

**ANALISIS KEKERABATAN GENETIK MENGGUNAKAN DNA KLOOROPLAS
GEN *rbcL* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase*) DAN GEN
matK (*Maturase K*) PADA SPESIES LAMUN DI PAPUA BARAT**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN
JURUSAN PEMANFAATAN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN KELAUTAN**

Oleh:
CYNTHIA ASTHARI KRIS HARDANI
115080601111039



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2015

**ANALISIS KEKERABATAN GENETIK MENGGUNAKAN DNA KLOOROPLAS
GEN *rbcl* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase*) DAN GEN
matK (*Maturase K*) PADA SPESIES LAMUN DI PAPUA BARAT**

SKRIPSI

PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN

JURUSAN PEMANFAATAN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN KELAUTAN

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Kelautan di Fakultas
Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

CYNTHIA ASTHARI KRIS HARDANI

115080601111039



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

SKRIPSI

ANALISIS KEKERABATAN GENETIK MENGGUNAKAN DNA KLOROPLAS
GEN *rbcL* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase*) DAN GEN
matK (*Maturase K*) PADA SPESIES LAMUN DI PAPUA BARAT

Oleh:

CYNTHIA ASTHARI KRIS HARDANI

NIM. 115080601111039

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 25 Juni 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji 1

Dr. Yuni Kilawati, S. Pi., M. Si.

NIP. 19730702 200501 2 001

Tanggal :

Dosen Penguji 2

Citra Satrya Utama D., S. Pi., M. Si.

NIK. 2013048401272001

Tanggal :

Dosen Pembimbing 1

Feni Iranawati, S. Pi., M. Si., Ph. D.

NIP. 19740812 200312 2 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing 2

Ade Yamindago, S. Kel., MP., M.Sc.

NIP. 19840521 200801 1 002

Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan Pemanfaatan
Sumberdaya Perikanan Kelautan

Dr. Ir. Daduk Setyohadi, MP.

NIP. 19630608 198703 1 003

Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Laporan Skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil karya dan pemikiran saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak pernah terdapat tulisan, pendapat, atau karya orang lain yang pernah diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam laporan ini dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka. Penelitian ini merupakan bagian dari Indonesian Biodiversity Research Center (IBRC) *project* melalui *PEER grant (the Partnerships for Enhanced Engagement in Research, No: PGA-2000003438)*, didanai oleh United States Agency for International Development (USAID) dan the National Science Foundation (NSF) bekerjasama dengan NSF-PIRE Program.

Apabila pada kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa usulan skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Penulis,

Cynthia Asthari Kris Hardani
NIM. 115080601111039

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Tuhan dengan selesainya Skripsi ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Tuhan Yesus Kristus karena atas berkat dan karunia-Nya laporan Skripsi ini dapat selesai dengan baik dan tepat pada waktunya.
2. Kedua orang tua penulis, Papa Surjo Pratomo, B. Sc dan Mama Justo Marhaeni, B. Sc karena senantiasa mendoakan, memberikan motivasi, dan dukungan bagi penulis mulai dari awal hingga saat ini.
3. Ibu Feni Iranawati, S. Pi., M. Si., Ph. D sebagai Dosen Pembimbing I dan Bapak Ade Yamindago, S. Kel., M. Sc., MP sebagai Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan arahan yang terbaik selama proses pemilihan topik hingga penulisan laporan.
4. Ibu Dr. Yuni Kilawati, S. Pi., M. Si sebagai Dosen Penguji I dan Ibu Citra Satrya Utama D, S. Pi., M. Si sebagai Dosen Penguji II atas kritik serta saran yang sangat membangun untuk penulisan laporan Skripsi.
5. Ibu Citra Satrya Utama D, S. Pi., M. Si dan Ibu Rarasrum Dyah K., S. Kel., M. Sc yang telah mengajak dan memperkenalkan penulis pada topik penelitian ini.
6. Seluruh Dosen Program Studi Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya atas pengalaman dan pengajaran yang diberikan selama proses perkuliahan.
7. United States Agency for International Development (USAID) dan the National Science Foundation (NSF) bekerja sama dengan NSF-PIRE Program yang telah mendanai seluruh proses pengerjaan penelitian ini.
8. Semua peneliti di Indonesian Biodiversity Research Center, Denpasar :
 - Bang Aji Wahyu Anggoro dan Mbak Dita Cahyani yang telah memberikan begitu banyak masukan untuk penelitian ini
 - Mbak Astria Yusmalinda sebagai tempat berbagi cerita, keluh, kesah selama berada di Bali dan selalu memberi jawaban atas semua pertanyaan penulis
 - Bang Andrianus Sembiring yang selalu bersedia membantu dan menghibur penulis
 - Mbak Yuli Syamsuni sebagai supervisor atas bimbingan dan arahnya selama penulis berada di Laboratorium Indonesian Biodiversity Research Center

- Mbak Rizki Wulan, Mbak Angka, Mbak Rina, Mbak Eka, Bang Samsul, Mbak Elok, Mbak Dian atas segenap bantuan, pengalaman, cerita, waktu yang telah diberikan untuk membantu penulis dalam mengerjakan penelitian ini
9. Rekan satu topik penelitian Mbak Andini dan Ma'rufah untuk semua masukan dan saling sharing ilmu selama pengerjaan Laporan PKL maupun skripsi.
 10. Teman-teman baru penulis (Mbak Lita, Bang Dinar, Bang Ichsan, Mbak Dhynsy, Steve, Rafid, Chepy, Shinta, Santi, Anita, Yunita, Mayliza), menyenangkan dapat mengenal kalian.
 11. Alexander Saragih yang telah menjadi pendengar, pemberi masukan yang terbaik, dan tempat berbagi segala cerita untuk penulis serta Intan Candra Dewi, Raista Nur Tazkiya, dan Emira Dyah Larasati yang telah menjadi sahabat paling setia bagi penulis saat suka maupun duka.
 12. Om Sigit, Tante Hermin, Dek Rena yang bersedia menjadi tempat bernaung dan beristirahat dari kelelahan lab selama di Bali.
 13. Teman-teman istimewa (Sucong, Vivin, Dira, Trias W, Isna, Fitri, Ajeng, Ica, Nanda, Barbara, Uldy, Sri, Adit, Fazi, Nito, Samid, Dito, Yusak, Habib, Ficky, Arif, Bagas, Ibnu, Danang, Daus, Yosev, Ucup, dan Himanikor lainnya) yang senantiasa berbagi cerita dan tawa setiap waktu untuk penulis.
 14. Geng Kertosari 22 (Fira, Fitri, Mei, Riska, Bintang, Indah, Dwi, Lia, Chindy, Arin, Mbak Aning, Mbak Kiky, Yane) yang telah menjadi tempat penulis berbagi cerita setiap hari.
 15. My future husband, dear Liam Payne, Harry Styles, Niall Horan, dan Louis Tomlinson.
 16. Kakak-kakak Ilmu Kelautan 2008, 2009, dan 2010 serta adik-adik Ilmu Kelautan 2012, dan 2013 yang telah memberikan banyak cerita selama penulis berkuliah di Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

RINGKASAN

CYNTHIA ASTHARI KRIS HARDANI. Analisis Kekerabatan Genetik Menggunakan Dna Kloroplas Gen *rbcL* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase*) dan Gen *matK* (*Maturase K*) pada Spesies Lamun di Papua Barat (dibawah bimbingan **Feni Iranawati, S. Pi., M. Sc., Ph. D. dan Ade Yamindago, S. Kel., M. Sc., MP.**).

Lamun (*seagrass*) adalah satu-satunya kelompok tumbuh-tumbuhan berbunga yang terdapat di lingkungan laut. Ekosistem padang lamun perlu dijaga dan dimanfaatkan dengan bijak karena padang lamun memiliki peran yang penting di ekosistem pesisir. Peran dari padang lamun yaitu sebagai tempat pemijahan dan tempat mencari makan bagi ikan dan kerang-kerangan dan mengurangi kekeruhan perairan. Lamun juga berperan penting pada siklus karbon dan nutrisi global serta dalam daur ulang berbagai zat hara di lingkungan perairan laut dangkal. Padang lamun, mangrove, dan terumbu karang bekerja sama untuk menyediakan lingkungan yang stabil dan ideal bagi organisme laut. Namun, gangguan seperti perubahan iklim global dan polusi lokal mengancam padang lamun dan organisme di sekitarnya. Oleh karena itu, ekosistem pesisir harus dapat mempertahankan keanekaragaman genetik semua organisme yang ada dalam ekosistem tersebut, termasuk di dalamnya adalah spesies lamun.

Ancaman bagi padang lamun tersebut menuntut lamun untuk dapat bertahan hidup dengan beradaptasi pada kondisi lingkungan yang berubah tersebut. Tidak jarang karena ada pengaruh dari polusi lokal atau perubahan habitat menimbulkan kemiripan morfologi dari beberapa spesies lamun yang ada menyebabkan sulitnya dilakukan identifikasi secara morfologi sehingga dibutuhkan identifikasi secara molekuler (genetik) dengan menggunakan teknik *DNA barcoding* yaitu metode untuk mengidentifikasi suatu spesies menggunakan urutan sekuens DNA pendek.

Menurut rekomendasi dari *Consortium for the Barcoding of Life (CBOL)*, gen *rbcL* dan *matK* digunakan dalam studi *DNA barcoding* dari lamun. Penelitian mengenai kekerabatan genetik atau yang sering disebut filogenetik pada lamun cukup banyak dilakukan di dunia. Misal pada penelitian *Vy et al.* (2013) yang menyatakan bahwa salah satu genus pada lamun yang memiliki taksonomi paling kompleks adalah genus *Halophila* sp. Contohnya pada *Halophila ovalis*

yang memiliki variasi genetik kecil tetapi plastisitas morfologinya besar. Penelitian tersebut bermaksud mengidentifikasi gen yang informatif untuk membedakan spesies antara genus *Halophila* sp. serta hubungan filogenetik antara spesies *Halophila* sp. lain di Viet Nam.

Metode yang digunakan untuk identifikasi molekuler meliputi koleksi sampel, ekstraksi DNA dengan Qiagen Kit dan amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan primer *rbcl* dan *matK* dengan siklus PCR modifikasi dari Lucas *et al.* (2012). Tahap berikutnya dilakukan elektroforesis untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA, sekuensing, dan menganalisis sekuens DNA yang diperoleh. Total sampel yang dikoleksi berjumlah 18 buah dengan rincian enam sampel dari perairan Wosi dan Rendani, Manokwari, Papua Barat dan 12 sampel dari Pantai Timur Manyafun, Papua Barat.

Metode rekonstruksi pohon filogeni yang digunakan adalah *Neighbor Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML). Kekerabatan genetik lamun dari Papua Barat terbagi menjadi dua kelompok besar yaitu famili Hydrocharitaceae dan Cymodoceaceae 'kompleks'. Famili Hydrocharitaceae yang terdiri dari *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, dan *Halophila ovalis* sedangkan famili Cymodoceaceae 'kompleks' terdiri dari *Cymodocea rotundata*. Gen *matK* lebih efektif dalam analisis filogenetik daripada gen *rbcl* karena gen *matK* mampu mengidentifikasi perbedaan jarak genetik yang lebih besar. Oleh karena itu, gen *matK* mampu membentuk pohon filogeni dengan percabangan yang lebih terperinci daripada percabangan yang dibentuk oleh pohon filogeni gen *rbcl*.

Kata kunci : *rbcl*, *matK*, lamun (*seagrass*), pohon filogeni, Hydrocharitaceae, Cymodoceaceae 'kompleks'

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat dan karunia-Nya Laporan Skripsi yang berjudul **Analisis Kekerabatan Genetik menggunakan DNA Kloroplas Gen *rbcL* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase*) dan Gen *matK* (*Maturase K*) pada Spesies Lamun di Papua Barat** telah selesai dengan baik. Pada laporan ini penulis menyajikan bahasan tentang pengujian empat spesies lamun yaitu *Thalassia hemprichii*, *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, dan *Halophila ovalis* yang diambil dari perairan Papua Barat dengan teknik *DNA barcoding*. Teknik ini juga dianggap lebih terpercaya dan lebih mudah dilakukan untuk mengetahui kemiripan antara sekuens sampel yang diujikan dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank*. Sekuens tersebut diolah dan dilakukan analisis kekerabatan genetik dengan membuat pohon filogeni menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML).

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penulisan Laporan Skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan oleh penulis. Semoga dengan disusunnya Laporan Skripsi ini dapat menambah pengetahuan dan bermanfaat bagi para pembaca.

Malang, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

PERNYATAAN ORISINALITAS	i
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Kegunaan	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Lamun (<i>Seagrass</i>)	6
2.2 Pola Distribusi Lamun	7
2.3 Fungsi dan Ancaman terhadap Lamun	10
2.4 DNA Barcoding	11
2.5 DNA Kloroplas	12
2.6 Ekstraksi DNA	14
2.7 Amplifikasi DNA	15
2.8 Elektroforesis	17
2.9 Pohon Filogeni	18
2.10 Metode Analisis Kekerabatan Genetik	21
2.11 Bootstrap	24
3. METODE PENELITIAN	26
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan	26
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	27
3.2.1 Alat-Alat Penelitian	27
3.2.2 Bahan-Bahan yang Dibutuhkan	27
3.3 Alur Penelitian	27
3.4 Skema Kerja	29
3.4.1 Pengambilan dan Pengawetan Sampel	29
3.4.2 Ekstraksi Sampel	30

3.4.3 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	32
3.4.4 Elektroforesis	33
3.4.5 Proses Analisis Sekuens DNA	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Analisis Hasil Ekstraksi DNA	37
4.2 Analisis Hasil Amplifikasi DNA.....	40
4.3 Identifikasi Molekuler Spesies	45
4.3.1 Identifikasi Molekuler Lamun dengan Gen matK.....	48
4.3.2 Identifikasi Molekuler Lamun dengan Gen rbcL	50
4.4 Analisis Nukleotida	52
4.4.1 Variasi Nukleotida.....	52
4.4.2 Variasi Jarak Genetik.....	54
4.5 Pohon Filogeni	60
4.5.1 Pohon Filogeni dengan Gen matK	60
4.5.2 Pohon Filogeni dengan Gen rbcL.....	62
4.6 Hubungan Kekerbatan Genetik dalam Famili Hydrocharitaceae.....	65
4.7 Hubungan Kekerbatan Genetik antara Lamun Sampel dengan <i>Outgrup</i> (<i>Zostera marina</i>).....	67
4.8 Pengaruh Perbedaan Lokasi terhadap Spesies <i>Enhalus acoroides</i>	68
4.8.1 Analisis Polimorfik <i>Site</i>	69
4.8.2 Persebaran Benih <i>Enhalus acoroides</i>	70
5. PENUTUP	74
5.1 Kesimpulan	74
5.2 Saran	75
DAFTAR PUSTAKA.....	76
LAMPIRAN	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Pola Distribusi Global Lamun (<i>Seagrass</i>).....	8
Gambar 2. Struktur DNA Kloroplas pada Tumbuhan	14
Gambar 3. Monophyly	19
Gambar 4. Polyphyly	20
Gambar 5. Paraphyly.....	20
Gambar 6. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Papua Barat	26
Gambar 7. Alur Penelitian Skripsi	28
Gambar 8. Visualisasi Hasil Ekstraksi Sampel Lamun	38
Gambar 9. Siklus PCR Gen matK.....	42
Gambar 10. Siklus PCR Gen rbcL	42
Gambar 11. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Menggunakan Gen matK.....	43
Gambar 12. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Menggunakan Gen rbcL	44
Gambar 13. Elektropherogram Hasil Sekuensing	46
Gambar 14. Pohon Filogeni Gen matK	61
Gambar 15. Pohon Filogeni Gen rbcL.....	63
Gambar 16. Peta Arus di Wilayah Papua Barat Tahun 2014	71



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Sebaran Padang Lamun di Kawasan ASEAN 9

Tabel 2. Komposisi Larutan Master Mix 41

Tabel 3. Hasil Identifikasi Spesies Lamun pada Gen matK menggunakan BLAST
..... 48

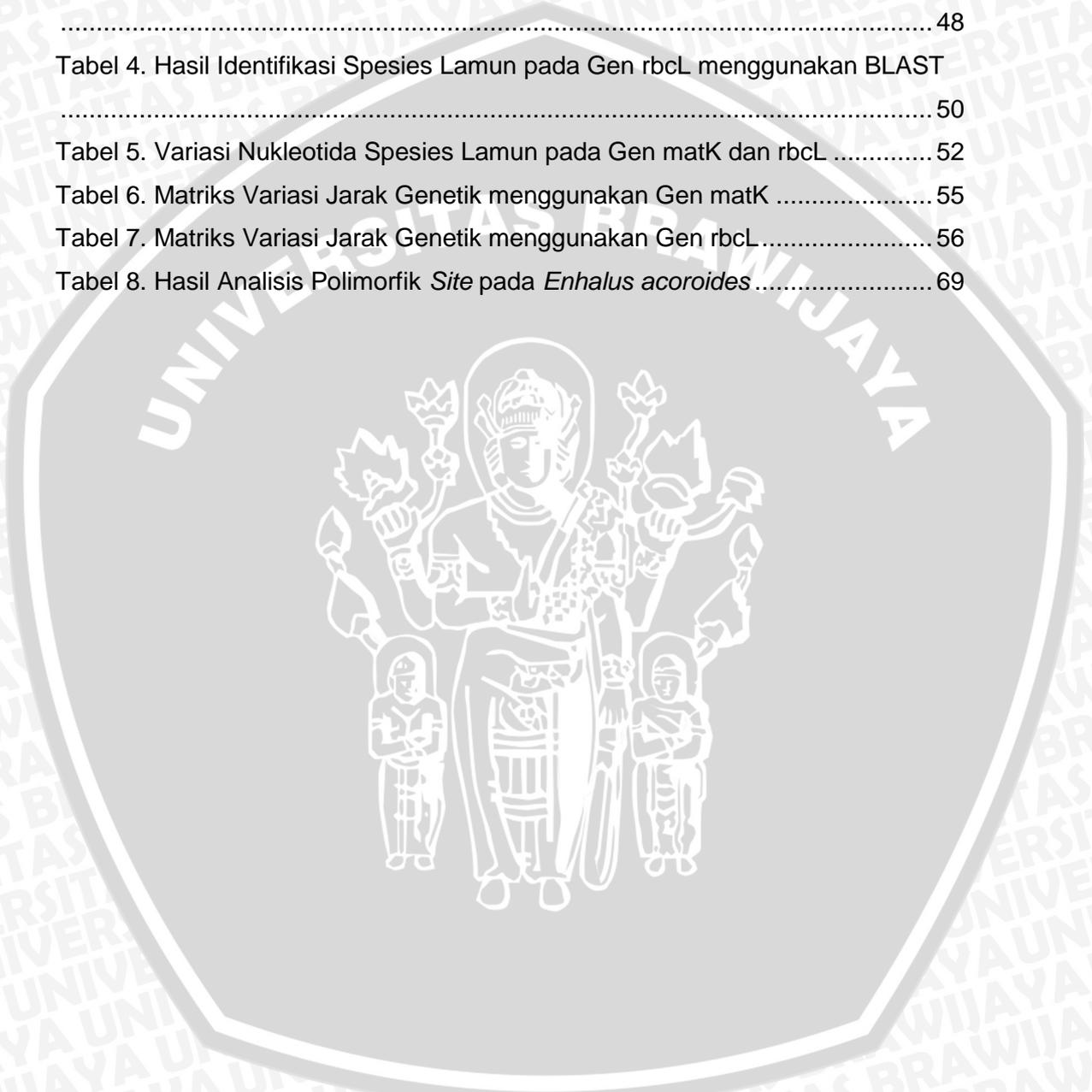
Tabel 4. Hasil Identifikasi Spesies Lamun pada Gen rbcl menggunakan BLAST
..... 50

Tabel 5. Variasi Nukleotida Spesies Lamun pada Gen matK dan rbcl 52

Tabel 6. Matriks Variasi Jarak Genetik menggunakan Gen matK 55

Tabel 7. Matriks Variasi Jarak Genetik menggunakan Gen rbcl 56

Tabel 8. Hasil Analisis Polimorfik Site pada *Enhalus acoroides* 69



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lamun (*seagrass*) adalah satu-satunya kelompok tumbuh-tumbuhan berbunga yang terdapat di lingkungan laut. Jumlah jenis lamun di dunia adalah 60 jenis, yang terdiri atas 4 suku dan 12 marga. Di perairan Indonesia terdapat 13 jenis yang terdiri atas 2 suku dan 7 marga. Beberapa jenis lamun yang ada di Indonesia adalah *Enhalus acoroides*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule pinifolia*, *Halophila ovalis*, *Thalassodendron ciliatum*, *Thalassia hemprichii*, dan *Syringodium isoetifolium* (Romimohtarto *et al.*, 2005; Maryanto *et al.*, 2013).

Ekosistem padang lamun perlu dijaga dan dimanfaatkan dengan bijak karena padang lamun memiliki peran yang penting di ekosistem pesisir. Menurut Waycott *et al.* (2004) dan Hemminga *et al.* (2000), peran dari padang lamun yaitu sebagai tempat pemijahan dan tempat mencari makan bagi ikan dan kerang-kerangan dengan nilai ekonomis tinggi dan mengurangi kekeruhan perairan dengan meningkatkan stabilisasi sedimen. Lamun juga berperan penting pada siklus karbon dan nutrisi global serta dalam daur ulang berbagai zat hara di lingkungan perairan laut dangkal. Padang lamun bersama dengan mangrove di daerah tropis merupakan vegetasi yang dominan di pinggiran pantai yang berperan sebagai pemisah antara aktivitas di darat dan laut. Menurut Nakajima *et al.* (2012), padang lamun, mangrove, dan terumbu karang bekerja sama untuk menyediakan lingkungan yang stabil dan ideal bagi organisme laut. Namun, gangguan seperti perubahan iklim global dan polusi lokal mengancam padang lamun dan organisme di sekitarnya. Oleh karena itu, ekosistem pesisir harus dapat mempertahankan

keanekaragaman genetik semua organisme yang ada dalam ekosistem tersebut, termasuk di dalamnya adalah spesies lamun.

Ancaman bagi padang lamun tersebut menuntut lamun untuk dapat bertahan hidup dengan beradaptasi pada kondisi lingkungan yang berubah tersebut. Tidak jarang karena ada pengaruh dari polusi lokal atau perubahan habitat menimbulkan kemiripan morfologi dari beberapa spesies lamun yang ada menyebabkan sulitnya dilakukan identifikasi secara morfologi sehingga dibutuhkan identifikasi secara molekuler (genetik). Terlebih lagi lamun bereproduksi secara seksual dan aseksual, sehingga identifikasi lamun antara spesies secara morfologi menjadi semakin sulit. Metode identifikasi secara molekuler dapat dilakukan dengan menggunakan *DNA barcoding*. Hal ini juga telah dibuktikan dengan penelitian sebelumnya oleh Kusumasari *et al.* (2014), bahwa teknik *DNA barcoding* dengan menggunakan dua lokus gen DNA kloroplas yaitu *matK* (*Maturase K*) dan *rbcL* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase*) mampu melakukan identifikasi spesies lamun *Thalassia hemprichii*, *Syringodium isoetifolium*, serta *Enhalus acoroides* di perairan Kabupaten Malang dan Kabupaten Lamongan.

DNA barcoding merupakan metode untuk mengidentifikasi suatu spesies menggunakan urutan sekuens DNA pendek (Lucas *et al.*, 2012). *DNA barcoding* menggunakan data fragmen sekuens DNA hingga tingkat spesies untuk menghasilkan informasi yang lebih detail. Tingkat akurasi sekuens DNA dapat diketahui melalui kemampuan sekuens tersebut untuk mengidentifikasi suatu organisme (Hollingsworth, 2007). Menurut rekomendasi dari *Consortium for the Barcoding of Life (CBOL)*, gen *rbcL* dan *matK* digunakan dalam studi *DNA barcoding* dari lamun. Lucas *et al.* (2012) menganalisis urutan fragmen DNA hingga tingkat famili dan genus menggunakan gen *rbcL* dan juga ditemukan hasil bahwa gen *matK*

merupakan gen yang informatif untuk menganalisis urutan fragmen DNA pada tingkat spesies.

Penelitian mengenai kekerabatan genetik atau yang sering disebut filogenetik pada lamun cukup banyak dilakukan di dunia. Penelitian Olsen *et al.* (2004), analisis molekuler yang dilakukan menjelaskan bahwa spesies yang ditemukan adalah *Zostera capricorni*, *Zostera japonica*, *Zostera noltii*, *Zostera tasmanica*, dan *Zostera marina*. Hasil analisis filogenetik menyatakan bahwa *Zostera* sp. yang hubungan kekerabatannya paling dekat adalah *Zostera japonica* dari Pasifik Utara dan Pasifik Selatan dengan *Zostera noltii* dari Atlantik Utara dan Atlantik Selatan. Selain itu, analisis filogenetik juga dilakukan untuk memberikan informasi dalam taksonomi organisme yang kompleks. Menurut Vy *et al.* (2013), menyatakan bahwa salah satu genus pada lamun yang memiliki taksonomi paling kompleks adalah genus *Halophila* sp. Contohnya pada *Halophila ovalis* yang memiliki variasi genetik kecil tetapi plastisitas morfologinya besar. Penelitian tersebut juga bermaksud mengidentifikasi gen yang informatif untuk membedakan spesies antara genus *Halophila* sp. serta hubungan filogenetik antara spesies *Halophila* spp.

