

**IDENTIFIKASI *Synaptula* (ECHINODERMATA :
HOLOTHUROIDEA) RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN COI**

SKRIPSI

Oleh :
Robitoh Desi Kurniasari
10500100111006



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2014

**IDENTIFIKASI *Synaptula* (ECHINODERMATA :
HOLOTHUROIDEA) RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN
COI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelas sarjana sains
dalam bidang biologi

Oleh :
Robitoh Desi Kurniasari
10500100111006



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

IDENTIFIKASI SYNAPTULA (ECHINODERMATA : HOLOTHUROIDEA) RAJA AMPAT BERDASARKAN GEN COI

**Oleh :
Robitoh Desi Kurniasari
10500100111006**

Telah dipertahankan didepan majelis penguji pada tanggal 8 Agustus
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana
sains dalam bidang biologi

**Menyetujui
Dosen pembimbing skripsi**

**Drs. Aris Soewondo, M.Si
NIP. 19641122 199002 1 001**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi S-1 Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Rodliyati Azrianingsih, S.Si., MAgr.Sc., PhD
NIP. 19700128 199412 2 001**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Robitoh Desi Kurniasari
NIM : 105090100111006
Jurusan : Biologi
Penulis tugas Akhir berjudul : Identifikasi *Synapta*
(Echinodermata : Holothuroidea)
Raja Ampat Berdasarkan Gen COI

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Tugas Akhir ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka TA ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi TA saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2014
Yang menyatakan,

(Robitoh Desi Kurniasari)
NIM. 105090100111006

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Identifikasi *Synaptula* (Echinodermata : Holothuroidea) Raja Ampat Berdasarkan Gen COI

Kurniasari, Robitoh D; Soewondo A
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Salah satu megabiodiversitas laut berada di kepulauan Raja Ampat. Identifikasi spesies yang terdapat di perairan Raja Ampat perlu dilakukan untuk mendapatkan data mengenai biodiversitas perairan Raja Ampat. Timun laut atau teripang merupakan salah satu organisme yang menghuni perairan Raja Ampat. Timun laut merupakan organisme yang memiliki struktur morfologi yang sulit untuk menentukan taksanya, karena timun laut merupakan *cryptic species*. Salah satu organisme timun laut yang merupakan spesies *cryptic* adalah *Synaptula*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Synaptula* yang dikoleksi dari perairan Raja Ampat menggunakan metode molekuler dengan marker gen COI. Peneliti mengidentifikasi *Synaptula* dengan alasan spesimen tersebut masih teridentifikasi sampai tingkat genus. Metode identifikasi secara molekuler yang digunakan DNA barcoding, dengan tahapan, isolasi DNA, PCR, dan sekuensing. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *Synaptula* dari Raja Ampat (UNP 101) memiliki kemiripan yang tinggi dengan spesies *Plakobranthus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina. Jarak genetic *Synaptula* UNP 101 dengan spesies *Plakobranthus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina adalah 1.3% dan nilai similaritas adalah 98.7%, sedangkan jika dibandingkan antara *Synaptula* UNP 101 dari Raja Ampat dengan *Synaptula reciprocans* jarak genetic sebesar 76.8% dan nilai similaritas sebesar 23.6%. Perbedaan hasil identifikasi berdasar karakter morfologi dan molekuler (berdasar sekuen gen COI) kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi DNA template *Synaptula* oleh DNA template *Plakobranthus* UNP 67 dikarenakan proses identifikasi dilakukan dalam kurun waktu yang bersamaan.

Kata Kunci : gen COI, identifikasi, *Synaptula*.

Identification *Synaptula* (Echinodermata: Holothuroidea) Raja Ampat Based on COI

Kurniasari, Robitoh D; A Soewondo

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences Brawijaya University

ABSTRACT

Identification of species Raja Ampat required in order to obtain marine biodiversity in Raja Ampat. Sea cucumber is one of the organism that inhabit in Raja Ampat waters. Sea cucumber is an organism that difficult to distinguish through morphological characteristic. *Synaptula* is one of group sea cucumber which known as cryptic species. This study aimed to identify *Synaptula* from Raja Ampat waters based on mitochondrial gene, cytochrome c oxidase subunit 1 (COI). The results of the study that *Synaptula* of Raja Ampat (UNP 101) is *Plakobranthus ocellatus*, the result is different with identification through morphological. *Synaptula* of Raja Ampat (UNP 101) has a high similarity with *Plakobranthus ocellatus* species from Sulawesi and the Philippines. Genetic distance *Synaptula* UNP 101 with *Plakobranthus ocellatus* species from Sulawesi and Philippines is 1.3% ,while similarity value is 98.7%. Genetic distance *Synaptula* of Raja Ampat (UNP 101) with *Synaptula reciprocans* is 76.8%, while similarity values is 23.6%. The difference in the results based on the identification of morphological and molecular characteritic may be caused by contamination DNA *Plakobranthus* to DNA *Synaptula*, contamination is likely to occur during the identification process which simultaneity.

Keywords: COI gene, identification, *Synaptula*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si). penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini. Untuk itu, iringan doa dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Drs. Aris Soewondo, M.Si selaku dosen Pembimbing,
2. Widodo, M.Si., Ph.D., Med.Sc selaku dosen Penguji I, dan Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya,
3. Muhaimin Rifa'i S.Si., Ph.D., Med.Sc selaku dosen Penguji II,
4. Abdul Hamid A. Toha selaku ketua proyek penelitian Marine Biodiversity Raja Ampat Islands (MB-RAI)
5. Bapak, ibuk, dan kakak yang dengan sepenuh hati dan sabar memberikan dukungan moril dan spiritual sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan tugas akhir ini
6. Laboran Lab. Biologi Molekuler dan Seluler, Susiati, M.Si
7. Teman-teman satu penelitan Ninda Syahriani dan Fitria Eka Aprilia.
8. Teman-teman angkatan 2010 dan anggota Lab. Biologi Molekuler dan Seluler, Lutfiatun, Afifi S.Si, Khoirotul, Lelly, Kikky, dll, serta beberapa pihak yang tidak dapat disebutkan satu per-satu.

Besar harapan penulis sehingga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan.

Malang, Agustus 2014

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Raja Ampat.....	4
2.2 Holothuroidea.....	5
2.3 Synaptula.....	7
2.4 Teknik Analisis Molekuler DNA Barcoding.....	9
2.5 Gen COI (<i>Cytochrome c Oxidase I</i>) Sebagai Marker Genetik.....	10
BAB III METODE PENELITIAN	12
3.1 Waktu dan Tempat.....	12
3.2 Cara Kerja.....	12
3.2.1 Koleksi Sampel Synaptula.....	12
3.2.2 Identifikasi Sampel Invertebrata.....	13
3.2.3 Ekstraksi DNA <i>Synaptula</i>	13

3.2.4 Elektroforesis Gel Agrose Hasil Isolasi DNA.....	14
3.2.5 Amplifikasi DNA <i>Synaptula</i> dengan PCR	15
3.2.6 Elektrroforesis gel agrose amplikon DNA hasil PCR.....	15
3.2.7 Sekuensing.....	15
3.2.8 Analisis Data	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Hasil Isolasi DNA <i>Synaptula</i>	17
4.2 Hasil Amplifikasi DNA <i>Synaptula</i>	17
4.3 Hasil Sekuensing DNA <i>Synaptula</i>	18
4.4 Jarak genetik dan Filogenetik <i>Synaptula</i>	20
BAB V PENUTUP	23
5.1 Kesimpulan.....	23
5.2 Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Bentuk umum tubuh holothuroidea.	6
Gambar 2.	Contoh tentakel oral(untuk makan) holothurians	7
Gambar 3.	Peta persebaran <i>Synaptula</i>	9
Gambar 4.	Lokasi pengambilan sampel <i>Synaptula</i> UNP 101.....	12
Gambar 5.	Spesimen <i>Synaptula</i> UNP 101 (no 36)	13
Gambar 6.	Hasil uji kualitatif isolasi DNA <i>Synaptula</i>	17
Gambar 7.	Hasil uji kualitatif DNA hasil PCR <i>Synaptula</i>	18
Gambar 8.	Hasil sekuensing DNA <i>Synaptula</i> UNP 101 Error! Bookmark n	
Gambar 9.	Hasil alignment hasil sekuensing <i>Synaptula</i> 101.1,101.2,101.3,101.4, dan UNP 67A	20
Gambar 10.	Pohon filogeni <i>Synaptula</i> Raja Ampat (UNP101).....	21

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Kerangka Operasional	29
Lampiran 2.	Jadwal penelitian	30
Lampiran 3.	Hasil elektroferogram sekuensing gen COI <i>Synaptula</i>	31
Lampiran 4.	Hasil BLAST 4 sekuen hasil PCR	35
Lampiran 5.	Jarak genetik (%) <i>Synaptula</i> dari Raja Ampat (UNP101).....	37



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jarak genetik (%) dan nilai similaritas (%) <i>Synaptula</i> dari Raja Ampat (UNP 101).....	22
--	----

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

Simbol/singkatan

Keterangan

DNA	:	Deoxyribose nucleic acid
Bp	:	Base pair, satuan panjang DNA & RNA
TBE	:	Tris Cl- boric acid- EDTA, buffer yang digunakan dalam pembuatan gel agarose
mt-DNA	:	Mitokondrial DNA
COI	:	Cytochrome c Oxidase I (COI)
EtBr	:	Etidium Bromida



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Raja Ampat merupakan gugusan pulau-pulau kecil yang terletak di bagian barat pulau Papua (di bawah kepala burung). Perairan Raja Ampat memiliki megabiodiversitas yang tinggi. Keanekaragaman biodiversitas di kepulauan Raja Ampat yang tinggi didukung oleh keadaan geografis perairannya yang terletak pada perairan tropis dan berarus tenang serta terletak pada “segitiga karang” (Mckenna,2002). Perairan Raja Ampat memiliki biodiversitas yang paling tinggi diantara pulau-pulau penyusun segitiga karang. Selain spesies karang dan ikan yang banyak ditemukan pada perairan laut Raja Ampat, ditemukan juga timun laut. Timun laut merupakan jenis organisme yang dapat ditemukan pada perairan tenang, dangkal, dan hangat yang sesuai dengan kondisi perairan laut kepulauan Raja Ampat, sedangkan perairan Raja Ampat merupakan habitat yang sesuai dengan lingkungan hidup optimal timun laut sehingga banyak ditemukan berbagai jenis timun laut di perairannya. Berdasarkan diversitas timun laut yang ditemukan diperairan kepulauan Raja Ampat, sehingga perlu dilakukan identifikasi spesies timun laut untuk mengetahui jenis-jenis timun laut yang berada di Raja Ampat (Kabupaten Raja Ampat dalam Angka, 2008).

