cohesive and clearly separated i.e *Tridacna* group which monophyletic and *Hippopus hippopus*. Based on the result, the DNA barcoding technique was effective for identification and confirmation of the occurrence of cryptic species phenomenon.

**Keywords:** Anthropogenic; COI; Giant clam; Kur Island; Phylogenetic

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v15i1.17631>

## PENDAHULUAN

Kima merupakan spesies kunci di ekosistem terumbu karang karena memiliki peran penting secara ekologis (Neo et al., 2015). Menurut Aline (2008) dan Neo et al., (2015) Kima berkontribusi membangun topografi dan struktur terumbu karang. Biota ini berperan dalam peningkatan keanekaragaman hayati (Cabaitan et al., 2008) karena menjadi sumber makanan, daerah asuhan, dan perlindungan bagi invertebrata kecil juga ikan (Vicentuan-Cabaitan et al., 2014; Neo et al., 2015). Kima dimanfaatkan sebagai substrat bagi *epibionts* dan menjadi inang bagi organisme komensalisme (Vicentuan-Cabaitan et al., 2014; Neo et al., 2015). Kima juga berperan sebagai penyaring alami yang mampu mengendalikan bahan organik atau bahan pencemar yang terlarut dalam air laut (Neo et al., 2015).

Kima mengalami tekanan *antropogenik* di sebagian besar wilayah di Indo-Pasifik, termasuk Indonesia. Satu alasan yang mendasari meningkatnya kegiatan antropogenik terhadap Kima adalah nilai ekonomi yang tinggi. Daging Kima merupakan sumber makanan berprotein tinggi dan menjadi komoditi niaga di beberapa negara seperti Jepang, Hongkong, Australia, dan Amerika Serikat (Calumpang, 1992). Cangkang Kima semakin populer dalam perdagangan perhiasan dan kerajinan tangan (Nijman et al., 2015; Larson, 2016). Selain itu, anakan Kima hidup merupakan komoditas penting dan salah satu biota laut yang paling diperdagangkan untuk industri akuarium air laut (Wabnitz et al., 2003; Mies et al., 2017). Penangkapan yang berlebihan, hilangnya habitat terumbu karang, dan perdagangan cangkang Kima telah menyebabkan penurunan populasi Kima dan kepunahan secara lokal (Bin Othman et al., 2010; Larson, 2016; Neo et al., 2017).

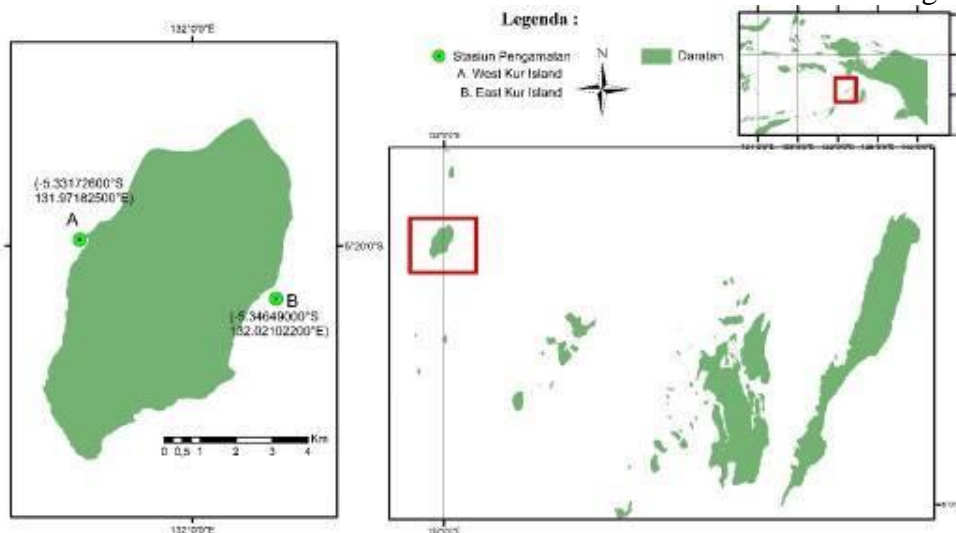
Tekanan antropogeni yang tinggi pada populasi Kima di alam tidak hanya menyebabkan penurunan jumlah spesies dan kelimpahan individu tetapi berpengaruh terhadap daya dukung ekosistem yang salah satunya ditemukan fenomena *cryptic species*. Fenomena *cryptic species* merupakan suatu yang umum ditemukan pada biota akuatik termasuk pada kerang Kima (Findra et al., 2017; Liu et al., 2020). Menurut Appeltans et al. (2012) sekitar 11–50% dari 80.000 spesies laut (49 taksa) menunjukkan fenomena *cryptic species*. Identifikasi berdasarkan karakter morfologi sering mengabaikan fenomena *cryptic species* karena secara morfologis memiliki kesamaan bentuk dan warna. Kesalahan mengidentifikasi *cryptic species* berimplikasi terhadap ancaman kepunahan karena kurangnya perlindungan. Teknik DNA *barcoding* merupakan metode identifikasi spesies melalui urutan sekuen barcode DNA dari gen COI (*Cytochrome c oxidase subunit-1*) DNA mitokondria (Hebert et al., 2003). Teknik ini sangat efektif digunakan menentukan identifikasi spesies terutama yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat (Hajbabaei et al., 2007). Amplifikasi fragmen gen COI telah banyak digunakan sebagai penanda kerang Kima (Findra et al., 2017; Neo et al., 2018; Othman et al., 2020; Liu et al., 2020).