Lokasi pengambilan sampel lamun terbagi menjadi dua yaitu perairan Wosi dan Rendani, Manokwari dan Pantai Timur ManyaiFun, Kabupaten Waigeo Barat. Lokasi pengambilan sampel lamun yang pertama yaitu Kabupaten Manokwari yang kini mulai dilirik oleh wisatawan untuk menikmati keindahan alam, terutama pesisir pantainya yang menawan (Kemendagri, 2015). Lokasi pengambilan sampel lamun yang kedua yaitu Kepulauan Raja Ampat. Kepulauan Raja Ampat terletak di pusat segitiga karang dunia (*coral triangle*) dan memiliki keanekaragaman hayati laut tropis paling kaya di dunia. Salah satu wilayah dari Kepulauan Raja Ampat yang memiliki pemandangan

pantai yang indah dan berpotensi untuk dikembangkan adalah di Perairan ManyaiFun (COREMAP, 2014).

Penelitian mengenai filogenetik lamun ini penting dilakukan karena penelitian mengenai filogenetik lamun khususnya di Indonesia sangat terbatas. Keanekaragaman dan tutupan lamun tinggi di Indonesia antara lain di Papua Barat sehingga padang lamun merupakan ekosistem yang penting untuk dilindungi.

1.2 Rumusan Masalah

Perumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana variasi DNA spesies dari lamun di perairan Papua Barat.
2. Bagaimana hubungan kekerabatan genetik spesies lamun dari Papua Barat.
3. Bagaimana efektivitas gen matK dibandingkan dengan gen rbcL dalam menganalisis kekerabatan genetik dari spesies lamun di perairan Papua Barat.

1.3 Tujuan

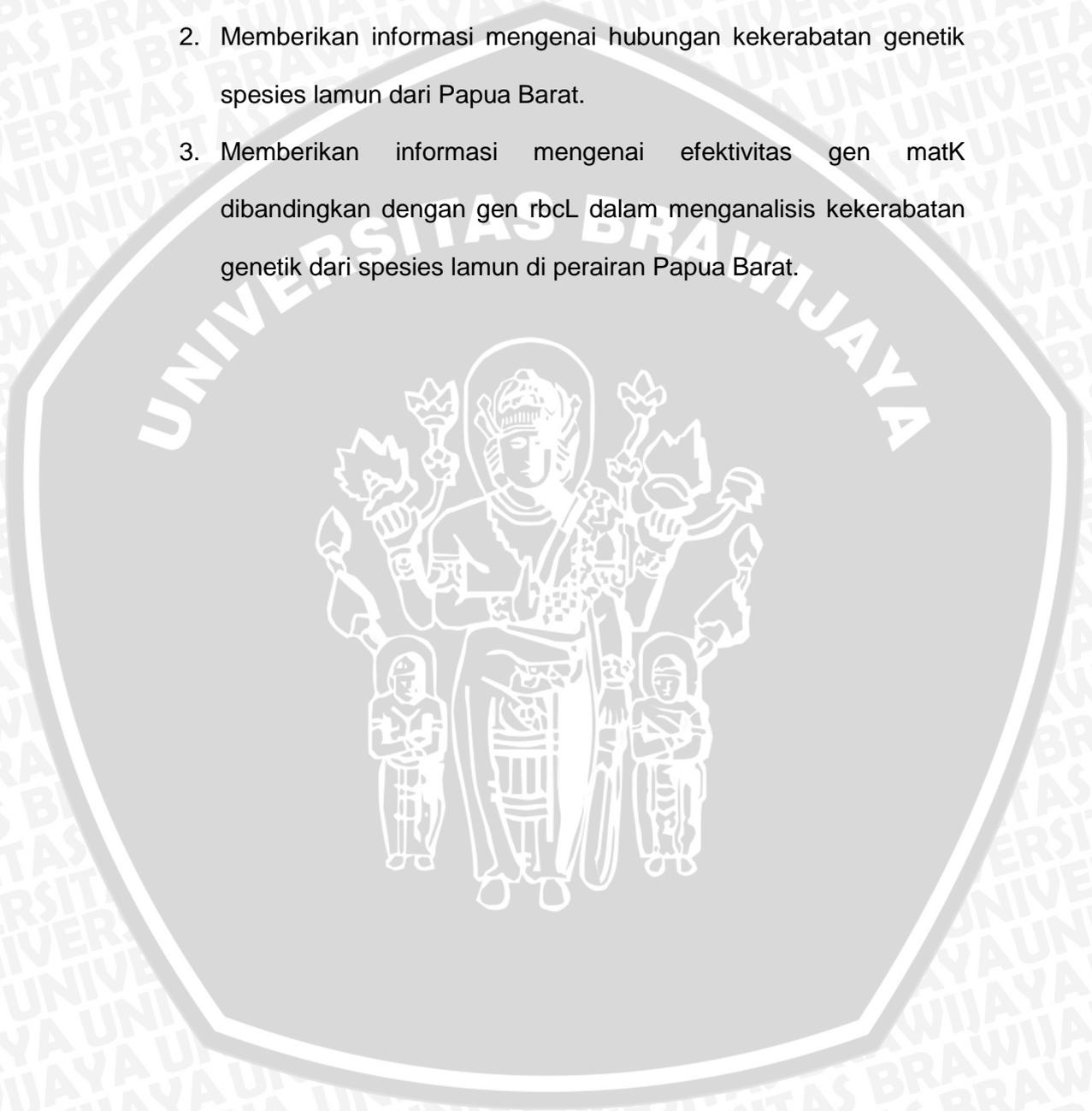
Tujuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui variasi DNA dari spesies lamun di Papua Barat.
2. Mengetahui hubungan kekerabatan genetik spesies lamun dari Papua Barat.
3. Mengetahui efektivitas gen matK dibandingkan dengan gen rbcL dalam menganalisis kekerabatan genetik dari spesies lamun di perairan Papua Barat.

1.4 Kegunaan

Penelitian ini memiliki beberapa kegunaan sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai variasi DNA pada lamun di Papua Barat.
2. Memberikan informasi mengenai hubungan kekerabatan genetik spesies lamun dari Papua Barat.
3. Memberikan informasi mengenai efektivitas gen *matK* dibandingkan dengan gen *rbcl* dalam menganalisis kekerabatan genetik dari spesies lamun di perairan Papua Barat.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lamun (*Seagrass*)

Lamun (*seagrass*) merupakan tumbuhan berbunga yang lingkungan hidupnya di perairan laut dangkal. Semua jenis lamun merupakan tumbuhan berbiji satu atau tunggal yang biasa disebut monokotil. Struktur lamun memiliki akar, rimpang (*rhizoma*) yang menjalar di atas substrat, daun, bunga, dan buah sama dengan tumbuhan berpembuluh yang hidup di lingkungan darat (Azkab, 1999).

Ruas-ruas pada rimpang lamun memiliki panjang yang berbeda-beda, dari ruas-ruas inilah tumbuh tunas daun lamun yang tegak. Akar lamun memiliki fungsi yang sama dengan tumbuhan pada umumnya yaitu untuk menyerap nutrisi dari substrat tempat tumbuhnya. Lamun hidup pada lingkungan perairan sehingga akar tidak berperan penting dalam penyerapan air dan nutrisi juga diserap langsung dari perairan melalui daun. Keseluruhan bagian tubuh lamun terendam air, namun tidak ada masalah dalam hal perolehan oksigen karena lamun memiliki saluran udara di daun dan batangnya (Lanyon, 1986).

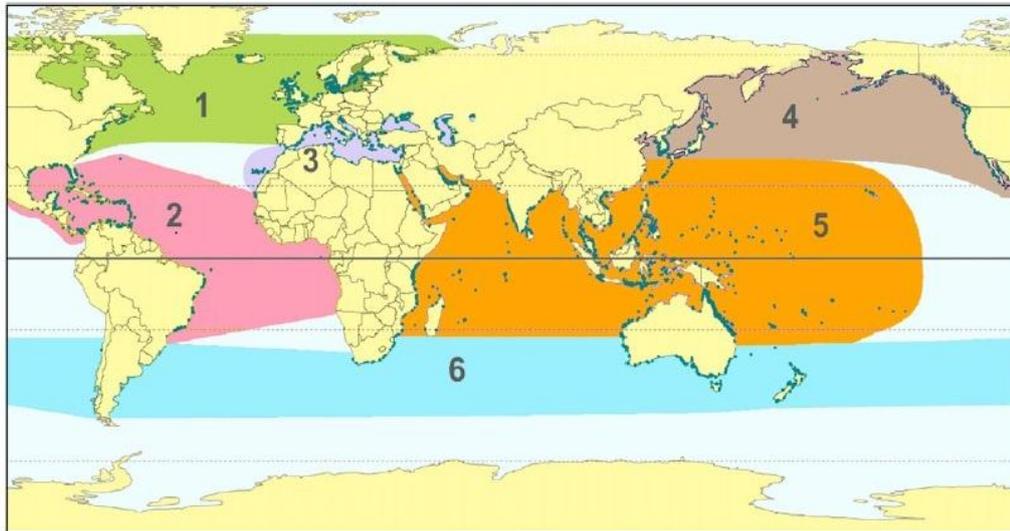
Menurut Waycott *et al.* (2004), terdapat tiga famili pada lamun yaitu famili Cymodoceaceae 'kompleks', Hydrocharitaceae, dan Zosteraceae. Pertama adalah famili Cymodoceaceae 'kompleks', famili Cymodoceaceae hanya terdiri dari lamun yang memiliki hubungan terdekat dengan Ruppiaceae dan Posidoniaceae. Sistem taksonomi yang terakhir memasukkan grup ini pada Potamogetonaceae, bersama dengan Zosteraceae. Namun, analisis molekuler yang terbaru menyatakan bahwa Cymodoceaceae, Ruppiaceae, dan Posidoniaceae menunjukkan sebuah garis evolusi independen yang sekarang disebut sebagai Cymodoceaceae

'kompleks'. Kategori 'kompleks' ini termasuk lima genus, empat genus diantaranya berada di daerah tropis yaitu *Cymodocea*, *Thalassodendron*, *Syringodium*, dan *Halodule*. Satu genus lainnya adalah *Ruppia* yang lebih banyak ditemukan di daerah *temperate* (wilayah dimana terjadi pergantian musim, temperature, dan kelembaban secara periodik serta berada diantara daerah tropis dan kutub). Kedua adalah famili Hydrocharitaceae, merupakan famili pada lamun yang dapat ditemukan secara global pada habitat yang berbeda-beda. Mayoritas hidup pada ekosistem air tawar dengan hanya tiga spesies yang hidup pada ekosistem laut yaitu *Halophila*, *Enhalus*, dan *Thalassia*. Ketiga adalah famili Zosteraceae, merupakan famili pada lamun yang memiliki satu spesies lamun yang paling terkenal yaitu *Zostera marina* (eelgrass). Lamun ini terdapat pada belahan bumi bagian utara, dapat pula tumbuh di Alaska yang dapat tertutup es pada musim tertentu. Terdapat dua genus pada famili ini yaitu *Zostera* dan *Phyllospadix* yang mayoritas tumbuh pada iklim *temperate*.

2.2 Pola Distribusi Lamun

Secara global, distribusi spesies lamun terbagi dalam 6 bioregion yang berbeda berdasarkan faktor lautan pemisahannya. Adapun 6 bioregion tersebut adalah 1. *Temperate North Atlantic*, 2. *Tropical Atlantic*, 3. *Mediterranean*, 4. *Temperate North Pasific*, 5. *Tropical Indo-Pasific*, dan 6. *Temperate Southern Oceans*. Indonesia berada pada bioregion kelima atau *Tropical Indo-Pacific* yaitu pada daerah Afrika Timur, Asia selatan dan Australia Utara hingga ke Samudera Pasifik. Lamun yang terdapat pada bioregion ini, diantaranya adalah *Cymodocea rotundata*, *Cymodocea serrulata*, *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Halodule uninervis*, *Halophila capricorni*, *Halophila ovalis*, *Thalassia hemprichii*, dan *Thalassodendron*

ciliatum (Short *et al.*, 2007). Distribusi lamun secara global dengan data dari *United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre* (UNEP-WCMC) disajikan pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Pola Distribusi Global Lamun (*Seagrass*)

(Short *et al.*, 2007)

Menurut Den Hartog (1970) dan Phillips dan Menez (1988) dalam Azkab (1999), ada sekitar 50 jenis lamun ditemukan di dunia yang tumbuh pada perairan laut dangkal yang berdasar lumpur atau pasir. Dari 50 jenis lamun tersebut, ada 12 jenis telah ditemukan di Indonesia yaitu *Syringodium isoetifolium*, *Halophila ovalis*, *Halophila spinulosa*, *Halophila minor*, *Halophila decipiens*, *Halodule pinifolia*, *Halodule uninervis*, *Thalassodendron ciliatum*, *Cymodocea rotundata*, *Cymodocea serrulata*, *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides*. *Thalassendron ciliatum* mempunyai sebaran yang paling terbatas sedangkan *Halophila spinulosa* ditemukan di daerah Riau, Anyer, Baluran, Irian Jaya, Belitung dan Lombok. Penelitian Kuo (2007), menambahkan bahwa telah ditemukan satu spesies baru pada genus *Halophila* sp. yaitu *Halophila sulawesii* pada Kepulauan Spermonde, Sulawesi Tenggara, Indonesia. Spesies baru ini mungkin terjadi pada suatu

genus yang hidup pada habitat berbeda, contohnya pada *Halophila sulawesii* yang hidup di kedalaman 10 m sampai 30 m.

Menurut Kordi (2011), lamun membentuk ekosistem yang berkesinambungan bersama dengan mangrove dan terumbu karang serta merupakan pusat kekayaan keanekaragaman hayati di daerah Indo-Pasifik Barat. Ada 20 negara di dunia yang ditumbuhi lamun, 15 diantaranya termasuk Indonesia berada pada daerah dengan jumlah kepadatan lamun yang tinggi. Pada kawasan Asia Tenggara (ASEAN), cukup banyak ditemukan lamun dengan jenis yang beragam. Sebaran padang lamun di kawasan ASEAN dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Sebaran Padang Lamun di Kawasan ASEAN

Jenis	Brunei	Indonesia	Malaysia	Filipina	Singapura	Thailand
<i>Cymodocea rotundata</i>	-	X	x	X	x	X
<i>Cymodocea serrulata</i>	-	X	x	X	x	X
<i>Enhalus acoroides</i>	x	X	x	X	x	X
<i>Halodule pinifolia</i>	-	X	-	X	x	X
<i>Halodule uninervis</i>	-	X	-	X	x	X
<i>Halophila beccarii</i>	-	-	x	X	x	X
<i>Halophila decipiens</i>	-	X	-	X	x	X
<i>Halophila minor</i>	-	X	x	X	x	X
<i>H.minor varietas baru</i>	-	-	-	X	-	
<i>Halophila ovalis</i>	x	X	x	X	x	X
<i>Halophila spinulosa</i>	x	X	x	X		
<i>Halophila sp.</i>	-	-	-	X	-	
<i>Ruppia maritime</i>	-	-	-	X	-	
<i>Syringodium isoetifolium</i>	-	X	x	X	-	
<i>Thalassia hemprichii</i>	X	X	x	X	-	X
<i>Thalassodendron ciliatum</i>	-	X	-	X	-	
Total	4	12	9	16	11	10

2.3 Fungsi dan Ancaman terhadap Lamun

Menurut Azkab (1999), peranan atau manfaat lamun di lingkungan perairan laut dangkal adalah sebagai berikut:

a. Sebagai Produsen Primer

Lamun mempunyai tingkat produktivitas primer paling tinggi bila dibandingkan dengan ekosistem lainnya yang ada di laut dangkal seperti ekosistem mangrove dan ekosistem terumbu karang.

b. Sebagai Habitat Biota

Lamun memberikan tempat perlindungan dan tempat menempel berbagai hewan dan tumbuh-tumbuhan (algae). Selain itu, padang lamun (*seagrass beds*) dapat juga sebagai daerah asuhan (*nursery area*) dan tempat mendapatkan makanan dari berbagai jenis ikan.

c. Sebagai Penangkap Sedimen

Daun lamun yang lebat akan memperlambat gerakan aliran air yang disebabkan oleh arus dan gelombang sehingga perairan disekitarnya menjadi tenang. Rimpang dan akar lamun dapat menancap kuat di dasar perairan sehingga akan menahan serta mengikat sedimen maka akan menstabilkan dasar perairan untuk mencegah erosi.

d. Sebagai Pendaur Zat Hara

Peranan lamun sangat penting dalam daur ulang berbagai zat hara di lingkungan perairan laut dangkal khususnya zat-zat hara yang dibutuhkan oleh alga yang hidup menempel (epifit) bagi lamun.

Padang lamun, mangrove, dan terumbu karang bekerja sama untuk menyediakan lingkungan yang stabil dan ideal bagi organisme laut. Namun,

gangguan antropogenik seperti perubahan iklim global dan polusi lokal mengancam padang lamun dan organisme di sekitarnya. Oleh karena itu, ekosistem pesisir yang efektif harus dapat mempertahankan keanekaragaman genetik semua organisme yang ada dalam ekosistem tersebut termasuk di dalamnya adalah spesies lamun (Nakajima *et al.*, 2012).

Kerusakan padang lamun dapat terjadi secara alami karena pengaruh ombak dan gelombang yang sangat kuat sehingga dapat menyebabkan lubang-lubang besar di daerah padang lamun yang dinamakan *blowout*. *Blowout* dijumpai di padang lamun yang menghadap ke lautan Hindia seperti Bali, Lombok, dan Pantai Selatan Jawa. Selain itu ancaman yang lainnya berasal dari penggunaan pupuk dalam kegiatan pertanian yang menyebabkan ledakan pertumbuhan ganggang laut yang mengurangi penetrasi cahaya untuk fotosintesis lamun. Perubahan tata guna lahan untuk pemukiman juga berimbas secara langsung pada penimbunan area padang lamun dan secara tidak langsung pada masuknya limbah rumah tangga ke area padang lamun sehingga turut menyebabkan rusaknya padang lamun. Buangan limbah industri, antara lain logam berat dan sistem pembuangan limbah dengan tanpa perlakuan penurunan kadar bahan yang dibuang sesuai baku mutu lingkungan yang diizinkan juga dapat menurunkan kualitas lingkungan padang lamun (Maryanto, 2013).

2.4 DNA Barcoding

DNA (Deoxiribo Nucleic Acid) adalah jenis asam nukleat yang berfungsi sebagai pembawa materi genetik yang menurunkan suatu sifat dari satu generasi ke generasi berikutnya. Fungsi lain dari DNA yaitu untuk mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel termasuk informasi untuk diferensiasi sel sehingga terbentuk manusia, hewan, tumbuhan, dan

organisme lainnya. Peran DNA sangat penting sehingga DNA juga disebut sebagai molekul utama kehidupan (Toha, 2001).

DNA barcoding dalam istilah Bahasa Indonesia diartikan sebagai “barkode DNA” merupakan metode untuk mengidentifikasi suatu spesies menggunakan urutan sekuens DNA pendek. *DNA barcoding* mendukung studi mengenai keanekaragaman hayati dan analisis forensik. Kriteria sampel yang informatif untuk identifikasi dengan teknik *DNA barcoding* menurut *Consortium Barcoding of Life* (CBOL) yaitu sampel harus sesuai untuk identifikasi suatu taksa (kondisi masih baik dan kandungan DNA tidak rusak) dan menunjukkan variasi yang tinggi antara spesies. Teknik *barcoding* yang ideal menggunakan sepasang primer sehingga menghasilkan sekuensing dua arah (Lucas *et al.*, 2012).

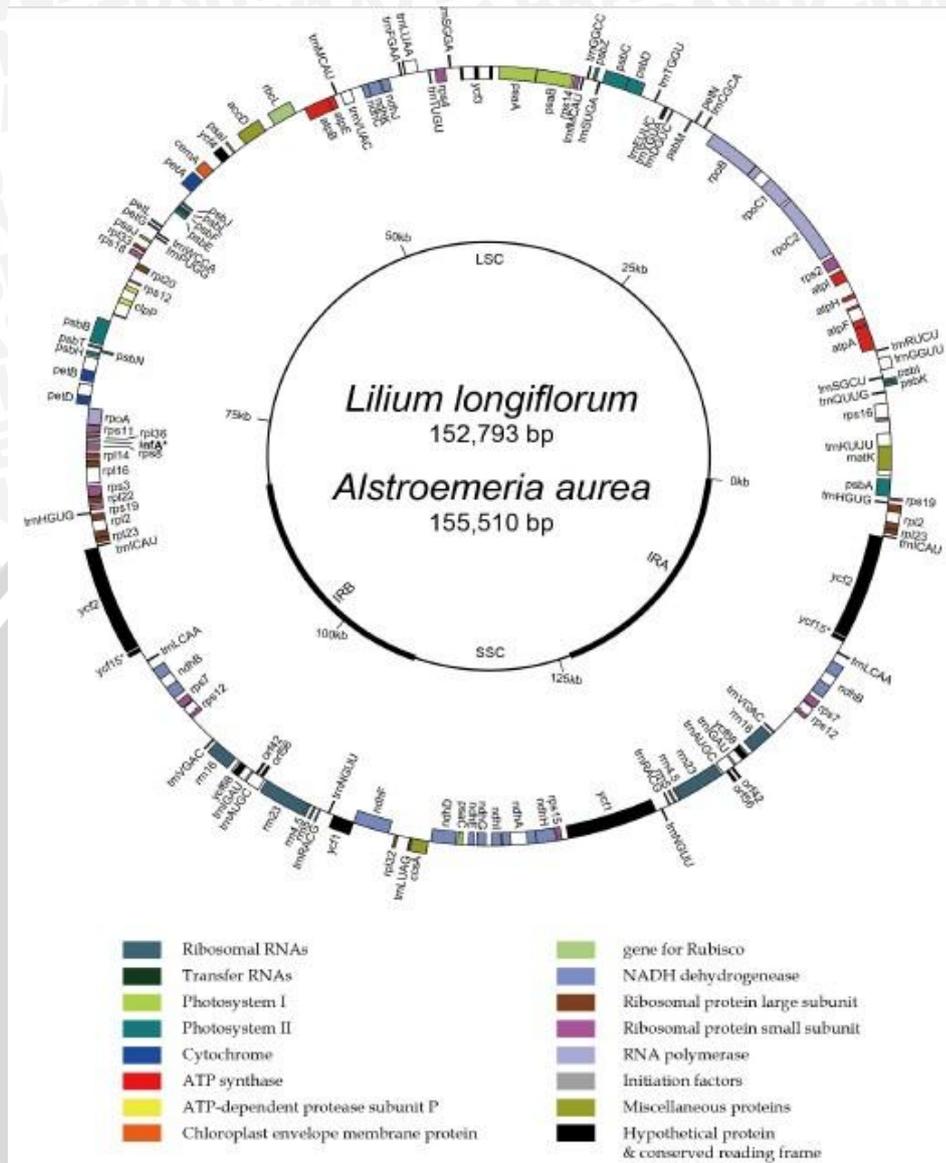
Teknik identifikasi spesies baru menggunakan metode *DNA barcoding* mengawali didirikannya suatu pusat data tentang keragaman spesies yang dapat diakses secara langsung. *DNA barcoding* juga merupakan ilmu baru yang sangat menarik untuk penelitian taksonomi. Teknik ini menggunakan urutan sekuens DNA singkat dalam suatu gen hewan, tumbuhan maupun jamur. Pada teknik *DNA barcoding* ini mencakup tiga kegiatan yaitu : pertama adalah proses sampling mulai dari pengumpulan dan identifikasi sampel, kedua adalah prosedur laboratorium yaitu proses pengolahan spesimen untuk mendapatkan sekuens DNA dari spesimen, ketiga adalah prosedur pengolahan data hingga publikasi sekuens di *GenBank* (CBOL, 2008).

2.5 DNA Kloroplas

DNA kloroplas atau sering disebut sebagai cpDNA memiliki ukuran yang lebih besar daripada DNA mitokondria atau mtDNA yaitu dengan berat sekitar 150 kb. Setiap kloroplas mengandung 20-60 DNA kloroplas. Panjang

DNA kloroplas berkisar antara 40-60 μm dengan berat molekul sekitar 85-140 $\times 10^6$ dalton, tergantung pada masing-masing organisme. DNA kloroplas juga memiliki karakteristik berantai ganda, sirkular, dan tidak menyatu dengan protein. Dalam banyak kasus juga ditemukan kandungan ikatan G-C DNA kloroplas berbeda dari DNA inti dan mitokondria. Ikatan G-C DNA kloroplas sebesar 36%, sementara ikatan G-C DNA inti dan DNA mitokondria masing-masing 64% dan 71% (Toha, 2001). DNA kloroplas dipilih untuk identifikasi tumbuhan karena kloroplas merupakan organel sel yang spesifik di tumbuhan. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya oleh Toha (2001), bahwa DNA kloroplas berukuran lebih besar dan lebih panjang 8 sampai 9 kali daripada DNA mitokondria.

