

**IDENTIFIKASI KESAMAAN GENETIK ANTARA  
IKAN LEMPUK *Gobiopterus* spp. DI RANU GRATI DENGAN  
*Gobiopterus brachypterus* BERDASARKAN SEKUEN GEN 12S  
rRNA**

**SKRIPSI**

oleh:  
**FITRI CHANDRA KUSUMA**  
**0810910045-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**IDENTIFIKASI KESAMAAN GENETIK ANTARA  
IKAN LEMPUK *Gobiopterus* spp. DI RANU GRATI DENGAN  
*Gobiopterus brachypterus* BERDASARKAN SEKUEN  
GEN 12S rRNA**

**SKRIPSI**

oleh:  
**FITRI CHANDRA KUSUMA**  
**0810910045-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2012**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI KESAMAAN GENETIK ANTARA IKAN  
LEMPUK *Gobiopterus* spp. DI RANU GRATI DENGAN  
*Gobiopterus brachypterus* BERDASARKAN SEKUEN  
GEN 12S rRNA**

oleh:

**FITRI CHANDRA KUSUMA  
0810910045**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Widodo, M.Si., Ph.D., Med, Sc  
NIP. 19730811 200003 1**

**Dr. Sri Widiyarti, M.Si  
NIP. 19670525 199103 2 001**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Widodo, M.Si., Ph.D., Med. Sc  
NIP. 19730811 200003 1**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitri Chandra Kusuma  
NIM : 0810910045  
Jurusan : Biologi  
Penulis tugas Akhir berjudul : Identifikasi Kesamaan Genetik Antara Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp. di Ranu Grati dengan *Gobiopterus brachypterus* Berdasarkan Sekuen Gen 12S rRNA

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juni 2012  
Yang menyatakan,

(Fitri Chandra Kusuma)  
NIM. 0810910045

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**IDENTIFIKASI KESAMAAN GENETIK ANTARA IKAN  
LEMPUK *Gobiopterus* spp. DI RANU GRATI DENGAN  
*Gobiopterus brachypterus* BERDASARKAN SEKUEN  
GEN 12S rRNA**

Fitri Chandra K, Widodo, Sri Widyarti  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya

**ABSTRAK**

Ikan Lempuk di Ranu Grati diduga memiliki kesamaan dengan *G.brachypterus*. Berdasarkan identifikasi morfologi, ikan lempuk Ranu Grati dikelompokkan menjadi dua tipe yaitu tipe B dan tipe C. Diperlukan identifikasi genetik untuk membuktikan apakah kedua tipe tersebut merupakan spesies yang sama atau berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan kesamaan genetik ikan lempuk Ranu Grati tipe B dan tipe C, serta mengetahui kesamaan genetik antara ikan lempuk *Gobiopterus* spp. Ranu Grati dengan *G.brachypterus* berdasarkan sekuen gen 12S rRNA. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu PCR-Sekuensing. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa ikan lempuk tipe B dan tipe C di Ranu Grati dipastikan adalah satu spesies yang sama dengan nilai jarak genetik 0% dan nilai similaritas sebesar 100%. Sedangkan, kesamaan genetik antara ikan lempuk di Ranu Grati dengan *G.brachypterus* sebesar 91.8% dengan jarak genetik sebesar 8.2%. Ikan lempuk Ranu Grati tidak satu genus dengan *Gobiopterus brachypterus*.

**Kata kunci :** *Gobiopterus brachypterus*, ikan lempuk, jarak genetik, similaritas

# Identification of Genetic Similarity Between Lempuk Fish *Gobiopterus* spp. in Ranu Grati and *Gobiopterus brachypterus* Based on Sequence Gene 12S rRNA

Fitri Chandra, Widodo, Sri Widyarti  
Biology Department, Faculty of Mathematics and Sciences,  
Brawijaya University

## ABSTRACT

Lempuk fish in Ranu Grati estimated has similarity with *Gobiopterus brachypterus*. Based on morphology identification, lempuk fish has been classified in to two type, B and C. The purpose of this research is to analyse the genetic similarity between lempuk fish *Gobiopterus* spp. Ranu Grati type B and type C, also between lempuk fish Ranu Grati with *Gobiopterus brachypterus* based on 12S rRNA gene sequences. The results shown that the lempuk fish type B and type C are the same species, with genetic distance value of 0 % and similarity value 100 %. Lempuk fish and *G.brachypterus* has genetic distance value 8.2 % and similarity value 91.8 %. Lempuk fish Ranu Grati are same genus with *G.brachypterus*.

**Key word :** genetic distance, *Gobiopterus brachypterus*, Lempuk fish, similarity



## KATA PENGANTAR

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

1. Widodo, M.Si., Ph.D., Med.Sc selaku dosen pembimbing akademik, dosen Pembimbing I, dan Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya
2. Dr. Sri Widyarti, M.Si selaku dosen Pembimbing II,
3. Nia Kurniawan, Ph.D., M.Sc., D.Sc selaku dosen Penguji
4. Ayah , Ibunda, dan Adik yang dengan sepenuh hati memberikan dukungan moril maupun spiritual sehingga penulisan tugas akhir ini dapat terselesaikan.
5. Teman-teman Biologi 2008, Lila, Lili, A'liyatur, Lilik, Siska, dll. Laboran dan anggota Lab Biologi Molekuler dan Seluler, Susiati, S.Si dll, serta beberapa pihak yang tidak dapat disebutkan satu per-satu.

Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat dan menambah khasanah ilmu pengetahuan.

Malang, Juni 2012

Penulis

# DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN &amp; SIMBOL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Ikan Lempuk.....	4
2.2 <i>Gobiopterus</i> spp.....	5
2.3 Keanekaragaman Genetik dan Konservasi Sumber Daya Ikan .....	7
2.4 Profil dan Karakter Perairan Ranu Grati .....	8
2.5 Teknik Analisis Molekuler yang Digunakan untuk Menentukan Variasi Genetik .....	10
2.6 DNA Mitokondria Sebagai Marker Genetik .....	11
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat .....	12
3.2 Prosedur Kerja Penelitian .....	12
3.2.1 Isolasi DNA.....	12
3.2.2 Uji Kuantitatif Hasil Isolasi DNA .....	13
3.2.3 Elektroforesis DNA Hasil Isolasi .....	13
3.2.4 Desain Primer.....	14
3.2.5 PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	14

3.2.6 Elektroforesis DNA Hasil PCR.....	15
3.2.7 Purifikasi DNA Hasil PCR.....	15
3.2.8 <i>Running</i> PCR Sekuensing .....	16
3.2.9 Purifikasi DNA Hasil PCR Sekuensing & <i>Running</i> Sekuensing.....	16
3.2.10 Analisis Data .....	17

#### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Hasil Isolasi DNA Ikan Lempuk <i>Gobiopterus</i> spp. ....	18
4.2 Hasil Amplifikasi DNA Ikan Lempuk <i>Gobiopterus</i> spp. ....	19
4.3 Hasil Sekuensing DNA Ikan Lempuk .....	20
4.4 Kesamaan Genetik Ikan Lempuk Tipe B dan Tipe C.....	22
4.5 Kesamaan Genetik Antara Ikan Lempuk <i>Gobiopterus</i> spp. dengan <i>Gobiopterus brachypterus</i> .....	24
4.6 Kesamaan Genetik Antara Ikan Lempuk dengan Ikan <i>Gobioidei</i> Subfamily <i>Gobionellinae</i> Berdasarkan Sekuen Gen 12S rRNA .....	27
4.7 Biogeografi Spesies ikan <i>Gobioidei</i> , Famili <i>Gobiidae</i> , Subfamili <i>Gobionellinae</i> .....	31

#### **BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran .....	35

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	37
<b>LAMPIRAN</b> .....	41

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Perbedaan sirip dorsal ke-2 pada ikan lempuk tipe B & tipe C yang mencirikan sifat <i>sexual dimorphism</i> .....	4
Gambar 2.2 <i>Gobiopterus brachypterus</i> .....	6
Gambar 2.3 <i>Gobiopterus chuno</i> .....	7
Gambar 4.1 Hasil uji kualitatif isolasi DNA ikan lempuk.	18
Gambar 4.2 Hasil amplifikasi gen 12S rRNA ikan lempuk pada gel agarose 1,5%.....	19
Gambar 4.3 Contoh elektroferogram hasil sekuensing isolat B5.....	21
Gambar 4.4 Perbedaan bentuk mulut ikan lempuk tipe B & tipe C yang mencirikan sifat <i>sexual dimorphism</i> .....	24
Gambar 4.5 Pohon filogeni <i>Neighbour joining</i> dan <i>Maximum likelihood</i> dengan model estimasi jarak Tamura-Nei antara sekuen gen 12S rRNA ikan lempuk tipe B, C, & <i>Gobiopterus brachypterus</i> .....	25
Gambar 4.6 Pohon filogeni <i>Maximum likelihood</i> dengan model estimasi jarak Tamura-Nei ( <i>bootstrap</i> 1000)berdasarkan data sekuen gen 12S rRNA ikan lempuk tipe B, C, & 11 spesies subfamili <i>Gobionellinae</i> .....	28
Gambar 4.7 Persebaran spesies ikan <i>Gobioidei</i> , famili <i>Gobiidae</i> , subfamili <i>Gobionellinae</i> di Indonesia.....	34

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbandingan kondisi kimia-fisik air di Ranu Grati.....	9
Tabel 4.1 Hasil uji kuantitatif DNA ikan lempuk.....	19
Tabel 4.2 Hasil perhitungan jarak genetik ikan lempuk tipe B & tipe C dengan menggunakan model estimasi jarak Tamura-Nei.....	22
Tabel 4.3 Hasil perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B, C, & <i>G.brachypterus</i> dengan menggunakan model estimasi jarak Tamura-Nei.....	25
Tabel 4.4 Hasil perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B, C, & <i>G.brachypterus</i> dengan menggunakan model estimasi jarak Kimura 2-Parameter ( <i>bootstrap</i> 1000).....	26
Tabel 4.5 Hasil perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B, C, & 11 spesies subfamili <i>Gobionellinae</i> dengan menggunakan model estimasi jarak Tamura-Nei ( <i>bootstrap</i> 1000)..	29
Tabel 4.6 Persebaran spesies ikan <i>Gobiodei</i> , famili <i>Gobiidae</i> , subfamili <i>Gobionellinae</i> .....	32

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Karakter morfologi ikan lempuk tipe B, tipe C, <i>G.brachypterus</i> , & <i>G. chuno</i> .....	41
Lampiran 2	Susunan nukleotida gen 12S rRNA <i>Gobiopterus brachypterus</i> dari sumber NCBI	42
Lampiran 3	Desain primer.....	44
Lampiran 4	Hasil uji kualitatif isolasi DNA ikan lempuk..	46
Lampiran 5	Diagram hasil uji sekuensing isolat B4, B5, C11, & C13.....	47



## DAFTAR SINGKATAN DAN SMBOL

### Simbol/ singkatan

### Keterangan

rRNA	: Ribosomal RNA
S (12S rRNA)	: Koefisien sedimentasi yang memiliki nilai ke-
	cepatan molekuler/ gaya sentrifugal
$\text{\AA}230$	: Absorbansi pada panjang gelombang 230 nm
$\text{\AA}260$	: Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm
DNA	: <i>Deoxyribose nucleic acid</i>
bp	: Base pair, satuan panjang DNA & RNA.
CI	: <i>Chloroform-Isoamyl alcohol</i> , bahan kimia yang digunakan dalam presipitasi protein
TE	: <i>Tris EDTA</i> , merupakan pelarut DNA
TBE	: <i>Tris Cl- boric acid- EDTA</i> , <i>buffer</i> yang digunakan dalam pembuatan gel agarose
EDTA	: <i>Etilene dimainin tetra acetate</i>
Dist	: <i>Distance</i> ( nilai jarak genetik)
Std.err	: <i>Standart error</i>
Mt-DNA	: Mitokondrial DNA
SL	: <i>Standart length</i>

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

*Gobiopterus* spp. merupakan spesies ikan yang hanya tinggal di Jawa, Sumatra, Filipina dan Australia. Persebarannya di Pulau Jawa tidak di semua perairan air tawar, namun hanya terbatas di Ranu Grati. (Larson *et al.*, 2008). *Gobiopterus* spp. yang hidup di Ranu Grati dikenal masyarakat dengan nama ikan lempuk.

Ikan lempuk merupakan ikan endemik di Ranu Grati, oleh karena itu ikan ini dijadikan maskot pariwisata di daerah Ranu Grati. Selain itu ikan lempuk diolah menjadi makanan ringan oleh masyarakat untuk dijual sehingga menjadi salah satu komoditas yang bernilai ekonomi. Ikan lempuk memiliki peran ekologis sebagai konsumen tingkat satu dan planktonivora utama yang mendukung keberadaan organisme-organisme konsumen tingkat selanjutnya dalam rantai makanan di danau Ranugrati, hal ini disebabkan karena ikan lempuk memiliki ukuran tubuh yang relatif kecil, sehingga menjadi mangsa bagi ikan predator yang berukuran lebih besar (Imam *et al.*, 2010).

Keunikan lain dari ikan lempuk yaitu memiliki kemiripan morfologi dengan ikan zebra (*Danio rerio*), dalam hal ukuran tubuh yang kecil dan tubuh yang transparan, sehingga dapat diamati tahap perkembangan embrio, serta tahap perkembangan organ internal seperti otak, sistem kardiovaskuler, sistem pencernaan, serta sistem saraf. Menurut Dahm *et al* (2005), *D. rerio* merupakan spesies ikan yang dijadikan sebagai model organisme untuk perkembangan dalam bidang biologi. Menurut Chauduri (1951), *G. chuno* memiliki tubuh yang transparan, dimana indung telur, dan proses perkembangan embrionya dapat dilihat dengan mata telanjang. Berdasarkan kesamaan tersebut, ikan lempuk menjadi menarik untuk dikaji lebih lanjut, sehingga nantinya diharapkan ikan lempuk dapat dijadikan sebagai kandidat yang dapat menggantikan *D. rerio* sebagai organisme model.

Saat ini kondisi perairan di Ranu Grati semakin menurun dari tahun ke tahun. Imam *et al* (2010) menyimpulkan bahwa kondisi kimia fisik air di Ranu Grati mengalami perubahan sejak tahun 2003. Selain itu kesadaran masyarakat untuk melestarikan ikan lempuk dan habitatnya masih sangat rendah, hal ini terbukti hanya 12,9 % responden berpendapat bahwa ikan lempuk dan habitatnya perlu dilestarikan.

Menurut Nisa (2011), ikan louhan (*Amphilopus trimaculatus*) yang menyebar merata di Ranu Grati merupakan predator bagi ikan lempuk. Berdasarkan kondisi tersebut, maka dikhawatirkan dapat mengakibatkan penurunan populasi ikan lempuk yang berpengaruh pada penurunan variasi genetik dan akan berakhir pada kepunahan. Sehingga diperlukan adanya penelitian yang mengkaji diversitas genetik ikan lempuk, namun saat ini identifikasi genetik pada ikan lempuk masih sedikit yang diketahui.