Pulau Kur merupakan pulau yang terletak di gugusan Kepulauan Kei berada di antara 5°10'–5°35'LS dan 131°52'–132°2'BT. Pulau Kur memiliki potensi sumber daya laut yang tinggi karena berhubungan langsung dengan Laut Banda dan Laut Arafura. Laut Banda merupakan salah satu wilayah perairan yang sangat produktif, sering terjadi *upwelling* sehingga sangat berkontribusi bagi tingginya tingkat kesuburan perairan di daerah tersebut (Nontji, 1993; Wyrski, 1961). Laut Arafura masuk dalam perairan potensial karena berbatasan dengan Pantai Barat Papua yang banyak mendapat kontribusi dari muara-muara sungai. Kerang Kima merupakan biota laut yang terancam punah (Eliata et al., 2003) yang masih dapat ditemukan di Perairan Pulau Kur (Triandiza et al., 2019). Kusnadi et al. (2008) menyatakan bahwa moluska khususnya kerang Kima secara tradisional telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir sebagai sumber makanan, bahan konstruksi, dan keperluan adat istiadat. Informasi ilmiah mengenai jenis-jenis kerang Kima yang menjadi potensi sumber daya laut Pulau Kur belum banyak terpublikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies Kima genus *Tridacna* asal Pulau Kur menggunakan marka gen COI dan merekonstruksi pohon filogenetik untuk menganalisa hubungan kekerabatannya.

## MATERIAL DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di perairan Kepulauan Kei dengan *study site* perairan Pulau Kur bagian Barat (-5,33172600°S; 131,97182500°E) dan Pulau Kur bagian Timur (-5,34649000°S; 132,02102200°E) pada November 2017 (Gambar 1). Sampel Kima yang digunakan untuk analisis genetik molekuler adalah jaringan mantel ( $\pm 1$  cm) yang dipotong menggunakan gunting bedah. Sampel jaringan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung sampel ukuran 5 mL dan dipreservasi dengan alkohol 96%. Sampel genetik molekuler dikerjakan di Laboratorium Biodiversitas dan Biosistemika Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.



**Gambar 1.** Lokasi penelitian kerang Kima (Genus *Tridacna*) di Pulau Kur, Kepulauan Kei

### Ekstraksi DNA, PCR, dan Sekuensing

Sebanyak 26 sampel kerang Kima diisolasi dan diekstraksi menggunakan panduan standar dari kit komersial GeneAid. Hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer yang digunakan adalah primer untuk invertebrata LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' dan HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (Folmer et al., 1994). Primer ini hanya mampu mengamplifikasi spesies *T. maxima*, sehingga menggunakan primer lain, yaitu primer spesifik untuk Kima LCO: 5'-GGG TGA TAA TTC GAA CAG AA-3' dan RCO: 5'-TAG TTA AAG CCC CAG CTA AA-3' (Kochzius & Nuryanto, 2008). Target gen COI yang teramplifikasi sepanjang  $\pm 700$  bp untuk primer LCO1490 dan HCO2198 dan  $\pm 500$  bp untuk primer LCO dan RCO. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR dengan kondisi predenaturasi 94 °C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 94 °C selama 1 menit, *annealing* (penempelan) 43 °C selama 90 detik dan ekstensi 72 °C selama 1 menit serta ekstensi akhir 72 °C selama 5 menit (Nuryanto et al., 2007).

Kualitas hasil amplifikasi PCR selanjutnya diuji menggunakan metode elektroforesis. Teknik ini menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi gel 1% yang dilarutkan dalam *buffer Tris Acetate EDTA* (TAE) dengan pewarna *ethidium bromide* (EtBr). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V dan arus listrik 400 mA selama 20 menit dan kemudian divisualisasikan menggunakan mesin Gel Doc. Hasil amplifikasi PCR yang positif kemudian dikirim ke perusahaan jasa *sequencing* (First Base Malaysia) untuk dilakukan *sequencing* dengan menggunakan metode Sanger.

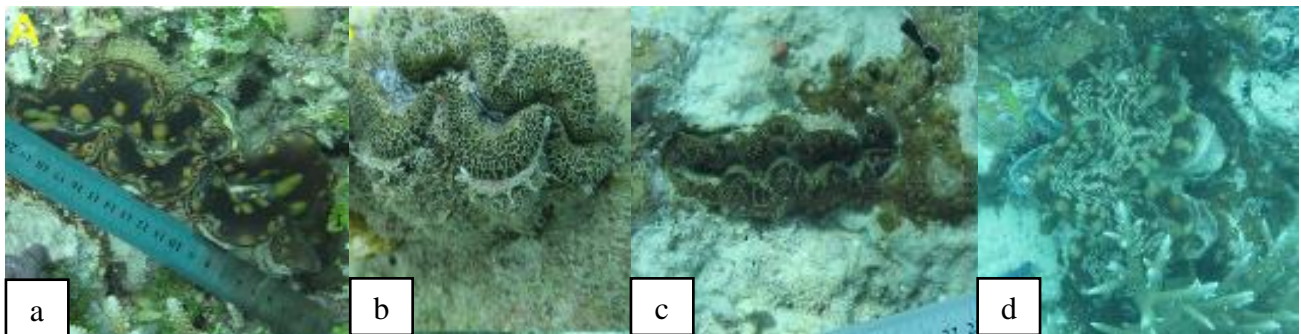
### Analisis Genetik

Konfirmasi hasil sekuensing dan pensejajaran sekuen DNA dilakukan menggunakan program *Clustal W* dari *software Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6* (MEGA 6) (Tamura et al., 2013). Identifikasi spesies dilakukan dengan *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) untuk mengetahui kecocokan sekuen DNA target dengan sekuen DNA pada basis data (*GenBank*). Sekuen Kima dari Pulau Kur kemudian dibandingkan dengan beberapa sekuen dari *GenBank T*.