Penanda molekuler atau marker molekuler memiliki pendekatan yang spesifik bagi sistem klasifikasi organisme. Untuk lamun sendiri, marker molekuler telah digunakan mulai awal tahun 1980-an. Gen yang dapat menjadi kode genetik dari lamun yaitu *Ribulose-1,5-Biphosphate-Carboxylase-Oxygenase (rbcL)* dan *maturaseK (matK)* yang merupakan gen dari kloroplas. Kedua gen ini sudah digunakan dalam banyak penelitian dengan fokus penelitian filogeni dan evolusi molekuler tanaman (Vy *et al.*, 2013). Posisi lokus gen *matK* dan *rbcL* pada kloroplas tumbuhan ditunjukkan di genome kloroplas pada Gambar 2 berikut ini.



Gambar 2. Struktur DNA Kloroplas pada Tumbuhan

(Kim dan Kim, 2013)

2.6 Ekstraksi DNA

Ekstraksi adalah tahap awal dalam isolasi DNA yang bertujuan untuk mendapatkan DNA tanpa debris sel. Prinsip kerja dalam isolasi DNA mencakup berbagai tahapan reaksi dengan tujuan yang berbeda pada setiap tahapnya. Tahap pertama adalah penghancuran dinding sel yang dapat dilakukan secara mekanis dan enzimatis. Tahap kedua adalah pemecahan

sel yang dapat dilakukan dengan berbagai cara tergantung dari jenis selnya. Tahap ketiga adalah membersihkan debris sel dengan cara sentrifugasi. Pemisahan DNA dapat dilakukan dengan mengambil supernatan cairan hasil dari proses sentrifugasi (Toha, 2001).

Saat proses ekstraksi DNA akan ditambahkan buffer ekstraksi atau buffer lisis untuk mencegah rusaknya DNA. Proses pemisahan DNA dari komponen sel lain termasuk debris sel dilakukan dengan sentrifugasi. Kontaminan yang umum ditemukan pada produk ekstraksi DNA adalah polisakarida yang dapat mengganggu proses lanjutan seperti PCR dimana terjadi hambatan kerja enzim taq polimerase. Untuk menghindari terjadinya hal ini maka jaringan yang digunakan dijaga tetap dingin sebelum dan selama proses ekstraksi (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA penting dilakukan setelah proses ekstraksi selesai. Menurut Sambrook dan Russel (1989) dalam Syafaruddin *et al.* (2011), pengukuran ini dapat menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis gel. Pengukuran dengan spektrofotometer dilakukan dengan panjang gelombang 260 nm sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280 nm, kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan A_{260} nm dengan A_{280} nm. Batas kemurnian yang biasa dipakai dalam analisis molekuler pada rasio A_{260}/A_{280} adalah 1,8 – 2,0.

2.7 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dengan teknik *PCR (Polymerase Chain Reaction)* bertujuan untuk memperbanyak DNA pada sampel beberapa kali lipat agar sekuens DNA tersebut dapat dianalisis. Teknologi ini juga memiliki fungsi lain diantaranya untuk analisis DNA pada pelaku kejahatan. Unsur utama

keberhasilan PCR adalah suatu bentuk atau jenis polimerase yang mempunyai toleransi terhadap suhu tinggi pada pengulangan siklus PCR di *PCR gene cycler* (Walker, 2013).

Teknik PCR terdiri atas tiga tahap dalam satu siklus, yaitu denaturasi, annealing, dan polimerasi. Tahap denaturasi bertujuan untuk memisahkan rantai ganda menjadi dua rantai tunggal untuk tempat penempelan primer. Tahap annealing terjadi penempelan primer dan pembentukan ikatan H baru antara untai tunggal DNA dengan primer. Tahap polimerasi yang sering disebut tahap ekstensi terjadi pemanjangan rantai tunggal primer dari ujung 3' ke 5' dengan enzim taq polimerase. Proses PCR berlangsung dalam beberapa siklus sekitar 30-35 siklus tergantung dari enzim taq polimerase dan jumlah sampel (Toha, 2001).

Menurut Fatchiyah *et al.* (2011), komponen yang diperlukan untuk PCR adalah cetakan DNA, primer, enzim taq polimerase, buffer PCR, ion Mg²⁺, dNTPs dan *PCR gene cycler* yang dapat dijelaskan sebagai berikut :

a. Cetakan DNA

Kemurnian DNA target sangat penting karena jika DNA tidak murni akan dapat mempengaruhi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim taq polimerase.

b. Primer

Primer tersusun dari urutan nukleotida sepanjang 15-32 bp pada ujung 5' DNA cetakan maupun komplemennya.

c. Enzim Taq Polimerase

Enzim ini bersifat termostabil dan diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim ini harus selalu disimpan pada suhu -20°C, untuk menghindari kerusakan enzim akibat perubahan suhu.

d. Buffer PCR

Buffer standar untuk PCR tersusun dari 50 mM KCl, 10 mM TrisCl (pH 8,3), dan 1,5 mM MgCl₂. Buffer PCR ini terkadang dijual dengan atau tanpa MgCl₂.

e. Ion Mg²⁺

Konsentrasi ion Mg²⁺ yang terbentuk dari ionisasi MgCl₂ merupakan faktor yang sangat penting karena dapat mempengaruhi proses annealing primer.

f. dNTPs

Konsentrasi yang biasanya digunakan untuk setiap dNTPs adalah 200 µM.

e. *PCR Gene Cyclor*

PCR gene cyclor atau yang biasa disebut mesin PCR merupakan alat yang dapat secara tepat mengatur suhu dan waktu yang dibutuhkan untuk proses amplifikasi DNA.

2.8 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan sebuah metode untuk memisahkan molekul berdasarkan berdasarkan ukuran dan muatan yang dimiliki. Senyawa yang diinginkan, bermigrasi melalui suatu medium yang berupa gel agarosa atau gel poliakrilamida dengan menggunakan muatan listrik untuk melewati gel tersebut (Walker, 2013).

Ada dua macam gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis yaitu gel poliakrilamida dan gel agarosa. DNA yang berukuran besar (sekitar 0,1 – 20 kb) dapat dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa, sedangkan DNA berukuran kecil (sekitar 6 – 2000 bp) dapat terpisah dengan elektroforesis gel poliakrilamida. Penggunaan EtBr (Etidium bromida) yang berfungsi untuk

memberi warna pada fragmen DNA agar berpendar saat diberi cahaya ultraviolet dapat menurunkan sekitar 15% kecepatan pergerakan fragmen DNA. Proses elektroforesis yang menggunakan buffer dengan kekuatan ion yang rendah akan menyebabkan pergerakan DNA relatif lambat. Namun jika kekuatan ion terlalu tinggi maka akan terbentuk panas sehingga gel dapat meleleh dan DNA akan terdenaturasi dan rusak (Toha, 2001).

Prinsip kerja elektroforesis yaitu adanya aliran molekul DNA dari kutub negatif (-) menuju ke kutub positif (+) sesuai dengan Fatchiyah *et al.* (2011), bahwa kecepatan molekul yang bergerak pada suatu medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran. Molekul yang bergerak ini memerlukan medium sebagai matriks penyangga, yang biasa digunakan adalah gel agarose. Gel diletakkan diantara dua *buffer chamber* sebagai sarana untuk menghubungkan kutub negatif dan positif. Besarnya molekul yang bermuatan listrik tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul tersebut terlarut. Pada pH rendah akan bermuatan positif yang bergerak ke kutub negatif. Pada pH tinggi akan bermuatan negatif yang bergerak ke kutub positif. Oleh karena itu, pH buffer elektroforesis yang berkisar antara 8-9 akan menyebabkan molekul bermuatan negatif yang akan bergerak ke kutub positif.

2.9 Pohon Filogeni

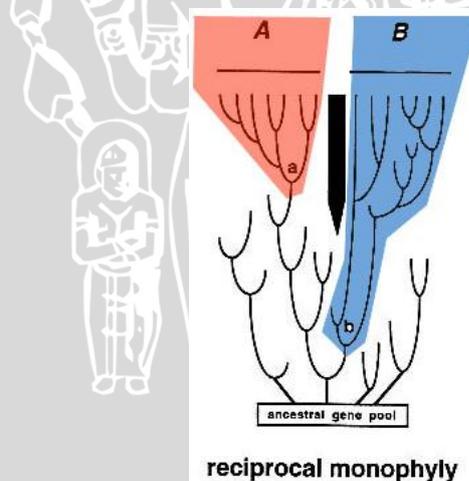
Filogenetika adalah salah satu bidang ilmu pengetahuan yang berkaitan dengan ilmu biologi serta menyediakan fasilitas dalam bidang epidemiologi manusia, ekologi, dan evolusi biologi. Evolusi adalah suatu proses bertingkat yang terjadi terus-menerus, memungkinkan suatu organisme sederhana menjadi lebih kompleks melalui keseluruhan perubahan dari beberapa generasi. Pohon evolusi (pohon filogeni) adalah

sebuah grafik dua dimensi yang menunjukkan hubungan diantara organisme yang diidentifikasi berdasarkan urutan sekuens DNA. Pohon terdiri dari cabang-cabang luar (*outer branches*) atau daun-daun (*leaves*) yang merepresentasikan *taxa* (organisme, sampel, atau spesimen) dan titik-titik (*nodes*) serta panjang cabang yang merepresentasikan hubungan antara *taxa* (Dharmayanti, 2011).

Menurut Avise (2000), terdapat tiga jenis topologi pohon *phylogram* yaitu pohon yang memiliki pola dan panjang percabangan sebagai berikut :

a. Monophyly

Kelompok yang terdiri dari semua keturunan dari nenek moyang (*ancestor*) yang sama dan juga nenek moyang itu sendiri. Topologi pohon Monophyly akan ditampilkan pada Gambar 3 berikut ini.

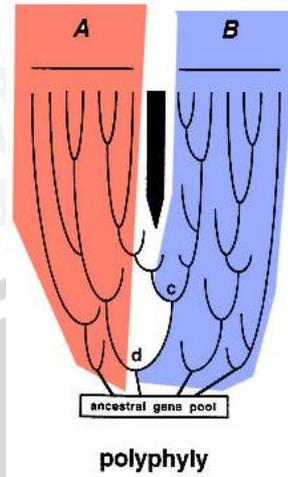


Gambar 3. Monophyly

(Avise, 2000)

b. Polyphyly

Kelompok yang terdiri dari garis keturunan yang tidak berasal dari nenek moyang yang sama. Topologi pohon Polyphyly akan ditampilkan pada Gambar 4 berikut ini.

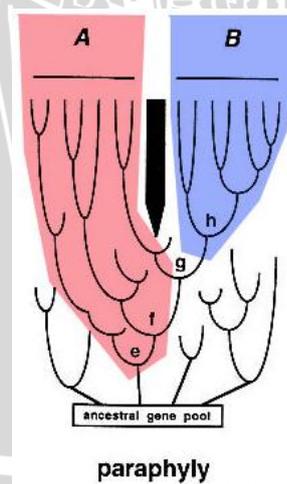


Gambar 4. Polyphyly

(Avice, 2000)

c. Paraphyly

Kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang tidak mencakup semua keturunan nenek moyang tersebut. Dapat dilihat pada Gambar 5, walaupun garis keturunan B *monophyletic* dengan h. Namun B *paraphyletic* karena tidak semua g termasuk pada B, hal yang sama juga terjadi pada garis keturunan A.



Gambar 5. Paraphyly

(Avice, 2000)

2.10 Metode Analisis Kekerabatan Genetik

Menurut Lemey *et al.* (2009), penjelasan mengenai setiap metode rekonstruksi pohon filogenetik atau metode analisis jarak genetik akan dijelaskan sebagai berikut :

a. Analisis jarak genetik dengan metode *Neighbor Joining* (NJ)

Neighbor Joining (NJ) pertama kali dikembangkan oleh Saitou dan Nei (1987) dan dimodifikasi oleh Studier dan Keppler (1988), NJ pada dasarnya memiliki kemiripan dengan metode *clustering* tetapi tanpa asumsi *clock-like behavior*. Jika menurut metode *clustering* sekuens A dan C terlihat lebih mirip dengan asumsi *clock-like behavior*, maka menurut NJ yang tanpa asumsi *clock-like behavior*, sekuens A memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan sekuens B. Asumsi *clock-like behavior* adalah konsep dari *molecular clock* yaitu suatu pendekatan yang menyatakan bahwa gen berkembang secara konstan dan membutuhkan waktu berkembang atau berevolusi yang berbeda antar jenis gen berbeda. Melalui *molecular clock* dapat diperkirakan sejarah evolusi organisme, selain itu *molecular clock* juga mampu menjelaskan tentang proses substitusi gen dari suatu organisme yang menjadi pusat pemahaman tentang proses evolusi organisme dalam rentang waktu yang cukup lama.

b. Analisis jarak genetik dengan metode Maximum Parsimony (MP)

Maximum Parsimony (MP) telah menjadi metode rekonstruksi pohon filogeni mulai dari awal tahun 1970-an hingga sekarang meskipun terdapat beberapa keterbatasan. Ide dasar dari metode parsimony sangat sederhana yaitu memilih pohon dengan jumlah perubahan evolusioner yang paling sedikit. Salah

satu konsep dari parsimony juga dapat digunakan untuk menghitung haplotipe jika terdapat banyak spesies yaitu parsimony informatif. Konsep parsimony informatif memiliki dua syarat yaitu minimal terdiri dari dua kelompok basa nitrogen dari satu *site* yang sama dan masing-masing kelompok dari basa nitrogen tersebut minimal terdiri dari dua individu.

c. Analisis jarak genetik dengan metode *Maximum Likelihood* (ML)

Maximum Likelihood (ML) akan membuat rekonstruksi pohon dengan banyak hipotesis (dugaan). Mulai dari menghitung kemungkinan topologi pohon yang berbeda, panjang percabangan yang berbeda, serta parameter dari model evolusi gen. Elemen-elemen ini digunakan untuk menghitung segala kemungkinan pohon yang dapat dibentuk. Parameter model evolusi gen ada dua macam yaitu frekuensi nukleotida (Π) dan tingkat substitusi (*rate of substitution*). Frekuensi nukleotida (Π) adalah persentase dari basa nitrogen A, T, G, dan C pada suatu sekuens, sedangkan tingkat substitusi (*rate of substitution*) adalah tingkat perubahan dari $A \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow C$ atau $G \leftrightarrow A$, $G \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, dan sebagainya.

d. Analisis jarak genetik dengan metode Bayesian Inference (BI)

Estimasi perhitungan metode Bayesian Inference adalah dengan besaran yang disebut *posterior probability*. Maksud dari *posterior probability* adalah pemilihan pohon dengan probabilitas yang paling tinggi. Tipe pohon yang memiliki probabilitas yang paling tinggi adalah pohon yang *high likelihood* dan *high prior probability*. *Prior probability* adalah data awal tentang suatu sekuens, seperti pada prinsip perhitungan *Maximum Likelihood* yaitu topologi pohon yang berbeda, panjang percabangan yang

berbeda, serta parameter dari model evolusi gen yaitu frekuensi nukleotida (Γ) dan tingkat substitusi (*rate of substitution*). Hal ini yang mendasari perbedaan BI dengan NJ, MP, dan ML. Jika NJ, MP, dan ML mencoba merekonstruksi pohon filogenetik terbaik sedangkan BI merekonstruksi pohon dengan probabilitas terbesar. Rekonstruksi pohon Bayesian Inference menggunakan *software* mrBayes dengan metode *Markov Chain Monte Carlo (MCMC)*.

MEGA 5.2 merupakan perangkat lunak yang dikembangkan dengan tujuan untuk menyediakan pusat informasi biologi, analisis statistik dari DNA, dan data-data sekuens DNA serta protein dari sudut pandang evolusi. MEGA 5.2 terus berkembang hingga dapat juga digunakan untuk visualisasi dan rekonstruksi pohon filogenetik serta menguji berbagai hipotesis evolusi (Tamura *et al.*, 2011).

Tujuan dari perangkat lunak MEGA adalah untuk menyediakan alat untuk mengeksplorasi, menemukan, dan menganalisis urutan DNA dari suatu sampel. Fitur-fitur MEGA memiliki presisi dalam analisis evolusi yang akurat, kemampuan edit data sekuens, dan pembuatan pohon filogeni. MEGA memungkinkan penggunaannya untuk browsing, mengedit, meringkas sekuens untuk keperluan publikasi. Perangkat lunak ini dirancang khusus untuk mempersingkat waktu dalam menyelesaikan analisis data dan pemilihan metode statistik analisis genetik molekuler (Hariyadi, 2011).

Perangkat lunak MEGA menggunakan analisis komparatif dengan pohon filogeni. Ada beberapa metode rekonstruksi atau pembuatan pohon filogeni yaitu *Neighbor Joining (NJ)*, *Maximum Likelihood (ML)*, *Maximum Parsimony (MP)*, dan *Bayesian Inference (BI)*. *Site* yang informatif untuk analisis atau *variable site* pada dataset sekuens juga dihitung dengan MEGA 5.2. Untuk analisis filogenetik, pemilihan model evolusi yang terbaik

ditentukan dengan jModel test. Identifikasi pemilihan model yang terbaik ini berdasarkan pada panjang sekuens, ukuran sampel, dan tujuan analisis (Lucas *et al.*, 2012). Konsistensi pohon filogeni NJ dan MP diuji dengan metode bootstrap sebanyak 1.000 kali. Nilai bootstrap lebih besar dari 85% menunjukkan bahwa peluang terjadinya perubahan susunan rendah. Topologi dengan panjang cabang rata-rata untuk semua ruas yang dihasilkan dengan metode *majority rule consensus tree* (Lestari, 2014)

2.11 Bootstrap

Kelemahan dari semua metode rekonstruksi pohon filogenetik yaitu mereka hanya menghasilkan dugaan mengenai hubungan kekerabatan genetik. Program pada komputer akan berjalan (terkadang membutuhkan waktu sehari-hari) dan hasilnya adalah sebuah pohon. Kemampuan dari data-data sekuens dalam mendukung pola hubungan kekerabatan genetik yang ditampilkan dalam pohon dapat diketahui dengan teknik bootstrap, dengan cara melakukan sampling acak yang berulang pada data sekuens asli. Pengacakan berulang ini juga membuat beberapa perubahan yang akan menghasilkan *pseudo-replicate* dataset sekuens. Bootstrap mengukur kekuatan percabangan suatu grup dalam pohon filogeni berdasarkan dukungan dari data (Holder dan Lewis, 2003).

Analisis bootstrap adalah teknik sampling yang banyak digunakan untuk estimasi nilai error dari statistik. Felsenstein (1985) dalam Lemey *et al.* (2009), pertama kali menggunakan teknik ini untuk estimasi selang kepercayaan dari kekerabatan genetik yang disimpulkan dari data sekuens. Bootstrap dilakukan pada data sekuens yang telah selesai dilakukan *alignment*. Bootstrap akan memilih kolom secara acak dari data sekuens tersebut, dimana setiap kolom pada data sekuens dapat dipilih lebih dari

sekali. Selanjutnya, setiap dataset akan dibuat sebuah pohon dan proporsi dari setiap *clade* dapat berbeda. Pendekatan yang dapat digunakan untuk menunjukkan nilai bootstrap pada pohon filogeni adalah *majority rule consensus tree* yaitu dengan memilih satu topologi pohon yang paling sering muncul dari keseluruhan bootstrap yang dilakukan. Jika pohon hasil bootstrap disimpulkan dari pemilihan model evolusioner yang kurang tepat, perbedaan awal yang terlihat adalah dari perbedaan panjang percabangan dari setiap pohon yang terbentuk atau biasa disebut *long branch attraction*. Analisis bootstrap merupakan teknik yang efektif dan mudah untuk menguji stabilitas dari grup pada pohon filogeni. Keuntungan utama dari teknik bootstrap adalah teknik ini dapat diaplikasikan pada semua metode rekonstruksi pohon filogeni. Jumlah replikasi bootstrap yang direkomendasikan antara 200 hingga 2000 kali pengulangan (Lemey *et al.*, 2009).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Waktu dan tempat pelaksanaan penelitian Skripsi terdapat dua tahap, yaitu tahap pengambilan sampel dan tahap pengujian sampel. Tahap pengambilan sampel lamun dari perairan Wosi dan Rendani, Manokwari, Papua Barat oleh Ibu Selvani dari Universitas Negeri Papua yang berjumlah enam buah pada bulan Januari 2014 serta sampel lamun dari Pantai Timur Manyafun, Papua Barat oleh Stevanus Liem dari Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada yang berjumlah 12 sampel pada tanggal 17-19 Juli 2014. Tahap pengujian sampel dilaksanakan pada 26 Januari 2015 – 13 Februari 2015 di Laboratorium *Indonesian Biodiversity Research Center* (IBRC) Denpasar, Bali. Peta lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 6 berikut ini.



Gambar 6. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Papua Barat

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pinset, *heating block*, dan vortex. Secara detil peralatan yang digunakan disajikan dalam Lampiran 1.

3.2.2 Bahan-Bahan yang Dibutuhkan

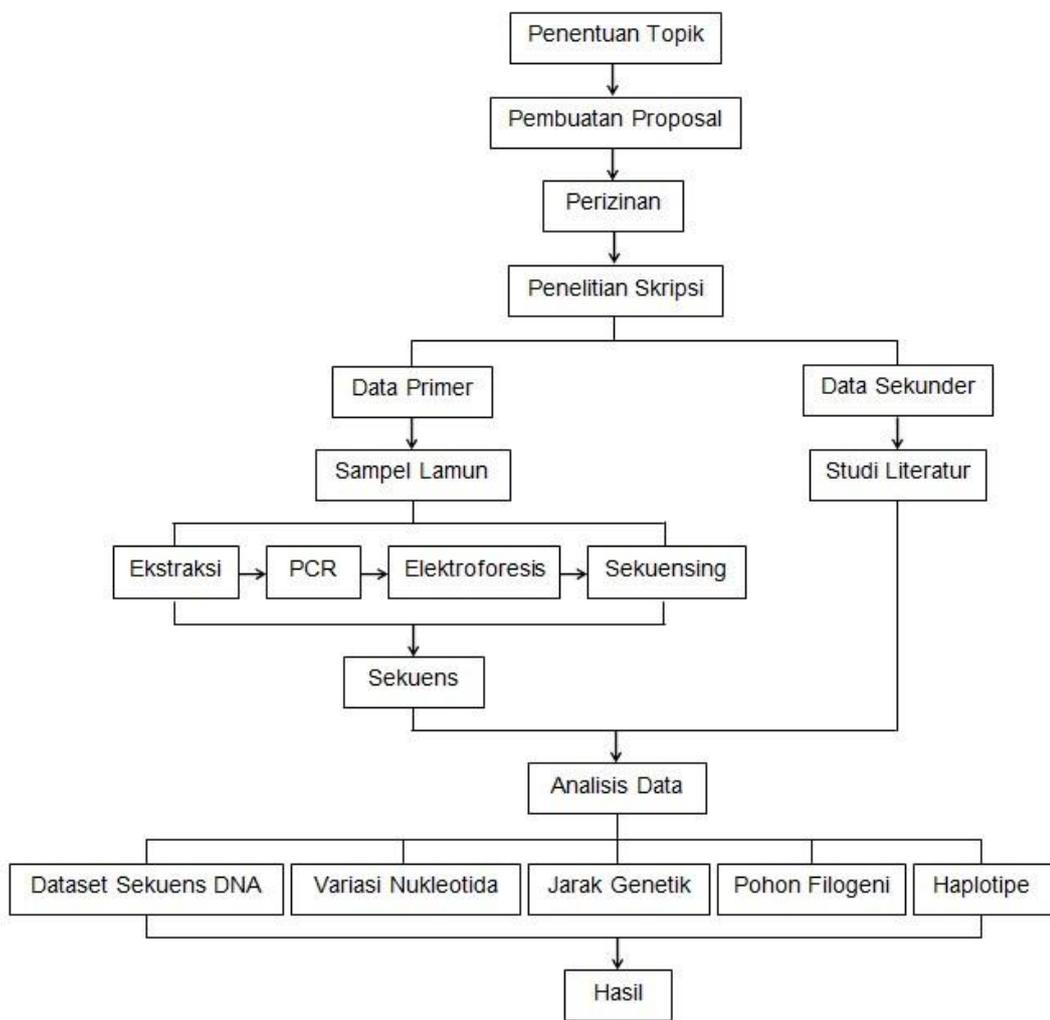
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Qiagen DNA Extraction Kit*, *RNAase* dan *silica gel*. Secara detil bahan yang dipergunakan disajikan pada Lampiran 2.

3.3 Alur Penelitian

Alur penelitian ini dengan melakukan observasi terhadap jenis lamun yang ada di perairan Papua Barat sehingga diperoleh 18 sampel. Pengawetan sampel dilakukan secara mandiri menggunakan *silica gel* selanjutnya dilakukan pengujian sampel di *Indonesian Biodiversity Research Center* Denpasar, Bali. Jika sekuens DNA telah didapatkan, maka dilakukan studi literatur dengan referensi yang relevan.