Menurut Imam (2011), ikan lempuk diduga memiliki kesamaan dengan spesies *Gobiopterus brachypterus* dan *Gobiopterus chuno*. Setelah dilakukan analisis morfologi berdasarkan pada pedoman identifikasi yang dibuat oleh Kottelat *et al.* (1993), ikan Lempuk di Ranu Grati cenderung memiliki banyak kemiripan dengan *G.brachypterus*, namun demikian masih terdapat perbedaan yang sangat jelas pada sirip dorsal kedua, sirip anal, dan rasio antara tinggi badan dengan panjang standar. Selain itu Imam (2011) mengelompokkan ikan lempuk di Ranu Grati menjadi dua tipe yaitu tipe B dan tipe C, yang masing-masing memiliki perbedaan morfologi, namun setelah dilakukan identifikasi genetik dengan teknik RAPD, diduga bahwa ikan lempuk tipe B dan tipe C merupakan spesies yang sama. Oleh karena itu identifikasi tingkat molekuler lebih lanjut sangat diperlukan untuk mendukung pernyataan bahwa ikan lempuk tipe B dan tipe C merupakan spesies yang sama serta dapat digunakan untuk membuktikan bahwa secara genetik ikan lempuk merupakan spesies yang sama dengan *Gobiopterus brachypterus*. Sehingga nantinya informasi dari penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk mengetahui diversitas genetik, dan selanjutnya untuk mendorong pelaksanaan usaha konservasi ikan lempuk.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini antara lain yaitu:

1. Apakah ikan lempuk tipe B dan tipe C Ranu Grati memiliki kesamaan Genetik berdasarkan sekuen gen 12S rRNA
2. Apakah Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp. Ranu Grati memiliki kesamaan genetik dengan *Gobiopterus brachypterus* berdasarkan sekuen gen 12S rRNA.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini antara lain yaitu:

1. Membuktikan kesamaan genetik antara ikan lempuk tipe B dan Tipe C Ranu Grati berdasarkan sekuen gen 12S rRNA.
2. Mengetahui kesamaan genetik antara Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp. Ranu Grati dengan *Gobiopterus brachypterus* berdasarkan sekuen gen 12S rRNA.

### 1.4 Manfaat

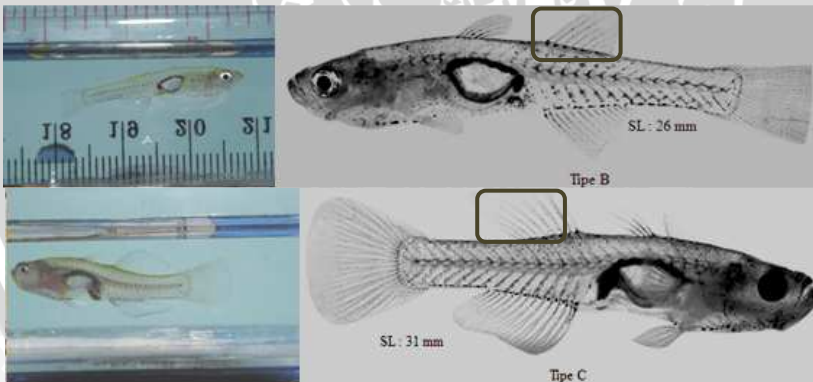
Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan informasi tentang kesamaan genetik ikan lempuk *Gobiopterus* spp. Ranu Grati dengan *Gobiopterus brachypterus*.
2. Sebagai informasi dasar untuk merancang program perbaikan mutu genetik ikan lempuk *Gobiopterus* spp. Ranu Grati berdasarkan diversitas genetiknya.
3. Mendorong dilakukannya penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan pemanfaatan ikan lempuk sebagai model organisme.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Lempuk

Karakteristik Ikan lempuk yang terdapat di danau Ranu Grati ditandai dengan warna tubuh yang transparan sehingga organ internal seperti ginjal, jantung, gelembung renang, pembuluh darah dan tulang belakang dapat terlihat dari luar tubuhnya. Menurut Imam (2011), Ikan lempuk di Ranu Grati diduga memiliki kesamaan dengan spesies *G.brachypterus* dan *G.chuno*. Setelah dilakukan analisis secara morfologi, ditemukan dua tipe ikan lempuk, yaitu tipe B dan C. Secara umum, ikan lempuk di Ranu Grati memiliki banyak kemiripan dengan *G.brachypterus*, walaupun demikian masih terdapat perbedaan yang sangat jelas pada bagian sirip dorsal kedua, sirip anal, dan rasio antara tinggi badan dengan panjang standar (Lampiran 1). Namun setelah dilakukan analisis genetik dengan teknik RAPD, diduga bahwa ikan lempuk tipe B dan C merupakan spesies yang sama, sehingga Imam (2011) menyatakan bahwa perbedaan sirip dorsal ke-2 merupakan sifat yang mencirikan sifat *sexual dimorphism* antara kedua tipe ikan tersebut.



Gambar 2.1 Perbedaan bentuk sirip dorsal kedua pada ikan lempuk tipe B dan tipe C yang mencirikan sifat *sexual dimorphism* (Imam., 2011)

Menurut Imam (2011), Penamaan dua tipe ikan lempuk yaitu tipe B dan tipe C didasarkan oleh hasil kesamaan dari masing-masing ikan lempuk yang dikelompokkan. Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi diketahui bahwa ikan lempuk yang memiliki panjang standar (SL) lebih pendek dan sirip cenderung berbentuk oval diduga mirip dengan spesies *G. Brachypterus*, sehingga ikan lempuk tersebut dinamai dengan ikan lempuk tipe B yang berarti inisial dari nama "*brachypterus*", sedangkan pada ikan lempuk yang memiliki panjang standar (SL) lebih panjang dan sirip yang cenderung berbentuk persegi diduga mirip dengan spesies *G. chuno*, sehingga ikan lempuk tersebut dinamai dengan ikan lempuk tipe C yang berarti inisial dari nama "*chuno*".

## 2.2 *Gobiopterus* spp.

*Gobiopterus* spp. merupakan spesies lokal yang terdapat di perairan Ranu Grati. Ikan ini tergolong dalam famili *gobiidae*, ordo *perciformes*, dan kelas *actinopterygii*. Terdapat dua jenis ikan lempuk (*Gobiopterus* spp). yang ada di Ranu Grati, yaitu *Gobiopterus brachypterus* dan *Gobiopterus chuno* (Kottelat *et al.*, 1993). Karakter morfologi *Gobiopterus* spp. diantaranya yaitu memiliki kepala pendek dan lebar, moncong bulat, memiliki gigi yang kecil, runcing dan berbentuk kerucut, membran insang yang berhubungan dengan isthmus badan serta memiliki sisik yang berbentuk cycloid dan ctenoid (Larson *et al.*, 2008).

Adapun klasifikasi dari *G. brachypterus* menurut Bleeker (1855) adalah sebagai berikut (Anonymous<sup>2</sup>, 2010):

Kingdom : Animalia  
Divisi : Chordata  
Kelas : Actinopterygii  
Ordo : Perciformes  
Famili : Gobiidae  
Genus : *Gobiopterus*  
Spesies : *Gobiopterus brachypterus*



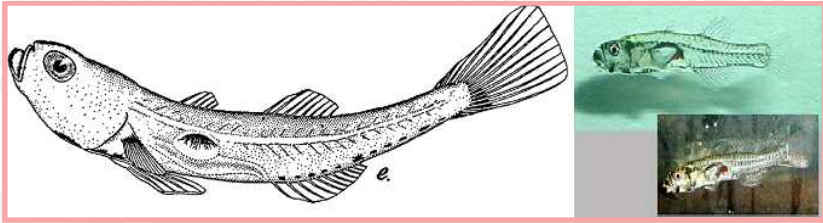
Gambar 2.2 *G. brachypterus* (Anonymous, 2011)

*G. brachypterus* memiliki ukuran kepala lebih besar daripada diameter badan. Tipe mulut ke arah inferior dan sirip bagian dorsal berbentuk oval. Secara morfologi ukuran tubuh kecil antara 1,5-2,0 cm dan sisik tidak memiliki pigmen sehingga tubuh transparan. *G. chuno* termasuk dalam satu famili dengan *G. brachypterus*. Secara umum ukuran morfologi maupun penampang lain terlihat sama antara *G. chuno* dengan *G. brachypterus*. Namun, letak mata *G. chuno* agak ke tengah ke arah dorsalis, tipe mulut superior dan bentuk sirip dorsal agak persegi. Keduanya dapat hidup secara berkelompok dan habitatnya di perairan dangkal pada serasah daun-daunan. Ikan ini terdistribusi di Pulau Jawa, Sumatra, Filipina dan Australia (Kottelat *et al.*, 1993). Adapun distribusi ikan lempuk di Pulau Jawa hanya terbatas di Ranu Grati (Larson *et al.*, 2008). Menurut Hindell & Jenkins (2004), tudi yang berhubungan dengan ekologi spesies gobies ini masih sangat sedikit yang diketahui.

Adapun klasifikasi dari *Gobiopterus chuno* menurut Hamilton (1822) adalah sebagai berikut (Anonymous<sup>3</sup>, 2010):

Kingdom	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Perciformes
Famili	: Gobiidae
Genus	: <i>Gobiopterus</i>
Spesies	: <i>Gobiopterus chuno</i>





Gambar 2.3 *G. chuno* (Pillay dan Sarojini, 1950)

### 2.3 Keanekaragaman Genetik dan Konservasi Sumber Daya Ikan

Keanekaragaman genetik merupakan variasi genetik individu-individu suatu populasi atau keanekaragaman genetik suatu spesies pada wilayah tertentu (Leksono, 2011). Keanekaragaman genetik dalam suatu spesies seringkali dipengaruhi oleh perilaku reproduksi individu-individu dalam populasi tersebut. Populasi adalah sekelompok individu-individu yang dapat kawin satu dengan lainnya dan menghasilkan keturunan. Individu-individu di dalam populasi memiliki perbedaan genetika antara satu dengan lainnya. Variasi genetik timbul karena setiap individu mempunyai bentuk-bentuk gen yang khas (Primack, 2004).

Keanekaragaman genetik dalam spesies memberikan kemampuan untuk beradaptasi atau melawan perubahan lingkungan dan iklim serta hama dan penyakit baru (Melchias, 2001). Keanekaragaman genetik mempunyai peranan yang sangat penting dalam program pemuliaan, karena optimalisasi perolehan genetik akan sifat-sifat tertentu dapat dicapai apabila cukup peluang untuk melakukan seleksi gen terhadap sifat yang diinginkan. Dasar genetik yang luas perlu tetap dipertahankan bahkan dikembangkan, sebab tidak hanya untuk mempertahankan sifat yang telah ada tetapi juga untuk memperoleh sifat baru yang diinginkan dan sekaligus memiliki kemampuan beradaptasi pada lingkungan yang beragam (Wright, 1976).

Biologi konservasi adalah ilmu lintas-disiplin (terpadu yang dikembangkan untuk menghadapi berbagai tantangan demi melindungi spesies dan ekosistem. Adapun prinsip-prinsip dari biologi konservasi adalah (Primack, 2004):

1. Keanekaragaman spesies dan komunitas biologi harus dilindungi.

2. Kepunahan spesies dan populasi yang terlalu cepat harus dihindari.
3. Kompleksitas ekologi harus dipelihara.
4. Evolusi harus berlanjut.
5. Keanekaragaman hayati memiliki nilai intrinsik

Konservasi sumber daya ikan diatur dalam Undang-undang No.31 Tahun 2004 dan Peraturan Pemerintah No.60 Tahun 200. Kedua sumber hukum tersebut mengatur tentang perlunya konservasi untuk pengelolaan SDI (Sumber Daya Ikan). Penyelenggaraannya meliputi konservasi ekosistem, konservasi jenis ikan dan konservasi genetik ikan. Konservasi ekosistem diselenggarakan dalam rangka menjamin habitat hidup ikan agar terjaga kelestariannya, baik pada area pemijahan (*spawning ground*), area asuhan (*nursery ground*), area mencari makan (*feeding ground*), juga pada jalur ruaya (*migratory route*). Sedangkan konservasi jenis ikan dan genetik ikan adalah untuk melindungi jenis dan genetik ikan yang terancam punah, ataupun yang sudah langka, yang selanjutnya untuk menjamin keanekaragaman hayati, sehingga keseimbangan populasi/spesies ikan tetap terjaga dan pengelolaan perikanan berkelanjutan dapat tercapai. Kegiatannya melalui penggolongan jenis ikan, penetapan status perlindungan jenis ikan, pemeliharaan, pengembangbiakan, dan penelitian serta pengembangan (Haryani *et al*, 2008).

## **2.4 Profil dan Karakter Perairan Ranu Grati**

Ranu Grati merupakan danau alami yang terletak di desa Ranu Klindungan, Kecamatan Ranu Grati, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Danau Ranu Grati memiliki luas wilayah 197 ha, dengan kedalaman air maksimum 134 m dan terletak di 10 m di atas permukaan laut. Secara geografis Ranu Grati terletak pada koordinat 07 °LS dan 113 °BT. Ranu Grati (Imam dan Arisoesilaningsih, 2009).

Danau Ranu Grati dikelola oleh Dinas Perikanan, Kabupaten Pasuruan. Biota yang hidup di danau ini sangat beragam. Beberapa jenis ikan yang dapat ditemui antara lain tombro, patin, nila, lempuk, gabus, lele, mujair, bawal, dan gurame (Dinas Perikanan, 2009).

Ranu grati dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar sebagai area rekreasi, pemancingan, pengairan dan pembudidayaan ikan dengan



sistem keramba jaring apung (KJA). Luas budidaya KJA mencapai 3,5 Ha (1,76 % luas danau ranugrati ) dengan jumlah pembudidayaan mencapai 640 unit. Jenis ikan yang banyak dibudidayakan adalah nila, bandeng tawar, tombro, gurame, patin dan bawal (Pemerintah Kabupaten Pasuruan, 2010).

Menurut Imam *et al* (2010), Kondisi kimia fisik air di Ranu Grati mengalami perubahan sejak tahun 2003. Budi daya ikan di kolam apung yang semakin intensif meningkatkan frekuensi dan jumlah konsentrat pakan ikan yang dipaparkan di perairan Ranu Grati. Kecerahan air rata-rata menurun 14,44 cm hingga mencapai 104,44 cm. Demikian pula kandungan oksigen terlarut maksimum yang tercatat sebesar 9,7 ppm pada tahun 2003, menurun hingga mencapai 6.02 ppm pada tahun 2009 (Tabel 2.3). Masyarakat banyak yang menangkap, mengolah, dan menjual ikan lempuk, hal ini dibuktikan dengan hasil sebesar 19,35 % responden yang mengkonsumsi ikan lempuk, dan responden umumnya berprofesi sebagai penangkap ikan lempuk. Selain itu kesadaran masyarakat untuk melestarikan ikan lempuk dan habitatnya masih sangat rendah, hal ini dibuktikan dengan hasil hanya 12,9 % responden berpendapat bahwa ikan lempuk dan habitatnya perlu dilestarikan.

Tabel 2.1 Perbandingan kondisi kimia – fisik air di Ranu Grati (Imam *et al.*, 2010)

Faktor Abiotik	2003	2009
pH	6,7 - 9,5	7,26 - 9,13
Suhu	24,5 - 31,4	28,3 - 29,7
Konduktifitas	0,210 - 0,252	0,136 - 0,392
Kecerahan rata2	90	104,44
DO (ppm)	3,6 - 9,7	4,35 - 6,02

## 2.5 Teknik Analisis Molekuler yang Digunakan untuk Menentukan Variasi Genetik

Metode untuk mengetahui keragaman genetik pada ikan adalah melalui penentuan karakter morfologi dan karakter genotip. Penentuan berdasarkan karakter genotip dapat dilakukan dengan beberapa teknik antara lain yaitu teknik alozim/isozim, DNA mitokondria, Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) dan DNA Mikrosatelit (Mulyasari 2007). Selain itu Garcia *et al* (2004) menyatakan bahwa teknik analisis genetik seperti Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Single Sequences Repeats (SSR), dan Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) juga dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik.