Synaptula merupakan salah satu spesies timun laut. Identifikasi spesies terhadap *Synaptula* perlu dilakukan karena diperlukan pendataan (penyusunan data base) terhadap keragaman jenis hewan di perairan Indonesia harus terus dilakukan untuk memenuhi kebutuhan penelitian dan tujuan praktis di masa depan serta untuk mengimbangi laju hilangnya keragaman. Identifikasi spesies-spesies timun laut berdasarkan morfologinya sulit dilakukan karena timun laut merupakan *species cryptic*. Menurut Herbert dkk. (2003), identifikasi spesies secara morfologi memiliki beberapa kekurangan. Pertama, baik bentuk fenotip serta variabilitas genetik pada pengenalan spesies melalui karakter dapat menimbulkan salah identifikasi. Kedua, identifikasi berdasarkan pada karakter morfologi tidak memperhitungkan *cryptic species*, yang sering dijumpai pada beberapa kelompok organisme terutama pada organisme invertebrata. Ketiga, identifikasi menggunakan

pendekatan morfologi terkadang hanya cocok untuk beberapa fase hidup organisme dan jenis kelamin tertentu. Keempat, penggunaan kunci determinasi untuk identifikasi sering membutuhkan keahlian yang tinggi karena sering terjadi salah menentukan jenis taksa.

Identifikasi spesies menggunakan cara lama banyak menghadapi kendala dan banyak kelemahan, sehingga perlu dilakukan pendekatan dengan metode yang baru untuk identifikasi spesies. Identifikasi secara molekuler merupakan salah satu metode yang dapat diterapkan dalam identifikasi spesies. *Barcode* DNA merupakan identifikasi molekuler yang menggunakan urutan pendek DNA untuk digunakan sebagai *barcode* dalam mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat. Ruas DNA yang bisa digunakan untuk sistem tersebut harus terstandarisasi (Meier *et al.* 2006).

Teknologi DNA *barcoding* ini menggunakan penanda gen *cytochrome oxidase sub unit 1* (CO1) dalam genom mitokondria (mtDNA) yang sekuennya biasa digunakan sebagai barcode. Sekuen gen CO1 mempunyai karakter yang memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam identifikasi suatu spesies pada hampir semua hewan, terutama pada bagian ujung 5'. Pada hewan, penggunaan mtDNA dalam identifikasi spesies didasari oleh analisis biogeografi dan sistematik sering tidak sejalan dengan identifikasi morfologi. Salah satu penyebabnya adalah karakter morfologi seringkali memperlihatkan fenomena *species cryptic*. Sedangkan mtDNA hewan merupakan genom sitoplasmik yang diwariskan secara uniparental dan tidak mengalami rekombinasi sehingga *species sibling* bisa dipastikan mempunyai mtDNA dengan nilai kesamaan yang tinggi. Salah satu ruas mtDNA yang banyak digunakan sebagai *barcode* yaitu *cytochrome oxidase 1* (CO1) yang dipopulerkan oleh Hebert *et al.* (2003). Gen *cytochrome oxidase 1* (CO1) adalah segmen dari DNA mitokondria yang terdiri atas 648bp (Hebert *et al.* 2003).

Sehingga dalam penelitian ini digunakan metode DNA *barcode* dengan sekuen gen COI untuk mengidentifikasi spesies yang ditemukan di perairan laut Raja Ampat Papua. Teknik DNA *barcode* berperan penting dalam konservasi diversitas spesies, hal ini berdasarkan Konvensi Keanekaragaman Hayati. Konvensi Keanekaragaman Hayati (*Convention on Biological Diversity* atau CBD) merupakan sebuah perjanjian internasional yang bertujuan

untuk mengembangkan strategi nasional dalam konservasi dan pemanfaatan berkelanjutan keanekaragaman hayati.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan sekuen gen COI teridentifikasi kedalam jenis apakah spesimen makroinvertebrata laut *Synaptula* (UNP 101) yang dikoleksi dari perairan kepulauan Raja Ampat?

1.3 Tujuan

Mengidentifikasi jenis taksa makroinvertebrata laut *Synaptula* (UNP 101) yang ditemukan di perairan Raja Ampat berdasarkan gen COI.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian adalah untuk mengetahui jenis taksa *Synaptula* (UNP 101), sehingga didapatkan informasi lebih luas kekayaan bawah laut Raja Ampat taksa *Synaptula* yang dapat dimanfaatkan sebagai komoditi perdagangan, bahan pangan, atau sebagai bahan obat serta memudahkan dalam manajemen konservasinya dan manajemen pemanfaatan berkelanjutan keanekaragaman hayati.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Raja Ampat

Kepulauan Raja Ampat merupakan salah satu bagian di pulau Papua, yang memiliki kekayaan bawah laut yang tinggi. Letak Kepulauan Raja Ampat di sebelah barat paruh burung pulau Papua ($0^{\circ}20'$ dan $2^{\circ}15'$ lintang selatan, dan $129^{\circ}35'$ dan $131^{\circ}20'$; bujur timur). Kabupaten Raja Ampat memiliki luas sekitar 881.953 km^2 dengan luas daratan hanya sekitar $6.084,50 \text{ km}^2$. Jumlah pulau yang berada dalam wilayah Kabupaten Kepulauan Raja Ampat adalah lebih dari 610 pulau, dengan panjang wilayah garis pesisir pantai lebih dari 753 km. Kabupaten Raja Ampat memiliki 4 pulau besar diantara 610 pulau yang termasuk kedalam wilayah kabupaten Raja Ampat yaitu : pulau Waigeo, Batanta, Salawati, dan Misol. Dari ratusan pulau yang tersebar di kabupaten Raja Ampat hanya 35 pulau saja yang didiami oleh penghuni local. Kabupaten Raja Ampat terletak pada posisi $2^{\circ}25' \text{ LU} - 4^{\circ}25' \text{ LS}$ dan $130^{\circ} - 132^{\circ}55' \text{ BT}$ dan secara administratif memiliki batas sebagai berikut :

- Sebelah Utara : Samudera Pasifik, berbatasan dengan wilayah Negara Palau.
- Sebelah Timur : Kota Sorong dan Kabupaten Sorong, Provinsi Papua Barat.
- Sebelah Selatan : Kabupaten Seram Utara, Provinsi Maluku.
- Sebelah Barat : Kabupaten Halmahera Tengah, Provinsi Maluku Utara.

(Kabupaten Raja Ampat dalam Angka, 2008).

Menurut Mckenna (2002) lokasi kepulauan Raja Ampat merupakan ekosistem koral Indonesia yang paling asli dan paling kaya. Potensi sumberdaya terumbu karang yang dimiliki kabupapten Raja Ampat, merupakan bagian dari “segitiga karang dunia” (*coral triangle*) yang terdiri dari Indonesia, Filipina, Papua New Guinea, Jepang, dan Australia. Raja Ampat memiliki ekosistem yang paling kaya diantara pulau-pulau penyusun segitiga karang. Berdasarkan hasil *Rapid Assessment Program* yang dilakukan oleh tim *Conservation International* (CI) disebutkan bahwa keanekaragaman Kabupapten Raja Ampat termasuk tinggi, disebutkan bahwa terdapat

456 spesies jenis karang keras, 699 spesies moluska, dan 972 spesies ikan karang. Pada beberapa lokasi sudah ditemukan kerusakan ekosistem meskipun kepadatan populasi manusia masih rendah (7.700 jiwa). Pada pulau Waigeo sudah terjadi penebangan liar di dalam lokasi cagar alam. Sehingga dibutuhkan upaya konservasi untuk melindungi ekosistem laut dan mencegah hilangnya keanekaragaman yang mendukung pemanfaatan sumberdaya berkelanjutan.

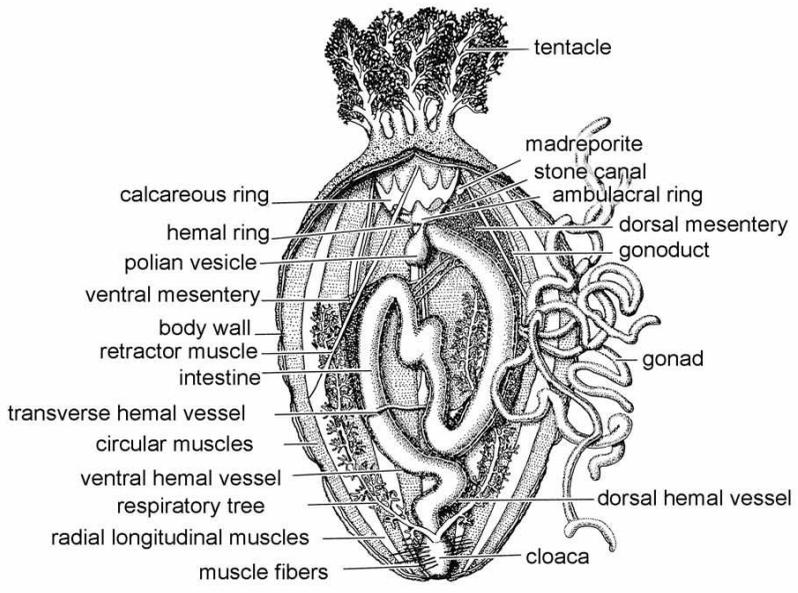
Kondisi umum perairan raja ampat dipengaruhi oleh iklim tropis dan perubahan iklim muson. Berdasarkan letak geografis, Indonesia terletak diantara samudra hindia dan samudra pasifik mengakibatkan perairan di Raja Ampat baik kondisi fisik maupun kimianya dipengaruhi oleh kedua samudra (Coremap dan Dinas Perikanan dan Kelautan Kabupaten Raja Ampat, 2005).