*maxima* (Accession EU003613.1), *T. noae* (Accession MG385538.1), *T. crocea* (Accession KY769522.1), *T. squamosa* (Accession KY769523.1), *T. gigas* (Accession EU003616.1), *T. derasa* (Accession KJ202112.1), *Hippopus hippopus* (Accession KJ202106.1), dan *out group Anadara antiquata* (Accession AB050895.1) (Keyse et al., 2018; Findra et al., 2017; Lizano & Santos, 2014; Nuryanto et al., 2007; Matsumoto & Hayami, 2001). Identifikasi dilanjutkan dengan analisis pohon filogenetik dan analisis jarak genetik berdasarkan Kimura-2-parameter menggunakan *software* MEGA 6. Pohon filogenetik dibangun berdasarkan metode *Neighbour Joining* model evolusi *P-distance* dan replikasi *bootstraps* 1000x melalui *software* Mega 6 (Tamura et al., 2013).

## HASIL

Hasil penelitian mendapatkan 26 sampel Kima berhasil diamplifikasi dengan panjang nukleotida 493–691 bp, namun data panjang fragmen DNA sampel yang dianalisis adalah 479 bp. Hasil identifikasi spesies terhadap 26 sekuen Kima asal Pulau Kur menggunakan BLAST mendapatkan 4 spesies Kima, yaitu 15 sekuen spesies *Tridacna maxima*, enam sekuen spesies *T. crocea*, empat sekuen spesies *T. noae*, dan satu sekuen spesies *T. squamosa* (Gambar 2). Hasil analisis homologi menunjukkan kemiripan yang hampir identik, yaitu 99–100% dengan *GenBank* (Tabel 1).



**Gambar 2.** Spesies Kima asal Pulau Kur berdasarkan analisis BLASTn, yaitu *Tridacna maxima* (a), *T. noae* (b), *Tridacna crocea* (c), dan *T. squamosa* (d)

**Tabel 1.** Hasil analisis homologi berdasarkan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) terhadap sekuen Kima asal Pulau Kur

Kode sampel	Analisis BLAST	Query cover	Similarity (%)	GenBank accession
KUR Kima Tm 01	<i>Tridacna crocea</i> Lamarck, 1819	96%	99,16%	KY769519.1
KUR Kima Tm 02	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	95%	99,54%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 03	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	93%	99,38%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 04	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	97%	99,25%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 05	<i>T. noae</i> (Röding, 1798)	94%	99,79%	MF969246.1
KUR Kima Tm 06	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	91%	99,20%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 07	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	95%	99,09%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 08	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	94%	99,23%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 09	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	93%	99,54%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 10	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	96%	99,85%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 11	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	97%	99,59%	FM244537.1
KUR Kima Tm 12	<i>T. noae</i> (Röding, 1798)	95%	100%	MF969246.1
KUR Kima Tm 13	<i>T. noae</i> (Röding, 1798)	94%	99,79%	MF969246.1
KUR Kima Tm 14	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	97%	99,17%	FM244555.1
KUR Kima Tm 15	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	96%	98,94%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 16	<i>T. noae</i> (Röding, 1798)	94%	100%	MF969246.1
KUR Kima Tm 17	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	94%	99,08%	DQ155301.2
KUR Kima Tm 18	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	95%	99,08%	DQ155301.2
KUR Kima Tc 01	<i>T. crocea</i> Lamarck, 1819	96%	98,96%	DQ269479.1

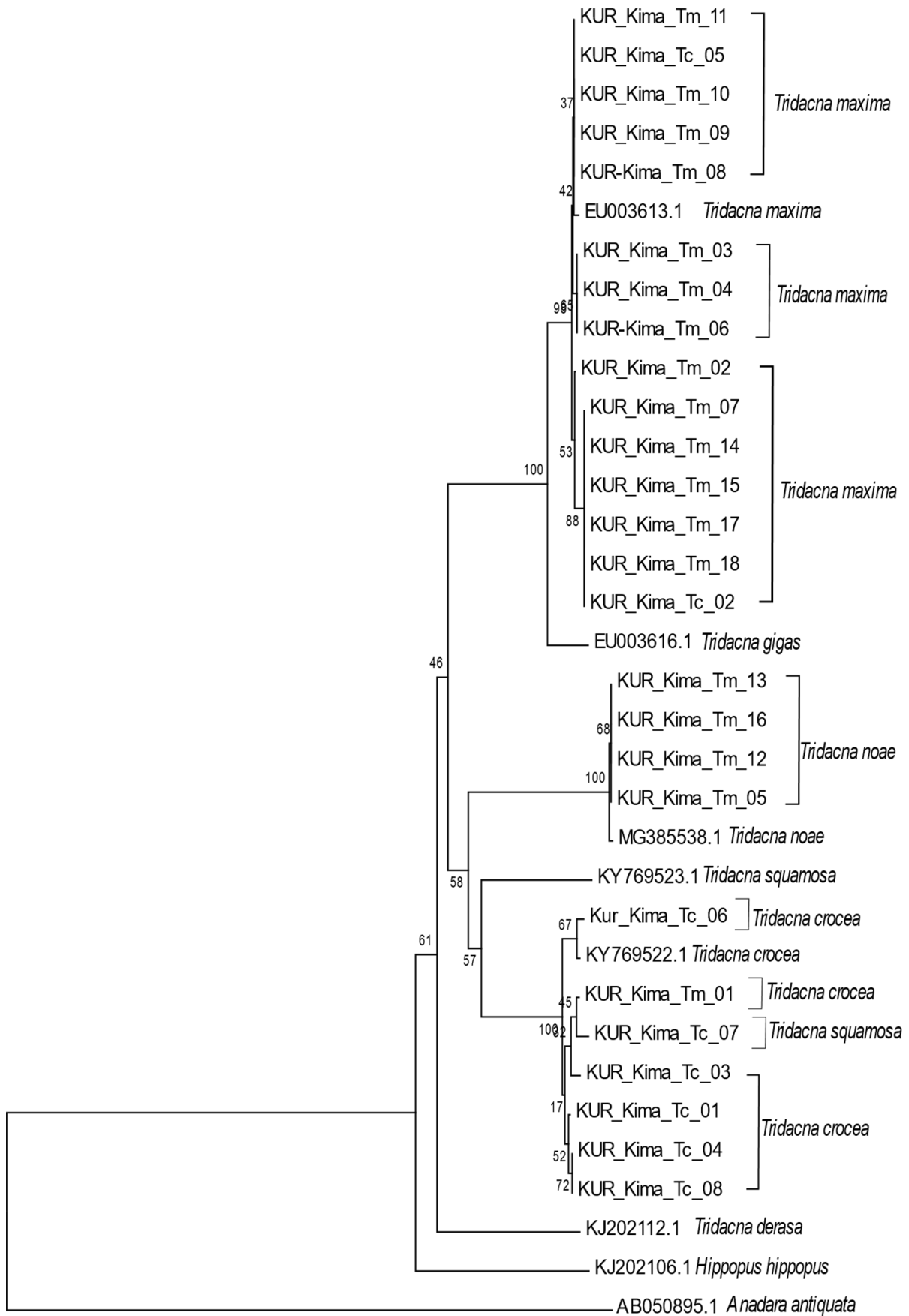
Kode sampel	Analisis BLAST	Query cover	Similarity (%)	GenBank accession
KUR Kima Tc 02	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	96%	99,39%	DQ155301.2
KUR Kima Tc 03	<i>T. crocea</i> Lamarck, 1819	94%	99,36%	MF969192.1
KUR Kima Tc 04	<i>T. crocea</i> Lamarck, 1819	96%	99,17%	DQ269479.1
KUR Kima Tc 05	<i>T. maxima</i> (Röding, 1798)	96%	99,55%	DQ155301.2
KUR Kima Tc 06	<i>T. crocea</i> Lamarck, 1819	97%	98,51%	MK249738.1
KUR Kima Tc 07	<i>T. squamosa</i> Lamarck, 1819	96%	98,75%	EU003615.1
KUR Kima Tc 08	<i>T. crocea</i> Lamarck, 1819	95%	99,16%	DQ269479.1