Adapun kelebihan dari penggunaan marka molekuler untuk menentukan variasi genetik antara lain yaitu (Mulyasari, 2007):

1. Memiliki akurasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode morfologi dalam proses seleksi ikan
2. Mampu membedakan antara individu yang homozigot dan heterozigot dalam satu generasi tanpa melakukan tes progeny
3. Tidak dipengaruhi lingkungan seperti fluktuasi musim dan asal geografis.

Penggunaan DNA Mitokondria (mt-DNA) sebagai gen marker diasumsikan karena Mt-DNA mempunyai variabilitas yang lebih tinggi 5 sampai 10 kali daripada kopi tunggal gen kromosom dan lebih jelas untuk membedakan gen yang bersifat fungsional. Metode ini berguna untuk mendeteksi keragaman populasi berdasarkan sifat maternal haplotipenya (Nugroho, 2001).

Analisis DNA mitokondria dilakukan untuk menyelidiki struktur populasi dan hubungan kekerabatan filogenetik diantara spesies ikan. Genom mitokondria berisi informasi genetik yang dapat memudahkan peneliti untuk melakukan determinasi atau menentukan hubungan kekerabatan antar spesies. Pokok studi ini didasari oleh polimorfisme DNA mitokondria yang mengindikasikan perbedaan dengan tingkat yang rendah diantara spesies ikan, sehingga memungkinkan untuk menggunakan sekuen mitokondria sebagai marker untuk identifikasi pada tingkat populasi (Doukakis *et al.*, 1999).

## 2.6 DNA Mitokondria Sebagai Marker Genetik

Mitokondrial DNA (mt-DNA) merupakan jenis molekul DNA yang berbentuk sirkuler untai ganda, dengan panjang 16.569 bp. Mitokondrial DNA mengkode 13 sub unit sistem fosforilasi oksidatif, 2 ribosomal RNAs (rRNAs), dan 22 transfer RNAs (tRNAs) (Anderson *et al.*, 1981). mtDNA memiliki kemampuan untuk menggandakan diri jutaan bahkan ribuan kali pada tiap selnya (Brown, 1980). Variasi mtDNA umumnya digunakan untuk studi evolusi manusia, migrasi, dan sejarah populasi (Tambets *et al.*, 2004).

DNA mitokondria terletak pada organel mitokondria yang bertanggung jawab dalam proses oksidasi aerobik pada organisme eukariotik. mt-DNA lengkap lebih pendek daripada nuklear DNA, tetapi cukup luas analisis statistiknya untuk multiseluler hewan tingkat tinggi. Metode analisis mt-DNA lebih mudah digunakan untuk sekuen DNA sepanjang 20.000 bp daripada nuklear DNA dengan panjang berjuta-juta bp. mt-DNA memiliki gen yang relatif sedikit, yang telah diidentifikasi, dan jalur biokimia mitokondria menghasilkan protein dari gen mitokondria yang diketahui. mt-DNA merupakan kandidat sebagai model biologi yang digunakan untuk mengembangkan pemahaman tentang hubungan kekerabatan antara gen dan lingkungannya. Serta diharapkan juga untuk mengembangkan teknik untuk analisis filogenetik (Nestor *et al.*, 2002).

Posisi yang berbeda-beda dari masing-masing gen mitokondria memiliki laju evolusi dengan kecepatan yang berbeda, yaitu ada yang bersifat relatif konserve (laju perubahan kecil) seperti 16S rRNA dan 12S rRNA, laju sedang (*cytochrome B*) dan yang memiliki laju cepat (CO1 dan d-Loop) (Brown *et al.*, 1979). Gen 12S rRNA dan 16S rRNA pada mitokondrial DNA merupakan gen yang menyandi pembentukan sekuen 12S rRNA dan 16S rRNA yang nantinya akan diterjemahkan dalam rangkaian urutan asam amino untuk pembentukan ribosomal RNA dalam proses sintesis protein. Menurut Cawthorn *et al* (2012), sekuen gen 12S rRNA dan 16S rRNA mampu untuk mengidentifikasi pengujian spesimen ikan dalam jumlah besar sampai tingkat genus.

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian yang berjudul “Identifikasi Kesamaan Genetik Antara Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp. di Ranu Grati dengan *Gobiopterus brachypterus* Berdasarkan Sekuen Gen 12S rRNA” ini dilakukan pada bulan Oktober 2011 sampai April 2012. Pengambilan sampel ikan lempuk (*Gobiopterus* spp.) dilakukan di Danau Ranu Grati, Desa Ranu Klindungan, Kecamatan Ranu Grati, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Sedangkan analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Prosedur Kerja Penelitian

#### 3.2.1 Isolasi DNA

Sampel ikan lempuk (*Gobiopterus* spp.) diambil dari Danau Ranu Grati, Pasuruan, Jawa Timur, sebanyak 30 individu, masing-masing 15 individu dengan 2 perbedaan morfologi yang berbeda yaitu tipe B dan tipe C (lampiran 1). Sampel dibawa ke laboratorium dalam keadaan hidup. Keseluruhan organ dari ikan lempuk digerus dengan mortal dingin kemudian ditambahkan buffer lysis sebanyak 500  $\mu$ L. Homogenat yang terbentuk dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* steril dan dimix gentle, lalu diinkubasi semalam dalam waterbath pada suhu 50 °C. Setelah proses inkubasi selesai, homogenate disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 25 °C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dipindahkan dalam tube 1,5 mL, kemudian ditambahkan 1x volume CI lalu dibolak-balik sebanyak 20 kali, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 25 °C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 mL. Proses selanjutnya yaitu ditambahkan 1x volume CI lalu dibolak-balik sebanyak 20 kali, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 25°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian dipindahkan ke dalam tube 1.5 mL, dan ditambahkan 0.5x volume ammonium asetat dan 2x volume EtOH 100%, kemudian di mix gentle.

Setelah itu diinkubasi pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam. Setelah proses inkubasi selesai, supernatant disentrifugasi pada kecepatan 10.000rpm dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang sehingga hanya tersisa pelet DNA yang mengendap di dasar tabung. Endapan pelet DNA ini diberi ethanol 70 % sebanyak  $500\ \mu\text{L}$  kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Setelah itu supernatan dibuang, dan endapan pelet dikeringkan sampai bau ethanol hilang kemudian ditambah TE buffer dengan pH 7.6 sebanyak  $50\ \mu\text{L}$  dan disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Ausubel *et al*, 2002).

### 3.2.2 Uji Kuantitatif Hasil Isolasi DNA

Uji Kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometri dilakukan untuk menentukan konsentrasi DNA hasil isolasi. Langkah pertama yang dilakukan yaitu kuvet diisi dengan buffer TE sebanyak  $1000\ \mu\text{l}$  sebagai blanko. Kemudian blanko diganti dengan larutan DNA sebanyak  $5\ \mu\text{l}$ , dimasukkan ke dalam kuvet yang berisi  $995\ \mu\text{l}$  buffer TE. Campuran dihomogenkan, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang  $260\ \text{nm}$ , dan  $280\ \text{nm}$ . Konsentrasi DNA dihitung dengan menentukan rasio  $A_{260}/A_{280}$ . Berikut merupakan rumus yang digunakan untuk menghitung konsentrasi DNA.

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{faktor pengencer} \times 50\ \mu\text{g/ml}$$

Ket :  $A_{260}$  = nilai absorbansi pada panjang gelombang  $260\ \text{nm}$  pada larutan DNA yang diukur

FP = fator pengenceran

$50$  = OD $_{260}$  sama dengan  $1$  maka setara dengan  $50\ \mu\text{g/ml}$

Kemurnian DNA diketahui dengan membandingkan absorbansi pada panjang gelombang  $260\ \text{nm}$  dengan  $280\ \text{nm}$ .

### 3.2.3 Elektroforesis DNA Hasil Isolasi

*Gel agarose*  $1\ \%$  dibuat dengan memanaskan bubuk *agarose* sebanyak  $0,3\ \text{gram}$  dengan  $30\text{ml}$  TBE hingga mendidih kemudian didinginkan hingga temperatur  $60^{\circ}\text{C}$  selama 1-2 menit lalu ditambahkan  $0,5\ \mu\text{L}$  EtBr dan digoyang-goyang. Setelah itu campuran *agarose* dan EtBr dituangkan pada cetakan yang telah dipasang sisir. Bila telah mengeras, gel dan cetakannya dimasukkan ke dalam chamber dan dituang TBE buffer sampai gel terendam, kemudian DNA dan loading dye dimasukkan pada masing-masing sumuran dengan

perbandingan (2:1) yaitu DNA sebanyak 2  $\mu$ L dan loading dye sebanyak 1  $\mu$ L. Langkah selanjutnya yaitu menghubungkan elektroda dengan *power supply* dan nyalakan selama  $\pm 30$  menit. Setelah selesai, elektroda dimatikan dan gel diambil kemudian dipindahkan ke UV-transiluminator lalu diamati hasilnya. Hasil tersebut kemudian didokumentasikan dengan kamera polaroid khusus.

### 3.2.4 Desain Primer

Desain primer dilakukan sebelum proses PCR. Primer didesain dengan mengacu pada *database* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Pertama-tama, dilakukan pencarian sekuen gen 12S rRNA dari spesies *Gobiopterus brachypterus* (lampiran 2). Kemudian langkah selanjutnya yaitu mencari spesies yang memiliki kesamaan gen dengan sekuen 12S rRNA *G.brachypterus* menggunakan program BLAST pada NCBI. Hasil yang didapatkan kemudian dipilih yang memiliki persentase kesamaan yang paling tinggi sekitar 99 % - 80 %, sehingga didapatkan 56 spesies dari sekuen gen 12S rRNA. Hasil dari sekuen tersebut kemudian *dialignment* dengan software MEGA 5.03, lalu dicari daerah yang *conserved*. Daerah yang *conserved* tersebut nantinya akan didesain sebagai primer forward dan primer reverse (Lampiran 3). Panjang amplikon dari pembuatan desain primer sebesar 432 bp.

### 3.2.5 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Primer yang digunakan dalam proses PCR ini yaitu 5'- AAA CCC AAA GGA CTT GGC -3' sebagai *forward primer* dan 5'- TCC GGT ACA CTT ACC ATG -3' sebagai *reverse primer* dari sekuen gen 12S rRNA *G.brachypterus*, sepanjang 432 bp. Komposisi PCR terdiri dari 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l PCR mix, 1  $\mu$ l primer forward, 1  $\mu$ l primer reverse, dan 1  $\mu$ l sampel DNA. Denaturasi awal dilakukan pada suhu 95 °C selama 5 menit, kemudian 33 siklus dengan proses denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 52,7 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik. Sedangkan post ekstensi dilakukan pada suhu 72 °C selama 10 menit. (Dudu *et al*, 2010). Verifikasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarosa 1,5 % yang mengandung 5 mg/ml EtBr (*ethidium bromide*).

Hasil elektroforesis dipapar di atas UV-*transiluminator* dan difoto dengan kamera *Polaroid*.

### 3.2.6 Elektroforesis DNA Hasil PCR

Gel agarosa yang digunakan adalah agarosa 1,5 %. Agarosa 0,45 gram ditambah dengan 30 ml *Tris borate-EDTA* (TBE) 1x. Agarosa dan TBE 1x dipanaskan di dalam *microwave* selama 2 menit. Setelah agak dingin, tetapi belum mengeras, ditambahkan dengan 1  $\mu$ L EtBr. Gel dituang ke dalam *plate* yang telah dipasang sisir. *Plate* diletakan pada bidang datar dan diusahakan permukaan gel rata. Gel didiamkan hingga mengeras, dan setelah mengeras sisir dilepas, gel dipindahkan ke *electrophoresis chamber* dan ditambahkan dengan TBE 1x hingga gel terendam. DNA sebanyak 3  $\mu$ l dicampur dengan 1  $\mu$ l *loading dye*, dan dimasukkan ke dalam sumur dengan hati-hati menggunakan *micropipet*. *Running* DNA dilakukan dengan menghubungkan katoda dan anoda pada sumber tegangan 50 V selama 1 jam. Pengamatan pita DNA yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan UV *transiluminator*.

### 3.2.7 Purifikasi DNA Hasil PCR

Sebelum dilakukan sekuensing. Hasil PCR harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk menghilangkan protein, dan kontaminan lainnya. Pertama-tama sampel hasil PCR di *spindown*, kemudian ditambah sodium asetat 1/10 *volume* dan EtOH absolute 2x *volume*, lalu diinkubasi selama 45 menit pada suhu -20°C. Setelah proses inkubasi selesai, sampel PCR disentrifus dua kali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C dan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk dibuang setengahnya dan disisakan sedikit, lalu ditambahkan alkohol 70 % sebanyak 200  $\mu$ L. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang dengan pipet, lalu pellet dikeringkan dalam oven dengan suhu 55°C. Setelah proses pengeringan selesai, pellet dilarutkan dengan aquades sebanyak 10  $\mu$ L. Hasil dari purifikasi DNA PCR ini diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarose 1,5% dalam 15  $\mu$ L TBE, adapun perbandingan antara *loading dye* dan sampel yang dimasukkan yaitu 2:3.

### 3.2.8 *Running* PCR Sekuensing

Running PCR sekuensing dilakukan untuk mengetahui sekuen DNA ikan lempuk khususnya gen 12S rRNA. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan sampel DNA ikan lempuk dari hasil PCR. Pertama-tama sebanyak 2  $\mu\text{L}$  sampel DNA dimasukkan ke dalam thinwall kemudian ditambahkan dengan 7  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{L}$  primer, 4  $\mu\text{L}$  buffer sekuensing, dan 3  $\mu\text{L}$  *Big dye*. Setelah itu thinwall dimasukkan kedalam thermal cycle dan dirunning dengan proses denaturasi pada suhu 96 °C selama 10 detik, annealing pada suhu 50 °C selama 5 detik, dan ekstensi pada suhu 60 °C selama 4 menit. Proses ini dilakukan 124 kali. Setelah itu dilakukan pendinginan pada suhu 4 °C selama 10 menit (Vosshall, 2001).

### 3.2.9 Purifikasi DNA Hasil PCR Sekuensing & *Running* Sekuensing

Purifikasi DNA hasil PCR sekuensing ini dilakukan untuk membersihkan sekuen DNA yang tidak terlabel oleh pewarna sekuensing (*Big dye*). Pertama-tama Sampel DNA ditambahkan dengan EDTA 0,126 M sebanyak 5  $\mu\text{L}$  dan EtOH Absolute sebanyak 60  $\mu\text{L}$ , kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Setelah proses inkubasi selesai, sampel disentrifus dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu ruang selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang (sisakan sedikit), lalu ditambahkan Alkohol 70 % sebanyak 60  $\mu\text{L}$  dan didinginkan selama 10 menit pada suhu -70 °C. Setelah proses pendinginan selesai, sampel disentrifus dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu ruang selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan keringkan pada suhu ruang selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 20  $\mu\text{L}$  buffer (*Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide*) dan divortex selama 1 menit, lalu *dispindown*. Setelah itu sampel dipanaskan pada suhu 95 °C selama 5 menit, lalu dimasukkan *refrigerator* selama 5 menit. Setelah proses pendinginan selesai, sampel DNA dimasukkan ke dalam *tube* sekuensing dan siap untuk dilakukan running sequencing yang kedua untuk mengurutkan basa nukleotida yang telah terlabel dengan mesin instrument ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.