2.2 Holothuroidea

Holothuroidea merupakan organisme yang tergolong kedalam filum Echinodermata. Echinodermata secara sederhana dapat dideskripsikan sebagai organisme yang memiliki kulit berduri. Holothuroidea merupakan organisme penting dalam sebuah ekosistem, karena holothuroidea merupakan organisme penting dalam jaring-jaring makanan. Telur, larva, dan juvenile dari holothuroidea menjadi sumber makanan bagi organisme air yang lebih besar seperti ikan, moluska, dan udang. Aktivitas holothuroidea berada pada dasar dan memakan serasah dan dengan aktivitasnya dapat berperan dalam pengadukan substrat (Darsono, 2005).

Identifikasi holothuroidea dapat berdasarkan struktur spikula dan komposisi penyusun spikula. Spikula merupakan endoskeleton yang terbentuk dari kapur dengan struktur khas pada setiap jenis holothuroidea dan merupakan struktur penting dalam identifikasi berdasarkan karakter morfologi (Pechenik, 1996). Selain identifikasi berdasarkan karakter morfologi juga dapat berdasarkan kandungan senyawa kimia holothuroidea. Senyawa yang menjadi pendanda holothuroidea adalah triterpen glikosida (Stonik, 1986), holothuroidea merupakan organisme dengan simetri bilateral pada fase larva dan radial pada fase dewasa. Struktur tubuh holothuroidea secara keseluruhan menyerupai timun. Pada kaki tabung di bagian dorsal yang berfungsi sebagai alat gerak juga terdapat papila yang berfungsi

sebagai alat sensor. Tubuh holothuroidea tersusun atas otot melingkar dan otot memanjang. Struktur saluran pencernaan holothuroidea berbentuk memanjang dalam rongga tubuhnya yang juga terdapat saluran respirasi (*respiratory tree*) (Jasin,1992).

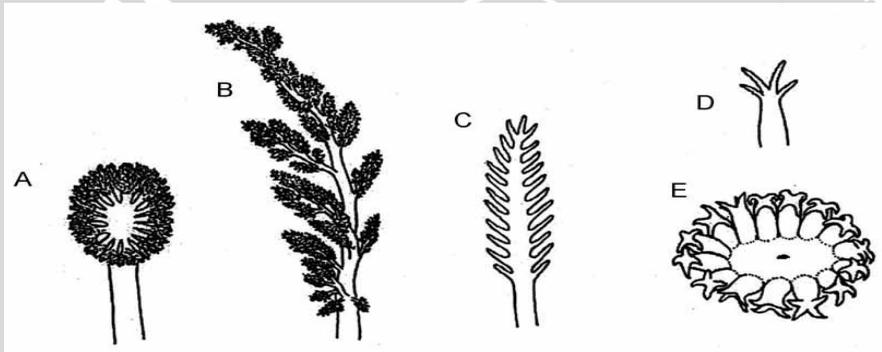


Gambar 1. Bentuk umum tubuh holothuroidea (Pawson et al,2010).

Pada bagian sekitar mulut holothuroidea terdapat struktur tentakel yang merupakan modifikasi kaki tabung (*tube feet*) dan berfungsi sebagai alat untuk membantu aktivitas makan holothuroidea (Pachenik,1996). Tentakel dapat digunakan sebagai penanda dalam identifikasi berdasarkan karakter morfologi yang setiap ordo memiliki kekhasan struktur tentakel (samyn dkk,2006). Holothuroidea merupakan organisme yang merespon gangguan dengan mengerutkan badannya, dan apabila gangguan terus berlanjut holothuroidea akan mengeluarkan tubulus cuvier yang lengket dan beracun sampai mengeluarkan organ-organ dalam rongga tubuhnya apabila gangguan terus berlanjut (Pechenik,1996).

Ciri subkelas Apodacea adalah memiliki sekitar 25 pinnate atau simple oral tentakel, dan menggunakan tentakel tersebut untuk memakan makanannya, dan sub kelas Apodacea bergerak pada dasar laut atau menempel pada pasir (Conand,1990 and Conand,2004).

Sedangkan ciri khusus ordo apodida adalah tubuhnya yang silindris, system pernafasannya mengerucut ke atas bagian tubuh, tidak memiliki papilla pada bagian anal, memiliki spikula atau ossicles yang sering termasuk kedalam golongan anchors yang berfungsi untuk attachment kedaras substrat dan membantu pergerakannya sebagai alternative alat gerak menggantikan tidak adanya struktur podia. Keberadaan anchors ini merupakan kekhasan yang dimiliki family synaptidae dan perbedaan struktur anchors dapat digunakan sebagai salah satu karakter morfologi yang membedakan antar genus pada family synaptidae. Kelas holothuroidea dapat digolongkan kedalam ordo-ordo yang berbeda salah satunya berdasarkan tipe-tipe oral tentakel (Pawson & Pawson,2008).



Pawson et al (2010)

Gambar 2 . Contoh tentakel oral(untuk makan) holothurians ,shield-shaped (Order Aspidochirotida); B, branching (O.Dendrochirotida); C, pinnate (O. Apodida); D, digitate (O. Apodida, O. Molpadiida); E, digitate (O. Molpadiida).

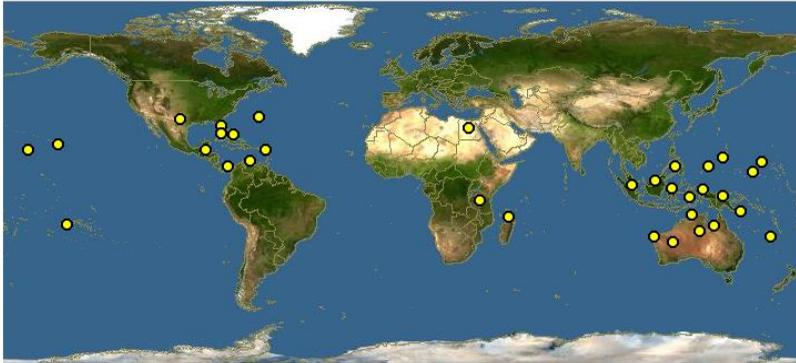
2.3 Synaptula

Synaptula merupakan salah satu spesies yang tergolong kedalam ordo apodida. Karakter morfologi apodida adalah tubuhnya yang silindris, sistem pernafasannya mengerucut ke atas bagian tubuh, tidak memiliki papilla pada bagian anal, memiliki spikula atau ossicles yang sering termasuk kedalam golongan anchors yang berfungsi untuk attachment kedaras substrat dan membantu pergerakannya sebagai alternative alat gerak menggantikan tidak

adanya struktur podia. Keberadaan anchors ini merupakan kekhasan yang dimiliki famili synaptidae dan perbedaan struktur anchors dapat digunakan sebagai salah satu karakter morfologi yang membedakan antar genus pada family synaptidae. Menurut Mayers dkk (2013) klasifikasi dari makroinvertebrata yang terkoleksi dari perairan laut raja ampat tergolong kedalam;

Kingdom	: Animalia
Filum	: Echinodermata
Subfilum	: Echiozoa
Kelas	: Holothuroidea
Ordo	: Apodida
Famili	: Synaptidae
Genus	: Synaptula

Secara umum timun laut memiliki permukaan tubuh yang kasar karena struktur tonjolan-tonjolan yang merupakan modifikasi papilla dan disebut tuberkel (Martoyoet al. 1996). Pada bagian ventral tubuhnya terdapat struktur kaki semu. Hampir seluruh tubuh timun laut $\pm 80\%$ berupa air. Beberapa spesies timun laut dapat mengeluarkan benang-benang lengket berwarna putih (tubulus cuvier) jika mendapat gangguan baik fisik maupun kimia (Wulandari,2012). Setiap timun laut memiliki spikula, tentakel, papila, dan podia yang setiap spesies memiliki karakter khas (Darsono 1998). Timun laut memiliki peran penting bagi ekosistem sekitarnya, karena merupakan komponen dalam rantai makanan (food chain) terumbu karang dan ekosistem asosiasinya pada berbagai tingkat struktur makanan (trophic levels) (Bakus 1973;Wulandari,2012). Bagi ekosistem sekitar timun laut, timun laut bermanfaat karena membantu proses dekomposisi zat organik yang ada dalam sedimen, sehingga menghasilkan nutrisi kedalam rantai makanan (Darsono 2005).



Gambar 3. Peta persebaran *Synaptula* (discoverlife.2013)
(lokasi ditemukan *Synaptula* ditunjukkan oleh titik kuning pada peta)

Berdasarkan peta persebaran *Synaptula* dari discoverlife, lokasi ditemukan *Synaptula* ditunjukkan oleh titik kuning dalam peta pada wilayah Indonesia-Australia terdapat banyak titik kuning , yang menunjukkan bahwa pada lokasi Indonesia-Australia banyak lokasi ditemukannya *Synaptula* .Hal ini disebabkan *Synaptula* atau timun laut pada umumnya memiliki habitat perairan yang tenang, dangkal, dan hangat. Wilayah perairan laut dalam Indonesia memiliki perairan yang cukup tenang karena didukung oleh struktur geografisnya yang memiliki banyak kepulauan sehingga kekuatan angin terhalang oleh pulau-pulau tersebut, sehingga sebagian besar laut di Indonesia memenuhi syarat habitat *Synaptula* untuk dapat hidup (discover life,2013; Aziz.1996; Wulandari,2012).

2.4 Teknik Analisis Molekuler DNA Barcoding

DNA *barcoding* merupakan teknik analisis molekuler. Dalam metode DNA barcoding terdapat teknik sekuensing. Sekuensing DNA merupakan pembacaan urutan basa nukleotida pada suatu fragmen DNA (Nichol,2002). Metode sekuensing banyak digunakan dalam banyak bidang salah satunya konfirmasi identitas. Metode sekuensing yang umum digunakan adalah metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert merupakan metode yang menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong fragmen DNA yang ditargetkan, sedang kan metode Sanger menggunakan

enzim DNA polymerase untuk membentuk kopian komplementer dari fragmen DNA target (Sambrook Russel, 2001). Seiring berkembangnya teknologi saat ini, metode sekuensing yang dahulunya dilakukan dengan sederhana dan manual telah dikembangkan menjadi suatu program dikomputer yang atau lebih dikenal dengan *automated DNA sequencing* (Nicholl,2001).