Materi yang digunakan pada penelitian skripsi ini adalah 18 sampel lamun yang terdiri dari 12 sampel lamun dari Pantai Timur Manyafun, Papua Barat dan 6 sampel lamun dari Wosi dan Rendani, Manokwari, Papua Barat. Adapun rincian sampel lamun yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 3 yaitu daftar sampel lamun. Sampel lamun ini kemudian dianalisis dengan teknik *DNA barcoding*, untuk mendapatkan sekuens DNA lamun melalui tahapan ekstraksi, PCR, elektroforesis, *alignment* sekuens atau pensejajaran sekuens, dan identifikasi data sekuens menggunakan *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*, serta rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan

metode *Neighbor Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML). Analisis jarak genetik (*pairwise distance*) juga dilakukan menggunakan metode *Kimura 2-Parameter* (K80) serta dilakukan analisis haplotipe pada setiap kelompok spesies yang terdapat pada sampel penelitian. Semua data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel kemudian dilakukan analisis deskriptif. Alur penelitian ini lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 7 berikut ini :



Gambar 7. Alur Penelitian Skripsi

3.4 Skema Kerja

3.4.1 Pengambilan dan Pengawetan Sampel

- Membentangkan rol meter pertama secara tegak lurus dengan garis pantai sepanjang 50 m atau 100 m
- Mengambil sampel lamun setiap 5 m atau 10 m dari panjang rol meter yang dibentangkan
- Mengukur jarak sepanjang 50 m ke kanan (atau sejauh ditemukan lamun lagi) dan 50 m ke kiri (atau sejauh ditemukan lamun lagi) dari rol meter pertama
- Membentangkan rol meter kedua secara tegak lurus dengan garis pantai sepanjang 50 m atau 100 m di sebelah kanan rol meter pertama
- Mengambil sampel lamun setiap 5 m atau 10 m dari panjang rol meter yang dibentangkan
- Membentangkan rol meter ketiga secara tegak lurus dengan garis pantai sepanjang 50 m atau 100 m di sebelah kiri rol meter pertama
- Mengambil sampel lamun setiap 5 m atau 10 m dari panjang rol meter yang dibentangkan
- Mencuci lamun yang didapatkan dengan air tawar hingga epifit hilang
- Mengeringkan permukaan daun lamun dengan tissue
- Memasukkan lamun bersama dengan *silica gel* ke dalam plastik klip



3.4.2 Ekstraksi Sampel

- Memanaskan *heating block* hingga mencapai suhu 65°C
- Memotong daun sampel lamun sepanjang 1,5 cm
- Menghaluskan daun lamun menggunakan pinset di dalam tube 1,5ml
- Menambahkan 400 µl Buffer AP1 dan 4 µl RNase
- Mencampur larutan dengan vortex dan inkubasi selama 2 jam (120 menit) pada suhu 65°C
- Membolak-balikkan *tube* sebanyak 2-3 kali selama inkubasi
- Menambahkan 130 µl Buffer P3, campur, dan inkubasi selama 5 menit di kulkas
- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
- Memindahkan cairan bening yang terbentuk ke *QIAshredder spin column*
- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
- Memindahkan *flow through* (cairan bening) ke *tube* 1,5 ml baru
- Menambahkan 1,5 kali Buffer AW1 dari volume *flow through* yang dipindahkan
- Memindahkan 650 µl campuran tersebut ke *DNeasy mini spin column*
- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm dan membuang cairan *flow through* yang terbentuk
- Memindahkan lagi sisa campuran ke *DNeasy mini spin column* hingga habis

- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm dan membuang cairan *flow through* yang terbentuk
- Memindahkan *spin column* pada 2 ml *collection tube* baru dan menambahkan 500 µl Buffer AW2
- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm dan membuang cairan *flow through* yang terbentuk
- Menambahkan lagi 500 µl Buffer AW2 dan memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
- Memindahkan *spin column* pada *tube* 1,5 ml dan menambahkan 100 µl ddH₂O
- Menyimpan sampel selama 5 menit pada suhu ruang (15-25°C)
- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm
- Menandai sebagai hasil ekstraksi "A"
- Memindahkan lagi *spin column* pada *tube* 1,5 ml baru dan menambahkan 100 µl ddH₂O
- Menyimpan sampel selama 5 menit pada suhu ruang (15-25°C)
- Memutar *tube* dengan *centrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm
- Tandai sebagai hasil ekstraksi "B"

3.4.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

- Menyalakan mesin PCR dan mengatur suhunya untuk tiap tahapan siklus
- Menyiapkan *tube* 0,6 ml untuk wadah larutan *master mix*
- Memasukkan komposisi larutan *master mix* ke *tube* 0,6 ml dengan volume yang telah dihitung sebelumnya yang disesuaikan dengan jumlah sampel
- Komposisi larutan *master mix* untuk 1 sampel adalah ddH₂O 10 µl, sepasang primer masing-masing 1,25 µl, dan KAPA *ready mix* 12,5 µl sehingga total satu komposisi *master mix* sebanyak 25 µl
- Mencampur larutan *master mix* dengan *pipetting*
- Menyiapkan *tube* PCR pada *tray* dan memasukkan *master mix* sebanyak 25 µl pada satu *tube* pada strip PCR
- Memasukkan sampel hasil ekstraksi sebanyak 2 µl pada masing-masing *tube* PCR yang telah berisi *master mix*
- Menutup *tube* PCR secara hati-hati
- Memutar *tube* PCR dengan *centrifuge*
- Memasukkan *tube* PCR dalam mesin PCR
- Menekan tombol *start* dan mesin PCR mulai bekerja

3.4.4 Elektroforesis

- Menimbang bubuk gel agarose sebanyak 0,75 gr
- Memasukkan bubuk agarose dalam beaker glass dan menambahkan 75 ml SB Buffer
- Memasukkan beaker glass ke dalam microwave selama 2 menit dengan suhu 300°C
- Menambahkan EtBr sebanyak 4 µl dan homogenkan dengan menggoyangkan beaker glass
- Menuangkan pada cetakan gel dan tunggu hingga menjadi gel
- Mengangkat sisir cetakan perlahan-lahan dan memindahkan cetakan ke dalam mesin elektroforesis
- Memasukkan *low DNA mass ladder* pada lubang pertama gel agarose yang telah berada dalam mesin elektroforesis
- Mengambil 4 µl sampel dan memasukkannya ke dalam sumur gel
- Memasukkan *low DNA mass ladder* pada lubang terakhir gel agarose yang telah berada dalam mesin elektroforesis
- Menutup mesin elektroforesis perlahan-lahan dan mengatur *power supply* yang terhubung dengan mesin elektroforesis untuk *running* gel elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 volt
- Mematikan mesin elektroforesis dan membuka penutup mesin elektroforesis
- Memindahkan gel agarose ke mesin UV (ultraviolet)
- Mengamati dan mengambil gambar gel menggunakan kamera digital dengan perbesaran yang proporsional



3.4.5 Proses Analisis Sekuens DNA

3.4.5.1 Persiapan Dataset Sekuens DNA

- Memasukkan kedua sekuens DNA hasil dari primer *forward* dan *reverse* pada *software* MEGA 5.2
- Menghapus huruf “N” di bagian awal sekuens dan bagian akhir sekuens
- Mengganti huruf “N” di tengah sekuens
- Mensejajarkan sekuens DNA hasil dari primer *forward* dan *reverse*
- Menggabungkan sekuens DNA hasil dari primer *forward* dan *reverse* yang masing-masing telah diedit
- Memulai proses BLAST pada laman website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Melakukan penamaan ulang (*rename*) pada setiap sekuens sesuai dengan hasil BLAST
- Menyiapkan dua dataset sekuens yaitu dataset sekuens matK dan dataset sekuens rbcL
- Menyimpan dataset sekuens dengan tipe *MAS file*, *MEG file*, dan *FASTA file*

3.4.5.2 Analisis Variasi Nukleotida

- Membuka dataset sekuens dengan tipe *MAS file* untuk dapat mengamati panjang sekuens, jumlah sekues, dan jumlah spesies pada data sekuens
- Untuk jumlah *variable site* dapat diketahui dengan membuka *software* DNAsp 5 lalu pilih *FASTA file* dari sekuens
- Pilih menu *Analysis* lalu pilih *Polymorphic Site*, amati jumlah *variable (polymorphic) site* yang dimiliki oleh keseluruhan sekuens

- Untuk *conserved site* dapat diketahui dengan membuka *software* MEGA 5.2 dan membuka dataset sekuens dengan tipe *MEG file*
- Pada data yang terbuka pilih ikon “C” dan amati angka yang menyatakan jumlah *conserved sites* di bagian bawah layar
- Untuk komposisi nukleotida masih dengan dataset yang sama dengan sebelumnya, pilih menu *Statistics*
- Pilih menu *Nucleotide Composition* lalu pilih data komposisi nukleotida rata-rata (*average*)

3.4.5.3 Menghitung Jarak Genetik

- Membuka dataset sekuens bentuk *MEG file* pada *software* MEGA 5.2
- Untuk *pairwise distance*, pilih menu *Distance* lalu pilih *Compute Pairwise Distance*
- Pada pilihan *Variance Estimation Method* pilih *Bootstrap Method* dengan replikasi 1000 dan pada pilihan *Model/Method* pilih *Kimura 2-Parameter Model (K80)* lalu *Compute*

3.4.5.4 Pembuatan Pohon Filogeni

- Membuka dataset sekuens dengan tipe *MEG file* untuk memulai proses analisis
- Memilih model evolusi untuk membuat rekonstruksi pohon yang terbaik dengan pilih menu *Models*, pilih *Find Best DNA/Protein Models*, lalu pilih *Compute*
- Amati jenis model evolusi dengan nilai *BIC (Bayesian Information Criterion)* yang terkecil dan berada pada urutan teratas
- Membuat pohon filogeni dengan pilih menu *Phylogeny* lalu pilih *Construct/Test Neighbor Joining Tree* untuk *Neighbor Joining (NJ)*

dan *Construct/Test Maximum Likelihood Tree* untuk *Maximum Likelihood* (ML) dengan *software* MEGA 5.2

- Pilih *Bootstrap method* pada kotak pilihan *Test of Phylogeny* dan mengisi *1000* pada kotak pilihan *No. of Bootstrap Replications*
- Untuk *Maximum Likelihood*, ganti pilihan *Model/Method* dengan model evolusi terbaik yang telah diketahui sebelumnya
- Pilih *Compute* dan tunggu hingga muncul *Consensus Tree* dari model tersebut.

3.4.5.5. Menghitung Haplotipe

- Siapkan dataset sekuens bentuk *MEG file* per spesies
- Membuka dataset sekuens bentuk *MEG file* pada *software* MEGA 5.2
- Pilih menu *Highlight* lalu pilih *Variable Sites*
- Pilih ikon *XL* karena akan ditampilkan oleh program Microsoft Excel
- Mengatur *Writing site number* pada *For each site*, mengatur *Missing data and alignment gaps* pada *Exclude site with missing/ambiguous data and gaps*, mengatur *Selected sites to include* pada *Only highlighted sites*, lalu pilih OK

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

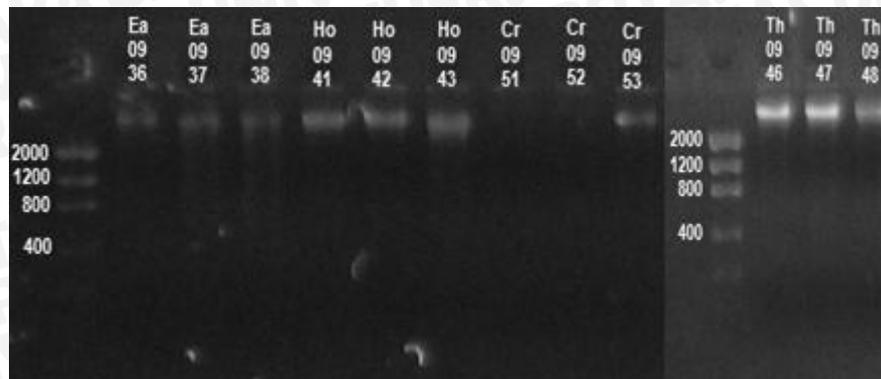
4.1 Analisis Hasil Ekstraksi DNA

Ekstraksi bertujuan untuk memecah sel kloroplas dan mengambil DNA yang ada di dalam sel kloroplas daun lamun. Sampel lamun diawetkan menggunakan *silica gel* agar sampel lamun benar-benar kering sehingga mudah digerus dan tidak busuk (Doyle and Doyle, 1987 dalam Ito *et al.*, 2011), untuk selanjutnya dilakukan isolasi DNA (ekstraksi DNA) yang dibutuhkan untuk penelitian.

Prosedur ekstraksi yang diterapkan untuk ekstraksi lamun pada penelitian skripsi ini menggunakan metode Qiagen Kit. Qiagen Kit dipilih karena mampu menghasilkan ekstrak dengan kuantitas DNA yang tinggi dan murni serta bersih dari debris sel. Proses ekstraksi harus dilakukan dengan hati-hati karena langkah-langkah kerja yang cukup banyak akan memungkinkan terjadinya *human error* dari peneliti. Sampel hasil ekstraksi (template DNA) divisualisasikan dengan gel elektroforesis sebelum memasuki tahap PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Proses visualisasi DNA (elektroforesis) dilakukan untuk mengecek ada atau tidaknya kandungan DNA (visualisasi DNA). Jika terdapat DNA pada sampel tersebut maka akan muncul *band* DNA pada hasil elektroforesis. Elektroforesis dilakukan sebanyak dua kali untuk setiap sampelnya yaitu setelah proses ekstraksi dan setelah proses PCR. Hal ini dilakukan agar dapat melihat dengan jelas (klarifikasi) keberhasilan metode ekstraksi dan PCR yang dilakukan dari perolehan *band* DNA yang tampak. Visualiasi gel elektroforesis hasil PCR akan menghasilkan *band* DNA yang lebih jelas daripada elektroforesis hasil ekstraksi karena DNA telah digandakan berkali-kali pada saat proses PCR.

Hasil visualisasi ekstraksi beberapa sampel lamun dengan gel elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 8 berikut ini.



Gambar 8. Visualisasi Hasil Ekstraksi Sampel Lamun

(Kolaborasi Riset dengan Indonesian Biodiversity Research Center, 2015)

Keterangan :

- Ladder : *Low DNA mass ladder* 2000 bp
- Ea : *Enhalus acoroides*
- Ho : *Halophila ovalis*
- Cr : *Cymodocea rotundata*
- Th : *Thalassia hemprichii*
- Angka menunjukkan nomor ID sampel yang dapat dilihat lebih lengkap pada Lampiran 3

Pada elektroforesis hasil ekstraksi (Gambar 8) dapat dilihat bahwa tidak semua sampel nampak memiliki *band* DNA. Namun, sampel yang tidak memiliki *band* DNA masih dapat langsung masuk ke tahap PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk dilakukan proses penggandaan DNA. Menurut IBRC (2015), terdapat dua kemungkinan mengapa elektroforesis sampel hasil ekstraksi tidak menampakkan *band* DNA yaitu hasil ekstraksi benar-benar tidak mengandung DNA ataupun DNA yang diperoleh sangat sedikit sedangkan *band* DNA yang tampak diatas 2000 bp menunjukkan bahwa genom DNA yang diperoleh cukup panjang sehingga melampaui marker dari *low DNA mass ladder* yang hanya sampai 2000 bp.

Menurut Fatchiyah *et al.* (2011), ekstraksi DNA memerlukan proses pemecahan dinding sel dan membran inti dengan penambahan buffer

ekstraksi untuk mencegah rusaknya DNA. Proses selanjutnya adalah pemisahan DNA dari debris sel dengan sentrifugasi. Kontaminan yang umum ditemukan diantaranya adalah polisakarida yang dapat mengganggu proses lanjutan seperti PCR dengan menghambat aktivitas *taq polymerase*. Untuk menghindari terjadinya hal ini, maka jaringan yang digunakan dijaga tetap dingin sebelum dan selama proses ekstraksi.

Lamun merupakan salah satu tumbuhan laut yang memiliki senyawa metabolit sekunder yang dapat pula digunakan sebagai anti bakteri. Menurut Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (2013), senyawa metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan pada tingkat pertumbuhan atau stress tertentu. Senyawa ini diproduksi hanya dalam jumlah sedikit dan tidak terus-menerus untuk mempertahankan diri dari perubahan lingkungan pada habitatnya. Senyawa metabolit sekunder memiliki struktur yang lebih kompleks dan sulit disintesa. Pada sampel yang memiliki senyawa metabolit sekunder, perlu modifikasi teknik dan penggunaan bahan kimia yang cukup banyak untuk mendapatkan DNA yang berkualitas tinggi dari sampel tersebut.

Satu sampel akan menghasilkan dua tube hasil ekstraksi DNA yang diberi tanda sebagai *tube A* dan *tube B*. Fungsi *tube A* sebagai tempat ekstrak DNA (template DNA) yang akan mengalami proses PCR dan fungsi dari *tube B* adalah sebagai stok dari hasil ekstraksi. Masing-masing *tube* menggunakan pengenceran satu kali dari filtrat DNA dari *spin column*. Pengenceran satu kali paling efektif karena akan menghasilkan konsentrasi DNA yang paling tinggi. Pernyataan ini sesuai dengan Restu *et al.* (2012), bahwa dengan tahap pengenceran satu kali menghasilkan rata-rata konsentrasi DNA yang tinggi daripada tahap pengenceran dua kali. Hal tersebut disebabkan karena pada saat pengenceran, sebagian supernatan

yang mengandung DNA genom ikut terbuang sehingga konsentrasi DNA yang dihasilkan menjadi berkurang.

4.2 Analisis Hasil Amplifikasi DNA

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode yang sesuai untuk amplifikasi atau penggandaan DNA pada sampel yang diujikan. Beberapa syarat untuk PCR juga dijelaskan pada Syafaruddin *et al.* (2011), bahwa pemilihan jenis marka molekuler (primer) yang akan digunakan dalam seleksi harus benar-benar dipertimbangkan kesesuaiannya dengan tingkat kemampuan dari primer tersebut untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi. Penyiapan atau purifikasi gen target juga sangat menentukan keberhasilan dari seleksi yang dilakukan.

DNA akan digandakan berdasarkan gen kloroplas yang dituju yaitu gen *matK* (*Maturase K*) dengan menggunakan primer *matK* (P646 dan P647) dan gen *rbcl* (*Ribulose 1,5 Biphosphate Carboxylase/Oxygenase*) dengan menggunakan primer *rbcl* (P610 dan P609). Langkah awal pada proses PCR adalah pembuatan larutan *master mix*. Jumlah *master mix* disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan melalui uji PCR. Jika sampel yang akan diujikan berjumlah satu maka akan dibuat dua komposisi *master mix*. Hal ini dilakukan untuk menghindari kurangnya jumlah *master mix*. Jumlah total *master mix* dalam satu *tube* PCR adalah 25 μ l dan akan ditambah dengan 2 μ l sampel sehingga total larutan dalam satu *tube* PCR adalah 27 μ l. Jumlah larutan ini cukup banyak untuk mengantisipasi menguapnya larutan saat proses PCR berlangsung dan agar diperoleh jumlah stok sampel hasil PCR yang mencukupi untuk proses elektroforesis dan sekuensing. Komposisi *master mix* untuk satu sampel dapat dilihat pada Tabel 2 berikut :

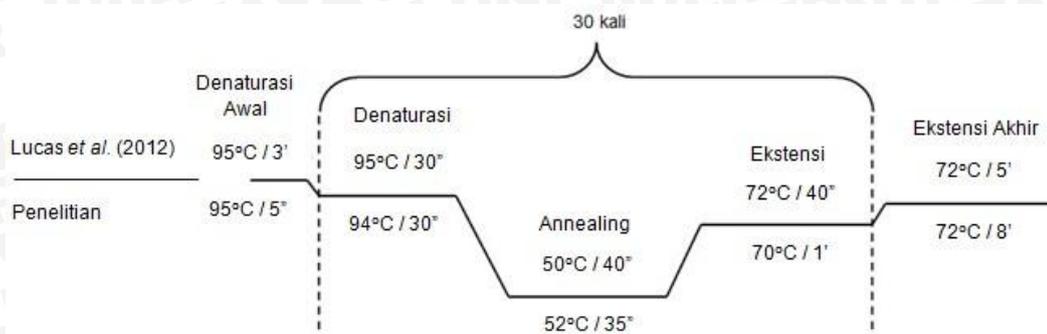
Tabel 2. Komposisi Larutan Master Mix

Komposisi	Volume (μ l)
ddH ₂ O	10
Primer 1 (10 μ M)	1,25
Primer 2 (10 μ M)	1,25
KAPA <i>Ready Mix</i> Terdiri dari : MgCl ₂ , dNTPs, PCR Buffer, dan enzim taq polimerase	12,5
DNA Template	2
TOTAL	27

PCR terdiri dari tiga tahap utama yaitu denaturasi, annealing, dan ekstensi. Tahap PCR ini diperinci lagi menjadi lima tahap yaitu denaturasi awal, denaturasi, annealing, elongasi atau ekstensi, dan tahap elongasi akhir atau ekstensi akhir. Denaturasi bertujuan untuk membuka dan memisahkan rantai *double helix* menjadi rantai tunggal, saat annealing terjadi proses penempelan primer pada DNA template, dan saat ekstensi terjadi proses perpanjangan DNA dengan enzim taq polimerase. Denaturasi, annealing, dan ekstensi termasuk siklus PCR utama yang diulangi sebanyak 30 kali dalam satu kali proses PCR berlangsung.

Menurut Toha (2001), tahap denaturasi bertujuan untuk memutuskan ikatan hidrogen dari DNA rantai ganda yang akan diampifikasi. Hasil yang diperoleh merupakan DNA rantai tunggal untuk penempelan primer saat tahap annealing. Pada tahap annealing terbentuk ikatan baru antara untai tunggal DNA cetakan dengan primer. Tahap ekstensi atau polimerasi merupakan tahap pemanjangan rantai tunggal primer dengan enzim DNA polimerase. Ketiga tahap ini membutuhkan temperatur dengan variasi tertentu tergantung dari sampel yang digunakan sehingga tidak ada standar yang sama untuk temperatur pada tahap-tahap tersebut. Temperatur yang

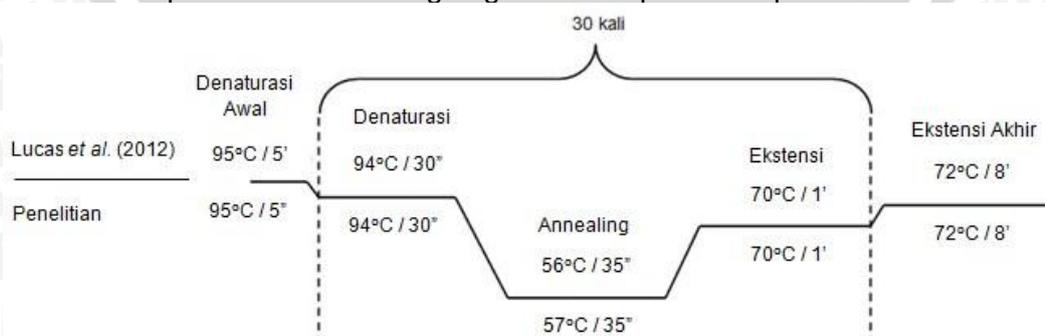
digunakan dapat berbeda untuk organisme, sel, dan gen yang berbeda pula. Berikut ini terdapat grafik siklus PCR yang digunakan dalam penelitian, adapun siklus PCR dengan gen matK dapat dilihat pada Gambar 9 berikut.



Gambar 9. Siklus PCR Gen matK

Menurut Lucas *et al.* (2012), PCR sampel lamun gen matK menggunakan primer P646 sebagai primer *forward* dan P647 sebagai primer *reverse* menghasilkan *band DNA* dengan panjang 945 bp. Siklus PCR gen matK (Gambar 9), menjelaskan bahwa pada penelitian ini dilakukan modifikasi dari Lucas *et al.* (2012) untuk suhu denaturasi dari 95°C diubah menjadi 94°C, annealing dari 50°C diubah menjadi 52°C, dan ekstensi dari 72°C diubah menjadi 70°C. Modifikasi lainnya juga dilakukan pada durasi pada setiap bagian siklus tersebut kecuali durasi denaturasi. Durasi denaturasi awal 3 menit diubah menjadi 5 detik, annealing dari 40 detik diubah menjadi 35 detik, ekstensi dari 40 detik diubah menjadi 1 menit, dan ekstensi akhir dari 5 menit diubah menjadi 8 menit.

Adapun siklus PCR dengan gen rbcL dapat dilihat pada Gambar 10.

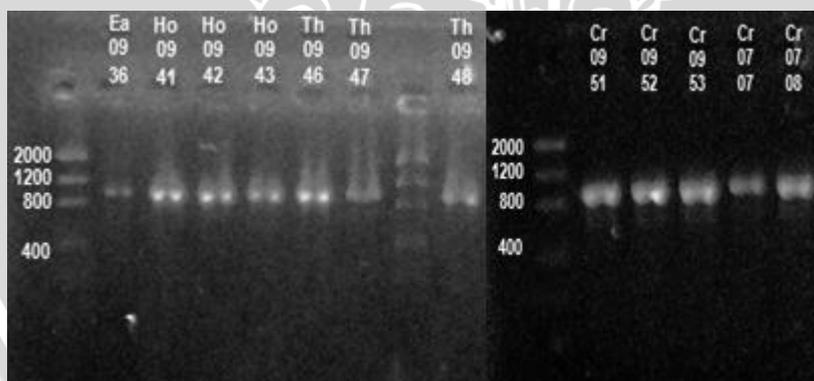


Gambar 10. Siklus PCR Gen rbcL

Menurut Lucas *et al.* (2012), PCR sampel lamun gen *rbcl* menggunakan primer P610 sebagai primer *forward* dan P609 sebagai primer *reverse* menghasilkan *band DNA* dengan panjang 599 bp. Siklus PCR gen *rbcl* (Gambar 10), menjelaskan bahwa pada penelitian ini dilakukan modifikasi dari Lucas *et al.* (2012) untuk suhu *annealing* dari 56°C diubah menjadi 57°C, serta modifikasi durasi pada denaturasi awal dari 5 menit diubah menjadi 5 detik.