**Tabel 2.** Komposisi nukleotida kerang Kima asal Pulau Kur

Spesies Kima	Kode sampel	T(U)	C	A	G
<i>T. maxima</i>	KUR Kima Tm 02	35,1	17,5	27,3	20,0
	KUR Kima Tm 03	35,5	17,1	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 04	35,5	17,1	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 06	35,5	17,1	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 07	35,1	17,5	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 08	35,3	17,3	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 09	35,3	17,3	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 10	35,3	17,3	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 11	35,3	17,1	27,1	20,5
	KUR Kima Tm 14	35,1	17,3	27,1	20,5
	KUR Kima Tm 15	35,1	17,5	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 17	35,1	17,5	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 18	35,1	17,5	27,6	19,8
	KUR Kima Tc 02	35,1	17,5	27,6	19,8
<i>T. crocea</i>	KUR Kima Tc 05	35,3	17,3	27,6	19,8
	KUR Kima Tm 01	36,3	17,3	25,5	20,9
	KUR Kima Tc 01	36,1	17,5	25,7	20,7
	KUR Kima Tc 03	36,1	17,5	25,3	21,1
	KUR Kima Tc 04	36,3	17,3	25,7	20,7
	KUR Kima Tc 06	36,3	17,5	25,7	20,5
	KUR Kima Tc 08	36,3	17,3	25,7	20,7
	KUR Kima Tm 05	33,8	18,8	25,7	21,7
<i>T. noae</i>	KUR Kima Tm 12	34,0	18,8	25,5	21,7
	KUR Kima Tm 13	33,8	18,8	25,7	21,7
	KUR Kima Tm 16	33,8	18,8	25,7	21,7
<i>T. squamosa</i>	KUR Kima Tc 07	35,6	18,0	25,5	20,9
Rata-rata komposisi nukleotida		35,3	17,6	26,7	20,4

**Tabel 3.** Analisis jarak genetik *intra species* dan *inter species* kerang Kima asal Pulau Kur berdasarkan metode Kimura 2 Parameter

Jarak genetik	Spesies Kima	<i>T. maxima</i>	<i>T. crocea</i>	<i>T. noae</i>	<i>T. squamosa</i>
<i>Intra species</i>	<i>T. maxima</i>	0,0049	-	-	-
	<i>T. crocea</i>	-	0,0103	-	-
	<i>T. noae</i>	-	-	0.0000	-
	<i>T. squamosa</i>	-	-	-	NC
<i>Inter species</i>	<i>T. maxima</i>	-	-	-	-
	<i>T. crocea</i>	0,1492	-	-	-
	<i>T. noae</i>	0,1729	0, 1598	-	-
	<i>T. squamosa</i>	0,1591	0,0112	0,1654	-



0.05

**Gambar 2.** Konstruksi pohon filogenetik sekuen Kima asal Pulau Kur menggunakan metode *Neighbour Joining* dengan model p-distance, nilai bootstrap 1000 ulangan

Hasil penyelarasan 26 sekuen sepanjang 479 pasang basa fragmen gen COI DNA mitokondria dari empat spesies Kima asal Pulau Kur terdapat 376 situs nukleotida yang konservatif (*conserve sites*), 102 situs nukleotida yang bervariasi (*variable sites*), 99 situs parsimoni, tiga situs singleton, dan satu situs *missing data/gap*. Situs yang bervariasi pada pensejajaran sekuen DNA menunjukkan adanya mutasi pada nukleotida. Mutasi substitusi terbagi dalam dua tipe, yaitu substitusi transisi dan substitusi transvers. Substitusi transisi merupakan pergantian basa nukleotida A dan G (purin) atau C dan T (pirimidin) sedangkan mutasi transvers merupakan pergantian basa nukleotida kelompok purin menjadi nukleotida kelompok pirimidin atau sebaliknya. Hasil pengukuran juga menunjukkan probabilitas substitusi transisi lebih besar dari pada substitusi transvers.