### 3.2.10 Analisis Data

Hasil urutan basa DNA ikan lempuk tipe B dan tipe C yang diperoleh dari sekuensing, dianalisis menggunakan software MEGA 5.03. Hasil sekuensing tersebut kemudian *dialignment* dengan sekuen gen 12S rRNA dari spesies *Gobiopterus brachypterus* dan 11 spesies dari subfamili *Gobionellinae* yang diperoleh dari *gene bank* (NCBI). Setelah itu dilakukan perhitungan jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik. Perhitungan jarak genetik digunakan untuk mengetahui nilai similaritas, sedangkan rekonstruksi pohon filogenetik digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies satu dan spesies lainnya. Berikut merupakan rumus untuk menghitung similaritas:

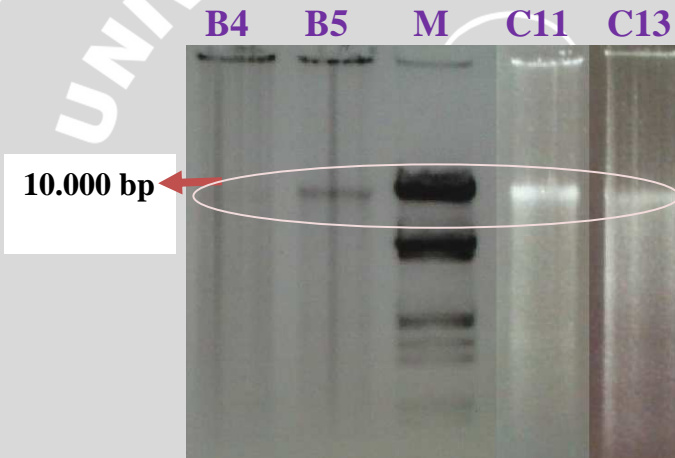
$$\text{Persentase Similaritas} = (1 - \text{Jarak Genetik}) \times 100\%$$

Hasil persentase yang didapatkan nantinya digunakan untuk mengetahui kesamaan genetik antara ikan lempuk tipe B dan tipe C, ikan lempuk Ranu Grati dengan *G.brachypterus*, serta ikan lempuk dengan 11 spesies dari subfamili *Gobionellinae* yang diambil dari Wang *et al* (2001).

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil Isolasi DNA Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp.

Total DNA Ikan lempuk yang didapatkan sebanyak 30 isolat (Lampiran 4), masing-masing 15 individu dari tiap tipenya, yaitu B1 sampai B15 dan C1 sampai C15. Dari hasil isolasi tersebut, hanya 4 isolat yang digunakan dalam penelitian ini, masing-masing dua isolat pada setiap tipenya, yaitu isolat B4, B5, C11, dan C13. Pemilihan ini berdasarkan ketersediaan sampel volume isolat DNA.



Gambar 4.1 Hasil uji kualitatif isolasi DNA Ikan Lempuk

Keterangan :

- B4, B5 : Ikan Lempuk tipe B
- C11, C13 : Ikan Lempuk tipe C
- M : DNA *Ladder*

Berdasarkan hasil uji kualitatif dari isolasi DNA ikan lempuk diatas dapat diketahui bahwa hasil isolasi DNA sudah cukup baik, hal ini dibuktikan dengan munculnya satu pita tebal pada masing-masing isolat. Selain itu dapat diketahui juga panjang DNA *whole genome* dari Ikan lempuk tipe B maupun tipe C yaitu sebesar 10.000 bp.

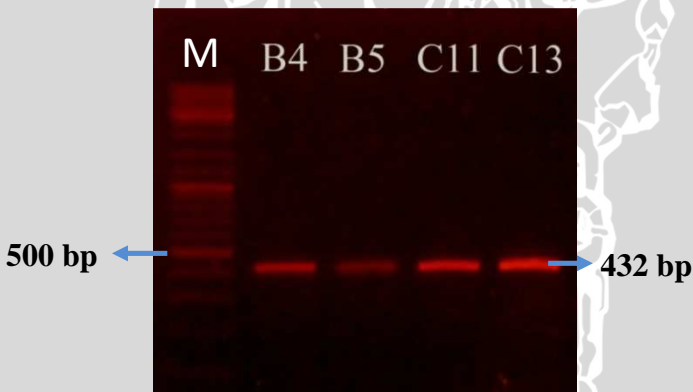
Tabel 4.1 Hasil uji kuantitatif DNA ikan lempuk

No.	Sampel	Å260	Å280	Kemurnian DNA	Konsentrasi
1.	B4	5.048	2.672	1.89	252,41
2.	B5	2.752	1.439	1.91	137,62
3.	C11	5.091	2.662	1.91	254.57
4.	C13	4.293	2.293	1.87	214.65

Berdasarkan hasil perhitungan uji kuantitatif DNA ikan lempuk dapat diketahui bahwa keempat sampel yang dipilih telah memenuhi syarat DNA murni.

#### 4.2. Hasil Amplifikasi DNA Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp.

DNA ikan lempuk diamplifikasi dengan menggunakan marka mitokondrial DNA yaitu dari gen 12S rRNA. Penggunaan mitokondrial DNA dalam penelitian ini didasarkan oleh keefektifan gen-gen dalam mitokondrial DNA untuk menyelidiki struktur populasi dan hubungan kekerabatan antar spesies.



Gambar 4.2 Hasil amplifikasi gen 12S rRNA ikan lempuk pada gel agarose 1,5 %.

Keterangan :

B4, B5 : Ikan Lempuk tipe B

C11, C13 : Ikan Lempuk tipe C

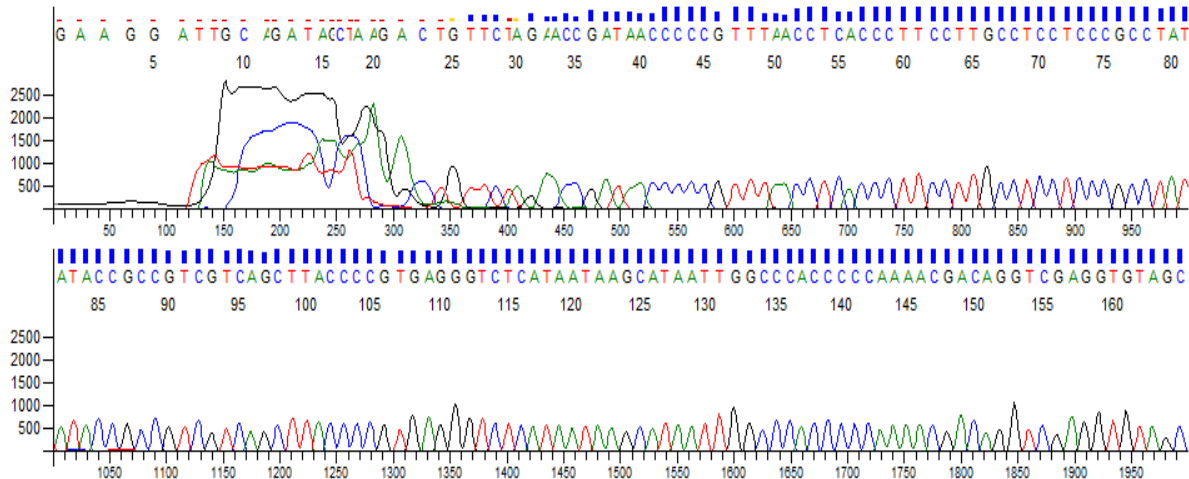
M : DNA Ladder

Berdasarkan hasil amplifikasi gen 12S rRNA ikan lempuk pada gel agarose 1,5 % menunjukkan bahwa primer yang digunakan dapat mengamplifikasi gen 12S rRNA DNA ikan lempuk dengan panjang ampikon yang telah sesuai yaitu sebesar  $\pm 432$  bp. Pemilihan gen 12S rRNA dari mitokondrial DNA dalam penelitian ini disebabkan karena gen ini dapat digunakan untuk menyelidiki hubungan kekerabatan dari suatu spesies. Menurut Moritz *et al* (1987), Analisis mitokondria telah digunakan secara luas untuk mempelajari evolusi, struktur populasi, aliran gen, hibridisasi, biogeografi, dan filogeni suatu spesies hewan. Sedangkan. Menurut Hilis dan Dixon (1991) dalam Wang *et al* (2001), Sekuen dari gen ribosomal RNA yang terdapat dalam mitokondria dapat digunakan untuk menduga filogeni diseluruh spektrum yang luas, dari penelitian-penelitian yang mempelajari tentang garis keturunan diantara hubungan kekerabatan dari suatu populasi maupun spesies yang berkerabat dekat. Selain itu, Solihin (1994) menyebutkan bahwa gen 12S rRNA merupakan gen yang terkonservasi dengan baik (memiliki kecepatan evolusi lambat) pada mitokondrial DNA, sehingga dapat digunakan untuk menyelidiki kesamaan asal muasal (*ancient taxa*).

Hasil PCR yang didapatkan kemudian dipurifikasi untuk menghilangkan primer dan reagen PCR mix (dNTPs (*nucleotides*), buffer PCR, Taq DNA *Polymerase* ), sehingga nantinya didapatkan DNA murni yang siap untuk disekuensing.

#### **4.3. Hasil Sekuensing DNA Ikan Lempuk**

Hasil sekuensing DNA ikan lempuk berupa hasil peak diagram yang diterjemahkan ke dalam urutan basa nukleotida sepanjang  $\pm 432$  bp (Lampiran 5), Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan mesin instrument ABI Prism 310 *Genetic Analyzer*.



Gambar 4.3 Contoh Elektroferogram hasil sekuensing isolat B5

Keterangan : blok merah : Low base  
 blok kuning : Medium base  
 blok biru : High base

Hasil sekuensing yang didapatkan berupa urutan nukleotida, pada hasil sekuensing didapatkan urutan nukleotida yang diblok dengan tiga macam warna yang berbeda, yaitu warna merah, biru, dan kuning. Warna merah menunjukkan keakuratan pembacaan nukleotida yang rendah, warna kuning menunjukkan pembacaan nukleotida pada level medium, sedangkan warna biru menunjukkan pembacaan nukleotida yang paling tinggi, atau dengan kata lain, nukleotida yang dibaca oleh mesin sekuenser sudah benar.

Berdasarkan hasil sekuensing dapat diketahui bahwa hasil pembacaan sekuensing sudah cukup baik, hal ini dapat dilihat dengan perolehan basa nukleotida dengan akurasi yang tinggi yaitu yang diblok dengan warna biru.

#### 4.4. Kesamaan Genetik Ikan Lempuk Tipe B dan Tipe C

Hasil sekuensing DNA ikan lempuk yang didapatkan, kemudian dialignment untuk mengetahui homologi diantara sekuen dan dipotong untuk menyamakan panjang sekuen. Setelah itu dihitung jarak genetik keempat sampel tersebut.

Tabel 4.2 Hasil perhitungan jarak genetik ikan lempuk tipe B & tipe C dengan menggunakan model estimasi jarak Tamura-Nei

	B4	B5	C11	C13
B4		0.000	0.000	0.000
B5	*0.000		0.000	0.000
C11	*0.000	*0.000		0.000
C13	*0.000	*0.000	*0.000	

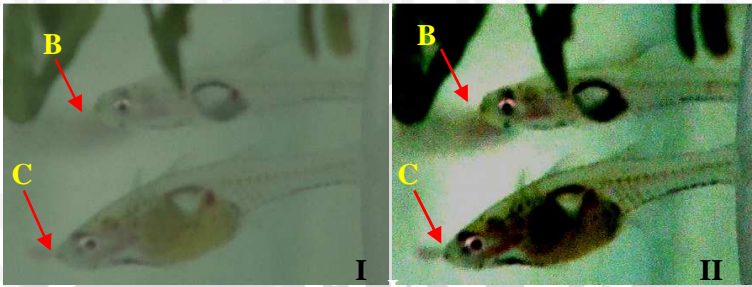
Keterangan : \*) *distance* / jarak genetik  
 ..) *standart error*

Berdasarkan hasil dari perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B dan tipe C berdasarkan sekuen gen 12S rRNA dapat diketahui bahwa ikan lempuk tipe B dan tipe C memiliki nilai jarak genetik sebesar 0 % dengan nilai *standart error* sebesar 0 %, sehingga dapat dikatakan bahwa ikan lempuk tipe B dan tipe C memiliki kesamaan sebesar 100 %, dan merupakan satu spesies yang sama walaupun terdapat perbedaan morfologi diantara keduanya, berdasarkan

hal ini dapat dikatakan bahwa terdapat sifat seksual dimorfisme pada perbedaan morfologi antara ikan lempuk tipe B maupun tipe C, yaitu perbedaan morfologi yang dapat dilihat dalam satu spesies yang membedakan antara jantan dan betina. Hal ini sesuai dengan pernyataan Imam (2011) bahwa perbedaan bentuk sirip dorsal kedua antara ikan lempuk tipe B dan tipe C adalah salah satu bentuk *sexual dimorphism*. Sehingga dalam hal ini terbukti bahwa ikan lempuk tipe B dan Tipe C merupakan spesies yang sama berdasarkan sekuen gen 12S rRNA.

Seksual dimorfisme merupakan tanda-tanda luar yang dapat dipakai untuk membedakan ikan jantan dan ikan betina. Jika suatu spesies ikan memiliki sifat morfologi yang jelas untuk membedakan ikan jantan betina maka spesies tersebut bersifat seksual dimorfisme (Rahardjo, 1980). Tjakrawidjaja (2006) menyebutkan bahwa panjang pangkal sirip anal jantan lebih panjang daripada betina, panjang sirip ekor jantan lebih panjang daripada betina, serta tinggi kepala jantan lebih pendek daripada betina. Berdasarkan karakteristik tersebut dapat disimpulkan bahwa ikan lempuk tipe B merupakan ikan lempuk betina dan ikan lempuk tipe C merupakan ikan lempuk jantan, hal ini dibuktikan dengan panjang sirip anal dan panjang standar (*standart length* (SL)) ikan lempuk tipe C lebih panjang daripada ikan lempuk tipe B (Gb. 2.1 & Lampiran 1), serta pengamatan langsung pada ikan lempuk yang telah memproduksi sel telur dan tidak memproduksi telur

Menurut Imam (2011), Panjang standar rata-rata tipe B yaitu sebesar 22 mm sedangkan tipe C sebesar 24 mm. Sehingga dapat dikatakan bahwa diduga ikan lempuk tipe C merupakan ikan lempuk jantan dan ikan lempuk tipe B merupakan ikan lempuk betina. Ikan lempuk tipe C memiliki tubuh yang lebih panjang, hal ini sesuai dengan acuan yang menyatakan bahwa perawakan ikan jantan lebih langsing daripada betina (Yamazaki, 1996).



Gambar 4.4 Perbedaan bentuk mulut pada ikan lempuk tipe B & tipe C yang mencirikan sifat *sexual dimorphism*. Gambar sebenarnya (I), gambar edit (II).