Modifikasi dilakukan berdasarkan uji coba dari beberapa sampel penelitian skripsi yang tidak menunjukkan hasil positif memiliki *band DNA* jika diterapkan siklus PCR gen *matK* dan gen *rbcl* menurut Lucas *et al.* (2012). Setelah *troubleshooting* beberapa kali, diperoleh siklus PCR yang menghasilkan sampel positif memiliki *band DNA*. Oleh karena itu siklus modifikasi tersebut yang diterapkan untuk 18 sampel penelitian skripsi ini.

Amplifikasi DNA gen *matK* pada beberapa sampel divisualisasikan dengan gel elektroforesis seperti Gambar 11 berikut ini.



Gambar 11. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Menggunakan Gen *matK*

(Kolaborasi Riset dengan Indonesian Biodiversity Research Center, 2015)

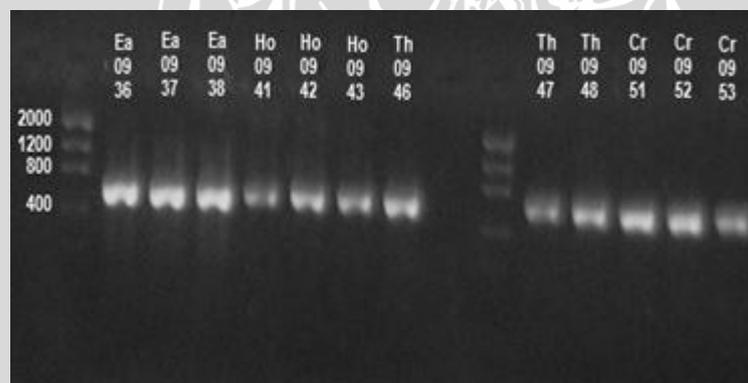
Keterangan :

- Ladder : Low DNA mass ladder 2000 bp
- Ea : *Enhalus acoroides*
- Ho : *Halophila ovalis*
- Cr : *Cymodocea rotundata*
- Th : *Thalassia hemprichii*

- Angka menunjukkan nomor ID sampel yang dapat dilihat lebih lengkap pada Lampiran 3

Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR pada sampel lamun menggunakan gen *matK* menghasilkan pita DNA dengan panjang 800-1200 bp pada semua sampel lamun penelitian skripsi ini yaitu spesies *Enhalus acoroides* (Ea), *Halophila ovalis* (Ho), *Thalassia hemprichii* (Th), dan *Cymodocea rotundata* (Cr). Hal ini sesuai dengan penelitian Lucas *et al.* (2012), bahwa amplifikasi DNA gen *matK* menghasilkan fragmen sepanjang 945 bp pada spesies *Thalassia hemprichii*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, *Halodule pinifolia*, *Halodule uninervis*, *Halophila decipiens*, *Halophila becarri*, dan *Syringodoum isoetifolium*.

Amplifikasi DNA pada gen *rbcl* pada beberapa sampel divisualisasikan dengan gel elektroforesis seperti Gambar 12 berikut ini.



Gambar 12. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Menggunakan Gen *rbcl*

(Kolaborasi Riset dengan Indonesian Biodiversity Research Center, 2015)

Keterangan :

- Ladder : *Low DNA mass ladder* 2000 bp
- Ea : *Enhalus acoroides*
- Ho : *Halophila ovalis*
- Cr : *Cymodocea rotundata*
- Th : *Thalassia hemprichii*
- Angka menunjukkan nomor ID sampel yang dapat dilihat lebih lengkap pada Lampiran 3

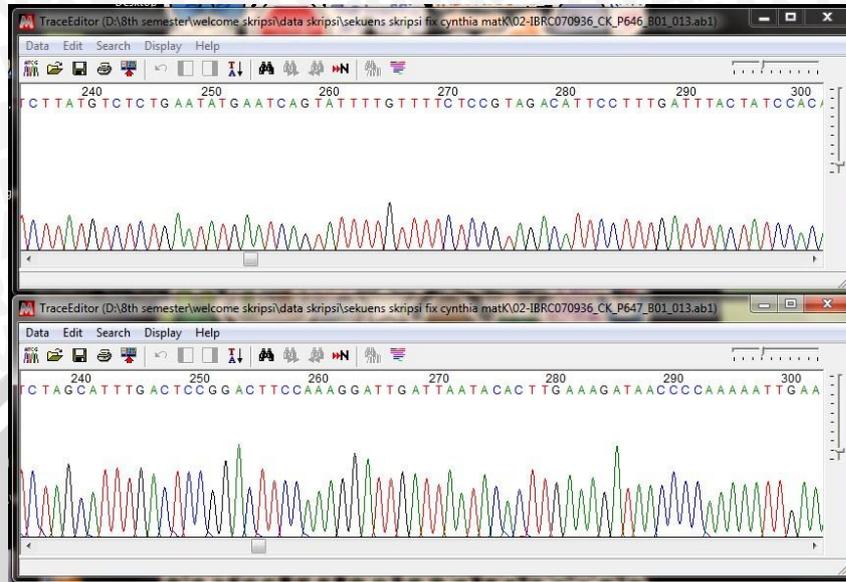
Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR pada sampel lamun menggunakan gen *rbcl* menghasilkan pita DNA dengan panjang 400-800 bp pada semua sampel lamun penelitian skripsi ini yaitu spesies *Enhalus acoroides* (Ea), *Halophila ovalis* (Ho), *Thalassia hemprichii* (Th), dan *Cymodocea rotundata* (Cr). Hal ini sesuai dengan penelitian Lucas *et al.* (2012), bahwa amplifikasi DNA gen *rbcl* menghasilkan fragmen sepanjang 599 bp pada semua sampelnya yaitu *Cymodocea rotundata*, *Cymodocea serrulata*, *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia*, *Halodule uninervis*, *Halodule wrightii*, *Halophila beccarii*, *Halophila decipiens*, *Halophila ovalis*, *Halophila ovata*, *Halophila ovalis* subsp. *ramamurthiana*, *Halophila stipulacea*, *Syringodium isoetifolium*, dan *Thalassia hemprichii*.

4.3 Identifikasi Molekuler Spesies

Sampel DNA hasil PCR yang positif memiliki *band* DNA selanjutnya disekuens di *Berkeley Sequencing Facility, University of California, Berkeley*. Data sekuens yang dihasilkan akan diidentifikasi molekuler menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan dianalisis hubungan filogenetiknya menggunakan *software* MEGA 5.2.

Hasil sekuensing sebagai data penelitian skripsi ini merupakan elektroferogram hasil dari metode sekuensing fluoresens (Gambar 13). Terdapat berbagai garis warna-warni yang membentuk puncak (*peak*) sebagai simbol dari basa nitrogen yang teridentifikasi saat proses sekuensing. Basa nitrogen A (Adenin) berwarna hijau, G (Guanin) berwarna hitam, C (Citosin) berwarna biru, dan T (Timin) berwarna merah. Pola warna pada elektroferogram ini sama dengan pola warna yang dikemukakan oleh Ratnayani *et al.* (2007) dalam Ferita *et al.* (2012). Hasil sekuensing mengalami proses edit sekuens, *alignment*, lalu proses BLAST dengan *GenBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sebelum

dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode analisis *Neighbor Joining* dan *Maximum Likelihood* menggunakan *software* MEGA 5.2.



Gambar 13. Elektropherogram Hasil Sekuensing

Proses edit sekuens menggunakan *software* MEGA 5.2 sangat dibutuhkan sebelum memasuki tahap *alignment* sekuens karena kualitas elektropherogram dari hasil sekuensing kurang maksimal. Sinyal gelombang bagian depan maupun bagian belakang elektropherogram dapat kurang jelas karena banyak terdapat sinyal ganda yang tidak beraturan (*noise*). Proses sekuensing akan menghasilkan dua sekuens untuk setiap sampelnya yaitu sekuens DNA hasil dari primer *forward* dan primer *reverse*. Kedua sekuens hasil dari primer *forward* dan *reverse* diinput dalam *software* MEGA 5.2 dan dilakukan *trim* yaitu proses edit bagian awal dan bagian akhir sekuens. Hal yang dilakukan saat *trim* adalah menghapus *noise* pada bagian awal dan bagian akhir sekuens yang teridentifikasi sebagai N dan mengganti beberapa basa nitrogen ditengah-tengah sekuens yang juga teridentifikasi sebagai N dengan cara mencocokkan dengan data elektropherogram. Proses *trim*

penting dilakukan karena hasil sekuensing yang diperoleh dapat kurang maksimal.

Proses berikutnya yaitu *alignment* sekuens atau pensejajaran sekuens. *Alignment* sekuens merupakan proses yang sangat penting karena saat proses ini dilakukan penentuan urutan nukleotida dari DNA. Sekuens DNA yang telah mengalami proses *trim* pada bagian edit sekuens akan dilakukan proses *contig* yaitu penggabungan sekuens DNA hasil dari primer *forward* dan *reverse* yang masing-masing telah diedit sehingga diperoleh satu sekuens tunggal.

Langkah berikutnya adalah proses BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dapat digunakan untuk menentukan homologi suatu urutan DNA atau asam amino dengan data yang ada di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Berdasarkan Widodo dan Miftakhunnafisah (2010), BLAST memiliki beberapa pilihan menu sesuai dengan analisis yang akan dikerjakan, misalnya analisis pensejajaran (*alignment analysis*). Analisis pensejajaran dapat digunakan untuk membandingkan dua sekuens atau lebih. Program ini dapat diakses melalui *website National Center for Biotechnology Information at The National Library of Medicine in Washington, DC* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Laman *website* ini dapat digunakan untuk melihat urutan sekuens data penelitian dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank*.

Identifikasi dengan BLAST perlu memperhatikan urutan pembacaan dari standar identifikasi, yaitu *nilai identity*, *nilai query cover*, dan *nilai E value* (*expect value*) yang digunakan oleh NCBI. Jika urutan pembacaan identifikasi tersebut tidak sesuai maka akan menghasilkan interpretasi yang tidak tepat. Nilai *identity* digunakan untuk melihat kesamaan urutan nukleotida dari sekuens yang dimiliki oleh sampel dengan sekuens yang terdapat pada

GenBank. Semakin tinggi nilai *identity* maka semakin mirip pula urutan nukleotida sekuens sampel dengan data sekuens yang terdapat pada *GenBank*. *Query cover* digunakan untuk mengukur berapa panjang sekuens dari sampel yang sesuai dengan sekuens yang ada pada *GenBank*. Semakin tinggi nilai *query cover* maka semakin tinggi pula tingkat kesamaan panjang sekuens sampel dengan sekuens yang ada pada *GenBank* sehingga semakin memadai sekuens DNA tersebut untuk dianalisis. *E value* digunakan untuk menggambarkan peluang atau kemungkinan jumlah adanya perbedaan pada *alignment*. Semakin rendah nilai *E value* maka sekuens DNA dari sampel semakin mirip dengan sekuens DNA yang terdapat pada *GenBank* NCBI.

4.3.1 Identifikasi Molekuler Lamun dengan Gen matK

Keseluruhan nilai *identity*, *query cover*, dan *E value* dari masing-masing sampel hasil BLAST dari gen matK dapat dilihat pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Spesies Lamun pada Gen matK menggunakan BLAST

No.	Lokasi	ID Sampel	Spesies	<i>GenBank Accession</i>	<i>Identity</i>	<i>Query Cover</i>	<i>E Value</i>
1.	Manyaifun	IBRC.07.09.36	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	100%	100%	0.0
2.	Manyaifun	IBRC.07.09.37	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	100%	100%	0.0
3.	Manyaifun	IBRC.07.09.38	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	99%	99%	0.0
4.	Manyaifun	IBRC.07.09.41	<i>H.ovalis</i>	AB 002570.1	99%	100%	0.0
5.	Manyaifun	IBRC.07.09.42	<i>H.ovalis</i>	AB 002570.1	99%	100%	0.0
6.	Manyaifun	IBRC.07.09.43	<i>H.ovalis</i>	AB 002570.1	99%	100%	0.0
7.	Manyaifun	IBRC.07.09.46	<i>T.hemprichii</i>	AB 002577.1	99%	100%	0.0
8.	Manyaifun	IBRC.07.09.47	<i>T.hemprichii</i>	AB 002577.1	99%	100%	0.0
9.	Manyaifun	IBRC.07.09.48	<i>T.hemprichii</i>	AB 002577.1	99%	99%	0.0
10.	Manyaifun	IBRC.07.09.51	<i>C.rotundata</i>	KF 488504.1	99%	98%	0.0
11.	Manyaifun	IBRC.07.09.52	<i>C.rotundata</i>	KF 488504.1	99%	98%	0.0
12.	Manyaifun	IBRC.07.09.53	<i>C.rotundata</i>	KF 488504.1	99%	98%	0.0
13.	Manokwari	IBRC.07.07.01	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	98%	99%	0.0

Tabel 3. Lanjutan

No.	Lokasi	ID Sampel	Spesies	GenBank Accession	Identity	Query Cover	E Value
14.	Manokwari	IBRC.07.07.02	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	100%	100%	0.0
15.	Manokwari	IBRC.07.07.07	<i>C.rotundata</i>	KF 488504.1	99%	98%	0.0
16.	Manokwari	IBRC.07.07.08	<i>C.rotundata</i>	KF 488504.1	99%	98%	0.0
17.	Manokwari	IBRC.07.08.01	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	99%	100%	0.0
18.	Manokwari	IBRC.07.08.02	<i>E.acoroides</i>	AB 002569.1	100%	100%	0.0

Tabel 3 di atas menunjukkan bahwa hasil BLAST identifikasi molekuler lamun dengan gen matK dari 18 sampel tidak semuanya memiliki kesamaan 100% dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank* NCBI ditinjau dari ketiga standar identifikasi yaitu nilai *identity*, *query cover*, dan *E value*. Nilai *identity* dan nilai *query cover* berkisar antara 98%-100%. Berdasarkan nilai yang diperoleh ini dapat diambil kesimpulan bahwa sekuens sampel memiliki homologi atau kesamaan yang tinggi dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank*. Terutama pada sampel *Enhalus acoroides* dengan nomor ID IBRC.07.09.36, IBRC.07.09.37, IBRC.07.07.02, dan IBRC.07.08.02 yang memiliki kesamaan nilai *identity* dan *query cover* sebesar 100% dengan sekuens *GenBank*. Nilai ini sudah memenuhi kriteria untuk mengidentifikasi suatu organisme secara molekuler (BLAST).

Identifikasi molekuler dengan gen matK pada *GenBank* (Tabel 3) untuk sekuens lamun spesies *Enhalus acoroides* sesuai dengan data *GenBank* dengan *accession number* AB 002569.1, spesies *Halophila ovalis* memiliki *accession number* AB 002570.1, spesies *Thalassia hemprichii* memiliki *accession number* AB 002577.1, dan spesies *Cymodocea rotundata* memiliki *accession number* KF 488504.1. Fungsi dari *accession number* adalah sebagai kode untuk sekuens yang terdapat pada *GenBank*, sehingga

tidak akan terdapat sekuens yang berbeda dengan *accession number* yang sama.

Total panjang sekuens lamun dengan gen matK pada penelitian ini sepanjang 817 bp. Panjang sekuens ini memiliki perbedaan dengan hasil penelitian Lucas *et al.* (2012) yaitu sepanjang 945 bp. Walaupun ditemukan selisih sepanjang 128 bp, kedua sekuens tersebut masih teridentifikasi sebagai sekuens dari gen matK. Hal ini dibuktikan dengan hasil dari BLAST yang mencocokkan keseluruhan sekuens sampel penelitian dengan sekuens dari spesies lamun gen matK di *GenBank* NCBI.

4.3.2 Identifikasi Molekuler Lamun dengan Gen *rbcl*

Keseluruhan nilai *identity*, *query cover*, dan *E value* dari masing-masing sampel hasil BLAST dari gen *rbcl* dapat dilihat pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Hasil Identifikasi Spesies Lamun pada Gen *rbcl* menggunakan BLAST

No.	Lokasi	ID Sampel	Spesies	<i>GenBank</i> <i>Accession</i>	<i>Identity</i>	<i>Query</i> <i>Cover</i>	<i>E</i> <i>Value</i>
1.	Manyaifun	IBRC.07.09.36	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0
2.	Manyaifun	IBRC.07.09.37	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0
3.	Manyaifun	IBRC.07.09.38	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0
4.	Manyaifun	IBRC.07.09.41	<i>H.ovalis</i>	JX 457593.1	100%	100%	0.0
5.	Manyaifun	IBRC.07.09.42	<i>H.ovalis</i>	JX 457593.1	100%	100%	0.0
6.	Manyaifun	IBRC.07.09.43	<i>H.ovalis</i>	JX 457593.1	100%	100%	0.0
7.	Manyaifun	IBRC.07.09.46	<i>T.hemprichii</i>	JN 225341.1	100%	100%	0.0
8.	Manyaifun	IBRC.07.09.47	<i>T.hemprichii</i>	JN 225341.1	100%	100%	0.0
9.	Manyaifun	IBRC.07.09.48	<i>T.hemprichii</i>	JN 225341.1	100%	100%	0.0
10.	Manyaifun	IBRC.07.09.51	<i>C.rotundata</i>	KF 488490.1	100%	100%	0.0
11.	Manyaifun	IBRC.07.09.52	<i>C.rotundata</i>	KF 488490.1	100%	100%	0.0
12.	Manyaifun	IBRC.07.09.53	<i>C.rotundata</i>	KF 488490.1	100%	100%	0.0
13.	Manokwari	IBRC.07.07.01	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0
14.	Manokwari	IBRC.07.07.02	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0
15.	Manokwari	IBRC.07.07.07	<i>C.rotundata</i>	KF 488490.1	100%	100%	0.0

Tabel 4. Lanjutan

16.	Manokwari	IBRC.07.07.08	<i>C.rotundata</i>	KF 488490.1	100%	100%	0.0
17.	Manokwari	IBRC.07.08.01	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0
18.	Manokwari	IBRC.07.08.02	<i>E.acoroides</i>	JN 225336.1	100%	100%	0.0

Tabel 4 di atas menunjukkan bahwa hasil BLAST identifikasi molekuler lamun dengan gen *rbcl* dari 18 sampel memiliki kesamaan 100% dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank* NCBI ditinjau dari ketiga standar identifikasi yaitu nilai *identity*, *query cover*, dan *E value*. Nilai 100% pada *identity* memiliki arti bahwa urutan nukleotida dari sekuens sampel dengan sekuens pada *GenBank* adalah identik, begitu pula dengan nilai *query cover* 100% memiliki arti bahwa panjang sekuens sampel dengan sekuens *GenBank* adalah sama panjang, sedangkan *E value* dari semua sampel menunjukkan nilai 0.0 maka tidak terdapat perbedaan pada *alignment* dari sekuens sampel dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank*.

Identifikasi molekuler dengan gen *matK* pada *GenBank* (Tabel 4) untuk sekuens lamun spesies *Enhalus acoroides* sesuai dengan data *GenBank* dengan *accession number* JN 225336.1, spesies *Halophila ovalis* memiliki *accession number* JX 457593.1, spesies *Thalassia hemprichii* memiliki *accession number* JN 225341.1, dan spesies *Cymodocea rotundata* memiliki *accession number* KF 488490.1.

Perbedaan panjang sekuens yang serupa juga dialami oleh sekuens dari gen *rbcl*. Total panjang sekuens lamun dengan gen *rbcl* pada penelitian ini sepanjang 549 bp. Panjang sekuens ini memiliki perbedaan dengan hasil penelitian Lucas *et al.* (2012) yaitu sepanjang 599 bp. Walaupun ditemukan selisih sepanjang 50 bp, kedua sekuens tersebut masih teridentifikasi sebagai sekuens dari gen *rbcl*. Hal ini dibuktikan dengan hasil dari BLAST

yang mencocokkan keseluruhan sekuens sampel penelitian dengan sekuens dari spesies lamun gen rbcL di *GenBank* NCBI.

4.4 Analisis Nukleotida

Analisis nukleotida diperlukan dalam penelitian ini karena nukleotida merupakan penyusun sekuens DNA. Menurut Toha (2011), nukleotida merupakan monomer DNA yang mengandung tiga bagian berbeda yaitu gula pentosa (deoksiribosa), basa nitrogen (A, T, G, C), dan gugus fosfat. Oleh karena itu, analisis mengenai variasi dari nukleotida dan variasi dari jarak genetik akan dibahas dalam penelitian ini.

4.4.1 Variasi Nukleotida

Perbandingan ikatan G-C dan A-T akan mempengaruhi proses denaturasi DNA. Menurut Fatchiyah *et al.* (2011), tingginya kandungan G-C akan memperlambat proses denaturasi. Namun jika kandungan ikatan A-T yang terlalu tinggi maka pita DNA tersebut akan mudah patah. Hasil analisis data variasi nukleotida dapat dilihat pada Tabel 5 berikut ini.

Tabel 5. Variasi Nukleotida Spesies Lamun pada Gen matK dan rbcL

Variabel	Gen matK	Gen rbcL
Panjang sekuens (bp)	817	549
Jumlah sekuens	18	18
Jumlah spesies	4	4
<i>Variable sites</i>	163	62
<i>Conserved sites</i>	654	487
Komposisi nukleotida (%)	A = 27-31 T = 37-39 G = 14-17 C = 17-18	A = 28-29 T = 28-30 G = 21-23 C = 20-21
<i>Best evolutionary models</i> untuk metode <i>Maximum Likelihood</i>	GTR	T92



Berdasarkan data pada Tabel 5, komposisi ikatan G-C pada sampel dengan gen *matK* lebih kecil daripada komposisi ikatan A-T, begitu pula dengan gen *rbcl* juga menunjukkan hal yang sama. Hal ini sesuai dengan Toha (2011), bahwa kandungan ikatan G-C dari DNA kloroplas berbeda dari DNA inti dan DNA mitokondria. Kandungan ikatan G-C dari DNA kloroplas sebesar 36%, sehingga dapat disimpulkan bahwa ikatan G-C pada DNA kloroplas lebih sedikit daripada ikatan A-T.

Berdasarkan data pada Tabel 6, panjang sekuens adalah jumlah basa nitrogen dalam satu sekuens dalam satuan *base pair* (bp). Jumlah sekuens adalah banyaknya sampel yang tersedia dan jumlah spesies adalah banyaknya jenis spesies pada total sampel. *Variable sites* adalah jumlah *site* yang menunjukkan perubahan (*polymorphic site*) sehingga terbentuk variasi dalam satu *site* yang sama, *variable sites* ini dapat menunjukkan adanya spesies yang berbeda pada sampel. *Conserved sites* adalah *site* yang perubahannya sedikit (jarang berubah) atau bahkan tidak berubah. Komposisi nukleotida adalah rata-rata jumlah perbandingan ikatan G-C dan A-T pada keseluruhan sekuens dengan gen *matK* atau *rbcl*. *Best evolutionary model* adalah suatu pendekatan model evolusi terbaik berdasarkan dua parameter yaitu frekuensi nukleotida (Π) dan *rate of substitution*. Frekuensi nukleotida (Π) adalah persentase dari basa nitrogen A, T, G, dan C pada suatu sekuens, sedangkan tingkat substitusi (*substitution rate*) adalah tingkat perubahan dari $A \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow C$ atau $G \leftrightarrow A$, $G \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, dan sebagainya.

Model evolusi terbaik diperoleh dengan mengolah data sekuens DNA yang diperoleh dengan *software* MEGA 5.2, hasilnya metode evaluasi terbaik untuk gen *matK* adalah GTR (*General Time Reversible*) dengan asumsi bahwa frekuensi nukleotida berbeda dan semua *substitution rate* memiliki

nilai yang berbeda, terdapat enam *substitution rate* yang mungkin terjadi yaitu $A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$, dan $G \leftrightarrow T$ (IBRC, 2015) sedangkan model evolusi terbaik untuk gen *rbcl* adalah T92 (*Tamura 2 - Parameter*) dengan asumsi bahwa frekuensi nukleotida berbeda dan terdapat *substitution rate* untuk purin ($A \leftrightarrow G$) dan pirimidin ($C \leftrightarrow T$) (Lemey *et al.*, 2009).

4.4.2 Variasi Jarak Genetik

Variasi jarak genetik (*pairwise distance*) ditampilkan pada Tabel 7 dan Tabel 8 menggunakan *Kimura 2 - Parameter* (K80) dengan bootstrap sebanyak 1000 kali pengulangan. *Kimura 2 - Parameter* (K80) dipilih karena memiliki model evolusi paling lengkap yaitu dengan frekuensi nukleotida yang sama dan *substitution rate* berbeda (dengan mempertimbangkan transisi dan transversasi) sehingga dapat digunakan sebagai standar perhitungan jarak genetik.



