

**ANALISIS STRUKTUR POPULASI IKAN TUNA MATA BESAR (*Thunnus
obesus*) YANG DIDARATKAN DI BALI, CILACAP DAN JAKARTA
MENGUNAKAN METODE *RESTRICTION FRAGMENT LENGTH
POLYMORPHISM (RFLP)***

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

Oleh:

LUH NYOMAN DIDIK TRI UTAMI

NIM. 125080602111003



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

ANALISIS STRUKTUR POPULASI IKAN TUNA MATA BESAR (*Thunnus obesus*) YANG DIDARATKAN DI BALI, CILACAP DAN JAKARTA MENGGUNAKAN METODE RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

**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:
LUH NYOMAN DIDIK TRI UTAMI
NIM. 125080602111003**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

HALAMAN PENGESAHAN

ANALISIS STRUKTUR POPULASI IKAN TUNA MATA BESAR (*Thunnus obesus*) YANG DIDARATKAN DI BALI, CILACAP DAN JAKARTA MENGGUNAKAN METODE RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Oleh :

LUH NYOMAN DIDIK TRI UTAMI

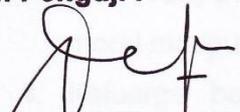
NIM. 125080602111003

Telah dipertahankan di depan penguji

Pada tanggal 28 April 2016

dan telah dinyatakan memenuhi syarat

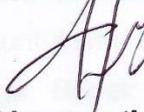
Dosen Penguji I



Defri Yona, S.Pi., M.Sc. Stud., D.Sc.
NIP. 19781229 200312 2 002

Tanggal : 13 MAY 2016

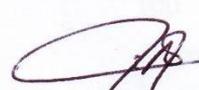
Menyetujui,
Dosen Pembimbing I



Feni Iranawati, S.Pi., M.Si., Ph.D.
NIP. 19740812 2003 12 2 001

Tanggal : 13 MAY 2016

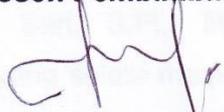
Dosen Penguji II



Muliawati, S.Pi., M.Si
NIP. 2013098810052001

Tanggal :

Dosen Pembimbing II



Syarifah Hikmah J. S., S.Pi., M.Sc
NIP. 19840720 201404 2 001

Tanggal : 13 MAY 2016

13 MAY 2016



Mengetahui
Ketua Jurusan



Dr. Ir. Daduk Setyohadi, MP.
NIP. 196303608 198703 1 003

Tanggal: 13 MAY 2016



ORISINALITAS SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Luh Nyoman Didik Tri Utami

NIM : 125080602111003

Judul Skripsi : Analisis Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) yang Didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta Menggunakan Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi ini penulis tulis berdasarkan hasil pemikiran dan pengalaman yang penulis lakukan serta bebas dari peniruan terhadap karya orang lain. Tulisan dan kutipan pendapat dari orang lain penulis tulis berdasarkan pada ketentuan penulisan ilmiah yang berlaku serta telah dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan atau terbukti ditemukan adanya plagiasi dalam skripsi ini, penulis bersedia menerima sanksi yang berlaku baik di Universitas Brawijaya ataupun di Indonesia.

Malang, 20 April 2016

Yang membuat pernyataan,

Luh Nyoman Didik Tri Utami

NIM.125080602111003

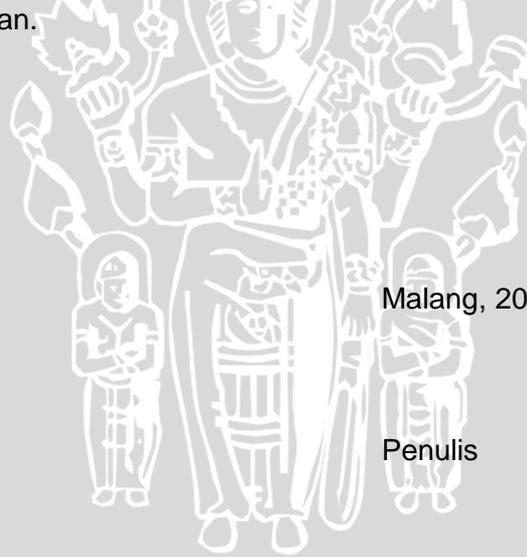
UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur penulis ucapkan seiring dengan selesainya skripsi yang berjudul “Analisis Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) yang Didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta Menggunakan Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)”. Dalam penulisan laporan ini, penulis mendapatkan bantuan dari berbagai pihak, oleh karenanya pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan termakasih kepada :

1. Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas anugerah-Nya telah memberikan perlindungan serta kesehatan kepada penulis sehingga laporan ini dapat terselesaikan.
2. Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) Tahun 2015 yang telah mendanai seluruh proses penelitian ini.
3. Orang tua penulis, Bapak I Wayan Sumertha, Ibu Ni Nyoman Sukartini, Bapak Made Urdaya dan Ibu Resini Suandari serta kakak perempuan penulis, Luh Putu Didik Dewi Pertami dan Luh Made Didik Dwi Wahyuni yang tiada henti memberikan dorongan baik secara moral maupun materiil selama menuntut ilmu di Universitas Brawijaya.
4. Keluarga besar penulis, Keluarga Bapak I Ketut Marya yang memberikan banyak informasi serta bantuan kepada penulis dalam menjalankan perkuliahan dan penelitian.
5. Ibu Feni Iranawati, S.Pi., M.Si, Ph.D selaku Dosen Pembimbing I dan Ibu Syarifah Hikmah Julinda Sari, S.Pi., M.Sc selaku Dosen Pembimbing II Skripsi penulis yang selalu memberikan pemasukan, bimbingan serta informasi yang sangat berarti dalam penyusunan skripsi.
6. Ibu Defri Yona, S.Pi., M.Sc. Stud., D.SC. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Muliawati, S.Pi., M.Si selaku Dosen Penguji II skripsi penulis yang memberikan bimbingan serta pembenahan dalam penyempurnaan skripsi ini.
7. Sahabat B4, Dhea Ayu Batamia, Ela Mustikawati dan Rainey Windayati yang telah menjadi penghibur, pengganggu, saudara,

penasihat, dan rekan yang selalu ada bagi penulis dalam semua kondisi.

8. Bapak Ade Yamindago, S.Kel., M.Sc., Mbak Cynthia Asthari Kris Hardani dan Mbak Ma'rufah yang telah memperkenalkan penulis pada bidang genetika kelautan.
9. Teman-teman Ilmu Kelautan 2012 (POSEIDON), kakak-kakak Ilmu Kelautan 2011 (MAGELHAEN'S), Ilmu Kelautan 2010 (MARCOPOLO) serta adik-adik Ilmu Kelautan 2013 (ATLANTIK) dan Ilmu Kelautan 2014 (KRAKEN) yang telah menjadi saudara kedua penulis selama merantau di Malang.
10. Keluarga besar tim asisten Biologi Laut Tropis-Zoologi (*Move and Unity*), Ekologi Laut Tropis (Ekola Bisa!), Oseanografi Kimia (Nitrat Fosfat Amonia Aye) serta Konservasi Sumberdaya Kelautan dan Perikanan (Biasa Lantai Lima) yang telah menjadi *partner* berbagi ilmu, belajar *team work*, belajar mengelola waktu dan memahami kebersamaan.



Malang, 20 April 2016

Penulis

RINGKASAN

LUH NYOMAN DIDIK TRI UTAMI. “Analisis Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) yang Didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta Menggunakan Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)” (dibawah bimbingan **FENI IRANAWATI** dan **SYARIFAH HIKMAH JULINDA SARI**).

Ikan tuna mata besar (*Thunnus obesus*) merupakan salah satu komoditas ekspor perikanan tertinggi di Indonesia. Namun hasil penangkapan ikan tuna mata besar di Samudera Hindia mengalami penurunan signifikan pada tahun 2003-2007 dan status ikan tuna mata besar saat ini adalah terancam (*vulnerable*). Data ini dapat menjadi indikasi telah terjadi *overfishing* pada ikan tuna mata besar dan dikhawatirkan penurunan jumlah stok akan terus berlanjut. Pendugaan stok ikan tuna mata besar sangat diperlukan untuk meningkatkan efektivitas pengelolaan perikanan dan konservasi dari spesies tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengklarifikasi stok ikan dengan akurat adalah analisis genetik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui struktur populasi dan menduga stok ikan tuna mata besar yang ditangkap di basis perikanan tuna mata besar di Indonesia (Bali, Cilacap dan Jakarta) menggunakan pendekatan filogenetik molekuler, sehingga pengelolaan ikan tuna mata besar di Indonesia dapat dilakukan dengan lebih tepat.

Sampel ikan tuna mata besar dikumpulkan dari Pelabuhan Benoa (Bali), Pelabuhan Perikanan Samudera Cilacap (Jawa Tengah), dan Pelabuhan Nizam Zachman (Jakarta) pada bulan Juli 2015. Metode analisis genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) pada lokus tujuan Sitokrom Oksidase I (COI) dengan menggunakan enzim restriksi *HaeIII*, *BamHI*, *HincII*, *RsaI*, *AluI* dan *XhoI*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan aplikasi PopGene32 versi 1.4.

Lokus COI pada ikan tuna mata besar dapat dipotong dengan variatif oleh dua enzim restriksi yaitu *HaeIII* dan *RsaI* yang masing-masing menghasilkan dua tipe alel. Keragaman genetik ikan tuna mata besar yang ditunjukkan dengan nilai heterozigositas menunjukkan bahwa dalam masing-masing populasi ikan tuna mata besar di ketiga lokasi penelitian bervariasi dengan nilai heterozigositas sebesar 5,3%. Nilai F-statistik juga menunjukkan bahwa antar populasi yang diteliti, secara genetik adalah bervariasi ($F_{ST} = 0,4375$).

Berdasarkan pada jarak genetik yang dimiliki, populasi ikan tuna mata besaryang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dibagi menjadi dua subpopulasi yaitu subpopulasi Bali-Cilacap (jarak genetik 0,0142) dan subpopulasi Jakarta (jarak genetik 0,1275 dengan populasi Bali). Perbedaan jarak genetik antar populasi yang memisahkan populasi ikan tuna mata besar Jakarta dapat diakibatkan karena suhu perairan yang berbeda di ketiga lokasi penelitian. Ikan tuna mata besar hidup pada daerah di bawah lapisan termoklin (150 m), suhu perairan pada kedalaman 150 m di perairan Bali dan Cilacap adalah sama (15-17°C), sedangkan di perairan Jakarta lebih dingin (12-15°C). Stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta terbagi menjadi dua yaitu stok Bali-Cilacap dan stok Jakarta.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang atas limpahan berkah-Nya, Laporan Skripsi yang berjudul “Analisis Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) yang Didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta Menggunakan Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)” dapat terselesaikan dengan baik dan tepat waktu. Pada Laporan Skripsi ini dibahas tentang struktur populasi dan pendugaan stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Pelabuhan Benoa (Bali), Pelabuhan Perikanan Samudera (Cilacap) dan Pelabuhan Nizam Zachman (Jakarta). Analisis struktur populasi dilakukan dengan menggunakan analisis genetik, metode *Restriction Fragment Length Polymorphism*. Data penelitian berupa susunan alel yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan bantuan aplikasi PopGene32. Hasil akhir dari penelitian ini adalah diketahuinya struktur populasi dan dugaan stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di ketiga lokasi penelitian.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa Laporan Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan untuk menyempurnakan isi dari laporan ini. Semoga tulisan ini bisa memberikan manfaat dan informasi baru bagi para pembaca.

Malang, 20 April 2016

Penulis

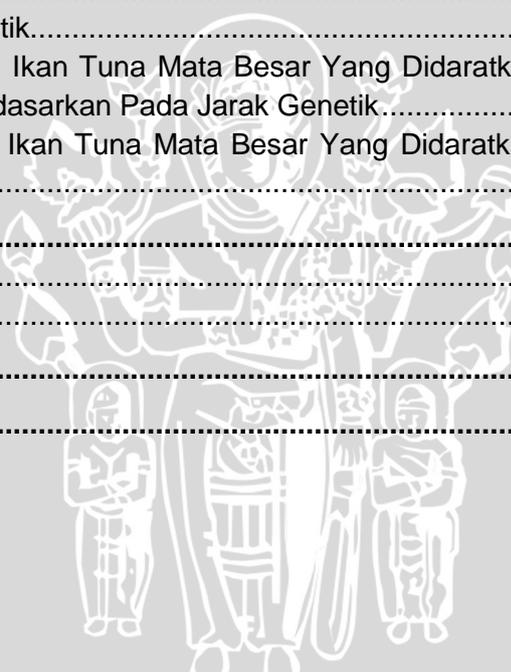
DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
ORISINALITAS SKRIPSI	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	iv
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Kegunaan.....	4
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ikan Tuna Mata Besar	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Tuna Mata Besar.....	6
2.1.2 Distribusi Ikan Tuna Mata Besar	7
2.2 Metode Analisis Struktur Populasi	9
2.3 Analisis Struktur Populasi Ikan Dengan Analisis Genetik.....	12
2.3.1 Filogenetik Molekuler	12
2.3.2 DNA Mitokondria (mtDNA)	13
2.4 Tahapan Identifikasi Molekuler	14
2.4.1 Ekstraksi DNA Metode <i>Chelex 10%</i>	14
2.4.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	15
2.4.3 Elektroforesis	15
2.5 Metode <i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	17
2.6 Penelitian Terdahulu	18
3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel	20
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.3 Alur Penelitian	21
3.4 Tahapan Penelitian	24

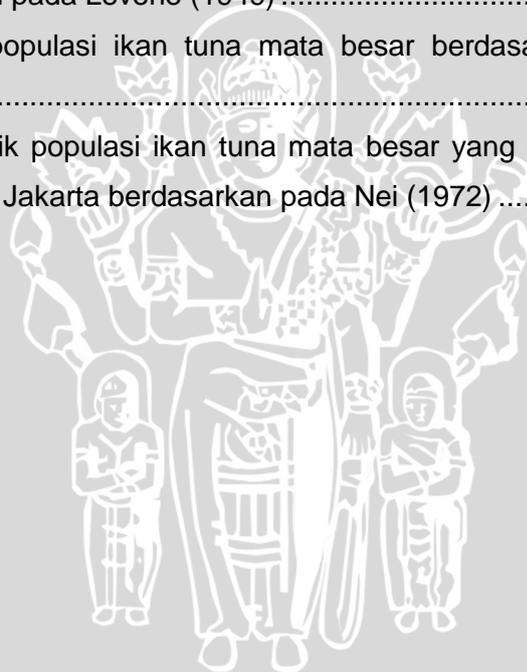


3.4.1 Identifikasi Morfologi	24
3.4.2 Pengambilan Sampel.....	25
3.4.3 Prosedur Ekstraksi DNA Sampel Dengan Metode <i>Chelex</i> 10%	26
3.4.4 Polymorphism Chain Reaction (PCR)	27
3.4.5 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	29
3.4.6 Analisis Data.....	30
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1 Amplifikasi mtDNA Lokus Sitokrom Oksidase I (COI) Ikan Tuna Mata Besar	34
4.2 Pola Pemotongan Enzim Restriksi pada Lokus Sitokrom Oksidase I (COI) Ikan Tuna Mata Besar	35
4.3 Keragaman Genetik Ikan Tuna Mata Besar Yang Di Daratkan Di Bali, Cilacap dan Jakarta	38
4.2.1 Frekuensi Alel.....	38
4.2.2 Heterozigositas.....	39
4.2.3 F-Statistik.....	41
4.2.4 Jarak Genetik.....	42
4.4 Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar Yang Didaratkan Di Bali, Cilacap dan Jakarta Berdasarkan Pada Jarak Genetik.....	43
4.5 Pendugaan Stok Ikan Tuna Mata Besar Yang Didaratkan Di Bali, Cilacap dan Jakarta.....	46
5. PENUTUP	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	50
DAFTAR LAMPIRAN	57



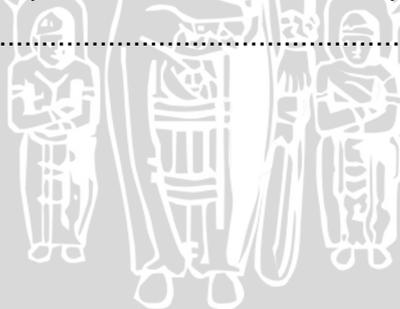
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Konsentrasi Enzim <i>HaeIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>RsaI</i> , <i>HincII</i> , <i>AluI</i> dan <i>XhoI</i> pada proses pemotongan <i>band</i> tunggal.....	29
Tabel 2. Hasil interpretasi pemotongan produk amplifikasi 770 bp dengan menggunakan enzim restriksi <i>BamHI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>RsaI</i> , <i>HincII</i> , <i>AluI</i> dan <i>XhoI</i>	37
Tabel 3. Frekuensi alel populasi ikan tuna mata besar masing-masing enzim .	38
Tabel 4. Nilai heterozigositas populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta pada masing-masing enzim restriksi berdasarkan pada Levene (1949).....	39
Tabel 5. F-Statistik populasi ikan tuna mata besar berdasarkan kepada Nei (1987).....	41
Tabel 6. Jarak genetik populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta berdasarkan pada Nei (1972).....	42