Hasil sekuensing dapat dianalisis menggunakan program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang dikembangkan oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Program BLAST berguna dalam membandingkan sekuen dari sampel dengan sekuen yang telah ada pada *Gene Bank*. Sehingga kemajuan teknologi dalam bidang molekuler membawa dampak positif pada bidang taksonomi, seperti pada bidang identifikasi spesies. Metode identifikasi spesies makhluk hidup telah berkembang dari identifikasi morfologi sampai pada identifikasi molekuler berdasarkan potongan DNA pendek yang disebut “*barcode DNA*” (*DNA barcoding*) (Hebert *et al.* 2003). *Barcode DNA* memiliki fungsi-fungsi aplikatif misalnya untuk survei ekologi (Dick dan Kress,2009).

Teknik DNA *Barcoding* tidak hanya berguna untuk mengidentifikasi spesies yang telah dikenali tetapi juga dapat menemukan spesies baru. Teknik DNA *barcoding* dapat menyediakan sebuah “barkode biologi” dari urutan pendek DNA yang distandardisasi untuk mengenali suatu spesies (Hajibabaei *et al.* 2005). Ide mengenai penggunaan barcoding ditujukan untuk membedakan spesies dan mengidentifikasi spesimen yang sulit dikenali, seperti fase larva, potongan organ maupun material yang mengalami pemrosesan, dengan menggunakan sekuens gen yang cukup pendek.

2.5 Gen COI (*Cytochrome c Oxidase I*) Sebagai Marker Genetik

Teknologi DNA *barcoding* ini menggunakan banyak penanda genetik, pada organisme hewan banyak digunakan gen sitokrom oksidase sub unit 1 (CO1) dalam genom mitokondria (mtDNA) yang sekuennya biasa digunakan sebagai barcode..Pada hewan, penggunaan mtDNA dalam analisis biogeografi dan sistematik sering tidak sejalan dengan morfologi. Salah satu penyebabnya adalah karakter morfologi seringkali memperlihatkan

fenomena *species cryptic*. Sedangkan mtDNA hewan merupakan genom sitoplasmik yang diwariskan secara uniparental dan tidak mengalami rekombinasi sehingga *species sibling* bisa dipastikan mempunyai mtDNA dengan nilai kesamaan yang tinggi. Salah satu ruas mtDNA yang banyak digunakan sebagai *barcode* adalah *cytochrome oxidase 1* (CO1) yang dipopulerkan oleh Hebert *et al.* (2003). Gen *cytochrome oxidase 1* (CO1) adalah segmen dari DNA mitokondria yang terdiri atas 648pb (Hebert *et al.* 2003).

Pada jenis timun laut identifikasi menggunakan sifat morfologi sulit dilakukan karena merupakan *species cryptic* (hampir mirip). Sehingga diperlukan metode identifikasi molekuler, salah satunya menggunakan genom mitokondria (mtDNA). mtDNA merupakan genom sitoplasmik yang diwariskan secara unioarental dan tidak mengalami rekombinasi sehingga spesies-spesies yang hampir mirip dapat diidentifikasi menggunakan metode ini, sehingga *species sibling* bisa dipastikan mempunyai mtDNA dengan nilai kesamaan yang tinggi. Bagian yang sering digunakan pada metode *barcode* adalah *cytochrome oxidase 1* (CO1) genom mitokondria yang dipopulerkan oleh Hebert *et al.* (2003). Dibandingkan sekuen lain pada genom mtDNA, gen COI memberikan hasil yang lebih efektif dan mudah, baik interspesifik maupun intraspesifik (Hebert *et al.* 2003).

Penggunaan gen COI dalam identifikasi spesies menggunakan DNA *barcode* memiliki kelebihan. Kelebihan yang dimiliki oleh gen COI antara lain; (1) memiliki tingkat keragaman yang tinggi sehingga dapat mengidentifikasi spesies dengan tingkat taksonomi yang luas; (2) terdapat suatu kecocokan dari perbedaan yang ada dalam ekspresi gen antar spesies, termasuk dengan sifat masing-masing gen COI; (3) gambaran analisis penyatuan DNA menunjukkan variasi dalam sejumlah nukleotida yang bertransis melewati gen COI dan penggabungannya terbatas hanya dengan tingkat keragaman DNA (Roe & Sperling 2007).

BAB III METODE PENELITIAN

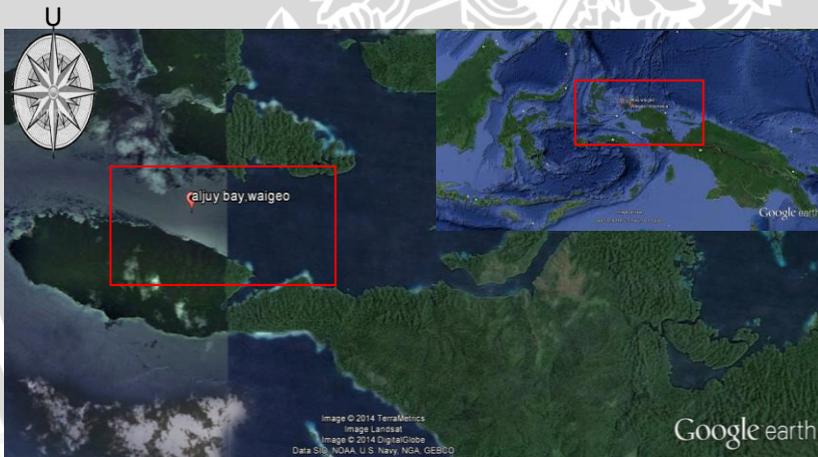
3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan bulan Februari sampai Juni 2014. Penelitian bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Koleksi Sampel *Synaptula*

Sampel (no 36) makroinvertebrata diambil dari laut kepulauan raja ampat yang merupakan koleksi Hamid A Toha program studi S3 Universitas Brawijaya. Sampel makroinvertebrata diambil pada 4 Juni 2013 di Waigeo dengan detail lokasi 00d 12.340 lintang selatan dan 30.15.333 bujur timur pada kedalaman 20-80 meter. Makroinvertebrata yang terambil disimpan pada botol berisi cairan etanol 95%.



Gambar 4. Lokasi pengambilan sampel *Synaptula* UNP 101 (kotak merah = lokasi pengambilan *Synaptula*)

Lokasi pengambilan sampel *Synaptula* terletak pada pulau Waigeo, yang dalam peta ditandai dengan kotak merah dan pada aljuy bay kemudian diperbesar dan ditandai dengan arsis warna putih.



Gambar 5 . Spesimen *Synaptula* UNP 101 (no 36)

3.2.2 Identifikasi Sampel Invertebrata

Diidentifikasi sampai pada tingkat genus dengan bantuan tenaga ahli dari Gustav Paulay dari University Of Florida.

3.2.3 Ekstraksi DNA *Synaptula*

DNA diekstraksi dengan Gsync DNA Extraction Kit (Geneaid). Langkah-langkah ekstraksi, yaitu :

1. Pemisahan jaringan

Sebanyak 25 mg jaringan *Plakobranthus* dimasukkan ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml. Ditambahkan 200 μ l Buffer GST dan 20 μ l Proteinase K. Di vortex, untuk menghomogenasi. Diinkubasi pada suhu 60°C sampai campuran menjadi jernih (\pm 7 jam).Selama inkubasi, setiap satu jam divortex dua kali.

2. Pelisisan sel

Jika terdapat bahan yang belum larut setelah inkubasi, disentrifugasi 10000 rpm selama 2 menit. Dipindah supernatan ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru. Ditambahkan 200 μ l Buffer GSB dibolak-balik agar sampel dan Buffer GSB homogen.

3. DNA binding

Etanol absolut ditambahkan sebanyak 200 μ l dan segera dimix dengan cara dibolak-balik. Dipindahkan semua campuran ke GD Column dalam 2 ml Collection Tube. Disentrifugasi 10000 rpm selama 1 menit. Dipindah GD Column ke Collection Tube baru. Collection Tube yang berisi presipitat dibuang

4. Washing

Buffer W1 ditambahkan sebanyak 400 μ l ke GD Column. Disentrifugasi 10000 rpm selama 30 detik. Dipindah GD Column ke Collection Tube baru. Collection Tube yang berisi presipitat dibuang. Ditambahkan 600 μ l Wash Buffer ke GD collumn. Disentrifugasi 10000 rpm selama 30 detik. Dipindah GD Column ke Collection Tube baru. Collection Tube yang berisi presipitat dibuang. Disentrifugasi 10000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan collum matrix.

5. Elusi

Dipindah GD collumn ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru, ditambahkan 100 μ l Buffer Elusi.

3.2.4 Elektroforesis Gel Agrose Hasil Isolasi DNA

Agarosa 1 % ditimbang sebanyak 0,15 gram, kemudian dilarutkan dengan TBE 1X pH 8 sebanyak 15ml dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup plastic wrap, di lubangi kecil-kecil lalu dimasukkan oven hingga mendidih, dibiarkan sampai hangat kuku kemudian ditambahkan EtBr 1 μ l. Agarosa yang sudah bercampur Etidium Bromida dituangkan pada cetakan sisir pembuat sumuran sampel. Setelah mengeras, gel dan cetakan dimasukkan ke dalam chamber dan dituangkan buffer TBE 1x sampai gel terendam. DNA dan larutan loading dye (1:1) dihomogenasi dan dimasukkan pada masing-masing sumuran. Elektroda dihubungkan dengan *power supply* 100 V dan dirunning selama 1 jam. Alat elektroforesis dimatikan dan gel diambil. dari alat tersebut. Gel dipindah ke UV-transiluminator dan didokumentasikan pada GelDoc-imaging.

3.2.5 Amplifikasi DNA *Synaptula* dengan PCR

DNA yang telah diisolasi diamplifikasi sekuen gen CO1 mtDNA menggunakan primer universal gen CO1 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). Racikan untuk PCR terdiri dari ddH₂O 12µl (diganti dengan larutan BSA), pcr mix kapa Taq Extra HotStart ReadyMix PCR kit (1,25 U per 50µl reaksi DNA polimerase, KAPA Taq Extra buffer (1X), dNTPs (masing-masing dNTP 0,3 mM (1X)), MgCl₂ (2 mM 1X) dan stabiliser), 1 µl masing-masing primer (10 µM), dan 1 µl DNA template. Program PCR : *hot start* 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 30 detik, *annealing* 50°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit(30 siklus), dan *post extension* 72°C selama 1 menit. Sampel hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C.