Komposisi nukleotida rata-rata yang ditemukan pada fragmen COI Kima asal Pulau Kur adalah nukleotida Timin (T) sebesar 35,3%, Cytosin (C) 17,6%, Adenin (A) 26,7%, dan Guanin (G) sebesar 20,4%. Komposisi nukleotida untuk setiap sampel dapat dilihat pada Tabel 2. Pasangan basa nukleotida A + T mempunyai kandungan nukleotida yang paling dominan dengan jumlah rata-rata 62% sedangkan terendah adalah pasangan G + C dengan jumlah rata-rata 38%.

Jarak genetik menunjukkan kedekatan kekerabatannya. Hasil analisis jarak genetik antara individu Kima dalam satu spesies maupun antar spesies berdasarkan Kimura 2 parameter disajikan pada Tabel 3. Jarak genetik antar individu dalam spesies (*intra species*) berkisar 0,0000 (*T. noae*) hingga 0,0103 (*T. crocea*). Jarak genetik antara spesies (*inter species*) terendah terjadi pada *T. crocea* dengan *T. squamosa* (0,0112) dan tertinggi antara *T. maxima* dengan *T. noae* (0,1729).

Konstruksi pohon filogenetik menggunakan 34 sekuen gen COI DNA mitokondria terdiri delapan spesies, dua genus, dari subfamilia *Tridacninae* dan *outgrup Anadara antiquata* dengan panjang sekuen 392 bp. Analisis filogenetik berdasarkan metode *Neighbour Joining* secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa Kima mengelompok berdasarkan genus, yaitu klad pertama terdiri atas kelompok genus *Tridacna* sedangkan klad kedua adalah genus *Hippopus*. Kedua klad tersebut terpisah dari *outgroupnya*, yaitu *A. Antiquata*. Rekonstruksi pohon filogenetik juga menunjukkan bahwa Kima genus *Tridacna* merupakan monofiletik, di mana *T. maxima* dan *T. gigas* berada dalam satu *subklad*, *T. noae*, *T. crocea*, dan *T. squamosa* mengelompok menjadi satu *subklad* lainnya, sedangkan *T. derasa* terpisah membentuk *subklad* tersendiri.

## PEMBAHASAN

Identifikasi menggunakan BLASTn mendapatkan hasil yang berbeda dibandingkan identifikasi menggunakan morfologi berdasarkan Copland dan Lucas (1988) serta Knop (1996). Hasil identifikasi berdasarkan morfologi hanya mendapatkan dua spesies Kima, yaitu *T. maxima* dan *T. crocea* sedangkan identifikasi dengan BLASTn mendapatkan empat spesies Kima, yaitu *T. maxima*, *T. noae*, *T. crocea*, dan *T. squamosa*. Sampel dengan kode KUR Kima Tm 05, KUR Kima Tm 12, KUR Kima Tm 13, dan KUR Kima Tm 16 awalnya diidentifikasi sebagai *T. maxima*, setelah dilakukan BLASTn menunjukkan bahwa Kima tersebut adalah *T. noae*. Kima *T. noae* telah lama diketahui bersifat *cryptic species* karena memiliki banyak kesamaan karakteristik morfologi dan preferensi habitat dengan *T. maxima*. Spesies Kima ini banyak dikenal dengan nama komersil *Tear Drops T. maxima*. Hasil penelitian Su et al. (2014) dan Borsa et al. (2015) menemukan bukti terbaru bahwa *T. noae* merupakan spesies yang valid terpisah dari *T. maxima* berdasarkan basa nukleotida, pola mantel, dan isolasi reproduksi. Kima *T. noae* di Indonesia ditemukan di Laut Sulawesi, Laut Maluku, dan Laut Sawu (Borsa et al. 2015). Temuan *T. noae* di Pulau Kur menambah lebih banyak informasi tentang distribusi geografis *T. noae* di Indonesia. Fenomena *cryptic species* (hampir mirip) pada kerang kima umumnya terjadi secara morfologi tetapi secara genetik sangat berbeda atau sebaliknya. Bickford et al. (2006) menyatakan bahwa fenomena *cryptic species* mengakibatkan terjadinya kesalahan identifikasi. Pemecahan masalah tersebut dapat diuji secara molekuler berdasarkan marka genetik COI (Nuryanto et al., 2007).

Sampel KUR Kima Tm 01 teridentifikasi secara morfologi *T. maxima* yang setelah di BLASTn teridentifikasi *T. crocea*. Sampel dengan kode KUR Kima Tc 02, KUR Kima Tc 05 dan KUR Kima Tc 07, awalnya teridentifikasi *T. crocea*, setelah dianalisa homologi dengan BLASTn

teridentifikasi *T. maxima* dan *T. squamosa*. *Tridacna maxima*, *T. crocea*, dan *T. squamosa* memiliki kemiripan secara morfologi dan preferensi habitat. Kelompok Kima ini memiliki ciri cangkang bersisik dan cara hidup membenamkan cangkangnya ke dalam substrat. Pada ukuran dewasa muda sangat sulit membedakan ketiga spesies ini, karena selain berukuran sangat kecil, cangkang Kima ini tertanam di dalam substrat sehingga hanya terlihat mantel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis DNA *Barcoding* sangat efektif digunakan untuk identifikasi sampai tingkat spesies dengan tingkat kebenaran yang tinggi dan membantu pengungkapan fenomena *cryptic species*.