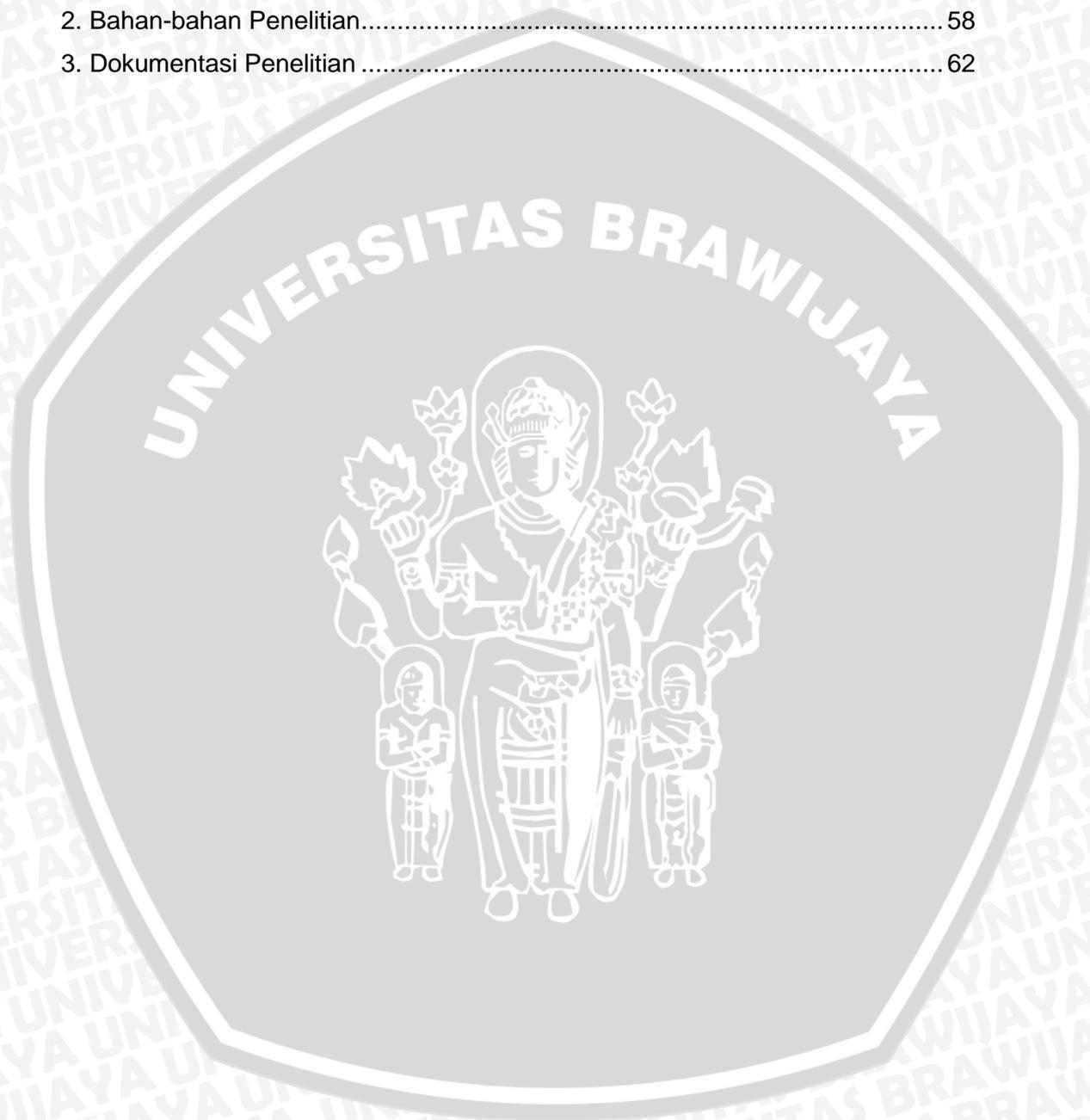
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Ikan tuna mata sesar (<i>Thunnus obesus</i>)	6
Gambar 2. Distribusi ikan tuna mata besar di dunia.....	9
Gambar 3. Lokasi pengambilan sampel ikan tuna mata besar	20
Gambar 4. Alur Penelitian Skripsi	23
Gambar 5. Morfologi ikan tuna mata besar	24
Gambar 6. Siklus PCR ikan tuna mata besar.....	28
Gambar 7. Amplifikasi mtDNA ikan tuna mata besar dengan M adalah marker 100 bp; 1-5 adalah populasi Bali; 6-10 adalah populasi Cilacap dan; 11-15 adalah populasi Jakarta.....	34
Gambar 8. Pemotongan fragmen DNA oleh enzim a). <i>BamHI</i> ; b). <i>HaeIII</i> ; c). <i>HincII</i> ; d). <i>RsaI</i> ; e). <i>AluI</i> dan; f). <i>XhoI</i> ; dengan M adalah marker 100 bp; dan U adalah uncut. 1-5 adalah populasi Bali; 6-10 adalah populasi Cilacap; 11-15 adalah populasi Jakarta	35
Gambar 9. Dendrogram struktur populasi ikan tuna mata besar yang di daratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dengan metode UPGMA (Nei 1972)	44
Gambar 10. Variabilitas suhu perairan Samudera Hindia pada kedalaman 150 m	45



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat-alat Penelitian.....	57
2. Bahan-bahan Penelitian.....	58
3. Dokumentasi Penelitian.....	62



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Wilayah laut Indonesia mencapai sekitar 73,1% dari seluruh wilayah Indonesia dengan garis pantai sepanjang 81.000 km yang merupakan garis pantai terpanjang kedua setelah Kanada (Gunawan, 2009). Dengan rasio perbandingan luas laut dan daratan yang sangat besar, laut Indonesia menyimpan banyak sumber daya alam baik yang dapat diperbaharui seperti perikanan maupun yang tidak dapat diperbaharui seperti minyak bumi dan gas. Salah satu komoditas perikanan yang memberikan kontribusi besar terhadap perekonomian Indonesia adalah perikanan tuna. Kelompok tuna besar yang ada di Indonesia meliputi madidihang atau tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*), tuna mata besar (*Thunnus obesus*), albakora (*Thunnus alalunga*) dan tuna sirip biru (*Thunnus maccoyi*) (Faizah, 2010). Perikanan tuna menjadi komoditas ekspor perikanan kedua di Indonesia yang telah menyumbangkan devisa sebesar US\$ 215,134 juta pada tahun 1998 yang meningkat sekitar 13,57% dari tahun 1997 (Yudiarosa, 2009).

Ikan tuna mata besar merupakan spesies penting dalam perikanan tuna di sepanjang Samudera Hindia (Fonteneau *et al.*, 2004) dan merupakan komoditas ekspor ikan tuna penting di Indonesia (Bahtiar *et al.*, 2013). Terhitung sebanyak 18,8% dari produksi ikan tuna mata besar dunia berasal dari Samudera Hindia. Menurut data Pengkajian Stok Ikan Perairan Indonesia, Samudera Hindia memiliki potensi perikanan yang tinggi yaitu sebesar 6.409 juta ton per tahun dengan potensi pemanfaatan sebesar 5.127 juta ton per tahun (Sibagariang *et al.*, 2011). Di Indonesia ikan tuna mata besar dapat dijumpai di

perairan selatan Jawa, barat daya Sumatera Selatan, Bali, Nusa Tenggara, Laut Banda dan Laut Maluku dengan basis perikanan terdapat di pelabuhan Benoa, Cilacap dan Jakarta (Faizah, 2010; Mertha *et al.*, 2004).

Berdasarkan pada data WWF (2011), total tangkapan ikan tuna dunia mengalami peningkatan dari 2,5 juta ton pada tahun 1986 menjadi 3,7 juta ton pada tahun 2003. Di Samudera Hindia terjadi peningkatan hasil tangkap ikan tuna mata besar dengan *longline* pada tahun 1980-an hingga akhir tahun 1990-an yaitu sebesar 40.000 ton hingga 100.000 ton. Hasil tangkapan tertinggi diperoleh pada tahun 1997 hingga tahun 1999 dengan jumlah hasil tangkapan berkisar antara 140.000-150.000 ton. Namun, pada tahun 2003-2007 terjadi penurunan jumlah hasil tangkap menjadi sekitar 96.200-12.700 ton (IOTC, 2008).

Kemerosotan produksi ini dapat menjadi indikator penurunan populasi atau telah terjadi *overfishing*. Bahkan saat ini, ikan tuna mata besar memiliki status terancam (*vulnerable*) berdasarkan kepada daftar merah IUCN. Pada masa mendatang dikhawatirkan penurunan stok ikan ini akan semakin besar, sehingga perlu dilakukan peningkatan efektivitas pengelolaan perikanan dan konservasi. Menurut Takagi *et al.* (1999), klarifikasi struktur stok ikan tuna mata besar dapat menjadi informasi yang sangat penting untuk pendugaan stok dan strategi pengelolaan yang tepat. Untuk mencegah terjadinya tangkap lebih pada spesies tersebut, perlu dilakukan analisis struktur populasi untuk menduga stok ikan tuna mata besar terutama di basis perikanan tuna mata besar Indonesia yaitu di Bali, Cilacap dan Jakarta (Suman *et al.*, 2013).

Menurut Pope (2010), ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk menyelesaikan struktur populasi ikan yaitu dinamika populasi, genetik, kelimpahan, densitas dan distribusi, usia dan ukuran, akuisisi, penyimpanan dan penggunaan energi serta kontaminan, penyakit dan parasit. Diantara metode penentuan struktur populasi yang ada, analisis genetik merupakan metode yang

paling akurat (Fauziyah, 2005). Analisis genetik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, salah satunya adalah metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Nugraha *et al.*, 2010).

Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* merupakan teknik molekuler yang sering digunakan untuk menentukan struktur populasi ikan (Martines dan Zardoya, 2005; Chiang *et al.*, 2008; Yanagimoto *et al.*, 2012; Bremmer *et al.*, 1998). Teknik PCR-RFLP memiliki kelebihan yaitu sederhana, akurat, relatif cepat dan murah dengan penggunaan alat dalam jumlah sedikit. RFLP didasarkan kepada pembuatan atau penghapusan daerah yang dikenali dari sebuah enzim restriksi endonuklease oleh variasi nukleotida dalam daerah polimorfik. Hal ini mengakibatkan hasil PCR yang mengandung polimorfik bila ditambahkan dengan enzim restriksi endonuklease akan menghasilkan pola yang terpisah bila divisualisasikan (Sharafi *et al.*, 2012). Teknik PCR-RFLP diharapkan dapat menjelaskan struktur populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta .

1.2 Perumusan Masalah

Ikan tuna mata besar merupakan spesies penting dalam perikanan tuna di Indonesia. Pertemuan dunia kedua mengenai ikan tuna mata besar telah menitik beratkan konsentrasi pada status stok ikan tuna mata besar karena aktifitas penangkapan. Hasil tangkapan ikan tuna mata besar mengalami penurunan yang signifikan pada tahun 2003-2007 yang mencapai 91,5%. Penurunan produksi ini dapat menjadi indikator penurunan populasi (*overfishing*). Untuk mencegah penurunan produksi secara berkelanjutan, diperlukan analisis struktur populasi untuk menduga stok ikan tuna mata besar di basis perikanan ikan tuna mata besar di Indonesia dengan menggunakan pendekatan filogenetik molekuler.

Berdasarkan pada uraian di atas, maka permasalahan yang ada dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah secara genetik ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta memiliki struktur populasi yang sama ?
2. Apakah ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta berasal dari stok yang sama ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui struktur populasi dan menduga stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di basis perikanan tuna mata besar di Indonesia (Bali, Cilacap dan Jakarta) menggunakan pendekatan filogenetik molekuler, sehingga dapat menjadi informasi untuk pengelolaan ikan tuna mata besar di Indonesia selanjutnya.

1.4 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan dan dimanfaatkan oleh :

1. Peneliti

Untuk meningkatkan kemampuan dan keterampilan dalam melakukan analisis struktur populasi ikan dengan analisis genetik pada suatu spesies

2. Masyarakat Akademis

Untuk menambah ilmu pengetahuan dan wawasan mengenai metode analisis struktur populasi ikan dengan analisis genetik serta dapat digunakan sebagai informasi untuk analisis struktur populasi ikan tuna mata besar di masa depan

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Pengambilan sampel jaringan ikan tuna mata besar dilakukan pada tanggal 25 Juni hingga 31 Juni 2015 di tiga lokasi yaitu di Pelabuhan Bena

(Bali), Pelabuhan Perikanan Samudera Cilacap (Jawa Tengah), dan Pelabuhan Nizam Zachman (Jakarta). Pengujian sampel dilakukan pada tanggal 12 Oktober hingga 12 November 2015 di Laboratorium Genetika dan Molekuler Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan pada tanggal 11 November hingga 3 Februari 2016 di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Tuna Mata Besar

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Tuna Mata Besar

Menurut Luwe (1839) dalam EOL (2015), klasifikasi ikan tuna mata besar adalah sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Superclass	: Gnathostomata
Class	: Osteichthyes
Subclass	: Actinopterygii
Suborder	: Scombroidei
Family	: Scombridae
Subfamily	: Scombrinae
Genus	: Thunnus
Species	: <i>Thunnus obesus</i>



Gambar 1. Ikan tuna mata sesar (*Thunnus obesus*)
(Sumber : Itano, 2005)

Karakteristik ikan tuna mata besar dapat dilihat dari ciri eksternalnya yaitu pada punggung berwarna hitam dengan garis berwarna biru metalik dan diikuti warna kuning di bawah garis tersebut. Pada bagian sisi bawah dan perut berwarna putih seperti mutiara. Sirip ekor (*cauda*) memiliki warna gelap (Itano, 2005). Ikan tuna mata besar memiliki bentuk tubuh yang memanjang serta *fusiform*. Ikan ini memiliki 2 sirip dorsal yang hampir terpisah, sirip pektoral yang agak panjang mencapai 110 cm serta ekor berbentuk *forked* dengan terdapat dua keel besar yang terpisah di dekat ekor (EOL, 2015).

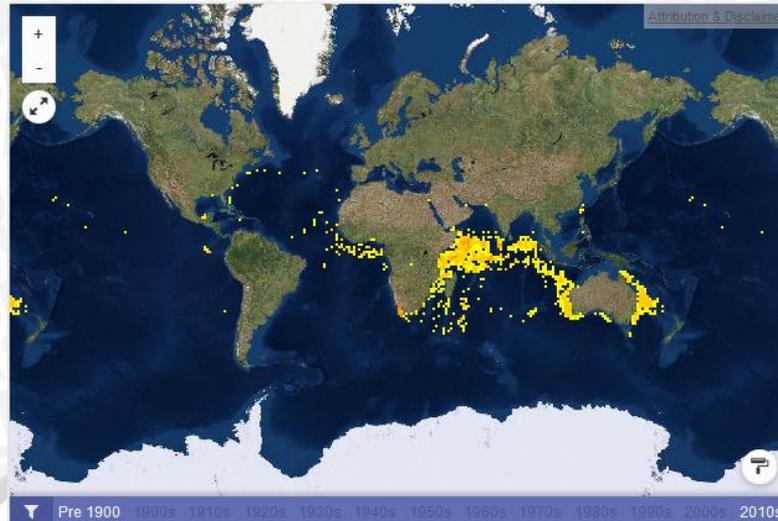
Ketika masih juvenil, tuna mata besar, albakora dan tuna sirip kuning sulit untuk dibedakan. Ikan tuna mata besar dewasa dengan berat 30 kg memiliki sirip dada yang hampir sama dengan sirip dada albakora dan tuna sirip kuning, namun ketika ikan telah dewasa masing-masing dapat dibedakan dari sirip punggungnya (Syarif *et al.*, 2010). Selain itu, ikan tuna mata besar juga dapat dikenali dari ukuran matanya yang lebih besar daripada ikan tuna lainnya. Ikan ini memiliki sirip pektoral yang cukup panjang serta memiliki warna kuning pada sirip dorsal dan anal (NSW, 2015).

2.1.2 Distribusi Ikan Tuna Mata Besar

Ikan tuna mata besar merupakan salah satu ikan epipelagis dan mesopelagis yang berukuran besar. Ikan ini dapat dijumpai pada permukaan laut hingga perairan kedalaman menengah dengan suhu berkisar antara 13⁰ sampai dengan 29⁰C. Meskipun demikian, konsentrasi terbanyak dari ikan jenis ini dijumpai pada daerah termoklin pada suhu antara 17⁰ sampai dengan 22⁰C. Suhu dan kedalaman lapisan termoklin menjadi faktor terpenting yang mempengaruhi distribusi vertikal dan horizontal dari ikan tuna mata besar (Bremer *et al.*, 1998; Maury, 2005).

Ikan tuna mata besar mampu melakukan migrasi baik secara vertikal maupun horizontal (Setiawati *et al.*, 2015). Secara horizontal, ikan tuna mata besar melakukan migrasi ke arah barat karena dipengaruhi oleh arus selatan ekuator (*South Equatorial Current*). Di Indonesia, secara horizontal air lautnya tidak mengalami variasi yang signifikan karena suhu air laut dipengaruhi oleh garis lintang, dimana daerah dengan lintang yang sama maka akan mendapatkan radiasi sinar matahari yang sama (Hartoko, 2010). Sebaran ikan tuna mata besar secara horizontal di Indonesia meliputi perairan selatan Sumatera, selatan Jawa, Bali, Nusa Tenggara Timur dan Laut Flores (Khotini, 2015). Secara vertikal, ikan tuna mata besar lebih memilih untuk berada pada daerah di bawah lapisan termoklin dan datang ke permukaan secara periodik (Brill *et al.*, 2005). Pergerakan vertikal ikan tuna mata besar mengikuti migrasi vertikal harian dari organisme nektonik kecil seperti krustacea, cephalopoda dan ikan kecil yang merupakan mangsanya (Grundin, 1989).