3.2.6 Elektroforesis gel agrose amplicon DNA hasil PCR

Agarosa 1,5% ditimbang sebanyak 0,23 gram, kemudian dilarutkan dengan TBE 1X pH 8 sebanyak 15ml dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup plastic wrap, di lubanggi kecil-kecil lalu dimasukkan oven hingga mendidih, dibiarkan sampai hangat kuku kemudian ditambahkan EtBr 1 µl. Agarosa yang sudah bercampur Etidium Bromida dituangkan pada cetakan sisir pembuat sumuran sampel. Setelah mengeras, gel dan cetakan dimasukkan ke dalam chamber dan dituangkan buffer TBE 1x sampai terendam. DNA dan larutan loading dye (1:1) dihomogenasi dan dimasukkan pada masing-masing sumuran. Marker yang digunakan untuk *running* hasil PCR adalah 1kb. Elektroda dihubungkan dengan power supply 100 V dan dirunning selama 1 jam. Alat elektroforesis dimatikan dan gel diambil dari alat tersebut. Gel dipindah ke UV-transiluminator dan didokumentasikan pada GelDoc-imaging.

3.2.7 Sekuensing

PCR for sequencing dilakukan oleh perusahaan jasa pelayanan sekuens. PCR untuk sekuens menggunakan DNA hasil amplifikasi dan primer yang sama seperti amplifikasi awal.

3.2.8 Analisis Data

Sekuen forward dan reverse yang diperoleh diedit dengan software Bioedit 7.0.9. Kemudian sekuen disejajarkan dengan data base di NCBI dengan software pada NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Berdasarkan hasil blast diperoleh sekuen dari NCBI, sekuen dipilih untuk digunakan adalah sekuen dengan nilai kesamaan diatas 85% (satu spesies) dengan sekuen sampel. Penelitian ini menggunakan sekuen dari spesies *Synaptula reciprocans* dan *Plakobranchus ocellatus*. Hasil sekuensing dialignment dengan sekuen yang diperoleh dari GeneBank (NCBI). Setelah dialignment, kemudian ujung sekuen dipotong untuk menyamakan panjang sekuen. Setelah itu dilakukan perhitungan jarak genetik dengan menggunakan software Mega 5.1. setelah diketahui jarak genetiknya kemudian dihitung similaritasnya dengan persamaan :

$$(1 - \text{jarak genetik}) \times 100\%$$

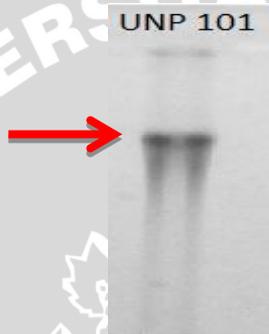
Dibuat pohon filogenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies satu dan spesies lainnya berdasarkan gen COI menggunakan maximum likelihood (ML) dengan metode estimasi jarak P-distance (boostrap 1000) pada software MEGA 5.1.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Isolasi DNA *Synaptula*

DNA isolasi dari jaringan organisme *Synaptula* menggunakan Gsync DNA ExtractionKit (Geneaid). DNA hasil isolasi dilihat kualitasnya dengan uji kualitatif elektroforesis gel agarose .



Gambar 6 . Hasil uji kualitatif isolasi DNA *Synaptula*

Arah yang ditunjuk anak panah merupakan pita DNA *Synaptula* yang berhasil diisolasi. Berdasarkan hasil uji kualitatif isolasi DNA *Synaptula* tersebut , DNA telah berhasil diisolasi, ditandai dengan munculnya pita pada gel agarose (ditunjuk oleh tanda panah merah). Pita yang terdeteksi tebal namun terdapat smear, hal ini kemungkinan disebabkan oleh DNA yang terisolasi sedikit dan terdapat kontaminan seperti protein dan RNA.

4.2 Hasil Amplifikasi DNA *Synaptula*

Sekuen gen COI diamplifikasi dari DNA yang telah berhasil diisolasi dari *Synaptula* menggunakan primer LCO-1490 dan HCO-2198 (folmer dkk.,1994). Digunakan sekuen gen COI dalam identifikasi *Synaptula*, karena gen COI merupakan marker molekuler yang paling baik dalam identifikasi spesies dan dengan perkembangan teknologi identifikasi sering dilakukan dengan metode molekuler dengan menggunakan gen marker genetik. Gen COI digunakan sebagai marker genetik karena memenuhi beberapa syarat standar, salah satunya yaitu gen COI memiliki tingkat evolusi

yang tinggi , sehingga dapat digunakan dalam identifikasi spesies serta membedakannya meskipun memiliki kekerabatan yang dekat. Sehingga hasil dari amplifikasi sekuen gen COI ini menghasilkan variasi meskipun berasal dari individu yang satu jenis spesies (Herbert dkk.,2003).



Gambar 7 . Hasil uji kualitatif DNA hasil PCR *Synaptula* (M = marker)

Berdasarkan hasil pita DNA pada uji kualitatif gel agarose 0.8%, sekuen gen COI *Synaptula* berhasil teramplifikasi dengan panjang amplicon ± 750 bp namun pita DNA hasil amplifikasi tipis (ditunjuk oleh kotak merah) hal ini kemungkinan karena DNA hasil isolasi sedikit dan terdapat kontaminan sehingga sekuen yang berhasil teramplifikasi pada saat PCR sedikit.

4.3 Hasil Sekuensing DNA *Synaptula*

Hasil sekuensing gen COI *Synaptula* berupa grafik *Peaks* yang diterjemahkan menjadi basa-basa nukleotida. Data sekuensing berupa urutan basa nukleotida yang terdiri dari tiga warna. Ketiga jenis warna mengindikasikan kualitas pembacaan nukleotida, warna merah menunjukkan kualitas pembacaan nukleotida rendah, warna kuning menunjukkan kualitas pembacaan nukleotida sedang, dan warna biru menunjukkan kualitas pembacaan baik. DNA sampel *Synaptula* UNP 101 telah diamplifikasi menggunakan metode PCR

1	1	CNNTTAAAT	AGTNTTGGT	ATGTGATGTG	GTTTAGTAGG	TACTGGAITA	AGTTTACTAA	TTCGTTTTGA	GTTAGGAAC	TCTGGTCCGT	TTTTAGGTGA	TGATCATTTT	TATAATGTAA
	121	TTGTAACGGC	TCACGCTTTC	GTTATAAATTT	TTTTCATAGT	TATACCTTTA	ATAAATGGTG	GATTTGGTAA	TTGGATAGTT	CCAATTTTGA	TTGGGGCCCC	AGATATAAGT	TTTCCTCGTA
	241	TAATAAATAT	AAAGTTTTGA	TTGTTACCTC	CITCTTTTAT	TCTTCTTCTA	TGCTCAAGTC	TGGTTGAGGG	AGGTGCAGGG	ACTGGATGAA	CTGTGTATCC	TCCTTTAAGA	GGCCCCGTGG
	361	GTCAATGGGG	TGCGTCAGTG	GACTTGGCGA	TTTTCTCCTT	GCATTTGGCA	GGGATATCTT	CTAATTTTAGG	TGCTGTAATA	TTTATTACTA	CCAATTTTAA	TATACGTTCT	CCTGGAATAA
	481	GGATGGAACG	TTTAAGTTTA	TTTGTTTGAT	CIGTCTTAGT	AACGGCCTTC	CITCTTCTTT	TATCTTTACC	TGTAATTAGCG	GGAGCCATTA	CAATGTTACT	TACCGATCGA	AATTTTAATA
601	CTAGGTTTTT	TGATCCTGCT	GGTGGAGGTG	ATCCTAATTT	ATATCAGCAC	TTGTTTTGAT	TTTTTGGTCA	CCTTGNAAGT	TAAAN				
2	1	CCTNTATTTA	GTTTTGGTAA	TGTGATGTGG	TTTAGTAGGT	ACTGGAITAA	GTTTACTAAT	TGTTTTGAG	TTAGGARACTT	CTGGTCCGTT	TTTTAGGTGAT	GAICATTTTT	ATAATGTAA
	121	TGTAACGGCT	CACGCTTTCG	TTATAAATTT	TTTTCATAGT	ATACCTTTAA	TAATTTGGTG	ATTTGGTAAT	TGGATAGTTC	CAATTTTGA	TGGGGCCCCA	GATATAAGTT	TTTCCTCGTA
	241	AAATAAATATA	AGTTTTTGGT	TGTTACCTCC	TTCTTTTAT	CTTCTTCTA	GCCTAAGTCT	GGTTGAGGGA	GGTGCAGGGA	CTGGATGAAC	TGTGTATCCT	CCITTAAGAG	GGCCCCGTGG
	361	TCATGGGGGT	CGCTCAGTGG	ACTTGGCGAT	TTTTCTCCTG	CATTTGGCAG	GCGATATCTC	TAATTTAGGT	GCTGTAAAT	TTATTACTAC	CATTTTAAAT	ATACGTTCTC	CTGGAATAAG
	481	GATGGAACGT	TTAAGTTTAT	TTGTTGATC	TGCTTTAGTA	ACGGCCTTCC	TTCTTCTTTT	ATCTTACC	GTATTAGCGG	GAGCCATTAC	AATGTTACTT	ACCGATCGAA	ATTTTAATAC
601	TAGGTTTTTT	GATCCTGCTG	GTGGAGGTGA	TCCTAATTTA	TATCAGCACT	TGTTTTGAT	TTTTTGGTCA	CCTGGAAGTT	TAAAN				
3	1	CNNTTAAAT	AGTTTTTGGT	ATGTGATGTG	GTTTAGTAGG	TACTGGAITA	AGTTTACTAA	TTCGTTTTGA	GTTAGGAAC	TCTGGTCCGT	TTTTAGGTGA	TGATCATTTT	TATAATGTAA
	121	TTGTAACGGC	TCACGCTTTC	GTTATAAATTT	TTTTCATAGT	TATACCTTTA	ATAAATGGTG	GATTTGGTAA	TTGGATAGTT	CCAATTTTGA	TTGGGGCCCC	AGATATAAGT	TTTCCTCGTA
	241	TAATAAATAT	AAAGTTTTGA	TTGTTACCTC	CITCTTTTAT	TCTTCTTCTA	TGCTCAAGTC	TGGTTGAGGG	AGGTGCAGGG	ACTGGATGAA	CTGTGTATCC	TCCTTTAAGA	GGCCCCGTGG
	361	GTCAATGGGG	TGCGTCAGTG	GACTTGGCGA	TTTTCTCCTT	GCATTTGGCA	GGGATATCTT	CTAATTTTAGG	TGCTGTAATA	TTTATTACTA	CCAATTTTAA	TATACGTTCT	CCTGGAATAA
	481	GGATGGAACG	TTTAAGTTTA	TTTGTTTGAT	CIGTCTTAGT	AACGGCCTTC	CITCTTCTTT	TATCTTTACC	TGTAATTAGCG	GGAGCCATTA	CAATGTTACT	TACCGATCGA	AATTTTAATA
601	CTAGGTTTTT	TGATCCTGCT	GGTGGAGGTG	ATCCTAATTT	ATATCAGCAC	TTGTTTTGAT	TTTTTGGTCA	CCTTGNAAGT	TAAAN				
4	1	CCTTTAAT	AGTTTTTGGT	ATGTGATGTG	GTTTAGTAGG	TACTGGAITA	AGTTTACTAA	TTCGTTTTGA	GTTAGGAAC	TCTGGTCCGT	TTTTAGGTGA	TGATCATTTT	TATAATGTAA
	121	TTGTAACGGC	TCACGCTTTC	GTTATAAATTT	TTTTCATAGT	TATACCTTTA	ATAAATGGTG	GATTTGGTAA	TTGGATAGTT	CCAATTTTGA	TTGGGGCCCC	AGATATAAGT	TTTCCTCGTA
	241	TAATAAATAT	AAAGTTTTGA	TTGTTACCTC	CITCTTTTAT	TCTTCTTCTA	TGCTCAAGTC	TGGTTGAGGG	AGGTGCAGGG	ACTGGATGAA	CTGTGTATCC	TCCTTTAAGA	GGCCCCGTGG
	361	GTCAATGGGG	TGCGTCAGTG	GACTTGGCGA	TTTTCTCCTT	GCATTTGGCA	GGGATATCTT	CTAATTTTAGG	TGCTGTAATA	TTTATTACTA	CCAATTTTAA	TATACGTTCT	CCTGGAATAA
	481	GGATGGAACG	TTTAAGTTTA	TTTGTTTGAT	CIGTCTTAGT	AACGGCCTTC	CITCTTCTTT	TATCTTTACC	TGTAATTAGCG	GGAGCCATTA	CAATGTTACT	TACCGATCGA	AATTTTAATA
601	CTAGGTTTTT	TGATCCTGCT	GGTGGAGGTG	ATCCTAATTT	ATATCAGCAC	TTGTTTTGAT	TTTTTGGTCA	CCTGGAAGT	TAAAN				