Tabel 6. Matriks Variasi Jarak Genetik menggunakan Gen matK

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1	IBRC070936 <i>Enhalus acoroides</i>		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
2	IBRC070937 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
3	IBRC070938 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
4	IBRC070941 <i>Halophila ovalis</i>	0.05	0.05	0.05		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	
5	IBRC070942 <i>Halophila ovalis</i>	0.05	0.05	0.05	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	
6	IBRC070943 <i>Halophila ovalis</i>	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	
7	IBRC070946 <i>Thalassia hemprichii</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04		0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02
8	IBRC070947 <i>Thalassia hemprichii</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00		0.00	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02
9	IBRC070948 <i>Thalassia hemprichii</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00	0.00		0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02
10	IBRC070951 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19		0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	
11	IBRC070952 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.00		0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	
12	IBRC070953 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.00	0.00		0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	
13	IBRC070701 <i>Enhalus acoroides</i>	0.02	0.02	0.02	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.18	0.18	0.18		0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
14	IBRC070702 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.19	0.19	0.19	0.02		0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
15	IBRC070707 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.00	0.00	0.00	0.18	0.19		0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	
16	IBRC070708 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.00	0.00	0.00	0.18	0.19	0.00		0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01	
17	IBRC070801 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.19	0.19	0.19	0.02	0.00	0.19	0.19		0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
18	IBRC070802 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.19	0.19	0.19	0.02	0.00	0.19	0.19	0.00		0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	
19	JN 225360.1 <i>Enhalus acoroides</i> from India (matK)	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.19	0.19	0.19	0.02	0.00	0.19	0.19	0.00	0.00		0.01	0.02	0.01	0.02	
20	JN 225366.1 <i>Halophila ovalis</i> from India (matK)	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.04	0.20	0.20	0.20	0.06	0.05	0.20	0.20	0.05	0.05	0.05		0.02	0.01	0.02	
21	JN 225358.1 <i>Cymodocea rotundata</i> from India (matK)	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.01	0.01	0.01	0.18	0.19	0.01	0.01	0.19	0.19	0.19	0.20		0.02	0.01	
22	JN 225373.1 <i>Thalassia hemprichii</i> from India (matK)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.19	0.19	0.19	0.06	0.05	0.19	0.19	0.05	0.05	0.05	0.05	0.18		0.02	
23	JN 225378.1 <i>Zostera marina</i> from Germany (matK)	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.16	0.16	0.16	0.22	0.22	0.16	0.16	0.22	0.22	0.22	0.22	0.15	0.21		

Angka hitam : Jarak genetik

Angka biru : Standar error data (α)

Tabel 7. Matriks Variasi Jarak Genetik menggunakan Gen rbcL

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1	IBRC070936 <i>Enhalus acoroides</i>		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
2	IBRC070937 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
3	IBRC070938 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
4	IBRC070941 <i>Halophila ovalis</i>	0.03	0.03	0.03		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	
5	IBRC070942 <i>Halophila ovalis</i>	0.03	0.03	0.03	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	
6	IBRC070943 <i>Halophila ovalis</i>	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	
7	IBRC070946 <i>Thalassia hemprichii</i>	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.03		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
8	IBRC070947 <i>Thalassia hemprichii</i>	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.03	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
9	IBRC070948 <i>Thalassia hemprichii</i>	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
10	IBRC070951 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10		0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
11	IBRC070952 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.00		0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
12	IBRC070953 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00		0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
13	IBRC070701 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10		0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
14	IBRC070702 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00		0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
15	IBRC070707 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
16	IBRC070708 <i>Cymodocea rotundata</i>	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00		0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	
17	IBRC070801 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10		0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
18	IBRC070802 <i>Enhalus acoroides</i>	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00		0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	
19	JN 225336.1 <i>Enhalus acoroides</i> from India (rbcL)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00		0.01	0.01	0.00	0.02	
20	JN 225348.1 <i>Halophila ovalis</i> from India (rbcL)	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.11	0.11	0.11	0.03	0.03	0.11	0.11	0.03	0.03	0.03		0.01	0.01	0.02	
21	JN 225334.1 <i>Cymodocea rotundata</i> from India (rbcL)	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11		0.01	0.01
22	JN 225341.1 <i>Thalassia hemprichii</i> from India (rbcL)	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01	0.10	0.10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.10		0.02
23	JN 225353.1 <i>Zostera marina</i> from Germany (rbcL)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.07	0.07	0.07	0.13	0.13	0.07	0.07	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.07	0.13	

Angka hitam : Jarak genetik

Angka biru : Standar error data (α)

Angka-angka yang dicetak dengan warna biru merupakan standar error data atau alfa (α). Nilai α muncul karena perhitungan jarak genetik dengan bootstrap 1000 sehingga dilakukan pengulangan perhitungan sebanyak 1000 kali. α merupakan suatu nilai keputusan statistik terhadap data yang diperoleh, apakah data tersebut signifikan atau tidak signifikan. Pada Tabel 6 dan Tabel 7 merupakan nilai jarak genetik dari gen *matK* dan *rbcl*, data menunjukkan bahwa semua nilai $\alpha < 0,05$ maka data jarak genetik tersebut adalah signifikan.

4.4.2.1 Variasi Intraspesifik

- **Variasi Intraspesifik Gen *matK***

Secara keseluruhan hasil analisis pada gen *matK* yang terdiri dari 18 sekuens sampel dan lima sekuens *GenBank* menunjukkan rentang jarak 0.00 hingga 0.22 dengan standar error data 0.00 hingga 0.02. Terdapat empat spesies pada sampel penelitian, berikut ini akan diuraikan satu-persatu. Pertama, jarak genetik antara tujuh sampel spesies *Enhalus acoroides* berada pada rentang 0.00 hingga 0.02 dengan jarak terjauh yaitu dengan sampel *Enhalus acoroides* dari Manokwari dengan ID IBRC.07.07.01 memiliki urutan basa berbeda hingga dapat disimpulkan bahwa pada spesies *Enhalus acoroides* tidak semuanya berasal dari keturunan yang sama dan terdapat variasi intraspesifik. Kedua, jarak genetik antara lima sampel spesies *Cymodocea rotundata* adalah 0.00 dapat disimpulkan bahwa pada spesies *Cymodocea rotundata* semuanya berasal dari keturunan yang sama dan tidak terdapat variasi intraspesifik. Namun, jika kelima sekuens *Cymodocea rotundata* tersebut dibandingkan dengan *GenBank* dengan *accession number* JN 225358.1 terdapat perbedaan jarak genetik sebesar 0.01. Ketiga, jarak

genetik antara tiga sampel spesies *Halophila ovalis* dan jika dibandingkan dengan *Halophila ovalis* JN 225366.1 adalah 0.00 dapat disimpulkan bahwa pada semua spesies *Halophila ovalis* berasal dari *gene pool* yang sama dan tidak terdapat variasi intraspesifik. Keempat, jarak genetik antara tiga sampel spesies *Thalassia hemprichii* adalah 0.00 dapat disimpulkan bahwa pada spesies *Thalassia hemprichii* semuanya berasal dari *gene pool* dan tidak terdapat variasi intraspesifik. Walaupun jika ketiga sekuens *Thalassia hemprichii* tersebut dibandingkan dengan *Thalassia hemprichii* JN 225373.1 terdapat perbedaan jarak genetik sebesar 0.01.

- **Variasi Intraspesifik Gen *rbcl***

Secara keseluruhan hasil analisis pada gen *rbcl* yang terdiri dari 18 sekuens sampel dan enam sekuens *GenBank* menunjukkan rentang jarak 0.00 hingga 0.13 dengan standar *error* data 0.00 hingga 0.02. Jarak genetik antar sampel pada empat spesies penelitian, semuanya sebesar 0.00 begitu pula jika dibandingkan dengan jarak genetik sekuens dari *GenBank* pada spesies yang sama. Maka dapat disimpulkan bahwa antara sampel dengan spesies yang sama memiliki urutan basa yang sama pula dan berasal dari *gene pool* sehingga tidak terdapat variasi intraspesifik antara sampel dari semua spesies.

Hasil yang dapat disimpulkan dari analisis variasi intraspesifik Tabel 6 dan 7 adalah pada gen *rbcl* tidak terdapat variasi jarak genetik antara sampel dalam satu spesies yang sama, hal ini berbeda dengan gen *matK* yang memiliki variasi intraspesifik. Sampel *Enhalus acoroides* dari Manokwari dengan ID IBRC.07.07.01 yang dianalisis dengan gen *matK* memiliki urutan basa yang berbeda dari sampel *Enhalus acoroides* lainnya hingga dapat disimpulkan bahwa pada spesies *Enhalus acoroides* tidak semuanya berasal

dari *gene pool* dan terdapat variasi intraspesifik. Namun, hal ini tidak dapat terdeteksi oleh gen *rbcl* maka dapat disimpulkan bahwa gen *matK* lebih teliti dalam melakukan analisis jarak genetik terhadap sampel lamun.

4.4.2.2 Variasi Interspesifik

Analisis jarak genetik pada Tabel 6 dan Tabel 7 menunjukkan rentang jarak genetik gen *matK* lebih besar yaitu berkisar antara 0.00 hingga 0.22 dibanding dengan gen *rbcl* yang berkisar antara 0.00 hingga 0.13 namun kedua gen memiliki standar *error data* yang sama yaitu 0.00 hingga 0.02.

- **Variasi Interspesifik Gen *matK***

Jarak genetik pada gen *matK* yang paling dekat ditemukan antara spesies *Halophila ovalis* dengan *Thalassia hemprichii*, dimana semua sampelnya menunjukkan jarak genetik sebesar 0.04. Jarak genetik yang paling jauh ditemukan antara *Halophila ovalis* dengan *Cymodocea rotundata*, dimana semua sampelnya menunjukkan jarak genetik sebesar 0.2.

Jika sekuens keempat spesies sampel tersebut dibandingkan dengan sekuens *outgroup* yaitu spesies *Zostera marina* JN 225378.1, maka terdapat perbedaan jarak genetik sebesar 0.22 dengan seluruh spesies *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii*. Selanjutnya adalah spesies *Cymodocea rotundata* yang memiliki jarak genetik sebesar 0.16 dengan *Zostera marina* JN 225378.1.

- **Variasi Interspesifik Gen *rbcl***

Jarak genetik pada gen *rbcl* yang paling dekat ditemukan antara spesies *Enhalus acoroides* dengan *Thalassia hemprichii*, dimana semua sampelnya menunjukkan jarak genetik sebesar 0.01. Jarak genetik yang

paling jauh ditemukan antara *Halophila ovalis* dengan *Cymodocea rotundata* yang semua sampelnya menunjukkan jarak genetik sebesar 0.11.

Jika sekuens keempat spesies sampel tersebut dibandingkan dengan sekuens *outgroup* yaitu spesies *Zostera marina* JN 225353.1, maka terdapat perbedaan jarak genetik sebesar 0.13 dengan seluruh spesies *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii*. Selanjutnya adalah spesies *Cymodocea rotundata* yang memiliki jarak genetik sebesar 0.07 dengan *Zostera marina* JN 225353.1.

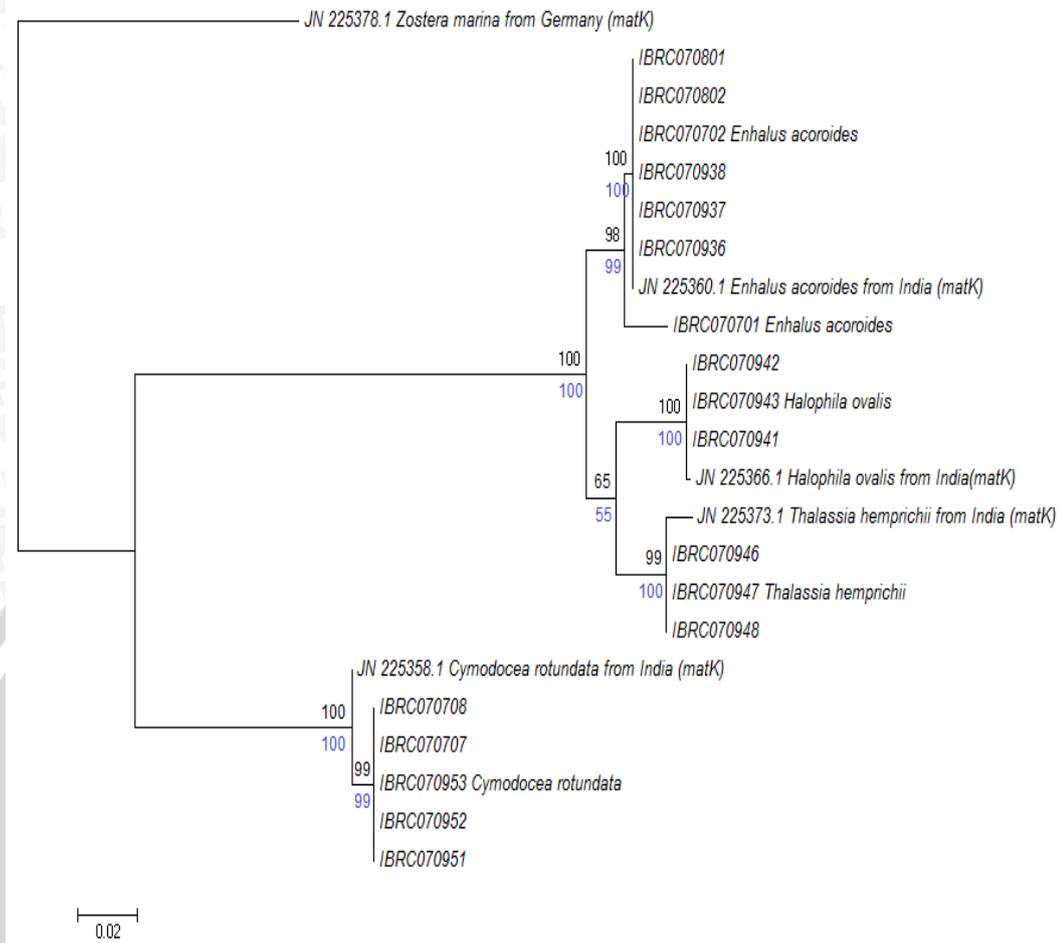
Dari analisis jarak genetik diperoleh variasi basa pada sampel lamun dengan gen *matK* lebih besar daripada gen *rbcL*, maka jarak genetik dari spesies lamun dengan gen *matK* juga lebih besar daripada gen *rbcL*. Variasi interspesifik lebih besar terjadi pada gen *matK* karena memiliki jarak genetik paling kecil adalah 0.04 dan jarak genetik paling besar adalah 0.2 dibandingkan dengan gen *rbcL* yang memiliki jarak genetik paling kecil adalah 0.01 dan jarak genetik paling besar adalah 0.11.

4.5 Pohon Filogeni

Pohon filogeni digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan genetik antara spesies. Pada penelitian ini metode rekonstruksi pohon filogeni yang digunakan adalah *Neighbor Joining* dan *Maximum Likelihood* dengan membandingkan dua gen kloroplas yang berbeda (*matK* dan *rbcL*).

4.5.1 Pohon Filogeni dengan Gen *matK*

Hasil rekonstruksi pohon filogeni dengan gen *matK* dapat dilihat pada Gambar 14 berikut ini.



Gambar 14. Pohon Filogeni Gen matK

Keterangan :

Angka Hitam : Nilai kepercayaan metode *Maximum Likelihood*

Angka Biru : Nilai kepercayaan Metode *Neighbor Joining*

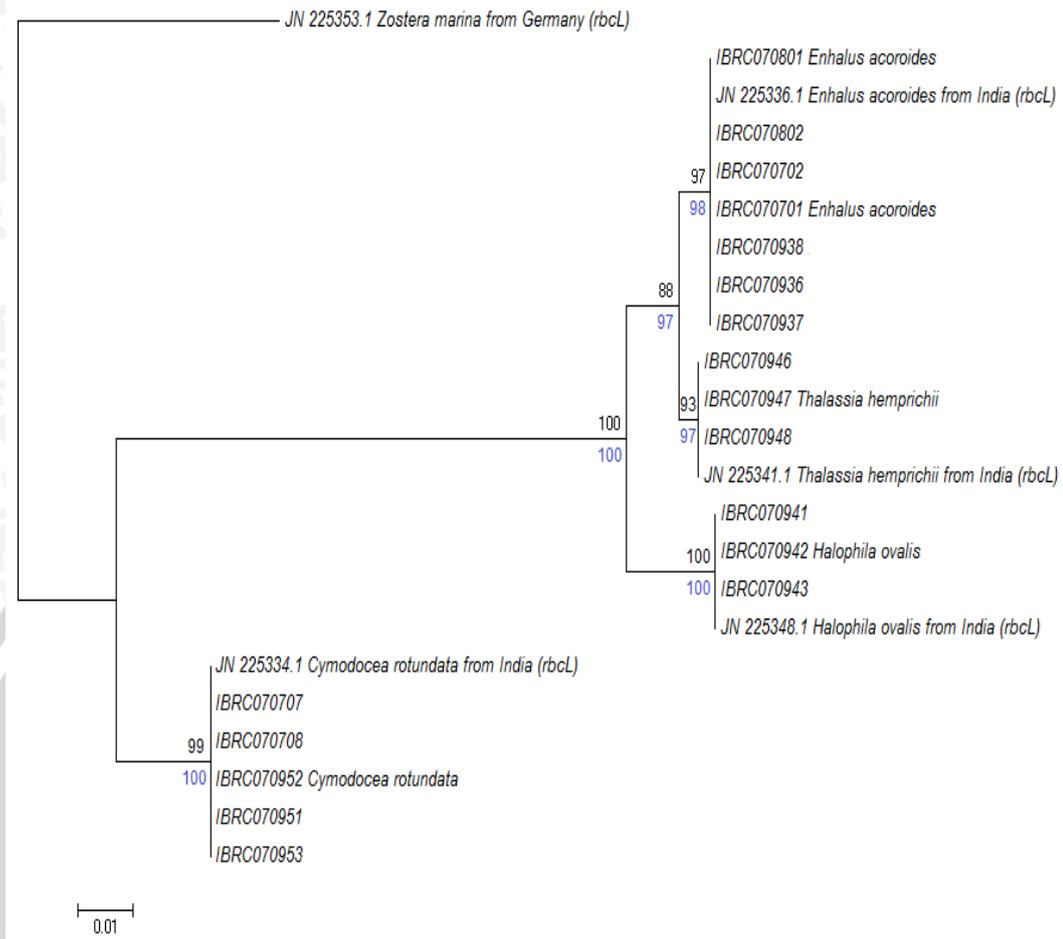
Terdapat dua jenis nilai kepercayaan (dinyatakan dalam persen) untuk menjelaskan pohon filogeni ini. Nilai kepercayaan tersebut disesuaikan dengan metode rekonstruksi pohon filogeni yang digunakan, yaitu *Maximum Likelihood* (ML) dengan angka berwarna hitam dan *Neighbor Joining* (NJ) dengan angka berwarna biru. Secara umum hasil rekonstruksi pohon filogeni gen matK menghasilkan dua percabangan besar yang terdiri atas tiga *clade*. *Clade* adalah kelompok suatu organisme yang memiliki kekerabatan dekat dan ditandai dengan letaknya pada pohon filogeni yang mengelompok.

Clade yang pertama adalah *clade Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii* dimana ketiga spesies tersebut tergabung dalam famili Hydrocharitaceae. Nilai kepercayaan NJ dan ML sebesar 100 persen yang memisahkan antara *clade Enhalus acoroides* dengan *clade Halophila ovalis* dan *Thalassia hemprichii*. Pada *clade Enhalus acoroides* terdapat satu sampel yang terpisah dengan nilai kepercayaan 98 persen (ML) dan 99 persen (NJ) yaitu sampel *Enhalus acoroides* IBRC.07.07.01. Nilai kepercayaan yang cukup kecil ditemukan pada percabangan antara *clade Halophila ovalis* dan *Thalassia hemprichii* sebesar 65 persen (ML) dan 55 persen (NJ) sedangkan nilai kepercayaan minimum yang akurat adalah 70 persen.

Clade yang kedua adalah *clade Cymodocea rotundata* yang berasal dari famili Cymodoceaceae 'kompleks'. Satu sekuens dari *GenBank* yang digunakan sebagai pembandingan untuk sampel *Cymodocea rotundata* membentuk hasil percabangan yang berbeda dengan kelima sekuens sampel *Cymodocea rotundata* dari *GenBank* dengan nilai kepercayaan 100 persen menurut metode ML dan NJ. Namun, untuk kelima sekuens *Cymodocea rotundata* sampel berada pada satu percabangan yang sama dengan nilai kepercayaan sebesar 99 persen menurut metode ML dan NJ. *Clade* ketiga adalah *outgrup* yaitu spesies *Zostera marina* dengan data sekuens yang diambil dari *GenBank*.

4.5.2 Pohon Filogeni dengan Gen *rbcl*

Hasil rekonstruksi pohon filogeni dengan gen *matK* dapat dilihat pada Gambar 15 berikut ini.



Gambar 15. Pohon Filogeni Gen rbcL

Keterangan :

Angka Hitam : Nilai kepercayaan metode *Maximum Likelihood*

Angka Biru : Nilai kepercayaan Metode *Neighbor Joining*

Hasil rekonstruksi pohon filogeni dengan gen rbcL hampir sama dengan gen matK, juga terdapat dua jenis nilai kepercayaan yaitu *Maximum Likelihood* (ML) dengan angka berwarna hitam dan *Neighbor Joining* (NJ) dengan angka berwarna biru. Secara umum pohon filogeni gen rbcL juga menghasilkan dua percabangan besar yang terdiri atas tiga *clade*. Komposisi dari *clade* pertama sama dengan pohon filogeni gen matK yaitu *clade Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii*. Nilai kepercayaan NJ dan ML sebesar 100 persen membagi antara *clade Enhalus*

acoroides dan *Thalassia hemprichii* dengan *clade Halophila ovalis*. Terdapat sedikit perbedaan dengan pohon filogeni gen *matK*, pada gen *rbcl* spesies *Enhalus acoroides* lebih dekat kekerabatannya dengan *Thalassia hemprichii* dibandingkan dengan *Halophila ovalis* dengan nilai kepercayaan 88 persen (ML) dan 97 persen (NJ).

Clade yang kedua adalah *clade Cymodocea rotundata* yang berasal dari famili *Cymodoceaceae* 'kompleks'. Satu sekuens dari *GenBank* digunakan sebagai pembanding untuk sampel *Cymodocea rotundata*. Hasilnya, terdapat perbedaan dengan pohon filogeni gen *matK*. Jika pada pohon filogeni gen *matK* kelima sekuens *Cymodocea rotundata* dari sampel dan sekuens *Cymodocea rotundata* dari *GenBank* berada pada percabangan yang berbeda, namun pada pohon filogeni gen *rbcl* kelima sekuens sampel *Cymodocea rotundata* dan sekuens *Cymodocea rotundata* dari *GenBank* berada pada percabangan yang sama dengan nilai kepercayaan 99 persen (ML) dan 100 persen (NJ). *Clade* ketiga adalah *outgroup* yaitu spesies *Zostera marina* dengan data sekuens yang diambil dari *GenBank*.

Berdasarkan variasi intraspesifik, variasi interspesifik, dan rekonstruksi pohon filogeni menyatakan bahwa gen *rbcl* lebih efektif dalam analisis filogenetik pada level famili karena variasi genetik yang minim dan stabil. Hal ini juga disebabkan karena evolusi dari gen *rbcl* lebih rendah daripada gen *matK*. Berbeda halnya dengan gen *matK* yang lebih efektif dalam analisis filogenetik pada level genus dan spesies karena memiliki banyak variasi genetik. Kemampuan evolusi dari gen *matK* lebih besar dibandingkan *rbcl* sehingga variasi genetik yang ditunjukkan juga lebih tinggi. Vy *et al.* (2013) juga menyatakan bahwa lokus gen *matK* pada kloroplas telah berkembang kurang lebih tiga kali lipat dibandingkan lokus gen *rbcl* sehingga *matK* lebih sesuai untuk analisis filogenetik tanaman baik pada tingkat genus dan spesies.

4.6 Hubungan Kekerbatan Genetik dalam Famili Hydrocharitaceae

Hubungan kekerabatan dalam famili Hydrocharitaceae akan dibahas pada sub bab ini karena sebagian besar spesies sampel penelitian merupakan spesies dari famili Hydrocharitaceae, yaitu spesies *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii*. Terdapat perbedaan percabangan yang menyatakan hubungan kekerabatan genetik antara spesies dalam pohon filogeni menurut gen matK dan rbcL.

Berdasarkan pohon filogeni gen matK (Gambar 14), ada percabangan yang membagi antara *Enhalus acoroides* dengan *Halophila ovalis* dan *Thalassia hemprichii* dimana percabangan ini memiliki nilai kepercayaan yang sangat tinggi yaitu 100 persen untuk ML dan NJ. Selain itu, spesies *Thalassia hemprichii* lebih dekat kekerabatannya dengan *Halophila ovalis* namun memiliki nilai kepercayaan yang cukup rendah yaitu 65 persen (ML) dan 55 persen (NJ).