Pada saat menjelang matahari terbit dan saat matahari akan tenggelam pada sore hari, ikan tuna dijumpai di atas lapisan termoklin. Pada malam hari, gerombolan ikan tuna dapat dijumpai di antara lapisan permukaan dan lapisan termoklin (Dagorn *et al.*, 2000). Menurut Bahtiar *et al.* (2013), semua jenis tuna kecuali tuna mata besar tidak tertangkap oleh *longline* pada kedalaman 300 m. Hal ini menunjukkan bahwa ikan tuna mata besar memiliki *swimming layer* yang jauh dan mampu beradaptasi pada suhu rendah. Distribusi ikan tuna mata besar di dunia dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Distribusi ikan tuna mata besar di dunia
(Sumber : gbif.org)

Distribusi ikan tuna mata besar yang luas menyebabkan ikan ini melakukan adaptasi terhadap perubahan lingkungannya. Bentuk adaptasi ini memungkinkan terjadinya perubahan yang dapat diidentifikasi pada ikan baik dalam bentuk fenotif maupun genotip. Identifikasi juga dapat digunakan untuk menggambarkan hubungan antar individu ikan. Dua metode identifikasi yang tersedia hingga saat ini adalah identifikasi morfologi dan molekuler.

2.2 Metode Analisis Struktur Populasi

Populasi ikan didefinisikan sebagai grup atau individu dari spesies yang atau subspecies sama yang secara spasial, genetik atau demografi terpisah dari grup lainnya (Wells dan Rishmond, 1995). Menurut Pope (2010), populasi ikan dan stok ikan merupakan hal yang berbeda, dimana stok ikan merupakan bagian dari populasi ikan atau disebut sebagai subpopulasi. Analisis struktur populasi ikan untuk menduga stok ikan berguna untuk memberikan saran pada eksploitasi optimum dari sumberdaya perairan yang hidup seperti ikan dan udang. Sumberdaya perairan yang hidup merupakan sumberdaya yang terbatas namun dapat diperbaharui, pendugaan stok dapat menggambarkan tingkat eksploitasi

yang kemudian dapat memberikan nilai maksimum penangkapan oleh aktivitas perikanan (Sparre dan Venema, 1998).

Menurut Pope, (2010), ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengetahui struktur populasi ikan yaitu :

1. Dinamika Populasi

Dinamika populasi merupakan proses yang dapat mengubah kelimpahan atau biomassa dari populasi dan merupakan suatu subset dari parameter populasi. Estimasi dinamika populasi dapat mendukung wawasan yang lebih mendalam mengenai populasi ikan. Estimasi dinamika populasi dapat mengindikasikan bagaimana sebuah populasi dapat berada pada suatu daerah dan bagaimana populasi tersebut dapat berubah di masa depan.

2. Genetik

Analisis genetik dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies *cryptic*, menentukan suatu individu yang baru berpindah populasi atau telah melakukan perpindahan pada masa lalu, menunjukkan ukuran khas dari suatu populasi dan meramalkan evolusi yang dapat terjadi di masa depan pada suatu populasi. Analisis genetik dilakukan berdasarkan kepada penanda genetik yang dimiliki oleh suatu individu seperti ekspresi protein akibat perbedaan gen, perbedaan fragmen DNA atau variasi urutan pasangan basa.

3. Kelimpahan, densitas dan distribusi

Estimasi kelimpahan absolut memerlukan biaya yang mahal serta waktu yang lama dalam penentuannya, namun dapat dilakukan untuk populasi ikan yang memiliki nilai yang tinggi seperti ikan ekonomis penting atau ikan yang perlu dikonservasi. Estimasi kelimpahan ikan biasanya dilakukan dengan mengambil sampel dari beberapa daerah yang

dianggap dapat mewakili keseluruhan sistem, tetapi tidak adanya sampel secara acak yang dapat menjelaskan variasi spasial dalam kelimpahan ikan membatasi pendekatan ini. Distribusi dari spesies juga perlu dipahami sebelum melakukan estimasi kelimpahan. Penentuan distribusi dari populasi atau spesies berdasarkan kepada ada atau tidaknya suatu spesies dalam suatu daerah. Sampel yang terdistribusi secara acak dapat memberikan kesimpulan yang sangat baik mengenai distribusi suatu spesies, namun sampling biasanya hanya dilakukan pada daerah yang berpotensi didiami oleh spesies tersebut.

4. Usia dan ukuran

Indeks ukuran dan struktur usia ikan didasarkan kepada estimasi panjang, berat dan usia dari sampel acak individu ikan. Indeks ini cenderung menggambarkan gambaran statis dari suatu populasi, meskipun memungkinkan adanya dinamika dalam populasi.

5. Akuisisi, penyimpanan dan penggunaan energi

Beberapa indeks populasi ikan menggambarkan proses akuisisi dan penyimpanan energi. Salah satu indeks sederhananya adalah persentase ikan tanpa makanan di dalam lambungnya. Tingginya persentase perut yang kosong mengindikasikan akuisisi mangsa yang bermasalah dalam suatu populasi. Persentase isi lambung yang kosong juga dapat dipengaruhi oleh waktu sampling khususnya pada ikan tidak memangsa ikan secara terus menerus. Selain isi perut, populasi ikan dapat dibedakan berdasarkan penggunaan energinya. Populasi yang berbeda akan ditunjukkan dari bagaimana energi dialokasikan oleh populasi ikan.

6. Kontaminan, penyakit dan parasit

Populasi ikan dapat dikarakteristikan berdasarkan kepada status kesehatannya. Inspeksi individu ikan pada sampel acak dapat

memberikan data mengenai proporsi populasi dengan lesi, parasit atau anomali lainnya (Wilson *et al.*, 1996 dalam Pope, 2010). Menentukan proporsi sampel dengan anomali kesehatan dapat dilakukan dalam waktu yang singkat yang biasanya dilakukan hanya dengan inspeksi visual.

Diantara keenam metode penentuan struktur populasi ikan, metode analisis genetik merupakan metode yang paling akurat. Menurut MacLean dan Evans (1981), genetik merupakan suatu indikator kuat yang dapat menentukan terjadinya pemisahan populasi dalam satu spesies pada waktu yang relatif lama. Kelebihan lainnya dalam mengidentifikasi kelompok ikan dengan menggunakan analisis genetik adalah memerlukan waktu yang relatif singkat dengan hasil yang akurat (Fauziah, 2005).

2.3 Analisis Struktur Populasi Ikan Dengan Analisis Genetik

2.3.1 Filogenetik Molekuler

Filogenetik merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antar taksa baik berdasarkan kepada karakter morfologi maupun molekular. Filogenetik molekular dilakukan dengan menggunakan data urutan nukleotida suatu taksa (Willet *et al.*, 1997). Analisis filogenetik memberikan pengertian yang komprehensif mengenai asal dan evolusi dari suatu spesies. Hasil rekonstruksi filogenetik adalah sebuah pohon filogeni yang digunakan untuk menggambarkan kekerabatan antar taksa atau antar spesies yang ada dalam suatu pohon filogeni tersebut (Michu, 2007).

Dalam filogenetik molekuler, hubungan antar organisme atau gen diteliti dengan membandingkan homologi urutan DNA atau sekuens. Ketidaksamaan dalam urutan mengindikasikan adanya perbedaan genetik yang menghasilkan adanya evolusi molekuler dalam waktu tertentu. Dengan membandingkan homologi molekul dari organisme yang berbeda memungkinkan untuk

mendapatkan derajat persamaan atau menyatakan hubungan hirarki dari sebuah pohon filogenetik (Patwardhan, 2014). Filogenetik dengan menggunakan data molekular lebih unggul daripada data morfologi karena dapat membedakan taksa dengan karakteristik morfologi yang sulit diamati (Shearer dan Coffroth, 2008).

2.3.2 DNA Mitokondria (mtDNA)

DNA mitokondria sangat baik dalam menyelesaikan filogenetik hingga tingkat spesies (Patwardhan *et al.*, 2014). Pada mtDNA, pewarisan sifat dilakukan secara maternal tanpa adanya rekombinasi. Laju mutasi pada mtDNA yang tinggi menyebabkan mtDNA sering digunakan untuk menentukan keragaman genetik antar populasi dalam suatu spesies, menghubungkan evolusi di antara populasi serta melakukan rekonstruksi migrasi suatu populasi (Toha, 2001).

Menurut Beaumont *et al.* (2010), mtDNA pada hewan biasanya muncul dalam bentuk sirkular dengan panjang 16 kb. Genom mitokondria pada ikan mengandung 13 gen yang mengkode protein, 2 gen yang mengkode RNA (12S dan 16S rRNA), 22 gen yang mengkode molekul tRNA dan 1 gen yang tidak mengkode (*non-coding region*) yang berperan sebagai inisiasi dari daerah repliasi mtDNA dan transkripsi RNA. Daerah ini disebut sebagai daerah kontrol (*control region*). Menurut Pertiwi (2015), lokus mitokondria yang sering digunakan dalam penelitian meliputi *control-region* (d-loop), 16S dan COI. *Control region* atau *displacement loop* (d-loop) merupakan DNA mitokondria yang berfungsi sebagai titik awal replikasi atau area *non coding* pada genom dengan laju mutasi yang tinggi. 16S merupakan lokus dalam area *non-coding* mitokondria yang paling *conserved* dan berfungsi dalam mengkode RNA ribosom untuk proses translasi, sedangkan COI mengkode protein yang berperan dalam proses metabolisme. COI merupakan gen yang bersifat *conserved* yaitu tidak banyak

mengalami mutasi (Buckin *et al.*, 2011). Sifatnya yang cenderung tetap menyebabkan gen COI baik digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisa struktur populasi ikan.

Terdapat tiga tahapan utama dalam identifikasi molekuler yang dilakukan dengan menggunakan penanda molekuler seperti DNA mitokondria. Menurut Syafarudin *et al.* (2011) tahapan identifikasi molekuler meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi DNA (menggunakan teknik PCR) dan elektroforesis.

2.4 Tahapan Identifikasi Molekuler

2.4.1 Ekstraksi DNA Metode *Chelex* 10%

Ekstraksi dilakukan untuk memisahkan DNA dari organel sel lainnya. Menurut Toha (2001), terdapat tiga tahap utama dalam ekstraksi DNA yaitu penghancuran dinding sel yang kemudian dilanjutkan dengan pelisisian sel yang bertujuan untuk merusak membran inti. Tahap terakhir dalam ekstraksi DNA adalah membersihkan debris sel untuk memisahkan DNA dari protein dan komponen sel lainnya. Terdapat beberapa metode ekstraksi yang dapat dilakukan, namun teknik yang paling sederhana, murah, tidak berbahaya dan hanya memerlukan sedikit jaringan sampel adalah ekstraksi DNA metode *Chelex* 10% (Claire, 2015).

Chelex 10% terbuat dari campuran 10 gram resin *chelex* dan 100 ml ddH₂O. Resin *chelex* tersusun atas *Styrene divinylbenzene copolymers* dan *ion iminodiacetate* (IBRC, 2013). Pada metode ini, sel akan mengalami lisis ketika diberikan suhu dan tekanan osmotik yang tinggi. Pada *Chelex* 10% terdapat ion magnesium yang merupakan kofaktor penting bagi DNA-ase.. DNA-ase secara alamiah ada dalam jaringan tubuh makhluk hidup dan berperan untuk memotong untai DNA menjadi fragmen. Dalam melakukan proses PCR, DNA-ase harus dihilangkan untuk mencegah DNA mengalami pemotongan sebelum

diamplifikasi. Resin pada *chelex* berikatan dengan kation termasuk magnesium, sehingga resin dapat melindungi DNA dengan mencegah DNA-ase aktif (Barber, 2014).

2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teknik PCR (*Polymorphism Chain Reaction*) merupakan teknik amplifikasi DNA yang bertujuan untuk memperbanyak DNA sampel beberapa kali lipat hingga sekuens DNA tersebut dapat dianalisis (Walker, 2013). Metode amplifikasi DNA dengan teknik PCR hanya memerlukan urutan DNA yang sedikit dengan menggunakan primer oligonukleat spesifik dan Taq DNA polimerase (Walsh *et al.*, 1991).

Siklus PCR dilakukan dengan mengikuti siklus amplifikasi DNA yang ada pada tubuh makhluk hidup yang meliputi tahapan denaturasi, annealing dan ekstensi. Menurut Beaumont *et al.* (2010), secara umum tahapan denaturasi dilakukan pada suhu di atas 90°C untuk memisahkan utas ganda pada DNA *template*. Tahapan annealing pada primer dilakukan dengan menurunkan suhu secara cepat pada suhu annealing yang telah ditentukan, biasanya sekitar 55°C untuk menempelkan primer pada utas DNA yang telah terpisah. Tahap terakhir yaitu tahapan polimerisasi/ ekstensi dilakukan dengan meningkatkan suhu hingga mencapai 72°C, dimana pada suhu tersebut taq polimerase sudah tidak aktif sehingga menyebabkan terjadinya sintesis DNA baru dari daerah 3' pada primer. Pada umumnya, siklus utama pada PCR dilakukan pengulangan sebanyak 20-40 siklus dengan produk hasil PCR harus terdiri dari jumlah salinan target yang tinggi dan sejumlah kecil fragmen DNA asli.

2.4.3 Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan untuk memvisualisasikan keberadaan DNA pada sampel yang diamplifikasi dan untuk mengetahui panjang *band* DNA

yang didapatkan. Menurut Karcher (1995), elektroforesis didefinisikan sebagai perpindahan partikel di bawah pengaruh medan listrik. Secara umum, cara perpindahan partikel dalam medan listrik atau mobilitas partikel tergantung pada daya elektrostatis yang terjadi dalam partikel. Molekul asam nukleat dipisahkan berdasarkan ukurannya oleh medan listrik dimana molekul bermuatan negatif akan berpindah menuju kutup positif (anoda). Aliran migrasi ditentukan oleh berat molekul dimana molekul yang ringan akan berpindah lebih cepat daripada molekul yang lebih berat (Green dan Sambrook, 2001).

Dalam proses elektroforesis diperlukan media untuk perpindahan molekul DNA. Media ini berfungsi untuk mencegah terjadinya gangguan mekanis, konveksi selama proses elektroforesis berlangsung dan berperan sebagai saringan molekuler untuk memisahkan molekul berdasarkan pada ukurannya. Contoh media yang dapat digunakan yaitu zat tepung (kanji), poliakrilamida, agarose atau campuran dari agarose dan akrilamida. Media yang paling umum digunakan untuk proses elektroforesis adalah media gel agarose. Gel agarose memberikan banyak keuntungan diantaranya adalah asam nukleat tidak terkontaminasi bahan kimia karena proses pemisahannya yang berdasarkan ukuran, gel agarose dapat divisualisasikan dengan mudah (Yilmaz *et al.*, 2012), mampu untuk memecah fragmen DNA yang tidak bisa dipecahkan dengan menggunakan metode lainnya dan sederhana (Karcher, 1995). Untuk memvisualisasikan molekul asam nukleat dalam gel agarose, digunakan Ethidium Bromida (EtBr) yang dapat menyisip di antara untai ganda DNA dan dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 300 nm di bawah sinar UV.

Ada beberapa teknik molekuler yang dapat digunakan dalam identifikasi molekuler, salah satunya adalah *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Teknik RFLP dapat digunakan untuk analisis variasi genetik pada DNA

mitokondria dengan menghasilkan pola pita DNA yang bervariasi tergantung kepada jenis enzim restriksi serta urutan target DNA yang akan dianalisis.

2.5 Metode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Analisis PCR-RFLP adalah salah satu pendekatan yang dapat memeriksa keanekaragaman spesies pada tingkat molekular. Dalam metode ini, digunakan enzim restriksi tertentu untuk memotong DNA untai ganda pada daerah yang dikenali (daerah restriksi) oleh masing-masing enzim restriksi. Menurut Toha (2001), enzim restriksi bekerja dengan mengenali urutan basa nukleotida tertentu pada DNA kemudian memotong ikatan fosfodiester pada untai DNA tersebut. Pendekatan yang paling sederhana dari RFLP adalah pemetaan RFLP, dimana diharapkan terdapat perbedaan fragmen yang menunjukkan perbedaan daerah restriksi untuk masing-masing hasil amplifikasi. Ukuran fragmen restriksi merupakan atribut genetik yang stabil dan dapat digunakan sebagai cetak biru molekular untuk membedakan individu atau genotif dalam atau antar spesies (Martin *et al.*, 2004).

RFLP khususnya digunakan pada mtDNA karena memiliki molekul yang dapat diekstrak menjadi jumlah salinan yang banyak dari sebuah individu tanpa harus dilakukan kloning ataupun PCR. Data RFLP dari sampel populasi dalam dianalisis melalui dua cara. Pertama, semua pola fragmen yang berbeda pada gel dideteksi dan frekuensi masing-masing fragmen ditentukan. Data frekuensi RFLP ini dapat dibandingkan antar populasi. Kedua, data RFLP dapat dianalisis berdasarkan pada proporsi dari nukleotida yang berbeda antar individu. Data ini dapat digunakan untuk menunjukkan hubungan antar populasi, spesies atau taksa (Beaumont *et al.*, 2010).

2.6 Penelitian Terdahulu

Penentuan struktur populasi ikan tuna mata besar dari perairan Samudera Atlantik dan Indo-Pasifik dengan menggunakan metode PCR-RFLP pada DNA mitokondria telah dilakukan oleh Bremer *et al.* pada tahun 1998. Bagian kecil pada otot jantung ikan diambil untuk diekstraksi dan diamplifikasi menggunakan primer L15998-PRO dan CSBDH. Enzim yang digunakan untuk analisis PCR-RFLP meliputi enzim restriksi *AccI*, *MnII* dan *RsaI*.

Hasil analisis menunjukkan bahwa enzim *RsaI* merupakan enzim yang paling variatif dalam memotong pita DNA dibandingkan dengan enzim *AccI* dan *MnII*. Analisis PCR-RFLP juga menunjukkan terdapat 13 haplotipe yang ditemukan pada ikan tuna mata besar di perairan Samudera Atlantik dan Indo-Pasifik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sampel ikan tuna mata besar di perairan Samudera Atlantik Utara dan Selatan berbeda signifikan dengan sampel ikan dari perairan Samudera Hindia, Pasifik Utara dan Pasifik Selatan. Perbedaan yang tidak signifikan dijumpai sepanjang Samudera Hindia, Pasifik Utara dan Selatan atau antara sampel di Atlantik Utara dan Teluk Guinea.