Keterangan:

B : ikan lempuk tipe B (betina)

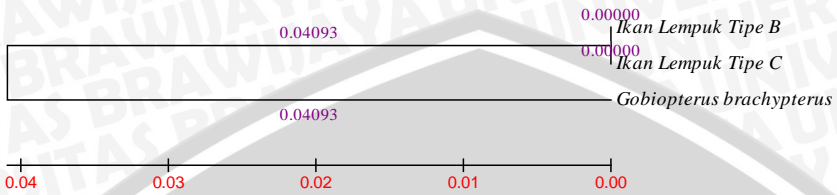
C : ikan lempuk tipe C (jantan)

Berdasarkan gambar diatas dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang khas pada bentuk mulut ikan lempuk yang memproduksi sel telur dan tidak. Ikan lempuk yang memproduksi sel telur memiliki bentuk mulut inferior, sedangkan ikan lempuk yang tidak memproduksi sel telur memiliki bentuk mulut superior. Menurut Imam (2011), Ikan lempuk yang memiliki bentuk mulut menyerupai *G.brachypterus* (kearah inferior) yaitu ikan lempuk tipe B, sedangkan yang memiliki bentuk mulut menyerupai *G.chuno* (kearah superior) merupakan ikan lempuk tipe C. Sehingga dalam hal terbukti bahwa ikan lempuk tipe B merupakan ikan lempuk betina sedangkan ikan lempuk tipe C merupakan ikan lempuk jantan.

#### 4.5. Kesamaan Genetik Antara Ikan Lempuk *Gobiopterus* spp. dengan *Gobiopterus brachypterus*

Dari keempat sekuen, dipilih masing-masing satu sekuen untuk setiap tipenya, pemilihan ini diambil dari sekuen yang paling bagus atau yang memiliki jumlah basa nukleotida terbanyak dengan pembacaan sekuensing yang paling tinggi nilainya, yaitu sekuen B5 dan C11. Kedua sekuen ini kemudian dialignment dengan spesies *G.brachypterus*. Setelah itu dilakukan pemotongan untuk menyamakan panjang seluruh sekuen, lalu direkonstruksi pohon filogenetik dan dihitung jarak genetiknya. Total sekuen yang dianalisis sebesar 363 bp.





Gambar 4.5 Pohon filogeni *Neighbour joining* dan *Maximum likelihood* dengan model estimasi jarak Tamura-Nei antara sekuen gen 12S rRNA ikan lempuk tipe B, C, & *Gobiopterus brachypterus*

Tabel 4.3 Hasil perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B, C, & *Gobiopterus brachypterus* dengan menggunakan model estimasi jarak Tamura-Nei (*bootstrap 1000*).

Spesies 1	Spesies 2	Dist	Std. Err	Similaritas
<i>G. brachypterus</i>	Ikan Lempuk Tipe B	8,2 %	1,6 %	91,812 %
<i>G. brachypterus</i>	Ikan Lempuk Tipe C	8,2 %	1,6 %	91,812 %
Ikan Lempuk Tipe B	Ikan Lempuk Tipe C	0,0 %	0,0 %	100,000 %

Keterangan : Dist) Distance / jarak genetik

: Std. Err) *Standart Error* / nilai kemungkinan kesalahan

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogeni (Gb. 4.5) dan hasil perhitungan jarak antara ikan lempuk tipe B, C, dengan *G.brachypterus* (Tb. 4.3) dapat diketahui bahwa ikan lempuk tipe B dan tipe C memiliki nilai similaritas sebesar 100 % dengan nilai *standart error* sebesar 0 %. Sedangkan nilai similaritas antara ikan lempuk tipe B maupun tipe C dengan *G.brachypterus* yaitu sebesar 91,8 % dengan nilai *standart error* sebesar 1,6 %.

Tabel 4.4 Hasil perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B, C, dan *G.brachypterus* dengan menggunakan model estimasi jarak Kimura 2-Parameter (*bootstrap 1000*).

Spesies 1	Spesies 2	Dist	Std. Err	Similaritas
<i>G. brachypterus</i>	Ikan Lempuk Tipe B	8,1 %	1,6 %	91,886 %
<i>G. brachypterus</i>	Ikan Lempuk Tipe C	8,1 %	1,6 %	91,886 %
Ikan Lempuk Tipe B	Ikan Lempuk Tipe C	0,0 %	0,0 %	100,000 %

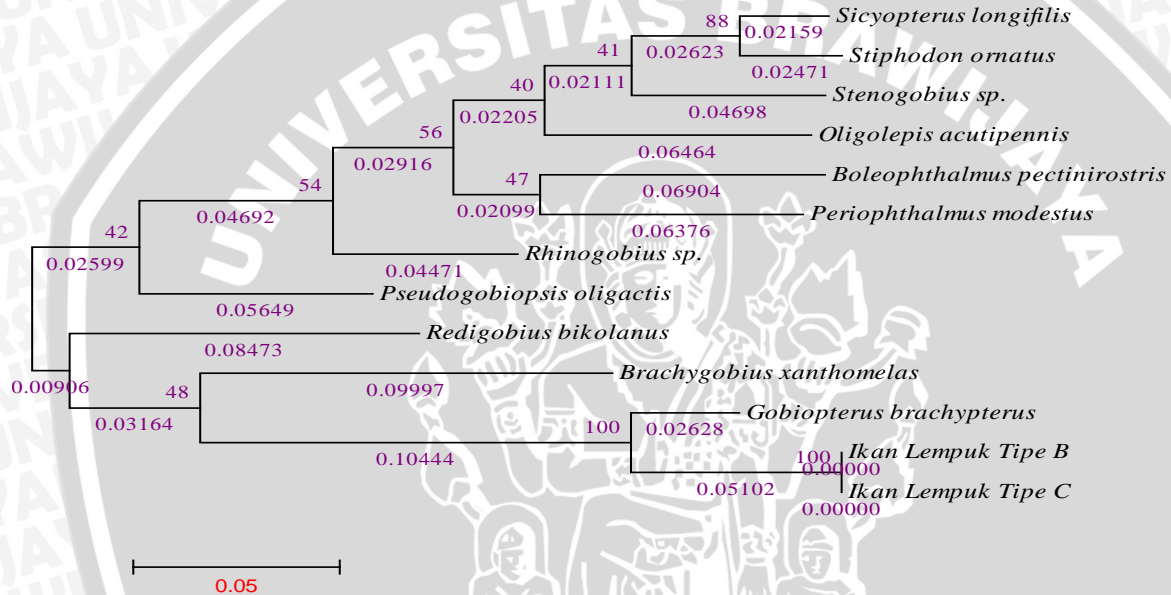
Berdasarkan hasil perhitungan jarak genetik dengan model estimasi jarak Kimura 2-Parameter dapat diketahui bahwa antara ikan lempuk tipe B dan tipe C memiliki nilai jarak genetik sebesar 0 % dengan nilai *standard error* 0 %. Sedangkan antara ikan lempuk tipe B dan tipe C dengan *G.brachypterus* menghasilkan nilai jarak genetik dan standart error yang sama yaitu berturut-turut 8,1 % dan 1,6% sehingga dapat dihitung nilai similaritasnya sebesar 91,8 %. Dari hasil perhitungan jarak genetik antara model estimasi jarak Tamura-Nei dan Kimura 2-parameter diketahui bahwa nilai hasil yang didapatkan tidak jauh berbeda, hal ini menandakan bahwa perhitungan dalam masing-masing model sudah cukup baik, kedua model tersebut memiliki model rumus perhitungan/algorithm yang berbeda namun keduanya sama-sama mengestimasi kemungkinan nilai jarak kekerabatan yang paling dekat diantara spesies. Cawthorn *et al* (2012) menyatakan bahwa berdasarkan sekuen gen 12S rRNA sebesar  $\pm 490$  bp, dua individu yang memiliki nilai jarak genetik maksimal dengan model estimasi jarak Kimura 2-Parameter sebesar 0.50 %, 2.30 %, dan 15.20 % dapat dikatakan berturut-turut sebagai satu spesies, satu genus, dan satu famili. Sehingga dapat dikatakan bahwa ikan lempuk diduga memiliki kesamaan famili dengan *G.brachypterus* namun tidak satu genus maupun satu spesies dengan *G.brachypterus*. Walaupun demikian, dalam hal ini masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan panjang basa yang lebih dari 363 bp.

Sekuen gen 12S rRNA dari mitokondrial DNA dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari suatu individu pada tingkat famili maupun genus. Menurut Alves *et al* (1995), Gen 12S rRNA pada mitokondrial DNA dapat digunakan untuk mempelajari hubungan kekerabatan filogenetik diantara taksa pada level famili, sedangkan Cawthorn *et al* (2012) menyebutkan bahwa sekuen gen ini mampu mengidentifikasi spesimen ikan sampai tingkat genus.

#### 4.6. Kesamaan Genetik Antara Ikan Lempuk dengan Ikan Gobioidi Sub Family *Gobionellinae* Berdasarkan Sekuen Gen 12S rRNA.

Ikan lempuk di danau Ranu Grati diduga memiliki kesamaan family dengan *G.brachypterus* yaitu famili *Gobiidae*. Family *Gobiidae* ini memiliki 5 subfamili yaitu subfamili *Gobiinae*, *Sicydiinae*, *Oxurdecinae*, *Amblyopinae*, dan *Gobionellinae*. Ikan *G.brachypterus* termasuk dalam subfamili *Gobionellinae*. Berdasarkan hal ini diperlukan penyelidikan lebih lanjut apakah ikan lempuk masih termasuk dalam satu subfamili yang sama dengan *G.brachypterus*.





Gambar 4.6 Pohon filogeni *Maximum Likelihood* dengan model estimasi jarak Tamura-Nei (*bootstrap* 1000) berdasarkan data sekuen gen 12S rRNA ikan lempuk tipe B, C, & 11 spesies subfamili *Gobionellinae*.

Tabel 4.5 Perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk tipe B, C, & 11 spesies subfamili *Gobionellinae* dengan menggunakan model estimasi jarak Tamura-Nei (bootstrap 1000).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ikan Lempuk Tipe B		0.000	0.016	0.031	0.030	0.033	0.029	0.029	0.030	0.031	0.031	0.031	0.032
Ikan Lempuk Tipe C	0.000		0.016	0.031	0.030	0.033	0.029	0.029	0.030	0.031	0.031	0.031	0.032
<i>Gobiopterus brachypterus</i>	0.079	0.079		0.030	0.027	0.032	0.031	0.031	0.028	0.031	0.030	0.030	0.029
<i>Boleophtalmus pectinirostris</i>	0.233	0.233	0.232		0.029	0.020	0.020	0.026	0.028	0.023	0.021	0.020	0.022
<i>Brachygobius xanthomelas</i>	0.243	0.243	0.208	0.214		0.028	0.027	0.026	0.027	0.026	0.026	0.026	0.025
<i>Oligolepis acutipennis</i>	0.243	0.243	0.237	0.123	0.218		0.023	0.027	0.028	0.024	0.020	0.018	0.020
<i>Periophtalmus modestus</i>	0.211	0.211	0.229	0.126	0.203	0.148		0.025	0.030	0.021	0.019	0.022	0.020
<i>Pseudogobius oligactis</i>	0.213	0.213	0.233	0.183	0.190	0.188	0.160		0.024	0.023	0.024	0.022	0.023
<i>Redigobius bikolanus</i>	0.228	0.228	0.210	0.206	0.198	0.200	0.221	0.157		0.027	0.026	0.026	0.025
<i>Rhinogobius sp.</i>	0.236	0.236	0.239	0.151	0.195	0.150	0.137	0.134	0.186		0.021	0.023	0.022
<i>Sicyopterus longifilis</i>	0.218	0.218	0.221	0.129	0.190	0.120	0.112	0.153	0.183	0.130		0.015	0.011
<i>Stenogobius sp</i>	0.225	0.225	0.224	0.129	0.183	0.105	0.142	0.134	0.191	0.142	0.081		0.017
<i>Stiphodon ornatus</i>	0.235	0.235	0.224	0.140	0.186	0.119	0.130	0.149	0.176	0.137	0.046	0.092	

Keterangan : nilai jarak genetik ditulis dengan warna hitam

: nilai *standart error* ditulis dengan warna biru

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik *Maximum likelihood* dan perhitungan jarak genetik dapat diketahui bahwa, diantara 11 spesies ikan dari subfamili *Gobionellinae*, ikan lempuk memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan *G.brachypterus* yaitu dengan nilai jarak genetik sebesar 7,9 % sehingga dapat dihitung nilai similaritasnya sebesar 92.1 %, dengan nilai stat/frekuensi sebesar 100, hal ini menandakan bahwa perhitungan jarak genetik sudah sangat akurat. Sehingga dapat dikatakan bahwa, ikan lempuk memiliki subfamili yang sama dengan *G.brachypterus* yaitu subfamili *Gobionellinae*.

Dari hasil yang didapatkan menyatakan bahwa ikan lempuk masih termasuk dalam satu famili dengan *Gobiopterus brachypterus*, namun masih terdapat keraguan apakah ikan lempuk berbeda *genus* dengan *G. brachypterus*. Sedangkan untuk hasil yang menyatakan bahwa ikan lempuk merupakan spesies yang berbeda dengan *G.brachypterus* dimungkinkan benar. Menurut Nosil & Rundle (2005), Adanya *barrier* geografis diantara satu populasi dan populasi lainnya pada satu spesies yang sama dalam jangka waktu yang lama dapat mengakibatkan spesiasi. Sehingga dari hal ini diduga bahwa spesies-spesies dari *Gobiopterus* spp. mengalami suatu spesiasi yang disebut spesiasi alopatrik, karena walaupun jangkauan area tinggal dari spesies *Gobiopterus* spp. ini luas, namun spesies ini hanya tinggal pada daerah-daerah tertentu. Imam (2011) menyatakan bahwa ikan lempuk memiliki karakteristik yang khas yaitu memiliki satu buah duri pada sirip dorsal kedua, sedangkan pada *G.brachypterus* yang dideskripsikan oleh Kottelat *et al* (1993) tidak memiliki duri sirip. Sehingga dengan adanya perbedaan morfologi inilah yang diduga menjadi salah satu penyebab ikan lempuk merupakan spesies yang berbeda dengan *G.brahpypterus*.

Menurut Leksono (2011), Spesiasi alopatrik adalah proses spesiasi yang terjadi pada area geografi yang berjauhan dari suatu spesies yang paling dekat hubungan kekerabatannya dan dipisahkan oleh *barrier* geografis. Karena kedua daerah mempunyai perbedaan dalam banyak hal, maka seleksi alam yang bekerja pada masing-masing area akan berbeda. Seiring dengan berjalannya waktu, kandungan alel dari masing-masing populasi akan menjadi berbeda karena proses divergensi genotip maupun fenotip. Berdasarkan hal ini dapat digambarkan bahwa diduga dengan adanya perbedaan lingkungan tempat tinggal ikan lempuk dengan *G.brachypterus* menyebabkan perbedaan adaptasi diantara keduanya, dan dalam jangka waktu yang lama dapat merubah

kandungan alel diantara keduanya, sehingga terjadi spesiasi salah satunya dengan modifikasi morfologi dari spesies tersebut untuk dapat bertahan hidup, salah satunya dengan pembentukan duri pada sirip seperti pada ikan lempuk. Namun dalam hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut, karena masih adanya keraguan tentang kesamaan genus antara ikan lempuk dan *G.brachypterus*.