Berdasarkan komposisi nukleotida, ke-4 jenis Kima hasil BLASTn memiliki basa nukleotida yang tidak sama. Komposisi nukleotida rata-rata yang ditemukan pada fragmen COI *T. maxima* adalah T sebesar 35,2 %, C (17,4%), A (27,5%), dan G (19,9%), dengan komposisi nukleotida A + T= 62,71% dan G + C= 37,29%. Kima *T. crocea* memiliki komposisi nukleotida T (36,3 %), C (17,4%), A (25,6%), dan G (20,7%), dengan komposisi nukleotida A + T= 61,82% dan G + C= 38,17%. *Tridacna squamosa* memiliki komposisi nukleotida T (35,6 %), C (18,0%), A (25,5%), dan G (20,9%), dengan komposisi nukleotida A + T= 59,50% dan G + C= 40,50% sedangkan *T. noae* memiliki komposisi nukleotida T (33,9 %), C (18,8%), A (25,6%), dan G (21,7%), dengan komposisi nukleotida A + T= 61,09% dan G + C= 38,91%. Komposisi nukleotida A + T terbesar terdapat pada Kima *T. maxima* sedangkan komposisi nukleotida G + C terbesar terdapat pada Kima *T. squamosa*. Komposisi nukleotida dapat digunakan untuk mendukung identifikasi Kima karena perbedaan komposisi nukleotida menunjukkan adanya variasi pada situs-situs nukleotida. Situs yang bervariasi tersebut menjadi penciri spesifik yang dapat membedakan spesies Kima. Menurut Kombong dan Arisuryanti (2018) perbedaan komposisi nukleotida gen mitokondria COI mengindikasikan adanya variasi genetik.

Jarak genetik dari seluruh sampel kerang Kima pada penelitian ini sangat rendah berkisar 0,0000–0,0103 sedangkan jarak genetik antar spesies pada penelitian ini berkisar antara 0,0112–0,1729. Nei (1972) menyatakan bahwa nilai jarak genetik 0,010–0,099 masuk dalam kategori rendah. Semakin rendah nilai dari jarak genetik yang diperoleh, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antara populasi tersebut. Hasil analisis jarak genetik mendapatkan bahwa jarak genetik *T. crocea* dan *T. squamosa* sangat rendah hanya berkisar 0,006–0,011. Berdasarkan Nei (1972) menunjukkan bahwa kedua spesies Kima tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang dekat atau merupakan spesies yang sama. Hasil tersebut berbeda dengan identifikasi menggunakan BLASTn yang menunjukkan kedua Kima tersebut merupakan spesies yang terpisah. Setelah dilakukan perbandingan dengan data *T. squamosa* (Accession KY769523.1) dari *GenBank*. Hasil analisis jarak genetik menunjukkan bahwa *T. squamosa* asal Pulau Kur terbukti merupakan *T. crocea* yang berbeda dengan *T. suamosa* dari *GenBank* dengan jarak genetik (12%). Hebert et al. (2003) menyatakan bahwa suatu organisme dinyatakan sebagai spesies yang berbeda jika jarak genetik berdasarkan sekuen gen COI lebih dari 2%. Berdasarkan Tabel 3, jarak genetik *T. maxima* dengan *T. noae* merupakan jarak genetik antar spesies tertinggi (17%). Hasil pengamatan morfologi dan preferensi habitat *T. maxima* memiliki kemiripan dengan *T. noae*, namun jarak genetik menyatakan bahwa keduanya sebagai spesies yang berbeda.

Analisa berdasarkan pohon filogenetik pada Kima menunjukkan bahwa semua kerang Kima anggota genus *Tridacna* adalah kelompok monofiletik (Nuryanto et al., 2007; Lizano & Santos, 2014; Findra et al., 2017) yang mengelompok menjadi tiga subgenus, yaitu *Tridacna sensu strict*, *Persikima*, dan *Chametrachea* (Hernawan, 2012). Rekonstruksi pohon filogenetik pada Gambar 2, mengkonfirmasi bahwa *T. maxima* dan *T. noae* merupakan spesies yang terpisah. Kima *T. maxima* mengelompok dengan *T. gigas* sedangkan *T. noae* mengelompok dengan *T. squamosa* dan *T. crocea*. Hasil pensejajaran nukleotida sepanjang 479 pasang basa fragmen gen COI DNA mitokondria mendukung hasil identifikasi tersebut, yakni terdapat 66 situs nukleotida yang bervariasi antar *T. maxima* dan *T. noae*.

Pohon filogenetik juga menunjukkan variasi genetik pada Kima. Kajian filogenetik menunjukkan bahwa *T. maxima* membentuk dua kelompok dan *T. crocea* membentuk tiga kelompok. Pada *T. maxima*, kelompok pertama terdiri dari sampel Kima Kur Tm 11, Kima Kur Tc 05, Kima Kur Tm 10, Kima Kur Tm 09, Kima Kur Tm 08, *T. maxima* (*GenBank*), Kima Kur Tm