Analisis struktur populasi ikan tuna mata besar di Samudera Hindia pada bagian perairan barat Sumatera dan selatan Jawa serta Nusa Tenggara dengan menggunakan metode PCR-RFLP juga pernah dilakukan oleh Suman *et al.* pada tahun 2013. Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong fragmen DNA ikan tuna mata besar adalah *Taq I* yang menghasilkan enam tipe restriksi, *Mbo I* yang menghasilkan dua tipe restriksi, *Rsa I* yang menghasilkan tiga tipe restriksi dan *Hin6 I* yang menghasilkan satu tipe restriksi.

Pemotongan produk PCR menggunakan enzim restriksi menghasilkan 12 komposisi haplotipe pada *D-loop region* DNA mitokondria dengan 10 komposisi termasuk ke dalam kelompok I (perairan selatan Jawa dan Nusa Tenggara) dan 8 komposisi berada pada kelompok II (perairan barat Sumatera). Jarak genetik

yang didapatkan antara kelompok I dan II adalah sebesar 0.0038. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa stok ikan tuna mata besar di Samudera Hindia terbagi menjadi dua sub populasi yaitu sub populasi di selatan Jawa dan Nusa Tenggara yang berasal dari Samudera Pasifik dan sub populasi barat Sumatera yang merupakan stok asli Samudera Hindia.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel jaringan ikan tuna mata besar dilakukan pada tiga lokasi yang merupakan basis perikanan ikan tuna mata besar di Indonesia. Lokasi pertama adalah Pelabuhan Benoa yang terletak di Jl. Pelabuhan Benoa, Desa Pedungan, Kecamatan Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Provinsi Bali. Lokasi kedua adalah Pelabuhan Perikanan Samudera Cilacap yang terletak di Jl. Lingkar Teluk Penyu No. 2 Cilacap, Provinsi Jawa Tengah. Lokasi terakhir pengambilan sampel adalah di Pelabuhan Nizam Zachman yang beralamat di Jl. Tuna Raya No. 1 Muara Baru Ujung, Desa Penjaringan, Kota Jakarta Utara, Provinsi DKI Jakarta (Gambar 3).



Gambar 3. Lokasi pengambilan sampel ikan tuna mata besar

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bunsen, *sprayer*, cawan petri, *tray tube*, *tray tip*, gelas ukur 100 ml, gunting, pinset, lemari pendingin, timbangan digital, mikropipet, *vortex mixer*, *waterbath*, *microwave*, mesin sentrifuse, *thermo cycler*, cetakan gel agarose, mesin elektroforesis, *gel documentation*, inkubator dan kamera digital (Lampiran 1 Alat-alat penelitian).

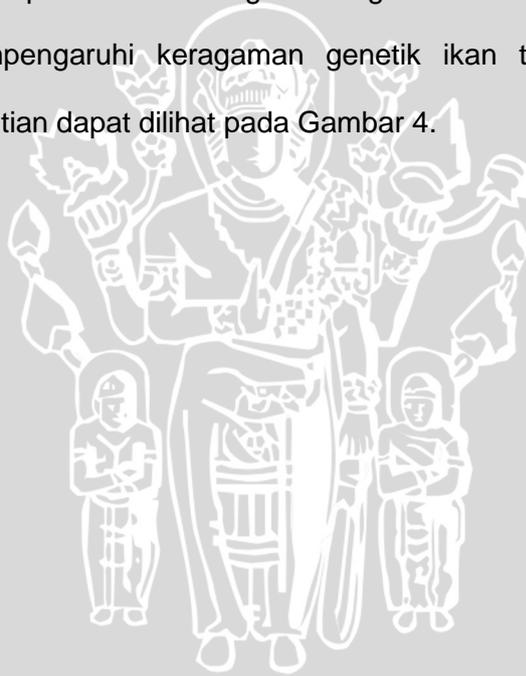
Bahan utama dari penelitian ini adalah sampel jaringan ikan tuna mata besar sebanyak 5 sampel dimasing-masing lokasi pendaratan ikan. Bahan pendukung antara lain adalah bahan pengambilan sampel (alkohol 96%), bahan ekstraksi (*chelex 10%*), bahan PCR (primer FBCH-FBCL, *PCR master mix DreamTaq*, produk ekstraksi dan ddH₂O), bahan elektroforesis (gel agarose, TBE buffer 4x, *aquabisestilata*, *Ethidium Bromida*, *DNA marker 100 bp*, *loading dye*, kertas parafilm), bahan RFLP (enzim restriksi *HaeIII*, *BamHI*, *RsaI*, *HincI*, *AluI* dan *XhoI*, *10X Buffer BamHI*, *10X Buffer R*, *10X Buffer Tanggo*, ddH₂O), *tube eppendorf 1,5 µl*, *tube eppendorf 0,6 µl*, *tube PCR*, ethanol 96%, tisu, spidol, tip putih, tip kuning, tip biru, kertas label *bleach 10%*, korek api dan sarung tangan (Lampiran 2 Bahan-bahan penelitian).

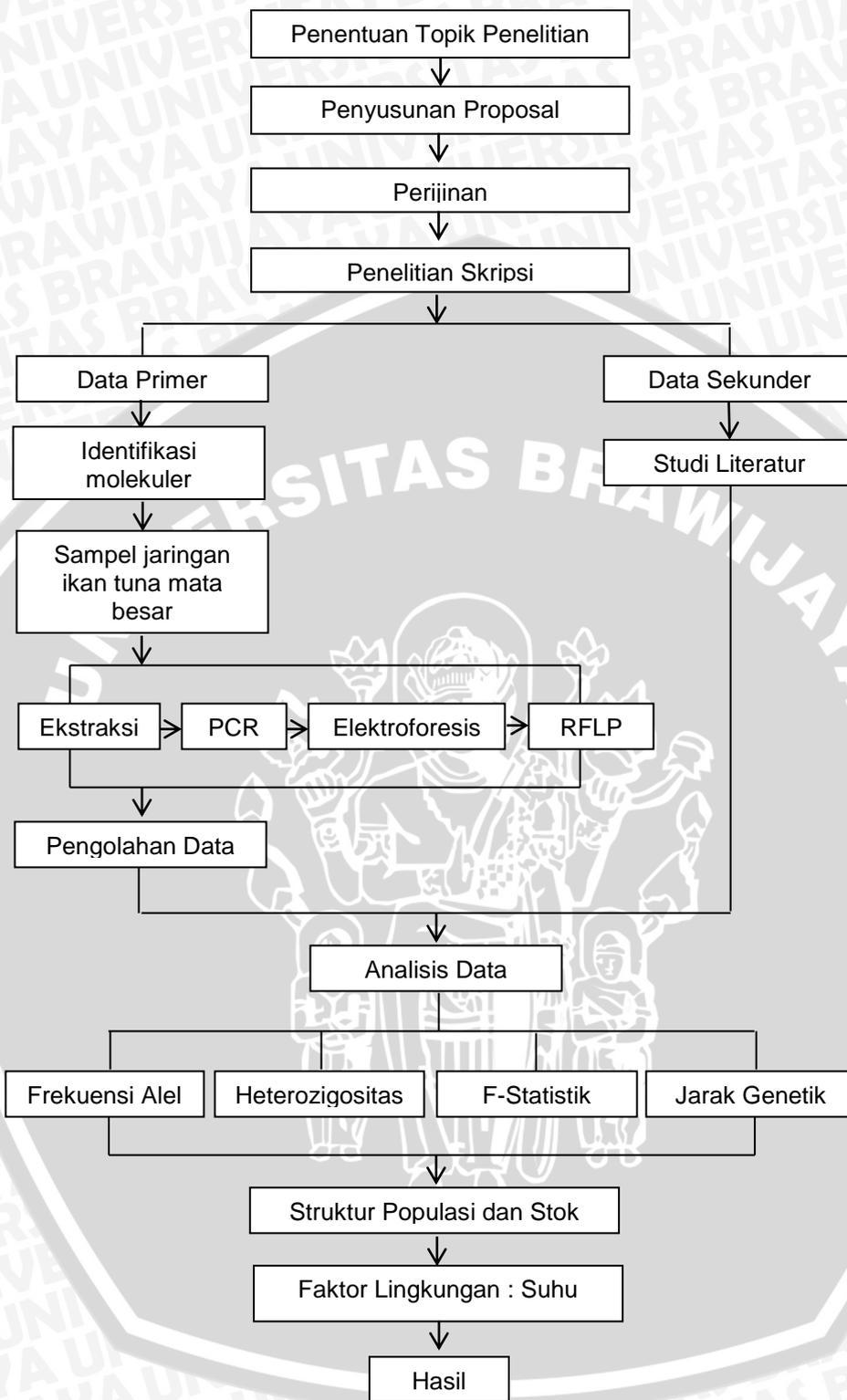
3.3 Alur Penelitian

Penelitian diawali dengan mengidentifikasi ikan tuna mata besar secara morfologi yang dilanjutkan dengan pengambilan materi utama penelitian yaitu sampel jaringan ikan tuna mata besar di Pelabuhan Benoa (Bali), Pelabuhan Perikanan Samudera (Cilacap) dan Pelabuhan Nizam Zachman (Jakarta). DNA mitokondria pada sampel diekstraksi dengan menggunakan metode *chelex 10%* yang kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi DNA untuk memperoleh dan memperbanyak lokus target yaitu lokus Sitokrom Oksidase I (COI). Keberhasilan proses amplifikasi dan visualisasi keberadaan *band* DNA dilakukan dengan

elektroforesis gel agarose 1,5%. *Band* DNA tunggal yang diperoleh, kemudian dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *BamHI*, *HaeIII*, *HincII*, *RsaI*, *AluI* dan *XhoI* berdasarkan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

Data yang diperoleh berupa alel-alel hasil proses RFLP diolah dengan menggunakan aplikasi PopGene32 sehingga diperoleh data lanjutan untuk dianalisis yaitu frekuensi alel, nilai heterozigositas, F-statistik dan jarak genetik. Data ini selanjutnya digunakan untuk menentukan struktur populasi dan stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta. Hasil berupa struktur populasi yang diperoleh dibandingkan dengan faktor lingkungan di lokasi penelitian yang mempengaruhi keragaman genetik ikan tuna mata besar. Sistematika alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.





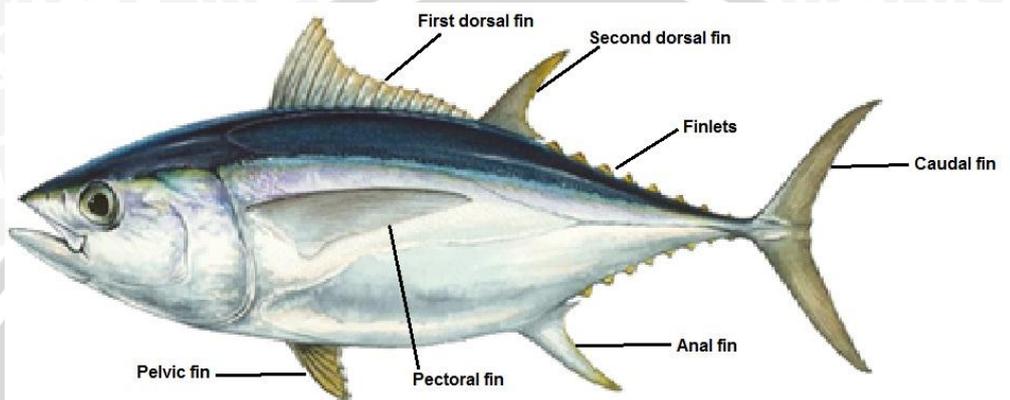
Gambar 4. Alur Penelitian Skripsi



3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Identifikasi Morfologi

Identifikasi morfologi ikan tuna mata besar dilakukan dengan menyesuaikan ikan yang dijumpai di lokasi penelitian dengan ciri-ciri morfologinya secara umum, yaitu sebagai berikut :



Gambar 5. Morfologi ikan tuna mata besar (Sumber: IGFA, 2016)

1. Kepala

Bagian kepala meliputi bagian ujung mulut terdepan hingga ujung belakang tutup insang. Bagian yang dapat diamati dari bagian kepala meliputi mulut, mata dan insang. Pada bagian mulut, ikan tuna mata besar memiliki mulut bagian bawah yang lebih panjang daripada mulut bagian atas (tipe superior). Pada bagian mata bila dibandingkan dengan ikan tuna lainnya, ikan tuna mata besar memiliki mata yang lebih besar. Selain itu, bagian kepala ikan tuna mata besar juga lebih besar, sehingga jarak ujung mulut depan menuju ujung insang belakang lebih besar dari tuna lainnya (Itano, 2005).

2. Bentuk dan Warna Tubuh

Bentuk tubuh yang dimiliki oleh ikan tuna mata besar adalah bentuk torpedo yang mendukung pergerakan yang cepat di perairan. Ikan ini memiliki warna keemasan hingga kekuningan pada bagian *mid-lateral*

yang tidak terlalu nampak, bada bagian atas dari *mid-lateral* dapat dilihat terdapat garis berwarna biru metalik cerah. Pada bagian punggung ikan memiliki warna hitam yang pekat. Pada bagian sirip, nampak terdapat warna kekuningan yang tidak terlalu jelas. Warna pada sirip anal berwarna perak, sedangkan pada sbagian sirip kaudal biasanya berwarna hitam (Itano, 2005).

3. Sirip

Ikan tuna mata besar memiliki dua sirip dorsal yang nampak sangat jelas terpisah. Sirip dorsal pertama dilengkapi dengan duri sebanyak 13-14 buah, sedangkan sirip dorsal yang kedua hanya tersusun atas bagian sirip yang lunak sebanyak 14-16 buah rangka sirip. Sirip analnya merupakan sirip lunak dengan jumlah rangka sebanyak 11-15 buah (IGFA, 2016). Sirip pektoral ikan ini lebih panjang daripada ikan tuna lainnya serta terdapat sirip pelvic di bagian bawah sirip pektoral (FAO, 2016). Finlet ikan tuna mata besar memiliki hitam pada bagian sisi terluar dan warna kekuningan di dalamnya (Itano, 2005).

Ikan tuna mata besar yang memiliki ciri-ciri sesuai dengan pemaparan di atas kemudian dipisahkan dengan ikan lainnya untuk diambil daging dan siripnya.

3.4.2 Pengambilan Sampel

Koleksi sampel dilakukan dengan mengambil jaringan ikan dari lima individu pada setiap lokasinya. Individu sampel yang dipilih merupakan individu yang memiliki anggota tubuh paling lengkap serta memiliki perbedaan morfologi seperti ukuran mata dan warna sirip yang nampak dibandingkan dengan individu lainnya. Sampel jaringan yang di ambil berasal dari bagian daging di balik katup insang ikan. Bagian ini dipilih karena bagian DNA yang terdapat pada daging

mudah untuk diekstraksi dan karena sampel ikan berasal dari ikan tuna mata besar yang akan di jual, sehingga pengambilan sampel dilakukan tanpa mengurangi nilai jual ikan.

Langkah pertama yang dilakukan dalam pengambilan sampel jaringan ikan tuna mata besar adalah menyiapkan alat dan bahan yang meliputi *tube eppendorf* 1,5 µl, gelas ukur 100 ml, gunting dan pinset yang telah di sterilkan serta alkohol 96%, kertas label dan tisu. Sampel pada bagian daging ikan pada bagian di balik katup insang diambil dengan ukuran kurang lebih 2 x 2 cm menggunakan pinset dan gunting. Sampel yang telah diambil, kemudian dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* 1,5 µl yang telah berisi alkohol 96% dan telah diberi label ID sampel. Pemberian ID sampel penting dilakukan untuk mencegah terjadinya pertukaran sampel. *Tube eppendorf* 1,5 µl yang telah berisi sampel jaringan ikan tuna mata besar lalu diletakkan dalam *coolbox* untuk memperlambat kerusakan pada sampel. Tahapan ini diulangi pada sampel ikan selanjutnya namun dengan terlebih dahulu mensterilkan pinset dan gunting menggunakan ethanol 96% agar tidak terjadi pencampuran DNA antar sampel. Setelah pengambilan sampel selesai, sampel dipindahkan dari *coolbox* ke dalam lemari pendingin bersuhu -80°C agar sampel jaringan tidak mudah rusak dan dapat digunakan dalam waktu yang lama.

3.4.3 Prosedur Ekstraksi DNA Sampel Dengan Metode *Chelex* 10%

Ekstraksi DNA ikan tuna mata besar dilakukan dengan menggunakan metode *chelex 10%* (Walsh *et al.*, 1991). Langkah pertama yang dilakukan dalam ekstraksi DNA pada ikan tuna mata besar adalah dengan memanaskan *waterbath* hingga mencapai suhu 95°C. Selanjutnya, *chelex 10%* yang tersimpan dalam *tube eppendorf* 0,6 µl diberikan label sesuai dengan ID sampel agar sampel tidak tertukar. Langkah selanjutnya adalah mengambil jaringan sampel

sebanyak ukuran ujung bulpoin dan memasukkannya ke dalam *tube* eppendorf yang telah berisi *chelex* 10% dengan menggunakan pinset dan gunting yang telah di sterilisasi. Jaringan sampel yang diambil hanya sedikit, dikarenakan ekstraksi metode *chelex* 10% hanya memerlukan sejumlah kecil jaringan sampel untuk dapat mengekstraksi DNA, bila jumlah jaringan sampel terlalu banyak maka dapat meningkatkan kontaminasi oleh protein. *Chelex* 10% yang telah berisi jaringan sampel kemudian di *vortex* selama 5-10 detik untuk menghomogenkan sampel dan *chelex* 10%. Untuk memisahkan antara natan dan supernatan, sampel dimasukkan ke dalam mesin sentrifuse selama 15 detik. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *waterbath* yang telah dipanaskan pada suhu 95°C selama 45 menit untuk melisiskan sel ikan tuna mata besar. Sampel dihomogenkan kembali dengan *vortex mixer* selama 5-10 detik, lalu disentrifuse selama 15 detik. Langkah terakhir, sampel disimpan pada lemari pendingin bersuhu -20°C agar *chelex* tidak mengalami kerusakan.