*Gobiopterus brachypterus* merupakan spesies ikan yang termasuk dalam ordo *Perciformes*, subordo *Gobioidei*, famili *Gobiidae*, subfamili *Gobionellinae*, genus *Gobiopterus*. Menurut Nelson (1994), *Gobioidei* merupakan subordo terbesar dalam vertebrata, dimana terdapat 2000 spesies yang masih ada pada perairan air tawar, estuarina, dan perairan air laut. *Gobioidei* atau yang sering disebut dengan ikan gobioid ini diklasifikasikan ke dalam 270 genus. *G.brachypterus* dikelompokkan ke dalam famili *Gobiidae* karena memiliki lima *branchiostegal ray* yaitu tulang yang menempel pada kulit untuk menutupi insang pada ikan. Famili *Gobiidae* memiliki 5 subfamili. *G.brachypterus* dikelompokkan ke dalam subfamili *gobionellinae*, karena memiliki ciri khas yaitu dua epural, yang merupakan dua tulang tambahan diatas tulang hipural (tulang yang menempel pada tulang punggung terakhir, dimana tulang punggung terakhir ini termodifikasi menjadi *urostyle*).

#### **4.7 Biogeografi Spesies Ikan *Gobioidei*, Famili *Gobiidae*, Subfamili *Gobionellinae***

Biogeografi merupakan suatu ilmu yang mempelajari tentang makhluk hidup dan geografi, yaitu ilmu yang mempelajari penyebaran organisme (yang masih hidup maupun yang sudah punah) di bumi. Faktor-faktor lingkungan seperti suhu, curah hujan, jenis tanah, topografi dll dapat mempengaruhi pola penyebaran suatu organisme makhluk hidup (Wang *et al.*, 2003).

Larson *et al* (2008) menyatakan bahwa subfamili *Gobionellinae* memiliki 36 spesies yang tersebar di kepulauan Indonesia, Malaysia, Singapore, Filipina, Papua Nugini, Thailand, Cina dan India.

Tabel 4.6 Persebaran spesies ikan *Gobioidei*, famili *Gobiidae*, subfamili *Gobionellinae* (Larson *et al.*, 2008).

No.	Nama Spesies	Penemu	Lokasi
1.	<i>Brachygobius doriae</i>	Gunther	Sa, Si
2.	<i>Brachygobius kabiliensis</i>	Inger	Si, Bo, M
3.	<i>Calamania illota</i>	Larson	Si
4.	<i>Calamania polylepis</i>	Wu & Ni	Shanghai
5.	<i>Calamania variegata</i>	Peters	Si
6.	<i>Gnatholepis anjerensis</i>	Bleeker	Si
7.	<i>Gnatholepis caurensis</i>	Bleeker	Su, Si
8.	<i>Gobiopterus birtwistlei</i>	Herre	Si, M
9.	<i>Gobiopterus brachypterus</i>	Bleeker	Si, M, Ranu Grati
10.	<i>Gobiopterus nanayensis</i>	Herre	Filipina
11.	<i>Hemigobius hoevenii</i>	Lim & Larson	Bo, Si, M
12.	<i>Hemigobius mingi</i>	Herre	Si, Ma
13.	<i>Mugilogobius chulae</i>	Smith	Thailand, Si
14.	<i>Mugilobius fasciatus</i>	Larson	Si
15.	<i>Mugilogobius mertonii</i>	Weber	Aus, Serangoon
16.	<i>Mugilogobius platystomus</i>	Gunther	Si, M
17.	<i>Mugilogobius rambaiae</i>	Smith	Thailand, Si
18.	<i>Mugilogobius triginus</i>	Larson	Si
19.	<i>Oligolepis acutipennis</i>	Valenciennes	India, Si
20.	<i>Oxutrichthys auchenolepis</i>	Bleeker	Si
21.	<i>Oxutrichthys microlepis</i>	Bleeker	Madura, Si
22.	<i>Oxyurichthys papuaensis</i>	Valenciennes	Si, New Guinea
23.	<i>Oxurichthys uronema</i>	Weber	(Tl.Bi-ma), Si
24.	<i>Pandaka cf pygmaea</i>	Herre	Filipina, Si
25.	<i>Pseudogobiopsis oligactis</i>	Bleeker	Amboina, Si
26.	<i>Pseudogobiopsis siamensis</i>	Fowler	Si, Thailand
27.	<i>Pseudogobiopsis avicennia</i>	Herre	Si
28.	<i>Pseudogobiopsis Javanicus</i>	Bleeker	Pacitan
29.	<i>Pseudogobiopsis melanostictus</i>	Day	India, Si
30.	<i>Redigobius isognathus</i>	Bleeker	Si
31.	<i>Rhinogobius giurinus</i>	Rutter	China, Si
32.	<i>Stimatogobius borneensis</i>	Bleeker	Bo, Si
33.	<i>Stigmatogobius pleurostigma</i>	Bleeker	Surabaya, M
34.	<i>Stimatogobius sadanundio</i>	Hamilton	Si, M
35.	<i>Stigmatogobius sella</i>	Steindachner	Bo, Si

Keterangan :

Daftar penyebaran yang diblok dengan warna abu-abu merupakan spesies yang tersebar di Indonesia.

Sa : Sarawak

M : Malaysia

Si : Singapura

Aus : Australia

Bo : Borneo

Su : Sumatra



Dari hasil data penyebaran yang didokumentasikan oleh Larson *et al* (2008) dapat diketahui bahwa terdapat 12 spesies dari subfamili *Gobionellinae* yang tinggal di Kepulauan Indonesia, antara lain yaitu *Gnatholepis cauerensis*, *Brachygobius kabiliensis*, *Gobiopterus brachypterus* (spesies yang diduga sebagai ikan lempuk), *Hemigobius hoevenii*, *Oxutrichthys microlepis*, *Oxurichthys papuaensis*, *Oxurichthys uronema*, *Pseudogobiopsis oligactis*, *Pseudogobiopsis javanicus*, *Stigmatogobius borneensis*, *Stigmatogobius pleurostigma*, *Stigmatogobius sella*. Berdasarkan hasil data penyebaran tersebut diduga terdapat 4 kemungkinan kesamaan genus yang dimiliki oleh ikan lempuk, yaitu genus *Gnatholepis*, *Brachygobius*, *Gobiopterus*, *Hemigobius*, *Oxutrichthys*, *Pseudogobiopsis*, dan *Stigmatogobius*.





Gambar 4.7 Persebaran spesies ikan *Gobioidae*, subfamili *Gobionellinae* di Indonesia

Keterangan :

- |  |   |
|--|---|
| 1. Sumatra ( <i>Gnatholepis cauerensis</i> )                       | 6. Danau Ranu Grati, Pasuruan ( <i>G.brachypterus</i> ) |
| 2. Borneo ( <i>Stigmatogobius borneensis</i> )                     | 7. Teluk Bima, Sumbawa ( <i>Oxurichthys uronema</i> )   |
| ( <i>Brachygobius kabiliensis</i> ) ( <i>Hemigobius hoevenii</i> ) | 8. Ambon ( <i>Pseudogobius oligactis</i> )              |
| ( <i>Stigmatogobius sella</i> )                                    | 9. New Guineae ( <i>Oxutricthys papuaensis</i> )        |
| 3. Pacitan ( <i>Pseudogobius javanicus</i> )                       |   |
| 4. Surabaya ( <i>Stigmatogobius pleurostigma</i> )                 |   |
| 5. Madura ( <i>Oxutricthys microlepis</i> )                        |   |

## BAB V PENUTUP

### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa berdasarkan sekuen gen 12S rRNA, ikan lempuk tipe B dan tipe C diduga merupakan satu spesies yang sama, hal ini dibuktikan dengan nilai jarak genetik sebesar 0 % dan similaritas sebesar 100 %. Kesamaan genetik antara ikan lempuk dengan *G.brachypterus* sebesar 91.8 % dengan jarak genetik sebesar 8.2 %. Sedangkan dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik maupun perhitungan jarak genetik antara ikan lempuk dan 11 spesies dari subfamili *gobionellinae* menyatakan bahwa ikan lempuk memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan spesies *G.brachypterus*. Setelah dilakukan klarifikasi hasil dengan referensi yang didapatkan, ikan lempuk diduga masih termasuk dalam satu famili dan subfamili yang sama dengan *G.brachypterus*, namun tidak termasuk dalam satu genus yang sama dengan *G.brachypterus*.

### 5.2. Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian selanjutnya antara lain yaitu:

1. Penggunaan basa sekuen gen 12S rRNA yang lebih panjang pada analisis identifikasi kesamaan genetik, yaitu lebih dari 490 bp, agar hasil jarak genetik yang diperoleh dapat dibandingkan dengan literatur yang didapat.
2. Diperlukannya penelitian yang berhubungan dengan analisis fisiologi ikan lempuk untuk membuktikan kebenaran dugaan bahwa ikan lempuk tipe B berjenis kelamin betina dan ikan lempuk tipe C berjenis kelamin jantan.
3. Penggunaan sekuen gen mitokondrial DNA yang tidak *conserved*, seperti cytochrome B, Cytochrome Oxidase 1, maupun D-Loop, sehingga dapat diketahui nilai diversitas genetik dari ikan lempuk. Nilai diversitas genetik inilah yang nantinya digunakan sebagai informasi lanjutan dalam usaha

konservasi ikan lempuk, sehingga ikan lempuk tidak akan punah dan tetap lestari demi menjaga keseimbangan rantai makanan pada perairan Danau Ranu Grati, Pasuruan, Jawa Timur.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## DAFTAR PUSTAKA

- Alves-Gomes J, *et al.* 1995. Phylogenetic analysis of South American electric fishes (order:Gynotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 12:298-318.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, *et al.*, 1981. Sequence and Organization of The Human Mitochondrial Genome. *Nature.* 290:457–65.
- Anonymous. 2010. *Gobiopterus brachypterus* (Bleeker, 1855). <http://www.fishbase.gr/Summary/speciesSummary.php?id=25075&lang=bahasa.jpg>. Diakses tanggal 1 November 2011.
- Anonymous<sup>2</sup>. 2010. *Gobiopterus brachypterus*. <http://www.fishbol.org/species.php>. Tanggal akses 1 November 2011.
- Anonymous<sup>3</sup>. 2010. *Gobiopterus chuno*. <http://en.bdfish.org/2011/07/goby-gobiopterus-chuno-hamilton-1822/>. Tanggal akses 1 November 2011.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seideman, J.A. Smith, and K. Struhl. 2002. Short Protocols In Molecular Biology Fifth Edition. John Wiley Sons Inc. Canada.
- Bleeker, P., 1855. Verslaag Van Eenige Vischverzamelingen Van Oost-Java. *Natuurkundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie*, 9:391-414.
- Brown, W.M., George M., Wilson, A.C. 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *J Genetics.* 76(4):1967-1971.
- Brown, W.M., 1980. Polymorphism in Mitochondrial DNA of Humans as Revealed by Restriction Endonuclease Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3605–9.
- Cawthorn, D.M. *et al.* 2012. Evaluation of the 16s and 12s rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa. *SciVerse. Gene:* 491:40-48.
- Chauduri, H., 1951. Notes On The Embryonic Development Of The Transparent Goby, *Gobiopterus chuno* (Hamilton). *Central Inland Fisheries Research Station.* 27 (4):247-252.
- Dahm, R., R. Geisler, and C. Nusslein-Volhard. 2005. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2<sup>nd</sup> Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH. Germany.

- Doukakis, P., V.J. Birstein, G.I. Ruban, and R. DeSalle, 1999. Molecular genetic analysis among subspecies of two eurasian sturgeon species. *Acipenser Baerii* and *Acipenser Stellatus*, *Molecular Ecology* .8 (1):117-127.
- Dudu, A., Georgescu, S.E., Dinischiotu, A., Costache, M. 2010. PCR-RFLP Method to Identify Fish Species of Economic Importance. *Archiva Zootechnica*. 13(1):53-59.
- Garcia, A.A.F., Benchimol, L.L., Barbosa, A.M.M., Geraldi, I.O., Souza, C.L Jr. Souza, A.P. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, and SSR Markers For Diversity Studies in Tropical Inbred Line. *Genetics and Molecular Biology*. Brazil.
- Hamilton, F. 1822. An Account of The Fishes Found in The River Ganges and Its branches.
- Haryani, E.B.S., D. Agus., dan K. Isao. 2008. Konservasi Sumber Daya Ikan. Direktorat Konservasi dan Taman Nasional Laut. Jakarta.
- Hindell, J. S., dan Jenkins, G. P, 2004. Spatial and Temporal Variability in The Assemblage Structure of Fishes Associated With Mangroves (*Avicennia marina*) and Intertidal Mudflats in Temperate Australian Embayments. 144: 385-395.
- Imam, M. 2011. Variasi Morfologi Pada Ikan Lempuk (*Gobiopterus brachypterus*) di Danau Ranu Grati Pasuruan. Thesis. Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Imam, M. dan E. Arisoelaningsih. 2010. Potensi dan Ancaman ikan lempuk aebagai *flag species* untuk konservasi danau Ranu Grati Pasuruan. Basic Science Seminar 7 Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Kottelat, M., A.J. Whiten, S.N. Kartikasari, dan S. Wirjoatmojo, 1993. Ikan Air Tawar Indonesia Bagian Barat dan Sulawesi. Periplus Editions Limited. Jakarta.
- Larson, H.K., Z. Jaafar, & K.K.P. Lim. 2008. An annotated checklist of the gobioid fishes of Singapore. *The Raffles Bulletin of Zoology* 56(1):135-155.
- Leksono, A.S. 2011. Keanekaragaman Hayati:Teori dan Aplikasi. UB Press. Malang.
- Melchias, G. 2001. Biodiversity and Conservation. Science Publisher, Inc. USA.
- Moritz, C., Dowling, T.E., and Brown, W.M. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial Dnieper Relevance for Population Biology and Systematics. *Ann Rev Ecol Syst*. 18: 269-291.

- Mulyasari. 2007. Beberapa Teknik Penentuan Variasi Genetik Pada Ikan Untuk Proses Pemuliaan. *Media Akuakultur*. 1(2):177-182.
- Nosil, P. and Rundle, H. D. 2005. Ecological Speciation. *Ecology Letters*. *Ecological letters* 8:336-352.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the world*. Willey. New York.
- Nestor, N.O., and J.A Glazier, 2002. The Fractal Structure of The Mitochondrial Genomes. *Elsevier Science*. (331): 221-230.
- Nisa, A.R.K. 2011. Predasi Louhan Pada Lempuk dan Ikan Lain di Ranu Grati Kabupaten Pasuruan. Skripsi tidak diterbitkan. Jurusan Biologi FMIPA UB. Malang.
- Nugroho, E. 2001. Capability of Mitochondria DNA D-Loop Markers from Shark Species Identification. *IFR Journal*, 7(1):62-66.
- Pemerintah Kabupaten Pasuruan. 2010. Budidaya Keramba Jaring Apung. <http://www.pasuruankab.go.id>. Tanggal akses 1 November 2011.
- Pillay, T.V.R, dan K.K. Sarojini. 1950. On the Larval Development of The Indian Transparent Goby, *Gobiopterus chuno* (Hamilton) With Observation on Bionomics. *Central Inland Fisheries Research Station*. XVI (3): 181-187.
- Primack, R.B. 2004. *A Primer of Conservation Biology*. Third Edition. Sinauer Associates Inc. USA.
- Rahardjo. 1980. *Ichtyologi*. Departemen Biologi Perairan. Fakultas Perikanan IPB.
- Solihin, D. D., 1994. Ulas Balik Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi Populasi pada Hewan. *Jurnal Hayati* 1:1-4.
- Tambets, K., S. Rootsi, T. Kivisild, H. Help, P. Serk, *et al.*, 2004. The Western and Eastern Roots of The Saami The Story of Genetic “Outliers” Told by Mitochondrial DNA and Y Chromosomes. *Am. J.Hum. Genet.* 74:661–82.
- Tamura, K., Nei, M., Dudley, J., and Kumar, S. 2011. MEGA. Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute. Arizona
- Tjakrawidjaja, A.H. 2004. Proses domestikasi ikan arwana Irian (*Scleropagus jardinii*) di Kabupaten Merauke. Laporan Program Kompetitif LIPI. Jakarta.
- Vosshall, L., 2001. ABI Prism 310 Cycle Sequencing Protocol. Applied Biosystem. USA.