03, Kima Kur Tm 04, dan Kima Kur Tm 06. Sedangkan kelompok kedua terdiri dari sampel Kima Kur Tm 02, Kima Kur Tm 07, Kima Kur Tm 14, Kima Kur Tm 15, Kima Kur Tm 17, Kima Kur Tm 18, dan Kima Kur Tc 02. Kima *T. crocea*, kelompok pertama terdiri Kima Kur Tc 06 dan *T. crocea GenBank*. Kelompok kedua terdiri dari Kima Kur Tm 01, Kima Kur Tc 07 (*T. squamosa*), dan Kima Kur Tc 03. Sedangkan kelompok ketiga terdiri dari Kima Kur Tc 01, Kima Kur Tc 04, dan Kima Kur Tm 08. Variasi genetik yang ditunjukkan pada pohon filogenetik disebabkan adanya mutasi pada urutan basa nukleotida (polimorfisme). *Tridacna maxima* terdapat 11 situs nukleotida yang bervariasi, yaitu pada situs 001, 003, 006, 011, 012, 021, 117, 174, 249, 288, dan 479 sedangkan pada *T. crocea* terdapat 11 situs nukleotida yang bervariasi, yaitu situs 001, 011, 120, 141, 171, 195, 276, 366, 387, 392, dan 479. Situs nukleotida yang bervariasi menunjukkan keragaman genetik yang berbeda sehingga dapat dijadikan sumber kekayaan genetik dalam pengelolaan konservasi Kima.

## SIMPULAN DAN SARAN

Analisis secara molekuler terhadap 26 sekuen Kima asal Pulau Kur mendapatkan empat spesies, yaitu *T. maxima*, *T. crocea*, *T. noae*, dan *T. squamosa*. Analisis jarak genetik dan pohon filogenetik sangat efektif mengkonfirmasi fenomena *cryptic species* *T. maxima* dan *T. noae* yang secara morfologi merupakan satu spesies yang sama, yaitu *T. maxima* tetapi secara genetik merupakan spesies yang berbeda. Analisis pohon filogenetik menunjukkan kerang Kima membentuk kelompok yang kohesif dan jelas terpisah, kecuali pada sampel Kur Kima Tc 07 yang teridentifikasi berdasarkan BLASTn *T. squamosa* namun tergabung dalam *clade T. crocea*. Teknik DNA Barkoding sangat efektif untuk identifikasi, mengkonfirmasi fenomena *cryptic species* dan mengindikasikan variasi genetik. Penelitian ini hanya mengkaji aspek morfologi dan genetika dalam identifikasi jenis kerang Kima, namun belum diketahui faktor-faktor yang memengaruhinya seperti bagaimana pengaruh lingkungan terhadap perbedaan pola mantel, apakah ada aliran gen dan konektivitas genetik antar populasi kerang Kima dari perairan sekitar terhadap populasi genetik kerang Kima di Pulau Kur serta peranannya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tulisan merupakan kontribusi dari kegiatan penelitian Tesis struktur populasi dan keragaman genetik kerang Kima (*Cardiidae: Tridacninae*) di Perairan Kepulauan Kei Maluku. Penulis berterima kasih kepada UPT Loka Konservasi Biota Laut Tual karena memfasilitasi pengumpulan sampel dalam penelitian ini. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Aliyadi, Mohammad Silayar, Roni Nahusona, dan Bikri Rahman Pary atas bantuan di lapangan. Terima kasih kepada Laboratorium Keanekaragaman Hayati dan Keanekaragaman Hayati Universitas IPB untuk pekerjaan laboratorium. Sebagian dari penelitian ini dibiayai oleh LIPI's COREMAP-CTI 2021–2022 (17/A/DK/2021).

## REFERENSI

- Aline, T. (2008). Dissolution of dead corals by euendolithic microorganisms across The Northern Great Barrier Reef (Australia). *Microbial Ecology*, 55(4), 569-580. doi:10.1007/s00248-007-9302-6.
- Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., ... Berta, A. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology*, 22(23), 2189-2202. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.036.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winkler, K., ... Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Ecology and Evolution*, 22(3), 148-155. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Bin Othman, A. S., Goh, G. H. S., & Todd, P. A. (2010). The distribution and status of giant clams (Family *Tridacnidae*), a short review. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 58(1), 103-111.
- Borsa, P., Fauvelot, C., Tiavouane, J., Grulois, D., Wabnitz, C., Naguit, M.R.A., & Andrefouet, S. (2015). Distribution of Noah's giant clam, *Tridacna noae*. *Marine Biodiversity*, 45, 339-344. doi: 10.1007/s12526-014-0265-9.