3.4.4 Polymorphism Chain Reaction (PCR)

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA ikan tuna adalah primer universal Fish BCH dan Fish BCL dengan lokus tujuan adalah lokus COI. Lokus COI dipilih sebagai lokus tujuan karena merupakan lokus yang *conserv*, sehingga tidak mudah berubah. Urutan primer FBCH sebagai primer *forward* adalah 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' sedangkan, urutan primer FBCL sebagai primer *reverse* adalah: 5'-TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC3' (Baldwin *et al.* 2009).

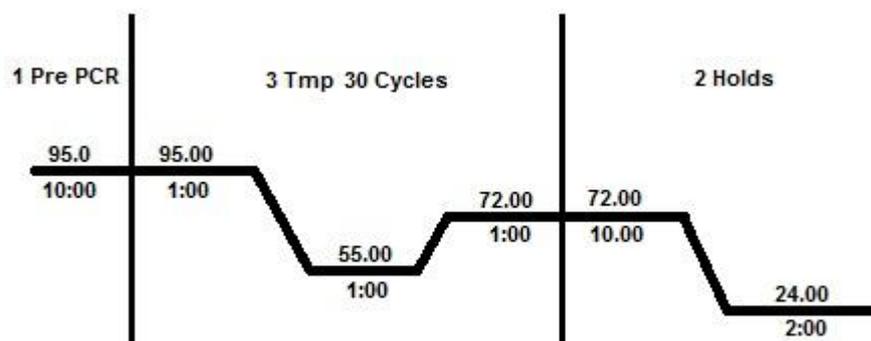
Tahap pertama dalam amplifikasi DNA adalah dengan mencampurkan DNA *template* hasil ekstraksi sebanyak 12 µl dengan 5 µl PCR *master mix* , 1 µl primer *forward*, 1 µl primer *reverse* dan 1 µl ddH₂O. PCR *master mix* merupakan

repository.ub.ac.id

campuran dari beberapa bahan yaitu Taq polimerase, dNTP, Buffer dan ion logam Mg^{2+} dan Cl^{2-} . Masing-masing bahan ini memiliki fungsi, sebagai berikut :

1. Taq polymerase merupakan enzim yang menempelkan nukleotida dengan dNTP
2. DNA *template* merupakan target DNA yang akan digandakan
3. Primer merupakan sepasang utas DNA tunggal (oligonukleatida) pendek yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai (polymerase DNA)
4. dNTP merupakan *building blok* (batu bata) penyusun DNA baru yang terdiri dari dATP, dCTP, dTTP, dGTP
5. Buffer sebagai penstabil enzim DNA polymerase dan pengoptimum reaksi
6. Ion logam berfungsi sebagai kofaktor (aktifator) bagi enzim DNA yaitu Mg^{2+} dan Cl^{2-}
7. ddH₂O berfungsi sebagai pengencer

Semua bahan dimasukkan ke dalam *tube* PCR dengan disertai proses *mixing* yaitu pencampuran larutan menggunakan mikropipet agar bahan tercampur. Untuk mengoptimalkan pencampuran antar bahan, dilakukan sentrifugasi terhadap campuran selama 15 detik. Campuran kemudian dimasukkan dalam mesin *thermo cycler* dengan siklus yang telah ditentukan (Gambar 6).



Gambar 6. Siklus PCR ikan tuna mata besar

Visualisasi keberhasilan amplifikasi dilakukan dengan melakukan elektroforesis terhadap sampel. Sampel di-*running* dalam *gel agarose* 1,5% selama 120 menit pada voltase 50 volt. Hasil *running* kemudian di visualisasikan di bawah sinar UV dengan menggunakan *gel doc*.

3.4.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Band tunggal yang didapatkan dari proses PCR kemudian dipotong dengan menggunakan enam jenis enzim restriksi yaitu *HaeIII*, *BamHI*, *RsaI*, *HincII*, *AluI* dan *XhoI*. Komposisi untuk masing-masing enzim dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi Enzim *HaeIII*, *BamHI*, *RsaI*, *HincII*, *AluI* dan *XhoI* pada proses pemotongan *band* tunggal

Bahan	Enzim <i>HaeIII</i>	Enzim <i>BamHI</i>	Enzim <i>RsaI</i>	Enzim <i>HincII</i>	Enzim <i>AluI</i>	Enzim <i>XhoI</i>
Produk hasil PCR	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
ddH ₂ O	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl	18 µl
10 X Buffer Tanggo	-	-	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
10 X Buffer <i>BamHI</i>	-	2 µl	-	-	-	-
10 X Buffer R	2 µl	-	-	-	-	-
Enzim restriksi	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Total Volume setiap <i>tube</i>	32 µl	32 µl	32 µl	32 µl	32 µl	32 µl

Hasil campuran kemudian disentrifugasi selama 15 detik lalu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 180 menit. Sampel kemudian dielektroforesis menggunakan *gel agarose* 1,5% dengan voltase 50 volt selama 120 menit. Untuk kontrol dilakukan dengan menggunakan produk hasil PCR yang tidak dipotong oleh enzim restriksi. Perpotongan *band* DNA divisualisasikan di bawah sinar UV pada *gel doc*.

3.4.6 Analisis Data

Hasil dari proses pemotongan *band* tunggal oleh enzim restriksi yang menghasilkan pola pemotongan yang berbeda diidentifikasi dengan huruf A, B, C, D dan E. Perhitungan statistik terkait dengan penentuan struktur populasi ikan tuna mata besar dilakukan dengan menggunakan bantuan *software* PopGene32 (Yeh *et al.*, 1999), diantaranya adalah sebagai berikut :

1. Frekuensi alel

Frekuensi alel digunakan untuk mengetahui perbandingan kehadiran suatu alel terhadap keseluruhan alel yang ada pada populasi. Frekuensi alel dalam suatu populasi dihitung berdasarkan kepada Nei dan Kumar (2000) sebagai berikut :

$$X_i = (2n_{ii} + \sum_{j \neq i} n_{ij}) / 2n$$

Dengan :

X_i = frekuensi alel ke- i

n_{ii} = jumlah sampel yang bergenotif ii (homozigot)

n_{ij} = jumlah sampel yang bergenotif ij (heterozigot)

n = jumlah sampel

2. Heterozigositas

Nilai heterozigositas digunakan untuk menyatakan tingkat keragaman genetik yang ada pada populasi. Nilai heterozigositas yang dihitung dalam penelitian ini meliputi nilai heterozigositas harapan, heterozigositas pengamatan dan rata-rata heterozigositas masing-masing lokus. Heterozigositas harapan merupakan gambaran alel heterozigot yang diharapkan berdasarkan pada hukum Hardy-Weinberg, sedangkan heterozigositas pengamatan merupakan gambaran dari sebagian alel yang ada di alam. Nilai heterozigositas harapan dan pengamatan dihitung berdasarkan pada Beaumont *et al.* 2010 sebagai berikut :

$$H_o = \sum_{i \neq j} \frac{n_{ij}}{n}$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^q x_i^2$$

Dengan :

H_o = heterozigositas pengamatan

n_{ij} = jumlah sampel yang bergenotif ij (heterozigot)

n = jumlah sampel

H_e = herozigositas harapan

X_i = frekuensi alel ke-i

q = jumlah alel

3. F-Statistik dan Aliran Gen

F-statistik (F_{ST}) yang digunakan untuk menjelaskan struktur genetik pada populasi dan tingkat perbedaan genetik antar populasi. Nilai F-statistik dihitung berdasarkan pada Nei (1987) dengan menggunakan data total heterozigositas harapan (diperoleh dari rata-rata frekuensi alel) dan rata-rata heterozigositas harapan masing-masing subpopulasi. F_{ST} dirumuskan sebagai berikut :

$$F_{ST} = H_T - H_S / H_T$$

Dengan :

F_{ST} = F statistik

H_T = total heterozigositas harapan seluruh populasi

H_S = rata-rata heterozigositas harapan subpopulasi

Aliran gen dihitung untuk mengetahui besaran tingkat gen yang sama pada masing-masing populasi yang diamati. Nilai aliran gen diestimasi berdasarkan pada Slatkin dan Barton (1989) dengan rumus sebagai berikut :

$$Nm = 0,25 (1 - F_{ST}) / F_{ST}$$

Dengan :

Nm = aliran gen

F_{ST} = F statistik

4. Jarak genetik

Jarak genetik merupakan pengukuran perbedaan genetik secara kuantitatif antar populasi, mulai dari urutan DNA, individu hingga taksa (Presciuttini, 2014). Perhitungan jarak genetik baik digunakan untuk mengetahui selisih genetik baik dalam populasi maupun antar populasi.

Nilai jarak genetik yang kecil menunjukkan hubungan genetik yang dekat sedangkan, jarak genetik yang besar menunjukkan hubungan genetik yang jauh. Nilai jarak genetik diperoleh melalui perhitungan berdasarkan pada Nei (1987) sebagai berikut :

$$D_m = \frac{1}{2R} \sum_{j=1}^R \sum_{i=1}^{l_j} (X_{ij} - Y_{ij})^2$$

Dengan :

D_m = jarak genetik

R = jumlah lokus dalam genom

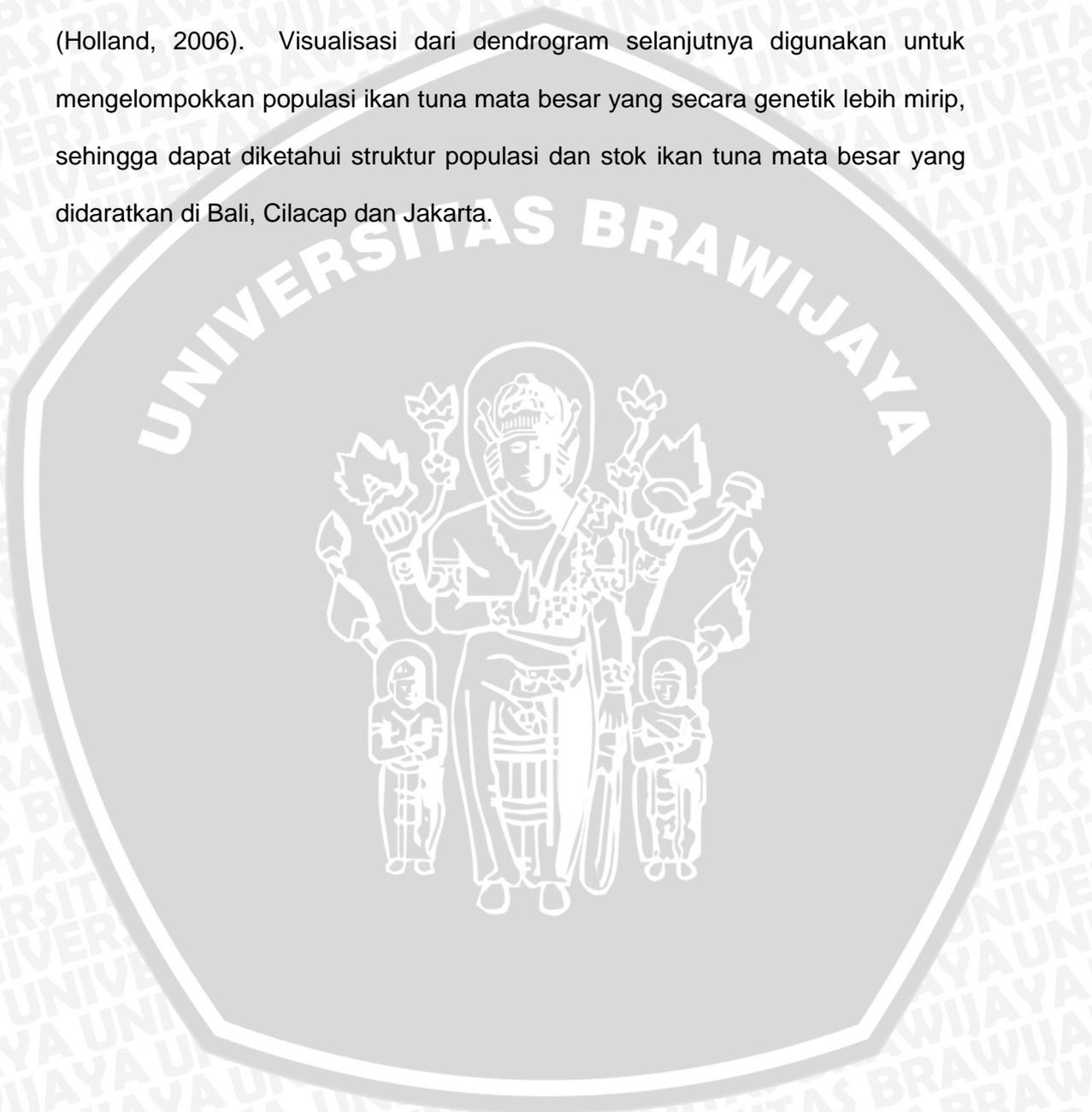
l_j = jumlah alel dalam lokus j

X_{ij} = frekuensi alel i pada lokus j dalam populasi X

Y_{ij} = frekuensi alel i pada lokus j dalam populasi Y

Tahap akhir dalam analisis data menggunakan aplikasi PopGene32 adalah pengelompokan (*clustering*) masing-masing populasi berdasarkan kesamaan genetik yang dimiliki. Metode *clustering* yang digunakan pada penelitian ini adalah metode UPGMA (*Unweighted Pairs Group Method With Arithmetic Averages*). Menurut Loewenstein *et al.* 2008, metode UPGMA merupakan metode yang digunakan untuk memahami pohon kekerabatan yang

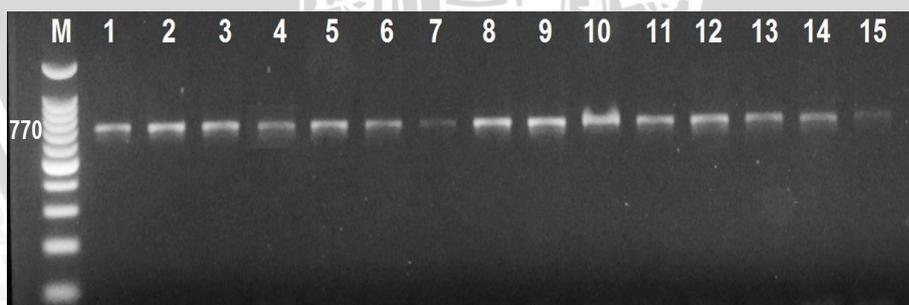
dihasilkan dari proses evolusi molekuler. Hasil dari pengelompokan dengan metode UPGMA akan menghasilkan dendrogram yaitu pohon yang menggambarkan semua kelompok hasil proses *clustering* yang ada dan menggabungkan dua kelompok yang memiliki tingkat kemiripan lebih tinggi (Holland, 2006). Visualisasi dari dendrogram selanjutnya digunakan untuk mengelompokkan populasi ikan tuna mata besar yang secara genetik lebih mirip, sehingga dapat diketahui struktur populasi dan stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Amplifikasi mtDNA Lokus Sitokrom Oksidase I (COI) Ikan Tuna Mata Besar

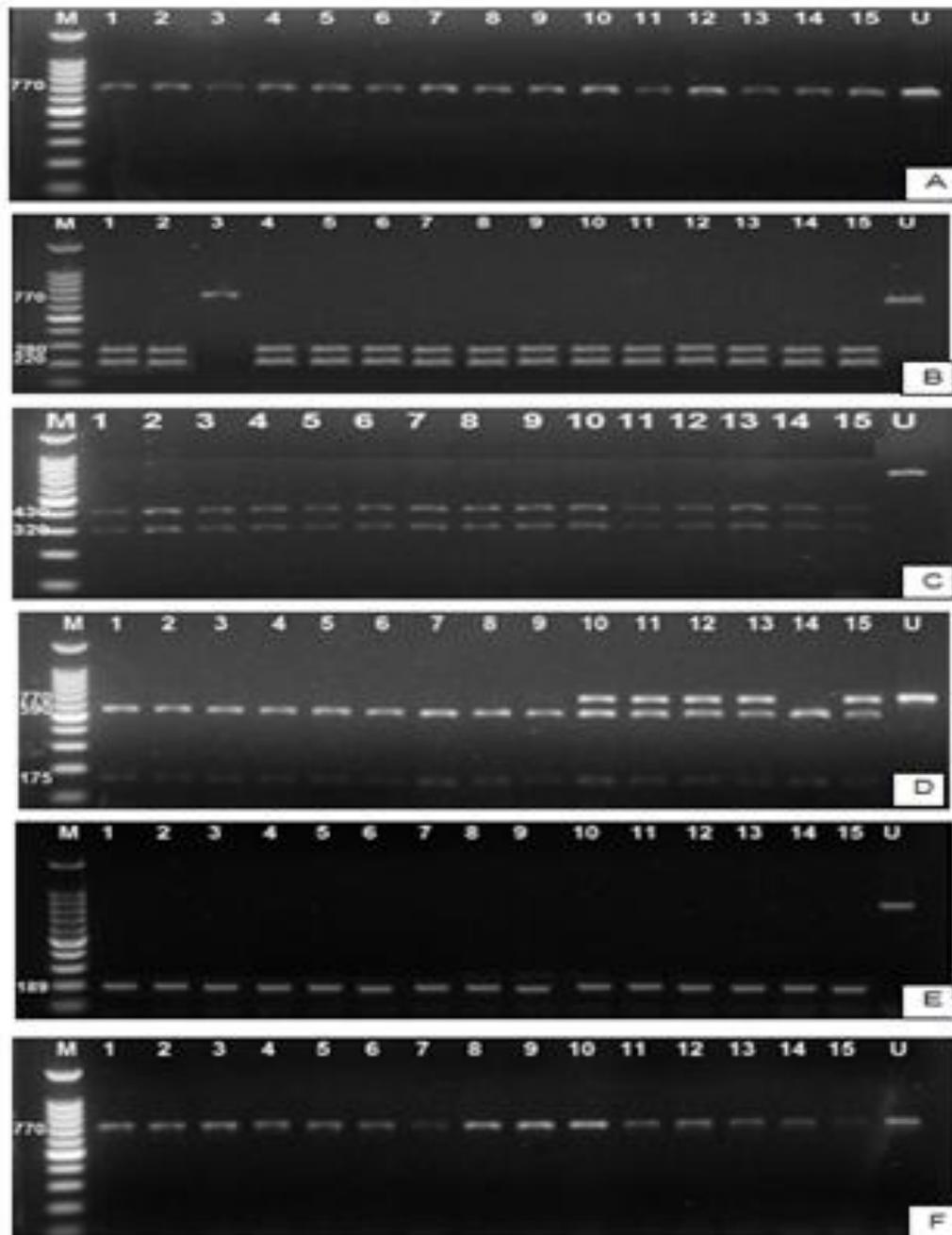
Amplifikasi mtDNA pada lokus Sitokrom Oksidase I (COI) dilakukan dengan menggunakan primer *forward* FBCL dengan urutan 5'-TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC-3' dan primer *reverse* FBCH dengan urutan 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (Baldwin *et al.*, 2009), menghasilkan *band* DNA tunggal berukuran ± 770 bp (Gambar 6). *Band* tunggal ini dapat diperoleh karena hanya terdapat satu daerah pada lokus COI yang dikenali oleh primer FBCL-FBCH. Panjang *band* DNA yang diperoleh berada pada kisaran ukuran *base pair* (bp) yang sama namun dalam intensitas yang berbeda. Perbedaan intensitas DNA yang teramplifikasi dapat dipengaruhi oleh kondisi *template* DNA, dimana hasil amplifikasi dengan intensitas rendah dapat diakibatkan karena kondisi *template* DNA yang rusak atau sedikit sehingga tidak teramplifikasi di bawah kondisi standar reaksi PCR (Seviour dan Nielsen, 2010).