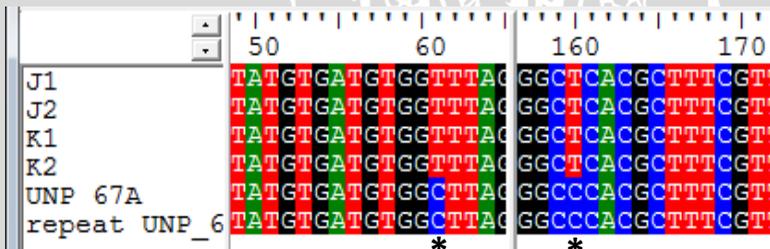
Gambar 8 . Hasil sekuensing DNA *Synaptula* UNP 101.

(1. Sekuensing (*Synaptula* UNP 101.1), 2. Sekuensing (*Synaptula* UNP 101.2), 3. Sekuensing (*Synaptula* UNP 101.3), dan 4. Sekuensing (*Synaptula* UNP 101.4) sedangkan Blok merah: kualitas pembacaan rendah / tidak valid ,Blok kuning: kualitas pembacaan cukup / cukup valid, dan Blok biru : kualitas pembacaan baik / valid).

Berdasarkan hasil sekuensing dapat diketahui bahwa hasil pembacaan nukleotida cukup baik, hal ini ditandai dengan presentasi basa nukleotida dengan warna blok biru yang menunjukkan bahwa hasil sekuensing memiliki nilai akurasi yang tinggi selain presentasi nukleotida yang berwarna biru juga ditandai dengan munculnya *peak* tunggal.

Berdasarkan data sekuen yang didapatkan dari keempat sampel PCR dari *Synaptula* .Sekuen forward kemudian di BLAST di NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Berdasarkan data yang didapatkan/ hasil blast tidak sesuai dengan identifikasi berdasarkan karakter morfologi yang telah dilakukan sebelumnya hal ini kemungkinan dikarenakan penggunaan primer CO1 yang sama dan bersifat universal (primer berdasarkan folmer et.al) sehingga terjadi pembacaan region yang sama.

Hipotesis tersebut didasarkan pada hasil alignment dari sampel J1,J2,K1,K2,dan UNP 67A sebagai berikut ;



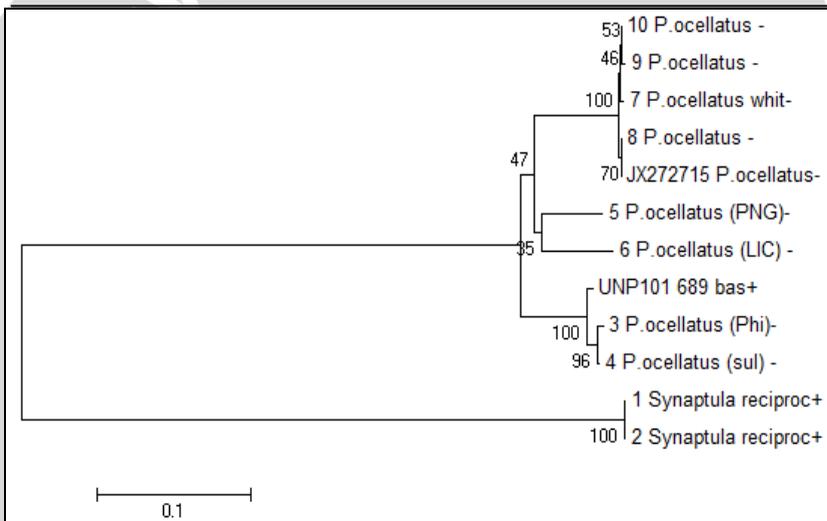
Gambar 9 . Hasil alignment hasil sekuensing *Synaptula* 101.1,101.2,101.3,101.4, dan UNP 67A (beda basa nukleotida ditunjuk oleh tanda bintang)

Dari hasil alignment menunjukkan bahwa hanya terdapat 2 basa yang berbeda (ditandai dengan tanda bintang) antara *Synaptula* (J1,J2,K1, dan K2) terhadap UNP 67A (*Plakobranthus ocellatus*) dan didapatkan hasil BLAST yang memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Plakobranthus*.

4.4 Jarak genetik dan Filogenetik *Synaptula*

Berdasarkan sekuen gen COI *Synaptula* (UNP101) yang telah didapatkan dari proses sekuensing, dialignment dengan sekuen

Synaptula dan *Plakobranchus* lainnya yang telah diunduh dari Genebank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) 11 sekuen. Pemilihan 11 sekuen berdasarkan dengan hasil BLAST dan identifikasi sebelumnya yang berbeda. Sekuen yang diambil berdasarkan dari pengambilan beberapa lokasi yang diidentifikasi dengan marker genetik gen COI. Setelah dialign, ujung sekuen dipotong untuk menyamakan panjang fragmen sekuen yang dipakai. Panjang fragmen gen COI yang dipakai adalah 462 bp pada masing-masing sekuen. Digunakan spesies *Synaptula* dan *Plakobranchus* dikarenakan terdapatnya perbedaan hasil blast dan identifikasi morfologi sebelumnya yang menunjuk pada spesies yang berbeda.



Gambar 10. Pohon filogeni *Synaptula* Raja Ampat (UNP101). Pohon filogeni menggunakan Neighbour joining dengan metode estimasi jarak P-distance (bootstrap 1000) pada data sekuen gen COI *Synaptula* Raja Ampat (UNP101) dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* dari Philipina (phi), Sulawesi (Sul), LIC, dan Papua New Guinea (PNG)

Tabel 1. Jarak genetik (%) dan nilai similaritas (%) antara *Synaptula* dari Raja Ampat (UNP 101) dengan *Synaptula reciprocans* dan *Plakobranchnus ocellatus* dari philipina (phi), Sulawesi (sul), dan menggunakan metode lizard island (LIC) menggunakan metode estimasi jarak p-distance (bostrap 1000).

Species	<i>Synaptula</i> UNP 101	
	jarak genetik (%)	similaritas(%)
3 P.ocellatus (Phi)-	1.30	98.70
4 P.ocellatus (sul) -	1.30	98.70
5 P.ocellatus (PNG)-	8.23	91.77
6 P.ocellatus (LIC) -	10.17	89.83
8 P.ocellatus -	11.47	88.53
JX272715 P.ocellatus-	11.47	88.53
7 P.ocellatus whit-	11.69	88.31
10 P.ocellatus -	11.69	88.31
9 P.ocellatus -	11.90	88.10
2 <i>Synaptula reciproc+</i>	76.84	23.16