- Cabaitan, P. C., Gomez, E. D., & Alino, P. M. (2008). Effects of coral transplantation and giant clam restocking on the structure of fish communities on degraded patch reefs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357(1), 85-98. doi: 10.1016/j.jembe.2008.01.001.
- Calumpong, H. P. (1992). *The giant clam: An ocean culture manual*. Canberra (AU): ACIAR Monograph 16.
- Copland, J. W., & Lucas, J. S. (1988). *Giant clams in Asia and the Pacific*. Canberra (AU): ACIAR Monograph 9.
- Eliata, A., Zahida, F., Wibowo, N. J., & Panggabean, L. M. G. (2003). Abundance of giant clam in coral reef ecosystem at Pari Island: A population comparison of 2003's to 1984's data. *Biota*, 8(3), 149-152. doi: 10.24002/biota.v8i3.2859.
- Findra, M. N., Setyobudiandi, I., Butet, N. A., & Solihin, D. D. (2017). Genetic profile assessment of giant clam genus *Tridacna* as a basis for resource management at Wakatobi National Park Waters. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 22(2), 67-74. doi: 10.14710/ik.ijms.22.2.67-74.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Hajbabaie, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics, and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172. doi: 10.1016/j.tig.2007.02.001.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of Royal Society B*, 270(1512), 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hernawan, U. E. (2012). Taxonomy of Indonesian giant clams (*Cardiidae*, *Tridacninae*). *Biodiversitas*, 13(3), 118-123. doi: 10.13057/biodiv/d130303.
- Keyse, J., Treml, E. A., Huelsken, T., Barber, P. H., DeBoer, T., Kochzius, M., ... Riginos, C. (2018). Historical divergences associated with intermittent land bridges overshadow isolation by larval dispersal in co-distributed species of *Tridacna* giant clams. *Journal of Biogeography*, 45(4), 848-858. doi:10.1111/jbi.13163.
- Knop, D. (1996). *Giant clams, a comprehensive guide to the identification and care of Tridacnid clams*. Ettlingen (PR): Dahne Verlag.
- Kochzius, M., & Nuryanto, A. (2008). Strong genetic population structure in the boring giant clam, *Tridacna crocea*, across the Indo-Malay Archipelago: Implications related to evolutionary processes and connectivity. *Molecular Ecology*, 17(17), 3775-3787. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03803.x.
- Kombong, C. B. S., & Arisuryanti, T. (2018). Komposisi nukleotida sekuen gen mitokondria *16S* dan *coi* ikan gabus (*Channa striata* Bloch, 1793) dari Danau Sentani, Jayapura, Papua. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 20(2), 57-62. doi: 10.22146/jfs.35551.
- Kusnadi, A., Triandiza T., & Hernawan, U. E. (2008). The inventory of mollusc species and its potent on seagrass bed in Kei Kecil Islands, Southeast Moluccas. *Biodiversitas*, 9(1), 30-34. doi: 10.13057/biodiv/d090108.
- Larson, C. (2016). Shell trade pushes giant clams to the brink. *Science*, 351(6271), 323-324. doi: 10.1126/science.351.6271.323
- Liu, J., Cui, D., Wang, H., Chen, J., Liu, H., & Zhang, H. (2020). Extensive cryptic diversity of giant clams (*Cardiidae: Tridacninae*) revealed by DNA-sequence-based species delimitation approaches with new data from Hainan Island, South China Sea. *Journal of Molluscan Studies*, 86(1), 56-53. doi:10.1093/mollus/eyz033
- Lizano, A. M., & Santos, M. D. (2014). Updates on the status of giant clams *Tridacna* spp. and *Hippopus hippopus* in the Philippines using mitochondrial *col* and *16S* rRNA genes. *Philippine Science Letters*, 7(1), 187-200.
- Matsumoto, M., & Hayami, I. (2001). Title molecular phylogenetics and taxonomic characters of the *Anadarinae*. *Fossils*, 69, 25-34.

- Mies, M., Dor, P., Güth, A. Z., & Sumida, P. Y. G. (2017). Production in giant clam aquaculture: Trends and challenges. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 25(4), 1-1.1 doi: 10.1080/23308249.2017.1285864.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-293. doi:10.1086/282771
- Neo, M. L., Eckman, W., Vicentuan, K., Teo, S.L.M., & Todd PA. (2015). The ecological significance of giant clams in coral reef ecosystems. *Biological Conservation*, 181, 111-123. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.004.
- Neo, M. L., Wabnitz, C. C. C., Braley, R. D., Heslinga, G. A., Fauvelot, C., Wynsberghe, S. V., ... Todd, P. A. (2017). Giant clams (*Bivalvia: Cardiidae: Tridacninae*): A comprehensive update of species and their distribution, current threats and conservation status. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 55, 87-388.
- Neo, M. L., Liu, L. L., Huang, D., & Soong, K. (2018) Thriving populations with low genetic diversity in giant clam species, *Tridacna maxima* and *Tridacna noae*, at Dongsha Atoll, South China Sea. *Regional Studies in Marine Science*, 24, 278-28. doi: 10.1016/j.rsma.2018.09.001.
- Nontji, A. (1993). *Laut nusantara*. Jakarta: Djambatan.
- Nijman, V., Spaan, D., & Nekaris, K. A. I. (2015). Large scale trade in legally protected marine mollusc shells from Java and Bali, Indonesia. *Plos ONE* 10(12), e0140593. doi: 10.1371/journal.pone.0140593.
- Nuryanto, A., Duryadi, D., Soedharma, D., & Bloom, D. (2007). Molecular phylogeny of giant clams based on mitochondrial DNA cytochrome c oxidase I gene. *HAYATI Journal of Biosciences*, 14(4), 162-166. doi:10.4308/hjb.14.4.162.
- Othmen, A. B., Abhary, M., Deli, T., Ouanes, Z., Alhuwaiti, N., Dimassi, N., & Mansour, L. (2020). Lack of mitochondrial genetic structure in the endangered giant clam populations of *Tridacna maxima* (*Bivalvia: Cardiidae: Tridacninae*) across the Saudi Arabian coast. *Acta Oceanologica Sinica*, 39(2), 28-37. doi: 10.1007/s13131-020-1547-7.
- Su, Y., Hung, J. H., Kubo, H., & Liu, L.-L. (2014). *Tridacna noae* (Röding, 1798) - a valid giant clam species separated from *T. maxima* (Röding, 1798) by morphological and genetic data. *Raffles Bulletin of Zoology*, 62, 124-135.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Triandiza, T., Zamani, N. P., Madduppa, H., & Hernawan, U.E. (2019). Distribution and abundance of the giant clams (*Cardiidae: Bivalvia*) in Kei Islands, Maluku, Indonesia. *Biodiversitas*, 20(3), 884-892. doi: 10.13057/biodiv/d200337.
- Vicentuan-Cabaitan, K., Neo, M. L., Eckman, W., Teo, S. L. M., & Todd, P. A. (2014). Giant clam shells host a multitude of epibionts. *Bulletin of Marine Science*, 90(3), 795-796. doi: 10.5343/bms.2014.1010.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., & Razak, T. (2003). *From ocean to aquarium: The global trade in marine ornamental species*. Cambridge (UK): UNEP-WCMC.
- Wyrski, K. (1961). *Scientific results of marine investigations of the South China Sea and the Gulf of Thailand 1959-1961 volume 2*. La Jolla: University of California, Scripps Institution of Oceanography.