Gambar 7. Amplifikasi mtDNA ikan tuna mata besar dengan M adalah marker 100 bp; 1-5 adalah populasi Bali; 6-10 adalah populasi Cilacap dan; 11-15 adalah populasi Jakarta.

4.2 Pola Pemotongan Enzim Restriksi pada Lokus Sitokrom Oksidase I (COI) Ikan Tuna Mata Besar

Fragmen DNA tunggal pada lokus COI yang telah diperoleh, dipotong oleh masing-masing enzim restriksi dan menghasilkan pola pemotongan yang berbeda seperti ditunjukkan oleh Gambar 8 berikut ini :



Gambar 8. Pemotongan fragmen DNA oleh enzim a). *Bam*HI; b). *Hae*III; c). *Hin*cII; d). *Rsa*I; e). *Alu*I dan; f). *Xho*I; dengan M adalah marker 100 bp; dan U adalah un-cut. 1-5 adalah populasi Bali; 6-10 adalah populasi Cilacap; 11-15 adalah populasi Jakarta

Hasil pemotongan *band* DNA (Gambar 8) memberikan informasi bahwa enzim *BamHI* menghasilkan satu tipe pemotongan yaitu alel A (770 bp), enzim *HaeIII* menghasilkan dua tipe pemotongan yang selanjutnya diberi nama alel A (770 bp) dan B (220 bp dan 280 bp), enzim *HincII* menghasilkan satu tipe pemotongan yaitu alel B (320 bp dan 430 bp), enzim *RsaI* menghasilkan dua tipe pemotongan yaitu alel B (175 bp dan 590 bp) dan C (175 bp, 590 bp dan 770 bp), enzim *AluI* menghasilkan satu tipe pemotongan yaitu alel A (189 bp), sedangkan enzim *XhoI* juga menghasilkan satu tipe pemotongan yaitu alel A (770 bp).

Berdasarkan pada jumlah alel yang dijumpai pada masing-masing enzim restriksi diketahui bahwa enzim restriksi yang mampu memotong *band* DNA tunggal lokus COI pada ikan tuna mata besar dengan variatif adalah enzim *HaeIII* dan *RsaI* karena menghasilkan lebih dari satu jenis alel. Enzim *RsaI* merupakan enzim restriksi yang sering digunakan untuk pemotong fragmen DNA mitokondria pada ikan tuna (Lin *et al.*, 2005; Kunal *et al.*, (2014). Berbeda dengan enzim *RsaI*, enzim *HaeIII* belum pernah digunakan untuk memotong *band* DNA ikan tuna. Enzim *HaeIII* sebelumnya telah berhasil digunakan untuk memotong *band* DNA pada sapi dan udang (Triastuti, 2003; Asmanik, 2003; Tunnisa, 2013). Hasil penelitian ini juga menunjukkan kemampuan enzim *HaeIII* dalam memotong DNA mitokondria pada ikan tuna mata besar.

Enzim *BamHI*, *HincII*, *AluI* dan *XhoI* tidak dapat mendeteksi terjadinya polimorfisme pada populasi yang diamati. Enzim *BamHI* dan *XhoI* tidak memotong *band* DNA tunggal karena tidak dijumpainya basa-basa yang dikenali oleh enzim tersebut pada hasil amplifikasi lokus COI ikan tuna mata besar. Enzim terakhir, *HincII* dan *AluI*, mampu memotong *band* DNA ikan tuna mata besar masing-masing menjadi dua fragmen dan satu fragmen namun tidak menunjukkan polimorfisme karena menghasilkan fragmen yang tidak variatif.

Hasil pemotongan enzim *BamHI*, *HincII*, *AluI* dan *XhoI* pada penelitian ini tidak menghasilkan pemotongan yang variatif pada DNA mitokondria ikan tuna mata besar seperti yang dihasilkan pada penelitian Kunal *et al.* (2014) dan Takeyama *et al.* (2005). Hal ini dapat diakibatkan karena primer yang digunakan pada penelitian ini tidak sama dengan primer yang digunakan pada penelitian Kunal *et al.* pada tahun 2014 yang menggunakan primer hasil desain Menezes (2006) dan pada penelitian Takeyama *et al.* pada tahun 2005 yang menggunakan primer hasil desain Chow dan Kishino (1995). Perbedaan primer yang digunakan menyebabkan daerah amplifikasi DNA tidak sama, sehingga urutan basa nukleotida yang diperoleh akan berbeda meskipun berada pada lokus DNA mitokondria yang sama.

Hasil pemotongan *band* DNA tunggal ini kemudian diinterpretasikan untuk mengetahui banyaknya alel yang dihasilkan oleh masing-masing enzim restriksi. Hasil interpretasi alel ikan tuna mata besar yang diperoleh dari pemotongan keempat enzim restriksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil interpretasi pemotongan produk amplifikasi 770 bp dengan menggunakan enzim restriksi *BamHI*, *HaeIII*, *RsaI*, *HincII*, *AluI* dan *XhoI*

Enzim Restriksi	Lokasi / Jumlah individu	Panjang Fragmen DNA / Jumlah individu		
		1	2	3
<i>BamHI</i>	Bali / 15	770/ 5	-	-
	Cilacap / 15	770/ 5	-	-
	Jakarta / 15	770/ 5	-	-
<i>HaeIII</i>	Bali / 15	770/ 1	280/ 4	220/ 4
	Cilacap / 15	280/ 5	220/ 5	-
	Jakarta / 15	280/ 5	220/ 5	-
<i>RsaI</i>	Bali / 15	590/ 5	175/ 5	-
	Cilacap / 15	770/ 1	590/ 5	175/ 5
	Jakarta / 15	770/ 4	590/ 5	175/ 5

Tabel 2. Lanjutan

Enzim Restriksi	Lokasi / Jumlah individu	Panjang Fragmen DNA / Jumlah individu		
		1	2	3
<i>HincII</i>	Bali / 15	430/ 5	320/ 5	-
	Cilacap / 15	430/ 5	320/ 5	-
	Jakarta / 15	430/ 5	320/ 5	-
<i>AluI</i>	Bali / 15	189 / 5	-	-
	Cilacap / 15	189 / 5	-	-
	Jakarta / 15	189 / 5	-	-
<i>XhoI</i>	Bali / 15	770/ 5	-	-
	Cilacap / 15	770/ 5	-	-
	Jakarta / 15	770/ 5	-	-

Berdasarkan kepada Tabel 2 di atas dapat diketahui bahwa distribusi alel pada masing-masing populasi menunjukkan adanya keragaman genetik antar populasi. Keragaman genetik ini penting bagi suatu populasi untuk menunjang kemampuan beradaptasi terhadap lingkungannya (Booy *et al.*, 2008).

4.3 Keragaman Genetik Ikan Tuna Mata Besar Yang Di Daratkan Di Bali, Cilacap dan Jakarta

4.2.1 Frekuensi Alel

Frekuensi alel merupakan perbandingan suatu alel dengan keseluruhan alel yang dijumpai (Muhammad *et al.*, 2012). Berdasarkan pada pola pemotongan *band* DNA tunggal oleh masing-masing enzim restriksi yang kemudian diolah dengan menggunakan aplikasi PopGene32, maka dapat diperoleh data nilai frekuensi alel (Tabel 3).

Tabel 3. Frekuensi alel populasi ikan tuna mata besar masing-masing enzim

Frek. Alel	<i>HaeIII</i>	<i>BamHI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HincII</i>	<i>XhoI</i>	<i>AluI</i>
A	0,0667	1.000			1.000	1.000
B	0,9333		0.667	1.000		
C			0.333			

Berdasarkan pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa enzim *HaeIII* dan *RsaI* memotong fragmen DNA pada ikan tuna mata besar dengan lebih variatif dibandingkan enzim *BamHI*, *HincII*, *XhoI* dan *AluI*. Frekuensi alel terendah dijumpai pada hasil pemotongan oleh enzim *HaeIII* yang menunjukkan individu dengan alel A dalam populasi hanya berjumlah 6,67%. Meskipun nilai frekuensi alel yang dijumpai rendah, namun data ini menunjukkan bahwa populasi yang diamati beragam dan mengalami polimorfik karena salah satu alelnya kurang dari 99% (Nei dan Kumar, 2000). Polimorfisme genetik ini terjadi karena adanya insersi ataupun delesi dalam urutan DNA.

4.2.2 Heterozigositas

Nilai heterozigositas merupakan salah satu nilai yang dapat digunakan untuk menghitung keragaman genetik pada populasi yang melakukan perkawinan secara acak dengan akurat, selain menggunakan data frekuensi alel (Oktarianti dan Pristiwindari, 2007). Nilai heterozigositas dipengaruhi oleh mutasi, jumlah, pola perkawinan, migrasi dan seleksi (Nozawa *et al.*, 1982). Nilai heterozigositas populasi ikan tuna mata besar pada masing-masing enzim dihitung berdasarkan pada Levene (1949) menggunakan aplikasi PopGene32 dengan hasil yang ditunjukkan oleh Tabel 4.

Tabel 4. Nilai heterozigositas populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta pada masing-masing enzim restriksi berdasarkan pada Levene (1949)

Enzim Restriksi	Homozigot pengamatan	Heterozigot pengamatan	Homozigot harapan	Heterozigot harapan	Nilai rata-rata heterozigositas
<i>HaeIII</i>	1.0000	0.0000	0.8745	0.1255	0,1067
<i>BamHI</i>	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0,0000
<i>RsaI</i>	1.0000	0.0000	0.5518	0.4482	0,2133
<i>HincI</i>	1.0000	0.0000	1.000	0.0000	0,0000
<i>AluI</i>	1.0000	0.0000	1.000	0.0000	0,0000
<i>XhoI</i>	1.0000	0.0000	1.000	0.0000	0,0000
Rata-rata	1.0000	0.0000	0.9044	0.0956	0.0533

Berdasarkan kepada Tabel 4 di atas, dapat diketahui bahwa hanya enzim *HaeIII* dan *RsaI* yang mampu menunjukkan heterozigositas yang terjadi pada lokus COI ikan tuna mata besar. Enzim *HaeIII* dan *RsaI* menunjukkan bahwa ketiga populasi yang diamati masing-masing memiliki tingkat keragaman genetik sebesar 10,67% dan 21,33% dengan nilai rata-rata heterozigositas sebesar 5,3% (heterozigositas rendah). Nilai heterozigositas yang semakin tinggi di dalam suatu populasi akan berkorelasi positif dengan variasi genetik pada populasi tersebut. Dari data yang diperoleh, dapat diketahui bahwa setiap populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta memiliki variasi genetik yang rendah (Muliadi dan Arifin, 2010). Variasi genetik yang rendah pada masing-masing populasi mengindikasikan terjadinya perkawinan sedarah (*inbreeding*) pada populasi tersebut (Hartati *et al.*, 2009).

Pendugaan keragaman genetik juga dapat dilakukan dengan menggunakan nilai heterozigositas pengamatan dan heterozigositas harapan (Tunnisa, 2013). Pada Tabel 4 ditunjukkan bahwa nilai heterozigositas harapan lebih besar daripada pengamatan. Data ini menunjukkan bahwa setiap populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta menyimpang dari keseimbangan Hardy-Weinberg (HWE). Keseimbangan Hardy-Weinberg menunjukkan adanya frekuensi genotip yang tetap dari generasi ke generasi karena terjadinya perkawinan secara acak yang tidak disertai dengan pengaruh lain seperti seleksi, mutasi, migrasi dan *random drift* (Warwick *et al.*, 1994). Dalam suatu populasi, peristiwa seleksi, mutasi, migrasi dan *random drift* akan selalu ada, sehingga secara alamiah di alam keseimbangan Hardy-Weinberg tidak mungkin terjadi (Ningtiyas, 2014).

4.2.3 F-Statistik

F-statistik merupakan metode yang diperkenalkan oleh Sewall Wright untuk menggambarkan struktur genetik populasi pada organisme diploid (Beaumont *et al.*, 2010). Hasil perhitungan F-statistik pada populasi ikan tuna mata besar di yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dilakukan berdasarkan Nei (1987) dengan menggunakan aplikasi PopGene32 yang ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. F-Statistik populasi ikan tuna mata besar berdasarkan kepada Nei (1987)

Lokus	<i>HaeIII</i>	<i>BamHI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HincI</i>	<i>AluI</i>	<i>XhoI</i>	Rata-rata
F_{ST}	0.1429	0.0000	0.5200	0.0000	0.0000	0.0000	0.4375

F_{ST} menyatakan perbedaan genetik dari sub populasi terhadap keseluruhan (total) populasi (Beaumont *et al.*, 2010). Hasil perhitungan menunjukkan bahwa rata-rata nilai F_{ST} adalah sebesar 0,4375 (Tabel 5). Nilai F_{ST} yang didapatkan ini menandakan bahwa terdapat perbedaan genetik yang tinggi antar populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta (Wright *dalam* Balloux dan Moulin, 2002). Hasil F_{ST} yang tinggi, berbanding terbalik dengan nilai heterozigositas yang rendah. Peristiwa ini dapat terjadi akibat perbedaan komposisi alel pada masing-masing populasinya, sehingga heterozigositas yang rendah dalam setiap populasi tidak mengakibatkan rendahnya F_{ST} antar populasi.

Aliran gen (Nm) yang terjadi pada populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta diestimasi berdasarkan Slatkin dan Barton (1989) pada aplikasi PopGene32 dan didapat bahwa aliran gen rata-rata pada ketiga populasi ikan tuna mata besar adalah sebesar 0,3214. Aliran gen ini

menunjukkan bahwa terdapat *gene flow* antar populasi namun aliran gen yang terjadi cukup rendah sehingga masing-masing populasi terpisahkan oleh variasi genetik yang besar.

4.2.4 Jarak Genetik

Jarak genetik merupakan pengukuran perbedaan genetik secara kuantitatif antar populasi, mulai dari urutan DNA, individu hingga taksa (Curcio *et al.*, 2014). Perhitungan jarak genetik populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dilakukan berdasarkan pada Nei (1972) dengan menggunakan aplikasi PopGene32. Hasil perhitungan jarak genetik populasi ikan tuna mata besar di ketiga wilayah penelitian dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Jarak genetik populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta berdasarkan pada Nei (1972)

Populasi	Bali	Cilacap	Jakarta
Bali	***		
Cilacap	0,0142	***	
Jakarta	0,1275	0,0655	***

Berdasarkan pada data di Tabel 6, dapat diketahui bahwa populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali memiliki kekerabatan yang dekat dengan populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Cilacap dengan jarak genetik 0,0142. Jarak genetik yang paling jauh dijumpai antara populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali dengan populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Jakarta. Adanya jarak genetik ini menunjukkan bahwa telah terjadi *gene flow* yang lebih besar antara ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali dan Cilacap daripada ikan tuna mata besar yang didaratkan di Jakarta sehingga menimbulkan adanya jarak dan variasi genetik lebih tinggi.

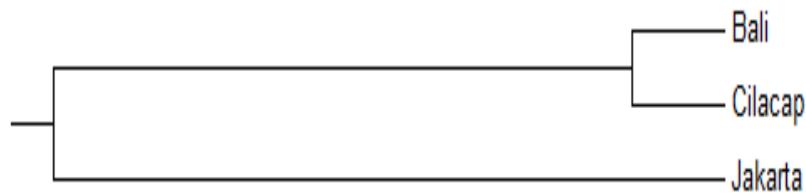
Jarak genetik yang dijumpai pada penelitian ini lebih besar dari pada jarak genetik ikan tuna mata besar yang diteliti oleh Suman *et al.* pada tahun 2013.