Data pada jarak genetik gen matK (Tabel 6) juga menjelaskan bahwa jarak genetik paling dekat pada gen matK adalah spesies *Thalassia hemprichii* dan *Halophila ovalis* dengan jarak genetik sebesar 0,04 sehingga Gambar 14 menunjukkan bahwa metode NJ dan ML pada gen matK mengelompokkan *Thalassia hemprichii* dan *Halophila ovalis* pada percabangan yang sama. Jarak genetik antara *Enhalus acoroides* dengan *Thalassia hemprichii* juga sebesar 0.04 kecuali untuk satu sampel *Enhalus acoroides* (IBRC 07.07.01) jarak genetiknya sebesar 0.05, akan tetapi hasil rekonstruksi pohon filogeni tetap mengelompokkan *Thalassia hemprichii* dan *Halophila ovalis* pada percabangan yang sama. Hal ini disebabkan karena jarak genetik grup *Enhalus acoroides* dengan grup *Halophila ovalis* sebesar 0.047 dan jarak genetik grup *Enhalus acoroides* dengan grup *Thalassia*

hemprichii sebesar 0.046 sedangkan jarak genetik grup *Thalassia hemprichii* dengan *Halophila ovalis* hanya sebesar 0.044.

Berbeda halnya dengan pohon filogeni gen *rbcl* (Gambar 15), ada percabangan yang membagi antara *Enhalus acoroides* dan *Thalassia hemprichii* dengan *Halophila ovalis*, dimana percabangan ini juga memiliki nilai kepercayaan yang sangat tinggi yaitu 100 persen untuk ML dan NJ. Selain itu dapat dilihat bahwa spesies *Thalassia hemprichii* lebih dekat kekerabatannya dengan *Enhalus acoroides* dan memiliki nilai kepercayaan yang cukup tinggi yaitu 88 persen (ML) dan 97 persen (NJ). Menurut Lemey *et al.* (2009), secara keseluruhan nilai kepercayaan pada percabangan pohon filogeni yang dapat dipercaya menampilkan data akurat adalah nilai kepercayaan yang mendukung data lebih dari 70% atau 75%. Hal yang sebaliknya, jika nilai kepercayaan pada percabangan pohon filogeni dibawah 70% maka data tersebut tidak akurat dan dapat diabaikan.

Data pada jarak genetik gen *rbcl* (Tabel 7) juga menjelaskan bahwa jarak genetik paling dekat pada gen *rbcl* adalah spesies *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides* dengan jarak genetik sebesar 0,01 sehingga Gambar 15 menunjukkan bahwa metode NJ dan ML pada gen *rbcl* mengelompokkan *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides* pada percabangan yang sama. Berdasarkan gen *rbcl*, *Thalassia hemprichii* tidak berada pada satu percabangan dengan *Halophila ovalis* karena jarak genetiknya sebesar 0.028 sedangkan jarak genetik grup *Thalassia hemprichii* dengan *Enhalus acoroides* hanya sebesar 0.009.

4.7 Hubungan Kekerabatan Genetik antara Lamun Sampel dengan *Outgrup* (*Zostera marina*)

Outgrup yang dipilih pada penelitian ini adalah spesies lamun *Zostera marina* karena spesies ini berada pada famili yang berbeda dengan keseluruhan sekuens sampel penelitian. Spesies *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii* termasuk famili Hydrocharitaceae, *Cymodocea rotundata* termasuk famili Cymodoceaceae 'kompleks' sedangkan *Zostera marina* merupakan famili Zosteraceae. Hal yang serupa diungkapkan oleh Waycott *et al.* (2004), bahwa anggota dari famili Hydrocharitaceae mayoritas hidup pada ekosistem air tawar dengan hanya tiga spesies yang hidup pada ekosistem laut yaitu *Halophila*, *Enhalus*, dan *Thalassia*. Famili Cymodoceaceae 'kompleks' berdasarkan taksonomi klasik dahulu bernama Potamogetonaceae bersama dengan Ruppiaceae, Posidoniaceae, dan Zosteraceae. Namun, analisis molekuler yang terbaru menunjukkan sebuah garis evolusi independen sehingga disebut sebagai Cymodoceaceae 'kompleks'. Kategori 'kompleks' ini termasuk lima genus, empat genus diantaranya berada di daerah tropis yaitu *Cymodocea*, *Thalassodendron*, *Syringodium*, dan *Halodule*. Famili Zosteraceae, merupakan famili pada lamun dan memiliki satu spesies lamun yang paling terkenal yaitu *Zostera marina* (*eelgrass*). Lamun ini terdapat pada belahan bumi bagian utara, dapat pula tumbuh di Alaska yang dapat tertutup es pada musim tertentu.

Alasan yang lain adalah bahwa keempat spesies lamun penelitian merupakan spesies lamun tropis sedangkan *Zostera marina* merupakan spesies lamun daerah sedang hingga dingin. *Zostera marina* tersebar luas pada daerah lintang utara, ditemukan di wilayah Atlantik Utara dan Pasifik Utara serta daerah Mediterania dan Laut Hitam. *Zostera marina* juga tersebar

meluas ke daerah Arktik di Alaska, Kanada, Greenland, dan Eropa utara (IUCN, 2014). Dengan adanya perbedaan habitat ini menyebabkan cukup banyak perbedaan genetik yang dimiliki oleh *Zostera marina* dibandingkan dengan keempat spesies sampel penelitian.

Hubungan kekerabatan dari keempat spesies sampel penelitian dengan *outgroup* dari *Zostera marina* dapat dilihat pada Tabel Jarak Genetik dengan gen *matK* (Tabel 6) dan gen *rbcL* (Tabel 7). Kedua tabel tersebut mengungkapkan hal yang sama yakni spesies yang memiliki jarak genetik paling kecil dengan *Zostera marina* adalah *Cymodocea rotundata* dengan jarak genetik 0.16 untuk gen *matK* dan 0.07 untuk gen *rbcL*. Salah satu alasan mengapa *Cymodocea rotundata* memiliki hubungan kekerabatan genetik paling dekat dengan *Zostera marina* adalah karena pada klasifikasi lamun yang terdahulu, spesies *Cymodocea rotundata* dan *Zostera marina* digolongkan pada famili yang sama yaitu Potamogetonaceae. Hal ini didukung oleh data klasifikasi lamun menurut den Hartog (1970) dalam Kordi (2011), bahwa *Cymodocea rotundata* termasuk pada famili Potamogetonaceae dan sub famili Cymodoceoideae sedangkan *Zostera marina* juga termasuk pada famili Potamogetonaceae tetapi pada sub famili yang berbeda yaitu sub famili Zosteroideae.

4.8 Pengaruh Perbedaan Lokasi terhadap Spesies *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides adalah spesies lamun pada sampel dengan jumlah yang paling banyak dan dapat ditemukan di kedua lokasi sampling. Terdapat beberapa *site* pada satu sampel spesies *Enhalus acoroides* yang memiliki variasi basa. Adapun yang dimaksud dengan *site* adalah penunjuk letak suatu basa dalam sebuah urutan sekuens.

4.8.1 Analisis Polimorfik Site

Untuk mengetahui adanya perbedaan letak suatu basa dapat diketahui dengan melakukan analisis polimorfik *site*. Analisis polimorfik *site* bertujuan untuk mengetahui letak suatu *site* yang mengalami variasi (perubahan) dalam satu spesies yang sama. Adanya variasi basa tersebut menyebabkan sampel ini berbeda dengan sampel *Enhalus acoroides* lainnya. Analisis polimorfik *site* dengan gen *rbcl* tidak menghasilkan adanya polimorfik *site*, namun dengan gen *matK* menghasilkan adanya dua haplotipe pada spesies *Enhalus acoroides* dengan ID sampel IBRC.07.07.01. Tabel hasil analisis polimorfik *site* dapat dilihat pada Tabel 8 berikut ini.

Tabel 8. Hasil Analisis Polimorfik Site pada *Enhalus acoroides*

No.	Haplotipe	ID Sampel	Lokasi	Polimorfik Site (pada basa ke-)														
				102	103	112	307	348	350	398	524	548	571	704	789	791	816	
1	Hap 1	IBRC070936 <i>Enhalus acoroides</i>	Manyaifun	T	T	T	T	T	T	T	T	A	A	T	T	T	T	
2		IBRC070937 <i>Enhalus acoroides</i>	
3		IBRC070938 <i>Enhalus acoroides</i>	
4		IBRC070702 <i>Enhalus acoroides</i>	Manokwari
5		IBRC070801 <i>Enhalus acoroides</i>	
6		IBRC070802 <i>Enhalus acoroides</i>	
7	Hap 2	IBRC070701 <i>Enhalus acoroides</i>	Manokwari	G	C	G	G	C	C	G	C	C	C	C	C	C	G	

Keterangan :

- Simbol titik-titik pada kolom “Polimorfik *site*” menunjukkan basa yang terdapat pada kolom tersebut sama dengan basa yang terdapat pada kolom paling atas (IBRC070936 *Enhalus acoroides*).

Berdasarkan Tabel 8 terdapat dua haplotipe pada dua wilayah yang berbeda yaitu Manyaifun dan Manokwari. Pada haplotipe 1, terdapat enam individu *Enhalus acoroides* yang antar individu berbagi gen sehingga tidak terdapat variasi. Walaupun berada pada dua lokasi yang berbeda namun masuk pada haplotipe yang sama. Pada haplotipe 2, hanya terdapat satu individu *Enhalus acoroides* dengan ID sampel IBRC.07.07.01 dari Manokwari yang memiliki urutan basa berbeda dengan individu *Enhalus acoroides* lain pada lokasi yang sama. Hal ini dapat disebabkan karena individu tersebut

melakukan adaptasi dengan lingkungannya sehingga terjadi variasi urutan basa.

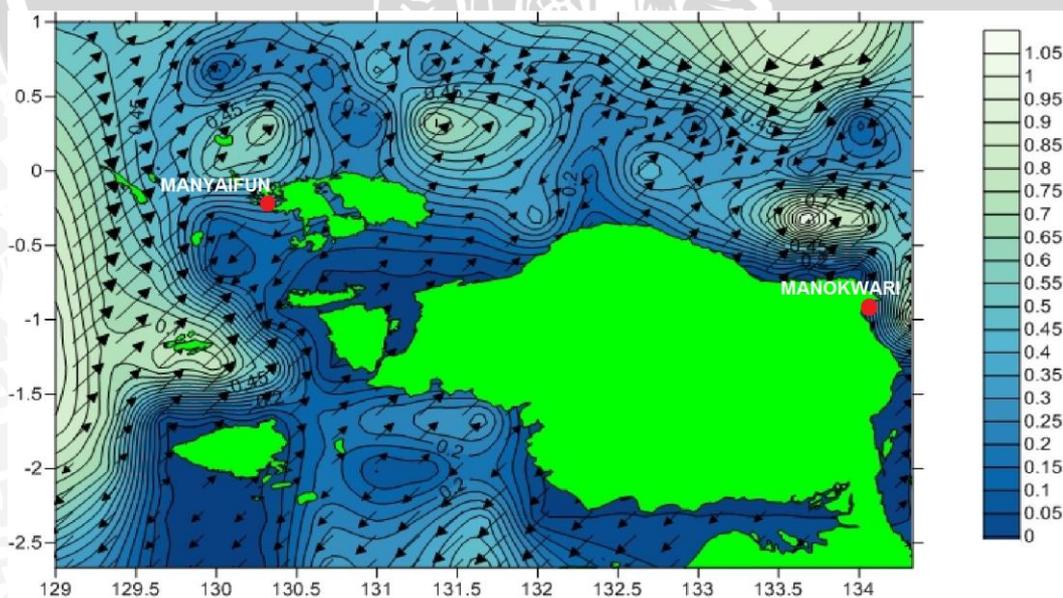
Pada Tabel 8 terdapat 14 polimorfik site dimana 7 atau setengah diantaranya merupakan transversasi yang dapat menyebabkan kemungkinan perubahan susunan asam amino yang lebih besar. Menurut Lemey *et al.* (2009), mutasi yang dapat terjadi pada sekuens DNA adalah transisi dan transversasi. Transisi adalah penggantian purin (A,G) dengan sesama purin atau penggantian pirimidin (C,T) dengan sesama pirimidin. Transversasi adalah penggantian purin menjadi pirimidin atau sebaliknya. Transversasi biasanya mengakibatkan kemungkinan perubahan protein yang lebih besar daripada transisi karena terdapat perubahan yang lebih drastis pada proses pembentukan asam amino. Terdapat empat kemungkinan kesalahan dalam transisi (A↔G, C↔T) dan delapan kemungkinan kesalahan dalam transversasi (A↔C, A↔T, G↔C, G↔T). Jika mutasi terjadi secara acak, kemungkinan kecacauan proses transversasi terjadi dua kali lipat lebih besar dibanding transisi.

4.8.2 Persebaran Benih *Enhalus acoroides*

Secara umum, hampir semua spesies lamun memiliki bunga yang terpisah antara individu jantan dan betina dengan demikian mengurangi kemungkinan untuk terjadinya *inbreeding*. Lamun juga dapat bereproduksi secara seksual yaitu dengan menghasilkan biji dan aseksual yaitu dengan rhizome. Menurut Waycott *et al.* (2004), *Enhalus acoroides* mempunyai tanaman jantan dan betina yang terpisah serta penyerbukannya yang terjadi pada permukaan air. *Enhalus acoroides* yang khususnya tumbuh di daerah Indo-Pasifik Barat menghasilkan bunga hingga membentuk biji pada kurun waktu bulan Februari sampai Juni setiap tahunnya. Lamun ini memiliki bunga jantan yang putih dengan tangkai yang pendek serta bunga betinanya

bertangkai panjang dengan kelopak kemerahan. Bunga jantan yang berukuran 2 cm akan tumbuh ke atas permukaan air dan terlihat seperti karet sintetis yang lembut. Bunga betina yang berukuran 2 cm juga tumbuh ke atas permukaan air dan pada batangnya membentuk sebuah mangkok yang berfungsi untuk menjebak bunga jantan sehingga serbuk dari bunga jantan akan keluar. Buah yang berukuran cukup besar (5-10 cm) akan terbentuk pada pangkal batang dengan tekstur yang berbulu sedikit tajam pada bagian luar. Buah berisi biji berukuran 10 mm yang berkecambah. Lamun *Enhalus acoroides* yang digunakan untuk penelitian ini diambil pada bulan Januari 2014 dari perairan Wosi dan Rendani, Manokwari, Papua Barat dan pada bulan Juli 2014 dari Pantai Timur Manyaifun, Papua Barat sehingga pada saat proses pengambilan, *Enhalus acoroides* sampel dalam keadaan tidak dalam masa produksi bunga atau tidak dalam masa penyerbukan.

Benih atau biji *Enhalus acoroides* diduga berpindah dari satu lokasi ke lokasi lainnya dengan bantuan arus. Pada Gambar 16 berikut ini ditampilkan peta pola arus pada tahun 2014 pada lokasi penelitian.



Gambar 16. Peta Arus di Wilayah Papua Barat Tahun 2014

Keterangan :

- Skala warna : kecepatan arus (m/s)
- Tanda panah : arah pergerakan arus
- Angka pada sumbu y : letak pada garis lintang ($^{\circ}$ LU dan $^{\circ}$ LS)
- Angka pada sumbu x : letak pada garis bujur ($^{\circ}$ BT)

Gambar 16 menjelaskan bahwa pergerakan arah arus adalah dari lokasi penelitian kedua yaitu dari Pantai Timur Manyafun yang berada di barat ke lokasi penelitian pertama yaitu perairan Wosi dan Rendani, Manokwari yang berada di timur. Pergerakan arah arus yang demikian dapat menyebabkan adanya aliran benih *Enhalus acoroides* dari daerah Manyafun ke daerah Manokwari, sehingga ada kemungkinan variasi genetik dari lamun di Manyafun dapat dimiliki oleh lamun di Manokwari. Namun, karena tidak ada arus yang bergerak dari Manokwari ke Manyafun maka tidak terjadi aliran benih antara kedua lokasi ini. Oleh karena itu, variasi genetik dari lamun di Manokwari tidak dimiliki oleh lamun di Manyafun. Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian bahwa terdapat satu sampel *Enhalus acoroides* yang memiliki variasi genetik yang berbeda dengan enam sampel *Enhalus acoroides* lainnya.

Bunga jantan dari *Enhalus acoroides* akan mengapung beberapa saat sebelum bertemu dengan bunga betina. Setelah terjadi pertemuan ini akan terbentuk buah yang selanjutnya akan berkecambah dan membentuk propagul. Hal ini pula yang dijelaskan oleh Lacap *et al.* (2002), bahwa *flowerlets* jantan yang mengambang dari *Enhalus acoroides* membawa serbuk sari dan akan menyebar di permukaan air dengan kecepatan rata-rata sekitar 13 km/hari dengan rentang daerah penyebaran sekitar 5 sampai 7 km saat air laut surut. Setelah bertemu dengan *flowerlets* betina dan membentuk buah maka buah dari *Enhalus acoroides* tersebut masih membutuhkan waktu



kurang lebih 7 hari untuk membentuk biji pada perairan yang tenang terutama di daerah laguna dan terlindung oleh karang.

Kemampuan atau daya apung dari propagul *Enhalus acoroides* akan sangat menentukan kemampuan persebaran benih *Enhalus acoroides* tersebut. Propagul yang terapung ini selanjutnya tenggelam sehingga dapat menancap kemudian tumbuh di substrat. Menurut Lacap *et al.* (2002), buah-buahan dan biji *Enhalus acoroides* terapung dengan kecepatan $0,26 \pm 0,02$ km/jam (rata-rata \pm standar error). Buah dan biji *Enhalus acoroides* yang berkembang menjadi propagul tersebut dapat terapung rata-rata sejauh 41 km. Pada 2 sampai 5 hari setelah daya apung hilang dan membentuk struktur bulu penahan propagul pada sedimen terbentuk. Jarak maksimum pergerakan propagul pada sedimen sebesar 204 cm dengan pergeseran rata-rata 10 hingga 29 cm/hari.

Jarak lokasi penelitian antara Manyafun dan Manokwari kurang lebih sejauh 500 km. Jika daya apung propagul *Enhalus acoroides* sebesar $0,26 \pm 0,02$ km/jam maka propagul tersebut dapat menempuh jarak 500 km kurang lebih selama 80 hari sedangkan kemampuan mengapung propagul *Enhalus acoroides* hanya 2 sampai 5 hari dengan jarak terjauh hanya 41 km. Maka pada setiap 41 km propagul tersebut akan tenggelam dan *Enhalus acoroides* baru akan tumbuh di substrat baru serta selanjutnya akan terus melakukan cara persebaran benih yang sama. Persebaran benih ini juga yang menyebabkan adanya perbedaan genetik dari *Enhalus acoroides* Manyafun dengan *Enhalus acoroides* Manokwari. Oleh karena itu, semakin jauh jarak lokasi pengambilan sampel *Enhalus acoroides* diduga akan semakin banyak pula perbedaan genetik yang dimiliki oleh lamun tersebut jika dibandingkan dengan sampel yang berjarak dekat.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Variasi DNA sampel lamun dengan gen *matK* menunjukkan bahwa panjang sekuens sebesar 817 bp, jumlah *variable sites* adalah 163 *site*, jumlah *conserved sites* adalah 654 *site*, persentase komposisi nukleotida A sebanyak 27-31%, T sebanyak 37-39%, G sebanyak 14-17%, dan C sebanyak 17-18%. Variasi DNA sampel lamun dengan gen *rbcL* menunjukkan bahwa panjang sekuens sebesar 549 bp, jumlah *variable sites* adalah 62 *site*, jumlah *conserved sites* adalah 487 *site*, persentase komposisi nukleotida A sebanyak 28-29%, T sebanyak 28-30%, G sebanyak 21-23%, dan C sebanyak 20-21%.
2. Kekerabatan genetik lamun dari Papua Barat terbagi menjadi dua kelompok besar yaitu famili Hydrocharitaceae dan Cymodoceaceae 'kompleks'. Gen *matK* menunjukkan *Thalassia hemprichii* lebih dekat dengan *Halophila ovalis* memiliki nilai kepercayaan dibawah 70% sedangkan gen *rbcL* menunjukkan *Thalassia hemprichii* lebih dekat dengan *Enhalus acoroides* memiliki nilai kepercayaan diatas 70%. Hasil yang lebih akurat adalah gen *rbcL* karena nilai kepercayaan diatas 70%.
3. Gen *rbcL* lebih efektif dalam analisis filogenetik pada level famili karena variasi genetik yang minim dan stabil serta dukungan dari nilai kepercayaan yang tinggi. Namun, gen *matK* lebih efektif dalam analisis filogenetik pada level genus dan spesies karena memiliki variasi genetik yang lebih tinggi.



5.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai kekerabatan genetik (filogeni) spesies lamun khususnya di Indonesia mengingat banyaknya spesies lamun yang tersedia. Lebih baik jika jenis lamun yang diteliti dapat ditambah sehingga akan diperoleh data mengenai analisa kekerabatan genetik yang lebih lengkap dan akurat.
2. Perlu ditambah lagi jenis gen yang jumlah variasi genetiknya mampu menganalisis kekerabatan diatas level genus atau famili sehingga hubungan filogenetik yang diperoleh akan lebih spesifik.



DAFTAR PUSTAKA

- Avise, John C. 2000. *Phylogeography : The History and Formation of Species*. United States of America : Harvard University Press.
- Azkab, M. Husni. 1999. Pedoman Inventarisasi Lamun. Oseana, Volume XXIV, Nomor 1, 1999 : 1 – 16.
- Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. 2013. Metabolit Sekunder Jalur Pembentukan dan Kegunaannya. <http://biogen.litbang.pertanian.go.id/index.php/2013/08/metabolit-sekunder-jalur-pembentukan-dan-kegunaannya/>. Diakses pada tanggal 3 November 2014 pukul 15.00 WIB.
- CBOL. 2008. *DNA Barcoding : A New Tool for Identifying Biological Specimens and Managing Species Diversity*. National Museum of Natural History. Smithsonian Institution Washington DC.
- COREMAP. 2014. Kondisi Geografis Raja Ampat. http://regional.coremap.or.id/raja_ampat/profil_kabupaten/deskripsi_wilayah/kondisi_geografis/ Diakses pada tanggal 5 Januari 2015 pukul 19.00 WIB.
- Dharmayanti, N. I. P. Indi. 2011. *Filogenetika Molekuler : Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor.
- Fatchiyah, Estri Laras A., Sri Widyarti, Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta : Erlangga.
- Ferita, I., Jamsari, I. Suliansyah, Gustian. 2012. Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir (Hunter) Roxb*). Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang.
- Hardani, Cynthia Asthari Kris. 2014. Identifikasi Lamun *Thalassia hemprichii* di Pantai Sendang Biru Kabupaten Malang menggunakan Teknik *DNA Barcoding*. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Hariyadi, Bambang, Harlis, Muswita, Mia Aina, Ali Sadikin. 2011. Pelatihan Penggunaan Gen Bank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dan Program MEGA 4.0 untuk Penelitian dan Peningkatan Pembelajaran Biologi di Sekolah dan Perguruan Tinggi. Jurnal Pengabdian pada Masyarakat No. 52 Tahun 2011.
- Hemminga, Marten A dan Carlos M. Duarte. 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press : United Kingdom.

- Holder, Mark dan Paul O. Lewis. 2003. *Phylogeny Estimation : Traditional and Bayesian Approach*. Department of Ecology and Evolutionary Biology, Connecticut, United States of America
- Hollingsworth, Peter M. 2007. *The Barcode of Life Initiative : Synopsis and Prospective Societal Impacts of DNA Barcoding of Fish*. Genomics Society, and Policy Vol. 3 No. 2 page 44-47.
- Ito, Y., N. Tanaka. 2011. *Hybridisation in a Tropical Seagrass Genus, Halodule (Cymodoceae), Inferred from Plastid and Nuclear DNA Phylogenies*. Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science, Tsukuba, Japan.
- IUCN. 2014. *The IUCN Red List of Threatened Species : Zostera marina*. <http://www.iucnredlist.org/details/153538/0>. Diakses pada tanggal 12 Mei 2015 pukul 23.00 WIB.
- Kemendagri. 2015. Profil Daerah Kabupaten Manokwari. <http://www.kemendagri.go.id/pages/profildaerah/kabupaten/id/92/name/pua-barat/detail/9202/manokwari>. Diakses tanggal 31 Maret 2015 pukul 17.00 WIB.
- Kim, Jung Sung dan Joo Hwan Kim. 2013. *Comparative Genome Analysis and Phylogenetic Relationship of Order Liliales Insight from the Complete Plastid Genome Sequences of Two Lilies (Lilium longiflorum and Alstroemeria aurea)*. Department of Life Science, Gacheon University, Seongnam, Gyeonggi-do, South Korea. *Journal of PLOS One*
- Kordi, M. Gufron. 2011. *Ekosistem Lamun (Seagrass) Fungsi, Potensi, dan Pengelolaan*. Jakarta : PT. Rineka Cipta.
- Kuo, John. 2007. *New Monoecious Seagrass of Halophila sulawesii (Hydrocharitaceae) from Indonesia*. *Aquatic Botany* 87 (2007) 171 – 175. University of Western Australia.
- Kusumasari, Andini, Ade Yamindago, Made Pharmawati. 2014. *Seagrass Identification Collected from Waters of Malang District and Lamongan District Using rbcL Gene (Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase) and matK Gene (Megakaryoctye-associated Tyrosine Kinase)*. Department of Marine Science. Malang : Brawijaya University.
- Lacap, Cristina Day A, J. E. Vermaat, R. N. Rollon, H. M. Nacorda. 2002. *Propagule Dispersal of the SE Asian Seagrasses Enhalus acoroides dan Thalassia hemprichii*. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 235 : 75-80.
- Lanyon, Janet. 1986. *Seagrasses of the Great Barrier Reef*. Queensland : Nadicprint Services.
- Lemey, Philippe, Marco Salemi, Anne Mieke Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook : A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. United States of America : Cambridge University Press.