- Wang, H.Y., Tsai, M.P., and Sin, C.L. 2001. Universal Primers for Amplification of The Complete Mitochondrial 12s rRNA Gene in Vertebrate. *Zoological studies* 39(1):61-66.
- Wang, H.Y., Tzeng, C.S., and Shen, S.C. 2003. Conservation and Phylogeography of Taiwan Paradise Fish, *Macropodus opercularis* Linnaeus. *Acta Zoologica Taiwanica* . 10(2): 121-134.
- Wright, J.W. 1976. Introduction to Forest Genetics, Academic Press Inc. New York.
- Yamazaki, Y. 1996. *Scleropages formosus* in Rain Forest. Narumi. Tokyo. Japan.





Lampiran 1. Karakter Morfologi Ikan Lempuk tipe B, tipe C, *G. brachypterus*, & *G. chuno*

Ciri-Ciri	Tipe B	Tipe C	<i>G. brachypterus</i>	<i>G. chuno</i>
Jumlah duri sirip dorsal pertama	4 s/d 5	4 s/d 5	5	5
Jumlah duri dan jari sirip dorsal kedua	I,7 s/d I,8	I,7 s/d I,9	8	8 s/d 9
Jumlah duri dan jari sirip anal	I,10 s/d I,13	I,11 s/d I,15	11 s/d 12	10 s/d 11
Tinggi badan (BD)	4,5 s/d 5 kali lebih pendek dari panjang standar (SL)	4 s/d 4,5 kali lebih pendek dari panjang standar (SL)	6 kali lebih pendek dari panjang standar (SL)	4,5 s/d 5 kali lebih pendek dari panjang standar (SL)
Pigment pada pipi dan batas pre-operkulum	Hitam vertikal	Hitam vertikal	Hitam vertikal	Tidak ada tanda
Warna pada dorsal midline	Ada pigment hitam	Ada pigment hitam	Ada pigment hitam	Tidak ada pigment
Panjang standar (SL)	22 mm (mean)	24 mm (mean)	18 mm	20 mm

## Lampiran 2. Susunan Nukleotida Gen 12S rRNA *Gobiopterus brachypterus* dari Sumber NCBI

LOCUS AF265404 979 bp DNA linear VRT 20-SEP-2001

DEFINITION *Gobiopterus brachypterus* 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product.

ACCESSION AF265404

VERSION AF265404.1 GI:12658285

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion *Gobiopterus brachypterus*

ORGANISM [Gobiopterus brachypterus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Gobioidi; Gobiidae; Gobiinae; Gobiopterus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 979)

AUTHORS Wang, H. Y., Tsai, M. P., Dean, J. and Lee, S. C.

TITLE Molecular phylogeny of gobioid fishes (Perciformes: Gobioidi) based on mitochondrial 12S rRNA sequences

JOURNAL Mol. Phylogenet. Evol. 20 (3), 390-408 (2001)

PUBMED [11527466](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 979)

AUTHORS Wang, H. -Y. and Tsai, M. -P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (10-MAY-2000) Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..979

/organism="Gobiopterus brachypterus"

/organelle="mitochondrion"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:[150303](#)"

[rRNA](#)