Populasi ikan tuna mata besar yang diteliti oleh Suman *et al.* (2013) berasal dari perairan selatan Jawa dan Nusa Tenggara serta perairan barat Sumatera. Jarak genetik yang dimiliki oleh kedua populasi tersebut tidak terlalu besar yakni hanya 0,0038. Kecilnya jarak genetik yang dimiliki oleh kedua populasi ini diduga diakibatkan karena *fishing ground* dari kedua sampel tidak terpisah.

Hasil jarak genetik yang lebih besar dari pada penelitian terdahulu dapat diakibatkan karena perbedaan jumlah sampel yang digunakan. Pada penelitian ini, hanya menggunakan lima individu untuk mewakili suatu populasi dengan tidak menutup kemungkinan akan terjadi perbedaan hasil bila jumlah sampel diperbanyak. Menurut Select (2016), semakin besar ukuran sampel maka hasil yang diperoleh akan lebih terpercaya dengan presisi yang lebih baik, namun memerlukan waktu dan biaya yang besar.

4.4 Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar Yang Didaratkan Di Bali, Cilacap dan Jakarta Berdasarkan Pada Jarak Genetik

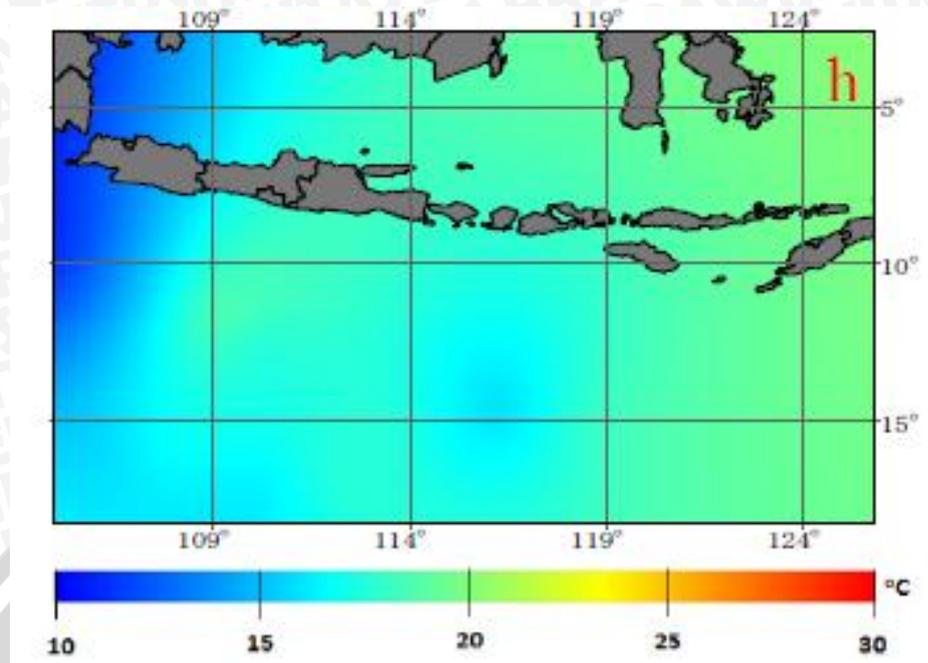
Populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dapat dikelompokkan berdasarkan pada jarak genetik yang dimiliki. Nilai jarak genetik yang kecil menunjukkan hubungan genetik yang dekat sedangkan, jarak genetik yang besar menunjukkan hubungan genetik yang jauh. Pengelompokan populasi berdasarkan jarak genetik dapat dilakukan dengan menggunakan analisis *clustering*. Analisis *clustering* merupakan rangkaian yang luas dari teknik yang dirancang untuk mengelompokkan kelompok yang serupa dari data yang dimiliki dan hasil pengelompokan ditunjukkan oleh gambar dendrogram (Heller dan Ghahramani, 2007). Hasil pengelompokan populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta berdasarkan pada jarak genetiknya dengan menggunakan metode UPGMA (Nei, 1972) menghasilkan dendrogram yang ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Dendrogram struktur populasi ikan tuna mata besar yang di daratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dengan metode UPGMA (Nei 1972)

Berdasarkan pada jarak genetik antar populasi dan dendrogram pada Gambar 9, maka diketahui bahwa struktur populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dapat dibagi kedalam dua subpopulasi yaitu subpopulasi Bali-Cilacap dan subpopulasi Jakarta. Terpisahnya populasi ikan tuna mata besar menjadi subpopulasi Bali-Cilacap dan subpopulasi Jakarta dapat diakibatkan karena faktor lingkungan yang menyebabkan terjadinya mutasi antara genetik individu yang sama (Holsinger dan Weir, 2009).

Perbedaan variabilitas lingkungan dapat berpengaruh terhadap susunan genetik suatu organisme (Liu *et al.*, 2013). Menurut Novianto *et al.* (2013), penyebaran ikan tuna mata besar secara vertikal dipengaruhi oleh suhu dan kedalaman renang yang dimiliki oleh ikan tersebut. Ikan tuna mata besar di perairan Selatan Jawa dan Samudera Hindia lebih banyak dijumpai pada kedalaman 150 m dengan rentangan suhu perairan berkisar antara 15-17°C (Hartoko, 2010). Pencitraan variabilitas suhu di Perairan Samudera Hindia khususnya Selatan Jawa (Gambar 10) pada kedalaman 150 m telah dilakukan oleh Sukresno *et al.* pada tahun 2013 dengan menggunakan Argo Float.



Gambar 10. Variabilitas suhu perairan Samudera Hindia pada kedalaman 150 m (Sukresno *et al.*, 2015)

Gambar 10 di atas menunjukkan variasi suhu air laut di kedalaman 150 m yang di ambil pada musim muson tenggara pada tahun 2013. Kondisi ini kurang lebih sama dengan kondisi perairan saat pengambilan sampel dilakukan yaitu pada bulan Juli yang juga termasuk kedalam musim muson tenggara. Gambar 10 juga menunjukkan bahwa suhu perairan di selatan Jawa Tengah (Cilacap) dan Bali adalah sama yaitu berkisar antara 15-17°C, sedangkan suhu perairan di selatan Jakarta lebih dingin yaitu berkisar antara 12-15°C. Persamaan suhu antara perairan Bali dan Cilacap diduga menyebabkan kecilnya jarak genetik antar populasi ikan tuna mata besar di kedua lokasi tersebut. Perbedaan suhu dan letak geografis yang cukup jauh antara populasi ikan tuna mata besar di perairan Bali dan Jakarta menyebabkan kedua populasi ini memiliki perbedaan jarak genetik yang paling jauh.

4.5 Pendugaan Stok Ikan Tuna Mata Besar Yang Didaratkan Di Bali, Cilacap dan Jakarta

Stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dapat diduga berdasarkan pada struktur populasinya. Hasil pendugaan stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta yang diperoleh adalah stok terbagi menjadi dua yaitu stok Bali-Cilacap dan stok Jakarta. Terbaginya stok ikan tuna mata besar ini diharapkan nantinya dapat digunakan sebagai dasar pengelolaan perikanan tuna mata besar di basis penangkapannya yaitu di Bali, Cilacap dan Jakarta.

Pendugaan stok ikan tuna mata besar dalam skala luas telah dilakukan oleh Bremmer *et al.* (2010). Penelitian ini membantah hipotesis awal bahwa ikan tuna mata besar di dunia merupakan populasi yang tunggal. Dalam penelitian ini diungkapkan bahwa secara genetik, ikan tuna mata besar dari Samudera Atlantik berbeda dengan ikan tuna mata besar di Samudera Hindia dan Pasifik. Pendugaan stok ikan tuna mata besar dalam skala yang lebih kecil pernah dilakukan oleh Suman *et al.* (2013) di perairan Barat Sumatera dan Selatan Jawa - Nusa Tenggara. Berdasarkan pada keragaman genetik dan jarak genetiknya, ikan tuna mata besar di perairan tersebut tidak berasal dari satu stok yang sama, namun terbagi menjadi stok Barat Sumatera dan Selatan Jawa – Nusa Tenggara. Lebih spesifik lagi, penduga stok ikan tuna mata besar dilakukan oleh Nugraha *et al.* (2010) di perairan Selatan Jawa dan Nusa Tenggara. Pendugaan stok yang dilakukan diperoleh bahwa ikan tuna mata besar di perairan tersebut adalah berbeda, sehingga dibagi menjadi dua stok yaitu stok Selatan Jawa dan stok Nusa Tenggara.

Pengkajian stok pada unit stok yang berbeda harus dilakukan secara terpisah. Pendugaan stok yang lengkap dapat memberikan informasi baik mengenai populasi ikan ataupun industri perikanan (Cooper, 2015). Pendugaan

stok ikan tuna mata besar diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan dan informasi dalam melakukan pengelolaan stok ikan tuna mata besar.



5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian tentang analisis struktur populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) yang telah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Struktur populasi ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta secara genetik adalah bervariasi dengan nilai rata-rata heterosigositas 5,3% dan nilai F_{ST} sebesar 0.4375.
2. Stok ikan tuna mata besar yang didaratkan di Bali, Cilacap dan Jakarta terbagi menjadi dua berdasarkan jarak genetik yang dimiliki yaitu stok Bali-Cilacap dan stok Jakarta.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan pada pelaksanaan dan hasil penelitian yang diperoleh adalah sebagai berikut :

1. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai struktur populasi dan stok ikan tuna mata besar dengan menggunakan jumlah sampel yang lebih besar dan pengambilan sampel dilakukan langsung dilokasi penangkapan untuk mencegah sampel berasal dari *fishing ground* yang sama.
2. Proses amplifikasi DNA lokus target sebaiknya dilakukan dengan menggunakan primer khusus atau melakukan pendesainan primer, sehingga dapat dipilih enzim restriksi yang mampu memotong *band* DNA tunggal dengan lebih variatif.

3. Manajemen perikanan tuna mata besar di Indonesia sebaiknya dibedakan berdasarkan kepada unit manajemennya masing-masing untuk mencegah terjadinya penurunan jumlah ikan akibat aktivitas penangkapan.



DAFTAR PUSTAKA

- Asmanik. 2003. *Variasi Genetik Udang Api-api (Metapenaeus monoceros. Fab) Di Perairan Jawa Timur (Jember dan Tuban) dan Sulawesi Selatan (Selat Makassar) Melalui Analisis Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Pada Mitokondrial DNA*. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Bahtiar, Andi, A. Barata, dan D. Novianto. 2013. Taktik Penangkapan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) Di Samudera Hindia Berdasarkan Data *Hook Timer* Dan *Minilogger Fishing Tactics For Bigeye Tuna (Thunnus Obesus) In Indian Ocean Based On Hook Timer And Minilogger Data*. Loka Penelitian Perikanan Tuna. Bali.
- Baldwin, Carole C., J. H. Mounts, D. G. Smith, and L. A. Weigt. 2009. Genetic Identification And Color Descriptions Of Early Life-History Stages Of Belizean Phaeoptyx And Astrapogon (Teleostei: Apogonidae) With Comments On Identification Of Adult Phaeoptyx. Magnolia Press. Zootaxa. Pg. 1–22.
- Balloux, F and L. Moulin N. 2002. The Estimation of Population Differentiation With Microsatellite Markers. *Molecular Ecology*. **11**: 155-165.
- Barber, Paul. 2014. DNA Extraction : Chelex. The Open Lab Book : Molecular Biology. <http://theolb.readthedocs.org/>. Diakses pada tanggal 20 Agustus 2015.
- Beaumont, Andy, Pierre B., and Kathrin H. 2010. Biotechnology and Genetics In Fisheries and Aquaculture. Second Edition. Blackwell Publishing. USA.
- Booy, G., R. J. J. Hendriks, M. J. M. Smulders, J.M.V. Groenendael, and B. Vosman. 2008. Generic Diversity and the Survival of Populations. *Plant Biology*. **2**: 379-395.
- Bremer, J. R. A., B. Stequert, N.W. Robertson, and B. Ely. 1998. Genetic Evidence For Inter-Oceanic Subdivision Of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) Populations. *Marine Biology*. **88**: 247-257.
- Brill, Richard W., K. A. Bigelow., M. K. Musyl, K. A. Fritsches, and E. J. Warrant. 2005. Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) Behaviour And Physiology And Their Relevance To Stock Assessments And Fishery Biology. *Sci. Pap. ICCAT*. **57**: 142-161.
- Chiang, Hsin-Chieh, C.C. Hsu, G. C. Wu, S.K. Chang, and H.Y. Yang. 2008. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research*. **140**: 305–312.
- Claire, Marie Loudon. 2015. DNA Extraction. Fastbleep. Molecular Biology Articles. <http://www.fastbleep.com/>. Diakses pada tanggal 20 November 2015.

- Cooper, Andrew B. 2015. A Guide to Fisheries Stock Assessment "From Data to Recommendations". University of Hampshire. Durham.
- Curcio, M., S. Presciuttini, R. Sciarrino, S. Fornaciari, M. L. Mariotti, and F. Scatena. 2014. Identification And Characterization of A Novel HLA-A Allele (HLA-A*68:105) by Gene Sequencing. *International Journal of Immunogenetics*. **91**: 484-485.
- Dagorn, L., P. Bach, E. Josse. 2000. Movement Patterns of Large Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) In The Open Ocean, Determined Using Ultrasonic Telemetry. *Marine Biology*. **136**: 361-371.
- [EOL] Encyclopedia of Life. 2015. Big Eye Tuna (*Thunnus obesus*). <http://eol.org/>. Diakses pada tanggal 22 November 2015.
- Faizah, Ria. 2010. *Biologi Reproduksi Ikan Tuna Mata Besar (Thunnus obesus) di Perairan Samudera Hindia*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fauziah. 2005. *Identifikasi, Klasifikasi dan Analisis Struktur Spesies Kawan Ikan Pelagis Berdasarkan Metode Deskriptor Akustik*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Biological Characteristic of Tuna. <http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en#Characteristics>. Diakses pada tanggal 29 April 2016
- Fonteneau, A., J. Ariz, A. Delgado, P. Pallares, and R. Pianet. 2004. A Comparisson of Bigeye Stock and Fisheries In The Atlantic, Indian And Pacific Ocean. IOTC-2004-WPTT-INF03. <http://www.iotc.org/English/meetings/wp/wpttcurrent.php>. Diakses pada tanggal 25 Februari 2016.
- Green, M. R., J. Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Amerika.
- Grundin, V. B. 1989. On The Ecology of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) and Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*). *J. Ichtyol*. **29**: 22-29.
- Gunawan, S. 2009. *Optimalisasi Pemanfaatan Kekayaan Laut Indonesia Guna Meningkatkan Kesejahteraan Rakyat*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Guries, Raymond P. and F. T. Ledig. 2007. *Genetic Structure of Populations and Differentiation in Forest Trees*. University of Wisconsin. Madison.
- Hartati, Sumadi, dan T. Hartatik. 2009. Identifikasi Karakteristik Genetik Sapi Peranakan Ongole Di Peternakan Rakyat. *Buletin Peternakan*. **33**(2): 64-73.
- Hartoko, Agus. 2010. Spatial Distribution of *Thunnus sp*, Vertical and Horizontal Sub-Surface Multilayer Temperature Profiles of In-Situ Agro Float Data in Indian Ocean. *Journal of Coastal Development*. **14**: 61-74.

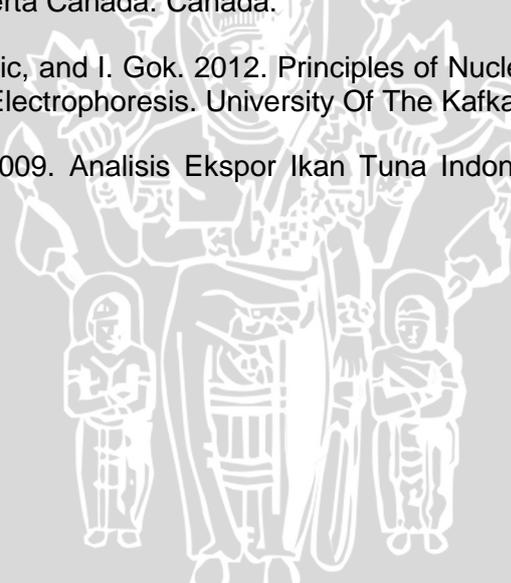
- Heller, K. A., and Z. Ghahramani. 2007. Bayesian Hierarchical Clustering. University College London. London.
- Holland, Steven M. 2006. Cluster Analysis. University of Georgia. Athens.
- Holsinger, Kent E., and B. S. Weir. 2009. Genetics in Geographically Structured Populations : Defining, Estimating and Interpreting F_{ST} . *Nature Review Genetics*. **10**: 639-650.
- [IBRC] Indonesian Biodiversity Research Center. 2013. Gel Electrophoresis. Banda Aceh.
- [IGFA] The International Game Fish Association. 2016. Tuna, Bigeye (Pacific). <https://www.igfa.org/species/57-tuna-bigeye-pacific.aspx?CommonName=57-tuna-bigeye-pacific.aspx>. Diakses pada tanggal 28 April 2016.
- [IOTC] Indian Ocean Tuna Commission. 2008. Executive Summary of The Status of The Big Eye Tuna Resource. Report of the Eleventh Session of The Scientific Committee of The IOCT. Pg 72-81
- Itano, David G. 2005. A Handbook for the Identification of Yellowfin and Bigeye Tunas in *Fresh Condition* (v2). University of Hawaii. Hawaii.
- Karcher, Susan J. 1995. Molecular Biology. Academic Press. California.
- Kothini, Siti Nur. 2010. *Status dan Pengelolaan Sumberdaya Ikan Tuna Mata Besar (Thunnus obesus Lowe, 1839) Di Perairan Saudera Hindia*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kunal, S. Priyaranjan, G. Kumar, and M. R. Menezes. 2015. Genetic Variation in Yellowfin Tuna *Thunnus Albacares* (Bonnaterre, 1788) Along Indian Coast Using Pcr-Rflp Analysis of Mitochondrial Dna D-Loop Region. *International Journal of Scientific Research*. **3**: 25-30.
- Levene, H. 1949. On A Matching Problem In Genetics. *Ann Math Stat*. **20**: 91-94.
- Lin, Wen-Feng, C. Y. Shiau, and D.F. Hwang. 2005. Identification of Four *Thunnus* Tuna Species Using Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequence and PCR-RFLP Analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*. **13**: 382-387.
- Liu, Yang, S. Webber, K. Bowgen, L. Schmaltz, K. Bradley, P. Halvarsson, M. Abdelgadir, and M. Griesser. 2013. Environmental Factors Influence Both Abundance and Genetic Diversity In A Widespread Bird Species. *Ecology Evolution*. **3**: 4683–4695.
- Loewenstein, Yaniv, E. Portugaly, M. Frommer, and M. Linial. 2008. Efficient Algorithms For Accurate Hierarchical Clustering of Huge Datasets : Tackling The Entire Protein Space. *Oxford Journal*. **24**(13): 141-149.
- Martin, Presley, M. Muruke, K. Hosea, A. Kivaisi, N. Zerwas, and C. Bauerle. 2004. A Rapid PCR-RFLP Method for Monitoring Genetic Variation Among Commercial Mushroom Species. *Biochemistry And Molecular Biology Education*. **32** : 390-394.