Analisis filogeni berdasarkan fragmen gen COI menunjukkan bahwa *Synaptula* satu clade dengan *Plakobranchnus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina dengan nilai bootstrap yang tinggi. Berdasarkan perhitungan jarak genetik menggunakan metode p-distance didapatkan hasil bahwa *Synaptula* dari Raja Ampat (UNP 101) merupakan spesies *Plakobranchnus ocellatus* yang memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *Plakobranchnus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina. Nilai jarak genetik dan similaritas *Synaptula* UNP 101 dengan spesie *Plakobranchnus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina adalah 1.3% dan 98.7% dengan *standart error* sebesar 0.5%. Hal ini berbeda dengan identifikasi morfologi yang merujuk pada spesies *Synaptula*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi DNA template *Synaptula* dengan DNA template *Plakobranchnus* dikarenakan proses pengerjaan proses identifikasi yang bersamaan.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil sekuensing bahwa spesimen / organisme makroinvertebrata yang dikoleksi pada tanggal 4 Juni 2013 di Waigeo dengan detail lokasi 00d 12.340 lintang selatan dan 30.15.333 bujur timur pada kedalaman 20-80 meter, yang sebelumnya telah diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi sebagai *Synaptula* memiliki kemiripan yang tinggi dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina. Jarak genetic *Synaptula* UNP 101 dengan spesies *Plakobranchus ocellatus* dari Sulawesi dan Philipina adalah 1.3% dan nilai similaritas adalah 98.7%, sedangkan jika dibandingkan antara *Synaptula* UNP 101 dari Raja Ampat dengan *Synaptula reciprocans* jarak genetik sebesar 76.8% dan nilai similaritas sebesar 23.6%. Perbedaan hasil identifikasi berdasar karakter morfologi dan molekuler (berdasar sekuen gen COI) kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi DNA template *Synaptula* oleh DNA template *Plakobranchus* UNP 67 dikarenakan proses identifikasi dilakukan dalam kurun waktu yang bersamaan.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah sampel yang diawetkan sebaiknya secara utuh sehingga ciri morfologi dari spesimen yang didapat juga dapat dipelajari untuk memperkuat data yang diperoleh serta lebih akurat data yang didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPS] Badan Pusat Statistik.2008. Kabupaten Raja Ampat Dalam Angka.Badan Pusat Statistik Kabupaten Raja Ampat.Waisai.
- Aziz A. 1996. Makanan dan cara makan berbagai jenis teripang. *Oseana* 21(4): 43-59.
- Bakus GJ. In: QA. Jones, R. Endean (Eds.). 1973.Biology and Geology of Coral Reefs.vol. II.Academic Press: New York.
- Barcodeoflife. 2013.what is DNA barcoding. <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>. Diakses pada 10 Desember 2013.
- Bordbar .S, Farooq Anwar and Nazamid Saari. 2011. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods A Review. *Mar. Drugs* 2011, 9, 1761-1805; doi:10.3390/md9101761
- Claridge,J.E.Impact of 16S rRNA gene sequence for identification of bacteris on clinical microbiology and infections disease.*clinical microbiology reviews* 17(4):840-862.
- Coremap dan Dinas Perikanan dan Kelautan Kabupaten Raja Ampat. 2005.Atlas Sumberdoyo Pesisir dan Lout Kepulauan Raja Ampot (DistrikWoigeo Borot dan Woigeo Seiton). Kerja Sama Antara Coremap tahapII, Dinas Perikanan dan Kelautan Kabupaten Raja Ampat dengan PT.Edecon Prima Mandiri. 2005. Raja Ampat.
- Darsono,P. 1998. Pengenalan umum teripang (holothurians). *Oseana* 23 (1):1-8.
- Darsono,P. 2005. Teripang (Echinodermata:Holothurians) Perlu Dilindungi.*Jurnal Biologi Indonesia*.3 (9): 405-410.
- Darwin,C. R., 1842. The Structure and Distribution of Coral Reefs. Smith, Elder and Company,London (Reprinted 1962, University of California Press, Berkeley, CA).
- Dick CW, Kress WJ. 2009. Dissecting tropical plantdiversity with forest plots anda molecular toolkit.*Bioscience* 59: 745-755
- Discoverlife. 2013.*Synaptula* sp..<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Synaptula>. Diakses pada 10 desember 2013.

- Dheta, ErmelindaMeye. 2009. Sitotoksisitas dan Efek Ekstrak Etanol Kulit Buah Jambu Menté (Anacardiumoccidentale L.) TerhadapSelMieloma. FakultasBiologi UGM. Yogyakarta
- Effendi,1., T. Priantono, S. Tjokrosoetro & K. Budiono. 1981. Overview of disastrous tectonic earthquakes in the period between April 1979 – April 1980. *Bull. Geol. Res. and Dev. Centre,4: 1820.*
- Folmer M, M Black, W Hoeh, R Lutz & R Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrialcytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoaninvertebrates. *Molecular Marine Biology andBiotechnology 3: 294-299.*
- Gorajaampat. 2013. peta kepulauan raja ampat.www.gorajaampat.com. Diakses pada 10 November 2013.
- Hajibabaei. Dna barcode distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS 103: 968-971*
- Hantoro, W.S, P.A. Pirazzoli, C. Jouannic, H, Faure, C.T. Hoang, U. Radtke, C. Causse, M. Borel Best, R. Lafont,
- Hashimoto, Y. In: *Marine Toxins and Bioactive Marine Metabolites*, Japan ScientificSocieties Press, Tokyo, 1979.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaardJR. 2003. Biological identificationthrough DNA barcodes. *Proc. R. Soc.Lond 270: 313-321.*
- Hopper, H. A.; Levring, T.; Tanaka, Y. In: *Marine Algae in Pharmaceutical Science*,
- Jasin, M. 1992. *Zoologi Invertebrata*. Sinar Wijaya. Surabaya:x+277hlm.
- Jawahar, A.T., Nagarajan, J., & Shanmugam, S.A. Antimicrobial Substances of PotentialBiomedical Importance from Holothurian Species. *Indian J. Mar. Sci.* 2002, 31, 161–164.
- J. Michael Janda and Sharon L. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in theDiagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal Of Clinical Microbiology*, Sept. 2007, p. 2761–2764 Vol. 45, No. 90095-1137/07/\$08.00_0 doi:10.1128/JCM.01228-07. Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

- Jung-Hoon, Y., L. Jung-Sook, S. Young, P. Young-Ha & T.L. Sung. 1997. Reclassification of nocardioidea simplex ATCC 13260, ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*. international Journal of systematic Bacteriology 47(3):904-907.
- Katsui, N.; Suzuik, Y.; Katamura, S.; Irie, T. Tetrahedron. 1967. 23, 1185.
- Lahaye *et al.* 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS* 105(8): 2923-2928.
- Madigan, M.T.J.M. Martinko & J. Parker. 2010. Brock biology of microorganism Prentice-Hall, inc., Upper Saddle River: xix+991 hlm.
- Martoyo J, Aji N & Winanto T. 1996. Budi Daya Teripang. Depok : Penebar Swadaya
- McKenna, S.A, Gerald R Allen, and Suer suryadi. 2002. A Marine Rapid Assessment Of The Raja Ampat Islands, Papua Province, Indonesia. Conservation International.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, dan Peter. 2006. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55(5): 715-728.
- Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, and T. A. Dewey. 2013. The Animal Diversity Web (online). Accessed at <http://animaldiversity.org>. diakses pada 1 November 2013.
- Nicholl, D.S.T. 2002. An introduction to genetic engineering. 2nd ed. Cambridge University Press. New York. S
- Pachenik, J.A. 1996. Biology Of Invertebrates. 3rd ed. McGraw-Hill Companies, Inc. Boston.
- Pangastuti, A. 2006. definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16S rRNA dan gen penyandi protein. *biodiversitas* 7(3):292-296.
- Papp, Z. 1981. Temporal variation of elastic strain release in the Banda Sea region. *Bull. Geol. Res. and Dev. Centre*, 4: 13-17.
- Pawson David L & Doris J Pawson. 2008. An Illustrated Key To The Sea Cucumber Of The South Atlantic Bight. Smithsonian Institution. Washington.

- Pawson. David L, Doris J. Pawson,& Rachael A. King. 2010. A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea.). *Zootaxa* 2449: 1–48 (2010) www.mapress.com/zootaxa/.
- Pranoto E. N, Widodo Farid Ma'rif ,dan Delianis Pringgenies. 2012. Kajian Aktivitas Bioaktif Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Terhadap Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan* Volume 1, Nomor 1, Tahun 2012, Halaman 1-8. Online di : <http://www.ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jpbhp>
- Samyn,Y.,D. Vandenspiegel, & C Massin. 2006. A New Indo-West Pacific Species Of *Actinopyga* (Holothuroidea:aspidochirotida,Holothuroiidae). *Zootaxa*.
- S. Bieda & K. Lambeck. 1994. Quaternary uplifted coal reef terraces on A10r Island, East Indonesia. *Coral Reef*~, 13: 215-223.
- Sambrook,J & D.W.Russel. 2001. molecular cloning: a laboratory manual vol 2.3rd ed. Cold spring harbour laboratory press. New York.
- Stonik, V.A. 1996. Some Terpenoid and Steroid Derivates From Echinodems and Sponges. *Pure & Applicative Chemistry*.58 (3) : 423-436.
- Tamarin,R.H. 2002. Principles of genetics.7th ed.McGraw-Hill Companies,Inc.,Boston:xvi+609 hlm.
- Tamura K, Dudley J, Nei M dan Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Van Bemmelen,R. W. 1949. The Geology of Indonesia: General Geology of Indonesia and Adjacent Archipelagoes.Martinus Nijhoff, The Hague. 732 pp.
- Vilova, T. V.; Zenovski, V. P.; Deviatkova, M. A.; *Stomatologiia* 2005, 84, 10.
- Vol. 1, Walter de Gruyter, Berlin, 1979.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes B, dan Last P. 2005. DNA Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 360: 1847-1857.

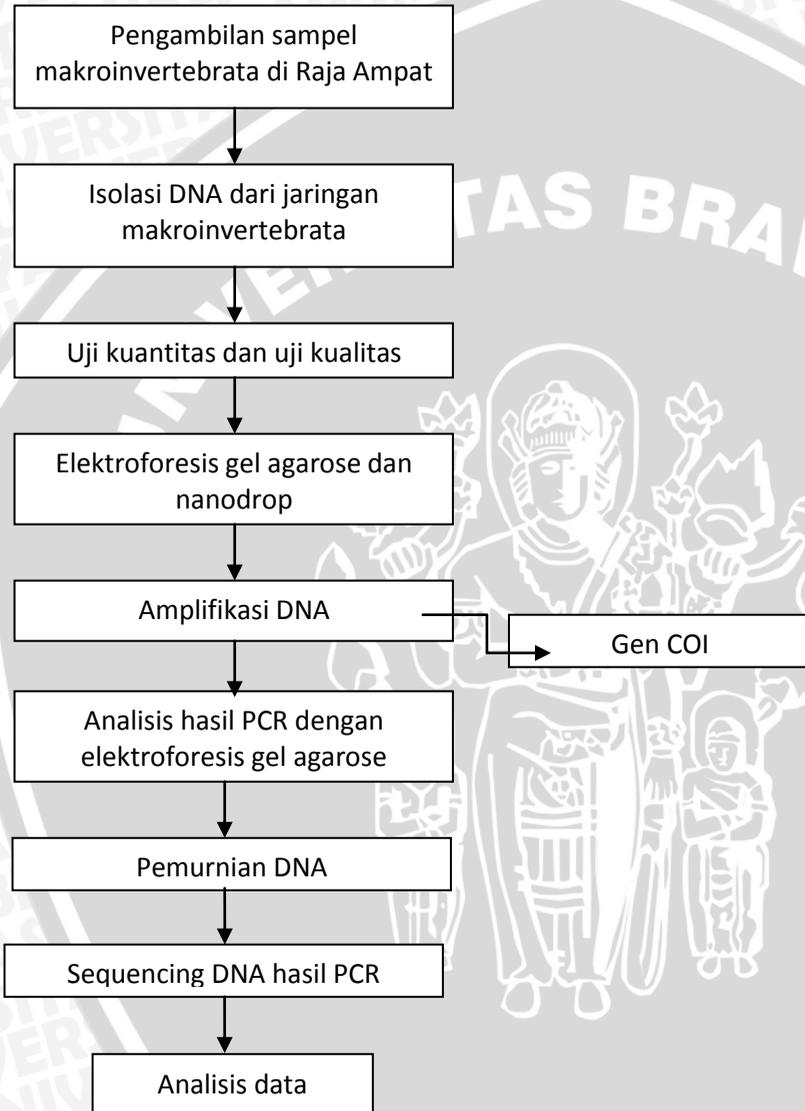
Wulandari,Ninditasya, Majiana Krisanti, Dewi Elfidasari. 2012. Keragaman Teripang asal Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu Teluk Jakarta. Unnes of Life science 1 (2) (2012). ISSN 2252-6277.