- Lestari, Wenni Setyo. 2014. Hubungan Kekerabatan Paku Suplir Marga *Adiantum (Pteridaceae)* dari kepulauan Sunda Kecil, Indonesia berdasarkan Sekuen DNA Kloroplas Rbcl dan TRNL-F. Denpasar : Universitas Udayana.
- Lucas, Christina, Thirunavakkarasu Thangaradjou, and Jutta Papenbrock. 2012. *Development of a DNA Barcoding System for Seagrasses: Successful but not Simple*. *Journal of PLOS One* 7 (1) e29987.
- Maryanto, Ibnu, Joeni Setjio Rahajoe, dan Sasa Sofyan Munawar. 2013. *Bioresources untuk Pembangunan Ekonomi Hijau*. Jakarta : LIPI Press.
- Nakajima, Yuichi, Y. Matsuki, C. Lian, M. D. Fortes, W. H. Uy, W. L. Campos, M. Nakaoka, and K. Nadaoka. 2012. *Development of Novel Microsatellite Markers in a Tropical Seagrass, *Enhalus acoroides**. *Conservation Genet Resour* (2012) 4:515-517.
- Olsen, Jeanine L., Stam, Wytze T., dan Coyer, James A. 2004. *North Atlantic Phylogeography and Large-Scale Population Differentiation of the Seagrass *Zostera marina* L.* Department of Marine Biology, Centre of Ecological and Evolutionary Studies, University of Groningen, Netherlands. *Journal of Molecular Ecology* (2004) 13 : 1923-1941.
- Restu, M., Mukrimin, dan Gusmiaty. 2012. Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (*Toona sureni*) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*. Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Romimohtarto, Kasijan dan S. Juwana. 2005. *Biologi Laut : Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut*. Jakarta : Djambatan
- Seagrass Watch. 2014. *Tropical Seagrass Identification*. http://www.seagrasswatch.org/id_seagrass.html. Diakses pada tanggal 2 Mei 2015 pukul 17.00 WIB.
- Short, F., T. Carruthers, W. Dennison, M. Waycott. 2007. *Global Seagrass Distribution and Diversity : A Bioregional Model*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 350. (2007) : 3-20.
- Syafaruddin , E., Randriani, dan T. J Santoso. 2011. Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Jambu Mete. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri, Sukabumi. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. *MEGA 5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. *Journal of Molecular Biology Evolutionary* 28 (10) : 2731-2739.
- The Marine Life Information Network. 2008. Biodiversity and Conservation of Seagrass. <http://www.marlin.ac.uk/>. Diakses pada tanggal 2 Mei 2015 pukul 18.00 WIB.

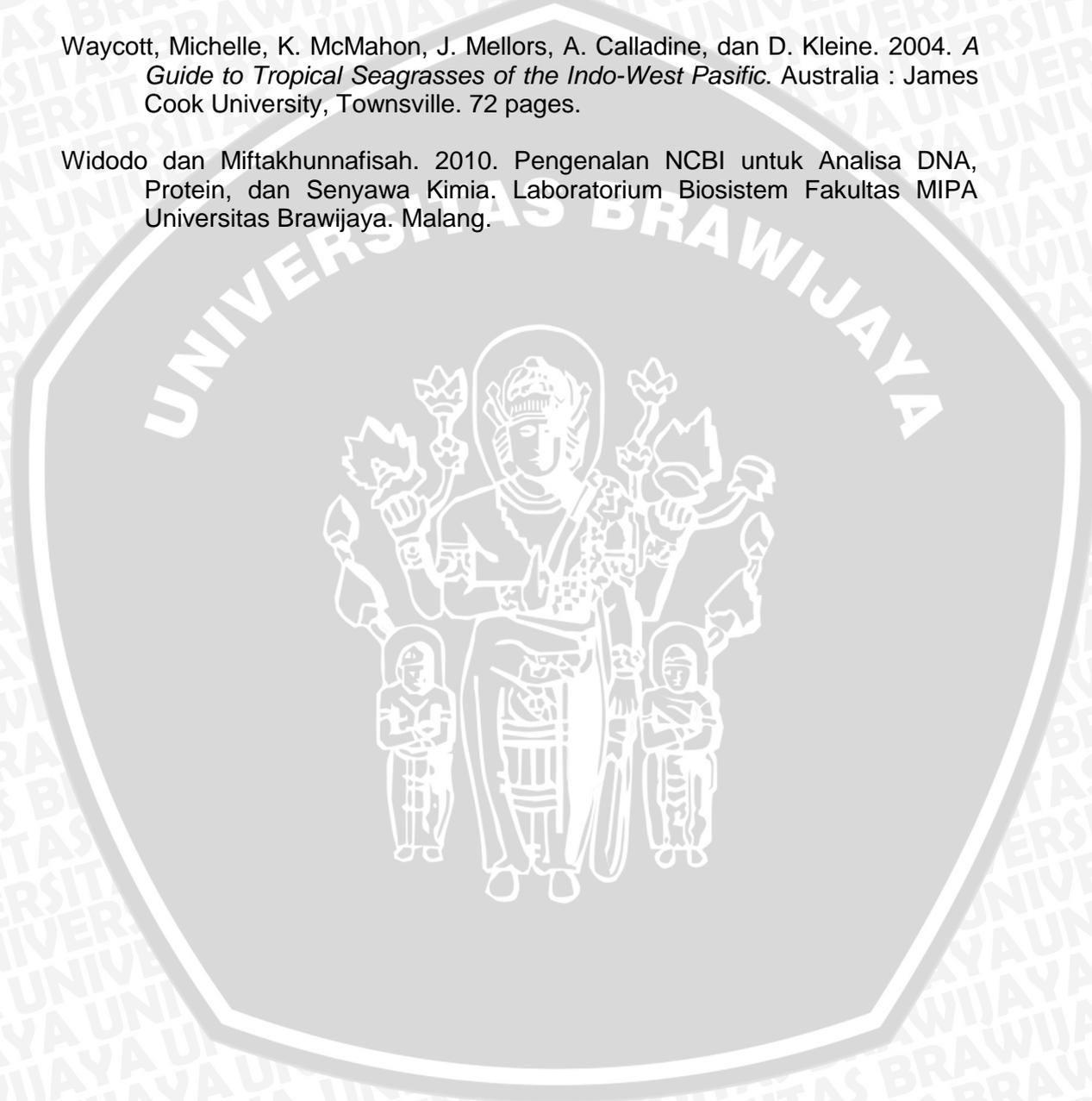
Toha, Abdul Hamid. 2001. *Deoxyribo Nucleic Acid*. Bandung : Alfabeta.

Vy, Nguyen Xuan, J. P. Bujang, J. Papenbrock. 2013. *Variability of Leaf Morphology and Marker Genes of Members of the Halophila Complex Collected in Viet Nam*. Aquatic Botany 110 (2013) 6-15.

Walker, Sharon Ph. D. 2013. *Menyingkap Tabir Bioteknologi Panduan Belajar Mandiri*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Waycott, Michelle, K. McMahon, J. Mellors, A. Calladine, dan D. Kleine. 2004. *A Guide to Tropical Seagrasses of the Indo-West Pasific*. Australia : James Cook University, Townsville. 72 pages.

Widodo dan Miftakhunnafisah. 2010. *Pengenalan NCBI untuk Analisa DNA, Protein, dan Senyawa Kimia*. Laboratorium Biosistem Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.

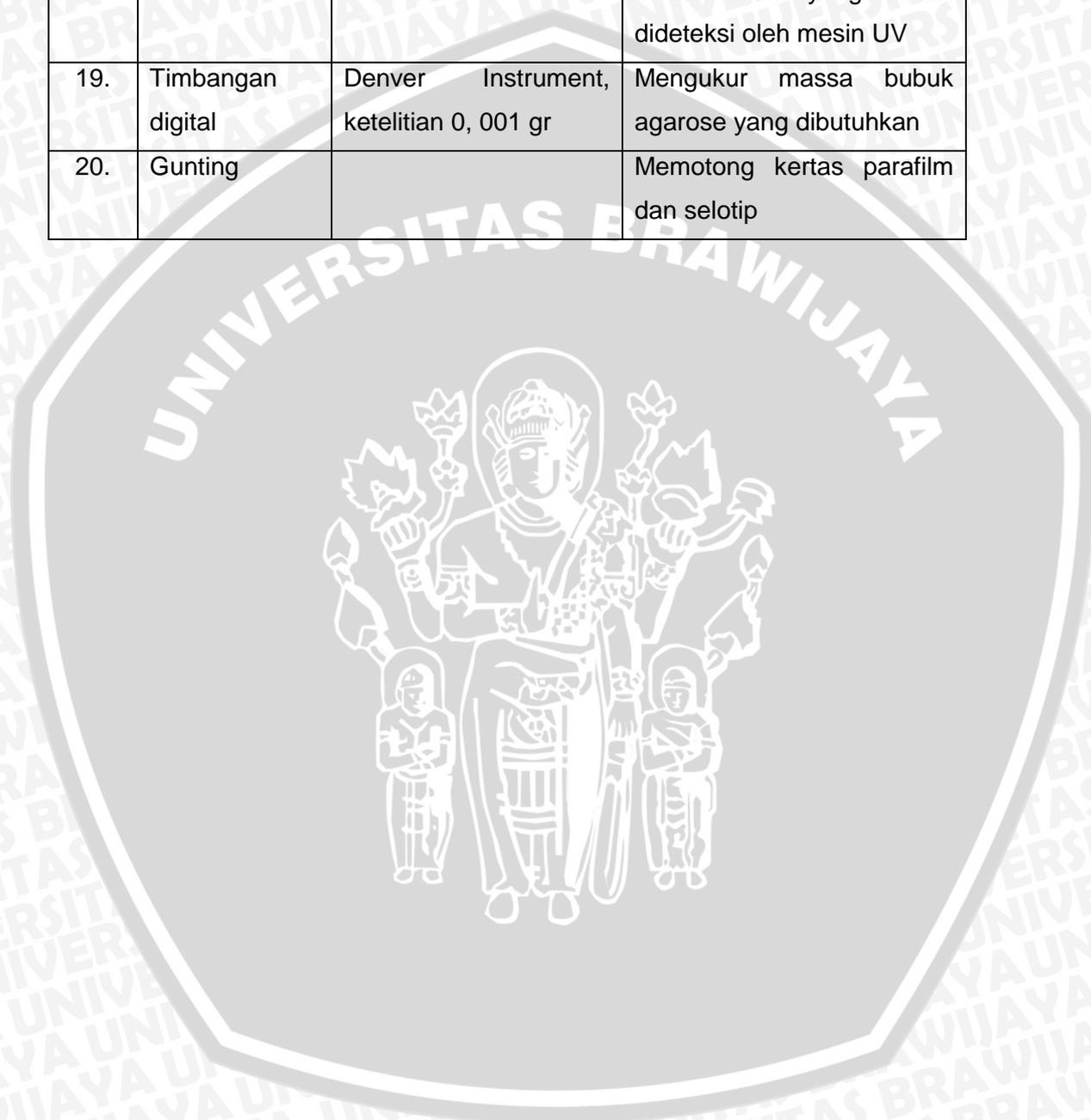


LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat - Alat Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Fungsi
1.	Pinset		Mengambil potongan sampel
2.	Nampan		Tempat alat dan bahan saat proses ekstraksi
3.	<i>Sprayer</i>		Tempat larutan bleach 10%
4.	<i>Heating block</i>	Fisher Scientific™ Isotemp™	Memanaskan sampel
5.	<i>Vortex</i>	Fisher Scientific	Menghomogenkan sampel secara mekanik
6.	Mikropipet	Eppendorf ukuran 2,5 µl; 10µl; 20µl; 100 µl; 200µl; dan 1000µl	Memindahkan berbagai larutan dengan volume tertentu
7.	Lemari pendingin	± 15 ⁰ C	Mendinginkan sampel hasil ekstraksi dan PCR
8.	Stopwatch	Fisher Scientific	Mengukur waktu
9.	<i>Centrifuge</i>	Eppendorf Microcentrifuge Model 5424R	Memisahkan DNA dari debris sel, memisahkan natan dan supernatan
10.	<i>Tray/Rak</i>		Tempat tube 1,5ml dan 0,6ml
11.	<i>Thermocycler</i>	MJ Mini 96 well	Mesin PCR
12.	Microwave	Sanyo, 300 ⁰ C	Melarutkan agarose
13.	<i>Gel Rig</i>	Thermo Scientific OWL D2	Alat untuk elektroforesis
14.	<i>Power Supply</i>	Thermo Scientific EC 300XL	Pengatur waktu dan tegangan listrik elektroforesis
15.	<i>Beaker glass</i>	Pyrex, 200 ml	Wadah etanol dan wadah menghomogenkan agarose

16.	Gelas ukur	Pyrex, 100 ml	Mengukur volume SB Buffer
17.	Mesin UV		Alat bantu mengamati gel hasil elektroforesis
18.	Kamera digital	Sony Digital Camera	Mengambil foto hasil elektroforesis yang sudah dideteksi oleh mesin UV
19.	Timbangan digital	Denver Instrument, ketelitian 0,001 gr	Mengukur massa bubuk agarose yang dibutuhkan
20.	Gunting		Memotong kertas parafilm dan selotip



Lampiran 2. Bahan – Bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Fungsi
1.	Plastik klipser		Menyimpan sampel daun lamun yang akan diujikan
2.	<i>Silica gel</i>		Menyerap air pada sampel
3.	Tisu		Mengusap permukaan daun lamun, membersihkan meja yang telah diberi larutan bleach
4.	Air tawar		Mencuci sampel dan menghilangkan epifit
5.	<i>Glove</i>	Evolution One™ Latex Gloves, Microflex®	Menghindari kontaminasi dan melindungi tangan
6.	<i>Worksheet</i> ekstraksi dan PCR		Pencatatan saat tahap ekstraksi dan PCR
7.	Larutan bleach 10%	Bayclin	Sterilisasi dan membersihkan meja
8.	<i>Tube</i>	Eppendorf, ukuran 1,5 ml dan 0,6 ml	Wadah sampel yang telah diekstraksi
9.	<i>Qiagen DNA Extraction Kit</i>	Buffer AP1, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer P3	Larutan pada proses ekstraksi
10.	RNase A	Qiagen Kit	Menonaktifkan RNA lamun
11.	<i>Pipet tips</i>	ExactaCruz™, 10 µl, 20 µl, 200 µl, dan 1000 µl	Membantu <i>micropipet</i> dalam mengambil berbagai larutan
12.	<i>QIAshredder spin column</i>	Qiagen Kit	Menyaring sisa debris sel daun lamun
13.	<i>Collection tube</i>	2 ml	Penampung <i>flow through</i> hasil ekstraksi
14.	<i>DNeasy mini spin column</i>	Qiagen Kit	Menyaring DNA hasil ekstraksi

15.	ddH ₂ O		Mengencerkan DNA
16.	KAPA <i>Ready Mix</i>	KAPA Biosystems	Sebagai larutan master mix yang berisi dNTPs, buffer, enzim, dan MgCl ₂
17.	Primer Gen <i>rbcl</i>	P610 (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC -3') dan P609 (5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG -3'), 10 mM	Penanda lokasi DNA yang mulai digandakan
18.	Primer Gen <i>matK</i>	P646 (5'-TAA TTT ACG ATC AAT TCA TTC-3') dan P647 (5'-GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG-3'), 10 mM	Penanda lokasi DNA yang mulai digandakan
19.	<i>Tube</i> PCR	Eppendorf, 1 strip 8 tube masing-masing 200 µl	Wadah larutan saat PCR berlangsung
20.	Bubuk agarose	GeneMate LE	Bahan pembuatan gel elektroforesis
21.	SB Buffer		Pelarut bubuk agarose
22.	EtBr (<i>Ethidium bromida</i>)		Pewarna gel agarose
23.	Selotip		Menempelkan kertas parafilm ke meja
24.	<i>Low DNA Mass Ladder</i>	Invitrogen, 4 µl/lane	Penanda berat molekul atau massa DNA
25.	Sampel lamun	<i>Cymodocea rotundata</i> , <i>Enhalus acoroides</i> , <i>Halophila ovalis</i> , <i>Thalassia hemprichii</i>	Sampel yang akan diidentifikasi secara molekuler

Lampiran 3. Foto Alat – Alat yang Digunakan



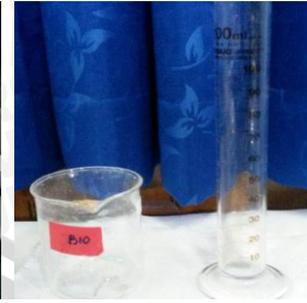
Pinset



Sprayer



Mikropipet



Beaker glass dan gelas ukur



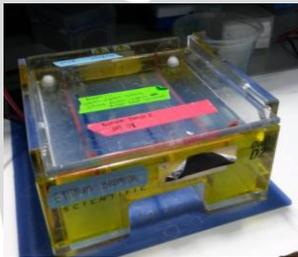
Heating block



Vortex



Power supply



Gel Rig



Thermocycler



Tray / Rak tube



Microwave



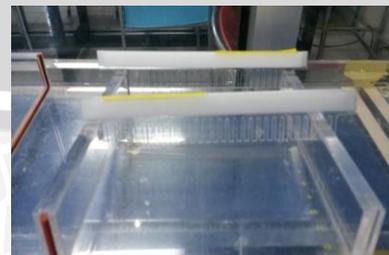
Centrifuge



Mesin UV



Timbangan digital



Cetakan Gel

Lampiran 4. Foto Bahan - Bahan yang Digunakan



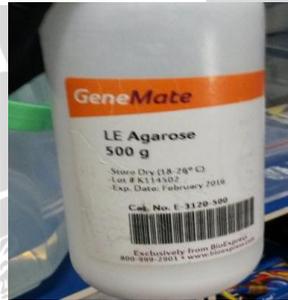
Sampel Lamun



RNase A



Tube eppendorf



Bubuk agarose



KAPA Ready Mix



DNeasy mini spin column



QIAshredder spin column



Collection tube



Buffer Ekstraksi



Tube PCR



EtBr



Kertas parafilm



Micropipet tips

Lampiran 5. Foto Kegiatan



Proses Ekstraksi



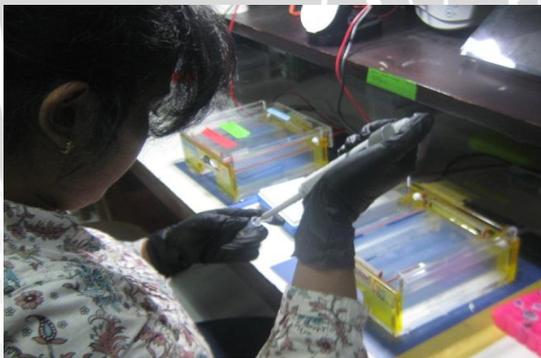
Ruang ekstraksi



Proses PCR



Ruang PCR



Proses elektroforesis



Ruang elektroforesis



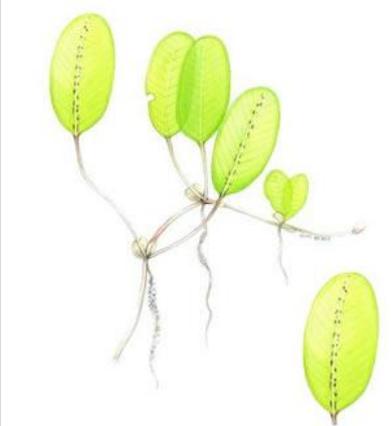
Persiapan *plate* pengiriman sekuens

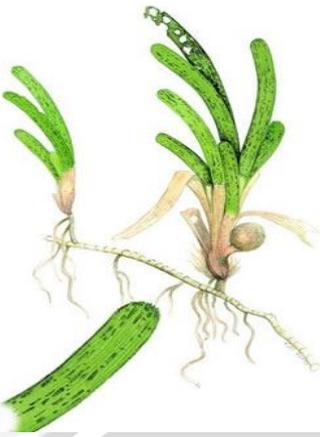
Lampiran 6. Daftar Sampel Lamun

NO.	ID	SPESES	LOKASI	SITE
1.	IBRC.07.09.36	<i>Enhalus acoroides</i>	Manyaifun	Pantai Timur
2.	IBRC.07.09.37	<i>Enhalus acoroides</i>	Manyaifun	Pantai Timur
3.	IBRC.07.09.38	<i>Enhalus acoroides</i>	Manyaifun	Pantai Timur
4.	IBRC.07.09.41	<i>Halophila ovalis</i>	Manyaifun	Pantai Timur
5.	IBRC.07.09.42	<i>Halophila ovalis</i>	Manyaifun	Pantai Timur
6.	IBRC.07.09.43	<i>Halophila ovalis</i>	Manyaifun	Pantai Timur
7.	IBRC.07.09.46	<i>Thalassia hemprichii</i>	Manyaifun	Pantai Timur
8.	IBRC.07.09.47	<i>Thalassia hemprichii</i>	Manyaifun	Pantai Timur
9.	IBRC.07.09.48	<i>Thalassia hemprichii</i>	Manyaifun	Pantai Timur
10.	IBRC.07.09.51	<i>Cymodocea rotundata</i>	Manyaifun	Pantai Timur
11.	IBRC.07.09.52	<i>Cymodocea rotundata</i>	Manyaifun	Pantai Timur
12.	IBRC.07.09.53	<i>Cymodocea rotundata</i>	Manyaifun	Pantai Timur
13.	IBRC.07.07.01	<i>Enhalus acoroides</i>	Manokwari	Rendani
14.	IBRC.07.07.02	<i>Enhalus acoroides</i>	Manokwari	Rendani
15.	IBRC.07.07.07	<i>Cymodocea rotundata</i>	Manokwari	Rendani
16.	IBRC.07.07.08	<i>Cymodocea rotundata</i>	Manokwari	Rendani
17.	IBRC.07.08.01	<i>Enhalus acoroides</i>	Manokwari	Wosi
18.	IBRC.07.08.02	<i>Enhalus acoroides</i>	Manokwari	Wosi



Lampiran 7. Identifikasi Morfologi Lamun

No.	Jenis Lamun	Morfologi
1.	 <p data-bbox="462 806 790 902"><i>Enhalus acoroides</i> (Seagrass Watch, 2015)</p>	<p data-bbox="810 347 1370 851">Menurut Kordi (2011) dan Waycott et al. (2004), <i>Enhalus acoroides</i> memiliki daun sebanyak 2 atau 4 helai yang ujungnya membulat, panjang daun 30-200 cm dan lebar 1,2-2 cm, serta buah berbentuk bulat telur berukuran 5-10 cm. Tepian daun menggulung ke dalam dengan diameter rhizoma 1,5 cm.</p>
2.	 <p data-bbox="462 1377 790 1473"><i>Halophila ovalis</i> (Seagrass Watch, 2015)</p>	<p data-bbox="810 922 1370 1624">Menurut Kordi (2011) dan Waycott et al. (2004), karakteristik spesies <i>Halophila ovalis</i> memiliki sepasang daun yang tumbuh dari rhizoma, tangkainya ramping berdiameter 1 mm dan panjang 0,4-8 cm yang berwarna merah muda. Daun-daun bundar telur (oval) berwarna hijau berukuran panjang 0,5-15 cm dan lebar 0,3-2,5 cm. Tulang daun sejajar berjumlah 4-25 buah dan memiliki garis tepi pada pinggir daun.</p>

<p>3.</p>	 <p><i>Thalassia hemprichii</i> (Seagrass Watch, 2015)</p>	<p>Menurut Kordi (2011), <i>Thalassia hemprichii</i> (dugong grass) tumbuh pada substrat dasar berpasir hingga pecahan karang dan sering menjadi spesies yang dominan pada suatu ekosistem padang lamun. Lamun ini memiliki daun dengan panjang 5-20 cm dan lebar 4-10 mm, tulang daun berjumlah 10-17 buah yang membujur.</p>
<p>4.</p>	 <p><i>Cymodocea rotundata</i> (Seagrass Watch, 2015)</p>	<p>Menurut Kordi (2011) dan Waycott et al. (2004), <i>Cymodocea rotundata</i> tumbuh pada habitat substrat yang berpasir, sedikit berlumpur, hingga pecahan karang. Jenis lamun ini memiliki daun dengan ukuran panjang 7-20 cm dan lebar 2-5 mm, ujung daun tumpul dan membulat. Tulang daun berjumlah 7-15 buah, dan daun berjumlah 2-7 helai.</p>
<p>5.</p>	 <p><i>Zostera marina</i> (Algae Base, 2015)</p>	<p>Menurut The Marine Life Information Network (2008), <i>Zostera marina</i> memiliki daun hijau tua yang panjang dan sempit. Panjang daun pada umumnya sekitar 20-50 cm (hingga 2 m), lebar 4-10 mm dengan ujung daun membulat. Lamun ini memiliki tulang daun berjumlah 5-11 buah.</p>