- Martines, Pilar and R. Zardoya. 2005. Genetic Structure Of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) In The Atlantic Ocean. *ICCAT*. **17**: 195-205.
- MacLean, J. A. and D. O. Evans. 1981. The Stock Concept, Discreteness of Fish Stocks, and Fisheries Management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **32**: 1889-1898.
- Maury, Olivier. 2005. How To Model The Size-Dependent Vertical Behavior Of Bigeye (*Thunnus obesus*) Tuna In Its Environment?. *ICCAT*. **57**(2): 115-126.
- Mertha, I. G. Sedana, M. Nurhuda, dan A. Nasrullah. 2006. Perkembangan Perikanan Tuna di Pelabuhan Ratu. *Jurnal Lit. Perikanan Indonesia*. **12**: 117-127.
- Michu, E. 2007. *A Short Guide to Phylogeny Reconstruction*. *Plant Soil Environ*. **10**: 442-446.
- Muhammad, Zakiatun, I K. Puja, dan I N. Wandia. 2012. Polimorfisme Lokus Mikrosatelit RMM185 Sapi Bali di Nusa Penida. *Indonesia Medicus Veterinus*. **1**: 505-518.
- Muliadi, Dudung dan J. Arifin. 2010. Pendugaan Keseimbangan Populasi dan Heterozigositas Menggunakan Pola Protein Albumin Darah pada Populasi Doba Ekor Tipis (*Javanese Thin Tailed*) di Daerah Indramayu. *Jurnal Ilmu Ternak*. **10**: 65-72.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance Between Populations. *Am Nat*. **106**: 283-292.
- _____. 1987. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance From a Small Number of Individuals. *Genetics*. **89**: 583-590.
- _____. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetic*. Oxford University Press. New York.
- Ningtiyas, Weny Dwi. 2014. *Keragaman Gen MHC DRB3 exon 2 (Major Histocompatibility Complex) Pada Populasi Sapi Bali dan Sapi Hasil Persilangan*. Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Novianto, Dian, A. Bahtiar dan A. Barata. 2013. Sebaran Laju Pancing Rawai Tuna Di Samudera Hindia. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. **19**: 175-234.
- [NSW] New South Wales. 2016. Bigeye Tuna *Thunnus obesus*. <http://www.dpi.nsw.gov.au/content/fisheries/recreational/saltwater/sw-species/bigeye-tuna>. Diakses pada tanggal 9 April 2016.
- Nugraha, Budi, M. S. Baskoro, A. B. Pane, and E. Nugroho. 2010. Genetic Diversity of Big Eye Tuna (*Thunnus obesus*) Based on mtDNA Analysis With The PCR-RFLP Technique. Institut Penelitian Perikanan Laut.

- Oktarianti, Rike dan M. Pristiwindari. 2007. Pengkajian Polimorfisme Protein Plasma Darah Pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy* Lac) di Kabupaten Jember. *Jurnal Ilmu Dasar*. **8**: 6-12.
- Pasingi, Nuralim. 2011. *Model Produksi Surplus Untuk Pengelolaan Sumberdaya Rajungan (Portunus pelagicus) di Teluk Banten, Kabupaten Serang, Provinsi Banten*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Patwardhan, Anand, S. Ray, and A. Roy. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Phylogenetics & Evolutionary Biology*. **2**: 1-9.
- Pertiwi, Ni Putu Dian. 2015. *Identifikasi Ikan Karang Famili Pseudochromidae (DOTTYBACK) Di Kawasan Coral Triangle*. Tesis. Universitas Udayana. Denpasar.
- Pope, Kevin L. 2010. Methods for Assessing Fish Populations. Artikel. University of Nebraska. Lincoln.
- Riswanto, Setiyo. 2012. *Status Perikanan Tuna Mata Besar (Thunnus obesus Lowe, 1839) Di Perairan Samudera Hindia, Selatan Pelabuhan Ratu, Sukabumi*. Tesis. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Select Statistic. 2016. The Importance and Effect of Sample Size. <http://www.select-statistics.co.uk/>. Diakses pada tanggal 9 Februari 2015.
- Setawati, Martiwi Diah, A. B. Sambah, F. Miura, T. Tanaka, and Abd. R. Asyaktur. 2015. Characterization of Bigeye Tuna Habitat in the Southern Waters off Java-Bali Using Remote Sensing Data. *Advances in Space Research*. **55**: 732-746.
- Seviour, Robert and P.H. Nielsen. 2010. *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing. London.
- Sharafi, H, A. Pouryasian, S. M. Alavian, B. Behnava, M. Keshvari, L. Mehrnoush, S. Salimi, and O. Kheradvar. 2012. Development and Validation of a Simple, Rapid and Inexpensive PCRFLP Method for Genotyping of Common IL28B Polymorphisms: A Useful Pharmacogenetic Tool for Prediction of Hepatitis C Treatment Response. *Hepatitis Monthly*. **12**: 190-195.
- Shearer, T. L., and M.M. A. Coffroth. 2008. DNA Barcoding: Barcoding Corals: Limited By Interspecific Divergence, Not Intraspecific Variation. *Molecular Ecology Resources*. **8**: 247-255.
- Sibagariang, O. Prima, Fauziyah, and F. Agustriani. 2011. Analisis Potensi Lestari Sumberdaya Perikanan Tuna Longline di Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah. *Maspuri Journal*. **3**: 24-29.
- Sparre, Per and Venema, S.C. 1998. *Introduction To Tropical Fish Stock Assesment*. FAO Fisheries Technical Paper.

- Slatkin, M. and N. H. Barton. 1989. A Comparison of Three Indirect Methods For Estimating Average Levels of Gene Flow. *Evolution*. **43**: 1349-1368.
- Sukresno, Bambang. A. Hartoko, B. Sulistyono, and Subiyanto. 2015. Empirical Cumulative Distribution Function (ECDF) Analysis of *Thunnus.sp* using ARGO Float Sub-surface Multilayer Temperature Data in Indian Ocean South of Java. *Procedia Environmental Science*. **23**: 358-367.
- Suman, Ali, H. E. Erianto, K. Amri, and B. Nugraha. 2013. Population Structure And Reproduction Of Big Eye Tuna (*Thunnus obesus*) In Indian Ocean At Western Part Of Sumatra And Southern Part Of Java And Nusa Tenggara. IOTC.
- Suryanto, Dwi. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara.
- 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.
- Syarif, B., S. D. Gautama, Suwardiyono. 2010. Penangkapan dan Penanganan Ikan Tuna Mata Segar di Kapal Rawai Tuna. Balai Besar Pengembangan Penangkapan Ikan. Semarang.
- Takagi, Motohiro, T. Okamura, S. Chow, and N. Taniguchi. 1999. PCR Primers for Microsatellite Loci in Tuna Species of the Genus *Thunnus* and its Application for Population Genetic Study. *Fisheries Science*. **64**: 571-576.
- Takeyama, H., S. Chow, H. Tsuduki, T. Matsunaga. 2005. Mitochondrial DNA Sequence Variation Within and Between *Thunnus* Tuna Species and Its Application to Species Identification. Tokyo University of Agriculture and Technology. Japan.
- Toha, Abdul Hamid. 2001. Deoxyribo Nucleic Acid. Alfabeta. Bandung.
- Triastuti, Juni. 2003. *Kajian Komparatif Variasi Genetik Udang Windu (Panaeus monodon Fab.) Di Perairan Jawa Timur dan Sulawesi Selatan Melalui Analisa Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Tunnisa, Ridha. 2013. *Keragaman Gen Igf-1 Pada Populasi Kambing Kacang Di Kabupaten Jeneponto*. Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Walker, Sharon. 2013. Menyingkap Tabir Bioteknologi Panduan Belajar Mandiri. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Walsh, P. Sean, D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*. **54**: 134-139.

- Warwick, E. J., J. M. Astuti dan W. Hardjosubroto. 1994. Pemuliaan Ternak. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wells, J. V. and M. R. Rishmond. 1995. Populations, Metapopulations, And Species Populations: What Are They and Who Should Care?. *Wildlife Society Bulletin*. **23**: 458-462.
- Willet, C. E., J. J. Cherry, and L. A. Steiner. 1997. Characterization And Expression of The Recombination Activating Genes (rag1 and rag2) of Zebrafish. *Immunogenetics*. **45**: 394-404.
- WWF. 2011. Perikanan Tuna : Panduan Penangkapan dan Penanganan. Seri Panduan Perikanan Skala Kecil Versi 1. 32 hlm.
- Yanagimoto, Takashi, T. Kitamura, and T. Kobayashi. 2012. Genetic Stock of Walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) Inferred by PCR-RFLP Analysis of The itochondrial DNA and SNP Analysis of Nuclear DNA. *Marine Genomics*. **7**: 17-25.
- Yeh FC, Yang RC, and Boyle T. 1999. POPGENE version 1.31 : Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Edmonton, AB. University of Alberta Canada. Canada.
- Yilmaz, Muhittin, C. Ozic, and I. Gok. 2012. Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. University Of The Kafkas. Turkey.
- Yudiarosa, Indriana. 2009. Analisis Ekspor Ikan Tuna Indonesia. *Wacana*. **12**: 116-134.



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat-alat Penelitian

No	Nama Alat	Merk	Fungsi
1	Bunsen	Lampu spritus 150 I – RRC	Pengkondisian aseptis dan untuk mensterilisasikan pinset dan gunting
2	<i>Sprayer</i>		Wadah larutan <i>bleach</i> 10%
3	Cawan petri	Pyrex	Wadah sampel yang akan diambil jaringannya
4	<i>Tray Tip</i>	Light Cycler™ Capillaries	Tempat untuk meletakkan tip mikropipet
5	<i>Tray Tube</i>	ExtraGene	Tempat untuk meletakkan tip mikropipet
6	Gelas ukur 100 ml	Pyrex Iwaki Glass	Mengukur volume larutan TBE buffer yang digunakan untuk pembuatan gel agarose
7	Gunting steril	RENZ	Mengambil sampel
8	Pinset	Venus	Mengambil sampel dalam ukuran kecil
9	Lemari pendingin (-20°C)	Sharp Crystal Ice	Menyimpan produk hasil PCR
10	Lemari pendingin (-80°C)	Thermo Scientific Hera Freeze	Menyimpan jaringan sampel
11	Timbangan digital	Analytical Balance XT 120A (Precisa)	Menimbang berat bubuk agarose yang dibutuhkan untuk membuat gel agarose
12	Miropipet	Bio-Rad	Mengambil dan memindahkan larutan dalam skala mikroliter
13	<i>Vortex mixer</i>	Maxi Mix II Barnstead Thermolyne Type 37600 Mixer	Menghomogenkan sampel secara mekanik

Lanjutan Lampiran 1. Alat-alat Penelitian

No	Nama Alat	Merk	Fungsi
14	<i>Waterbath</i>	Memmert	Memanaskan sampel yang telah di campurkan dalam chelex untuk memecah sel
15	<i>Microwave</i>	U-Rolux	Memanaskan larutan buffer dan bubuk agarose
16	Mesin setrifuse	Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Centrifuge	Memutar sampel yang telah di campurkan dalam chelex untuk memisahkan antara natan (padatan) dan supernatan (larutan)
17	<i>Thermo Cyclor</i>	Bio-Rad My Cyclor™ Thermal Cyclor	Mengamplifikasi DNA sampel
18	Cetakan gel agarose		Membentuk / mencetak gel agarose
19	<i>Gel Rig</i>	Bio-Rad	Meletakkan gel agarose yang berisi sampel hasil PCR selama proses elektroforesis
20	<i>Power Suplay</i>	Bio-Rad PowerPac	Mengalirkan listrik serta mengatur waktu dan tegangan listrik elektroforesis
21	<i>Gel documentation</i>	Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc™ XR Imaging System	Memvisualisasikan keberadaan <i>band</i> DNA dengan bantuan sinar UV
22	Inkubator	Memmert	Mengaktifkan dan menonaktifkan enzim restriksi dengan suhu
23	<i>Beaker Glass</i> 100 ml	Iwaki CTE33 Asahi Glass	Wadah ethanol dan wadah pembuatan gel agarose
24	Laptop	Toshiba	Media <i>output</i> visualisasi elektroforesis

Lampiran 2. Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Merk	Fungsi
1	Jaringan ikan tuna mata besar		Materi penelitian
2	Ethanol 96%	Brataco	Mengawetkan sampel jaringan ikan tuna mata besar
3	Chelex	Philekorea Technology (PKT)	Memisahkan DNA sampel dengan komponen sel lainnya
4	Primer FBCL	Integrated DNA Technologies (IDT)	Penanda lokasi DNA yang mulai digandakan (primer <i>forward</i>)
5	Primer FBCH	Integrated DNA Technologies (IDT)	Penanda lokasi DNA yang mulai digandakan (primer <i>reverse</i>)
6	PCR Master Mix	Thermo Scientific Dream Taq	Campuran larutan yang dibutuhkan dalam proses PCR
7	ddH ₂ O	Thermo Scientific	Pengencer DNA
8	Bubuk agarose	Science Preneur Lifetechnologies	Membuat gel agarose untuk elektroforesis DNA
9	TBE Buffer 10X	Molecular Biology Grade AppliChen	Bahan pembuatan gel agarose dan merendam <i>gel rig</i>
10	Aquabidestilata	Aqua Bidestilata Steril Proinjectionem (IKA)	Mengencerkan konsentrasi TBE Buffer 10X
11	Ethidium Bromida	Thermo Fisher Scientific	Memberi warna pada DNA dibawah sinar UV
12	DNA ladder	Bench Top 100 bp	Penanda berat molekul DNA
13	Loading dye		Menenggelamkan DNA saat proses elektroforesis

Lanjutan Lampiran 2. Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Merk	Fungsi
14	Parafilm	Parafilm-M American National Can™	Alas untuk mencampurkan bahan elektroforesis
15	Enzim restriksi (<i>HaeIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>RsaI</i> , <i>HincII</i> , <i>AluI</i> dan <i>XhoI</i>)	Thermo Scientific	Memotong <i>band</i> DNA tunggal sesuai dengan urutan nukleotida pada enzim restriksi
16	<i>10X Buffer BamHI</i>	Thermo Scientific	Pengencer konsentrasi enzim restriksi <i>BamHI</i>
17	<i>10X Buffer R</i>	Thermo Scientific	Pengencer konsentrasi enzim restriksi <i>HaeIII</i>
18	<i>10X Buffer Tango</i>	Thermo Scientific	Pengencer konsentrasi enzim restriksi <i>RsaI</i> , <i>HincII</i> , <i>AluI</i> dan <i>XhoI</i>
19	<i>Tube eppendorf</i>	Eppendorf Tube epQuality	Wadah chelex dan larutan <i>master mix</i>
20	<i>Tube PCR</i>	Axygen Scientific PCR Strip	Wadah campuran sampel dan <i>master mix</i> saat PCR berlangsung
21	Ethanol	Emsure®	Larutan untuk menyimpan sampel, Membersihkan alat dan menyalakan bunsen
22	Tisu	PB-10 Multi Toilet 10 in 1	Membersihkan alat dan meja kerja
23	Spidol	Snowman	Memberi label ID pada sampel
24	Pipet Tip	Light Cycler™ Capillaries	Membantu mikropipet untuk pengambilan larutan dalam skala kecil
25	Kertas Label	FOX Self Adhesive Label	Menuliskan ID pada sampel

Lanjutan Lampiran 2. Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Merk	Fungsi
26	<i>Hands Glove</i>	Sensi® Gloves	Melindungi tangan dan mencegah terjadinya kontaminasi pada sampel
27	Korek api	Sakerhets-Tandstickor	Untuk menyalakan bunsen
28	<i>Bleach 10%</i>	Bayclin	Pengkondisian aseptis pada meja sebelum melakukan kegiatan laboratorium



Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian



Mengambil sampel jaringan ikan tuna mata mata besar



Mengekstraksi DNA ikan tuna mata mata besar



Mengamplifikasi (PCR) DNA lokus Sitokrom Oksidase I (COI)



Menginkubasi DNA untuk pemotongan DNA band tunggal (proses Restriction Fragment Length Polymorphism)