Yun,J.&S.Ryu. 2005. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX as a way to improve it.microbial cell factories 6(8):1-5.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

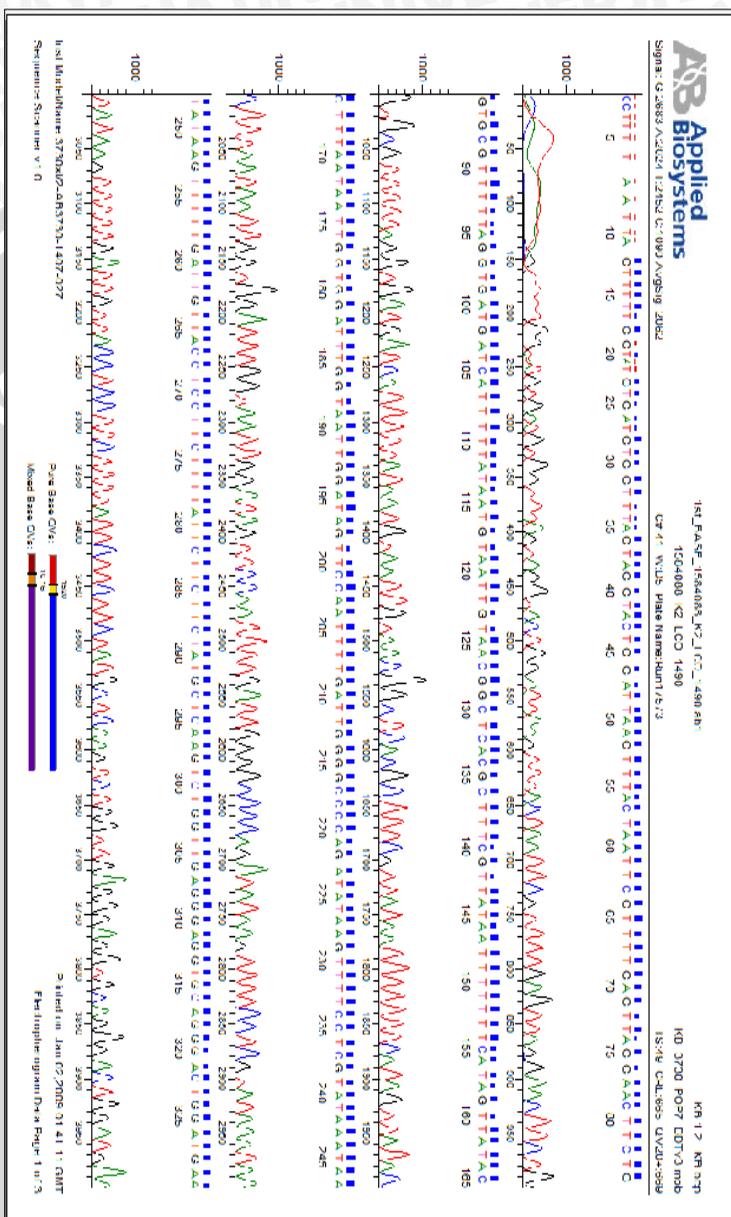


Lampiran 1 : Kerangka Operasional



Lampiran 2: Jadwal penelitian

Kegiatan	September	Oktober	November	Desember	Januari	Februari	Maret	April	Mei	Juni	Juli
Studi Literatur	■	■	■	■							
Penyusunan Proposal	■	■	■	■							
Seminar Proposal Skripsi					■						
Penelitian						■	■	■			
Seminar hasil Skripsi									■	■	
Ujian Skripsi											■



Gambar 1. Hasil elektroferogram gen COI *Synaptula* 101.1, 101.2, 101.3, dan 101.4

Lampiran 4 : Hasil penjajaran 4 sekuen *Synaptula* UNP 101 dengan data base di NCBI dengan software BLAST 4 sekuen hasil PCR

No	Spesies	Kode akses genebank	Query cover (%)	Identical (%)
1	<i>Plakobranthus</i> sp. 1 JV-2013 isolate Plk sp1 04Phi01 cytochrome c oxidase subunit 1 (COXI) gene, partial cds;mitochondrial .	KC573733.1	97	99
2	<i>Plakobranthus</i> sp. 1 JV-2013 isolate Plk sp1 07Sul01 cytochrome c oxidase subunit 1 (COXI) gene, partial cds;mitochondrial .	KC573732.1	97	99
3	<i>Plakobranthus</i> sp. 1 JV-2013 isolate Plk aff sp1 07SPNG01 cytochrome c oxidase subunit 1 (COXI) gene, partial cds;mitochondrial .	KC573734.1	97	92
4	<i>Plakobranthus ocellatus</i> isolate Po705LIC cytochrome c oxidase subunit 1 (Co1) gene, partial cds; mitochondrial	GC996679.1	97	90
5	<i>Plakobranthus</i> sp. 'white' JV-2013 isolate Plk wht 11Tha01 cytochrome c oxidase subunit 1 (COXI) gene, partial cds; mitochondrial.	KC573723.1	95	90
6	<i>Plakobranthus ocellatus</i> voucher Ploc 128 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	JX272711.1	94	90
7	<i>Plakobranthus ocellatus</i> voucher Ploc 103 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	JX272686.1	94	90
8	<i>Plakobranthus ocellatus</i> isolate 856 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds ; mitochondrial	HM187635.1	97	89

9	Plakobranchnus ocellatus isolate 850 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds ; mitochondrial	HM187633.1	97	89
10	<i>Plakobranchnus ocellatus</i> voucher Ploc 133 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds ; mitochondrial	JX272715.1	94	89
11	Plakobranchnus ocellatus voucher Ploc 116 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds ; mitochondrial	JX272699.1	94	89
12	<i>Plakobranchnus ocellatus</i> voucher Ploc 115 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds ; mitochondrial	JX272698.1	94	89
13	<i>Plakobranchnus ocellatus</i> voucher Ploc 112 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds ; mitochondrial	JX272695.1	94	89
14	<i>Plakobranchnus</i> aff. 'purple' JV-2013 isolate Plk aff pur 09Gua02 cytochrome c oxidase subunit 1 (COXI) gene, partial cds ; mitochondrial	KC573730.1	96	89
15	<i>Plakobranchnus</i> aff. 'purple' JV-2013 isolate Plk aff pur 08Mor03 cytochrome c oxidase subunit 1 (COXI) gene, partial cds ; mitochondrial	KC573729.1	95	89

Lampiran 5. Perhitungan jarak genetic (%) antara *Synaptula* dari Raja Ampat (UNP101) dengan *Synaptula reciprocans*, *Plakobranchus ocellatus* dari philipina (phi), Sulawesi (sul), lizard island (LIC) menggunakan metode estimasi jarak p-distance (bootstrap 1000)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 1 <i>Synaptula reciprocans</i>		0.0185	0.0000	0.0185	0.0178	0.0183	0.0179	0.0177	0.0178	0.0178	0.0179	0.0178
2. UNP101 689 bas+	0.7684		0.0185	0.0050	0.0152	0.0051	0.0123	0.0138	0.0152	0.0151	0.0154	0.0151
3. 2 <i>Synaptula reciprocans</i>	0.0000	0.7684		0.0185	0.0178	0.0183	0.0179	0.0177	0.0178	0.0178	0.0179	0.0178
4. 3 <i>P. ocellatus</i> (Phi)-	0.7641	0.0130	0.7641		0.0157	0.0029	0.0129	0.0142	0.0157	0.0156	0.0159	0.0156
5. 10 <i>P. ocellatus</i> -	0.7792	0.1169	0.7792	0.1255		0.0154	0.0139	0.0139	0.0022	0.0020	0.0021	0.0020
6. 4 <i>P. ocellatus</i> (sul) -	0.7684	0.0130	0.7684	0.0043	0.1212		0.0124	0.0142	0.0154	0.0153	0.0155	0.0153
7. 5 <i>P. ocellatus</i> (PNG)-	0.7814	0.0823	0.7814	0.0909	0.1017	0.0866		0.0121	0.0139	0.0139	0.0141	0.0139
8. 6 <i>P. ocellatus</i> (LIC) -	0.7879	0.1017	0.7879	0.1104	0.1061	0.1104	0.0866		0.0139	0.0140	0.0141	0.0140
9. 7 <i>P. ocellatus</i> whit-	0.7792	0.1169	0.7792	0.1255	0.0022	0.1212	0.1017	0.1061		0.0029	0.0031	0.0029
10. 8 <i>P. ocellatus</i> -	0.7792	0.1147	0.7792	0.1234	0.0022	0.1190	0.0996	0.1082	0.0043		0.0029	0.0000
11. 9 <i>P. ocellatus</i> -	0.7814	0.1190	0.7814	0.1277	0.0022	0.1234	0.1039	0.1082	0.0043	0.0043		0.0029
12. JX272715 <i>P. ocellatus</i>	0.7792	0.1147	0.7792	0.1234	0.0022	0.1190	0.0996	0.1082	0.0043	0.0000	0.0043	