1..979

/product="12S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 caaaagcttg gtctgactt tagtatcagc tctgtttaa cttatacatg caagtatctg
61 caccocatgt gagaatgcc taccatactt ttcacctcca taagttaaag gagctggcat
121 caggcagcag cactagtcg gccaaaaca ctttgaata gccacacccc caccggctct
181 cagcagtaat taatcttaag caataagtga aaacttgact tagttataca ccaaggagag
241 ccgtaaaac tcgtccagc caccgcggtt atacgagggg ctcaagtga tatattaacg
301 gcgtagaag tggttactac atcgaattaa actaaagcta aacacctctt atgttggtat
361 acccacctga tggtaggaaa cattttccac gaaagtgc caactcctca caactcca
421 ctaaagctag gaaacaaacc gggattagat acccgcctct gccctcctct aadacaagt
481 gtttatttac acccacctcc acttgccagg gaactacgag cccagctta aaacccaag
541 gacttggcgg tgcttagac ccacctagag gagcctgttc tagaaccgat aaccccggtt
601 taacctcacc ettecttgca tccctccgcg etatatacgg eegtgtctag cttaccctt

```

Primer Forward

661 gagggatcca caataagcat aattgctcag cccccaacac gacaggtcga ggtgtagcgc  
721 atgaaagga aagaaatggg ctacattcaa tggatacaat gaataacgga taatgttttg  
781 aaatatacat ttttaaggagg atttagcagt aaagagaaaa agcagagtgt tctcttgaaa  
841 ctggccctga agcgcgcaca caccgcccgt cactctcccc aaacaccctt attaaactat  
901 aaataaaaca aagtttttct aaaagaaggg gaggcaagtc gtaacatggt aagtgtaccg  
961 gaaggtgcac ttggaaaaa

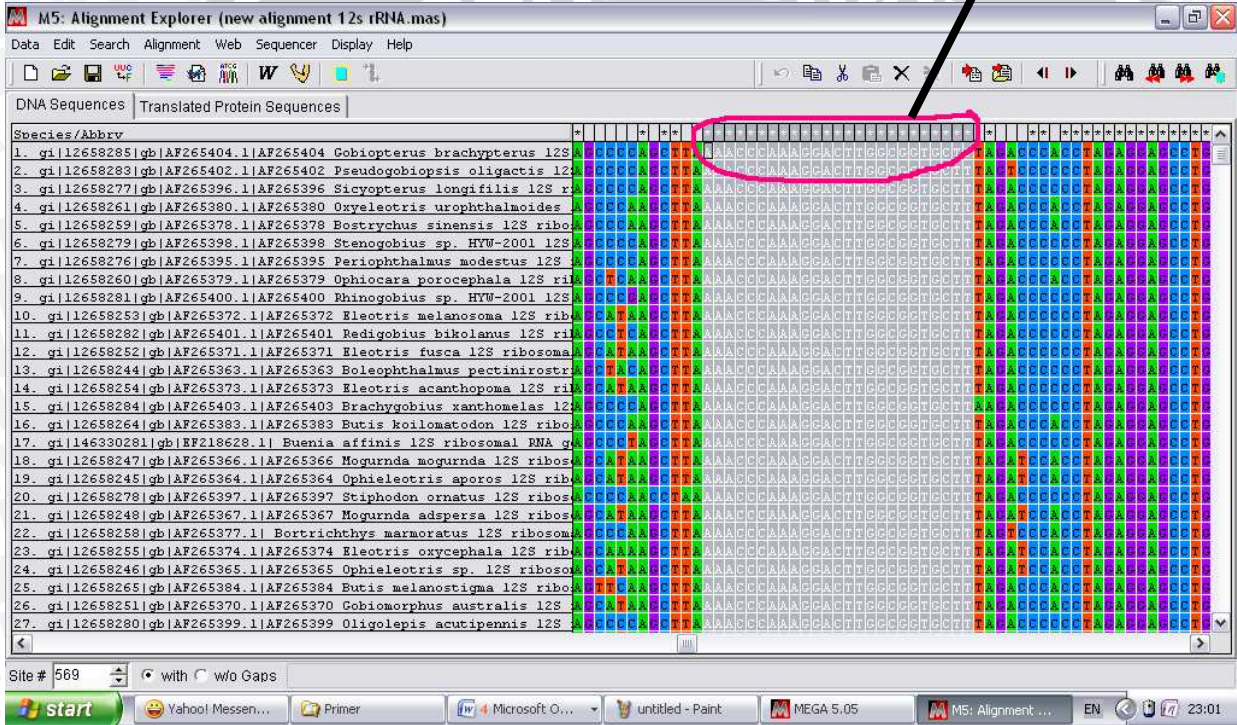
Primer Reverse

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



### Lampiran 3. Desain Primer

Conserved region



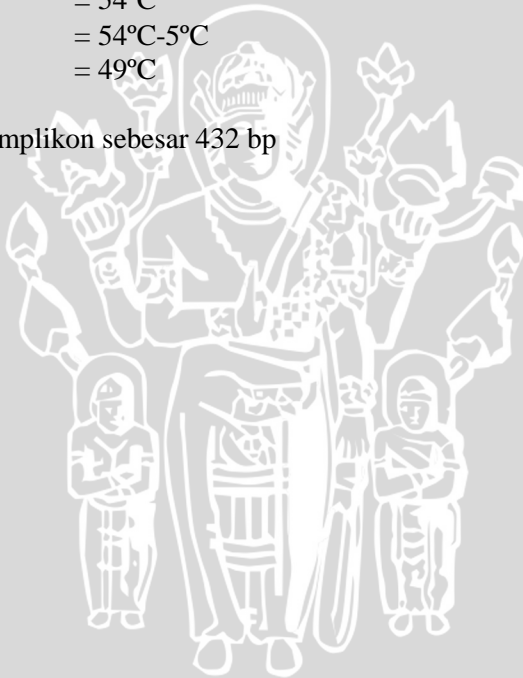
Keterangan: Daerah conserved merupakan daerah yang dilingkari garis berwarna merah muda. Daerah conserved tersebut - nantinya akan dibuat sebagai primer forward.

Adapun rincian perolehan hasil desain primer yaitu sebagai berikut:

5'- AAACCCAAAGGACTTGGC -3' (Primer Forward) Sekuen 531-548

5'- TCCGGTACACTTACCATG -3' (Primer Reverse) Sekuen 945-962

- Jumlah %GC =  $9/18 \times 100\%$   
= 50%
- $T_m$  =  $((\Sigma(A+T)) \times 2) + ((\Sigma(G+C)) \times 4)$   
=  $((9 \times 2) + (9 \times 4))$   
=  $(18 + 36)$   
=  $54^\circ\text{C}$
- $T_a$  =  $54^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C}$   
=  $49^\circ\text{C}$
- Panjang amplikon sebesar 432 bp

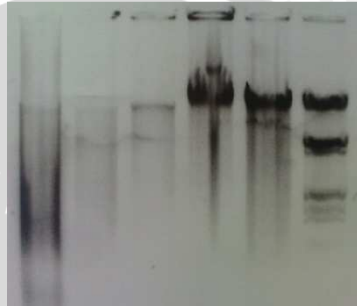


Lampiran 4. Hasil Uji Kualitatif Isolasi DNA Ikan Lempuk

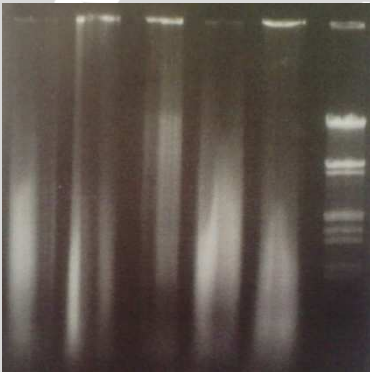
B1 B2 B3 B4 B5 M



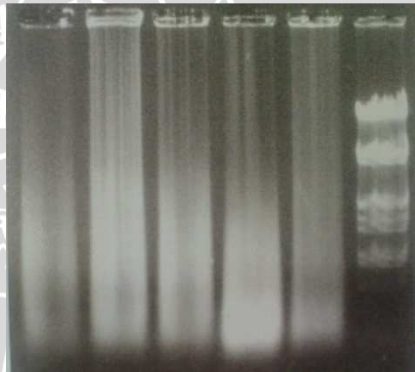
B6 B7 B8 B9 B10 M



B11 B12 B13 B14 B15 M



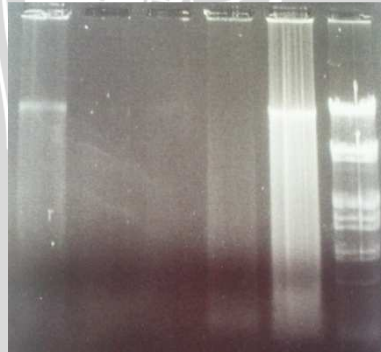
C1 C2 C3 C4 C5 M



C6 C7 C8 C9 C10 M



C11 C12 C13 C14 C15 M



# Lampiran 5. Diagram Hasil Sekuensing Isolat B4, B5, C11, & C13



Sekeun Gen 12S rRNA Ikan Lempuk B4.ab1

KB 1.4.0 KB.bcp

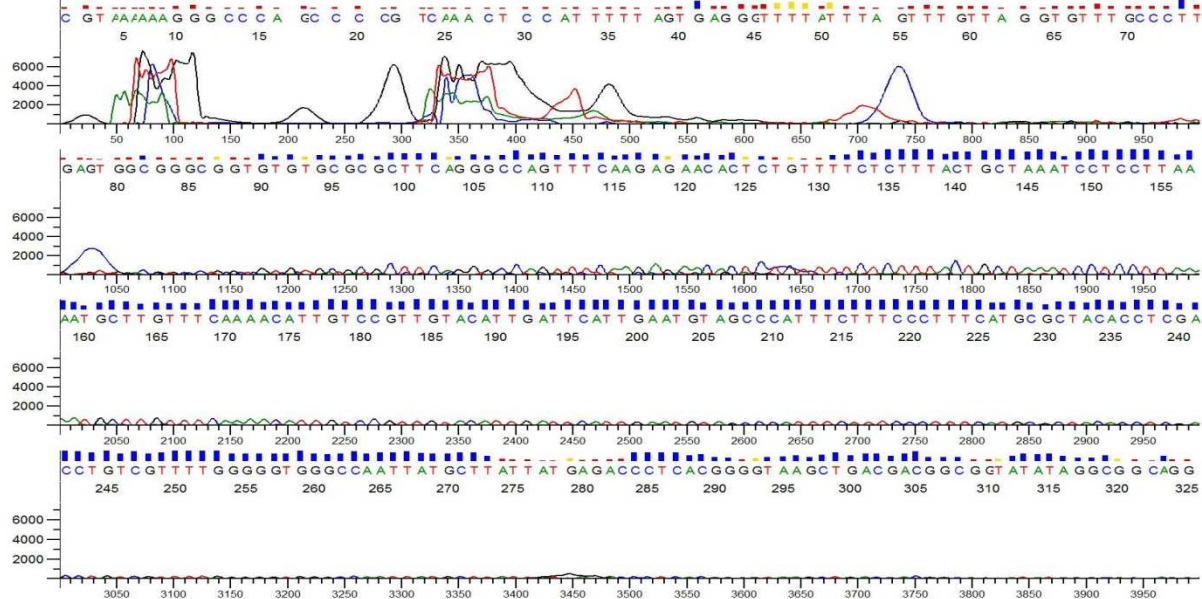
b4

KB\_310\_POP6\_BDTV3\_50Std.mob

Signal: G:617 A:358 T:340 C:374 AvgSig: 422

Ch#:1 W:A1 Plate Name:Unassigned

TS:29 CRL:235 QV20+237



Inst Model/Name:310 /ABI PRISM 310

Pure Base QVs: 1520

Printed on: May 23,2012 15:59:07 GMT

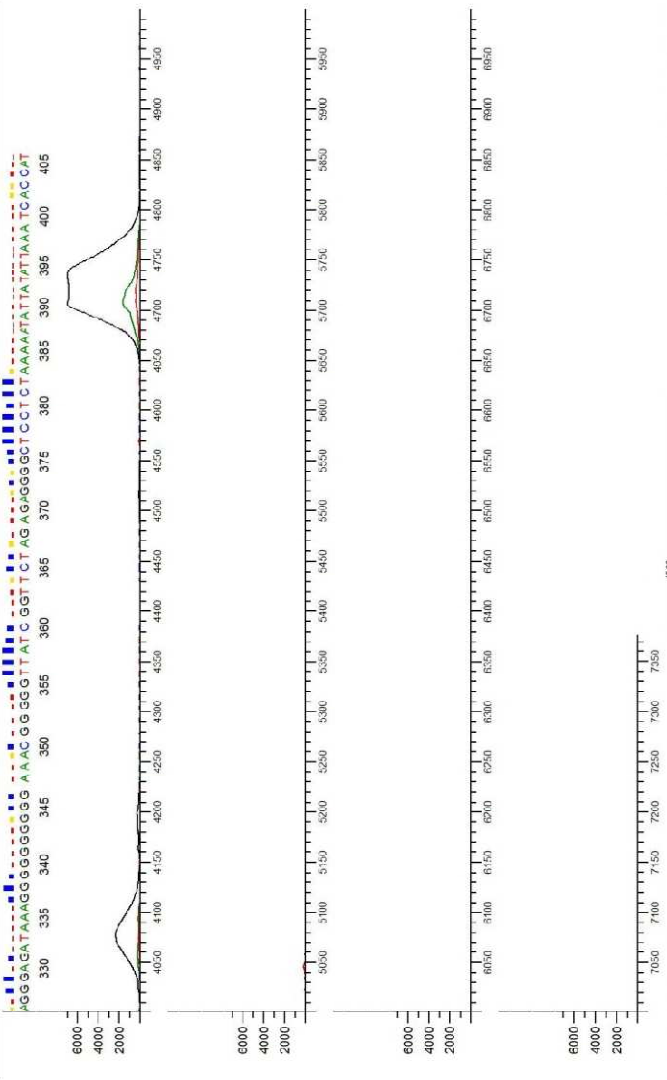
Sequence Scanner v1.0

Mixed Base QVs: 10 16

Electropherogram Data Page 1 of 2

Signal: G 617 A 368 T 340 C 374 AvgSg: 422

AGG SA GAT AAAGGGGGGGG A A A C G G G G T A T C G G T T C T A A A A F T T A T T T A A A T C A C C A T







Sekeun Gen 12S rRNA Ikan Lempung B5 ab1

B-125rRNAGB

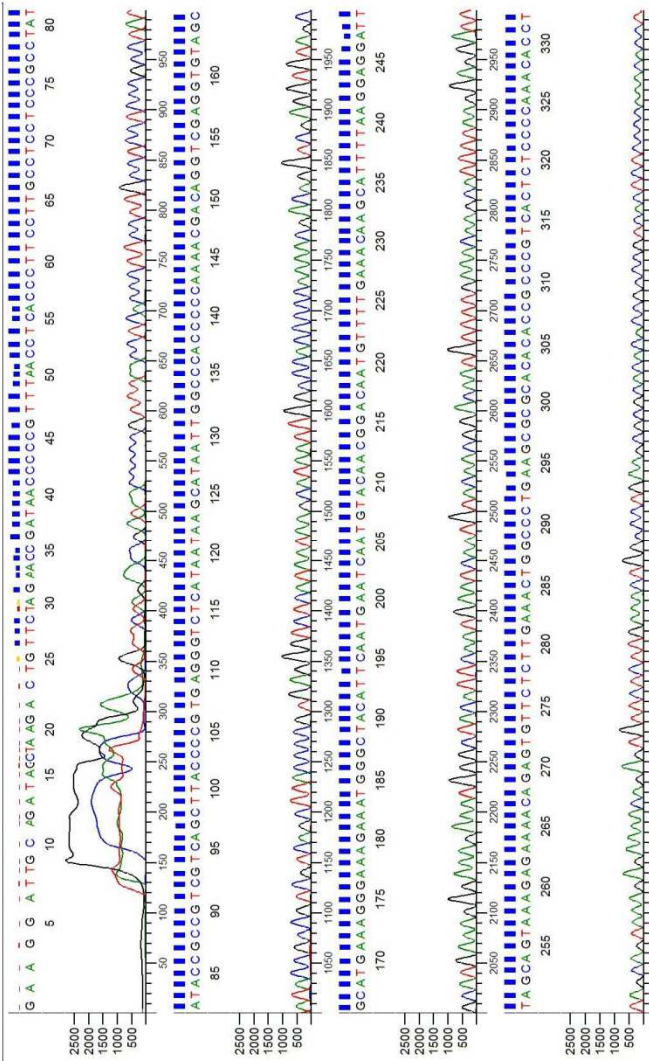
Signal: G.2801.A.3489 T.2457 C.3595 AvgSig: 3065

#F: 14 W: C3 Plate Name: 120321-17

KB1.4.0 KB.bcp

KB\_3730\_POPP\_BDTV3.mob

TS:55 CRL:365 OV:20-372



Inst Model/Name: 3730Xi/Microgen3730XL03-1623-027  
Sequence Scanner v1.0  
Printed on: May 23, 2012 16:59:12 GMT  
Electropherogram Data Page 1 of 5



Selexion Gen 12S rRNA Ikan Lempuk B5 ab1

B-126/rNAGB

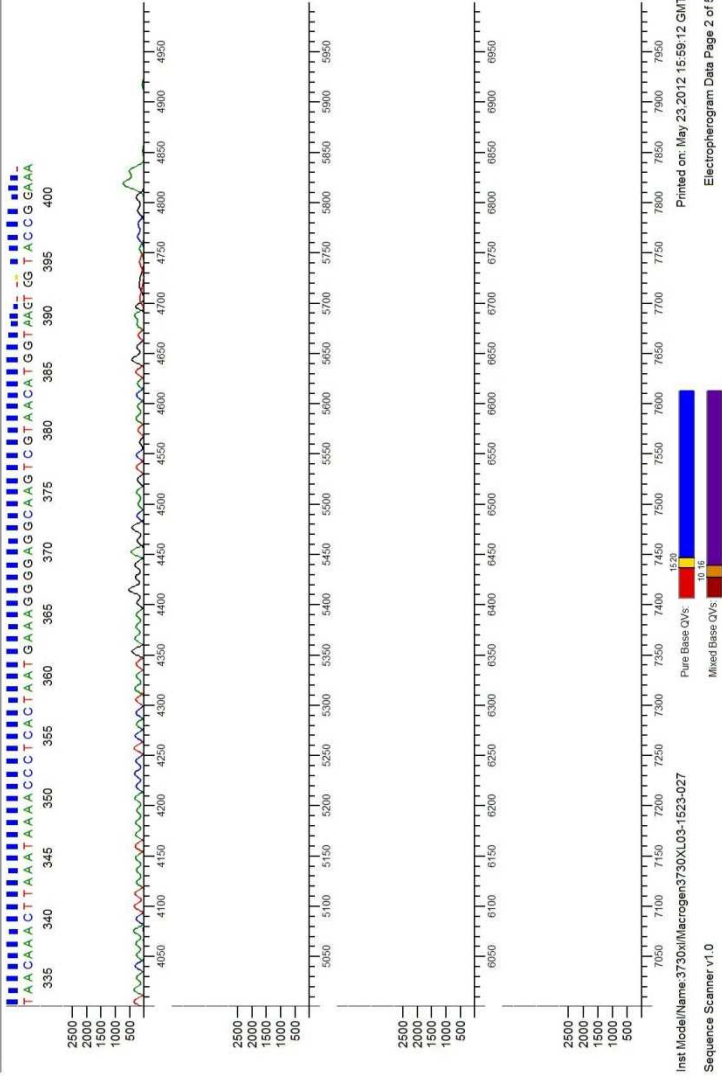
KB 1.4.0 KB bcp

KB\_3730\_POP7\_BD1V3.mob

Signal: G.2801.A.3489.T.2457.C.3595.AvgSig: 3085

Ch# 14 W.C3 Plate Name: 120321-17

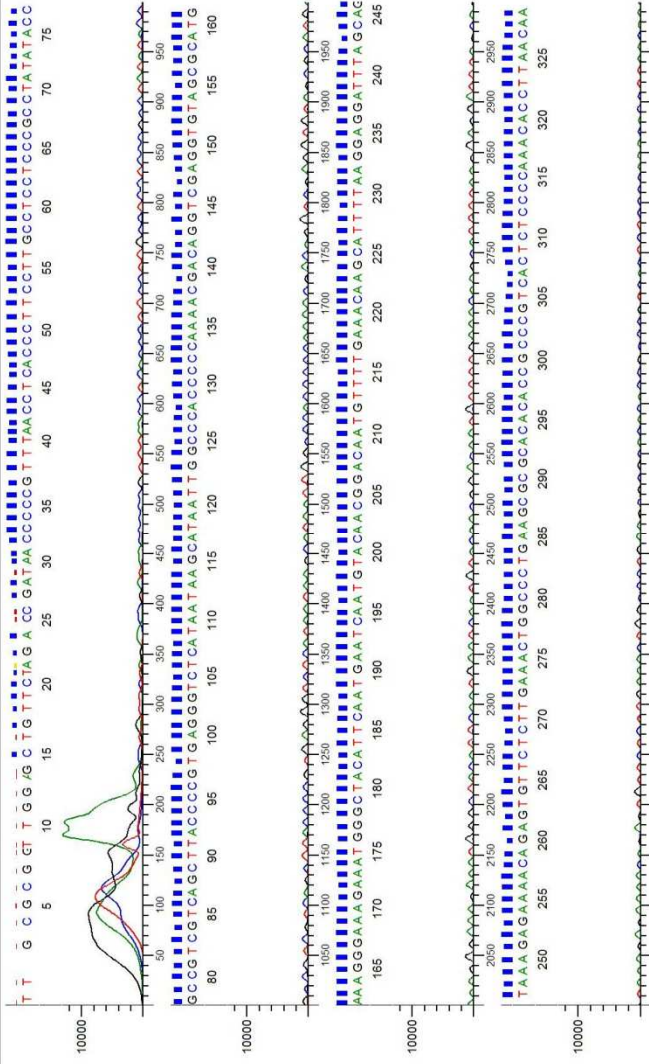
TS55 CRL365 QV20-372



Inst Model/Name: 3730xl/Macrogen3730XL03-1623-027  
Sequence Scanner v1.0

Printed on: May 23, 2012 15:59:12 GMT  
Electrothermogram Data Page 2 of 5

Pure Base QVs  
Mixed Base QVs





Sekelun Gen 12S rRNA Ikan Lempung C11.ab1

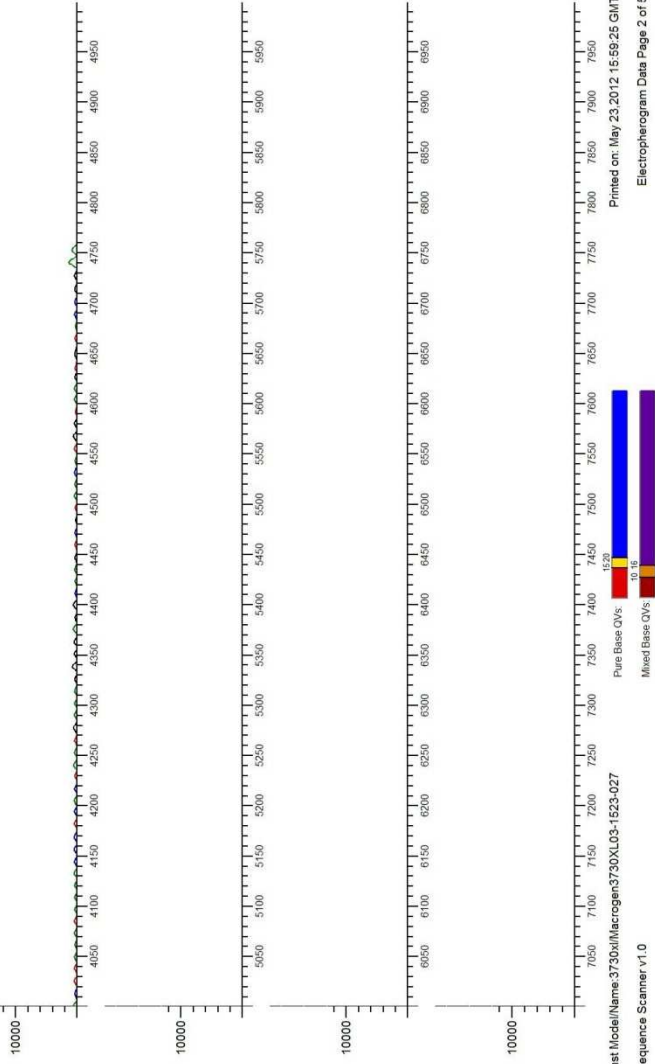
C:125FRNAGB

Signal: G-906 A:1208 T:842 C:1062 AvgSig: 1004

Ch#: 12 W:ES Plate Name:120321-17

KB 1.40 KB.bcp  
KB\_3730\_POP7\_BDT13.mob  
TS-50 CRL360 QV20-370

ACT T A A A T A A A A C C C T C A C T A T G A A A G G G G A G G C A A G T C G T A C A T G G T A A G T G T A C C G G A



Inst Model/Name:3730xl/Macrogen3730XL03-1623-027

Printed on: May 23, 2012 15:59:25 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 2 of 5





Sekleun Gen 12S rRNA Ikan Lempot C13.ab1

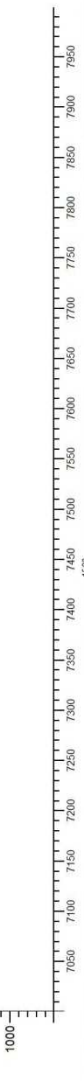
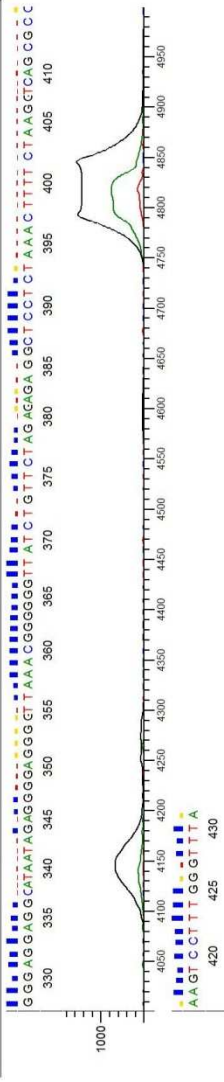
KB 1.4.0 KB.bcp  
KB\_310\_POP8\_BDTv3\_50Std.mob

c13

Signal: G:670 A:321 T:251 C:335 AvgSig: 394

#2 W.A.3 Plate Name:Unassigned

TS:37 CRL:258 QV:20--286



Inst Mode/Name:310/ABI/PRISM.310  
Sequence Scanner v1.0

Pure Base QVs: 10.1  
Mixed Base QVs: 10.1

Printed on: May 23, 2012 15:59:00 GMT  
Electropherogram Data Page 2 of 3